



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ALINE DE SOUZA NICOLETTI

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS PLASMÁTICOS EM
RESPOSTA A INFECÇÃO POR SARS-COV-2**

CAMPINAS

2023

ALINE DE SOUZA NICOLETTI

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS PLASMÁTICOS EM
RESPOSTA A INFECÇÃO POR SARS-COV-2**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

ORIENTADOR: PATRICIA MORIEL

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA ALINE DE SOUZA NICOLETTI E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. PATRICIA MORIEL

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

N544a Nicoletti, Aline de Souza, 1990-
Avaliação da expressão de microRNAs plasmáticos em resposta a infecção por SARS-CoV-2 / Aline de Souza Nicoletti. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Patricia Moriel.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. MicroRNA. 2. COVID-19. 3. SARS-CoV-2. 4. Biomarcadores. 5. Epigenética. I. Moriel, Patricia, 1972-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Evaluation of plasma microRNA expression in response to SARS-CoV-2 infection

Palavras-chave em inglês:

MicroRNA

COVID-19

SARS-CoV-2

Biomarkers

Epigenetics

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

Patricia Moriel [Orientador]

Mariangela Ribeiro Resende

Magnun Nueldo Nunes dos Santos

Paulo Caleb Júnior de Lima Santos

Tiago Campos Pereira

Data de defesa: 11-10-2023

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3606-495X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2850210083178579>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO/DOCTORADO

NOME DO ALUNO – COMO CONSTA NA ATA DE DEFESA

ORIENTADOR: Profa. Dra. Patricia Moriel

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROFA. DRA. PATRICIA MORIEL**
 - 2. PROFA. DRA. MARIANGELA RIBEIRO RESENDE**
 - 3. PROF. DR. MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS**
 - 4. PROF. DR. PAULO CALEB JÚNIOR DE LIMA SANTOS**
 - 5. PROF. DR. TIAGO CAMPOS PEREIRA**
-

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 11/10/2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais Pedro e Marineide, meus maiores exemplos de amor, honestidade, fé e persistência. A vocês, toda minha gratidão e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar os meus caminhos e por me permitir concluir mais essa etapa em minha vida.

Aos meus pais, a minha irmã, a minha avó (*in memoriam*) e ao meu namorado por me apoiarem e acreditarem em mim.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Patricia Moriel, pela orientação efetiva, pela confiança e pelas oportunidades a mim concedidas ao longo do Doutorado. Sem a sua orientação, eu provavelmente não teria chegado até aqui.

À Marília e ao Prof. Éder, pela parceria e por todo aprendizado compartilhado.

À equipe do laboratório (Mariana, Nadine, Carla, Pedro, Rafael, Cecília, João, Fabiana, Júlia Franco, Laura e a todos os ICs) por todo aprendizado compartilhado.

À Faculdade de Ciências Médicas (FCM) e Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) por disponibilizar a base para meu desenvolvimento profissional.

A todos os voluntários e pacientes que consentiram em participar deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Códigos de Financiamento 2021/04669-9, 2021/12359-0, e 2021/12387-3 pelo auxílio financeiro à pesquisa.

EPIGRAFE

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância”.

Hipócrates

RESUMO

Introdução: A COVID-19 tem como agente etiológico o vírus SARS-CoV-2. A maioria dos pacientes sintomáticos desenvolve sintomas leves, no entanto, alguns pacientes podem progredir para doença grave-crítica, com pneumonia, SARS, disfunção múltipla de órgãos e morte. O entendimento dos mecanismos moleculares e inflamatórios da COVID-19 é essencial e os miRNAs constituem uma das formas de regulação destes mecanismos. Eles são moléculas pequenas de cadeia simples de RNA formadas por ~22 nucleotídeos não codificantes, que participam da regulação pós-transcricional da expressão gênica. Devido à sua expressão específica em diferentes tecidos e estados patológicos, os miRNAs circulantes têm sido alvo de investigações como possíveis biomarcadores de doenças, incluindo as infecções virais como a COVID-19. **Objetivos:** 1) Identificar quais miRNAs estão desregulados na infecção por SARS-CoV-2, através de uma revisão de escopo; 2) Identificar, por NGS, os principais miRNAs plasmáticos que estão desregulados na infecção por SARS-CoV-2 em humanos e realizar a análise *in silico* destes; 3) Validar a expressão dos miRNAs plasmáticos desregulados em resposta a infecção por SARS-CoV-2 em humanos, selecionados na etapa de sequenciamento, por RT-qPCR. **Metodologia:** 1) A revisão de escopo foi conduzida seguindo as recomendações da PRISMA-ScR e incluiu a elaboração de uma estratégia de busca, a seleção dos estudos, a extração e análise dos dados e as análises de bioinformática; 2 e 3) O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP. Os pacientes com COVID-19 foram recrutados do HES, do CeCom e do Hospital Municipal de Paulínia, enquanto os controles foram recrutados da comunidade UNICAMP. Para todos os participantes, amostras de sangue foram coletadas, e a extração de miRNAs foi realizada a partir de plasma. Para o objetivo 2, as etapas que se seguiram foram a construção de bibliotecas, o sequenciamento e as análises de bioinformática, enquanto para o objetivo 3 as etapas foram a síntese de cDNA, a RT-qPCR, e a análise *in silico*. Para os objetivos 2 e 3, análises estatísticas foram realizadas. **Resultados:** 1) 20 estudos foram incluídos e os miRNAs desregulados mais importantes foram os miR-21-5p, miR-146a, miR-126-3p, miR-144 e miR-155; 2) 18 miRNAs foram

expressos diferencialmente entre pacientes com COVID-19 e controles. A análise de bioinformática apontou as 50 vias de sinalização mais enriquecidas;

3) Dos 3 miRNAs validados, o miR-320b foi o único miRNA significativamente mais expresso no grupo de pacientes com COVID-19 comparado ao grupo controle. Para os miR-4433b-5p e miR-16-2-3p, nenhuma diferença significativa na expressão gênica foi encontrada. **Conclusões:** Os miRNAs desregulados mais importantes identificados na revisão de escopo que podem desempenhar um papel na patogênese do COVID-19 foram miR-21-5p, miR-146a, miR-126-3p, miR-144 e miR-155; O estudo identificou 18 miRNAs expressos diferencialmente entre pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e controles, que podem ser usados como possíveis biomarcadores da COVID-19 depois de serem validados por RT-qPCR; Este trabalho confirmou que o miR-320b permite distinguir entre pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e participantes controles para a população estudada, entretanto, mais estudos são sugeridos para confirmar o papel do miR-320b como um alvo no tratamento da COVID-19 ou como um biomarcador da doença.

Palavras-chave: MicroRNA; MiRNA; Epigenética; COVID 19; SARS-CoV-2; Biomarcadores.

ABSTRACT

Introduction: COVID-19 has the SARS-CoV-2 virus as its etiological agent. Most symptomatic patients develop mild symptoms, however, some patients may progress to severe-critical illness, with pneumonia, SARS, multiple organ dysfunction, and death. Understanding the molecular and inflammatory mechanisms of COVID-19 is essential and miRNAs constitute one of the ways to regulate these mechanisms. They are small, single-stranded RNA molecules formed by ~22 non-coding nucleotides, which participate in the post-transcriptional regulation of gene expression. Due to their specific expression in different tissues and pathological states, circulating miRNAs have been the target of investigations as possible biomarkers of diseases, including viral infections such as COVID-19. **Aims:** 1) Identify which miRNAs are deregulated in SARS-CoV-2 infection, through a scoping review; 2) Identify, by NGS, the main plasma miRNAs that are deregulated in SARS-CoV-2 infection in humans and perform in silico analysis of them; 3) Validate the expression of plasma miRNAs deregulated in response to SARS-CoV-2 infection in humans, selected in the sequencing stage, by RT-qPCR. **Methods:** 1) The scoping review was conducted following PRISMA-ScR recommendations and included the development of a search strategy, study selection, data extraction and analysis and bioinformatics analyses; 2 and 3) The study was approved by the UNICAMP Research Ethics Committee. Patients with COVID-19 were recruited from HES, CeCom and Hospital Municipal de Paulínia, while controls were recruited from the UNICAMP community. For all participants, blood samples were collected, and miRNA extraction was performed from plasma. For objective 2, the steps that followed were library construction, sequencing and bioinformatics analyses, while for objective 3 the steps were cDNA synthesis, RT-qPCR, and in silico analysis. For objectives 2 and 3, statistical analyzes were performed. **Results:** 1) 20 studies were included and the most important dysregulated miRNAs were miR-21-5p, miR-146a, miR-126-3p, miR-144 and miR-155; 2) 18 miRNAs were differentially expressed between COVID-19 patients and controls. The bioinformatics analysis identified the 50 most enriched signaling pathways; 3) Of the 3 validated miRNAs, miR-320b was the only miRNA significantly more expressed in the group of

patients with COVID-19 compared to the control group. For miR-4433b-5p and miR-16-2-3p, no significant differences in gene expression were found.

Conclusions: The most important dysregulated miRNAs identified in the scoping review that may play a role in the pathogenesis of COVID-19 were miR-21-5p, miR-146a, miR-126-3p, miR-144, and miR-155; The study identified 18 differentially expressed miRNAs between patients infected with SARS-CoV-2 and controls, which can be used as possible biomarkers of COVID-19 after being validated by RT-qPCR; This work confirmed that miR-320b allows distinguishing between patients infected by SARS-CoV-2 and control participants for the studied population, however, further studies are suggested to confirm the role of miR-320b as a target in the treatment of COVID-19 or as a biomarker of the disease.

Keywords: MicroRNA; miRNA; Epigenetics; COVID-19; SARS-CoV-2; Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Características clínicas da COVID-19

Figura 2: Mecanismo de infecção da célula pelo SARS-CoV-2 e a consequente cascata de resposta inflamatória

Figura 3: Biogênese de um miRNA

Figura 4: Etapas da extração de miRNA

Figura 5: Etapas da montagem das bibliotecas de miRNA

Figura 6: Etapas da síntese de cDNA

Figura 7: Etapas da RT-qPCR

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: MiRNAs desregulados em diferentes infecções virais

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	Região 3' Não Traduzida
5'UTR	Região 5' Não Traduzida
ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
BPM	Batimentos por minuto
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	DNA complementar
CeCom	Centro Comunitário de Saúde da Universidade Estadual de Campinas
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CliPhar	Laboratório de Farmácia Clínica
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
CoVs	Coronavírus
CRISPR	Agrupados de Curtas Repetições Palindrômicas Regularmente Interespaçadas
CT	Ciclo de quantificação
CXCL10	Ligante de quimiocina de motivo C-X-C 10
CXCL8	Ligante de quimiocina de motivo C-X-C 8
DAMP	Padrões Moleculares Associados ao Dano Celular
DCs	Células Dendríticas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT1	DNA Metiltransferase 1
DNMT3A	DNA Metiltransferase 3A
DNMT3B	DNA Metiltransferase 3B
DNMTs	DNA Metiltransferases
dNTPs	Deoxinucleotídeos trifosfatos
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
EDTA	Etilenodiamino-tetracético
ELISA	Ensaio do Tipo Imunossorvente Ligado a Enzima

EUA	Estados Unidos da América
FC	Fold-change
FDA	Food and Drug Administration
FR	Fold-regulation
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos
H2A	Histona 2A
H2B	Histona 2B
H3	Histona 3
H4	Histona 4
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HES	Hospital Estadual de Sumaré
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana 1
HSV	Herpes Simples
IDT	Integrated DNA Technologies
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IP-10	Proteína 10 induzida por Interferon-gama
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
ISGs	Genes Estimulados por IFN
LacTAD	Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho em Ciências da Vida
LD	Lactato Desidrogenase
LFA	Ensaio do Tipo Fluxo Lateral
Lig	Ligase
MCP1	Proteína Quimioatraente de Monócitos-1
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Oriente Médio Coronavírus
MGB	Aglutinante de ranhura menor
MIP1 α	Proteína Inflamatória 1 α de Macrófagos
MIP1 β	Proteína Inflamatória 1 β de Macrófagos

miRNAs	MicroRNAs
ncRNAs	RNAs não-codificantes
NFQ	Corante quencher não-fluorescente
NGS	Sequenciamento de Próxima Geração
NPM1	Nucleofosmina 1
OMSO	Organização Mundial de Saúde
ORFs	Open Reading Frames
P	DNA polimerase de inicialização à quente
PaO ₂ /FiO ₂	Relação pressão parcial de oxigênio/fração inspirada de oxigênio
PAP	Polimerase Poli(A)
pH	Potencial Hidrogeniônico
pri-miRNA	MiRNA primário
PRISMA-ScR	Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses statement for Scoping Reviews
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa
R	Corante repórter
RBD	Domínio de Ligação ao Receptor
RdRP	RNA Polimerase dependente de RNA
RISC	Complexo de Indução ao Silenciamento
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNase	Ribonuclease
RNA-seq	Sequenciamento de Próxima Geração de RNA
ROC	Receiver Operating Characteristics
RT	Transcrição Reversa
RT-LAMP	Amplificação Isotérmica mediada por Loop de Transcrição Reversa
RT-PCR	Reação em Cadeia de Polimerase com Transcrição Reversa em Tempo Real
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa Quantitativa em Tempo Real
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus

SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2
SARSr-CoVs	Coronavírus relacionados ao SARS
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
sgRNA	RNAs subgenômicos
SpO2	Saturação de oxigênio
TC	Tomografia Computadorizada
TMPRSS2	Protease Transmembrana Serina 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TP	Tempo de Protrombina
UMI	Identificadores Únicos Moleculares
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTM	Meio de Transporte Universal
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
1.1 COVID-19.....	20
Origem, taxonomia e genômica.....	20
Transmissão, sintomatologia, e mecanismo de infecção da célula pelo SARS-CoV-2.....	22
Diagnóstico.....	26
Tratamento.....	30
Prevenção.....	32
1.2 Mecanismos epigenéticos de regulação da infecção.....	33
1.3 MiRNAs.....	35
MiRNAs em infecções virais.....	37
2. Objetivos.....	42
2.1 Objetivo geral.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
3. Metodologia.....	43
Parte 1 – Revisão de escopo.....	43
Parte 2 – Estudo experimental.....	44
A) Parte comum aos objetivos específicos 2 e 3.....	44
B) Objetivo específico 2.....	48
C) Objetivo específico 3.....	51
4. Resultados.....	57
Artigo 1.....	59
Artigo 2.....	70
Artigo 3.....	83
5. Discussão.....	97
6. Conclusão.....	101
7. Referências.....	102
8. Anexos.....	109
8.1 Anexo I.....	110

8.2 Anexo II.....	135
8.3 Anexo III.....	157
8.4 Anexo IV.....	164

1. INTRODUÇÃO

1.1 COVID-19

Origem, taxonomia e genômica

A doença do coronavírus 2019 (COVID-19) tem como agente etiológico o vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) (1). Os coronavírus (CoVs) causaram três surtos em larga escala nas últimas duas décadas: a síndrome respiratória aguda grave (SARS), a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) e agora a COVID-19, cuja pandemia foi declarada em março de 2020, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (2).

Com base em dados epidemiológicos, o mercado de Huanan, em Wuhan, na China, conhecido pela venda de animais selvagens vivos, foi um importante epicentro inicial da infecção por SARS-CoV-2, onde ocorreram 28% de todos os casos da doença relatados em dezembro de 2019, a despeito da hipótese da pandemia da COVID-19 ter ocorrido devido a um escape laboratorial do vírus, a qual é altamente improvável (3).

O SARS-CoV-2 é um vírus de ácido ribonucleico (RNA), pertencente ao gênero betacoronavírus, da subfamília Orthocoronavirinae, família Coronaviridae e ordem Nidovirales (4). Apresenta 79% de similaridade com o genoma do vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus (SARS-CoV) e 50% com o vírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio Coronavírus (MERS-CoV). A análise filogenética de todo o genoma mostra que o SARS-CoV-2 está agrupado com o SARS-CoV e com os coronavírus relacionados ao SARS (SARSr-CoVs) encontrados em morcegos (RaTG13, RmYN02, ZC45 e ZXC21), colocando-o no subgênero Sarbecovirus (5).

Os dois terços proximais a extremidade 5' do genoma do novo coronavírus contêm o gene da replicase, que codifica duas *Open Reading Frames* (ORFs), ORF1a e ORF1b. O outro terço proximal a extremidade 3' do genoma codifica outras ORFs, das quais quatro codificam as proteínas estruturais: glicoproteína *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N) (6). Dos quatro

genes estruturais, o SARS-CoV-2 compartilha mais de 90% da identidade de aminoácidos com o SARS-CoV, exceto pelo gene S, que diverge (5). A proteína S do SARS-CoV-2 possui duas subunidades funcionais, S1 e S2. A subunidade S1 é a principal responsável pela ligação ao receptor na célula hospedeira, e a subunidade S2 medeia a fusão da membrana após a ativação proteolítica (6). A proteína M é a maior e mais abundante proteína estrutural, que define a forma do vírion e desempenha uma função crucial no processo de brotamento de partículas virais de suas células hospedeiras. A proteína E é essencial para a infecção e replicação do vírus. A proteína N está associada ao RNA genômico, mantém o material genético dentro do envelope, e também é essencial para a replicação viral. Durante a automontagem das partículas virais, a proteína viral M coopera com outras proteínas estruturais para formar o vírion completo (7).

A glicoproteína S é a fonte mais relevante de antígenos para o desenvolvimento de vacinas e a mais susceptível a mutações que podem aumentar a transmissibilidade e/ou virulência do SARS-CoV-2. Até o momento cinco variantes de interesse já foram identificadas, a saber: Alfa, Beta, Gama, Delta e Omicron. As mutações correspondentes bem como suas implicações, estão descritas a seguir (6–8).

A Lys417 está localizada no domínio de ligação ao receptor (RBD) da glicoproteína S, que interage com a proteína do receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) humana. Uma mutação não sinônima nesta posição K417N aparece na variante Beta, enquanto a K417T aparece na Gama. Ambas as mutações estão associadas ao aumento da transmissibilidade e redução da sensibilidade aos anticorpos neutralizantes. A mutação L452R é encontrada na variante Delta e refere-se à mudança de aminoácidos de leucina (L) para arginina (R). Esta mutação no RBD parece aumentar a afinidade de ligação do receptor ECA2 e pode diminuir a interação com os anticorpos induzidos pela vacina. Além disso, poderia fornecer resistência às células T, que são essenciais para atingir e destruir células infectadas por vírus. A substituição de aminoácidos E484K indica uma mudança de ácido glutâmico (E) para lisina (K) na posição 484. Esta mutação é compartilhada pelas variantes Beta e Gama e poderia melhorar a capacidade de escapar do sistema imunológico afetando o reconhecimento de anticorpos. A substituição de aminoácidos N501Y é compartilhada pelas

variantes Alfa, Beta e Gama. Acredita-se que a mudança de asparagina (N) para tirosina (Y) na posição 501 aumente a afinidade de ligação com a ECA2 humana, induzindo a maiores concentrações do vírus na faringe e na cavidade nasal e, portanto, aumentando sua taxa de transmissão. A substituição de aminoácidos D614G denota uma mudança de ácido aspártico (D) para glicina (G) na posição 614 e é compartilhada pelas variantes Alfa, Beta, Gama e Delta. Estudos relatam sua relação com o aumento da taxa de transmissão da COVID-19, levando a maior infectividade do epitélio olfatório, induzindo anosmia. Já as substituições de aminoácidos afetando P681H e P681R foram detectadas em Alfa e Delta, respectivamente, de forma que a substituição P681R parece estar associada a uma maior patogenicidade, acarretando maior resistência aos anticorpos neutralizantes induzidos pela imunização (7).

Com relação a variante Omicron BA.1, em comparação com o genoma de referência de Wuhan-Hu-1, a região spike apresentou 35 mutações, 15 dessas se enquadrando no RBD. 3 mutações em regiões que codificam a proteína M e 6 em regiões que codificam a proteína do nucleocapsídeo também foram identificadas. Além disso, algumas estimativas indicaram que a Omicron BA.1 é três a seis vezes mais infecciosa do que as variantes anteriores (9).

Transmissão, sintomatologia e mecanismo de infecção da célula pelo SARS-CoV-2

O vírus pode ser transmitido por inalação de gotículas respiratórias contendo o vírus ou por contato das mãos em superfícies que contêm o vírus e posterior contaminação ao levar as mãos aos olhos, boca e nariz (10). O tempo de incubação pode variar de 1-14 dias (mais comumente em torno de 5 dias) e os sintomas incluem febre, fadiga e tosse seca na maioria dos pacientes, podendo ser acompanhada de produção de escarro, dor de cabeça, hemoptise, diarreia, anorexia, dor de garganta, dor no peito, calafrios, náuseas e vômitos, além de distúrbios do olfato e do paladar (5). Os casos severos de COVID-19 podem progredir para a SARS, em média entre o oitavo e nono dia após os sintomas iniciais (11). Além disso, o vírus pode induzir uma cascata inflamatória intensa, muitas vezes chamada de “tempestade de citocinas”, o que explica a agressão

pulmonar grave, visualizada em imagens de tomografia computadorizada e que induz a formação de microtrombos, resultando em lesões renais e cardíacas, entre outras (12).

A maioria dos pacientes sintomáticos desenvolve sintomas leves (aproximadamente 81% dos casos), no entanto, alguns pacientes podem progredir para doença grave-crítica (19% dos casos), com pneumonia, SARS, disfunção múltipla de órgãos e morte (5). Em geral, adultos mais velhos têm maior risco para desenvolver a forma grave da doença, embora crianças e jovens não estejam isentos. Além disso, o risco de uma pessoa contrair a forma grave da doença aumenta a depender do número de condições médicas preexistentes, como câncer, doenças hepática/renal/pulmonar crônicas, fibrose cística, demência ou outras condições neurológicas, diabetes, condições cardíacas, sobrepeso ou obesidade, imunossupressão, entre outras (13).

A figura 1 apresenta os sintomas mais comuns de acordo com a evolução da doença, correlacionando com a idade e com a presença de comorbidades como os maiores fatores de risco para a COVID-19 grave-crítica (5).

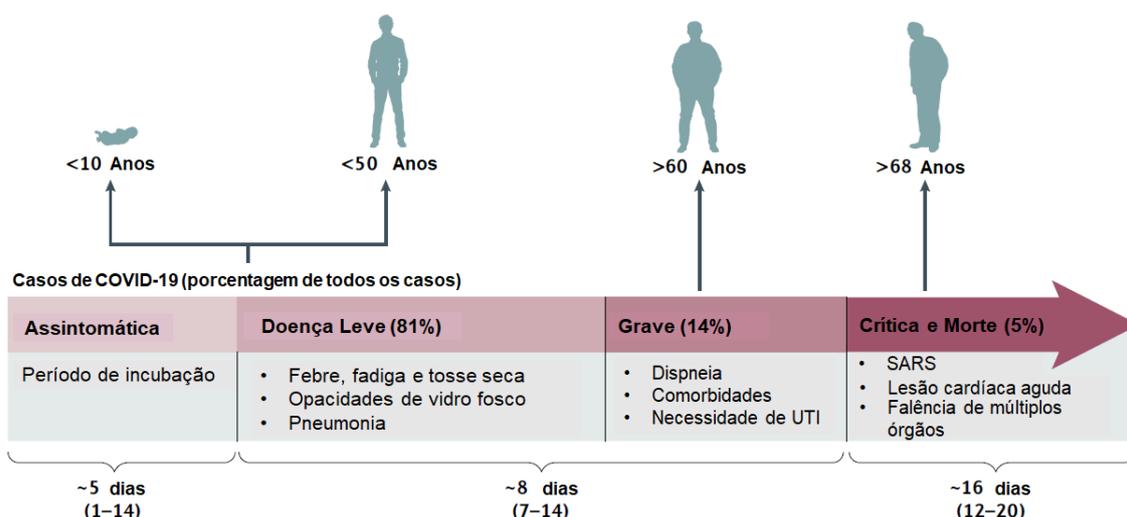


Figura 1: Características clínicas da COVID-19 (Adaptado de: Hu, B, et al. 2021).
UTI: unidade de terapia intensiva;

A nível celular, uma menor capacidade das células T CD4+ e CD8+ de produzir interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2), bem como um

comprometimento na ativação de células T de células dendríticas (DCs) em pacientes com idade ≥ 55 anos compromete a resposta imune adaptativa ideal. Ainda, proporções mais altas de macrófagos e neutrófilos pró-inflamatórios e, conseqüentemente, citocinas pró-inflamatórias como interleucina-6 (IL-6) e interleucina (IL-8) também foram observadas no lavado bronco alveolar de pacientes com COVID-19 grave em comparação a pacientes com doença leve (2).

No estágio inicial da doença, os achados laboratoriais indicam leucocitose ou leucopenia, com linfopenia acentuada, incluindo diminuição importante dos linfócitos T CD4+ e CD8+. Na medida que a doença avança, pode-se observar uma redução na concentração de hemoglobina e de albumina sérica, bem como um aumento da proteína C reativa, velocidade de hemossedimentação (VHS), tempo de protrombina (TP), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LD), procalcitonina, dímero-D, creatina quinase, ureia e creatinina, porém estes achados laboratoriais apresentam baixa ou nenhuma sensibilidade diagnóstica para a COVID-19 (14).

O SARS-CoV-2 infecta as células que expressam em suas superfícies os receptores da ECA2 e da protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) (11,15,16). O primeiro passo no processo de entrada do vírus na célula é a ligação da porção N-terminal da proteína viral, unidade S1, no receptor da ECA2. O segundo passo é a clivagem entre as unidades S1 e S2 pela TMPRSS2 e pela catepsina L celular. Após esta clivagem, a unidade S2 sofre um rearranjo conformacional, que direciona e completa a fusão entre as membranas da célula hospedeira e viral, com conseqüente entrada do vírus na célula (17).

Uma vez que o genoma é liberado no citosol do hospedeiro, ORF1a e ORF1b são traduzidas em proteínas de replicase viral, que são clivadas em proteínas não estruturais individuais, formando a RNA polimerase dependente de RNA (RdRP). Ocorre então a replicação viral de RNAs genômicos e subgenômicos (sgRNA) e proteínas estruturais e acessórias são traduzidas para a formação de partículas virais (2). A replicação ativa e liberação do vírus fazem com que a célula hospedeira entre em processo de piroptose (morte inflamatória da célula) com liberação de padrões moleculares associados ao dano celular (DAMP), incluindo adenosina trifosfato (ATP), ácidos nucleicos e oligômeros ASC (11).

Estes produtos são reconhecidos por células epiteliais vizinhas, células endoteliais e macrófagos alveolares, desencadeando a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias [incluindo IL-6, proteína 10 induzida por interferon-gama (IP-10), proteína inflamatória 1 α de macrófagos (MIP1 α), proteína inflamatória 1 β de macrófagos (MIP1 β) e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP1)] (11). Há ainda um aumento do ligante de quimiocina de motivo C-X-C 10 (CXCL10) e motivo C-X-C 8 (CXCL8) (12). Estas proteínas induzem a migração de monócitos, macrófagos e linfócitos T para o local de infecção, que por sua vez promovem uma inflamação adicional e produção de IFN γ , estabelecendo um loop de feedback pró-inflamatório (figura 2) (11,14,18,19).

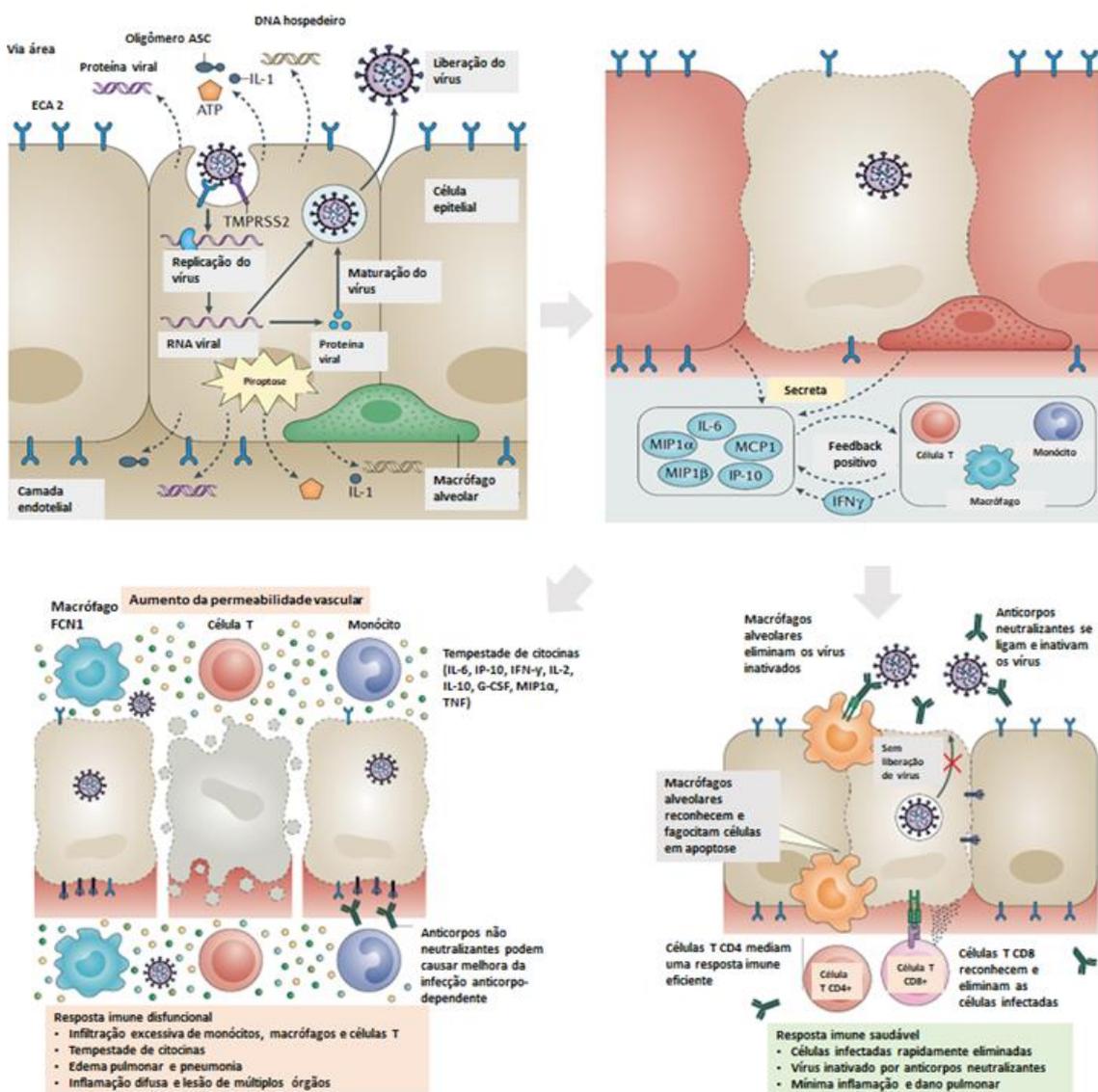


Figura 2: Mecanismo de infecção da célula pelo SARS-CoV-2 e a consequente cascata de resposta inflamatória (Adaptado de: Tay, M. Z, et al. 2020). **Canto superior esquerdo:** Entrada do vírus na célula, sua replicação ativa e morte inflamatória celular com liberação de padrões moleculares associados ao dano celular; **Canto superior direito:** Produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que induzem a migração de monócitos, macrófagos e linfócitos T para o local da infecção, com inflamação adicional e liberação de IFN γ ; **Canto inferior esquerdo:** Resposta imune disfuncional; **Canto inferior direito:** Resposta imune saudável. G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos; TNF: fator de necrose tumoral.

A figura 2 demonstra duas possíveis respostas imunológicas contra a infecção viral, uma resposta imune imperfeita e uma resposta imune adequada. Na resposta imune imperfeita, há um acúmulo adicional de células imunes nos pulmões, causando superprodução de citocinas pró-inflamatórias, que eventualmente danificam a infraestrutura pulmonar. Adicionalmente, anticorpos não neutralizantes, liberados por linfócitos B podem aumentar a infecção pelo aumento dependente de anticorpo, exacerbando ainda mais os danos nos órgãos. Na resposta imune adequada, a inflamação inicial atrai linfócitos T vírus-específicos para o foco da infecção, onde podem eliminar as células contaminadas antes da liberação de novos vírus ao microambiente. Anticorpos neutralizantes nestes indivíduos podem bloquear a infecção viral e macrófagos alveolares reconhecem estas partículas virais ligadas aos anticorpos e, por opsonização, fagocitam e eliminam o vírus, assim como os restos celulares. Por fim, esses processos levam à eliminação mais rápida do vírus, o que diminui os danos causados às células pulmonares e resultam em recuperação do indivíduo (11).

Diagnóstico

Atualmente, diferentes métodos podem ser utilizados para o diagnóstico da COVID-19. Estes métodos podem identificar as regiões específicas de genes virais por meio das técnicas de Reação em Cadeia de Polimerase com

Transcrição Reversa em Tempo Real (RT-PCR), Amplificação Isotérmica mediada por Loop de Transcrição Reversa (RT-LAMP) e Agrupados de Curtas Repetições Palindrômicas Regularmente Interespaçadas (CRISPR), os anticorpos Imunoglobulina M (IgM)/Imunoglobulina G (IgG), produzidos pelo sistema imune em resposta à infecção viral, e o antígeno testado (20).

A técnica de RT-PCR tem sido amplamente utilizada para testes de doenças contagiosas em todo o mundo e, atualmente, é o padrão ouro para a detecção de SARS-CoV-2. Ela se baseia em duas reações consecutivas: a conversão do RNA em DNA complementar (cDNA) através da enzima de transcrição reversa e a amplificação da amostra de cDNA pela reação em cadeia de polimerase usando primers específicos do gene e sondas de hidrólise marcadas com fluorescência. A primeira etapa produz moldes de DNA para serem usados na segunda etapa, onde o número de cópias do DNA é aumentado ao longo de repetidos ciclos térmicos. Os primers específicos do gene orientam a segunda reação para a amplificação apenas da região selecionada no genoma, enquanto as sondas produzem sinais fluorescentes a cada amplificação bem-sucedida das regiões do gene, permitindo um sistema de reação quantificável (20).

Diferentes regiões do genoma do vírus SARS-CoV-2 são usadas para projetar primers e sondas para RT-PCR. Por exemplo, o Instituto Nacional de Saúde (NIH tailandês), localizado na Tailândia, utiliza genes N, o Instituto Pasteur, localizado na França, genes da RdRP (2 alvos) e o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), localizado na China, genes ORF1ab e N. Os genes mais usados são N, ORF1a, ORF1b e E, mas a maioria desses países recomenda o gene E (21).

Os kits RT-PCR para detecção de SARS-CoV-2 incluem principalmente as enzimas de transcrição reversa e amplificação, dois a três conjuntos de primers e sondas para amplificação das regiões específicas do genoma viral e reagentes autorizados para controles negativos, positivos e internos. Os genes-alvo, primer correspondente e as sequências de sonda usadas variam de acordo com os kits comerciais (20). Amostras de swabs nasofaríngeos ou orofaríngeos, de lavado bronco alveolar ou ainda amostras de fezes e urina podem ser utilizadas (21).

Apesar de ser o método mais confiável para detecção de SARS-CoV-2, o RT-PCR permite apenas a realização de um número limitado de testes a cada dia. Além disso, a sensibilidade deste método geralmente depende da quantidade de

RNA em cada amostra. Os pacientes podem ser classificados como positivos para SARS-CoV-2 ou negativos com base nos resultados de RT-PCR. No entanto, esta técnica não fornece informações para os pacientes que já se recuperaram do SARS-CoV-2, pois a carga viral é eliminada do corpo após a recuperação. Da mesma forma, os pacientes que estão nos primeiros dias da infecção viral podem não responder positivo a este teste devido à quantidade inadequada de vírus nos swabs (20). Em adição, o RT-PCR é uma técnica mais dispendiosa e demorada, requerendo equipamentos de laboratório mais caros e recursos humanos altamente qualificados, em comparação, por exemplo, ao teste rápido de antígeno que será abordado nos próximos parágrafos (21). Entretanto, já se encontra em desenvolvimento o DIRECT-PCR, uma PCR rápida e sem extração. No DIRECT-PCR, reações homogêneas de tubo único incluem toda a lise viral, sendo as etapas de transcrição reversa, amplificação e detecção concluídas em 36 minutos (22) .

Na RT-LAMP uma metodologia de ciclo térmico único é usada para combinar uma etapa de transcrição reversa com um método de amplificação de ácido nucleico, sendo uma alternativa menos demorada em relação ao RT-PCR. O LAMP é ainda uma alternativa mais econômica, pois não requer instrumentos termocicladores caros que operam em temperaturas alternadas para a amplificação. Toda a reação de amplificação é processada em um único tubo a cerca de 60–65°C, usando dois ou três conjuntos de primers específicos de genes diferentes e enzimas polimerase de deslocamento de fita (20,21).

Com relação ao CRISPR, este ensaio realiza simultaneamente a transcrição reversa e a amplificação isotérmica usando RT-LAMP para RNA extraído de swabs nasofaríngeos ou orofaríngeos em meio de transporte universal (UTM), seguido pela detecção por Cas12 de sequências predefinidas de coronavírus, após o que a clivagem de uma molécula repórter confirma a detecção do vírus. Os primers são direcionados para os genes E e N do SARS-CoV-2, e os gRNAs de Cas12 são projetados para detectar três coronavírus do tipo SARS (SARS-CoV-2, coronavírus tipo SARS de morcego e SARS-CoV) no gene E e para detectar especificamente SARS-CoV-2 apenas no gene N (23). Os métodos de diagnóstico baseados em CRISPR se beneficiam de alta sensibilidade e especificidade, com precisão comparada ao RT-PCR, mas sem necessidade de instrumentação elaborada ou infraestrutura laboratorial complexa (23,24). Além

disso, o tempo de resposta é bastante rápido, com resultados disponíveis em 30-40 minutos (23).

Um teste de anticorpos pode medir a presença e a concentração de IgG e IgM em amostras de sangue, soro ou plasma. A detecção de IgM caracteriza uma infecção ativa, enquanto a de IgG caracteriza infecção/imunidade prévia. Os testes de anticorpos mais comuns são baseados em ensaios do tipo fluxo lateral (LFA) e ensaios do tipo imunossorvente ligado a enzima (ELISA) (20).

Em um LFA, o dispositivo é composto por um cassete, envolvendo uma tira de membrana polimérica carregada com antígenos marcados com nanopartículas de ouro, geralmente contendo duas linhas: uma linha de controle e uma linha de teste. A amostra, depositada no dispositivo, se move através da tira por ação capilar. Ao encontrar a primeira linha, os antígenos marcados com ouro se ligam à molécula alvo na amostra por meio de uma ligação antígeno-anticorpo. Os antígenos marcados com ouro que estão em excesso se movem mais ao longo da tira e são capturados na linha de controle, de forma que mesmo na ausência da molécula alvo na solução da amostra, estes devem ser capturados na linha controle para atestar o correto funcionamento do teste (20).

Nos testes ELISA, o antígeno viral recombinante é revestido nas superfícies dos poços de plástico como moléculas-alvo. Uma vez preparados os poços, o soro do paciente é adicionado. Se anticorpos (IgG ou IgM) contra o antígeno alvo estiverem presentes na amostra, ocorre um evento de ligação. A amostra em excesso é lavada várias vezes para garantir que todo o substrato não ligado seja removido. Em seguida, adiciona-se uma segunda solução contendo anticorpos anti-humanos secundários marcados e permite-se que se liguem, de forma que se o anticorpo de interesse estiver ausente na amostra, não ocorre ligação. O excesso é novamente removido por lavagem e a ligação dos anticorpos alvo é confirmada por uma reação de mudança de cor dependente de enzima. Um espectrômetro lê a mudança de cor e a concentração do anticorpo de interesse pode ser determinada (20).

Assim como os testes de anticorpos, os testes de antígeno podem ser operados em tiras LFA para fins de detecção rápida ou em formato ELISA para melhor sensibilidade e alto rendimento. Neste caso, a membrana do dispositivo LFA ou os poços da placa de ELISA são revestidos com anticorpos (25).

O benefício de um LFA sobre o teste ELISA é que o dispositivo pode ser usado em casa, sem treinamento. Já o ELISA é uma técnica diagnóstica que pode ser realizada apenas em laboratórios com autorização para realização de exames de moderada ou alta complexidade, requerendo pessoal qualificado e instrumentação específica. Com relação aos testes sorológicos, o maior problema é a reatividade cruzada, que ocorre quando os anticorpos se ligam a um antígeno diferente do antígeno alvo, muitas vezes devido às semelhanças entre as moléculas, o que pode levar a resultados falsos positivos. Além disso, como os anticorpos são desenvolvidos ao longo de uma infecção, um resultado negativo em um teste de anticorpos pode não confirmar que o paciente não está infectado. Esta resposta tardia geral pode, portanto, levar a falsos negativos, ou seja, quando o paciente está infectado, mas ainda não produziu anticorpos em níveis detectáveis. Por outro lado, devido à detecção tardia de anticorpos, estudos sorológicos podem ser retroativamente benéficos para identificar quem desenvolveu imunidade ao vírus e qual proporção da população foi infectada, ao passo que o teste de RT-PCR pode produzir resultados falsos negativos, uma vez que, conforme mencionado acima, a carga viral diminui com o curso da infecção (20).

Em adição aos métodos discutidos acima, imagens de tomografia computadorizada (TC) de tórax foram usadas como recurso de diagnóstico para COVID-19, principalmente no início da pandemia. Geralmente, opacidades em vidro fosco bilaterais e periféricas são observadas em TC de tórax de pacientes com COVID-19 no estágio inicial da doença, enquanto padrões de pavimentação irregulares são observados no estágio posterior (25). Entretanto, a TC de tórax, apesar de ser considerada uma ferramenta de imagem de rotina sensível para COVID-19, apresenta baixa especificidade (26,27).

Tratamento

As abordagens terapêuticas disponíveis incluem medicamentos antivirais e anticorpos monoclonais (28).

Os principais medicamentos antivirais que foram testados para o tratamento de COVID-19 incluem o remdesivir, o molnupiravir, o nirmatrelvir-ritonavir, a hidroxicloroquina e o lopinavir-ritonavir (29). Embora o *Food and Drug*

Administration (FDA) dos Estados Unidos da América (EUA) tenham aprovado o uso emergencial da hidroxicloroquina e do lopinavir-ritonavir, estas autorizações foram revogadas devido a complicações cardiovasculares e à falta de redução da mortalidade, respectivamente (28).

O remdesivir (nome comercial Veklury) atua como um análogo de nucleosídeo, inibindo o RdRp viral de coronavírus como SARS-CoV-2. Ele foi aprovado pelo FDA para o tratamento da COVID-19 em adultos e pacientes pediátricos (28 dias de idade ou mais e peso mínimo de 3 kg) que estejam ou não hospitalizados, com doença leve a moderada com alto risco de progressão para a forma grave (28,29).

O molnupiravir (Lagevrio) é um pró-fármaco, análogo de ribonucleosídeo antiviral β -d-N4-hidroxicitidina (EIDD-1931), que atua interrompendo o processo de replicação viral. O medicamento foi aprovado pelo FDA, sob uso emergencial, para tratamento da doença leve a moderada em adultos que apresentam alto risco de progressão para COVID-19 grave, incluindo hospitalização ou morte, e para os casos em que as opções de tratamento autorizadas pela FDA não estejam acessíveis ou clinicamente apropriadas (28,29). Já o nirmatrelvir-ritonavir (Paxlovid) está aprovado, sob uso definitivo, para as mesmas condições que o Lavegrio, não sendo aprovado para uso como profilaxia pré-exposição ou pós-exposição ao vírus SARS-CoV-2 (29).

Quanto aos anticorpos monoclonais (mAb), eles são geralmente projetados para atingir a proteína S do SARS-CoV-2, mas também podem direcionar o microambiente para regular as respostas imunes locais à infecção viral (28). Até o momento, dois anticorpos foram aprovados pela FDA sob uso definitivo, o tocilizumab (Actemra) e o baricitinib (Olumiant). O Actemra está aprovado para o tratamento da COVID-19 em adultos hospitalizados que estão recebendo corticosteróides sistêmicos e requerem oxigênio suplementar, ventilação mecânica não invasiva ou invasiva ou oxigenação por membrana extracorpórea (ECMO). Já o Olumiant está aprovado para as mesmas condições que o Actemra, com exceção do recebimento de corticosteróides sistêmicos (29).

No Brasil, além dos antivirais e anticorpos monoclonais mencionados acima, também está autorizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o anticorpo monoclonal sotrovimabe (30).

Prevenção

Medidas não farmacológicas, incluindo distanciamento físico, uso adequado de máscaras, *home-office*, isolamentos e/ou quarentenas, foram impostas no início da pandemia da COVID-19 para retardar a propagação da doença. No entanto, essas medidas comportamentais têm efeitos indesejados, com consequências para a saúde mental (7). Dessa forma, a adoção de medidas de prevenção de contágio que incluem, principalmente, a lavagem frequente das mãos com água e sabão ou a higienização com álcool 70%, e a etiqueta respiratória, além do desenvolvimento de vacinas seguras e eficientes constituem estratégias importantes para o sucesso da luta contra a COVID-19 (7,31).

Atualmente, três grandes plataformas de tecnologia de vacinas são exploradas para projetar vacinas seguras e eficazes contra a COVID-19: a abordagem de vírus inteiro (vírus inativado e vetor viral), de ácido nucleico e a de subunidade. As vacinas de vírus inativado contêm vírus completos que foram mortos por produtos químicos, radiação ou calor. Já as vacinas de vetor viral usam um vírus seguro, replicante ou não replicante, que carrega um vetor viral capaz de transportar proteínas virais alvo para o corpo humano, a fim de aumentar a resposta imune. Com relação a plataforma de ácido nucleico, ela usa informações genéticas, seja de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou RNA mensageiro (RNAm), para fornecer instruções às células para produzir proteínas específicas, não o vírus inteiro. As vacinas de subunidade, por sua vez, usam um ou mais antígenos purificados que podem estimular o sistema imunológico, não introduzindo todo o patógeno e não requerendo um vetor viral seguro (7).

No Brasil, as vacinas aprovadas pela ANVISA incluem a Comirnaty (Pfizer/Wyeth), a Coronavac (Butantan e SinoVac), a vacina da Janssen (Janssen-Cilag) e a Oxford/Covishield (Fiocruz e AstraZeneca) (32).

A Comirnaty é uma vacina de RNAm que, assim como as demais, com exceção da Coronavac, tem como alvo a proteína S do SARS-CoV-2. Para imunização completa, duas doses são necessárias, com intervalo de 28 dias entre elas. Ela tem 100% e 96,4% de eficácia contra as variantes Alfa e Beta, respectivamente. A Coronavac, por sua vez, é uma vacina de vírus inteiro inativado, e duas doses são recomendadas, com intervalo de 14 dias entre elas.

Sua eficácia contra a variante Delta é de 59%, embora sua eficácia contra as demais variantes não tenha sido reportada. Quanto a vacina da Janssen, ela utiliza a tecnologia de vetor adenoviral humano e apenas uma dose é necessária para a imunização completa. Além disso, sua eficácia contra as variantes Alfa, Beta, Gama e Delta não foi reportada. Finalmente, a vacina da Oxford/Covishield utiliza a plataforma de vetor adenoviral de chimpanzé e duas doses são recomendadas, com intervalo de 12 semanas entre uma e outra. Ela apresenta 74,5% de eficácia contra a variante Alfa, 10,4% contra a variante Beta, 77,9% contra a Gama e 67% contra a Delta (7).

Mais recentemente, no final de novembro de 2021, tendo em vista a identificação e disseminação da variante Omicron, a ANVISA aprovou, sob uso emergencial, a vacina Comirnaty bivalente (Pfizer). As apresentações disponíveis combinam o RNAm da cepa original e o da cepa Omicron BA.1 ou BA.4/BA.5. Ambas as apresentações estão indicadas para imunização ativa em indivíduos com idade igual ou superior a 12 anos que tenham recebido anteriormente pelo menos um esquema de vacinação primária contra COVID-19 (33).

Embora a vacinação em massa da população tenha se mostrado muito promissora na redução da propagação da COVID-19, contribuindo para a redução do número de óbitos (34), pesquisas recentes demonstraram como os mecanismos epigenéticos regulam a interação hospedeiro-vírus e podem ser decisivos no curso de infecções, incluindo o COVID-19 (35,36).

1.2 Mecanismos epigenéticos de regulação de infecção

A expressão gênica eucariótica é regulada não apenas por intensificadores e promotores genômicos, mas também por modificações epigenéticas através dos quais o genoma do hospedeiro integra sinais intrínsecos e ambientais (37,38). Existem principalmente três mecanismos fundamentais através dos quais essas modificações ocorrem, incluindo a metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas e as funções dos RNAs não codificantes (ncRNAs) (tanto ncRNAs longos ou microRNAs (miRNAs)). Cada um desses mecanismos não é um evento isolado, mas funciona em estreita ligação com os outros,

criando assim uma rede complexa de sinalização celular que, em última análise, governa o resultado da infecção (38).

Com relação a metilação do DNA, ela diz respeito a introdução de um grupo metil na citosina na sequência CpG, que compreende regiões do DNA onde um nucleotídeo citosina é seguido por um nucleotídeo guanina na sequência linear de bases ao longo de sua direção 5'-3', por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs; DNMT1, DNMT3A e DNMT3B). Acredita-se que a metilação do DNA esteja associada à repressão da expressão gênica (39).

Quanto as modificações pós-traducionais de histonas, sabe-se que a cromatina é composta de DNA e quatro tipos de proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4). Devido à presença de grupos fosfato, o DNA é carregado negativamente, enquanto as proteínas histonas têm aminoácidos com carga mais positiva. Essas cargas negativas e positivas atraem o DNA e as histonas entre si, formando um complexo estável. Modificações químicas reversíveis, principalmente reações de acetilação e metilação, nas respectivas cadeias laterais de aminoácidos lisina (K), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), arginina (R) e glutamina (Q) das histonas nucleares afetam a expressão gênica e as funções celulares (40).

Pesquisas recentes se concentraram em como os vírus utilizam aspectos da maquinaria epigenética para permitir o estabelecimento, disseminação e persistência da infecção e serão explanadas mais detalhadamente a seguir. Por exemplo, pesquisadores demonstraram que a metilação da histona H3K4 pelo vírus influenza A/cepa H3N2 inibe a iniciação da resposta imune inata no hospedeiro. Foi relatado também uma associação clara entre a trimetilação da H3 lisina 27 (H3K27me3) e a regulação negativa ou inativação de genes estimulados por IFN (ISGs) na infecção por MERS-CoV e pela cepa H5N1-VN1203 do vírus da influenza A. Como consequência, apesar da ativação dos fatores de transcrição e das vias de sinalização, o estado reprimido impediu fisicamente a transcrição desses genes. Ainda na infecção por MERS-CoV e H5N1, a metilação do DNA promoveu a supressão da produção de moléculas de apresentação de antígenos em ambas as doenças. Já nas infecções por SARS-CoV, herpes simples (HSV) e pelo vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1), a metilação do DNA resultou em atraso do reconhecimento do patógeno e modulação dos níveis de expressão de ISG (35).

No tocante aos ncRNAs, os miRNAs foram identificados como um dos principais atores na regulação de várias respostas celulares e fisiológicas (38). Neste trabalho iremos focar especificamente no papel dos miRNAs como reguladores epigenéticos especialmente nas infecções virais, incluindo a COVID-19.

1.3 MiRNAs

Os miRNAs são moléculas pequenas de cadeia simples de RNA formadas por aproximadamente 22 nucleotídeos não codificantes, que participam da regulação pós-transcricional da expressão gênica (41,42). A maior parte dos miRNAs se liga complementarmente à região 3' não traduzida (3'-UTR) do RNAm alvo (43,44), e dependendo da complementariedade dessa ligação, podem ocasionar a degradação do RNAm (quando a complementariedade é perfeita) ou inibir a tradução deste (quando a complementariedade é imperfeita), e conseqüentemente regular a síntese proteica (45). No entanto, existem vias não canônicas em que os miRNAs podem se ligar a outras regiões, incluindo a região 5' não traduzida (5'-UTR), sequências promotoras (46). Além disso, já se tem conhecimento que os miRNAs podem, inclusive, ativar a expressão de alguns genes (47).

Desde a sua descoberta em larvas de *Caenorhabditis elegans* em 1993 (48,49), os miRNAs vêm sendo estudados frequentemente, destacando o papel dos mesmos em regular diversas funções celulares. Estima-se que ao menos 60% dos mRNAs em humanos possam ser regulados por miRNAs, sugerindo que cada miRNA seja capaz de regular centenas de mRNAs diferentes (50).

Em relação à biogênese dos miRNAs, os genes que codificam miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, gerando na maior parte das vezes um miRNA primário (pri-miRNA), composto aproximadamente por 500 a 3000 bases em uma estrutura em forma de grampo. Essa estrutura é a chave para que o pri-miRNA gerado seja reconhecido e processado pela ribonuclease (RNase) Drosha, resultando no pré-miRNA, composto por aproximadamente 60 a 70 nucleotídeos. O pré-miRNA é posteriormente translocado do núcleo para o citoplasma por poros nucleares com o auxílio da Exportina-5. No citoplasma, o

pré-miRNA é clivado pela Dicer, uma RNase III/endonuclease, e são formadas duas moléculas de RNA (RNA dupla fita). A fita guia do RNA direciona a ligação do complexo proteico Argonauta e auxilia na ligação do complexo de indução do silenciamento do RNA (RISC) ao miRNA (51). O complexo RISC, quando ativado, identifica seu sítio de ligação na região 3'-UTR do mRNA alvo, regulando a síntese proteica (41,52) (Figura 3). Também existem vias não canônicas de biogênese de miRNAs, as quais incluem diferentes combinações de outras proteínas com proteínas envolvidas na via canônica, como a Drosha e a Dicer (53).

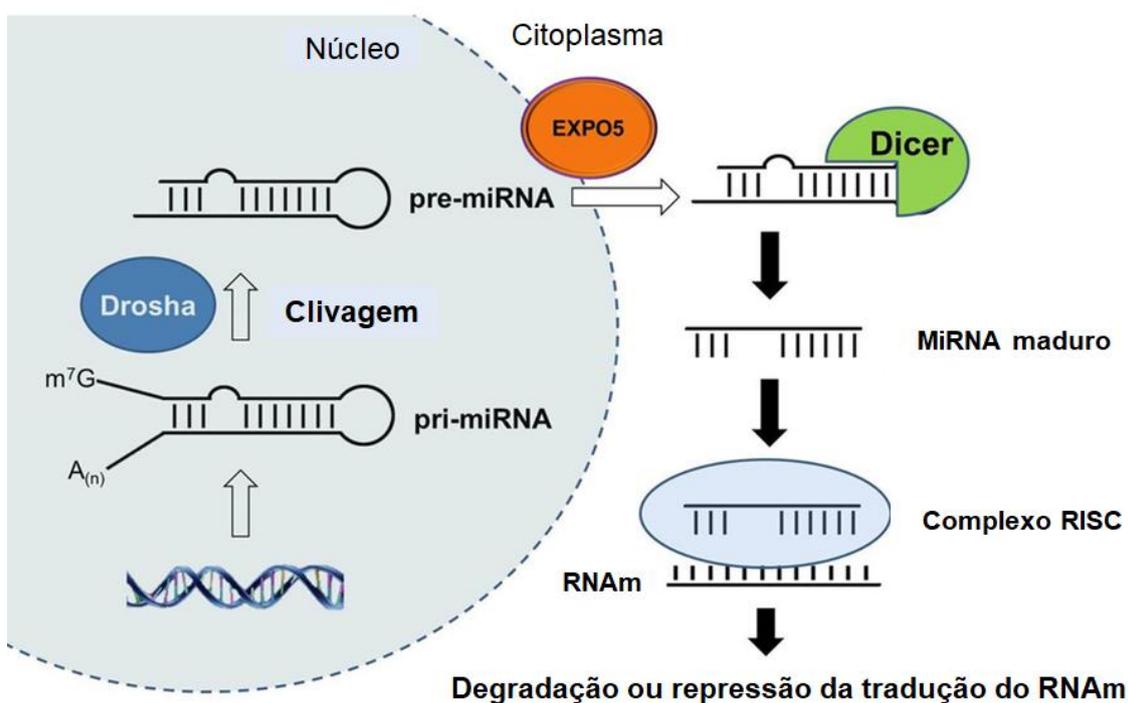


Figura 3. Biogênese de um miRNA [Adaptado de: Jung e Suh, 2015 (54)]. A RNA-polimerase II realiza a transcrição do gene do miRNA, gerando o pri-miRNA; O pri-miRNA é processado pela Drosha, gerando pré-miRNA; O pré-miRNA é transportado para o citoplasma com auxílio da Exportina-5; A Dicer identifica o pré-miRNA para a formação do miRNA dupla fita; Ocorre a formação do complexo RISC-miRNA; Ligação do RISC-miRNA ao mRNA alvo com degradação ou repressão da tradução deste RNAm.

Numerosos estudos demonstraram que os miRNAs podem ser liberados em fluidos extracelulares, como plasma, soro, líquido cefalorraquidiano, saliva,

leite materno, urina, lágrimas, lavado brônquico, entre outros. Os miRNAs extracelulares podem ser entregues às células-alvo e podem atuar como reguladores autócrinos, parácrinos e/ou endócrinos para modular as atividades celulares (53). Além disso, ao contrário das espécies de RNA celular, eles são altamente estáveis, resistindo à degradação à temperatura ambiente por até 4 dias e em condições deletérias, como ebulição, múltiplos ciclos de congelamento-descongelamento e potencial hidrogeniônico (pH) alto ou baixo (53,55).

Existem duas populações de miRNAs extracelulares em fluidos biológicos. Um pode ser encontrado em vesículas como exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos, enquanto o outro está associado a proteínas, como o complexo proteico argonauta, a lipoproteína de alta densidade (HDL) e a nucleofosmina 1 (NPM1) (53,56,57). No que diz respeito a presença de miRNAs específicos, o biofluido que apresenta um espectro mais diferente dos demais é o plasma, provavelmente devido a captação de miRNAs de diferentes tipos celulares circulantes que entram em contato com o sangue. Os fluidos que possuem miRNAs mais distintos entre si são o plasma e a urina (55).

Assim, pelo fato dos miRNAs serem altamente estáveis nos diversos fluidos extracelulares e devido à sua expressão específica em diferentes tecidos e estados patológicos, os miRNAs circulantes têm sido alvo de investigações como possíveis biomarcadores de doenças e de toxicidades induzidas por medicamentos, tendo sido relatados pela primeira vez no campo da biologia do câncer, especialmente por sua natureza não invasiva (58,59).

MiRNAs em infecções virais

Os miRNAs circulantes também demonstraram ter um papel em infecções virais, seja nas respostas antivirais celulares ou na replicação e propagação de vírus (60,61). Também, a ruptura e disfunção dos miRNAs podem perturbar a resposta imune e estimular a liberação de citocinas inflamatórias alterando a resposta celular à infecção viral (62).

A tabela 1, abaixo, traz exemplos de miRNAs desregulados e suas implicações em diversas infecções causadas por vírus.

Tabela 1: MiRNAs desregulados em diferentes infecções virais

Autores	Amostra e população	MiRNAs identificados	Implicação e conclusão
Reynoso, et al. (63)	Plasma de pacientes com HIV (com carga viral abaixo do limite de detecção ou cronicamente infectados) e indivíduos saudáveis	Aumento da concentração dos miRNAs hsa-miR-29b-3p, hsa-miR-33a-5p e hsa-miR-146a-5p no plasma de pacientes com carga viral não detectável, comparado aos infectados crônicos	A superexpressão dos hsa-miR-29b-3p e hsa-miR-33a-5p reduziu significativamente a produção viral em células MT2 e TCD4+ primárias, sugerindo que os níveis de miRNAs circulantes podem ter valor diagnóstico e/ou prognóstico para a infecção pelo HIV e que os hsa-miR-29b-3p e miR-33a-5p podem contribuir para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-HIV
Xu, et al. (64)	Soro de pacientes CHC, em comparação com controles e pacientes com hepatite crônica tipo B.	Aumento da concentração dos miRNAs miR-21, miR-122 e miR-223 em pacientes com CHC e hepatite crônica, comparado a controles saudáveis. Ademais, a concentração dos miR-21 e miR-122 séricos foi maior em pacientes com hepatite crônica do que em pacientes com CHC.	Os miRNAs encontrados têm forte potencial para servir como novos biomarcadores para lesão hepática, mas não especificamente para CHC

Móran, et al. (65)	Pacientes com influenza A/H1N1	Aumento da expressão do miR-150	Pacientes que superexpressam o miR-150 evoluem para doença severa, quando comparados com pacientes que apresentam sintomas leves da doença
Tambyah, et al. (66)	Sangue total de pacientes infectados com a cepa H1N1 do vírus Influenza A, em comparação com indivíduos saudáveis.	14 miRNAs altamente desregulados, entre eles, a expressão de 6 miRNAs (miR-1260, miR-335, miR-664, miR-26a, miR-576-3p e miR-628-3p) estava aumentada no momento da infecção	A expressão aumentada dos miRNAs encontrados permitiu distinguir claramente os indivíduos infectados dos não infectados
Fayyad-Kazan, et al. (67)	Pacientes com COVID-19	Diminuição da expressão dos miRNAs miR-17-5p e o miR-142-5p Aumento da expressão dos miRNAs miR-15a-5p, miR-19a-3p, miR-19b-3p, miR-23a-3p, miR-92a-3p e miR-320a	Os miRNAs miR-19a-3p, miR-19b-3p e miR-92a-3p podem servir como potenciais biomarcadores de diagnóstico e/ou supostos alvos terapêuticos durante a infecção por SARS-CoV-2
Garg, et al. (68)	Pacientes com COVID-19 mecanicamente ventilados, pacientes SDRA induzida por influenza e controles saudáveis.	Aumento da concentração sérica dos miRNAs miR-21, miR-155, miR-208a e miR-499 em pacientes com COVID-19 em comparação com controles saudáveis	Os miRNAs miR-155, miR-208a e miR-499 permitem distinguir claramente entre pacientes com COVID-19 e SDRA induzida por influenza.

Gonzalo-Calvo, et al. (69)	Plasma de pacientes com COVID-19 internados em enfermarias clínicas sem necessidade de cuidados intensivos e pacientes internados na UTI.	miR-148a-3p, miR-451a, miR-486-5p, miR-192-5p e miR-323a-3p	Os miRNAs miR-148a-3p, miR-451a e miR-486-5p distinguiram entre pacientes de UTI e enfermaria e os miRNAs miR-192-5p e miR-323a-3p diferenciaram pacientes não sobreviventes de UTI de sobreviventes, sugerindo que perfis específicos de miRNAs circulantes estão associados à gravidade da COVID-19
Lu, et al. (70)	Cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes humanas	Aumento na expressão do miR-200c-3p	A superexpressão do miR-200c-3p resultou em níveis mais baixos na expressão de ECA2
Wyler, et al. (71)	Linhagens celulares humanas	Aumento na expressão do miR-155	Aumento de 2 vezes na expressão de ISGs e citocinas prejudiciais aos tecidos, como CXCL10 ou IL-6 em células Calu3 infectadas por SARS-CoV-2 em comparação com SARS-CoV

Legenda: HIV: Vírus da imunodeficiência humana; CHC: Carcinoma hepatocelular; SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo; UTI: Unidade de terapia intensiva

Como demonstrado acima, os miRNAs têm potencial para serem usados como biomarcadores de diagnóstico e terapêuticos em infecções virais, incluindo a COVID-19 (59,62). Entretanto, pesquisas mais extensas são necessárias para melhorar a compreensão de como as alterações nos mecanismos epigenéticos do hospedeiro, induzidos por SARS-CoV-2, afetam as funções celulares, como o metabolismo e a resposta imune, auxiliando na construção de um mapa mais abrangente das redes epigenômicas e na identificação de reguladores de cromatina específicos que controlam a transcrição de moléculas efetoras inatas durante as respostas hiper inflamatórias, bem como a transição da infecção entre as fases assintomática e sintomática da doença (38).

A principal hipótese desse trabalho é: o SARS-CoV-2 induz a expressão diferencial de miRNAs no hospedeiro, que podem servir como alvos ou biomarcadores na COVID-19.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar possíveis alterações na expressão de miRNAs plasmáticos em resposta a infecção por SARS-CoV-2.

2.2 Objetivos específicos

- 1. Identificar quais miRNAs estão desregulados na infecção por SARS-CoV-2 e suas funções, através de uma revisão de escopo;
- 2. Identificar, através de sequenciamento de próxima geração (NGS), os principais miRNAs plasmáticos que estão desregulados na infecção por SARS-CoV-2 em humanos e realizar a análise *in silico* destes, a fim de visualizar as vias de sinalização nas quais estes miRNAs atuam e a integração com seus genes alvos envolvidos na COVID-19;
- 3. Validar a expressão dos miRNAs plasmáticos desregulados em resposta a infecção por SARS-CoV-2 em humanos, selecionados na etapa de sequenciamento, por Reação em Cadeia da Polimerase com Transcriptase Reversa Quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).

Cada objetivo específico será apresentado na forma de um artigo.

3. METODOLOGIA

A metodologia será explicada conforme cada objetivo específico.

Parte 1- Revisão de escopo

A revisão de escopo foi conduzida de acordo com as recomendações da PRISMA-ScR (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses statement for Scoping Reviews*) e registrada na plataforma *Open Science Framework* (<https://doi.org/10.17605/OSF.IO/M5VJ6>).

Estratégia de busca

A estratégia de busca incluiu uma combinação de termos relacionados a COVID-19 e miRNAs, sendo guiada pela PICo, em que “P” compreendeu a população (células, animais e pacientes humanos), “I” o fenômeno de interesse (miRNAs como biomarcadores na infecção por COVID-19), e “Co” o contexto (estudos *in vitro*, *in vivo* e em humanos).

Uma pesquisa abrangente da literatura foi realizada usando os bancos de dados PubMed, PubMed Central, BVS/BIREME, *Web of Science*, Scopus, EBSCOhost, ProQuest, Embase e *Cochrane Library* para identificar estudos relevantes até a data de 3 de junho de 2021.

Seleção dos estudos

Foram incluídos estudos em células, animais e humanos que descreveram miRNAs desregulados na COVID-19. Estudos com abordagem puramente computacional e de sequenciamento de próxima geração de RNA (RNA-seq) de bancos de dados foram excluídos, assim como preprints, livros/capítulos de livros, editoriais, comentários, anais de conferências ou resumos, revisões de literatura e diretrizes.

Os estudos recuperados das bases de dados foram avaliados usando o programa Rayyan QCRI para excluir artigos duplicados (Fase I), analisar os títulos e resumos (Fase II) e analisar os artigos completos dos resumos

selecionados na fase anterior (Fase III). Dois revisores independentes (MBV e ASN) foram envolvidos nessas etapas e as discordâncias foram resolvidas por um terceiro revisor (PM). Além disso, as referências citadas em todos os artigos incluídos foram revisadas para identificar quaisquer estudos que possam ter sido perdidos.

Extração e análise dos dados

Foram extraídos os seguintes dados de cada artigo incluído: autor, data de publicação ou disponibilidade online, país, tipo de publicação, população, amostras, métodos/técnicas usados para identificar os miRNAs, tempo em que os miRNAs foram analisados, os miRNAs diferencialmente expressos em células ou animais infectados por SARS-CoV-2 e em pacientes com COVID-19, as implicações fisiopatológicas dos miRNAs desregulados e as principais conclusões sobre o papel dos miRNAs como biomarcadores da COVID-19. Novamente, dois revisores (MBV e ASN) concluíram independentemente a extração dos dados e as discordâncias foram resolvidas por um terceiro revisor (PM).

Análises de bioinformática

Para gerar a rede de interação dos miRNAs selecionados foi utilizada a ferramenta miRTargetLink 2.0. Os dados apresentados correspondem a interações miRNA-alvo com forte suporte, ou seja, validadas experimentalmente por ensaio repórter, western blot, Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa (qPCR), microarray e/ou experimentos de sequenciamento de nova geração. A ferramenta obtém anotações de miRNAs da versão mais recente do miRBase (v.22.1), enquanto os alvos validados experimentalmente são recuperados do miRTarBase (v.8) e miRATBase.

Parte 2- Estudo experimental

A) Parte comum aos objetivos específicos 2 e 3

Aprovação em comitê de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (números 36041420.0.0000.5404 e 31049320.7.1001.5404). Todos os participantes ou seus responsáveis assinaram um termo de consentimento autorizando o uso de suas amostras e dados.

Participantes e critérios de elegibilidade

Os pacientes com COVID-19 (grupo caso) foram recrutados do Hospital Estadual Sumaré Dr. Leandro Francheschini (HES) na cidade de Sumaré (SP, Brasil), do ambulatório do Centro Comunitário de Saúde (CeCom) da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP (Campinas-SP, Brasil), e do Hospital Municipal de Paulínia na cidade Paulínia (SP, Brasil), enquanto os voluntários saudáveis (grupo controle) foram recrutados da comunidade UNICAMP.

Os pacientes do grupo caso, como será detalhado no próximo item, foram classificados de acordo com a gravidade da COVID-19 em pacientes com COVID-19 leve/moderada e grave/crítica. O período de coleta das amostras para os pacientes do grupo com COVID-19 grave/crítica foi de 05/2020 a 03/2021 e nenhum deles estava vacinado contra a COVID-19. O período de coleta para os pacientes do grupo com COVID-19 leve/moderada foi de 06/2020 a 05/2022 e dos 45 pacientes incluídos, 22 não estavam vacinados contra a COVID-19. Já para os participantes do grupo controle, o período de coleta para os pacientes do grupo com COVID-19 leve/moderada foi de 08/2020 a 05/2022 e dos 40 pacientes incluídos, 17 não estavam vacinados contra a COVID-19.

Os critérios de elegibilidade foram idade ≥ 18 anos e admissão no HES, no CeCom ou no Hospital Municipal de Paulínia com resultado positivo no RT-PCR para SARS-CoV-2 com swab nasofaríngeo para os pacientes com COVID-19, e idade ≥ 18 anos e resultado negativo no RT-PCR para SARS-CoV-2 com swab nasofaríngeo para os participantes controles.

Caracterização dos participantes

Para o objetivo específico 2, os participantes foram caracterizados quanto ao sexo, idade, raça e comorbidades. Adicionalmente, eles foram classificados pela gravidade da COVID-19, de acordo com os critérios de Falavigna et al. em: pacientes com COVID-19 leve (n=4), ou seja, com algum sinal ou sintoma da doença, mas sem dispneia ou imagem de tórax anormal; e em pacientes com COVID-19 grave/crítica (n=4), na qual os casos graves apresentaram frequência respiratória (FR) > 30 batimentos por minuto (bpm), saturação de oxigênio (SpO₂) ≤ 93% em ar ambiente, relação pressão parcial de oxigênio/fração inspirada de oxigênio (PaO₂/FiO₂) < 300 mmHg ou infiltrado pulmonar > 50%, e os casos críticos apresentaram falência respiratória, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos (72). Os pacientes com COVID-19 grave/crítica foram ainda caracterizados quanto ao tempo de hospitalização, medicamentos usados para a COVID-19 durante a internação, tempo sob ventilação mecânica, necessidade de prona e morte. Além disso, os participantes foram pareados por sexo e idade.

Para o objetivo específico 3, os participantes foram caracterizados quanto à idade, gênero, etnia e a presença de comorbidades, como diabetes, hipertensão arterial sistêmica, doença cardíaca isquêmica e doença pulmonar obstrutiva crônica. Também foram classificados pela gravidade da COVID-19, de acordo com os critérios do National Institutes of Health (NIH), em pacientes com COVID-19 leve/moderada (n=45), no qual a doença leve inclui indivíduos que apresentam algum dos vários sinais e sintomas de COVID-19, mas não têm falta de ar, dispneia ou imagens torácicas anormais, e a doença moderada inclui indivíduos que apresentam evidências de doença do trato respiratório inferior durante avaliação clínica ou imagem e que apresentam SpO₂ ≥94% em ar ambiente ao nível do mar; e em pacientes com COVID-19 grave/crítica (n=40), na qual os indivíduos com doença grave têm SpO₂ <94% em ar ambiente ao nível do mar, PaO₂/FiO₂ <300 mmHg, FR >30 respirações/min ou infiltrados pulmonares >50%, e os com doença crítica apresentam insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos (73).

Coleta e separação de plasma para os experimentos laboratoriais

Os experimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de Farmácia Clínica (CliPhar) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNICAMP. As amostras de todos os pacientes com COVID-19 foram coletadas até o 10º dia a partir do início dos sintomas da doença. O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA (etilenodiamino-tetracético) como anticoagulante e centrifugado a 2.500 rpm, à 4°C por 10 minutos para a separação do plasma. O plasma foi aliquoteado e armazenado em freezer a -80°C até a realização dos experimentos.

Para o grupo Controle, além da amostra de sangue coletada em tubos contendo EDTA como anticoagulante (n=4 para o objetivo específico 2; n=40 para o objetivo específico 3) também foi necessário realizar a coleta de swab nasofaríngeo para determinação de SARS-CoV-2 por RT-qPCR, para comprovação da condição de controle (Covid-19 negativo). Os kits utilizados para a extração da amostra biológica e para o RT-qPCR em si foram o PureLink™ RNA Mini, marca Invitrogen, e o GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System, marca Promega, sendo ambos os ensaios conduzidos de acordo com as instruções do fabricante.

Extração de miRNAs

A extração dos miRNAs foi realizada utilizando o kit *miRNeasy Serum/Plasma* (Qiagen, Cat No. /ID: 217184), e todas as instruções do fabricante foram seguidas.

O reagente de lise QIAzol, incluído no kit, é uma solução monofásica de fenol e tiocianato de guanidina desenvolvida para facilitar a lise celular, desnaturar complexos proteicos e para remover a maior parte de DNA e proteínas residuais do lisado por extração orgânica. Após a adição de clorofórmio, o lisado é separado nas fases orgânica e aquosa por centrifugação. O RNA se divide na fase superior, aquosa, enquanto o DNA se divide na interfase e as proteínas na parte inferior, orgânica, ou na interfase. A fase aquosa é separada e é adicionado etanol para fornecer condições de ligação apropriadas para todas as moléculas com 18 nucleotídeos ou mais. A amostra então é adicionada à uma coluna de rotação, na qual o RNA total se liga à membrana de sílica e o fenol e outros contaminantes são removidos. Por fim, o RNA é eluído em um pequeno volume de água livre de RNase.

A figura 4 ilustra as etapas envolvidas no processo de extração de miRNAs.

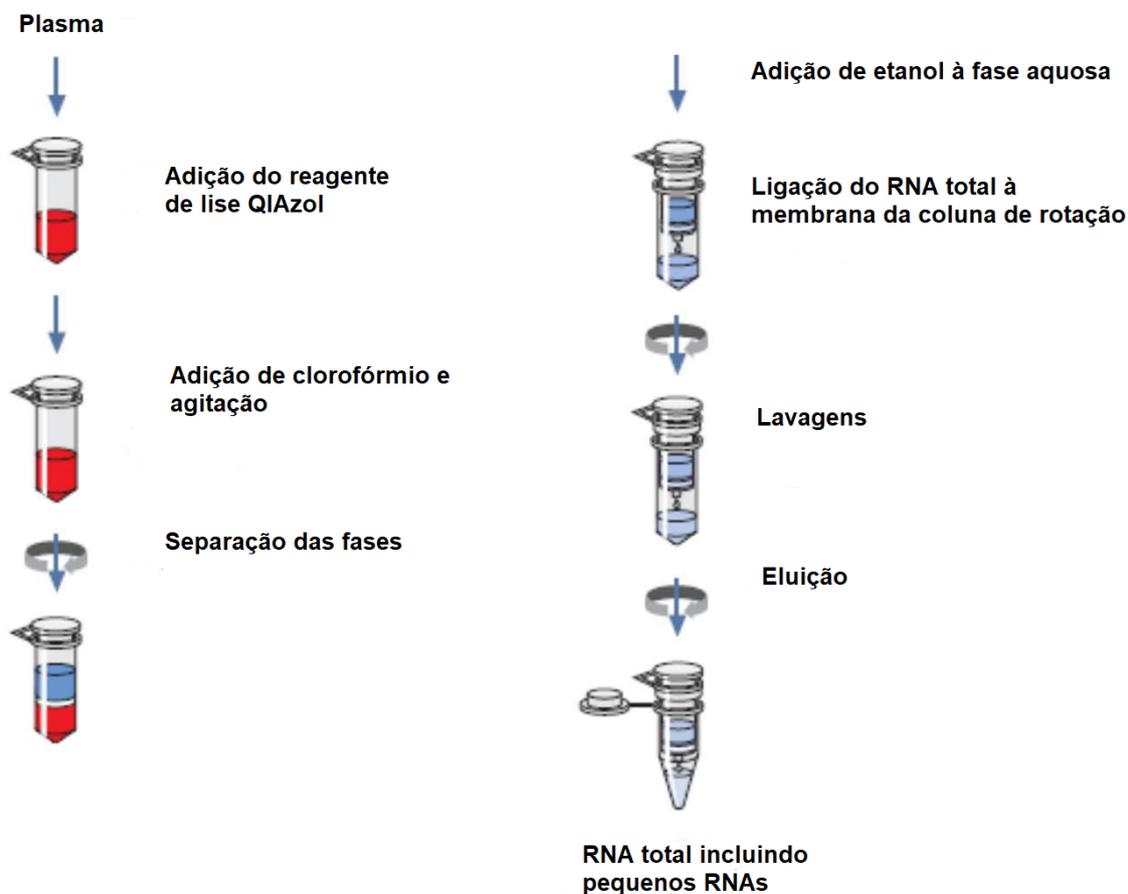


Figura 4. Etapas da extração de miRNA (Adaptado de: *miRNeasy Serum/Plasma Handbook* – Qiagen).

Para o objetivo específico 3, logo após a adição de QIAzol, foram adicionadas aproximadamente 15 fmol do controle exógeno (*spike-in*) cel-miR-39, marca Integrated DNA Technologies (IDT), com a finalidade de monitorar a qualidade no processamento e quantificação das amostras.

B) Objetivo específico 2

Construção de bibliotecas e sequenciamento

A montagem das bibliotecas de miRNAs foi realizada com 5 uL de cada amostra de miRNA previamente extraído, utilizando o *QIAseq™ miRNA Library*

Kit (Qiagen, Cat No./ID: 331502), e todas as instruções do fabricante foram seguidas.

A montagem das bibliotecas se baseia na ligação de adaptadores nos grupos hidroxil 3' e fosfato 5' dos miRNAs maduros, permitindo a transcrição reversa através de primers específicos, contendo Identificadores Únicos Moleculares (UMI), que se ligam na região do adaptador 3'. Em seguida é realizada a limpeza do cDNA através da adsorção do DNA em esferas magnéticas na presença de álcool. Após a limpeza, é realizada a amplificação da biblioteca através do pareamento de primers *forward*, ligados a identificadores específicos para cada amostra, e de um primer reverso universal. Por fim é feita uma limpeza da biblioteca utilizando novamente esferas magnéticas.

A figura 5 ilustra as etapas realizadas durante a montagem das bibliotecas.

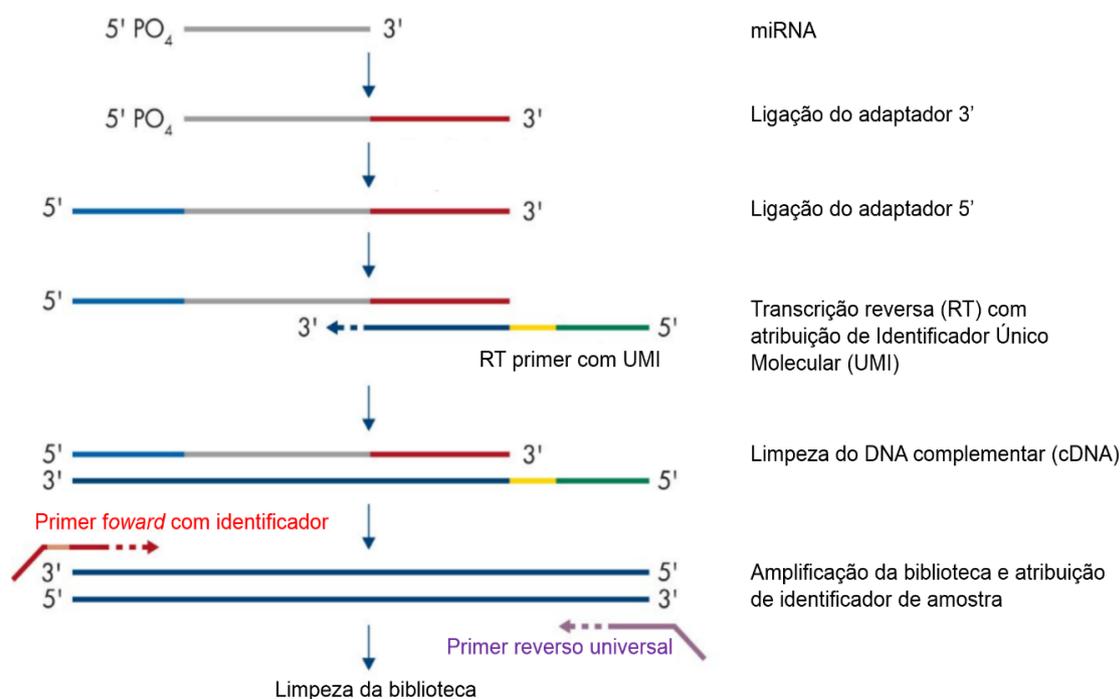


Figura 5. Etapas da montagem das bibliotecas de miRNA. (Adaptado de: *QIAseq® miRNA Library Kit Handbook* – Qiagen).

As amostras foram enviadas para o Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) para realização das etapas de controle de qualidade e sequenciamento. O controle de qualidade das bibliotecas foi realizado através da análise do tamanho das mesmas pelo *4200 TapeStation*

Instrument (Agilent Technologies) e da concentração (em ng/ μ L) pelo *Qubit Fluorometric Quantitation* (Thermo Fisher Scientific). Foram utilizados 1 μ L e 2 μ L para análise do tamanho das bibliotecas e concentração, respectivamente.

O sequenciamento foi realizado utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2500, sendo geradas 25-30 milhões de leituras por amostras, número adequado para análise de sequenciamento de miRNAs.

Análises de bioinformática

As análises primária e secundária foram conduzidas no *GeneGlobe*. A análise primária é baseada na contagem de UMIs e no mapeamento das seqüências de miRNA, enquanto a análise secundária, usando a contagem de UMIs para cada miRNA, realiza a análise de expressão diferencial.

Para a identificação dos potenciais genes alvos preditos por esses miRNAs, foi utilizado o software *miRWalk 2.0*, que fornece os alvos preditos de acordo com 12 bases de dados diferentes, incluindo o *TargetScan*. A fim de visualizar a interação conjunta dos diferentes miRNAs e seus genes alvos, foram construídas matrizes. As matrizes foram ordenadas de acordo com os genes preditos por mais miRNAs diferentes, sendo selecionados os genes relacionados a 5 ou mais miRNAs para a análise de enriquecimento. O software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA[®], Qiagen) foi utilizado para identificar as principais vias de sinalização canônicas nas quais os miRNAs diferentemente expressos estão envolvidos.

Análise estatística

Para as análises secundárias, os resultados foram normalizados usando o método DESeq2 e os valores de p listados foram retornados pelo software Bioconductor. Os resultados foram expressos como *fold-change* (FC) e *fold-regulation* (FR). FC é a expressão normalizada de miRNA em cada amostra teste dividida pela expressão normalizada de miRNA na amostra controle. FR representa os resultados de FC de uma forma biologicamente significativa. Valores de FC maiores que 1 indicam regulação positiva e FR é igual a FC. Valores de FC menores que 1 indicam regulação negativa, e FR é o inverso

negativo do FC. $FR \geq 1,6$ ou $FR \leq -1,6$ foram usados como critério para selecionar miRNAs expressos diferencialmente entre o grupo caso e controle. Para análise de enriquecimento dos genes-alvo previstos, os valores de p foram calculados pelo teste exato de Fisher. O teste t de Student foi usado para comparar a média de idade dos grupos.

O nível de significância adotado foi de 5%.

C) Objetivo específico 3

Validação por RT-qPCR

A validação por RT-qPCR compreendeu a síntese de cDNA a partir das amostras de miRNAs, a seleção de miRNAs como normalizadores endógenos e a RT-qPCR propriamente dita.

Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o *TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Cat No. /ID: A28007)*, e todas as instruções do fabricante foram seguidas.

A síntese de cDNA envolve a modificação de miRNAs maduros pela adição de uma cauda poli(A) em suas extremidades 3', seguido pela ligação de um adaptador às extremidades 5'. Um primer RT Universal se liga a cauda poli(A) e o miRNA é transcrito reversamente. Por fim, primers forward e reverse aumentam o número de moléculas de cDNA numa reação de amplificação.

A figura 6 ilustra as etapas realizadas durante a síntese de cDNA.

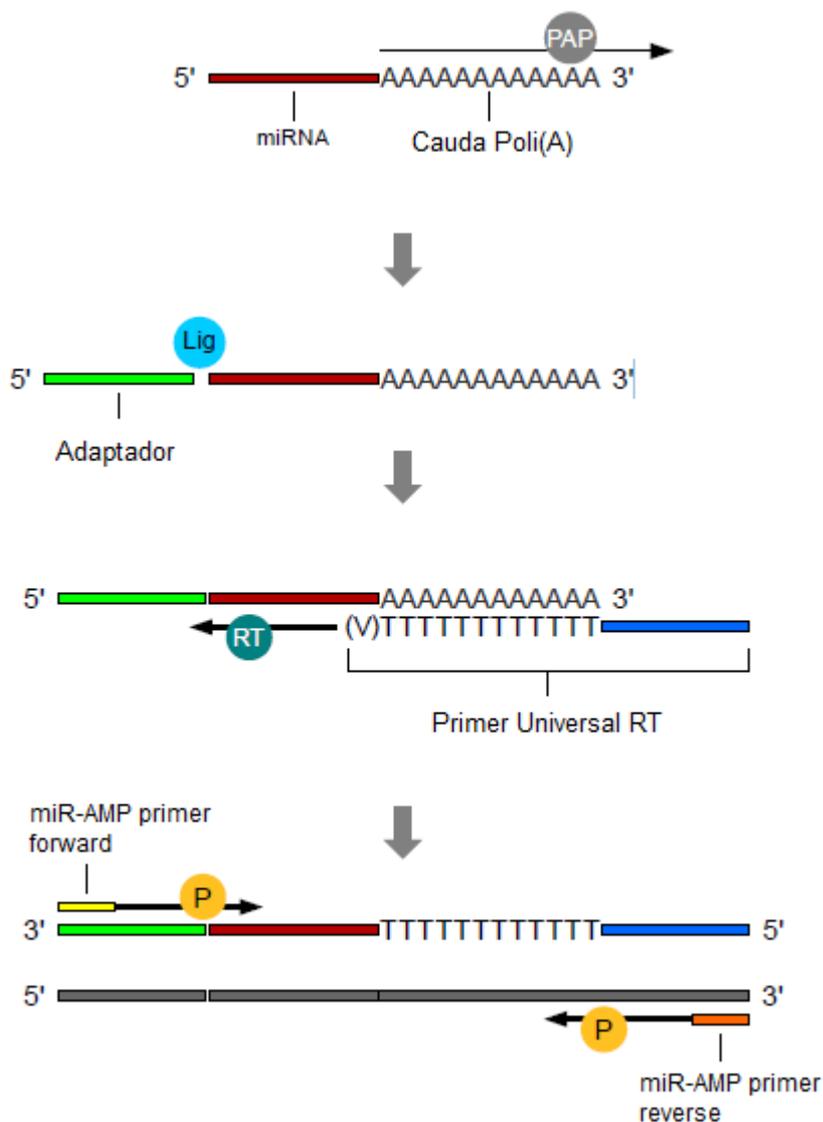


Figura 6. Etapas da síntese de cDNA (Adaptado de: TaqMan® Advanced miRNA Assays - USER GUIDE – Applied Biosystems). PAP: Poli(A) polimerase; Lig: Ligase; RT: Transcriptase reversa; P: DNA polimerase de inicialização a quente.

Seleção de miRNAs como normalizadores endógenos

Para avaliar a expressão gênica de miRNAs por RT-qPCR é necessário além da utilização de um controle exógeno, para monitorar a quantidade de amostra e a eficiência da extração, a utilização de controles endógenos, ou seja, miRNAs que não tiveram sua expressão alterada independente do grupo/tratamento em que foram alocados e que se encontram moderadamente abundantes nas amostras em questão. A normalização por genes de controle

endógenos é atualmente o método mais preciso para corrigir possíveis vieses causados por coleta de amostras, variação na quantidade de material de partida, eficiência da transcrição reversa e preparação e qualidade do ácido nucleico (74,75).

Assim, com base nos resultados preliminares referentes ao objetivo 2 deste estudo, na qual foi empregada a técnica de sequenciamento de nova geração, foram selecionados quatro miRNAs candidatos a normalizadores, a saber: hsa-34a-3p, hsa-miR-194-3p, hsa-miR-17-3p e hsa-miR-205-3p. Para esta seleção, foram adotados os seguintes critérios: 1) FC igual a 1; 2) p-valor = 0,999; e 3) não possuir nenhum tipo de comentário pela análise final do *GeneGlobe*.

A análise de normalização foi realizada através da ferramenta online RefFinder (<https://blooge.cn/RefFinder/>). Ela compreende quatro diferentes ferramentas de normalização comumente usadas, o BestKeeper, o DeltaCt comparativo, o NormFinder e o GeNorm, contando com diferentes algoritmos para avaliar o gene ou o par de genes expressos de forma mais estável. As ferramentas calculam um valor de estabilidade para cada gene candidato, de forma que quanto menor o valor de estabilidade, mais estável é a expressão do gene em questão (75).

Além disso, as diferenças nos valores médios de ΔCt (Ct miR candidato – Ct Cel-miR-39) para os grupos caso e controle foram analisadas para cada miRNA candidato a normalizador, aplicando-se um teste T de Student não-pareado.

Com base nestes critérios, os miRNAs hsa-miR-34a-3p e hsa-miR-205-3p foram selecionados como controles endógenos.

RT-qPCR

A RT-qPCR foi realizada utilizando o *TaqMan™ Advanced miRNA Assays* (Applied Biosystems, Cat No. /ID:A25576), e as instruções do fabricante foram seguidas com algumas modificações. O volume total do mix de reação para a PCR foi reduzido para 7,5 μL e 2,5 μL de cada amostra de cDNA (1:10) foi pipetado à um micro tubo de 100 μL , de forma que o volume final da reação em cada micro tubo foi de 10 μL . As reações foram realizadas em duplicata.

As condições de ciclagem foram: *Hold*: 95°C, 20 segundos; *Cycling*: 95°C, 15 segundos; 60°, 60 segundos, e os *thresholds* foram traçados para cada miRNA analisado. Além dos miRNAs selecionados para a validação, também foi realizada a qPCR do controle exógeno cel-miR-39 e a dos controles endógenos hsa-miR-34a-3p e hsa-miR-205-3p para normalização dos resultados.

As análises dos miRNAs foram feitas através do Rotor-Gene Q Series Software. As expressões relativas dos miRNAs foram obtidas através do método $2^{-\Delta CT}$, onde ΔCT = ciclo de quantificação (CT) do miR candidato – CT do controle exógeno ou endógeno previamente selecionado.

A técnica de RT-qPCR tem como objetivo a amplificação de uma sequência específica de DNA, atrelada à geração de fluorescência através da adição de uma sonda de oligodesoxinucleotídeo contendo um fluoróforo, e compreende as etapas de desnaturação da fita dupla de DNA, o anelamento dos primers forward e reverse às sequências complementares ao longo das fitas molde de DNA e a extensão ou polimerização, na qual a DNA polimerase acrescenta os deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTPs) às fitas molde de acordo com o pareamento das bases.

A sonda TaqMan® MGB hibridiza especificamente uma sequência complementar entre os locais dos primers forward e reverse. Quando a sonda está intacta, a proximidade do repórter e do quencher suprime a fluorescência do repórter. Durante a polimerização, a DNA polimerase cliva apenas as sondas que hibridizam com a sequência alvo. A clivagem separa o repórter do quencher, resultando em aumento de fluorescência, que é detectada pelo equipamento.

A figura 7 ilustra as etapas da RT-qPCR.

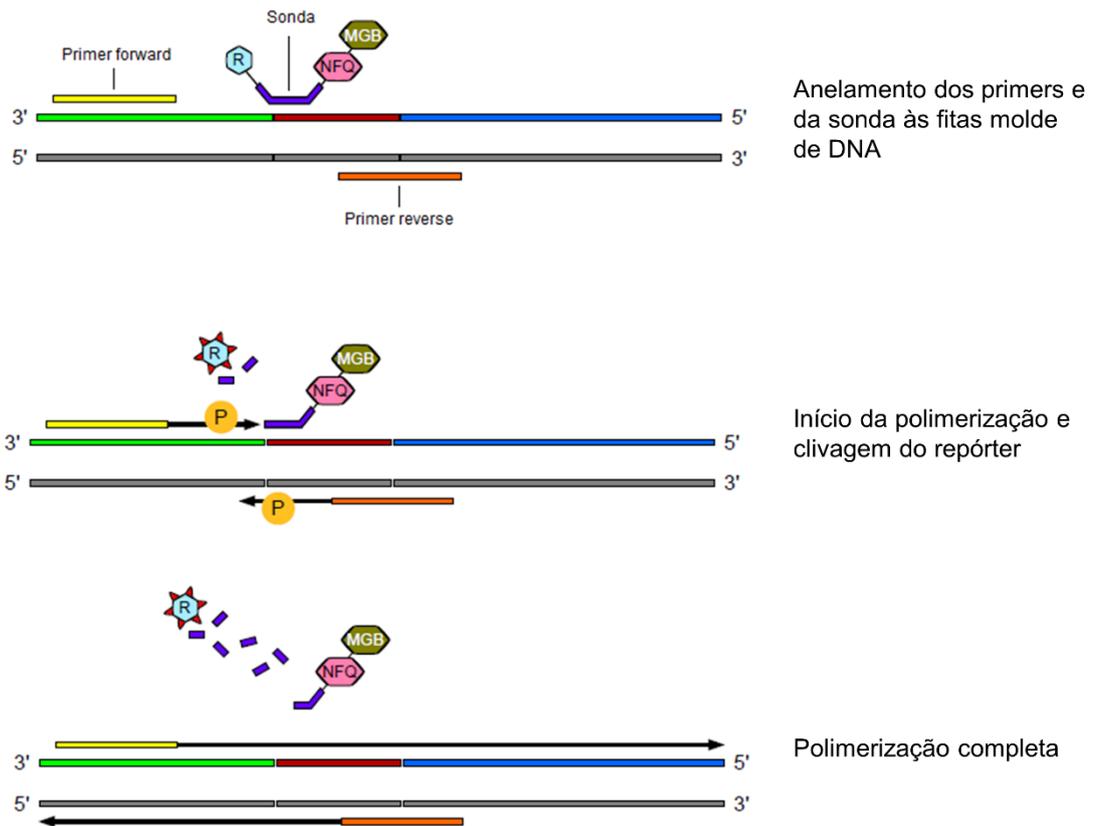


Figura 7. Etapas da RT-qPCR (Adaptado de: TaqMan® Advanced miRNA Assays - USER GUIDE – Applied Biosystems). P: DNA polimerase de inicialização a quente; R: Corante repórter; NFQ: Corante quencher não-fluorescente; MGB: Aglutinante de ranhura menor.

Análise *in silico*

Uma análise *in silico* foi realizada para identificar as vias alvo preditas para os miRNAs validados relacionadas à patogênese da doença em questão. A análise foi realizada usando o software online mirPath v.3, baseado no servidor web TargetScan (<https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/mirpathv3/index.php?r=mirpath#mirnas=hsa-miR-320b&methods=TargetScan&selection=0>, acessado em 1º de agosto de 2023).

Análise estatística

Para descrever o perfil da amostra foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas, com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%), e medidas descritivas (média e desvio padrão).

Para comparação entre os grupos foram utilizados os testes de qui-quadrado ou exato de Fisher para variáveis categóricas e o teste de Mann-Whitney para variáveis numéricas.

Foram construídas curvas *Receiver Operating Characteristics* (ROC) com apresentação das medidas de diagnóstico (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo). O nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em forma de artigo para cada objetivo específico proposto respectivamente:

4.1. Artigo 1: Publicado

Visacri MB, Nicoletti AS, Pincinato EC, Loren P, Saavedra N, Saavedra K, Salazar LA, Moriel P. Role of miRNAs as biomarkers of COVID-19: a scoping review of the status and future directions for research in this field. *Biomark Med.* 2021 Dec;15(18):1785-1795. doi: 10.2217/bmm-2021-0348. Epub 2021 Nov 17. PMID: 34784802; PMCID: PMC8601154 (76).

Reproduzido de Future Oncol. (2007) 3(5), 569-574 com permissão da Future Medicine Ltd.

4.2 Artigo 2: Publicado

Nicoletti AS, Visacri MB, da Ronda CRDSC, Vasconcelos PEDNS, Quintanilha JCF, de Souza RN, Ventura DS, Eguti A, Silva LFS, Perroud Junior MW, Catharino RR, Reis LO, Dos Santos LA, Durán N, Fávares WJ, Lancellotti M, da Costa JL, Moriel P, Pincinato EC. Differentially expressed plasmatic microRNAs in Brazilian patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19): preliminary results. *Mol Biol Rep.* 2022 Jul;49(7):6931-6943. doi: 10.1007/s11033-022-07338-9. Epub 2022 Mar 17. PMID: 35301654; PMCID: PMC8929466 (77).

Reproduzido com permissão da Springer Nature

4.3 Artigo 3: Submetido

Nicoletti AS, Visacri MB, da Ronda CRDSC, Siguemoto JT, Neri CM, de Souza RN, Ventura DS, Eguti A, Silva LFS, Perroud Junior MW, Reis LO, Dos Santos LA, Durán N, Fávares WJ, da Costa JL, Moriel P e Pincinato EC. Increased

expression of miR-320b in blood plasma patients in response to SARS-CoV-2 infection



Role of miRNAs as biomarkers of COVID-19: a scoping review of the status and future directions for research in this field

Marília B Visacri^{‡,1}, Aline S Nicoletti^{‡,1}, Eder C Pincinato², Píra Loren³, Nicola's Saavedra³, Kathleen Saavedra³, Luis A Salazar³ & Patricia Moriel^{*,4}

¹Department of Pharmacology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, 13083-887, Brazil

²Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, 13083-887, Brazil

³Center of Molecular Biology & Pharmacogenetics, Scientific & Technological Bioresource Nucleus, Universidad de La Frontera, Temuco, 4811230, Chile

⁴Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, 13083-871, Brazil

*Author for correspondence: patricia.moriel@fcf.unicamp.br

‡Authors contributed equally

Aim: miRNAs are potential biomarkers of several diseases. This review aimed to identify the miRNAs that could serve as biomarkers of COVID-19. **Materials & methods:** A literature search of nine databases was carried out for studies published before 13 June 2021 that described dysregulated miRNAs in cells or animals infected by SARS-CoV-2 or in patients with COVID-19. Two independent reviewers selected the studies and extracted data; disagreements were resolved by a third reviewer. **Results:** Twenty studies were included in this scoping review; results suggested that miR-21-5p, miR-146a, miR-126-3p, miR-144 and miR-155 are the most important dysregulated miRNAs that could serve as biomarkers for diagnosing and indicating the severity of COVID-19. miRNAs appear to play key roles in viral replication, proliferation of infected cells, immune response, inflammation and cardiovascular dysfunction. **Conclusion:** This review provides insights into the role of miRNAs as biomarkers in COVID-19 and the current status and future directions for research in this field.

First draft submitted: 30 April 2021; Accepted for publication: 10 September 2021; Published online: 17 November 2021

Keywords: biomarkers • COVID-19 • epigenomics • miRNAs • review • SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 is a novel betacoronavirus that has been identified as the infectious agent responsible for COVID-19 [1]. After the initial outbreak in Wuhan, China, COVID-19 spread worldwide; the COVID-19 pandemic was declared in March 2020 [2]. At the time of writing this article (July 2021), more than 185 million cases of COVID-19 had been reported across 223 countries that resulted in some 4 million deaths [3]. There is no specific treatment available for COVID-19, and the management of the disease is empirical [4]. To date, only three vaccines have been approved by the US FDA: Pfizer-BioNTech, Moderna and Janssen (Johnson & Johnson) COVID-19 vaccines [5]. However, other vaccines have been approved in other countries [6].

Real-time reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) performed on nasopharyngeal or oropharyngeal swabs is the most widely used diagnostic method for SARS-CoV-2 infection [7]. However, this technique has been criticized for being relatively invasive and associated with an increased risk of cross-infection [8]. Serological tests based on the detection of SARS-CoV-2-specific antibodies, IgM and/or IgG may also be used to diagnose COVID-19 [9]. IgM detection can be interpreted as an indicator of acute infection, whereas IgG detection represents previous infection/immunity [9]. However, serological tests have low sensitivity when performed in the early days after the onset of symptoms, have significant rates of false-negative results and show poor result validation [9]. Chest computed tomography is an alternative test for diagnosing and monitoring COVID-19 [10]. Finally, some inflammatory (procalcitonin, C-reactive protein), hematologic (lymphocyte, thrombocytes) and biochemical (creatinine kinase-MB, troponin I, D-dimer, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, lactate dehydrogenase and *l*-glutamyltransferase) biomarkers have been associated with severe COVID-19 and might help in the prognostic risk stratification of

patients with COVID-19 [11]. Therefore, the identification of effective diagnostic biomarkers and predictors of COVID-19 severity are increasingly enabling patients to receive accurate and targeted therapy [12].

miRNAs are small (~22-nucleotide long) noncoding RNAs that enhance mRNA degradation and inhibit protein translation [13], play essential regulatory roles in several biological processes and are potential disease biomarkers [13,14]. miRNAs may be useful in diagnosing diseases, evaluating their prognosis, providing potential therapeutic targets and improving our understanding of the physiopathology and signaling pathways involved in diseases [15]. Since viral infection may change host miRNA expression [16] and dysregulated miRNAs have already been studied as biomarkers of several infectious diseases [17], it is expected that miRNAs can also serve as biomarkers of COVID-19 [18–21]. This review aimed to identify which dysregulated miRNAs could serve as biomarkers of COVID-19 and their specific roles.

Materials & methods

This scoping review was conducted following the recommendations of the Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses statement for Scoping Reviews (PRISMA-ScR) [22]; the review protocol has been registered in the Open Science Framework (<https://doi.org/10.17605/OSF.IO/M5VJ6>).

Search strategy

A comprehensive search of literature published before 13 June 2021 was performed using PubMed, PubMed Central, BVS/BIREME, Web of Science, Scopus, EBSCOhost, ProQuest, Embase and Cochrane Library databases to identify relevant studies. The search strategy included a combination of terms related to COVID-19 and miRNAs; the full search strategy can be found in Supplementary Appendix One no language restrictions were imposed.

Study selection

Cell, animal and human studies that described dysregulated miRNAs in COVID-19 were included. Studies with a purely computational approach and RNA-seq from databases were excluded. Preprints, books and book chapters, editorials, comments, conference proceedings or abstracts and literature reviews and guidelines were also excluded. The studies retrieved from the databases were examined using the Rayyan QCRI program [23] to exclude duplicate files (Phase I), analyze the titles and abstracts of the articles (Phase II) and analyze complete articles of the previously selected abstracts (Phase III). Two reviewers (MBV and ASN) independently reviewed the titles and abstracts of all studies identified by the searches and discussed and addressed any discrepancies arising with a third reviewer (PM). In addition, references cited in all included articles were reviewed to identify any studies that might have been missed.

Data extraction & analysis

For each included study, details of the author, date of publication or online availability, country, publication type, population, samples, methods used to identify miRNAs, the time when miRNAs were analyzed, miRNAs differentially expressed in SARS-CoV-2-infected cells or animals and patients with COVID-19 (or exposed to SARS-CoV-2), pathophysiological implications of dysregulated miRNAs and main conclusions on the role of miRNAs as biomarkers of COVID-19 were extracted. Two reviewers (MBV and ASN) independently completed data extraction using a preformatted Microsoft Excel spreadsheet. Disagreements were resolved by a third reviewer (PM).

The results of this scoping review are presented using the narrative synthesis approach. Following the PRISMA-ScR guidelines [22], no quality assessment was performed because scoping reviews aim to identify all the available evidence and highlight their main characteristics regardless of the evidence quality.

Bioinformatics analysis

To generate the interaction network of selected miRNAs, we employed miRTargetLink 2.0, a tool containing experimentally validated interactions on human miRNA–mRNA pairs. Data shown correspond to miRNA–target interactions with strong support, in other words, validated experimentally by reporter assay, western blot, qPCR, microarray and/or next-generation sequencing experiments. The software obtains miRNAs annotations from the latest version of miRBase (v.22.1), while the experimentally validated targets are retrieved from miRTarBase (v.8) and miRATBase. miRTargetLink 2.0 can be freely accessible from the following link (<https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2/>).

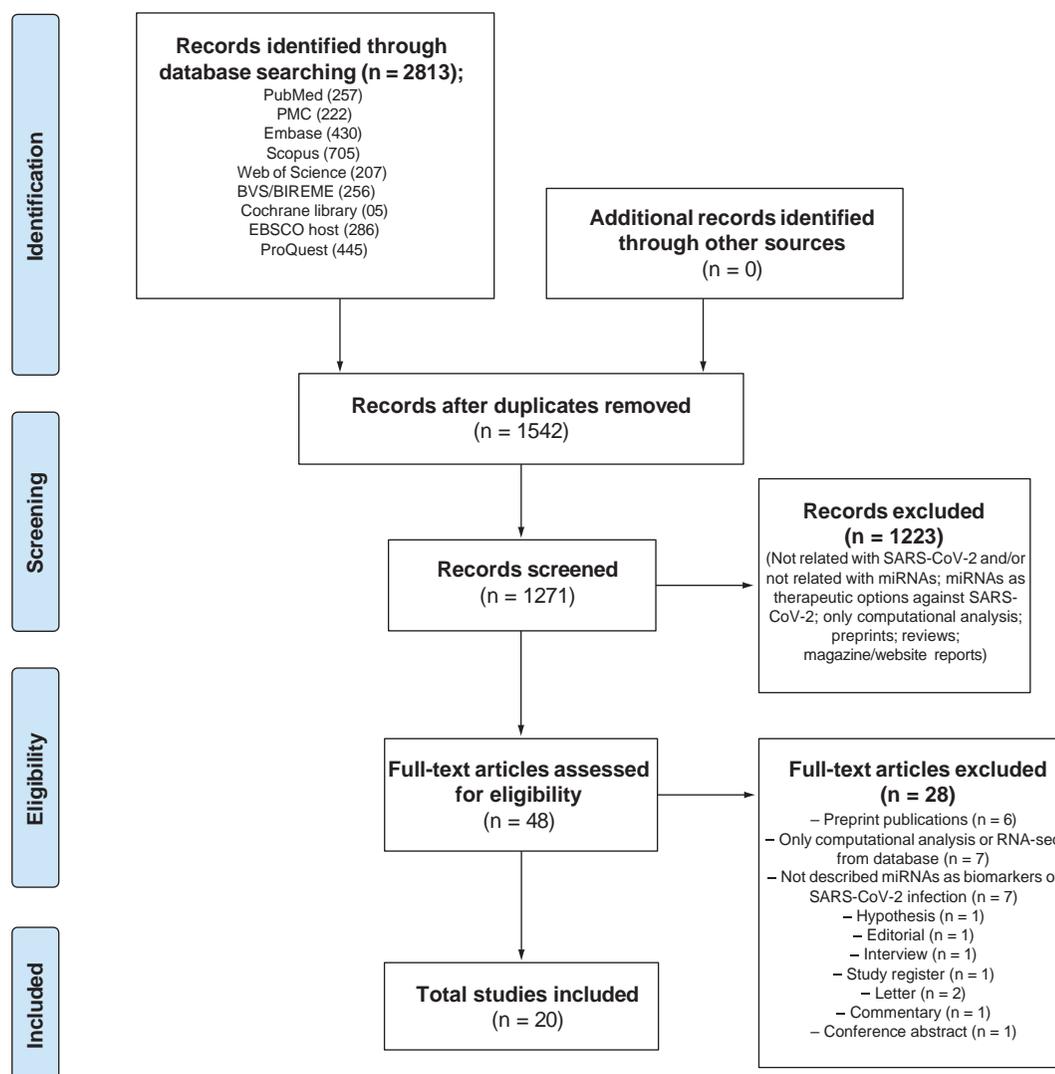


Figure 1. Study selection flowchart through literature search.

Results

Search results

An electronic search identified 2813 potentially relevant studies. After removing duplicates and reviewing the titles and abstracts, 48 articles were selected for full-text reading. In addition, no relevant studies were identified by searching the reference lists of the selected studies. After careful full-text reading, 20 studies [24–43] met the inclusion criteria and were thus included in the review. A flowchart of the literature search is shown in Figure 1. The references for the excluded studies, along with the reasons for their exclusion, are available in Supplementary Appendix Two.

Characteristics of the included studies

The characteristics of the 20 studies included in this scoping review are summarized in Table 1. All studies were published in English and reported between October 2020 and June 2021. Moreover, four studies were conducted in cells [24–27], one in an animal model [28] and 15 in humans [29–43]. Seventeen studies were published as research/original articles [24–34,38–42], one as a technical report [43], one as a rapid report [37] and one as correspondence [35]. Nine of these studies were conducted in China (Table 1) [24,29–32,35,38–40].

Overall, the human studies included a small number of participants. Of the 15 studies, 12 used control groups (healthy volunteers or patients without COVID-19 or not exposed to SARS-CoV-2) for the comparisons [29–31,33–41], while three studies included only patients with COVID-19 [32,42,43]. Interestingly, one study also compared

Table 1. Characteristics of the studies included in this scoping review.

Study	Date of publication (or online availability)	Country	Publication type	Population	Ref.
Cell study					
Liu <i>et al.</i>	Jan 2021	China	Original Article	Vero E6 cell line infected with SARS-CoV-2 and controls (to verify differently expressed virus-encoded miRNAs) and BEAS-b2 cells (to validate the regulatory role of the virus-encoded miRNAs on human genes).	[24]
Wyler <i>et al.</i>	Mar 2021	Germany	Original Article	Calu-3 cells infected with SARS-CoV-2 and controls.	[25]
Mishra and Banerjia	Apr 2021	India	Original Research	SARS-CoV-2 Spike gene transfected HEK-293T cells and controls (to quantify miRNAs in released exosomes - 'exosomes donor cells') and CHME3 cells (to assess the protein expression levels of miRNAs target genes - 'exosome recipient microglia').	[26]
Recchiuti <i>et al.</i>	Apr 2021	Italy	Research Article	Macrophages from monocytes culture of peripheral blood obtained from adult volunteers with or without cystic fibrosis. Macrophages exposed to SARS-CoV-2 virion spike 1 glycoprotein (S1) and controls.	[27]
Animal study					
Kim <i>et al.</i>	Nov 2020	Korea	Research Article	Hamsters infected with SARS-CoV-2 (n = 5) and uninfected control hamsters (n = 5).	[28]
Human studies					
Li <i>et al.</i>	Oct 2020	China	Research Article	Patients with mild or moderate COVID-19 (n = ten; gender: four male/six female; mean age: 44.9 years) and healthy volunteers (n = four; gender: two male/two female; mean age: 44.8 years).	[29]
Tang <i>et al.</i>	Oct 2020	China	Research Article	Patients with moderate (n = six; gender: four male/two female; range age: 20-89 years) and severe (n = six; gender: five male/one female; range age: 60-89 years) COVID-19 and healthy volunteers (n = four; gender: two male/two female; range age: 50-69 years).	[30]
Chen <i>et al.</i>	Dec 2020	China	Research Article	Patients with mild (mild or moderate disease (n = 50; gender: 28 male/22 female; mean age: 46.8 years)) and severe (severe or critical disease (n = 16; gender: 12 male/four female; mean age: 65.9 years)) COVID-19 and healthy volunteers (n = 17; gender: nine male/eight female; mean age: 32.9 years).	[31]
Zheng <i>et al.</i>	Dec 2020	China	Research Article	Patients with mild (n = six; gender: four male/two female; mean age: 23.4 years) and moderate (n = seven; gender: three male/four female; mean age: 49.1 years) and severe (n = five; gender: four male/one female; mean age: 58.0 years) COVID-19.	[32]
Sabbatinelli <i>et al.</i>	Dec 2020	Italy	Research Article	Patients with COVID-19 with multifocal interstitial pneumonia and requiring oxygen therapy (n = 29; gender: 17 male/12 female; these patients were divided in two groups for other objective and the mean age for general group was not shown) and healthy volunteers (n = 29; mean age: 64.1 years).	[33]
Garg <i>et al.</i>	Jan 2021	Germany	Research Article	Two cohorts: 1) Discovery cohort: mechanically ventilated COVID-19 patients (n = 18; gender: 17 male/one female; median age: 59 years) and healthy volunteers (n = 15; gender: 14 male/one female; median age: 31 years). 2) Validation cohort: mechanically ventilated COVID-19 patients (n = 20; gender: 14 male/six female; median age: 59.5 years), invasively ventilated influenza-induced ARDS patients (n = 13, gender: 11 male/two female; median age: 56 years) and healthy volunteers (n = 32; gender: 20 male/12 female; median age: 50 years).	[34]
Yang <i>et al.</i>	Feb 2021	China	Correspondence	Patients with COVID-19 (n = five) and healthy volunteers (n = three).	[35]
Bagheri-Hosseinabadi <i>et al.</i>	Mar 2021	Iran	Original Article	Patients with COVID-19 (n = 33; gender: 13 male/20 female; mean age: 62.4 years) and healthy volunteers (n = 29; gender: nine male/20 female; mean age: 56.6 years).	[36]
Centa <i>et al.</i>	Mar 2021	Brazil	Rapid Report	Patients who died due to ARDS, DAD, and multiple organs failure by SARS-CoV-2 infection (n = nine; gender: six male/three female; mean age: 73.4 years) and patients who died due to other causes, not involving lung injuries (n = ten; gender: seven male/three female; mean age: 42.3 years).	[37]
Li <i>et al.</i>	Mar 2021	China	Research Paper	Recovered COVID-19 patients (mild/moderate disease (n = 30; gender: 16 male/14 female; median age: 48.0 years) and severe/critical disease (n = 16; gender: 13 male/three female; median age: 54.0 years)) and healthy volunteers (n = 24; gender: ten male/14 female; median age: 36.0 years).	[38]
Mi <i>et al.</i>	Mar 2021	China	Research Paper	Fracture patients with IgG (-) (n = 50) and IgG (+) (n = 30) to SARS-CoV-2.	[39]
Li <i>et al.</i>	Apr 2021	China	Research Article	Patients with COVID-19 (n = ten; gender: four male/six female; mean age: 44.9 years) and healthy volunteers (n = four; gender one male/three female; mean age: 34.8 years).	[40]
Donyavi <i>et al.</i>	Apr 2021	Iran	Research Article	Patients with COVID-19 (n = 18; gender: nine male/nine female; mean age: 38.2 years) and healthy volunteers (n = 15; gender: eight male/seven female; mean age: 36.6 years).	[41]

ARDS: Acute respiratory distress syndrome; BEAS-b2: Human pulmonary epithelial cell; Calu-3: Human epithelial lung cancer cell; CHME3: Human microglial cell; DAD: Diffuse alveolar damage; HEK-293T: Human embryonic kidney cell; ICU: Intensive care unit; n: Number of animals or subjects; Vero E6: African green monkey kidney cell.

Table 1. Characteristics of the studies included in this scoping review (cont.).

Study	Date of publication (or online availability)	Country	Publication type	Population	Ref.
Gonzalo-Calvo <i>et al.</i>	May 2021	Spain	Original Research Article	Two cohorts: 1) Patients with COVID-19 admitted to the pneumology, infectious diseases or internal medicine wards without requiring critical care (n = 43; gender: 18 male/25 female; mean age: 68.0 years) or admitted to the ICU (n = 36; gender: 26 male/ten female; mean age: 68.0 years). 2) Patients with COVID-19 admitted to ICU nonsurvivors (n = 16; gender: 11 male/five female; mean age: 70.5 years) and survivors (n = 20; gender: 15 male/five female; mean age: 60.0 years).	[42]
Mitchell <i>et al.</i>	Jun 2021	USA	Technical Report	Patients with mild (n = 13; gender: seven male/six female; mean age: 56.2 years) and severe (n = 17; gender: 15 male/two female; mean age: 69.1 years) COVID-19.	[43]

ARDS: Acute respiratory distress syndrome; BEAS-2: Human pulmonary epithelial cell; Calu-3: Human epithelial lung cancer cell; CHME3: Human microglial cell; DAD: Diffuse alveolar damage; HEK-293T: Human embryonic kidney cell; ICU: Intensive care unit; n: Number of animals or subjects; Vero E6: African green monkey kidney cell.

patients with COVID-19 and patients with influenza-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) [34]. Six studies stratified the group of patients with COVID-19 into subgroups by severity [30–32,38,42,43], while one included only patients with mild/moderate disease [29], three included only severely affected and/or critically ill patients [33,34,37] and four did not report the disease severity [35,36,40,41]. One study included patients who underwent orthopedic surgery and who had previously been infected with SARS-CoV-2 (IgG [+]) (Table 1) [39].

miRNAs as biomarkers of COVID-19

Of the four studies in cells, three quantified differentially expressed miRNAs in cells [24–27] and one in exosomes released from cells [26]. The only animal model study used lung tissue [28]. In most human studies, analysis was performed to identify miRNAs in samples derived from blood. Four used plasma [31,35,36,42], three used serum [33,34,43], one of which also used small extracellular vesicles from whole serum [43], three used whole peripheral blood [29,38,40], two used peripheral blood mononuclear cells [32,41] and one used red blood cells [30], in other words, circulating miRNAs; however, one used lung tissue [37] and the other did not specify the sample used [39] (Supplementary Appendix Three). The main results of the studies involving miRNAs as biomarkers of COVID-19 are shown in Supplementary Appendix Three.

Regarding the methods used to identify miRNAs, six studies used only sequencing to determine differentially expressed miRNAs [29–32,35,40], while three used quantitative PCR to confirm results previously obtained by sequencing [25,43] or microarray [39] and 11 used PCR to quantify miRNAs previously chosen by bioinformatic analysis or literature search [24,26–28,33,34,36–38,41,42] (Supplementary Appendix Three).

In vitro studies analyzed miRNAs after treatment with SARS-CoV-2 S1 recombinant protein for 3 h [27], 4h [25], 12 h [25], 24 h [25] and 48 h [24] after virus infection or 48 h after spike plasmid transfection [26]. The only animal study quantified miRNAs on the 4th day after infection [28]. Of the 15 human studies, three did not report the time when miRNAs were analyzed [30,34,40]. The other 12 reported this information (some were more specific and others less): samples were collected within 1 week after diagnosis [29], at baseline (~10 days of onset of symptoms) [33], at hospital admission [36], before or following admission to the clinical ward or the intensive care unit [42], at the time of hospitalization [43], over 5 weeks [31], at stages 1–4 of disease progression [35], at the three clinical stages (treatment, convalescence and rehabilitation) [32], during the acute period of the disease and in the recovery period (4–5 weeks after the acute phase) [41], post hospital discharge (in the disease recovery) [38], at the time of hospital admission with a fracture [39] and postmortem [37] (Supplementary Appendix Three).

Many miRNAs were significantly dysregulated in COVID-19 (Supplementary Appendices Three & Four). All studies quantified host miRNAs, except for one that analyzed virus-encoded miRNAs [24]. Host miR-21-5p [30,33,34,40], miR-146a [30,33,43], miR-126-3p [33,34,43], miR-144 [29,35,38] and miR-155 [25,34,38,41] have been shown to be dysregulated in more than two studies (miR-627-5p appears in three studies [29,40,43], but in two of them the patients were the same [29,43], so it was not considered). Among these miRNAs, circulating miR-21-5p (downregulated or upregulated), miR-144 (downregulated) and miR-155 (downregulated or upregulated) appear to be the main potential diagnostic biomarkers and miR-146a (downregulated) appeared to be the biomarker for the severity of COVID-19. In addition to being useful for diagnosis and analysis of severity, miRNAs may also be useful as predictors of mortality, biomarkers of stage/phase and therapeutic targets of COVID-19 (Supplementary

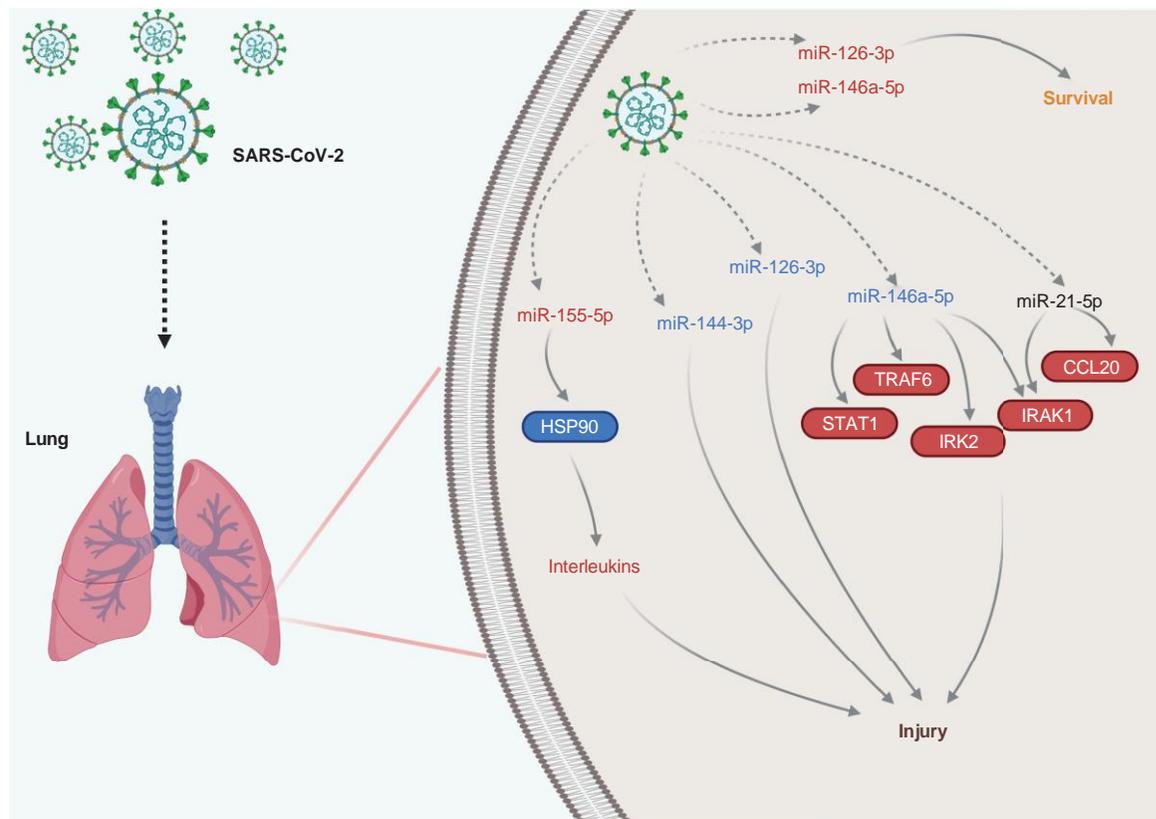


Figure 2. General mechanisms of miRNAs function in COVID-19.

Appendix Four). Dysregulated miRNAs appear to play key roles in the viral replication and proliferation of infected cells, immune response, inflammation, cardiovascular dysfunction, hyperactivation of human microglia and osteogenic differentiation and bone remodeling, contributing to the pathogenesis of COVID-19 and its sequelae (Supplementary Appendix Three). Figure 2 summarizes the general mechanisms of miRNAs function in COVID-19. The main genes regulated by these miRNAs, after bioinformatics analysis, are shown in Supplementary Appendices five–nine.

Discussion

Summary of evidence

We aimed to identify miRNAs as biomarkers of COVID-19 through a literature review. The main findings were as follows: the most important miRNAs, identified as potential candidate biomarkers, were miR-21-5p, miR-146a, miR-126-3p, miR-144 and miR-155; circulating miR-21-5p, miR-144 and miR-155 appear to be the main potential diagnostic biomarkers; miR-146a may serve as a biomarker of disease severity; the dysregulated miRNAs appear to play key roles in viral replication and proliferation of infected cells, immune response, inflammation, cardiovascular dysfunction, hyperactivation of human microglia and osteogenic differentiation and bone remodeling; miRNAs may serve as diagnostic biomarkers, indicators of disease severity, predictors of mortality, biomarkers of stage/phase and therapeutic targets of COVID-19. To the best of our knowledge, this is the first scoping review of differentially expressed miRNAs as biomarkers of COVID-19.

General view of the studies

In our view, the COVID-19 pandemic has changed the profile of published articles. More articles are being published as rapid or short communications containing little information. We also noted that many articles only commented on previously published articles, extrapolating the results for SARS-CoV-2 infection or were attempting to elucidate mechanisms, suggesting possibly important aspects of SARS-CoV-2 infection; we found that many

studies used only bioinformatics data. Although, these characteristics are justified by the urgency demanded by the pandemic and the need for knowledge about this new virus, such articles were excluded from our analysis.

Thus, we included only 20 studies in this scoping review despite the emergence of COVID-19 over a year ago, in December 2019 [1]. Most studies included in this scoping review were original/research articles [24–34,36,38–42] and conducted in humans [29–43]. Studies on miRNAs as biomarkers have mostly been conducted in cells and animal models. Since miRNAs as biomarkers can be detected in several tissues and body fluids [15], the human studies included in our review used blood and lung tissue samples [24–38,40–43].

Most of the studies were conducted in China [24,29–32,35,38–40] since this country was the first to be affected by SARS-CoV-2 [1]. We encourage further primary studies to be conducted mainly in North and South American populations where COVID-19 has a high incidence, utilizing a great opportunity for new research and development.

miRNAs as biomarkers of COVID-19

All the included studies reported dysregulated miRNAs probably induced by COVID-19, indicating that miRNAs are promising diagnostic biomarkers, indicators of disease severity, predictors of mortality, indicators of stage/phase of disease and therapeutic targets; miRNAs may be useful in the diagnosis, prognosis, monitoring and clinical management of COVID-19 and its consequences. Dysregulated miRNAs are related to viral replication, proliferation of infected cells, immune response, inflammation, cardiovascular dysfunction, hyperactivation of human microglia, osteogenic differentiation and bone remodeling [24–43]. Worldwide research has demonstrated that the pathogenesis of COVID-19 is associated with hyper inflammation and intensification of immune effects [44,45]; neurological and musculoskeletal sequelae, among others, can occur in patients with COVID-19 [46].

The most important miRNAs as biomarkers of COVID-19 appear to be miR-21-5p, miR-146a, miR-126-3p, miR-144 and miR-155. Four studies indicated that miR-21-5p expression was dysregulated (downregulated in three studies) in patients with COVID-19 compared with that in healthy volunteers [30,33,34,40] and thus may be a diagnostic biomarker. However, in one study, it was also significantly dysregulated in severe COVID-19 compared with that in moderate COVID-19 [30]. Moreover, this miRNA appeared to be more specific for SARS-CoV-2 infection since it was significantly more dysregulated in patients with COVID-19 than in patients with influenza-induced ARDS [34]. miR-21-5p regulates inflammation and is a marker of a proinflammatory state [33]. In a study that evaluated miRNAs as markers of cardiovascular damage in patients with COVID-19, miR-21-5p was associated with cardiac fibrosis and might be a predictor of chronic myocardial damage and inflammation in COVID-19 survivors [34]. Therefore, miR-21-5p may also be a potential therapeutic target for the management of COVID-19 and the prevention of its cardiovascular consequences.

Three studies found that miR-144 was expressed at lower levels in patients with COVID-19 than in healthy volunteers, revealing a potential biomarker for diagnosis [29,35,40]. However, these three studies used only sequencing technology to identify miRNAs and did not comment on the pathophysiological implications of miR-144.

Four studies revealed that miR-155 expression was dysregulated in COVID-19 [25,34,38,41]. An *in vitro* study showed that the upregulation of miR-155 expression was related to lung injury induced by SARS-CoV-2 and hence may be a potential therapeutic target [25]. Moreover, a human study [34] that compared dysregulated circulating miRNAs between patients with severe COVID-19 and healthy volunteers, as well as patients with severe COVID-19 compared with patients with influenza-induced ARDS, revealed that miR-155 expression was upregulated in both cases; thus, this miRNA may be specific for the diagnosis of SARS-CoV-2-induced ARDS. It might also be a predictor of chronic myocardial damage and inflammation in COVID-19 survivors [34]. Two other human studies indicated that miR-155 plays an important role in the immune response [38,41]. Interestingly, one study found that miR-155 expression was upregulated in patients with mild/moderate COVID-19 compared with that in patients with severe/critical COVID-19 and healthy volunteers, indicating that it is beneficial in controlling SARS-CoV-2 infection (an antiviral response) [38]. Another study indicated that miR-155-5p was a useful marker for discriminating between control and COVID-19 patients by receiver operating characteristic curve analysis [41]. Therefore, miR-155-5p may be used as a potential diagnostic biomarker [41] and may be associated with the progression to severe/critical COVID-19 [38].

Three studies showed that the expression of miR-146a [30,33,43] and miR-126-3p [33,34,43], all biomarkers of a proinflammatory state [33], was significantly downregulated in severe COVID-19. It has been shown that the downregulation of miR-146a expression promotes the inflammatory process since miR-146a-5p is negatively correlated with downstream target mRNA IL-1 receptor-associated kinases 1 and 2 (IRAK1 and IRAK2) and TRAF6 that participate in the NF- κ B proinflammatory pathway [30]. In addition, a decline in miR-146a-5p levels

may lead to the release of IL-6 [33]. miR-126-3p is a key regulator of endothelial inflammation [47]. Therefore, low levels of miR-146a and miR-126-3p indicate severe COVID-19 and may predict poor outcomes among those who develop systemic hyper inflammation [30,33,34,43].

Apart from those highlighted in this literature review, other miRNAs may also play important roles in COVID-19; these include miR-15b-5p [28,30] and members of the let-7 family (let-7a-5p, let-7b-3p, let-7b-5p, let-7d-5p, let-7f-5p) [27,31,32,41]. The precise roles of these miRNAs and their dysregulation might be clarified in future studies.

Limitations of the published studies

Cell lines used as *in vitro* models of COVID-19 are essential for the discovery of potential specific therapeutic targets; however, they might respond differently when compared with cells in an organism and; therefore, the findings of this study need to be validated in *in vivo* models [24,25]. Moreover, findings from animal studies need to be validated in humans as much as possible to increase the level of evidence. Regarding human studies; although, it is important to standardize the time of sample collection for analysis after infection or symptom onset, we observed that there was no standard time for the analysis of miRNAs between studies, and some studies did not specify the time elapsed since the onset of symptoms or diagnosis. Further research studies with standardized times need to be conducted, including more prospective longitudinal studies, to verify how these miRNAs behave over the time of infection and disease stage. Moreover, in some human studies, miRNAs described as potential biomarkers were detected by sequencing and need to be validated through RT-PCR in a higher number of patients. Since comorbidities (e.g., obesity, Type 2 diabetes and cardiovascular diseases) can influence the expression of miRNAs in the included studies, it is recommended that comorbidities be precisely matched between the interest and control groups, in addition to age and sex [30]. Finally, to validate the specificity of these miRNAs as biomarkers, future studies should include non-COVID-19 patients with pneumonia or ARDS as positive controls for moderate and severe disease groups as well as asymptomatic COVID-19 patients [30].

Limitations of this scoping review

Some studies may have been missed because they were not indexed in the searched databases. In addition, this review did not analyze the quality of the studies, considering the inherent characteristics of scoping reviews.

Conclusion

Based on the 20 included studies, the most important dysregulated miRNAs identified in the selected articles that may play a key role in COVID-19 pathogenesis were miR-21-5p, miR-146a, miR-126-3p, miR-144 and miR-155. Among these miRNAs, miR-21-5p, miR-144 and miR-155 appear to be the main potential diagnostic biomarkers and miR-146a appear to be biomarker of disease severity. In addition, miRNAs may be predictors of mortality, biomarkers of stage/phase and therapeutic targets of COVID-19, as they play key roles in viral replication, proliferation of infected cells, immune response, inflammation, cardiovascular dysfunction, hyperactivation of human microglia, osteogenic differentiation and bone remodeling. Further primary studies that demonstrate the role of miRNAs as biomarkers of SARS-CoV-2 infection/COVID-19 are needed.

Future perspective

This review provides insights into the role of miRNAs as biomarkers in COVID-19 and the current status and future directions for research in this field. To date, few studies have evaluated miRNAs as biomarkers of COVID-19. However, in the next few years, more studies are expected to be conducted and published, particularly based on populations of the North and South Americas. New miRNA biomarkers in other human biological samples (e.g., saliva) are expected to be discovered. In addition, miRNAs identified by sequencing must be validated by RT-PCR in a larger cohort and more studies including non-COVID-19 patients with pneumonia or ARDS as positive controls for moderate and severe disease groups as well as asymptomatic COVID-19 patients are required. Finally, the findings on miRNAs as biomarkers provide scope for research in the development of effective treatments for COVID-19.

Summary points

Search results

- A total of 2813 records were identified, 20 of which met the eligibility criteria.

Characteristics of the included studies

- All 20 studies were mostly research articles published in English between October 2020 and June 2021 and were mostly conducted in China.
- Fifteen studies were conducted in humans, four using cells and one in an animal model.

miRNAs as biomarkers of COVID-19

- miRNAs identified as the most important were miR-21-5p, miR-146a, miR-126-3p, miR-144 and miR-155.
- Among these miRNAs, miR-21-5p, miR-144 and miR-155 appear to be the main diagnostic biomarkers and miR-146a appear to be biomarker of disease severity.
- miRNAs may also be useful as predictors of mortality, biomarkers of stage/phase and therapeutic targets of COVID-19.

Future directions

- More studies are needed to investigate and validate the role of miRNAs as biomarkers of COVID-19.

Supplementary data

To view the supplementary data that accompany this paper please visit the journal website at: www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/bmm-2021-0348

Author contributions

MB Visacri, AS Nicoletti and P Moriel selected the articles and collected data from the studies included. MB Visacri, AS Nicoletti and EC Pincinato wrote the manuscript. P Loren, N Saavedra, K Saavedra and LA Salazar performed bioinformatics analysis. P Moriel revised the manuscript. All authors have read and agreed with the final version of the manuscript.

Acknowledgments

The authors would like to thank the librarian Ana Paula de Morais e Oliveira (School of Medical Sciences of University of Campinas) for all the support offered for conducting this scoping review.

Financial & competing interests disclosure

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (finance code 001 and 88881.504454/2020-01). MB Visacri is a recipient of a postdoctoral scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (no.: 88887.504453/2020-00). AS Nicoletti is a recipient of a doctoral scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (no.: 88887.511334/2020-00). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

References

1. Zhu N, Zhang D, Wang W *et al*. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 382(8), 727–733 (2020).
2. WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) – situation report – 52. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200312-sitrep-52-covid-19.pdf?sfvrsn%2%BCe2bfc9c0_4
3. WHO. WHO coronavirus (COVID-19) dashboard. <https://covid19.who.int/>
4. Phadke M, Saunik S. COVID-19 treatment by repurposing drugs until the vaccine is in sight. *Drug Dev. Res.* 81(5), 541–543 (2020).
5. FDA. COVID-19 vaccines. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/covid-19-vaccines>
6. TNY. Tracking coronavirus vaccinations around the world. <https://www.nytimes.com/interactive/2021/world/covid-vaccinations-tracker.html>
7. Torretta S, Zuccotti G, Cristofaro V *et al*. Diagnosis of SARS-CoV-2 by RT-PCR using different sample sources: review of the literature. *Ear Nose Throat J.* 100(Suppl. 2), S131–138S (2021).

8. Adeoye J, Thomson P. ‘The Double-Edged Sword’ – an hypothesis for Covid-19-induced salivary biomarkers. *Med. Hypotheses* 143, 110124 (2020).
9. Castro R, Luz PM, Wakimoto MD, Veloso VG, Grinsztejn B, Perazzo H. COVID-19: a meta-analysis of diagnostic test accuracy of commercial assays registered in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 24(2), 180–187 (2020).
10. Jin YH, Zhan QY, Peng ZY *et al.* Chemoprophylaxis, diagnosis, treatments, and discharge management of COVID-19: an evidence-based clinical practice guideline (updated version). *Mil. Med. Res.* 7(1), 41 (2020).
11. Danwang C, Endomba FT, Nkeck JR, Wouna DLA, Robert A, Noubiap JJ. A meta-analysis of potential biomarkers associated with severity of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Biomark. Res.* 8, 37 (2020).
12. Caruso FP, Scala G, Cerulo L, Ceccarelli M. A review of COVID-19 biomarkers and drug targets: resources and tools. *Brief Bioinform.* 22(2), 701–713 (2021).
13. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136(2), 215–233 (2009).
14. Trzybulska D, Vergadi E, Tsatsanis C. miRNA and other non-coding RNAs as promising diagnostic markers. *EJIFCC* 29(3), 221–226 (2018).
15. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG *et al.* miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. *Cells* 9(2), 276 (2020).
16. Cullen BR. Five questions about viruses and microRNAs. *PLoS Pathog.* 6(2), e1000787 (2010).
17. Correia CN, Nalpas NC, McLoughlin KE *et al.* Circulating microRNAs as potential biomarkers of infectious disease. *Front. Immunol.* 8, 118 (2017).
18. Guterres A, de Azeredo Lima CH, Miranda RL, Gadelha MR. What is the potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in COVID-19? *Infect. Genet. Evol.* 85, 104417 (2020).
19. Mirzaei R, Mahdavi F, Badrzadeh F *et al.* The emerging role of microRNAs in the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. *Int. Immunopharmacol.* 90, 107204 (2021).
20. Abedi F, Rezaee R, Hayes AW, Nasiripour S, Karimi G. MicroRNAs and SARS-CoV-2 life cycle, pathogenesis, and mutations: biomarkers or therapeutic agents? *Cell Cycle* 20(2), 143–153 (2021).
21. Abu-Izneid T, AlHajri N, Ibrahim AM *et al.* Micro-RNAs in the regulation of immune response against SARS CoV-2 and other viral infections. *J. Adv. Res.* 30, 133–145 (2021).
22. Tricco AC, Lillie E, Zarin W *et al.* PRISMA extension for scoping reviews (PRISMA-ScR): checklist and explanation. *Ann. Intern. Med.* 169(7), 467–473 (2018).
23. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst. Rev.* 5(1), 210 (2016).
24. Liu Z, Wang J, GeY *et al.* SARS-CoV-2 encoded microRNAs are involved in the process of virus infection and host immune response. *J. Biomed. Res.* 35(3), 216–227 (2021).
25. Wyler E, Mo’sbauer K, Franke V *et al.* Transcriptomic profiling of SARS-CoV-2 infected human cell lines identifies HSP90 as target for COVID-19 therapy. *iScience* 24(3), 102151 (2021).
26. Mishra R, Banerjea AC. SARS-CoV-2 spike targets USP33-IRF9 axis. *Front. Immunol.* 12, 656700 (2021).
27. Recchiuti A, Patruno S, Mattoscio D *et al.* Resolvin D1 and D2 reduce SARS-CoV-2-induced inflammatory responses in cystic fibrosis macrophages. *FASEB J.* 35(4), e21441 (2021).
28. Kim WR, Park EG, Kang KW, Lee SM, Kim B, Kim HS. Expression analyses of micromas in hamster lung tissues infected by SARS-CoV-2. *Mol. Cells* 43(11), 953–963 (2020).
29. Li C, Hu X, Li L, Li JH. Differential microRNA expression in the peripheral blood from human patients with COVID-19. *J. Clin. Lab. Anal.* 34(10), e23590 (2020).
30. Tang H, Gao Y, Li Z *et al.* The noncoding and coding transcriptional landscape of the peripheral immune response in patients with COVID-19. *Clin. Transl. Med.* 10(6), e200 (2020).
31. Chen YM, Zheng Y, Yu Y *et al.* Blood molecular markers associated with COVID-19 immunopathology and multi-organ damage. *EMBO J.* 39(24), e105896 (2020).
32. Zheng HY, Xu M, Yang CX *et al.* Longitudinal transcriptome analyses show robust T cell immunity during recovery from COVID-19. *Signal Transduct. Target. Ther.* 5(1), 294 (2020).
33. Sabbatinelli J, Giuliani A, Matakchione G *et al.* Decreased serum levels of the inflammaging marker miR-146a are associated with clinical non-response to tocilizumab in COVID-19 patients. *Mech. Ageing Dev.* 193, 111413 (2021).
34. Garg A, Seeliger B, Derda AA *et al.* Circulating cardiovascular microRNAs in critically ill COVID-19 patients. *Eur. J. Heart Fail.* 23(3), 468–475 (2021).
35. Yang P, Zhao Y, Li J *et al.* Downregulated miR-451a as a feature of the plasma cfRNA landscape reveals regulatory networks of IL-6/IL-6R-associated cytokine storms in COVID-19 patients. *Cell. Mol. Immunol.* 18(4), 1064–1066 (2021).

36. Bagheri-Hosseinabadi Z, Ostad Ebrahimi H, Bahrehmand F, Taghipour G, Abbasifard M. The relationship between serum levels of interleukin-2 and IL-8 with circulating microRNA-10b in patients with COVID-19. *Iran J. Immunol.* 18(1), 65–73 (2021).
37. Centa A, Fonseca AS, Ferreira SGDS *et al.* Deregulated miRNA expression is associated with endothelial dysfunction in post-mortem lung biopsies of COVID-19 patients. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 320(3), L405–L412 (2020).
38. Li S, Duan X, Li Y *et al.* Differentially expressed immune response genes in COVID-19 patients based on disease severity. *Aging* 13(7), 9265–9276 (2021).
39. Mi B, Xiong Y, Zhang C *et al.* SARS-CoV-2-induced overexpression of miR-4485 suppresses osteogenic differentiation and impairs fracture healing. *Int. J. Biol. Sci.* 17(5), 1277–1288 (2021).
40. Li CX, Chen J, Lv SK, Li JH, Li LL, Hu X. Whole-transcriptome RNA sequencing reveals significant differentially expressed mRNAs, miRNAs, and lncRNAs and related regulating biological pathways in the peripheral blood of COVID-19 patients. *Mediators Inflamm.* 2021, 6635925 (2021).
41. Donyavi T, Bokharaci-Salim F, Baghi HB *et al.* Acute and post-acute phase of COVID-19: analyzing expression patterns of miRNA-29a-3p, 146a-3p, 155-5p, and let-7b-3p in PBMC. *Int. Immunopharmacol.* 97, 107641 (2021).
42. Gonzalo-Calvo D, Benítez ID, Pinilla L *et al.* Circulating microRNA profiles predict the severity of COVID-19 in hospitalized patients. *Transl. Res.* 236, 147–159 (2021).
43. Mitchell MI, Ben-Dov IZ, Liu C *et al.* Extracellular vesicle capture by antibody of choice and enzymatic release (EV-CATCHER): a customizable purification assay designed for small-RNA biomarker identification and evaluation of circulating small-EVs. *J. Extracell. Vesicles* 10(8), e12110 (2021).
44. Coperchini F, Chiovato L, Croce L *et al.* The cytokine storm in COVID-19: an overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 53, 25–32 (2020).
45. Tay MZ, Poh CM, Re'nia L *et al.* The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 363–374 (2020).
46. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A *et al.* Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat. Med.* 27, 601–615 (2021).
47. Hartmann D, Fiedler J, Sonnenschein K *et al.* MicroRNA-based therapy of GATA2-deficient vascular disease. *Circulation* 134, 973–1990 (2016).



Differentially expressed plasmatic microRNAs in Brazilian patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19): preliminary results

Aline de Souza Nicoletti¹ · Marília Berlofa Visacri¹ · Carla Regina da Silva Correa da Ronda² · Pedro Eduardo do Nascimento Silva Vasconcelos¹ · Julia Coelho França Quintanilha³ · Rafael Nogueira de Souza¹ · Deise de Souza Ventura⁴ · Adriana Eguti⁴ · Lilian Ferreira de Souza Silva⁴ · Mauricio Wesley Perroud Junior^{1,4} · Rodrigo Ramos Catharino^{2,5} · Leonardo Oliveira Reis⁶ · Luiz Augusto dos Santos⁷ · Nelson Durán⁸ · Wagner José Fávaro⁸ · Marcelo Lancellotti² · José Luiz da Costa² · Patricia Moriel² · Eder de Carvalho Pincinato¹

Received: 22 November 2021 / Accepted: 3 March 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

Abstract

Background Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is caused by a novel coronavirus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). It is known that host microRNAs (miRNAs) can be modulated to favor viral infection or to protect the host. Herein, we report preliminary results of a study aiming at identifying differentially expressed plasmatic miRNAs in Brazilian patients with COVID-19.

Methods and results miRNAs were extracted from the plasma of eight patients with COVID-19 (four patients with mild COVID-19 and four patients with severe/critical COVID-19) and four healthy controls. Patients and controls were matched for sex and age. miRNA expression levels were detected using high-throughput sequencing. Differential miRNA expression and enrichment analyses were further evaluated. A total of 18 miRNAs were differentially expressed between patients with COVID-19 and controls. miR-4433b-5p, miR-6780b-3p, miR-6883-3p, miR-320b, miR-7111-3p, miR-4755-3p, miR-320c, and miR-6511a-3p were the most important miRNAs significantly involved in the PI3K/AKT, Wnt/ β -catenin, and STAT3 signaling pathways. Moreover, 42 miRNAs were differentially expressed between severe/critical and mild patients with COVID-19. miR-451a, miR-101-3p, miR-185-5p, miR-30d-5p, miR-25-3p, miR-342-3p, miR-30e-5p, miR-150-5p, miR-15b-5p, and miR-29c-3p were the most important miRNAs significantly involved in the Wnt/ β -catenin, NF- κ B, and STAT3 signaling pathways.

Conclusions If validated by quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in a larger number of participants, the miRNAs identified in this study might be used as possible biomarkers for the diagnosis and severity of COVID-19.

Keywords COVID-19 · SARS-CoV-2 · Biomarkers · Epigenomics · microRNAs

Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), whose initial outbreak occurred in Wuhan, China.

Unfortunately, this virus has spread rapidly worldwide, culminating in the pandemic situation we have been experiencing since mid-March 2020 [1]. SARS-CoV-2 is an RNA virus, which belongs to the genus *Betacoronavirus*, and is transmitted by inhalation of droplets containing the virus or by hand contact on surfaces containing the virus and subsequent contamination through the hands, eyes, mouth, and nose. Symptoms include fever and dry cough in most patients, which may be accompanied by breathing difficulties, loss of taste, nausea, and diarrhea [2]. Severe cases of COVID-19 can progress to severe acute respiratory syndrome (SARS) and to a cytokine storm, in which

Aline de Souza Nicoletti and Marília Berlofa Visacri have contributed equally to this study.

✉ Patricia Moriel
patricia.moriel@fcb.unicamp.br

Extended author information available on the last page of the article

the virus induces an intense inflammatory cascade [3]. Currently, there is no specific treatment for the management of COVID-19 [4]. Although some vaccines have been approved for emergency use by the Food and Drug Administration (FDA), such as the Comirnaty and Pfizer-BioNTech, Moderna, and Janssen (Johnson & Johnson) COVID-19 vaccines [5], and vaccine campaigns are ongoing, the emergence of new variants is a remaining concern [6].

Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) performed to detect viral RNA on nasopharyngeal or oropharyngeal swabs is the gold standard for the diagnosis of SARS-CoV-2. Although it is a specific and sensitive quantitative assay, there are some limitations, such as being relatively invasive and associated with an increased risk of cross-infection [7, 8]. Other methods, such as virus antigen or serological antibody testing, may also be used to diagnose COVID-19. While rapid antigen tests detect SARS-CoV-2 in samples from the respiratory tract, rapid serological tests detect antibodies (IgM and/or IgG) produced over days to weeks after infection by the virus. Both tests are easy to handle and require minimal personnel training. Rapid antibody tests, while less specific, can be useful for reducing exposure to risk factors during repeated sampling and are more cost effective compared to RT-PCR tests [7, 9]. Computed tomography of the chest consists of a complementary examination for the diagnosis of COVID-19, which allows the monitoring of disease evolution [7, 10]. In addition, the neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) has been suggested as a prognostic marker for screening patients with COVID-19, with a higher NLR being associated with a poor prognosis [11]. Moreover, the detection of microRNAs (miRNAs) in human samples may be an alternative to identify effective biomarkers for the diagnosis and severity of COVID-19.

miRNAs are defined as small, single-stranded, non-coding RNA molecules of 21–23 nucleotides in length that bind to the target transcript in the 3' untranslated region (UTR), inhibiting protein translation and destabilizing their target messenger RNAs (mRNAs). miRNAs can regulate almost a third of the human genome and are widely involved in multiple pathways, such as cell proliferation, cell death, stress resistance, and fat metabolism. In addition, evidence suggests that a gain or loss of function of one or more miRNAs is associated with the diagnosis, progression, and prognosis of several cancers and infectious diseases [12, 13]. Therefore, dysregulated miRNAs, in addition to serving as biomarkers of disease, may be potential therapeutic targets providing a better understanding of the signaling pathways involved and the disease pathogenesis.

In a systematic review focused on the description of miRNAs associated with SARS-CoV-2 infection in human cells, only 2 out of the 29 studies included in the review reported the analysis of miRNA expression in patients with COVID-19 compared to non-COVID-19 samples [14]. Most

of the studies included in this review reported miRNA data based on genome sequencing of SARS-CoV-2 isolates and computational approaches [14]. In addition, our research group conducted a scoping review on miRNAs differentially expressed in SARS-CoV-2 infected animals and patients with COVID-19, excluding studies based only on in silico prediction analysis [15]. Twenty studies were included, and 15 of which were conducted in patients. We have verified that miR-21-5p, miR-146a-5p, miR-126-3p, miR-144, and miR-155 may serve as important biomarkers of COVID-19 [15]. However, few studies have included participants from North and South America [15], where COVID-19 cases are rising again. Thus, the present article reports preliminary results (high-throughput sequencing analysis) of a study aiming at identifying differentially expressed plasmatic miRNAs in Brazilian patients with COVID-19 as possible biomarkers for disease diagnosis and severity.

Patients & methods

Study approval

The study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Medical Sciences of the University of Campinas (UNICAMP) (numbers 36041420.0.000.5404 and 31049320.7.1001.5404). All participants or their guardians signed a consent form authorizing the use of their samples and data.

Participants and eligibility criteria

From May to September 2020, 12 participants were included in this study: four patients with severe/critical COVID-19 had been admitted to the *Hospital Estadual Sumaré Dr. Leandro Francheschini* (HES) in Sumaré city (SP, Brazil), affiliated with UNICAMP; four patients with mild COVID-19 had been admitted to the Hospital Municipal de Paulínia, in Paulínia city (SP, Brazil), and four healthy volunteers (controls).

The eligibility criteria were age ≥ 18 years and admission to HES or Hospital Municipal de Paulínia with a positive result in SARS-CoV-2 nasopharyngeal swab RT-PCR for patients with COVID-19, and age ≥ 18 years and negative result in SARS-CoV-2 nasopharyngeal swab RT-PCR for controls. Patients were excluded if their plasma samples were not sufficient to perform the experiments.

It is important to note that the control participants were not experiencing flu-like symptoms associated with COVID-19, had no contact with people infected with the SARS-CoV-2, were not front-line health professionals, and were followed up for 15 days after the collection of biological

samples to ensure that they would not show COVID-19 related symptoms.

Demographic and clinical data

Data regarding the characteristics of patients with COVID-19 were obtained from medical records, including information concerning gender, age, race, and comorbidities. Additionally, they were classified by COVID-19 severity based on Falavigna et al.[16]: *mild*, presence of any signs and symptoms of COVID-19, but without dyspnea or abnormal chest imaging; *moderate*, evidence of disease in the lower respiratory tract and $\text{SpO}_2 > 93\%$ on room air; *severe*, presence of one of the following factors: respiratory rate > 30 bpm, $\text{SpO}_2 \leq 93\%$ on room air, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 300$ mm Hg, pulmonary infiltrate $> 50\%$; and *critical*, respiratory failure, septic shock, and/or multiple organ dysfunction. Patients with severe/critical COVID-19 were also characterized by the length of hospital stay, drugs used for COVID-19 during hospitalization, the time they remained mechanically ventilated, prone position, and death. Data regarding control characteristics were obtained from interviews with volunteers, including information concerning age, gender, race, and comorbidities. Patients with severe/critical COVID-19, patients with mild COVID-19, and controls were matched for gender and age.

Sample collection and miRNA extraction

Venous whole blood samples were collected in EDTA-containing tubes from all participants (patients and controls). All patient samples were collected within ten days of the onset of the COVID-19 symptoms. Plasma samples were separated from whole blood by centrifugation at 2500 rpm, 4 °C for 10 min, and stored in freezer at -80 °C until the experiments were carried out.

miRNA extraction was performed with 200 μL of each plasma sample using the miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Cat No. 217184), following the manufacturer's instructions. At the end of the experiment, the samples were stored in a freezer at -80 °C until further use.

Library construction and sequencing

Library construction was performed with 5 μL of each miRNA sample using the QIAseq® miRNA Library Kit (Qiagen, Cat No. 331502), following the manufacturer's instructions. For quality control of the samples, 1 μL and 2 μL of each miRNA sequencing library was analyzed using an Agilent Bioanalyzer and a Qubit fluorometer, respectively, according to the manufacturer's instructions. A quality check of the raw data is provided in Supplementary Table 1.

The samples were sent to the Life Sciences Core Facility (LaCTAD) from UNICAMP for sequencing. The library preparations were sequenced on an Illumina HiSeq 2500 platform, and 75 bp single-end reads were generated.

Bioinformatics analysis

Primary and secondary analyses were conducted in *GeneGlobe*. The primary analysis is based on counting the unique molecular identifiers (UMIs) and mapping the miRNA sequences, while the secondary analysis, using the UMI counts for each miRNA, performs the differential expression analysis. *MiRWalk* software was used to predict the miRNA target genes. *MiRWalk* provides predicted targets according to 12 different databases, including *TargetScan* [17]. A matrix was constructed to identify the interaction between miRNAs and their predicted target genes, which were sorted according to the potential target genes of different miRNAs. For diagnostic analysis, genes related to five or more miRNAs were selected for enrichment analysis, using the Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, Qiagen) software to identify the main canonical signaling pathways involving differentially expressed miRNAs. For severity analysis, only target genes predicted by *TargetScan* and at least five different databases were selected for the following analyses. The genes targeted by at least two different miRNAs were selected for unsupervised enrichment analysis using the IPA software.

Statistical analysis

For the secondary analyses, the results were normalized using the DESeq2 method and the p values listed were returned by the Bioconductor software packages, such that p values less than 0.05, were considered significant. The results were expressed as fold-change (FC) and fold-regulation (FR). FC is the normalized miRNA expression in each test sample divided by the normalized miRNA expression in the control sample. FR represents the FC results in a biologically meaningful way. FC values greater than one indicate upregulation, and FR is equal to FC. FC values less than one indicate downregulation, and FR is the negative inverse of the FC. $\text{FR} \geq 1.6$, or $\text{FR} \leq -1.6$, were used as criteria to select differentially expressed miRNAs for the diagnosis of COVID-19. $\text{FR} \geq 2.0$, or $\text{FR} \leq -2.0$, were used as criteria to select miRNAs differentially expressed for COVID-19 severity.

For enrichment analysis (the most important canonical signaling pathways) of the predicted target genes, p values were calculated by Fisher's exact test, and p values less than 0.05 were considered significant.

The Student's *t* test (Microsoft Excel) was used to compare the mean age of the groups and a *p* value less than 0.05 was considered the cut-off for statistical significance.

Results

Characteristics of participants

Twelve participants were included in this study: patients with mild COVID-19 (mild, *n* = 4; moderate, *n* = 0; total, *n* = 4; sex: 2 male/2 female; mean age \pm standard deviation [SD] 61.8 \pm 11.7 years), patients with severe/critical COVID-19 [severe, *n* = 2; critical, *n* = 2; total, *n* = 4; sex: 2 male/2 female (severe: 1 male/1 female; critical: 1 male/1 female); mean age \pm SD: 64.0 \pm 8.6 years], and controls (*n* = 4; sex: 2 male/2 female; mean age \pm SD: 62.8 \pm 14.9 years). Sex and age were similar among the three groups (age comparison: controls vs. patients with COVID-19, *p*-value = 0.99; controls vs. mild COVID-19, *p*-value = 0.92; controls vs. severe/critical COVID-19, *p* value = 0.87; severe/critical vs. mild COVID-19, *p* value = 0.77). Table 1 shows the detailed characteristics of the participants.

Regarding patients with severe/critical COVID-19, the average length of stay was 36 \pm 27 days; all patients received amoxicillin + clavulanate (1 g IV t.i.d.) and azithromycin (500 mg PO q.d.), two patients also received oseltamivir (75 mg PO b.i.d.) as antimicrobial treatment, two patients used dexamethasone (6 mg q.d.) to treat inflammation, and all patients were treated with anticoagulants (enoxaparin 40–60 mg/d SC or heparin 10,000–15,000 UI/d SC); they remained mechanically ventilated for 515 \pm 346 h; two were pronated; and two patients died.

miRNAs as possible biomarkers of diagnosis for COVID-19

Differential miRNA expression profiling

A total of 18 miRNAs were differentially expressed between patients with COVID-19 and the controls, of which 13 were significantly upregulated and five were significantly downregulated (Fig. 1 and Table 2). The expression of miR-6780b-3p, miR-6883-3p, miR-4769-5p, miR-6873-3p, miR-320b, miR-7111-3p, miR-4755-3p, miR-320c, miR-6511a-3p, miR-320d, miR-5187-3p,

Table 1 Characteristics of patients with COVID-19 and controls (healthy volunteers)

ID	Gender	Age (y)	Race	Comorbidities
<i>Mild COVID-19</i>				
M1	Female	47	NA	Systemic arterial hypertension Diabetes
M2	Male	58	NA	None
M3	Female	69	NA	None
M4	Male	73	NA	Systemic arterial hypertension
<i>Severe/critical COVID-19</i>				
SC1	Female	55	Caucasian	Systemic arterial hypertension Diabetes Congestive heart failure Chronic kidney disease
SC2	Male	59	Non-caucasian	None
SC3	Female	68	Caucasian	Systemic arterial hypertension Diabetes Hypothyroidism Obesity
SC4	Male	74	Non-caucasian	Systemic arterial hypertension Diabetes Chronic kidney disease
<i>Controls</i>				
HV1	Female	45	Caucasian	None
HV2	Male	56	Caucasian	None
HV3	Female	73	Caucasian	Arrhythmia
HV4	Male	77	Caucasian	Previous myocardial infarction and stroke

COVID-19 coronavirus disease 2019, ID identification, SC patient with severe/critical COVID-19, M patients with mild COVID-19, HV healthy volunteers, NA information not available, y years

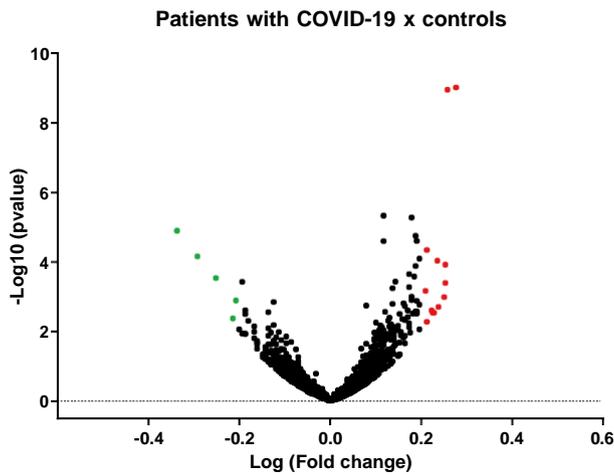


Fig. 1 Differential miRNA expression between patients with COVID-19 and controls (healthy volunteers). The abscissa presents the logarithmic value, logFC, of multiple differences in miRNA expression between the two groups and the ordinate represents the negative pair value of the p -value of the change in miRNA expression. Each point in the figure represents a miRNA. miRNAs with significant differences are represented by green (downregulated) and red (upregulated) dots. miRNAs without significant differences are represented by black dots

Table 2 Differentially expressed miRNAs between patients with COVID-19 and controls (healthy volunteers) ($FR \geq 1.6$ or $FR \leq -1.6$)

miRNA	FR	FC	p value
<i>Upregulated</i>			
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
<i>Downregulated</i>			
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

FC fold change, FR fold regulation

miR-4508, and miR-4659a-5p was at least 1.6-fold higher in patients with COVID-19 than in controls. In addition, the expression of miR-4433b-5p, miR-16-2-3p, miR-126-3p, miR-150-5p, and miR-224-5p was reduced by more than 1.6-fold in patients with COVID-19 compared with that in controls (Table 2).

Additional analysis of only patients with mild COVID-19 compared to controls and only patients with severe/critical COVID-19 compared to controls were performed (Supplementary Table 2 and Supplementary Figs. 1 and 2). Only eight miRNAs were differentially expressed in the three analyses (Table 2 and Supplementary Table 2): miR-4433b-5p (downregulated), miR-6780b-3p, miR-6883-3p, miR-320b, miR-7111-3p, miR-4755-3p, miR-320c, and miR-6511a-3p (upregulated). Figure 2 shows a comparison of the expression levels of these miRNAs between the groups.

Enrichment analysis

After the identification of the eight miRNAs cited above as possible diagnostic biomarkers, enrichment analysis was performed, and the top 50 canonical signaling pathways are shown in Fig. 3. Of the 50 most enriched signaling pathways, three appear to have an important role in modulating viral infections by miRNAs: Wnt/ β -catenin signaling, phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling, and the STAT3 pathway. A total of 242 genes were related to these pathways, and 64 of them were common to at least two of the above-mentioned pathways (data not shown). The matrix constructed for the analysis of miRNA-gene interactions indicated that miR-320b and miR-320c interacted the most with the 242 selected genes, and their interactions are described in more databases.

miRNAs as possible biomarkers of severity of COVID-19

Differential miRNA expression profiling

A total of 42 miRNAs were differentially expressed between severe/critical patients with COVID-19 and mild patients with COVID-19, all at least twofold lower in patients with severe/critical COVID-19 than in patients with mild COVID-19 (Fig. 4 and Table 3). miR-451a, miR-101-3p, miR-185-5p, miR-30d-5p, miR-25-3p, miR-342-3p, miR-30e-5p, miR-150-5p, miR-15b-5p, and miR-29c-3p were the 10 most downregulated miRNAs (Table 3).

As cited above, an analysis of patients with severe/critical COVID-19 compared to controls was also performed (Supplementary Table 2 and Supplementary Figs. 1 and 2).

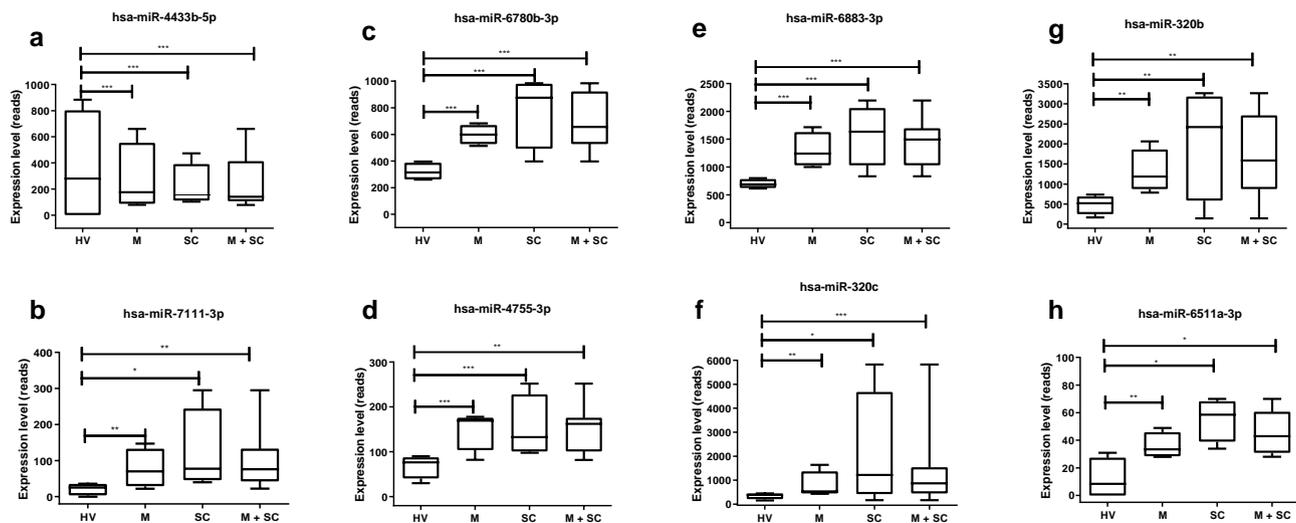


Fig. 2 Expression of miRNAs in each sample. The abscissa presents the status of each participant: healthy volunteer (HV) (n = 4), patient with mild COVID-19 (M) (n = 4), patient with severe/critical COVID-19 (SC) (n = 4) and M + SC (n = 8). The letters **b** to **h** represent miRNAs consistently upregulated. The letter **a** represents the

only miRNA consistently downregulated. Boxplot features: minimum whisker, the smallest value within; minimum box, 25th percentile; center, median; maximum box, 75th percentile; maximum whisker, the largest value within. *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$

Enrichment analysis

After the identification of 10 miRNAs cited as possible biomarkers of severity of COVID-19, enrichment analysis was performed, and the most important canonical signaling pathways are shown in Fig. 5. Three pathways, Wnt/ β -catenin, NF- κ B, and STAT3 signaling, play an important role in viral infection and inflammatory response. A total of 159 genes were related to these pathways, and 34 of them were common to at least two of the above-mentioned pathways (data not shown). From the analysis of miRNA-gene interactions, miR-185-5p and miR-15b-5p are the ones that most interact with the 159 selected genes, and their interactions are described in more databases.

Discussion

miRNAs that enable the identification of SARS-CoV-2 infection may directly target the viral genome and proteins associated with the entry of the virus into the cell (e.g., ACE2, ADAM17, TMPRSS2), as well as regulate the immune system [18]. Based on this, a study suggested some miRNAs that could be important for COVID-19 diagnosis, such as miR-15b-5p, miR-195-5p, miR-221-3p, and miR-140-3p [18]. In our study, we identified eight important miRNAs as possible diagnostic biomarkers (miR-4433b-5p, miR-6780b-3p, miR-6883-3p, miR-320b, miR-7111-3p, miR-4755-3p, miR-320c, and miR-6511a-3p) that were not

described in previously published articles on SARS-CoV-2 infected cells and animals, and patients with COVID-19 [15]. However, in a recent study, the most downregulated miRNA in our study, miR-4433b-5p, was differentially expressed between moderate and severe COVID-19 cases, suggesting that this miRNA might be a candidate for stratifying patients based on severity [19]. In our study, miR-4433b-5p was downregulated in both mild and severe/critical cases compared to controls; however, miR-4433b-5p was not differentially expressed between severe/critical cases and mild cases. In another recently published study, the miR-320 family, including miR-320b, was strongly downregulated in patients with COVID-19 induced severe respiratory failure compared to patients with COVID-19 induced moderate respiratory failure [20]. In our study, miR-320b was upregulated in both mild and severe/critical cases compared to controls; however, miR-320b was not differentially expressed between severe/critical cases and mild cases.

In addition, the expression of miR-16-2-3p was downregulated in patients with COVID-19 compared to controls, contrary to the studies by Li et al. in which the expression was upregulated [21, 22]. Moreover, miR-16-2-3p was found to be positively regulated in cells infected with SARS-CoV-2 compared to samples of normal human lung tissue [23]. High levels of this miRNA may play a role in mediating SARS-COV-2 infection [14]. However, the differential expression of miR-16-2-3p in patients with COVID-19 does not appear to be specific, since it was found in the comparison between patients with recent or

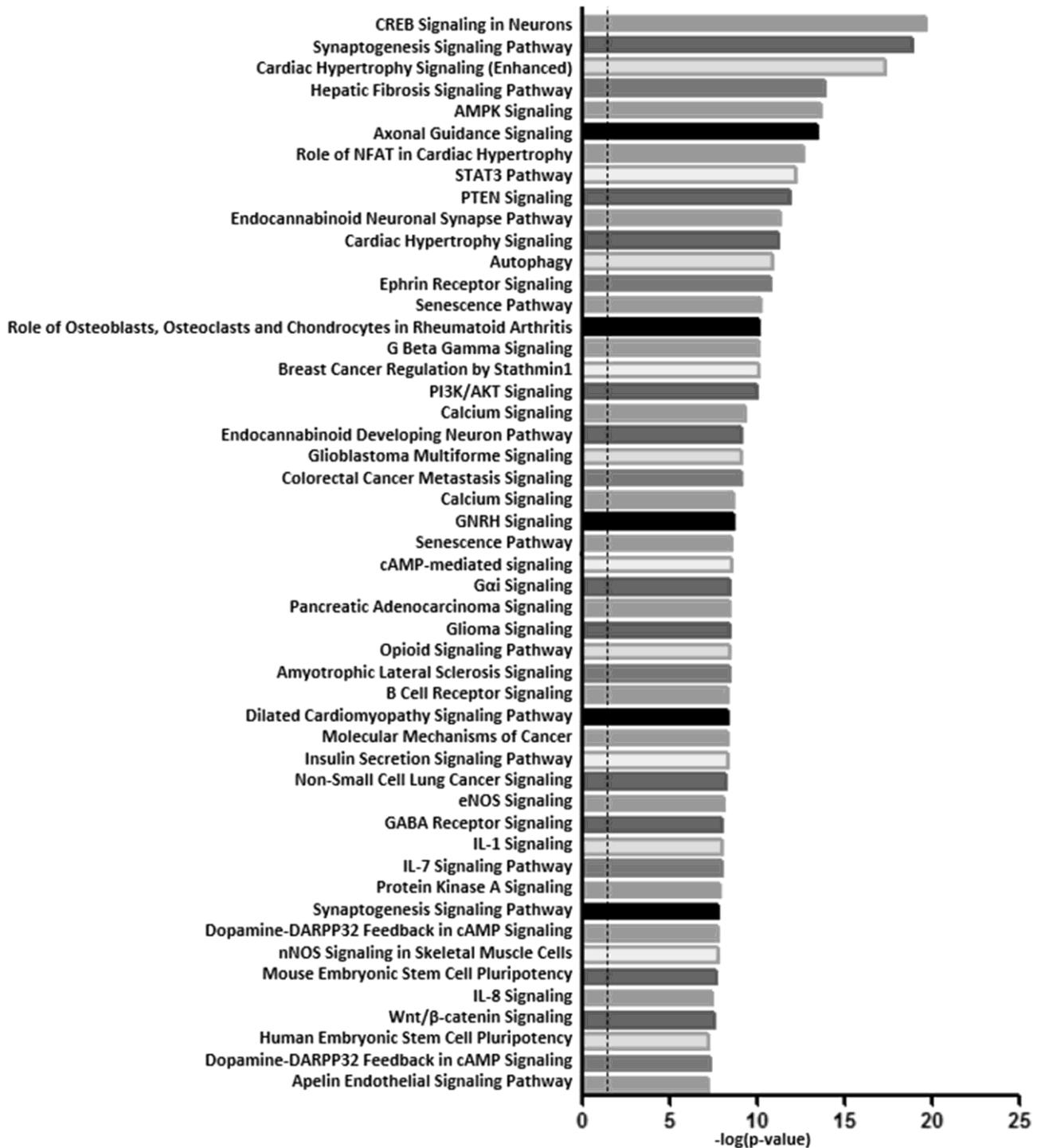


Fig. 3 Enrichment analysis of the predicted target genes (top 50 canonical signaling pathways). Enrichment analysis performed by Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, Qiagen bioinformatics). The dashed line represents $-\log(p\text{ value})=1.3$ or $p\text{ value}=0.05$ (Fisher's exact test)

complicated type 2 diabetes [24]. In addition, miR-16-2-3p expression was found to be upregulated in the plasma of patients with non-syndromic cleft lip [25] and downregulated in resistant glucocorticoid patients with ulcerative colitis [26].

We also found that miR-126-3p was differentially expressed and downregulated in patients with COVID-19 compared with that in controls, corroborating the findings of Sabbatinelli et al. [27] and Garg et al. [28]; however, these studies compared only patients with severe COVID-19 with

Patients with severe/critical COVID-19 x patients with mild COVID-19

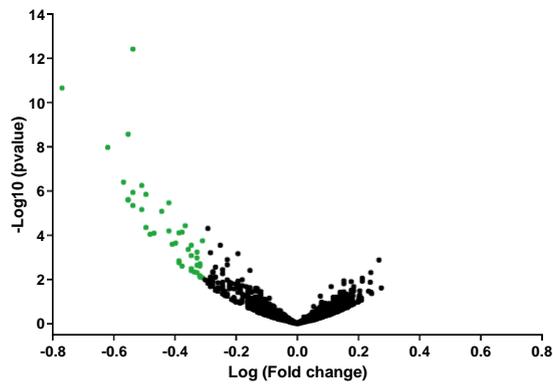


Fig. 4 Differential miRNA expression between patients with severe/critical and those with mild COVID-19. The abscissa presents the logarithmic value, logFC, of the multiple differences in miRNA expression between the two groups, and the ordinate presents the negative pair value of the p value of the change in miRNA expression. Each point in the figure represents a miRNA. Downregulated miRNAs with significant differences are represented by green dots. miRNAs without significant differences are represented by black dots. No miRNA is upregulated

healthy volunteers. Although we found miR-126-3p as a possible diagnostic biomarker in our study, miR-126-3p downregulation was associated with inflammation by regulating the NF- κ B inhibitor I κ -B α . Interestingly, miR-126-3p has also been associated with endothelial dysfunction, which can partially explain the vascular damage observed in the lungs of patients with COVID-19, associated with the presence of intracellular viruses and perivascular T-cell infiltrates [29], contributing to disease severity. Moreover, Mitchell et al. found miR-126-3p downregulated in severely ill COVID-19 hospitalized patients on mechanical ventilators when compared to mildly ill COVID-19 hospitalized patients [30].

In the comparison between patients with mild COVID-19 and controls, we found that miR-99a-5p and miR-378a-3p were upregulated (Supplementary Table 2). In a study by Tang et al. miR-99a-5p was found to be downregulated in severe cases compared to healthy volunteers and in severe cases compared to moderate cases and was associated with the expression of the proinflammatory genes *IGF1R* and *MTMR3*, which induce weaker antiviral immunity [31]. In addition, the increase in miR-378a-3p expression attenuated hypoxia-induced lesions in cardiomyocytes by suppressing the NEAT1 lncRNA [32], although in a study by Chen et al. elevated levels of miR-378a-3p were associated with a poor prognosis for COVID-19 [33].

In our study, from the eight most important miRNAs for the diagnosis of COVID-19, a total of 242 target genes were found to be possibly related to the Wnt/ β -catenin signaling, PI3K/AKT signaling, and STAT3 pathways, which according to Barbu et al. are well known to be involved in viral

Table 3 Differentially expressed miRNAs between patients with severe/critical COVID-19 and in those with mild COVID-19 ($FR \geq 2.0$ or $FR \leq -2.0$)

miRNA	FR	FC	p value
<i>Upregulated</i>			
None			
<i>Downregulated</i>			
miR-451a	-5.79	0.17	<0.001
miR-101-3p	-4.15	0.24	<0.001
miR-185-5p	-3.74	0.27	<0.001
miR-30d-5p	-3.58	0.28	<0.001
miR-25-3p	-3.56	0.28	<0.001
miR-342-3p	-3.55	0.28	<0.001
miR-30e-5p	-3.49	0.29	<0.001
miR-150-5p	-3.47	0.29	<0.001
miR-15b-5p	-3.4	0.29	<0.001
miR-29c-3p	-3.26	0.31	<0.001
miR-10b-5p	-3.18	0.31	<0.001
miR-16-2-3p	-3.17	0.32	<0.001
miR-186-5p	-3.11	0.32	<0.001
miR-16-5p	-3.05	0.33	<0.001
miR-425-5p	-2.97	0.34	<0.001
miR-187-3p	-2.76	0.36	<0.001
miR-125a-5p	-2.66	0.38	<0.001
miR-106b-3p	-2.62	0.38	<0.001
miR-22-3p	-2.55	0.39	<0.001
miR-144-5p	-2.48	0.4	<0.001
miR-151a-3p	-2.44	0.41	0.001
miR-30a-5p	-2.43	0.41	<0.001
miR-92a-3p	-2.43	0.41	0.002
miR-15a-5p	-2.38	0.42	<0.001
miR-195-5p	-2.36	0.42	0.002
miR-4508	-2.35	0.43	<0.001
miR-194-5p	-2.26	0.44	<0.001
miR-140-3p	-2.25	0.45	0.003
miR-142-5p	-2.24	0.45	0.004
miR-99a-5p	-2.24	0.45	<0.001
miR-363-3p	-2.23	0.45	<0.001
let-7g-5p	-2.18	0.46	0.005
miR-20a-5p	-2.14	0.47	0.002
miR-144-3p	-2.13	0.47	<0.001
miR-10a-5p	-2.12	0.47	0.001
miR-378a-3p	-2.12	0.47	0.005
let-7f-5p	-2.1	0.48	0.008
miR-660-5p	-2.08	0.48	0.007
miR-3135b	-2.07	0.48	0.002
miR-96-5p	-2.07	0.48	0.002
miR-125b-5p	-2.05	0.49	<0.001
let-7i-5p	-2.04	0.49	0.008

FC fold change, FR fold regulation

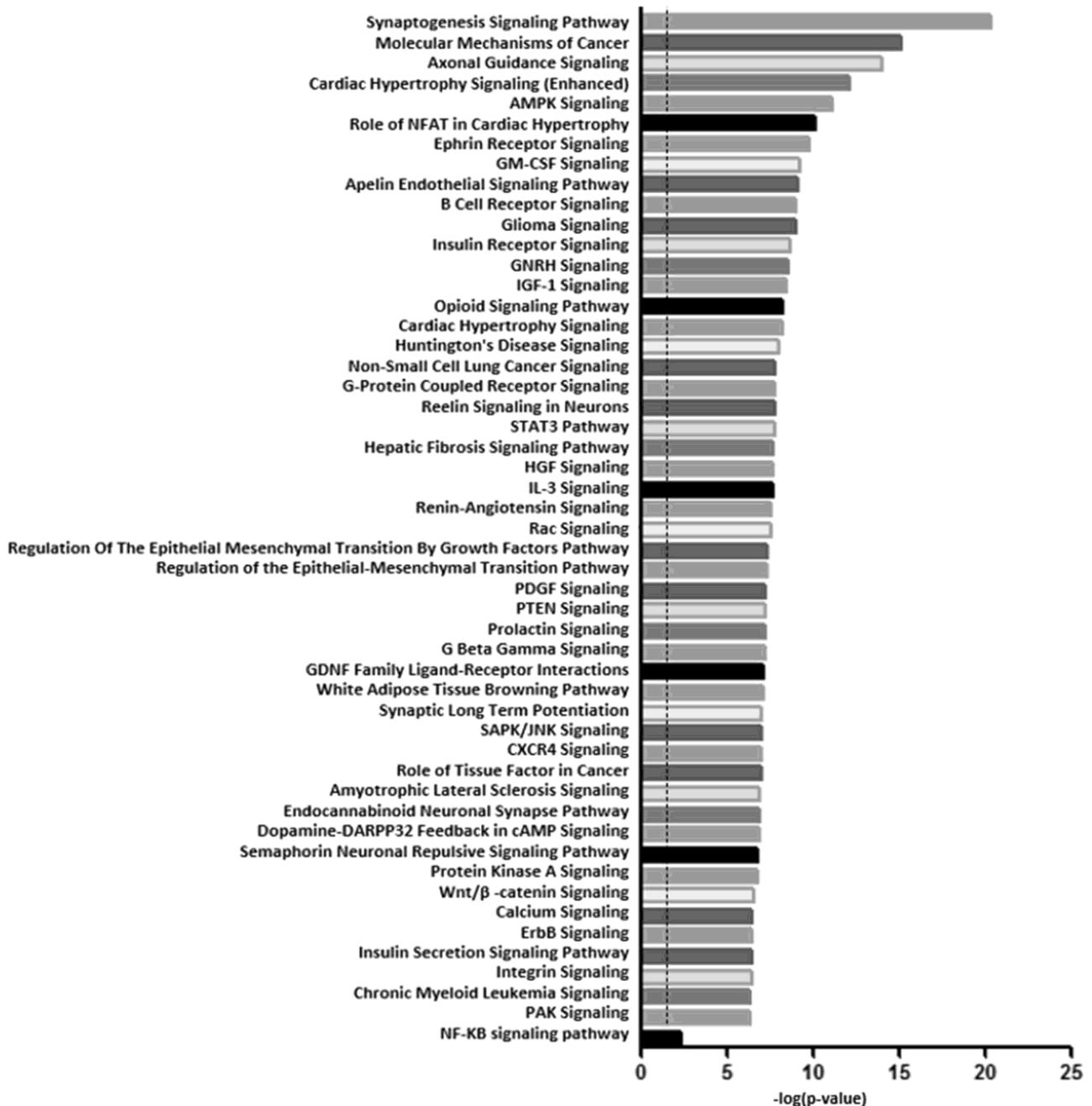


Fig. 5 Enrichment analysis of the predicted target genes (most important canonical signaling pathways). Enrichment analysis performed by Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, Qiagen bioinformatics). The dashed line represents $-\log(p\text{ value})=1.3$ or $p\text{ value}=0.05$ (Fisher's exact test)

infection. Wnt represents a group of highly preserved pathways in vertebrates through which extracellular signals are transported into the cell. In addition, there appears to be a relationship between the Wnt pathway and innate immune response in the host. However, there are theories that type I interferon (IFN) signaling can be increased while inhibiting the Wnt pathway [34]. STAT3 is a member of the STAT protein family that controls the expression of genes regulating

different biological processes, such as immune responses, inflammation, and apoptosis. STAT3 protein is present in the cytoplasm in an inactive form and is activated by numerous types of cytokines, especially interleukin-6 (IL-6), which is a predictive marker of severity in COVID-19. Furthermore, STAT3 may have multiple roles during SARS-CoV-2 infection, including induction of pro-inflammatory responses, promotion of a cytokine storm, impairment of

antiviral immune responses, alteration of virus replication, and exacerbation of lymphopenia [35]. Finally, with regard to the PI3K/AKT signaling pathway, it has an important role in viral replication, and its activation has been reported in many viruses, such as hepatitis B and C and human immunodeficiency. In addition, Shwetha et al. demonstrated that the upregulation of miR-320c during hepatitis C virus infection targets PI3K/AKT signaling, which increases cell survival and corroborates the results found in our study [34, 36]. Therefore, these signaling pathways may be dysregulated in patients with COVID-19, thus contributing to its pathogenesis.

miRNAs as biomarkers of COVID-19 severity may be associated with the host immune response and inflammation and may serve as therapeutic targets [31]. Our study showed that miR-451a, miR-101-3p, miR-185-5p, miR-30d-5p, miR-25-3p, miR-342-3p, miR-30e-5p, miR-150-5p, miR-15b-5p, and miR-29c-3p were the ten most important downregulated miRNAs as possible biomarkers of disease severity. Among these miRNAs, miR-451a and miR-150-5p were found to be downregulated in plasma of patients with COVID-19 admitted in intensive care unit compared to those admitted to the ward in the study by Gonzalo-Calvo et al. and receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed that miR-451a was able to discriminate the COVID-19 severity with high accuracy [37]. Moreover, miR-15b-5p was found to be differentially expressed in two previous studies [18, 31]. According to Kim et al. miR-15b-5p directly binds to the viral genome, and in their study, it was also found to be downregulated during SARS-CoV-2 infection, which may allow the virus to escape the host immune defense by inhibiting apoptosis and promoting the proliferation of infected cells [18]. However, according to Tang et al. its upregulation can accelerate viral replication, mediate virus-induced changes in the cell transcriptome, and intensify the severity of COVID-19 [31]. miR-15b-5p was also predicted by three independent studies included in the systematic review published by Marchi et al. indicating that this miRNA can act by regulating host and SARS-CoV-2 genes [14].

The type I IFN signaling pathway is involved in viral infections [34]. Recent studies have shown that IFN is crucial for the severity of COVID-19, and its deficiency can lead to severe disease [38, 39]. However, the type I IFN pathway appears not to be significantly enriched in the ten downregulated miRNAs in severe/critical COVID-19 patients. On the other hand, our study showed that these downregulated miRNAs appear to be involved in the Wnt/ β -catenin signaling pathway, an immune regulation pathway that may be hyperactivated. Once type I IFN signaling can be increased while inhibiting the Wnt pathway [34], it is possible that the hyperactivated Wnt signaling pathway is related to decreased type I IFN signaling pathway. Moreover, NF- κ B and STAT3 signaling pathways appear to be significantly enriched, and

they are also known to be involved in viral infection [34]. It is known that the severity of COVID-19 is dependent on a cytokine storm, most likely induced by the IL-6 amplifier, which is a hyperactivation machinery that regulates the NF- κ B pathway and is stimulated by the simultaneous activation of STAT3 and NF- κ B signaling in non-immune cells, including alveolar epithelial cells and endothelial cells [40]. Therefore, the hyperactivation of these two signaling pathways plays a key role in the inflammation of non-immune cells and may cause fatal symptoms such as acute respiratory distress syndrome (ARDS), severe pneumonia, multiorgan failure, and coagulation [40]. The signaling pathways found may be possible therapeutic targets for the treatment of patients with severe or critical COVID-19.

Additional downregulated miRNAs identified in this study have been related to the disease severity, including miR-195-5p, miR-140-5p, miR-144-3p, miR-125a-5p, miR-30a-5p, let-7f-5p, let-7 g-5p, and let-7i-5p (Table 3; severe/critical compared to mild COVID-19), and miR-195-5p, miR-144-3p, miR-125a-5p, miR-30a-5p, miR-21-5p, let-7a-5p, let-7d-5p, and let-7f-5p (Supplementary Table 2; severe/critical COVID-19 compared to control). According to Kim et al. miR-195-5p directly binds to the viral genome, but unlike our results, this miRNA was upregulated in SARS-CoV-2 infection and appears to be related to the promotion of apoptosis by inducing cell cycle arrest and the prevention of excessive proliferation of infected cells [18]. Moreover, miR-140-3p and miR-144-3p were found to be downregulated in the studies by Kim et al. and Li et al. respectively, as well as in our work [18, 21, 22]; however, Li et al. [21, 22] studied miRNAs as diagnostic biomarkers (patients with mild or moderate COVID-19 compared to healthy volunteers). It is known that miR-140-3p targets TMPRSS2, and its downregulation can contribute to viral infection by inhibiting apoptosis and promoting cell proliferation [18]. The pathophysiological implication of miR-144-3p dysregulation has not been reported by Li et al. [21, 22]. In contrast, Guo et al. showed that this miRNA is upregulated in the lung tissues of mice infected with the H7N9/AH1-PB2-627E/701 N strain of the influenza virus [41]. Furthermore, downregulation of miR-125a-5p and miR-30 may favor entry of the virus into the cell. miR-125a-5p was predicted to directly target ACE2 mRNA or associated ACE2 pathways, while miR-30a was found to be negatively correlated with the TMPRSS2 protein [14]. According to Tang et al. and corroborating our results and those of Sabatinelli et al. the downregulation of miR-21-5p is associated with inflammation [27, 31], while its upregulation appears to be associated with cardiac fibrosis [28]. Finally, the altered expression of members of the let-7 family found in our work supports the findings of Chen et al. and Zheng et al. revealing the importance of this family in the activation of T cells and during the inflammatory response

[33, 42]. Indeed, let-7 miRNAs play a key role in the activation of the immune system and the inflammatory response by targeting the *IL-6* gene and reducing its expression [43, 44].

This study has some limitations: (a) the blood samples were collected at different times after the onset of COVID-19 symptoms, i.e., different periods of infection between patients; (b) we did not include non-COVID-19 patients with respiratory viral infection as positive controls (e.g., patients infected with influenza virus) to validate the specificity of these miRNAs as biomarkers of COVID-19; (c) we also did not include asymptomatic SARS-CoV-2 infected patients, and thus, it is not known if the differential expression of these miRNAs would be useful for diagnosing these patients; (d) we do not know which strains of SARS-CoV-2 infected the patients studied; (e) although we matched age and gender between healthy volunteers and patients with COVID-19, race and comorbidities, such as type 2 diabetes, obesity and coronary artery diseases, that are known to alter the expression of miRNAs could not be precisely combined in our study; and (f) a small number of participants were included in the present study; however, the next step of our research is to validate the main miRNAs herein identified by quantitative RT-PCR (preferred method for the identification of miRNAs) in a larger cohort. Our results can also guide future studies to be conducted by other research groups, which can be performed in patients of other ethnicities.

Conclusion

In conclusion, the differentially expressed miRNAs identified in this study might be used as possible biomarkers for the diagnosis and severity of COVID-19 after being validated by quantitative RT-PCR and in a larger number of participants. Moreover, these miRNAs and signaling pathways may be possible targets for developing therapeutics for treating COVID-19.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07338-9>.

Acknowledgements We thank the staff of the Life Sciences Core Facility (LaCTAD) from University of Campinas (UNICAMP), for the quality control of the samples and sequencing.

Author contributions PM contributed with conception of the work. ASN, MBV, CRSCR, and RNS contributed to data acquisition. CRSCR, DSV, AE, LFSS, MWPI, RRC, LOR, LAS, ND, and WJF contributed with the recruitment of the participants and obtaining plasma samples. MBV, ASN, PENSIV, PM, and ECP performed the experiments (miRNA extraction and library construction). PM, MBV, ASN, PENSIV, and JCFQ performed bioinformatics and statistical analysis. ML performed the SARS-CoV-2 nasopharyngeal swab RT-PCR for control participants. PM and JLC supervised the study. MBV and ASN wrote the manuscript. PM, ECP, and JCFQ revised the manuscript. All authors have read and agreed with the final version of the manuscript.

Funding This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES) [Finance Code 001—88881.504454/2020-01 and 88887.506965/2020-00], by São Paulo Research Foundation (FAPESP) [number 2021/04669-9], and by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). ASN is a recipient of a doctoral scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES) [number 88887.511334/2020-00]. MBV is a recipient of a postdoctoral scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES) [number 88887.504453/2020-00]. CRSCR is a recipient of a doctoral scholarship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES) [number 88887.513100/2020-00].

Declarations

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval The study was approved by the Research Ethics Committee of the School of Medical Sciences of the University of Campinas (UNICAMP) [numbers 36041420.0.000.5404 and 31049320.7.1001.5404].

Consent for publication A preprint of this article has been already submitted on ResearchSquare platform (<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-630726/v1>) and published under a CC BY 4.0 License.

References

1. Lu H, Stratton CW, Tang YW (2020) Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: the mystery and the miracle. *J Med Virol* 92(4):401–402. <https://doi.org/10.1002/jmv.25678>
2. Guan WJ, Ni ZY, Hu Y et al (2020) Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med* 382(18):1708–1720. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2002032>
3. Coperchini F, Chiovato L, Croce L et al (2020) The cytokine storm in COVID-19: an overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev* 53:25–32. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.05.003>
4. Jean SS, Lee PI, Hsueh PR (2020) Treatment options for COVID-19: the reality and challenges. *J Microbiol Immunol Infect* 53(3):436–443. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.03.034>
5. FDA. Covid-19 vaccines authorized for emergency use or FDA-approved. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/covid-19-vaccines>. Accessed 15 September 2021
6. Chung JY, Thone MN, Kwon YJ (2021) COVID-19 vaccines: the status and perspectives in delivery points of view. *Adv Drug Deliv Rev* 170:1–25. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.011>
7. Ji T, Liu Z, Wang G et al (2021) Detection of COVID-19: a review of the current literature and future perspectives. *Biosens Bioelectron* 166:112455. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112455>
8. Adeoye J, Thomson P (2020) ‘The double-edged sword’—an hypothesis for Covid-19-induced salivary biomarkers. *Med Hypotheses* 143:110124. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110124>
9. Castro R, Luz PM, Wakimoto MD et al (2020) COVID-19: a meta-analysis of diagnostic test accuracy of commercial assays registered in Brazil. *Braz J Infect Dis* 24(2):180–187. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.04.003>

10. Jin YH, Zhan QY, Peng ZY et al (2020) Chemoprophylaxis, diagnosis, treatments, and discharge management of COVID-19: an evidence-based clinical practice guideline (updated version). *Mil Med Res* 7(1):41. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00270-8>
11. Pimentel GD, Dela Vega MCM, Laviano A (2020) High neutrophil to lymphocyte ratio as a prognostic marker in COVID-19 patients. *Clin Nutr ESPEN* 40:101–102. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2020.08.004>
12. Mishra PJ, Bertino JR (2009) MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 10(3):399–416. <https://doi.org/10.2217/14622416.10.3.399>
13. Correia CN, Nalpas NC, McLoughlin KE et al (2017) Circulating microRNAs as potential biomarkers of infectious disease. *Front Immunol* 8:118. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00118>
14. Marchi R, Sugita B, Centa A et al (2021) The role of microRNAs in modulating SARS-CoV-2 infection in human cells: a systematic review. *Infect Genet Evol* 91:104832. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104832>
15. Visacri MB, Nicoletti AS, Pincinato EC et al (2021) MicroRNAs as biomarkers of COVID-19: a scoping review on role, status, and future directions for research in this field. *Biomark Med* 15(18):1785–1795. <https://doi.org/10.2217/bmm-2021-0348>
16. Falavigna M, Colpani V, Stein C et al (2020) Guidelines for the pharmacological treatment of COVID-19. The task-force/consensus guideline of the Brazilian association of intensive care medicine, the Brazilian society of infectious diseases and the Brazilian society of pulmonology and tisiology. *Rev Bras Ter Intensiva* 32(2):166–196. <https://doi.org/10.5935/0103-507x.20200039>
17. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4:e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
18. Kim WR, Park EG, Kang KW et al (2020) Expression analyses of microRNAs in hamster lung tissues infected by SARS-CoV-2. *Mol Cells* 43(11):953–963. <https://doi.org/10.14348/molcells.2020.0177>
19. Farr RJ, Rootes CL, Rowntree LC et al (2021) Altered microRNA expression in COVID-19 patients enables identification of SARS-CoV-2 infection. *PLoS Pathog* 17(7):1009759. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009759>
20. Duecker RP, Adam EH, Wirtz S et al (2021) The MiR-320 family is strongly downregulated in patients with COVID-19 induced severe respiratory failure. *Int J Mol Sci* 22(19):10351. <https://doi.org/10.3390/ijms221910351>
21. Li C, Hu X, Li L, Li JH (2020) Differential microRNA expression in the peripheral blood from human patients with COVID-19. *J Clin Lab Anal* 34(10):23590. <https://doi.org/10.1002/jcla.23590>
22. Li CX, Chen J, Lv SK et al (2021) Whole-transcriptome RNA sequencing reveals significant differentially expressed mRNAs, miRNAs, and lncRNAs and related regulating biological pathways in the peripheral blood of COVID-19 patients. *Mediators Inflamm* 2021:6635925. <https://doi.org/10.1155/2021/6635925>
23. Chow JT, Salmena L (2020) Prediction and analysis of SARS-CoV-2-targeting microRNA in human lung epithelium. *Genes (Basel)* 11(9):1002. <https://doi.org/10.3390/genes11091002>
24. Meerson A, Najjar A, Saad E et al (2019) Sex differences in plasma microRNA biomarkers of early and complicated diabetes mellitus in israeli arab and jewish patients. *Noncoding RNA* 5(2):32. <https://doi.org/10.3390/nrna5020032>
25. Zou J, Li J, Ji C et al (2016) Expression profile of plasma microRNAs in nonsyndromic cleft lip and their clinical significance as biomarkers. *Biomed Pharmacother* 82:459–466. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.033>
26. Luo J, Wang Y, Lan D et al (2018) Differential expression of serum microRNAs in glucocorticoid-resistant patients with ulcerative colitis. *Int J Clin Exp Pathol* 11(2):936–946
27. Sabbatinelli J, Giuliani A, Maticchione G et al (2021) Decreased serum levels of the inflammaging marker miR-146a are associated with clinical response to tocilizumab in COVID-19 patients. *Mech Ageing Dev* 193:111413. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111413>
28. Garg A, Seeliger B, Derda AA et al (2021) Circulating cardiovascular microRNAs in critically ill COVID-19 patients. *Eur J Heart Fail* 23(3):468–475. <https://doi.org/10.1002/ehf.2096>
29. Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M et al (2020) Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med* 383(2):120–128. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2015432>
30. Mitchell MI, Ben-Dov IZ, Liu C et al (2021) Extracellular Vesicle Capture by AnTibody of Choice and Enzymatic Release (EV-CATCHER): a customizable purification assay designed for small-RNA biomarker identification and evaluation of circulating small-EVs. *J Extracell Vesicles* 10(8):e12110. <https://doi.org/10.1002/jev2.12110>
31. Tang H, Gao Y, Li Z et al (2020) The noncoding and coding transcriptional landscape of the peripheral immune response in patients with COVID-19. *Clin Transl Med* 10(6):e200. <https://doi.org/10.1002/ctm2.200>
32. Zhao J, Chen F, Ma W, Zhang P (2020) Suppression of long noncoding RNA NEAT1 attenuates hypoxia-induced cardiomyocytes injury by targeting miR-378a-3p. *Gene* 731:144324. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144324>
33. Chen YM, Zheng Y, Yu Y et al (2020) Blood molecular markers associated with COVID-19 immunopathology and multi-organ damage. *EMBO J* 39(24):e105896. <https://doi.org/10.15252/embj.2020105896>
34. Barbu MG, Condrat CE, Thompson DC et al (2020) MicroRNA involvement in signaling pathways during viral infection. *Front Cell Dev Biol* 8:143. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00143>
35. Jafarzadeh A, Nemati M, Jafarzadeh S (2021) Contribution of STAT3 to the pathogenesis of COVID-19. *Microb Pathog* 154:104836. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104836>
36. Shwetha S, Gouthamchandra K, Chandra M et al (2013) Circulating miRNA profile in HCV infected serum: novel insight into pathogenesis. *Sci Rep* 3:1555. <https://doi.org/10.1038/srep01555>
37. de Gonzalo-Calvo D, Benítez ID, Pinilla L et al (2021) Circulating microRNA profiles predict the severity of COVID-19 in hospitalized patients. *Transl Res* 236:147–159. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.05.004>
38. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L et al (2020) Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* 369(6504):718–724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>
39. Meffre E, Iwasaki A (2020) Interferon deficiency can lead to severe COVID. *Nature* 587(7834):374–376. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-03070-1>
40. Hojyo S, Uchida M, Tanaka K et al (2020) How COVID-19 induces cytokine storm with high mortality. *Inflamm Regen* 40:37. <https://doi.org/10.1186/s41232-020-00146-3>
41. Guo Y, Huang N, Tian M et al (2020) Integrated analysis of microRNA-mRNA expression in mouse lungs infected with H7N9 influenza virus: a direct comparison of host-adapting PB2 mutants. *Front Microbiol* 11:1762. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01762>
42. Zheng HY, Xu M, Yang CX et al (2020) Longitudinal transcriptome analyses show robust T cell immunity during recovery

from COVID-19. *Signal Transduct Target Ther* 5(1):294. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00457-4>

43. Abu-Izneid T, AlHajri N, Mohammed Ibrahim A et al (2021) Micro-RNAs in the regulation of immune response against SARS COV-2 and other viral infections. *J Adv Res* 30:133–145. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.11.013>
44. Sung SY, Liao CH, Wu HP et al (2013) Loss of let-7 microRNA upregulates IL-6 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells triggering a reactive stromal response to prostate cancer.

PLoS ONE 8(8):71637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071637>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Aline de Souza Nicoletti¹ · **Marília Berlofa Visacri¹** · **Carla Regina da Silva Correa da Ronda²** · **Pedro Eduardo do Nascimento Silva Vasconcelos¹** · **Julia Coelho França Quintanilha³** · **Rafael Nogueira de Souza¹** · **Deise de Souza Ventura⁴** · **Adriana Eguti⁴** · **Lilian Ferreira de Souza Silva⁴** · **Mauricio Wesley Perroud Junior^{1,4}** · **Rodrigo Ramos Catharino^{2,5}** · **Leonardo Oliveira Reis⁶** · **Luiz Augusto dos Santos⁷** · **Nelson Durán⁸** · **Wagner José Fávaro⁸** · **Marcelo Lancellotti²** · **José Luiz da Costa²** · **Patricia Moriel²** · **Eder de Carvalho Pincinato¹**

¹ School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Cândido Portinari Street, 200, Cidade Universitária Zeferino Vaz—Barão Geraldo, Campinas, SP 13083-871, Brazil

³ UNC Eshelman School of Pharmacy, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA

⁴ Hospital Estadual Sumaré Dr. Leandro Francheschini, Sumaré, SP, Brazil

⁵ Innovare Biomarkers Laboratory, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

⁶ UroScience Laboratory, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

⁷ Hospital Municipal de Paulínia, Paulínia, SP, Brazil

⁸ Laboratory of Urogenital Carcinogenesis and Immunotherapy, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil



Increased expression of miR-320b in blood plasma of patients in response to SARS-CoV-2 infection

Aline de Souza Nicoletti ¹, Marília Berlofa Visacri ¹, Carla Regina da Silva Correa da Ronda ², Julia Tiemi Siguemoto ², Carolini Motta Neri ², Rafael Nogueira de Souza ^{2,3}, Deise de Souza Ventura ³, Adriana Eguti ³, Lilian Ferreira de Souza Silva ³, Mauricio Wesley Perroud Junior ^{1,3}, Keini Buosi ¹, Mehrsa Jalalizadeh ¹, Franciele A. V. Dionato ¹, Luciana S. B. Dal Col ¹, Cristiane F. Giacomelli ¹, Patrícia A. F. Leme ¹, Leonardo Oliveira Reis ^{1,4}, Luiz Augusto dos Santos ⁵, Nelson Durán ¹, Wagner José Fávaro ¹, José Luiz da Costa ², Patricia Moriel ^{2*} and Eder de Carvalho Pincinato.¹

¹ Faculty of Medical Sciences, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas (SP-Brazil); a192905@dac.unicamp.br (A.S.N.); mariberlofa@gmail.com (M.B.V.); mperroud@unicamp.br (M.W.P.J.); keini.buosii@gmail.com (K.B.); jalalizadeh.mehrsa@gmail.com (M.J.); franciele.avdp@gmail.com (F.A.V.D.); lusaboya@hotmail.com (L.S.B.D.C.); giacosta@unicamp.br (C.F.G.); pleme@unicamp.br (P.A.F.L.); reisleo.l@gmail.com (L.O.R.); nelsonduran1942@gmail.com (N.D.); favarowj@unicamp.br (W.J.F.); ederpcb@unicamp.br (E.C.P.).

² Faculty of Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas (SP-Brazil); c265769@dac.unicamp.br (C.R.S.C.R.); j238356@dac.unicamp.br (J.T.S.); c250181@dac.unicamp.br (C.M.N.); rnsrgb@gmail.com (R.N.S.); josejlc@unicamp.br (J.L.C.).

³ Hospital Estadual de Sumaré Dr. Leandro Francheschini, Sumaré (SP-Brazil); deise.ventura@hes.unicamp.br (D.S.V.); drieguti@gmail.com (A.E.); lilianfssilva@gmail.com (L.F.S.S.).

⁴ School of Life Sciences, Pontifical Catholic University of Campinas (PUC-Campinas), Campinas (SP-Brazil); reisleo.l@gmail.com (L.O.R.).

⁵ Hospital Municipal de Paulínia, Paulínia (SP-Brazil); lasantos2001@uol.com.br (L.A.S.).

* Correspondence: patricia.moriel@fcf.unicamp.br

Background: Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) virus. Although advanced age and the presence of comorbidities contribute to a greater risk of developing the severe form of the disease, recent research has demonstrated how epigenetic mechanisms regulate the host-virus interaction and can be decisive in the course of infections, including COVID-19. In this context, microRNAs (miRNAs) comprise one of the three fundamental mechanisms of epigenetic regulation of gene expression and have been shown to play an important role in viral infections, either in cellular antiviral responses or in virus replication and propagation. A pilot study published by our research group identified, through NGS, the miR-4433b-5p, miR-320b and miR-16-2-3p differently expressed between patients with COVID-19 and controls. Thus, the objective of the present work is to validate the expression of these miRNAs in a larger cohort of participants using the qRT-PCR technique, and to perform *in silico* analyses. **Methods:** Patients with COVID-19 (case group, n=90) and healthy volunteers (control group, n=40) were recruited. MiRNAs were extracted from plasma samples and the validation by RT-qPCR was performed. In addition, *in silico* analyses were performed using mirPath v.3 software and TargetScan web server. **Results:** Of the three validated miRNAs, miR-320b was the only miRNA found up-regulated in the case group compared to the control group. The ROC curve constructed for this miRNA indicated an excellent specificity value, despite a reasonable sensitivity value. The *in silico* analyses pointed to the role of miR-320b in the regulation of the KITLG gene and, consequently, of the inflammatory process, in the lungs of patients infected with SARS-CoV-2. **Conclusion:** This work confirmed that miR-320b makes it possible to distinguish patients with COVID-19 from control participants, however, if this miRNA can be used as a target or a biomarker, further research is needed.

Keywords: microRNA; miRNA; Epigenetic; COVID-19; SARS-CoV-2;

1. Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [1]. The main form of disease transmission involves the inhalation of respiratory droplets containing the virus, and the most common symptoms include fever, fatigue, and dry cough [2]. Most patients develop mild symptoms; however, others may progress to severe critical illness (19% of cases), pneumonia, severe acute respiratory syndrome, multiple organ dysfunction, and death [3]. Although advanced age and the presence of comorbidities such as diabetes, heart disease, obesity, and immunosuppression contribute to a greater risk of developing the severe form of the disease [4], recent research has demonstrated how epigenetic mechanisms regulate host-virus interactions and can be decisive in the course of infections, including COVID-19 [5,6]. The epigenetic regulation of gene expression does not involve changes in the DNA sequence, and the function of non-coding RNAs (ncRNAs), such as microRNAs (miRNAs) is one of the three fundamental mechanisms of its regulation [7].

MiRNAs are small RNA molecules comprising approximately 22 noncoding nucleotides [8,9]. Most of them bind in a complementary fashion to the 3' untranslated region (3'-UTR) of the target messenger RNA (mRNA). Depending on the complementarity of this binding, they can mediate mRNA degradation or inhibit its transcription, thereby regulating protein synthesis [10–12]. Furthermore, circulating miRNAs play an important role in viral infections, either in cellular antiviral responses or viral replication and propagation [13,14].

Using next-generation sequencing (NGS), a pilot study published by our research group identified 18 plasma miRNAs that were differentially expressed between patients with COVID-19 and controls, including miR-4433b-5p, miR-320b, and miR-16-2-3p [15]. Thus, the objective of the present study was to validate the expression of these miRNAs in the plasma of a larger cohort of participants using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and perform *in silico* analyses to better understand how the dysregulated expression of these miRNAs can contribute to the pathogenesis of COVID-19.

2. Results

2.1 Participants

A total of 130 participants were included, with 40 in the control group and 90 in the case group. Of these, 5 from the case group were excluded from the analyses because they had cel-miR-39-3p expression levels above or below two standard deviations.

The clinical and demographic characteristics of all participants are shown in Table 1. Statistical analysis showed that the control and case groups did not differ with respect to age or sex; however, differences were observed in terms of ethnicity and presence of comorbidities. Most participants in the control group self-identified as Caucasians (60.7%), whereas most participants in the case group self-identified as non-Caucasians (87.0%). Regarding the presence of comorbidities, the case group had more comorbidities (82.1%), such as diabetes (100%) and systemic arterial hypertension (80.0%) compared to the control group. However, no significant differences were identified between the groups with respect to ischemic heart disease, and chronic obstructive pulmonary disease.

Table 1. Demographic and clinical data of included participants

Variable	Control group (N = 40)	Case group (N = 85)	p-value
Age (mean ± SD, Years)	44.50 ± 18.88	48.48 ± 17.17	0.1968 ¹
Gender (N, %)			
Male	21 (33.9%)	41 (66.1%)	0.6564 ²
Female	19 (30.2%)	44 (69.8%)	
Total	40	85	
Ethnicity (N, %)			
Caucasian	37 (60.7%)	24 (39.3%)	<0.0001 ²
Non-Caucasian	3 (13.0%)	20 (87.0%)	
Total	40	44	
Comorbidities (N, %)			
No	26 (55.3%)	21 (44.7%)	<0.0001 ²
Yes	14 (17.9%)	64 (82.1%)	
Total	40	85	
Diabetes (N, %)			
No	40 (47.1%)	45 (52.9%)	<0.0001 ²
Yes	0 (0.0%)	26 (100.0%)	
Total	40	71	
Systemic arterial hypertension (N, %)			
No	32 (45.1%)	39 (54.9%)	0.0083 ²
Yes	8 (20.0%)	32 (80.0%)	
Total	40	71	
Ischemic heart disease (N, %)			
No	40 (37.4%)	67 (62.6%)	0.2946 ³
Yes	0 (0.0%)	4 (100.0%)	
Total	40	71	
Chronic obstructive pulmonary disease (N, %)			
No	40 (37.0%)	68 (63.0%)	0.5519 ³
Yes	0 (0.0%)	3 (100.0%)	
Total	40	71	

SD, standard deviation; N, sample number; ¹: based on Mann-Whitney test; ², Chi-square test; ³, Fisher's exact test.

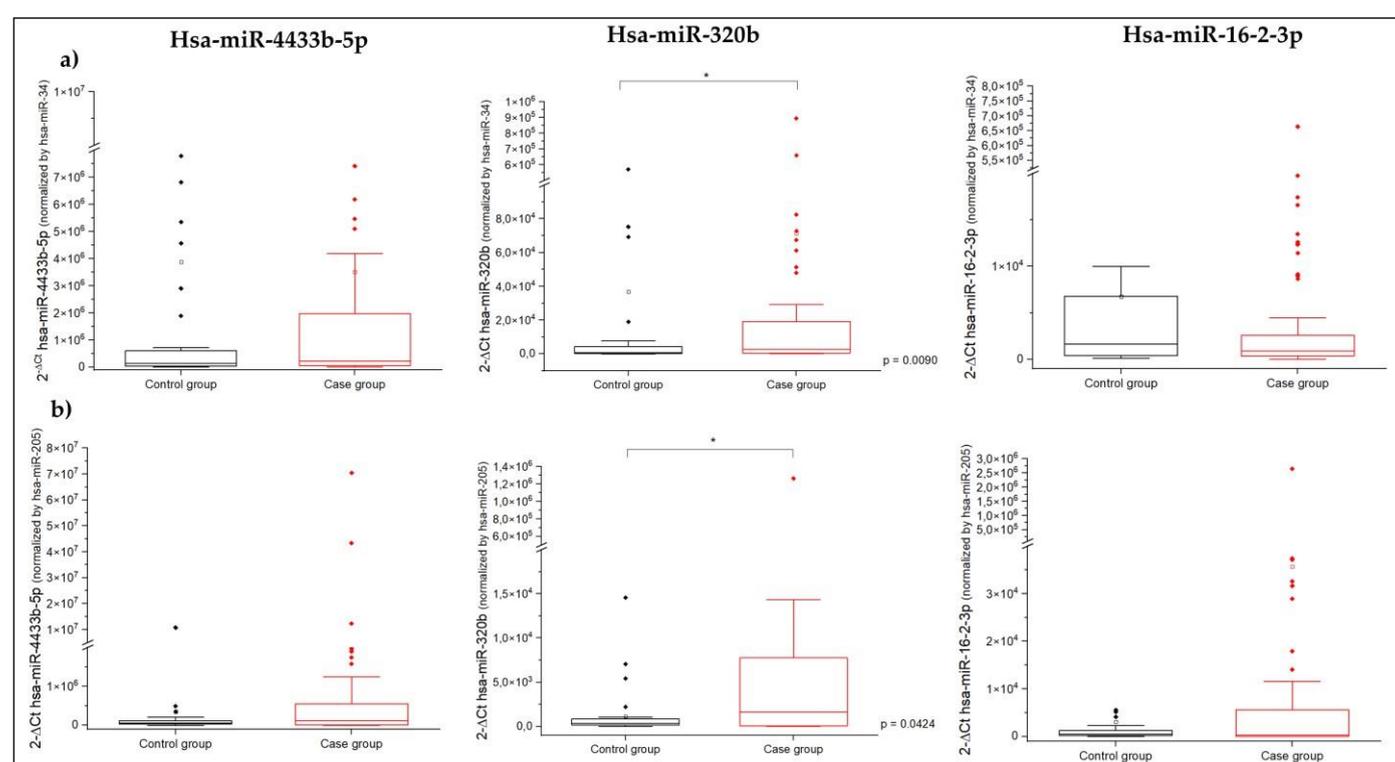
2.2 Validation of miRNAs by qRT-PCR

Figure 1 presents the gene expression of the three validated plasmatic miRNAs between control and case groups that was analyzed using the 2- Δ Ct method. Among these, miR-320b was the only miRNA whose expression was significantly upregulated in the case group than in the control group, regardless of the endogenous normalizer used. For miR-4433b-5p and miR-16-2-3p, no significant differences were found. Fold regulation (FR) and *p*-values for each validated miRNA are shown in Table 2 according to the endogenous normalizer used.

Table 2. Fold regulation and p value for each validated miRNA

miRNA	Fold regulation	p-value*
<i>Normalized by hsa-miR-34a-3p</i>		
Has-miR-4433b-5p	-1,12	0.2826
Has-miR-320b	1.91	0.0090
Has-miR-16-2-3p	1.84	0.2630
<i>Normalized by hsa-miR-205-3p</i>		
Has-miR-4433b-5p	5.39	0.4001
Has-miR-320b	19.81	0.0424
Has-miR-16-2-3p	11.50	0.6490

* based on Mann-Whitney test

**Figure 1.** Gene expression of plasmatic miR-4433b-5p, miR-320b and miR-16-2-3p between the control and case groups
a) miRNAs normalized by endogenous control hsa-miR-34a-3p and b) miRNAs normalized by endogenous control hsa-miR-205-3p.

2.3 Receiver Operator Characteristic (ROC) curves

For miR-320b (the only miRNA for which a significant difference was observed in gene expression between the evaluated groups), an ROC curve was generated to assess its ability to distinguish between participants without COVID-19 and patients with COVID-19. Figure 2 shows two ROC curves: one evaluating miR-320b expression normalized to that of miR-34a-3p and the other evaluating miR-320b expression normalized to that of miR-205-3p.

Table 3 shows the area under curve (AUC), cut-off point, sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) according to the normalizer used.

Reasonable AUC and sensitivity values were observed for both normalizers. Regarding the specificity and PPV parameters, desirable values of 72.5% and 81%, respectively, were observed when miR-320b expression was normalized to that of miR-34. These values increased to 90% and 92%, respectively, when the expression of miR-320b was normalized to that of miR-205. This finding indicates that this miRNA demonstrated good specificity.

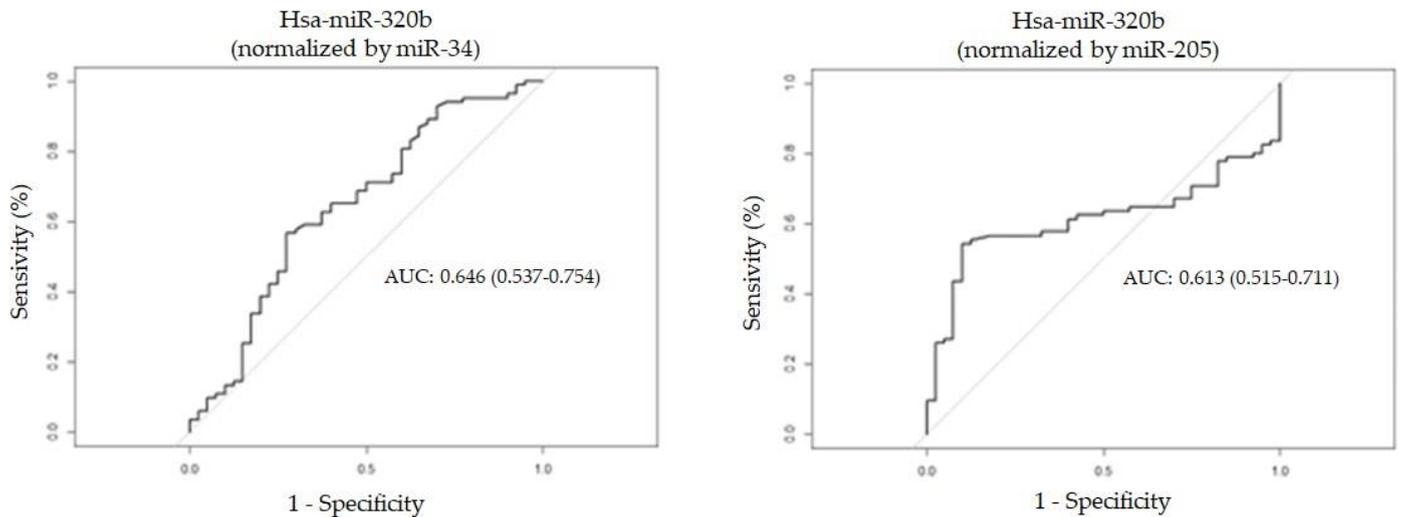


Figure 2. ROC curves of miR-320b expression between the control and case groups

Table 3. AUC, cutoff point, sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of miR-320b between the control and case groups

	Area	Cutoff	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Normalized by miR-34a-3p	0.646	1887	0.566	0.725	0.810	0.446
Normalized by miR-205-3p	0.613	1194	0.541	0.900	0.920	0.480

2.4 In silico analysis of potential targets of miR-320b

Using mirPath v.3 software and the TargetScan web server, 21 genes were found that were related to hsa-miR-320b and are described in Table 4. In addition, five predicted target pathways regulated by hsa-miR-320b were identified, all with p-values <0.05, which are listed as follows: 1) hematopoietic cell lineage, 2) chemical carcinogenesis, 3) caffeine metabolism, 4) metabolism of xenobiotics by cytochrome P450, and 5) linoleic acid metabolism. Of these, hematopoietic cell lineage and linoleic acid metabolism pathways are possibly related to COVID-19; therefore, they were selected as the focal points of our investigation to propose a mechanism of action of hsa-miR-320b, as shown in figure 3.

Table 4. TargetScan predicted gene interactions for hsa-miR-320b

#	Gene name
1	SLC9A2
2	RPA3OS
3	CYP1A2
4	ADAL
5	LPPR1
6	BHLHE41
7	HSPH1
8	VEPH1
9	ARL8B
10	PBX3
11	MLF1
12	KITLG
13	DNER
14	CDK13
15	ARFIP1
16	ST7-OT4
17	CD3G
18	CD12orf36
19	FAM63B
20	RGS9BP
21	GCG

148

3. Discussion

149

A preliminary study conducted by our research group identified 18 differentially expressed miRNAs between patients with COVID-19 and controls using NGS. hsa-miR-4433b-5p, followed by hsa-miR-16-2-3p, were found to be the most downregulated miRNAs, with FR values of -2.15 and -1.97, respectively, and p-values < 0.0001, whereas hsa-miR-320b was found to be upregulated, with FR of 1.78 and p-value of 0.001, respectively. Furthermore, a matrix constructed for the analysis of miRNA-gene interactions indicated that miR-320b interacted with most of the 242 genes selected in the enrichment analyses [15]. Therefore, the objective of this study was to validate the expression of hsa-miR-4433b-5p, hsa-miR-320b, and hsa-miR-16-2-3p in the plasma of a larger group of participants using qRT-PCR. qRT-PCR is currently considered the gold standard technique for small RNAs, because the results obtained by NGS are not necessarily the same as those found by qRT-PCR [16].

First, regarding the demographic and clinical data of the included participants, although age and sex were intentionally matched between the case and control groups, the same was not possible for ethnicity and presence of comorbidities. The control group mainly comprised Caucasian participants, whereas the case group consisted of non-Caucasian participants. Additionally, the case group had a higher proportion of patients with diabetes, hypertension, and ischemic heart disease than the control group. Although these differences between our groups may contribute to possible bias, they corroborate the findings of previous literature reviews [17,18]. For instance, a study conducted in China reported that in an initial cohort of 1,590 patients with COVID-19, 399 (25.1%) had at least one comorbidity, whereas 130 (8.2%) had two or more comorbidities. Hypertension (16.9%), diabetes (8.2%), cardiovascular disease (3.7%), and chronic kidney disease (1.3%)

were the most common in all patients with COVID-19 [19]. The American Heart Association's COVID-19 Cardiovascular Disease Registry study reported that Hispanic and Black patients accounted for more than half of hospitalized COVID-19 patients and, consequently, more than half of all hospital deaths. This finding indicates that these populations are more likely to be hospitalized with SARS-CoV-2 infection and therefore carry a disproportionate burden of COVID-19 mortality. In addition, Asian patients are more likely to develop severe COVID-19 cardiorespiratory disease than non-Hispanic Caucasian patients [20].

Regarding the validation of selected miRNAs, while miR-4433b-5p was found to be downregulated in patients with COVID-19 when using the NGS technique [15], in the present study, no significant differences were found in the gene expression of this miRNA between the case and control groups for both selected endogenous normalizers. In contrast, in a study published by Giannella et al., analysis of small RNA sequencing data identified downregulation of miR-4433b-5p in the serum of patients with COVID-19 compared to that in the serum of healthy controls. In addition, survival curve analysis confirmed that high leukocyte counts ($>9 \times 10^9/L$) and low serum miR-4433b-5p levels at admission were associated with increased mortality [21].

The study conducted by Najafipour et al. employed a small RNA deep sequencing approach to screen for differentially expressed miRNAs in blood samples derived from patients with COVID-19, in which miR-16-2-3p was found to be among the top ten most up-regulated miRNAs [17]. Similarly, another study published by Li et al. found miR-16-2-3p to be the most up-regulated miRNA, with a fold-change (FC) of 1.6 compared to that in the control group [22]. Although this miRNA was the second most downregulated miRNA in a preliminary study published by our research group [15], in the present study, the expression of miR-16-2-3p was not significantly different between the case and control groups, independent of the endogenous normalizer used.

Corroborating the findings of our preliminary study, we found that miR-320b was significantly upregulated in patients with COVID-19 than in healthy volunteers. For both endogenous normalizers used, desirable values for specificity, which comprise the ability of this miRNA not to be upregulated in samples from individuals known not to be infected with SARS-CoV-2, were indicated by the ROC curve, despite modest sensitivity values. Consistent with our results, the work performed by Giuliani et al. validated the overexpression of miR-320b in the serum of deceased patients by qRT-PCR compared to that in the serum of those who survived COVID-19. Furthermore, Kaplan-Meier and Cox regression models confirmed that patients with 20% higher serum levels of miR-320b had a three-fold increased risk of death during hospitalization due to COVID-19 [23]. In addition, a study published by Giannella et al. also identified that the expression of miR-320 family (320a-3p, 320b, 320c, and 320d) as upregulated in patients with COVID-19 compared to that in healthy controls. Furthermore, ROC curve analysis identified that high expression levels of miR-320 family members showed $>90\%$ sensitivity and specificity in discriminating between these two groups, regardless of disease severity. However, network analysis of the genes targeted by miRNAs showed that upregulation of the miR-320 family was associated with the targeting of several genes involved in antiviral defense, such as genes that encode cytokines, chemokines and cytokine receptors (IFNL1, CCL5, IL2RB), C-reactive protein (PCR), chain light ferritin (FTL), cytochrome c (CYCS), matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and proteins involved in intracellular trafficking (ARF1, DTCN5, SEC24A, SLC26A2) [21]. In contrast, a study conducted by Duecker et al. using NGS found that the expression of members of the miR-320 family was significantly

downregulated in patients with severe respiratory failure induced by SARS-CoV-2 than 221
in controls, primarily during the subsequent phase of the disease (< 7 days). Additionally, 222
the expression of all miR-320 family members was significantly correlated with C-reactive 223
protein, D-dimer, and IL-6 concentrations in the blood of patients with COVID-19 patients 224
and healthy controls. Enrichment analysis was performed to identify the contributions of 225
the miR-320a, miR-320b, and miR-320c targets to biological processes, highlighting the 226
role of pathways related to inflammation and endothelial dysfunction [24]. 227

In our study, the *in silico* analysis focused on hsa-miR-320b because, as shown above, 228
among the miRNAs validated by qRT-PCR, it was the sole miRNA with statistically sig- 229
nificant expression differences between individuals without COVID-19 and those afflicted 230
by the disease. Using mirPath v3 software, we identified five signaling pathways poten- 231
tially related to hsa-miR-320b. Among these, the hematopoietic cell lineage and linoleic 232
acid metabolism pathways were most likely involved in the pathogenesis of COVID-19. 233
Among the genes associated with the hematopoietic cell lineage pathway, *KITLG* seems 234
to encode a protein, the SCF, whose increased expression seems to be related to the sever- 235
ity of the disease induced by SARS-CoV-2 [25]. In Figure 3, we propose a mechanism of 236
action of hsa-miR-320b based on its relationship with the hematopoietic cell lineage path- 237
way. Increased expression of hsa-miR-320b in patients with COVID-19 leads to increased 238
expression of *KITLG* in bronchial epithelial and smooth muscle cells, lung fibroblasts, en- 239
dothelial cells, mast cells, eosinophils, and dendritic cells. This results in heightened re- 240
cruitment of mast cell progenitors and diminished mast cell apoptosis, culminating in es- 241
calated release of inflammatory agents like proteases, histamines, chemotactic factors, and 242
cytokines. These factors are acknowledged to be elevated in COVID-19, particularly in its 243
severe manifestation. [26,27]. One consideration for using *in silico* approaches is that their 244
results should be evaluated with caution, since these tools rely on sequence-based predic- 245
tions to pair miRNAs with target genes. A large set of potential targets is generated, many 246
of which have little functional value, and it is up to the investigator to determine which 247
are associated with their pathways of interest. Ideally, all predictions should be carefully 248
validated, preferably using experimental data [28]. 249

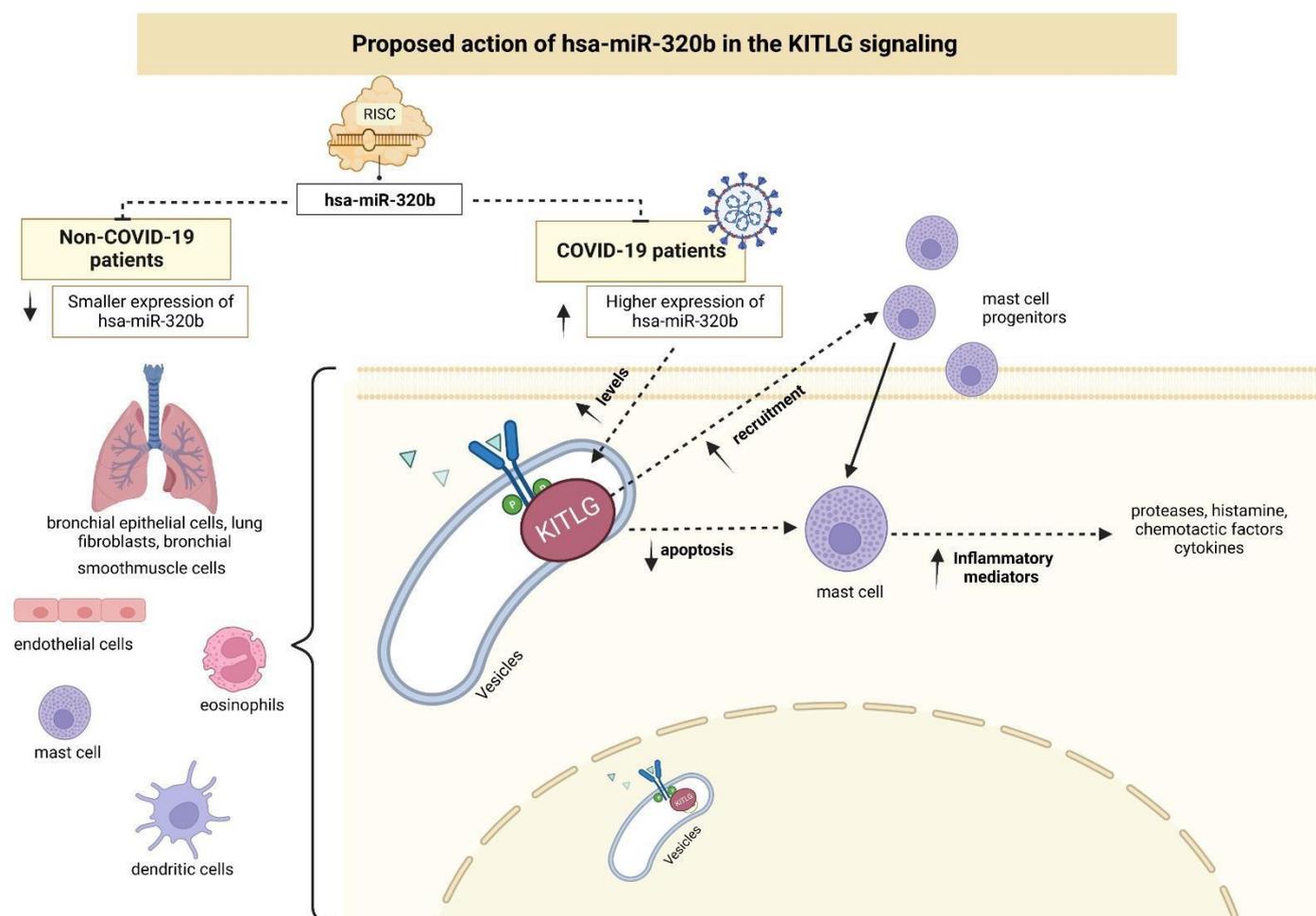


Figure 3. Proposed action of has-miR-320b in the KITLG pathway. Increased hsa-miR-320b expression in patients with COVID-19 leads to an increase in KITLG gene expression. As a result, there is an increase in the recruitment of mast progenitor cells, contributing to an increase in the release of inflammatory mediators, a characteristic feature of SARS-CoV-2 infection. Created with BioRender.com, accessed on 27 July 2023.

While widespread vaccination has exhibited considerable potential in curtailing the dissemination of COVID-19 and subsequently decreasing mortality rates [29], a significant query persists: How can we discern, amidst variables like age and comorbidities, the individuals who will advance to the critical stage of COVID-19? This identification is crucial for accurate management and the prevention of unfavorable outcomes. Therefore, miRNAs have emerged as critical regulators in the pathogenesis of inflammatory lung diseases, including those induced by viral infections [30,31]. Therefore, analysis of the miRNA profile of patients with COVID-19, such as that performed in this study, may help us better understand the evolution of the disease by identifying the signaling pathways regulated by these miRNAs, allowing the design of new therapeutic targets or drug repositioning [17].

In conclusion, this study confirmed that miR-320b renders distinguishing patients infected with SARS-CoV-2 from control participants, and its higher expression in patients with COVID-19 may be related to an increase in the inflammatory process. However,

further research is needed to determine whether this miRNA can be used as a target or biomarker. 271
272

4. Materials and Methods 273

Study design and ethical considerations 274

This was an observational, analytical, case-control study conducted using nonprobabilistic sampling. 275
276

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (numbers 36041420.0.000.5404 and 31049320.7.1001.5404). All participants or their guardians signed a consent form authorizing the use of their samples and data. 277
278
279
280

Participants and eligibility criteria 281

Patients with COVID-19 (case group) were recruited from the Hospital Estadual Sumaré Dr. Leandro Francheschini (HES) in the city of Sumaré (SP, Brazil), the outpatient clinic of the Community Health Center (CeCom) of the Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP (Campinas-SP, Brazil), and Paulínia Municipal Hospital, HMP (Paulínia-SP, Brazil), whereas healthy volunteers (control group) were recruited from the UNICAMP community. 282
283
284
285
286
287

Eligibility criteria are outlined as follows: age ≥ 18 years, admitted to HES with a positive RT-PCR result for SARS-CoV-2 confirmed through a nasopharyngeal swab for patients with COVID-19 and negative RT-PCR result for SARS-CoV-2 confirmed through a nasopharyngeal swab for control participants. 288
289
290
291

Characterization of the participants 292

The participants were characterized in terms of age, sex, ethnicity, and comorbidities such as diabetes, systemic arterial hypertension, ischemic heart disease, and chronic obstructive pulmonary disease. 293
294
295

Sample collection 296

Blood was collected in tubes containing EDTA (ethylenediamine-tetraacetic) as an anticoagulant and centrifuged at 2,500 rpm for 10 min at 4°C to separate the plasma. The plasma was aliquoted and stored in a freezer at -80°C until the experiments were performed. All analyses were performed at the Clinical Pharmacy Laboratory (CLIPHAR), located in the Faculty of Pharmaceutical Sciences at UNICAMP. 297
298
299
300
301

Criteria for selecting possible miRNAs candidates 302

Considering the RNA-Seq expression data obtained in a preliminary study by our research group [15], three criteria were used to select the miRNAs for validation by qRT-PCR: (1) the miRNA must exhibit a FC > 1.6 or < -1.6 ; (2) the miRNA must have a p-value < 0.05 ; and (3) the miRNA must not have comments from the GeneGlobe Data Analysis Center (Qiagen, Germany). Based on these criteria, three miRNAs were selected for validation by qRT-PCR, as described in the objectives of this paper: hsa-miR-4433b-5p, hsa-miR-320b and hsa-miR-16-2-3p. 303
304
305
306
307
308
309

To select candidates for endogenous normalizers, the following criteria were adopted: 1) the miRNA must have an FC equal to 1; 2) the miRNA must have a p-value equal to 0.999; and 3) the miRNA must not have comments from the GeneGlobe Data Analysis Center. Normalization analysis was performed using the RefFinder online tool and the differences in mean ΔCt values (candidate Ct miR – Ct Cel-miR-39) for case and control groups were analyzed for each miRNA candidate for normalization using a non-paired Student's t-test. Based on these criteria, hsa-miR-34a-3p and hsa-miR-205-3p were selected as endogenous controls.

Assessment of miRNA expression

The extraction of miRNA was performed using the miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. Immediately after the addition of QIAzol, 15 fmol of the exogenous control (spike-in) cel-miR-39 (Integrated DNA Technologies (IDT) was added to monitor the quality of processing and quantification of the samples. cDNA was synthesized using the TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions.

RT-qPCR reactions were performed on Rotor-Gene Q platform (Qiagen, Germany) using TaqMan™ Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems, USA) for three miRNAs selected for validation, as well as for cel-miR-39 (spike-in), hsa-miR-34a-3p and hsa-miR-205-3p (endogenous normalizers). The total reaction volume was reduced to 10 μ L, comprising 5 μ L of TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2 \times) (Applied Biosystems, USA), 0.5 μ L of TaqMan® Advanced miRNA Assay (20 \times) (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), 2 μ L of RNase-free water, and 2.5 μ L of diluted cDNA (1:10). All reactions were performed in duplicate and the cycling conditions are listed as follows: Hold:95°C, 20 s; Cycling:95°C, 15 s; 60°, 60 s. Raw data were evaluated using the Rotor-Gene Q Series Software (Qiagen, Germany). As a part of the quality control, samples with cel-miR-39 expression above two standard deviations were excluded from the analysis.

Expression changes were evaluated using the $2^{-\Delta Ct}$ method, where ΔCt reflects the difference between the threshold cycle of the target gene and the endogenous control (hsa-miR-34a-3p and has-miR-205-3p). This step was performed to remove variations that were not related to the biological condition studied.

In silico analysis of has-miR-320b

Since hsa-miR-320b was the only validated miRNA that distinguished between participants with or without COVID-19, *in silico* analysis was performed to identify the predicted target pathways for this miRNA related to the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection. The analysis was performed using the online software mirPath v.3, based on the TargetScan web server (<https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/mirpathv3/index.php?r=mirpath#mirnas=hsa-miR-320b&methods=TargetScan&selection=0>, accessed on August 1, 2023).

Statistical analysis

To describe the sample profile, frequency tables of categorical variables were created with absolute frequencies (n), percentages (%), and descriptive measures (mean and standard deviation). For comparisons between groups, the chi-square or Fisher's exact test was used for categorical variables and the Mann-Whitney test for numeric variables. Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed using diagnostic measures

[area under the curve (AUC), cutoff point, sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV)]. The significance level adopted was 5%.

Author Contributions: Conceptualization, José Da Costa, Eder Pincinato and Patricia Moriel; Data curation, Aline Nicoletti and Patricia Moriel; Funding acquisition, José Da Costa, Eder Pincinato and Patricia Moriel; Investigation, Aline Nicoletti, Marília Visacri, Carla Da Ronda, Júlia Siguemoto and Carolini Neri; Methodology, Aline Nicoletti, Marília Visacri, Carla Da Ronda, Júlia Siguemoto and Carolini Neri; Project administration, Aline Nicoletti; Resources, Aline Nicoletti, Rafael de Souza, Deise Ventura, Adriana Eguti, Lilian Silva, Mauricio Junior, Keini Buosi, Mehrsa Jalalizadeh, Franciele Dionato, Luciana Dal Col, Cristiane Giacomelli, Patrícia Leme, Leonardo Reis, Luiz dos Santos, Nelson Durán, Wagner Fávaro, José Da Costa, Eder Pincinato and Patricia Moriel; Supervision, Aline Nicoletti and Patricia Moriel; Validation, Aline Nicoletti; Visualization, Aline Nicoletti; Writing – original draft, Aline Nicoletti; Writing – review & editing, Aline Nicoletti and Patricia Moriel.

Funding: This research was funded by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*—Brazil (CAPES) (Finance Code 001) and by the São Paulo Research Foundation (FAPESP), grant numbers 2021/04669-9, 2021/12359-0, and 2021/12387-3.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Campinas (protocols codes: 36041420.0.000.5404, August 15, 2020, and 31049320.7.1001.5404, July, 25, 2020)

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the Research Data Repository of the University of Campinas, <https://doi.org/10.25824/redu/WWUNT1>.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Available online: https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1 (accessed on 30 May 2023).
2. Zavascki, A.P.; Falci, D.R.; Chen, A.T.C. Clinical Characteristics of Covid-19 in China. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 1859–1862, doi:10.1056/nejmc2005203.
3. Hu, Ben; Guo, Hua; Zhou, Peng; and Shi, Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **2019**, doi:10.1038/s41579-020-00459-7.
4. CDC People with Certain Medical Conditions Available online: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html> (accessed on 1 June 2023).
5. Atlante, S.; Mongelli, A.; Barbi, V.; Martelli, F.; Farsetti, A.; Gaetano, C. The Epigenetic Implication in Coronavirus Infection and Therapy. *Clin. Epigenetics* **2020**, 1–12, doi:10.1186/s13148-020-00946-x.
6. Foolchand, A.; Mazaleni, S.; Ghazi, T.; Chuturgoon, A.A. A Review: Highlighting the Links between Epigenetics, COVID-19 Infection, and Vitamin D. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms232012292.
7. Bhat, S.; Rishi, P.; Chadha, V.D. Understanding the Epigenetic Mechanisms in SARS CoV-2 Infection and Potential Therapeutic Approaches. **2020**.
8. Lagos-Quintana, M.; Rauhut, R.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. Identification of Novel Genes Coding for Small

- Expressed RNAs. *Science (80-.)*. **2001**, *294*, 853–858, doi:10.1126/science.1064921. 396
9. Lee, R.C.; Ambros, V. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis Elegans*. *Science (80-.)*. **2001**, *294*, 862–864, doi:10.1126/science.1065329. 397
398
 10. Baek, Daehyun; Villén, Judit; Shin, Chanseok; Camargo, Fernando D; Gygi, Steven P and Bartel, D.P. The Impact of MicroRNAs on Protein Output. *Nature* **2008**, doi:10.1038/nature07242.The. 399
400
 11. Selbach, M.; Schwanhäusser, B.; Thierfelder, N.; Fang, Z.; Khanin, R.; Rajewsky, N. Widespread Changes in Protein Synthesis Induced by MicroRNAs. *Nature* **2008**, *455*, 58–63, doi:10.1038/nature07228. 401
402
 12. Bartel, D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **2004**, *116*, 281–297, doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5. 403
404
 13. Barbu, M.G.; Condrat, C.E.; Thompson, D.C.; Bugnar, O.L.; Cretoiu, D.; Toader, O.D.; Suci, N.; Voinea, S.C. MicroRNA Involvement in Signaling Pathways During Viral Infection. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 1–22, doi:10.3389/fcell.2020.00143. 405
406
407
 14. Liang, Y.; Fang, D.; Gao, X.; Deng, X.; Chen, N.; Wu, J.; Zeng, M.; Luo, M. Circulating MicroRNAs as Emerging Regulators Of. **2023**, *13*, doi:10.7150/thno.78164. 408
409
 15. Nicoletti, A. de S.; Visacri, M.B.; da Ronda, C.R. da S.C.; Vasconcelos, P.E. do N.S.; Quintanilha, J.C.F.; de Souza, R.N.; Ventura, D. de S.; Eguti, A.; Silva, L.F. de S.; Perroud Junior, M.W.; et al. Differentially Expressed Plasmatic MicroRNAs in Brazilian Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Preliminary Results. *Mol. Biol. Rep.* **2022**, *49*, 6931–6943, doi:10.1007/s11033-022-07338-9. 410
411
412
413
 16. D’haene, B.; Mestdagh, P.; Hellems, J.; Vandesompele, J. MiRNA Expression Profiling: From Reference Genes to Global Mean Normalization. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *822*, 261–272, doi:10.1007/978-1-61779-427-8_18. 414
415
 17. Najafipour, R.; Mohammadi, D.; Estaki, Z.; Zarabadi, K.; Jalilvand, M.; Moghbelinejad, S. Screening for Differentially Expressed MicroRNAs in BALF and Blood Samples of Infected COVID- • 19 ARDS Patients by Small RNA Deep Sequencing. **2022**, 1–12, doi:10.1002/jcla.24672. 416
417
418
 18. Zhang, J. jin; Dong, X.; Liu, G. hui; Gao, Y. dong Risk and Protective Factors for COVID-19 Morbidity, Severity, and Mortality. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2023**, *64*, 90–107, doi:10.1007/s12016-022-08921-5. 419
420
 19. Guan W-j, Liang W-h, Zhao Y, et al. Comorbidity and Its Impact on 1590 Patients with COVID-19 in China: A Nationwide Analysis. *Eur Respir J* **2020**, *55*: 200054, doi:10.1183/13993003.00547-2020. 421
422
 20. Rodriguez, F.; Solomon, N.; De Lemos, J.A.; Das, S.R.; Morrow, D.A.; Bradley, S.M.; Elkind, M.S.V.; Williams, J.H.; Holmes, D.J.; Matsouaka, R.A.; et al. Racial and Ethnic Differences in Presentation and Outcomes for Patients Hospitalized With COVID-19: Findings From the American Heart Association’s COVID-19 Cardiovascular Disease Registry. *Circulation* **2021**, *143*, 2332–2342, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052278. 423
424
425
426
 21. Giannella, A.; Riccetti, S.; Sinigaglia, A.; Piubelli, C.; Razzaboni, E.; Battista, P. Di; Agostini, M.; Molin, E.D.; Manganeli, R.; Gobbi, F.; et al. Circulating MicroRNA Signatures Associated with Disease Severity and Outcome in COVID-19 Patients. **2022**, 1–21, doi:10.3389/fimmu.2022.968991. 427
428
429
 22. Li, C.; Hu, X.; Li, L.; Li, J. hui Differential MicroRNA Expression in the Peripheral Blood from Human Patients with COVID-19. *J. Clin. Lab. Anal.* **2020**, *34*, 3334–3340, doi:10.1002/jcla.23590. 430
431
 23. Giuliani A, Matakchione G, Ramini D, Di Rosa M, Bonfigli A R, Sabbatinelli J, Monsurro V, Recchioni R, Marcheselli F, Marchegiani F, Piacenza F, Cardelli M, Galeazzi R, Pomponio G, Ferrarini A, Gabrielli A, Baroni S S, Moretti M, Sarzani R, Giordano P, Ch, A.; Olivieri, F. Circulating MiR-320b and MiR-483-5p Levels Are Associated with COVID-19 in-Hospital Mortality. **2020**. 432
433
434
435
 24. Duecker, R.P.; Adam, E.H.; Wirtz, S.; Gronau, L.; Khodamoradi, Y.; Eberhardt, F.J.; Donath, H.; Gutmann, D.; Vehreschild, M.J.G.T.; Zacharowski, K.; et al. The MiR-320 Family Is Strongly Downregulated in Patients with 436
437

- COVID-19 Induced Severe Respiratory Failure. **2021**, *2*, 1–14. 438
25. Zhu, J.; Wu, C.; Wu, L. Associations Between Genetically Predicted Protein Levels and COVID-19 Severity. **2020**, 1–4, doi:10.1093/infdis/jiaa660. 439
440
26. Mak, A.C.Y.; Sajuthi, S.; Joo, J.; Xiao, S.; Sleiman, P.M.; Lurmann, F.; Jain, D.; Abecasis, G.; Kang, H.M.; Nickerson, D.A.; et al. Lung Function in African American Children with Asthma Is Associated with Novel Regulatory. *215*, 869–886. 441
442
443
27. Kaur, S.; Bansal, R.; Kollimuttathuillam, S.; Manje, A. The Looming Storm: Blood and Cytokines in COVID-19. **2020**. 444
445
28. Folador, E.; de Oliveira Junior, A.; Tiwari, S.; Jamal, S.; Ferreira, R.; Barh, D.; Ghosh, P.; Silva, A.; Azevedo, V. In Silico Protein-Protein Interactions: Avoiding Data and Method Biases Over Sensitivity and Specificity. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2015**, *16*, 689–700, doi:10.2174/1389203716666150505235437. 446
447
448
29. Graña, C.; Ghosn, L.; Evrenoglou, T.; Jarde, A.; Minozzi, S.; Bergman, H.; Buckley, B.S.; Probyn, K.; Villanueva, G.; Henschke, N.; et al. Efficacy and Safety of COVID-19 Vaccines. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2022**, 2022, doi:10.1002/14651858.CD015477. 449
450
451
30. Stolzenburg, L.R.; Harris, A. The Role of MicroRNAs in Chronic Respiratory Disease: Recent Insights. *Biol. Chem.* **2018**, *399*, 219–234, doi:10.1515/hsz-2017-0249. 452
453
31. Zhang, S.; Amahong, K.; Sun, X.; Lian, X.; Liu, J.; Sun, H.; Lou, Y.; Zhu, F.; Qiu, Y. The MiRNA: A Small but Powerful RNA for COVID-19. *Brief. Bioinform.* **2021**, *22*, 1137–1149, doi:10.1093/bib/bbab062. 454
455
456

5. DISCUSSÃO

Como detalhado na introdução deste estudo, os miRNAs circulantes têm sido alvo de investigações como possíveis biomarcadores de doenças, demonstrando importante papel como reguladores epigenéticos em infecções virais, incluindo a COVID-19. Por isso, nesta tese, o nosso objetivo foi avaliar as possíveis alterações na expressão de miRNAs plasmáticos em resposta a infecção por SARS-CoV-2 com a finalidade de não somente identificar miRNAs que possam ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico e/ou prognóstico, mas principalmente para melhor compreender como a expressão desregulada destes contribui para a patogênese da COVID-19.

Para atingir o objetivo proposto, nós optamos inicialmente por realizar uma revisão do tipo escopo da literatura. Esta revisão abrangeu uma pesquisa bibliográfica em nove bases de dados de artigos, publicados até a data de 13 de junho de 2021, que descreveram miRNAs desregulados em células, animais ou em pacientes infectados por SARS-CoV-2. Ao total, 20 estudos foram incluídos e os miRNAs desregulados mais importantes que podem desempenhar um papel fundamental na patogênese da COVID-19 foram os miR-21-5p, miR-146a, miR-126-3p, miR-144 e miR-155. Entre esses miRNAs, os miR-21-5p, miR-144 e miR-155 parecem ser potenciais biomarcadores de diagnóstico, enquanto o miR-146a parece ser um potencial biomarcador de gravidade da doença. Esta revisão forneceu informações sobre o papel dos miRNAs como biomarcadores na COVID-19 e o status à época das pesquisas nesse campo, contribuindo com novos *insights* para estudos futuros.

Quanto à segunda etapa deste estudo, ela compreendeu a identificação de miRNAs diferentemente expressos no plasma de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, através da técnica de NGS. Para tanto, 12 participantes foram recrutados, sendo 4 controles e 8 casos. Os pacientes do grupo caso foram ainda classificados, de acordo com os critérios de Falavigna et al. (72), em pacientes com COVID-19 leve ou grave/crítica. Um total de 18 miRNAs foram expressos diferencialmente entre pacientes com COVID-19 e controles. Destes, a expressão dos miR-6780b-3p, miR-6883-3p, miR-4769-5p, miR-6873-3p, miR-320b, miR-7111-3p, miR-4755-3p, miR-320c, miR-6511a-3p, miR-320d, miR-

5187-3p, miR-4508 e miR-4659a-5p foi pelo menos 1,6 vezes maior no grupo caso em comparação ao controle, enquanto a expressão dos miR-4433b-5p, miR-16-2-3p, miR-126-3p, miR-150-5p e miR-224-5p foi pelo menos 1,6 vezes menor na mesma comparação. Interessantemente, os miR-16-2-3p, miR-126-3p e miR-150-5p foram previamente identificados nos estudos incluídos em nossa revisão de escopo. O miR-16-2-3p, por exemplo, foi encontrado 1,3 vezes mais expresso no sangue periférico total de pacientes com COVID-19 em comparação aos controles (76). Quanto ao miR-126-3p, em um estudo ele foi encontrado menos expresso em vesículas extracelulares de casos severos em relação a casos leves (77), enquanto em outros dois estudos foi encontrado menos expresso no soro de pacientes com COVID-19 em comparação a voluntários saudáveis (68,78). A respeito do miR-150-5p, ele foi encontrado menos expresso no plasma de pacientes com COVID-19 internados em unidade de terapia intensiva em comparação com a pacientes de enfermaria (69).

Além disso, ainda nesta segunda etapa, análises adicionais das comparações controles versus casos, controles versus pacientes com COVID-19 leve e controles versus pacientes com COVID-19 grave/crítica identificaram 8 miRNAs diferencialmente expressos. A análise de bioinformática destes 8 miRNAs apontou as 50 vias de sinalização mais enriquecidas, das quais 3 parecem ter um papel importante na modulação de infecções virais por miRNAs: a sinalização Wnt/ β -catenina, a sinalização fosfoinositídeo 3-quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT) e a via STAT3. Ademais, um total de 242 genes foram relacionados a essas vias. A matriz construída para a análise das interações gene-miRNA apontou os miR-320b e miR-320c como os que mais interagiram com os 242 genes selecionados. Tomados em conjunto, os achados desse estudo contribuiriam para a identificação de possíveis biomarcadores da doença em questão e de vias de sinalização que podem ser alvos para o desenvolvimento de futuras terapias para o tratamento da COVID-19.

Uma vez que os resultados encontrados por NGS não necessariamente são os mesmos encontrados por RT-qPCR, a terceira etapa deste estudo envolveu a validação da expressão dos miR-4433b-5p, miR-320b e miR-16-2-3p, selecionados na etapa anterior, no plasma de um grupo maior de participantes, através da técnica de RT-qPCR, que atualmente é considerada a técnica padrão ouro para análise da expressão gênica de pequenos RNAs (79).

Foram incluídos 130 participantes, sendo 40 controles e 90 casos. Destes, 5 amostras do grupo caso foram excluídas das análises porque apresentaram níveis de expressão do controle exógeno cel-miR-39-3p acima ou abaixo de dois desvios padrões. Além disso, uma vez que a normalização por genes de controle endógenos é atualmente o método mais preciso para corrigir possíveis vieses causados, por exemplo, pela variação na quantidade de material de partida, entre outras causas (74,75), dois controles endógenos foram selecionados novamente com base na etapa anterior, o miR-34a-3p e o miR-205-3p. Dos 3 miRNAs validados, o miR-320b foi o único miRNA significativamente mais expresso no grupo de pacientes com COVID-19 comparado ao grupo controle, independentemente do normalizador endógeno utilizado. Para os miR4433b-5p e miR-16-2-3p, nenhuma diferença significativa na expressão gênica foi encontrada. Apesar de valores razoáveis para a sensibilidade, a curva ROC para o miR-320b apresentou ótimos valores de especificidade, que compreende a capacidade deste miRNA não ser encontrado mais expresso em participantes não infectados pelo SARS-CoV-2 em comparação aos infectados (80). A análise *in silico* identificou 5 possíveis vias de sinalização reguladas pelo miR-320b, das quais a via de sinalização da linhagem celular hematopoiética parece estar mais relacionada à patogênese da COVID-19 ao regular a expressão do gene KITLG em células pulmonares e sanguíneas como mastócitos, eosinófilos e células dendríticas. A expressão aumentada deste gene, por sua vez, promove um aumento no recrutamento de células progenitoras de mastócitos, contribuindo para um aumento na liberação de mediadores inflamatórios (81,82), sabidamente aumentados na COVID-19. Entretanto, dado que as previsões computacionais devem ser avaliadas com cautela (83), estudos experimentais são necessários para avaliar como a expressão do miR-320b influencia no curso da infecção por SARS-CoV-2.

Assim como na etapa anterior, esta etapa apresentou algumas limitações: (a) as amostras de sangue foram coletadas em momentos diferentes após o início dos sintomas da COVID-19; (b) não foram incluídos pacientes com outras infecções virais respiratórias (por exemplo, pacientes infectados com o vírus influenza) como controles positivos para comprovar a especificidade dos miRNAs validados como biomarcadores da COVID-19; (c) também não foram incluídos pacientes assintomáticos infectados por SARS-CoV-2; (d) não

sabemos quais cepas do SARS-CoV-2 foram responsáveis pela infecção de nossos pacientes; e (e) apesar de termos pareado idade e sexo entre os grupos caso e controle, a etnia e a presença de comorbidades, que sabidamente alteram a expressão de miRNAs, não puderam ser precisamente combinadas em nosso estudo.

Por fim, como mencionado acima, este estudo identificou por meio da técnica de NGS o miR-320b como mais expresso no plasma de pacientes do grupo caso em comparação a controles, o que foi confirmado ao se validar a expressão deste miRNA, utilizando a técnica padrão ouro de RT-qPCR, e está de acordo com os achados da literatura, no qual a família do miR-320 (320a-3p, 320b, 320c e 320d) foi encontrada superexpressa em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 em comparação a controles saudáveis (84), e no qual a superexpressão de miR-320b foi validada no soro de pacientes falecidos em comparação a sobreviventes da COVID-19 (85). No entanto, mais pesquisas são necessárias a fim de confirmar se este miRNA pode ser usado como um alvo no tratamento da COVID-19 ou como um biomarcador da doença.

6. CONCLUSÃO

Os miRNAs desregulados mais importantes identificados nos 20 artigos selecionados que podem desempenhar um papel fundamental na patogênese do COVID-19 foram miR-21-5p, miR-146a, miR-126-3p, miR-144 e miR-155. Entre esses miRNAs, os miR-21-5p, miR-144 e miR-155 parecem ser potenciais biomarcadores de diagnóstico e o miR-146a parece ser um potencial biomarcador da gravidade da doença. Além disso, os miRNAs podem ser preditores de mortalidade, biomarcadores de estágio/fase e alvos terapêuticos do COVID-19, pois desempenham papéis importantes na replicação viral, proliferação de células infectadas, resposta imune, inflamação, disfunção cardiovascular, hiperativação de micróglia humana, diferenciação osteogênica e remodelação óssea.

Este estudo identificou 18 miRNAs expressos diferencialmente entre pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e controles, que podem ser usados como possíveis biomarcadores da COVID-19 depois de serem validados por RT-qPCR e em um maior número de participantes. Além disso, esses miRNAs e as vias de sinalização identificadas podem ser possíveis alvos para o desenvolvimento de terapias para tratamento da COVID-19.

Este estudo confirmou que o miR-320b permite distinguir entre pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e participantes controles para a população estudada e que, possivelmente, sua maior expressão na COVID-19 está relacionada a um aumento do processo inflamatório. Entretanto, mais estudos são sugeridos no sentido de confirmar o papel do miR-320b como um alvo no tratamento da COVID-19 ou como um biomarcador da doença.

7. REFERÊNCIAS

1. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) [Internet]. [cited 2023 May 30]. Available from: https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_1
2. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. 2020;(January).
3. Lu H, Stratton CW, Tang YW. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J Med Virol.* 2020;92(4):401–2.
4. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 2020;5(4):536–44.
5. Hu, Ben; Guo, Hua; Zhou, Peng; and Shi Z-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. 2019;(December).
6. Wu C, Yin W, Jiang Y, Xu HE. Structure genomics of SARS-CoV-2 and its Omicron variant : drug design templates for COVID-19. 2022;(January).
7. Hassine IH. Covid - 19 vaccines and variants of concern: A review. 2022;(October 2021):1–16.
8. Puhach O, Meyer B, Eckerle I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. *Nat Rev Microbiol.* 2023;21(3):147–61.
9. Shrestha LB, Foster C, Rawlinson W, Tedla N, Bull RA. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: Implications for immune escape and transmission. *Rev Med Virol.* 2022;(July).
10. Zavascki AP, Falci DR, Chen ATC. Clinical Characteristics of Covid-19 in China. *N Engl J Med.* 2020;382(19):1859–62.
11. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020;20(6):363–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
12. Coperchini, Francesca; Chiovato L, Croce LMF and RM. The cytokine storm in COVID-19: An overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;53(January):25–32.
13. CDC. People with Certain Medical Conditions [Internet]. [cited 2023 Jun 1]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html>
14. Xavier, Analucia R. Xavier; Silva, Jonadab S; Almeida JPCL, Conceição, Johnatan Felipe F; Lacerda, Gilmar S; and Kanaan S. COVID-19 : clinical and laboratory manifestations in novel coronavirus infection. 2020;1–9.
15. Chen Y, Guo Y, Pan Y, Joe Z. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV Yun. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;(January).

16. Walls, Alexandra C; Park, Young-Jun; Tortorici, M. Alejandra; Wall, Abigail; McGuire, Andrew T; and Veessler D. Structure , Function , and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* [Internet]. 2020;181(2):281-292.e6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
17. Hoffmann, Markus; Weber, Hannah Kleine; Schroeder, Simon; Kruger, Nadine; Herrler, Tanja; Erichsen, Sandra; Schiergens, Tobias S; Herrler, Georg; Wu, Nai-Huei; Nitsche, Andreas; Muller, Marcel A; Drosten, Christian; and Pohlmann S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. 2020;(January).
18. Chen, Nanshan; Zhou, Min; Dong, Xuan; Qu, Jieming; Gong, Fengyun; Han, Yang; Qiu, Yang; Wang, Jingli; Liu, Ying; Wei, Yuan; Xia, Jia'an; Yu, Ting; Zhang, Xinxin; and Zhang L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China : a descriptive study. 2020;(January).
19. Konig MF, Powell M, Staedtke V, Bai R, Thomas DL, Fischer N, et al. Preventing cytokine storm syndrome in COVID-19 using α -1 adrenergic receptor antagonists. 2020;130(7):3345–7.
20. Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. *Biosens Bioelectron*. 2021;172(January).
21. Maniruzzaman M, Islam, Hazrat; Ali N and S, Maitra. COVID-19 diagnostic methods in developing countries. *Environ Sci Pollut Res* [Internet]. 2022;51384–97. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-21041-z>
22. Nemati M, Jafari A, Ebrahimi Y, Golchin A, Pouya FD, Rezaei-Tavirani M, et al. Laboratory methods: A concise review and update for COVID-19 diagnosis. *Cell Biochem Funct*. 2023;41(4):413–22.
23. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Singh J, Miao X, et al. CRISPR-Cas12 – based detection of SARS-CoV-2. 2022;38(7):870–4.
24. Liu X, Liu C, Liu G, Luo W, Xia N. COVID-19: Progress in diagnostics, therapy and vaccination. *Theranostics*. 2020;10(17):7821–35.
25. Majumder J, Minko T. Recent Developments on Therapeutic and Diagnostic Approaches for COVID-19. *AAPS J*. 2021;23(1).
26. Umakanthan S, Sahu P, Ranade A V., Bukelo MM, Rao JS, Abrahao-Machado LF, et al. Origin, transmission, diagnosis and management of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Postgrad Med J*. 2020;96(1142):753–8.
27. Alsharif W, Qurashi A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. *Radiogr J*. 2020;(January).
28. Forchette L, Sebastian W, Liu T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology , Vaccines , Variants , and Therapeutics. 2021;41(6).
29. FDA. Coronavirus (COVID-19) Drugs [Internet]. [cited 2023 Jun 6].

- Available from: <https://www.fda.gov/drugs/emergency-preparedness-drugs/coronavirus-covid-19-drugs#:~:text=Under section 564 of the,approved product for emergency use.>
30. Ministério da Saúde. Medicamentos aprovados para tratamento da Covid-19 [Internet]. [cited 2023 Jun 6]. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/medicamentos>
 31. Ministério da Saúde. Como se proteger? [Internet]. [cited 2023 Jun 7]. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/como-se-proteger>
 32. Ministério da Saúde. Vacinas - Covid-19 [Internet]. [cited 2023 Jun 7]. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas>
 33. Ministério da Saúde. Comirnaty bivalente (Pfizer) [Internet]. [cited 2023 Jun 15]. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas/comirnaty-bivalente-pfizer>
 34. Graña C, Ghosn L, Evrenoglou T, Jarde A, Minozzi S, Bergman H, et al. Efficacy and safety of COVID-19 vaccines. *Cochrane Database Syst Rev.* 2022;2022(12).
 35. Atlante S, Mongelli A, Barbi V, Martelli F, Farsetti A, Gaetano C. The epigenetic implication in coronavirus infection and therapy. *Clin Epigenetics* [Internet]. 2020;1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13148-020-00946-x>
 36. Foolchand A, Mazaleni S, Ghazi T, Chuturgoon AA. A Review: Highlighting the Links between Epigenetics, COVID-19 Infection, and Vitamin D. *Int J Mol Sci.* 2022;23(20).
 37. Tsai K, Cullen BR. Epigenetic and epitranscriptomic regulation of viral replication. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2020;18(October). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0382-3>
 38. Bhat S, Rishi P, Chadha VD. Understanding the epigenetic mechanisms in SARS CoV-2 infection and potential therapeutic approaches. 2020;(January).
 39. Milavetz, Barry I. and Balakrishnan L. Viral Epigenetics. *Methods Mol Biol.* 2015;569–96.
 40. Kumar S, Szyf M. Epigenetic perspectives of COVID-19 : Virus infection to disease progression and therapeutic control. 2020;(January).
 41. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (80-).* 2001;294(5543):853–8.
 42. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (80-).* 2001;294(5543):862–4.
 43. Baek, Daehyun; Villén, Judit; Shin, Chanseok; Camargo, Fernando D; Gygi, Steven P and Bartel DP. The impact of microRNAs on protein

- output. *Nature*. 2008;
44. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008;455(7209):58–63.
 45. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004;116(2):281–97.
 46. Broughton, James P.; Lovci, Michael T.; Huang, Jessica L.; Yeo, Gene W. and Pasquinelli AE. Pairing Beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell*.
 47. Vasudevan S. Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2012;3(3):311–30.
 48. Lee, Rosalind; Feinbaum, Rhonda; and Ambros V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell*. 2004;116(116):843–54.
 49. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855–62.
 50. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92–105.
 51. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the. *Nature*. 2001;409(2001):363–6.
 52. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*. 2004;16(6):861–5.
 53. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(AUG):1–12.
 54. Jung HJ, Suh Y. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Front Genet*. 2015;5(JAN):1–13.
 55. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem*. 2016;56(11):1733–41.
 56. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(12):5003–8.
 57. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol [Internet]*. 2011;13(4):423–33. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3074610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 58. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al.

- Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(11):4402–7.
59. Correia CN, Nalpas NC, McLoughlin KE, Browne JA, Gordon S V., MacHugh DE, et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers of infectious disease. *Front Immunol*. 2017;8(FEB):1–17.
 60. Barbu MG, Condrat CE, Thompson DC, Bugnar OL, Cretoiu D, Toader OD, et al. MicroRNA Involvement in Signaling Pathways During Viral Infection. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8(March):1–22.
 61. Liang Y, Fang D, Gao X, Deng X, Chen N, Wu J, et al. Circulating microRNAs as emerging regulators of. 2023;13(1).
 62. Guterres A, de Azeredo Lima CH, Miranda RL, Gadelha MR. What is the potential function of microRNAs as biomarkers and therapeutic targets in COVID-19? Vol. 85, *Infection, Genetics and Evolution*. 2020.
 63. Reynoso R, Laufer N, Hackl M, Skalicky S, Monteforte R, Turk G, et al. MicroRNAs differentially present in the plasma of HIV elite controllers reduce HIV infection in vitro. *Sci Rep*. 2014;4:1–9.
 64. Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, et al. Circulating MicroRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog*. 2011;50(2):136–42.
 65. Morán, J; Ramírez, G; Jiménez, L; Cruz, A; Pérez-Patrigeon, S; Hidalgo, A; Orozco, L; Martínez A, Padilla, L; Avila-Moreno, F; Cabello, C; Granados, J; Ortiz-Quintero B; Ramírez-Venegas, A; Ruiz-Palacios, G M; Zlotnik, A; Merino, E; and Zúñiga J. Circulating levels of miR-150 are associated with poorer outcomes of A/H1N1 infection. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.07.001>
 66. Tambyah PA, Sepramaniam S, Ali JM, Chai SC, Swaminathan P, Armugam A, et al. microRNAs in Circulation Are Altered in Response to Influenza A Virus Infection in Humans. 2013;8(10):1–11.
 67. Fayyad-kazan M, Makki R, Skafi N, El M, Badran B. Circulating miRNAs: Potential diagnostic role for coronavirus disease 2019 (COVID-19). 2021;
 68. Garg A, Seeliger B, Derda AA, Xiao K, Gietz A, Scherf K, et al. Circulating cardiovascular microRNAs in critically ill COVID-19 patients. 2020;468–75.
 69. de Gonzalo-Calvo D, Benítez ID, Pinilla L, Carratalá A, Moncusí-Moix A, Gort-Paniello C, Molinero M, González J, Torres G, Bernal M, Pico S, Almansa R, Jorge N, Ortega A, Bustamante-Munguira E, Gómez JM, González-Rivera M, Micheloud D, Ryan P, Martinez A, BF. Circulating microRNA profiles predict the severity of COVID-19 in hospitalized patients. 2021;(October).
 70. Lu D, Chatterjee S, Xiao K, Riedel I, Wang Y, Foo R. MicroRNAs targeting the SARS-CoV-2 entry receptor ACE2 in cardiomyocytes.

- 2020;(January).
71. Wyler E, Mösbauer K, Franke V, Diag A, Gottula LT, Arsiè R, et al. Transcriptomic profiling of SARS-CoV-2 infected human cell lines identifies HSP90 as target for COVID-19 therapy. *iScience*. 2021;24(3).
 72. Falavigna M, Colpani V, Stein C, Pontes Azevedo LC, Bagattini AM, de Brito GV, et al. Guidelines for the pharmacological treatment of COVID-19. The task force/consensus guideline of the Brazilian Association of Intensive Care Medicine, the Brazilian Society of Infectious Diseases and the Brazilian Society of Pulmonology and Tisiology. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2020;32(2):166–96.
 73. NIH. Clinical Spectrum of SARS-CoV-2 Infection [Internet]. [cited 2023 Jun 19]. Available from: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/overview/clinical-spectrum/>
 74. ThermoFisher Scientific. TaqMan Advanced miRNA Assays - USER GUIDE [Internet]. 2016 [cited 2023 Jun 19]. Available from: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2F100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf
 75. Lange T, Stracke S, Rettig R, Lendeckel U, Kuhn J, Schlüter R, et al. Identification of miR-16 as an endogenous reference gene for the normalization of urinary exosomal miRNA expression data from CKD patients. *PLoS One*. 2017;12(8):1–13.
 76. Visacri MB, Nicoletti AS, Pincinato EC, Loren P, Saavedra N, Saavedra K, et al. Role of miRNAs as biomarkers of COVID-19: a scoping review of the status and future directions for research in this field. *Biomark Med*. 2021;15(18):1785–95.
 77. Nicoletti A de S, Visacri MB, da Ronda CR da SC, Vasconcelos PE do NS, Quintanilha JCF, de Souza RN, et al. Differentially expressed plasmatic microRNAs in Brazilian patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19): preliminary results. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2022;49(7):6931–43. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07338-9>
 78. Li C, Hu X, Li L, Li J hui. Differential microRNA expression in the peripheral blood from human patients with COVID-19. *J Clin Lab Anal*. 2020;34(10):3334–40.
 79. Mitchell MI, Ben-Dov IZ, Liu C, Ye K, Chow K, Kramer Y, et al. Extracellular Vesicle Capture by AnTibody of CChoice and Enzymatic Release (EV-CATCHER): A customizable purification assay designed for small-RNA biomarker identification and evaluation of circulating small-EVs. *J Extracell Vesicles*. 2021;10(8).
 80. Sabbatinelli J, Giuliani A, Maticchione G, Latini S, Laprovitera N, Pomponio G, et al. Decreased serum levels of the inflammaging marker

- miR-146a are associated with clinical non-response to tocilizumab in COVID-19 patients. 2020;(January).
81. D'haene B, Mestdagh P, Hellemans J, Vandesompele J. miRNA expression profiling: From reference genes to global mean normalization. *Methods Mol Biol.* 2012;822:261–72.
 82. Mandrekar JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2010;5(9):1315–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181ec173d>
 83. Mak ACY, Sajuthi S, Joo J, Xiao S, Sleiman PM, Lurmann F, et al. Lung Function in African American Children with Asthma Is Associated with Novel Regulatory. *215*(July 2020):869–86.
 84. Kaur S, Bansal R, Kollimuttathuillam S, Manje A. The looming storm: Blood and cytokines in COVID-19. 2020;(January).
 85. Folador E, de Oliveira Junior A, Tiwari S, Jamal S, Ferreira R, Barh D, et al. In Silico Protein-Protein Interactions: Avoiding Data and Method Biases Over Sensitivity and Specificity. *Curr Protein Pept Sci.* 2015;16(8):689–700.
 86. Giannella A, Riccetti S, Sinigaglia A, Piubelli C, Razzaboni E, Battista P Di, et al. Circulating microRNA signatures associated with disease severity and outcome in COVID-19 patients. 2022;(August):1–21.
 87. Giuliani A, Matakchione G, Ramini D, Di Rosa M, Bonfigli A R, Sabbatinelli J, Monsurro V, Recchioni R, Marcheselli F, Marchegiani F, Piacenza F, Cardelli M, Galeazzi R, Pomponio G, Ferrarini A, Gabrielli A, Baroni S S, Moretti M, Sarzani R, Giordano P, Ch A, Olivieri F. Circulating miR-320b and miR-483-5p levels are associated with COVID-19 in-hospital mortality. 2020;(January).

8. ANEXOS



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: miRNAs E POLIMORFISMOS NO RECEPTOR DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA 2 COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE DOENÇA INDUZIDA PELO SARS-CoV-2

Pesquisador: Patricia Moriel

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36041420.0.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital Estadual Sumaré Dr. Leandro Francheschini

Patrocinador Principal: Capes Coordenação Aperf Pessoal Nivel Superior

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.214.696

Apresentação do Projeto:

O parecer inicial é elaborado com base na transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo na Plataforma Brasil e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. Os pareceres de retorno, emendas e notificações são elaborados a partir dos dados e arquivos da última versão apresentada.

Introdução: 1.1 COVID-19 O coronavírus SARS-CoV-2 (Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2), agente causador da COVID-19 (doença coronavírus 2019), se tornou a mais recente emergência mundial, responsável por 619.150 mortes em todo o mundo até o dia 23 de julho de 2020 e um total de 15.012.731 casos confirmados (WHO, 2020c) Dados do Ministério da Saúde informam que o Brasil, na mesma data, soma 1.145.906 casos confirmados e 52.645 mortes por COVID-19 (BRASIL, 2020) O primeiro caso relatado da doença ocorreu em dezembro de 2019, em Wuhan, na China. Acredita-se que a contaminação tenha ocorrido por transmissão zoonótica em um mercado de frutos do mar, que também comercializavam animais selvagens vivos (LU; STRATTON; TANG, 2020). O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA, pertencente ao gênero betacoronavírus, da subfamília Orthocoronavirinae, família Coronaviridae e ordem Nidovirales. Apresenta 79% de similaridade com o SARS-CoV e 98% de similaridade com o coronavírus de morcego, o RaTG13. Dentre as coronaviroses conhecidas, quatro (229E, NL63, OC43 e HKU1) causam infecções no trato respiratório superior e são responsáveis por sintomatologias leves, e

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.214.696

três podem se replicar no trato respiratório inferior e causar pneumonias graves, sendo elas a SARS-CoV, MERS-CoV e a mais recente SARS-CoV-2 (VIRUSES, 2020). Sabe-se até o momento que o vírus pode ser transmitido por inalação de gotículas respiratórias contendo o vírus ou por contato das mãos em superfícies que contêm o vírus e posterior contaminação ao levar as mãos aos olhos, boca e nariz. O tempo de incubação pode variar de 4-5 dias até aproximadamente 11-12 dias e os sintomas incluem febre e tosse seca na maioria dos pacientes, podendo ser acompanhada de dificuldade respiratória, mialgia e/ou artralgia, dor de cabeça, tontura, perda do paladar, náusea e diarreia (GUAN; ZHONG, 2020). Os casos severos de COVID-19 podem progredir para Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), em média entre o oitavo e nono dia após os sintomas iniciais (TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020). O vírus pode induzir uma cascata inflamatória intensa, muitas vezes chamada de “tempestade inflamatória”, o que explica a agressão pulmonar grave, visualizada em imagens de tomografia computadorizada e que induz a formação de microtrombos, resultando em lesões renais e cardíacas, entre outras (COPERCHINI; CHIOVATO; CROCE; MAGRI et al., 2020). O SARS-CoV-2 infecta as células que expressam em suas superfícies os receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e da protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) (CHEN; GUO; PAN; ZHAO, 2020; TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020; WALLS; PARK; TORTORICI; WALL et al., 2020). O receptor de ECA2 é uma glicoproteína transmembrana do tipo 1, composta por 805 aminoácidos e apresenta um único domínio catalítico extracelular que remove um único aminoácido da angiotensina II, formando a angiotensina-(1-7). Este receptor também converte a angiotensina I em angiotensina1-9, que depois se transforma na angiotensina-(1-7) (VICKERS; HALES; KAUSHIK; DICK et al., 2002). É altamente expresso nas células epiteliais do pulmão, onde o vírus é capaz de provocar um grande processo inflamatório (YUKI; FUJIOGI; KOUTSOGIANNAKI, 2020). O primeiro passo no processo de entrada do vírus na célula é a ligação da porção N-terminal da proteína viral, unidade S1, no receptor de ECA2 (HOFFMANN; KLEINE-WEBER; SCHROEDER; KRÜGER et al., 2020). Polimorfismos no gene ECA2 foram documentados primeiramente na população chinesa com três variantes (rs4240157, rs4646155 e rs4830542), associadas com hipertensão (YI; GU; WANG; AN et al., 2006), e um estudo brasileiro demonstrou haver associação entre os polimorfismos ECA2 G8790A (rs2285666) e ECA I/D e hipertensão (PINHEIRO; SANTOS; JARDIM; SILVA et al., 2019). Estes polimorfismos podem alterar o equilíbrio entre ECA1 e ECA2, diminuindo os efeitos biológicos de vasodilatação, proteção vascular e antifibróticos, decorrentes da ação da ECA2 e exacerbando os efeitos de edema, inflamação, lesão tecidual, trombose, fibrose, entre outros, induzidos pela supre-expressão da ECA1 e aumento da concentração de angiotensina II (GEMMATI; BRAMANTI; SERINO;

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

SECCHIERO et al., 2020). Devido à sua grande importância nos mecanismos de infecção pelo SARS-CoV-2 e nos processos de proteção vascular, vasodilatação, entre outros, é possível que polimorfismos no gene ECA2 possam influenciar a susceptibilidade e evolução da COVID-19 (DEVAUX; ROLAIN; RAOULT, 2020). O segundo passo é a clivagem entre as unidades S1 e S2 pela TMPRSS2. Após esta clivagem, a unidade S2 sofre um rearranjo conformacional, que direciona e completa a fusão entre as membranas da célula hospedeira e viral, com consequente entrada do vírus na célula (HOFFMANN; KLEINE-WEBER; SCHROEDER; KRÜGER et al., 2020). Após entrada na célula, a replicação ativa e liberação do vírus fazem com que a célula hospedeira entre em piroptose (morte inflamatória da célula) com liberação de padrões moleculares associados ao dano celular (DAMP), incluindo ATP, ácidos nucleicos e oligômeros ASC (TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020). Estes produtos são reconhecidos por células epiteliais vizinhas, células endoteliais e macrófagos alveolares, desencadeando a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (incluindo IL-6, IP-10, proteína inflamatória 1a de macrófagos (MIP1), MIP1 e MCP1) (TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020). Há ainda um aumento da CXCL10 e CXCL8 (COPERCHINI; CHIOVATO; CROCE; MAGRI et al., 2020). Estas proteínas induzem a migração de monócitos, macrófagos e linfócitos T para o local de infecção, que por sua vez promovem uma inflamação adicional e produção de IFN, estabelecendo um loop de feedback pró-inflamatório (CHEN; ZHOU; DONG; QU et al., 2020; KONIG; POWELL; STAEDTKE; BAI et al., 2020; TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020; XAVIER; SILVA; ALMEIDA; CONCEIÇÃO et al., 2020) Na reposte imune adequada, a inflamação inicial atrai linfócitos T vírus-específicos para o foco da infecção, onde podem eliminar as células contaminadas antes da liberação de novos vírus ao microambiente. Anticorpos neutralizantes nestes indivíduos podem bloquear a infecção viral e macrófagos alveolares reconhecem estas partículas virais ligadas aos anticorpos e, por opsonização, fagocitam e eliminam o vírus, assim como os restos celulares. Por fim, esses processos levam à eliminação mais rápida do vírus, o que diminui os danos causados às células pulmonares e resultam em recuperação do indivíduo (TAY; POH; RÉNIA; MACARY et al., 2020). A maioria dos pacientes sintomáticos desenvolve sintomas leves, no entanto, alguns pacientes podem progredir para doença grave, como pneumonia, síndrome respiratória aguda grave, disfunção múltipla de órgãos e morte (CDC, 2020b). Ainda, idosos e pessoas com comorbidades (ex., diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares) têm maior risco para desenvolver a forma grave da doença (CDC, 2020b). Por outro lado, os neonatos, lactentes e crianças são menos afetados pela COVID-19 (SINGHAL, 2020). Em todo o mundo, estima-se que aproximadamente 5% dos casos confirmados vão a óbito (WHO, 2020b) Muitos estudos estão sendo conduzidos para verificar a eficácia e a segurança de vários tratamentos para

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.214.696

a COVID-19, como azitromicina, lopinavir/ritonavir, remdesivir, ribavirina, interferons, glicocorticoides, plasma convalescente, entre outros. Entretanto, no momento ainda não há nenhum tratamento efetivamente comprovado contra a doença e possíveis vacinas estão sendo desenvolvidas (JEAN; LEE; HSUEH, 2020). Os pacientes com quadros leves são tratados em domicílio e medicados com sintomáticos (ex., antitérmicos). Casos moderados a graves requerem hospitalização para oxigenioterapia, como cateter nasal, ventilação não invasiva e até ventilação mecânica. O tempo médio de hospitalização de um paciente com a COVID-19 é de 10 dias e 25-30% dos pacientes necessitam de admissão em unidade de terapia intensiva (SINGHAL, 2020) com taxa de mortalidade de 42% neste grupo (ARMSTRONG; KANE; COOK, 2020). Desta forma, a medida mais efetiva ainda é a prevenção da COVID-19. Então, a população deve seguir rigorosamente as recomendações das autoridades para diminuir a transmissão do SARS-CoV-2, incluindo distanciamento social, uso de máscaras e higienização das mãos (WHO, 2020a) No estágio inicial da doença, os achados laboratoriais indicam leucocitose ou leucopenia, com linfopenia acentuada, incluindo diminuição importante dos linfócitos T CD4 e CD8. Na medida que a doença avança, pode-se observar redução na concentração de hemoglobina e da albumina sérica, bem como aumento da proteína C reativa, VHS (velocidade de hemossedimentação), TP (tempo de protrombina), ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), LD (lactato desidrogenase), procalcitonina, dímero-D, creatina quinase, ureia e creatinina (XAVIER; SILVA; ALMEIDA; CONCEIÇÃO et al., 2020), porém, estes achados laboratoriais apresentam baixa ou nenhuma sensibilidade diagnóstica para a COVID19. As tomografias computadorizadas (CT) de tórax de pacientes diagnosticados com a COVID-19 mostram opacidades pulmonares em vidro fosco e consolidações, com distribuição predominantemente periférica, por vezes associadas a reticulado fino, espessamento vascular e o sinal do halo invertido e são consideradas confirmatórias para as suspeitas, baseadas nos sinais e sintomas clínicos dos pacientes (CHATE; FONSECA; PASSOS; TELES et al., 2020). Sabe-se que alguns fatores estão associados com o agravamento da doença, como a hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo 2, obesidade, idade, entre outros (CDC, 2020a). Porém, pacientes que apresentam as mesmas condições clínicas podem evoluir de forma diferenciada à COVID-19. Uma possível explicação para esta variação pode estar relacionada com a variação genética dos indivíduos, como a diferente expressão de miRNAs.

1.2 MicroRNAs Os MiRNAs são moléculas pequenas de cadeia simples de RNA formadas por aproximadamente 22 nucleotídeos não codificantes, que participam da regulação pós-transcricional da expressão gênica (LAGOS-QUINTANA; RAUHUT; LENDECKEL; TUSCHL, 2001; LAU;

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.214.696

LIM; WEINSTEIN; BARTEL, 2001; LEE; AMBROS, 2001). A maior parte dos miRNAs se liga complementarmente à região 3' não traduzida (3'-UTR) do RNA mensageiro (mRNA) alvo (BAEK; VILLÉN; SHIN; CAMARGO et al., 2008; MISHRA; HUMENIUK; LONGO-SORBELLO; BANERJEE et al., 2007; SELBACH; SCHWANHÄUSSER; THIERFELDER; FANG et al., 2008), e dependendo da complementariedade dessa ligação, eles podem ocasionar a degradação do mRNA (quando a complementariedade é perfeita) ou inibir a transcrição do mRNA (quando a complementariedade é imperfeita), e conseqüentemente regular a síntese proteica (BARTEL, 2004). No entanto, existem vias não canônicas em que os miRNAs podem se ligar a outras regiões, incluindo a região 5'-UTR, regiões codificantes e (BROUGHTON; LOVCI; HUANG; YEO et al., 2016) Além disso, já se tem conhecimento que miRNAs podem inclusive ativar a expressão de alguns genes (VASUDEVAN, 2012). Desde a sua descoberta em *C. elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; WIGHTMAN; HA; RUVKUN, 1993), os miRNAs vêm sendo estudados frequentemente, com um aumento exponencial de estudos nos últimos anos, destacando o papel dos miRNAs em regular diversas funções celulares. Estimam-se que ao menos 60% dos mRNAs em humanos podem ser regulados por miRNAs, sugerindo que cada miRNA é capaz de regular centenas de mRNAs diferentes (FRIEDMAN; FARH; BURGE; BARTEL, 2009). Em relação à biogênese dos miRNAs, os genes que codificam miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, gerando na maior parte das vezes um miRNA primário (pri-miRNA), composto aproximadamente por 500 a 3000 bases em uma estrutura em forma de grampo. Essa estrutura é a chave para que pri-miRNA gerado seja reconhecido e processado pela ribonuclease (RNase) Drosha, resultando no pré-miRNA, composto por aproximadamente 60 a 70 nucleotídeos. O pré-miRNA é posteriormente translocado do núcleo para o citoplasma por poros nucleares com o auxílio da Exportina-5. No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela Dicer, uma RNase III/endonuclease, e são formadas duas moléculas de RNA (RNA dupla fita). A fita guia do RNA direciona a ligação do complexo proteico Argonauta e auxilia na ligação do complexo de indução do silenciamento do RNA (RISC) ao miRNA (BERNSTEIN; CAUDY; HAMMOND; HANNON, 2001). O complexo RISC, quando ativado, identifica seu sítio de ligação na região 3'-UTR do mRNA alvo (CULLEN, 2004; LAGOS-QUINTANA; RAUHUT; LENDECKEL; TUSCHL, 2001). Também existem vias não canônicas de biogênese de miRNAs, as quais incluem diferentes combinações de outras proteínas com proteínas envolvidas na via canônica, como a Drosha e a Dicer (O'BRIEN; HAYDER; ZAYED; PENG, 2018). Os MiRNAs podem ser encontrados em diversos fluidos biológicos, como urina, plasma, fluido lacrimal, saliva, leite materno, entre outros (WEBER; BAXTER; ZHANG; HUANG et al., 2010), e apesar destes fluidos conterem uma concentração relativamente alta de enzimas capazes de degradar RNA, os miRNAs são bastante estáveis pelo

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

fato de se encontrarem principalmente em vesículas, como os exossomos (CORTEZ; CALIN, 2009; KOSAKA; IGUCHI; OCHIYA, 2010) ou ligados a complexos proteicos como o complexo argonauta e lipoproteínas de alta densidade (ARROYO; CHEVILLET; KROH; RUF et al., 2011; VICKERS; PALMISANO; SHOUCRI; SHAMBUREK et al., 2011). Muitos miRNAs são encontrados em fluidos específicos, enquanto outros podem ser encontrados em vários fluidos diferentes. No que diz respeito a presença de miRNAs específicos, o biofluido que apresenta um espectro mais diferente dos demais é o plasma, provavelmente devido a captação de miRNAs de diferentes tipos celulares circulantes que entram em contato com o sangue. Os fluidos que possuem miRNAs mais distintos entre si são o plasma e a urina (WEBER; BAXTER; ZHANG; HUANG et al., 2010). Pelo fato dos miRNAs serem altamente estáveis nos diversos fluidos extracelulares e devido à sua expressão específica em diferentes tecidos e estados patológicos, os miRNAs circulantes têm sido alvos de investigações como possíveis biomarcadores de algumas doenças e de toxicidades induzidas por medicamentos (WANG; ZHANG; MARZOLF; TROISCH et al., 2009). Em relação a doenças virais, sabe-se, por exemplo, que pacientes contaminados com o vírus da influenza A/H1N1 que super-expressam o miR-150 evoluem para doença severa, quando comparados com pacientes que apresentam sintomas leves da doença (MORÁN; RAMÍREZ-MARTÍNEZ; JIMÉNEZ-ALVAREZ; CRUZ et al., 2015) . Um estudo realizado em Cingapura avaliou as alterações na expressão de miRNAs no sangue total de pacientes infectados com a cepa H1N1 do vírus Influenza A, em comparação com indivíduos saudáveis. Utilizando PCR quantitativo, foram detectados 14 miRNAs altamente desregulados, distinguindo claramente os indivíduos infectados (TAMBYAH; SEPRAMANIAM; MOHAMED ALI; CHAI et al., 2013). A expressão desregulada de alguns miRNAs pode, por exemplo, modular a transcrição e tradução de genes relacionados com os fatores imunomoduladores que podem inibir ou potencializar a resposta inflamatória, bastante acentuada em casos graves de COVID-19. Dessa forma, essas pequenas moléculas de RNA podem funcionar como biomarcadores favoráveis, oferecendo valor diagnóstico promissor e previsão de gravidade da resposta inflamatória para COVID-19 (TAMBYAH; SEPRAMANIAM; MOHAMED ALI; CHAI et al., 2013). Outras pesquisas também reportam possíveis miRNAs sobre a influenza (miR-323, miR-491, miR-485, miR-654, e miR-3145) estes relacionados a região codificadora do gene PB1 da influenza PB1, os quais degradam o RNA e inibem a translocação viral reduzindo assim o acúmulo de partículas virais (TAMBYAH; SEPRAMANIAM; MOHAMED ALI; CHAI et al., 2013). Porém, existem estudos que sugerem que alguns miRNAs podem ter efeito positivo na replicação viral, como por exemplo, o miR-122 para o vírus hepatotrófico, o qual aumenta a estabilidade viral. (KHONGNOMNAN; MAKKOCH; POOMIPAK; POOVORAWAN et al., 2015; MACHLIN; SARNOW; SAGAN, 2011). Na

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

literatura recente, três trabalhos de bioinformática descrevem possíveis miRNAs marcadores de doença e gravidade relacionados a COVID-19 (ARISAN; DART; GRANT; ARISAN et al., 2020; FULZELE; SAHAY; YUSUFU; LEE et al., 2020; SAÇAR DEMIRCI; ADAN, 2020). Como exemplo, os trabalhos de Fulzele S, et al. 2020 e o trabalho de Arisan ED, et al. 2020, que por bioinformática propõem o estudo de 7 miRNAs que podem estar diretamente ligados à gravidade da COVID-19. O estudo de Arisan ED, et al. 2020 propõe o estudos dos miRs 8066, 5197, 3611, 3934-3p, 1307-3p, 3691-3p e 1468-5p; já o de Fulzele S, et al. 2020 propõe o estudos dos miRs miR-15b-5p, miR-15a-5p, miR-548c-5p, miR-548d-5p, miR-409-3p, miR -30b-5p e miR-505-3p (FULZELE; SAHAY; YUSUFU; LEE et al., 2020). Até o momento não existem trabalhos de validação de miRNAs como biomarcadores de gravidade ou de diagnóstico em amostras humanas.

Delineamento da pesquisa: Trata-se de estudo clínico observacional, analítico, de coorte, retrospectivo com amostragem não probabilística consecutiva, em duas etapas distintas. A PRIMEIRA ETAPA compreende estudo observacional, analítico, transversal, com amostragem não probabilística consecutiva, que envolverá 100 indivíduos adultos, pacientes do Hospital Estadual de Sumaré (HES), divididos em dois grupos; grupo Caso (n=50, com teste referência (RT-PCR) positivo para SARS-CoV-2) e grupo controle (n=50 com teste referência (RT-PCR) negativo para SARS-CoV-2). As amostras do primeiro grupo serão obtidas junto à soroteca do HES, as do segundo grupo serão coletadas dos pacientes. A SEGUNDA ETAPA compreende estudo observacional analítico, de coorte, transversal, retrospectivo, de amostragem não probabilística consecutiva, que envolverá 200 indivíduos adultos, pacientes do Hospital Estadual de Sumaré (HES), positivos para SARS-CoV-2 no teste em RT-PCR. Amostras dos participantes da segunda etapa serão obtidas junto à soroteca do HES e dados demográficos, clínicos, sobre os medicamentos utilizados e resultados de exames complementares serão obtidos junto aos prontuários dos pacientes. Assim, o objetivo deste projeto é avaliar miRNAs e polimorfismos no gene da ECA2 como possíveis biomarcadores da COVID-19. O objetivo principal foi dividido em dois objetivos específicos principais. 1) Identificar através de sequenciamento os principais miRNAs plasmáticos que possam ser biomarcadores de diagnóstico da COVID-19; Este é um estudo observacional, analítico, transversal, cuja amostragem é não probabilística do tipo consecutiva. Para identificar miRNAs que possam ser biomarcadores de diagnóstico da COVID-19 (estudo transversal), serão formados dois grupos, grupo Caso (50 pacientes): amostra de sujeitos do Hospital Estadual de Sumaré (HES) que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência [Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR)]; e grupo Controle (50

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.214.696

pacientes): amostra de voluntários que tiveram seu exame negativo para SARS-CoV-2 no teste referência (RT-PCR). Os miRNAs serão extraídos de plasma, utilizando kit comercial, de 6 amostras do grupo Caso e 6 amostras do grupo Controle para realização da montagem da biblioteca, sequenciamento e análise diferencial dos miRNAs expressos. Posteriormente, os miRNAs selecionados serão validados nas demais amostras. 2) Identificar através de sequenciamento os principais miRNAs plasmáticos e polimorfismos no receptor ECA relacionados à gravidade induzidas pela COVID-19; Este é um estudo observacional, analítico, coorte retrospectivo, cuja amostragem é não probabilística do tipo consecutiva. Para identificar miRNAs e polimorfismos no gene da ECA2 que possam ser biomarcadores de gravidade da COVID-19 (coorte retrospectivo), as amostras do grupo Caso (200 pacientes) serão estratificadas pela gravidade da doença (doença leve-moderada e doença grave-crítica) através de parâmetros clínicos e tomografia computadorizada de pulmão. Os miRNAs serão extraídos de 6 amostras de plasma dos pacientes que apresentaram doença leve-moderada e de 6 amostras dos pacientes que apresentaram doença grave-crítica, para posterior montagem da biblioteca, sequenciamento, análise diferencial e validação. O sequenciamento será dividido em dois tempos de coleta: antes de dois dias para verificar algum miRNA preditor de gravidade e após 7 dias para verificar algum miRNA marcador de gravidade. A análise de polimorfismos no gene da ECA2 será feita por RT-PCR. Este estudo só terá início após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP.

Critérios de inclusão: OBJETIVO 1. Critérios de inclusão Sujeitos de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos. Para o grupo Caso, a amostra dos sujeitos de pesquisa que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR). Para o grupo Controle, no momento da coleta não ter nenhum sintoma de COVID-19 e não ter estado em nenhum ambiente que sabidamente tivesse pessoas positivas para COVID-19 nos últimos 15 dias. OBJETIVO 2 Critérios de inclusão Sujeitos de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR).

Critérios de exclusão: OBJETIVO 1. Critérios de exclusão Dados incompletos nos prontuários. Para o grupo Controle as amostras de sujeitos que tiveram seu exame positivo no momento da coleta de sangue para SARS-CoV-2 no teste referência. OBJETIVO 2 Critérios de exclusão Dados incompletos nos prontuários.

MÉTODOS:

Dados comuns aos objetivos específicos:

Local do estudo: A inserção de pacientes no estudo será realizada no Hospital Estadual Sumaré (HES), localizado na cidade de Sumaré, no estado de São Paulo. O HES se trata de um hospital

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

terciário e que presta serviços ao SUS. As amostras serão obtidas a partir da soroteca do Laboratório de Análises Clínicas do HES, a quantidade de amostra necessária para a realização dos experimentos é muito pequena, portanto, é possível conseguir a amostra da soroteca do laboratório.

A coleta de sangue dos pacientes controles, assim como a montagem das bibliotecas e o sequenciamento de miRNAs, assim como ensaios quantitativos de reação em cadeia da polimerase (qPCR), serão realizados no Laboratório de Farmácia Clínica (CliPharm) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da UNICAMP. Os ensaios de RT-PCR para detecção de SARS-CoV-2 e a coleta de amostras de swab serão realizados no Laboratório do Prof. Marcelo Lancellotti da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da UNICAMP (laboratório nível 2). A determinação de vitamina D plasmática será realizada no laboratório de toxicologia do Prof. Dr. José Luís da Costa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da UNICAMP. Aprovação em Comitê de Ética: O estudo será enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP.

Grupos de estudo: No total serão 200 amostras do grupo Caso (sujeitos de pesquisa que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR)) e 50 amostras para o grupo Controle (sujeitos que tiveram seu exame negativo para SARS-CoV-2 no teste referência). A divisão destas amostras por objetivo está demonstrada na figura 3.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Identificar miRNAs plasmáticos que possam ser biomarcadores de diagnóstico da covid-19

Desenho de estudo: Este é um estudo observacional, analítico, transversal, cuja amostragem é não probabilística do tipo consecutiva.

Grupos do estudo: Serão realizados dos grupos a saber: grupo Caso (amostra de 50 sujeitos de pesquisa que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR)) e grupo Controle (amostra de 50 sujeitos que tiveram seu exame negativo para SARS-CoV-2 no teste referência).

As amostras do grupo Casos serão obtidas da soroteca do Laboratório de Análises Clínicas do HES; para as amostras do grupo Controle será realizado convite a comunidade UNICAMP para sujeitos que gostariam de se voluntariar para pesquisa, será aplicado o TCLE para o grupo controle. Este convite será realizado para pessoas que já estejam trabalhando presencialmente na UNICAMP, com isso eles não irão se deslocar para ir até a UNICAMP para fazer a coleta, eles já estarão na UNICAMP e facilmente podem se deslocar de seu local de trabalho para o local da coleta (FCF/UNICAMP); recomendamos que o deslocamento seja feito a pé, ou em automóvel próprio. Em

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

relação ao contato com o pesquisador para apresentação do projeto e assinatura do TCLE, este poderá ocorrer por telefone ou por meios eletrônicos. No momento da coleta o sujeito da pesquisa assina o TCLE. O contato deste com os pesquisadores só será no momento das coletas onde os pesquisadores estarão equipados com todos os EPIs recomendados para tal (luvas, máscara n95, faceshield e avental descartável), o sujeito deverá estar de máscara, só retirando a mesma no momento da coleta do swab. Portanto, entendemos que não há previsão de ressarcimento pelo deslocamento, pois ele será mínimo dentro da UNICAMP.

Critérios de inclusão e exclusão: Critérios de inclusão Sujeitos de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos. Para o grupo Caso, a amostra dos sujeitos de pesquisa que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR). Para o grupo Controle, no momento da coleta não ter nenhum sintoma de COVID-19 e não ter estado em nenhum ambiente que sabidamente tivesse pessoas positivas para COVID-19 nos últimos 15 dias. Critérios de exclusão: Dados incompletos nos prontuários. Para o grupo Controle as amostras de sujeitos que tiveram seu exame positivo no momento da coleta de sangue para SARS-CoV-2 no teste referência.

Caracterização dos pacientes: Serão coletados dados demográficos, incluindo identificação do sujeito, idade, sexo e cor da pele. Serão coletados também dados referentes, estado civil, presença de comorbidades.

Coleta e separação de plasma para os experimentos laboratoriais: Serão necessários 300 uL de plasma dos sujeitos de pesquisa para determinação de miRNA. Para o grupo Caso, as amostras serão obtidas da soroteca do HES. Para o grupo Controle, será coletado um tubo de 4 mL de sangue contendo EDTA (etilenodiamino-tetracético) como anticoagulante. O sangue coletado será centrifugado a 2.500 rpm, 4°C por 10 minutos. O plasma será aliquotado e armazenado em freezer -80°C até a realização dos experimentos.

Gostaria de salientar que a manipulação de sangue total ou plasma de pacientes em infecção ativa de SARS-CoV-2, até o momento, parece ser segura aos manipuladores. A revisão sistemática realizada por Andersson M, et al. 2020, demonstrou que o RNA viral foi detectado em um número muito pequeno de amostras de sangue de pacientes com infecção ativa e nos que foram detectados existia uma baixa concentração de RNA viral, mas que este, pelos estudos não era infectante (ANDERSSON; CARCAMO; AUCKLAND; BAILLIE, 2020).

Para o grupo Controle também será necessário realizar a coleta de swab nasal para determinação da presença de SARS-CoV-2 por RT-PCR, todo procedimento será realizado em laboratório de nível 2.

Reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa (RTPCR) para

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

Detecção de SARS-CoV-2: O RNAv será extraído das amostras dos pacientes controles, utilizando-se kit comercial PureLink® Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen by Life Technologies, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Depois de extraído o RNA será estocado a -70°C ou imediatamente submetido a RT-PCR.

A RT-PCR será conduzida com emprego do kit comercial Superscript® (Invitrogen by Life Technologies, EUA). As reações de RT-PCR serão realizadas em um volume final de 25 µL contendo 5,0 µL de RNA viral, 6,0 µL de H₂O livre de DNase e RNase, 12,5 µL de PCR Master Mix (2x), 0,5 µL de Forward Primer 50 µM, 0,5 µL de Reverse Primer 50 µM, e 0,5 µL de Super Script IIITM One-Step RT-PCR System with Platinum Taq. Na amplificação a mistura será submetida a 48°C por 30 min, 95°C por 10 min, seguida por 45 ciclos de PCR cada um composto de 95o C por 15 s e 60o C por 1 min. Todas as etapas da reação serão realizadas na plataforma Applied Biosystems7500 Real-Time PCR. Cada conjunto de amostras submetido à amplificação será acompanhado de um controle negativo e um controle positivo.

miRNAs: Extração dos miRNAs Para realização do sequenciamento e análise diferencial dos miRNAs expressos serão extraídos os miRNAs de amostras de plasma de 6 pacientes positivos e de 6 pacientes negativos para SARS-CoV-2. As extrações dos miRNAs para sequenciamento e validação serão realizadas utilizando o miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Cat No. /ID: 217184). Serão adicionados 200 µL de cada amostra em 1 mL de QIAzol e incubados em temperatura ambiente por 5 minutos após homogeneização. Nesta etapa, serão adicionadas 3x10⁷ cópias do controle exógeno (spike-in) cel-miR-39 para normalização das amostras utilizadas para validação. Este miRNA será sintetizado pela Integrated DNA Technologies (IDT), atentando-se para fosforilação na região 5' para o spike-in ser compatível com TaqMan™ Advanced miRNA Assays que utilizamos para validação por qPCR. Após adição do controle, 200 µL de clorofórmio serão adicionados na amostra, a qual será homogeneizada e incubada por 3 minutos a temperatura ambiente. Logo após, será realizada a primeira centrifugação a 13.000 rcf por 15 minutos a 4C. A seguir, a fase aquosa será retirada e transferida para um novo tubo com 1,5 vezes seu volume em etanol 100%. Após homogeneização, será transferido todo volume da amostra para coluna de eluição e a mesma será centrifugada a 13.000 rcf por 15 segundos à temperatura ambiente. Após eluição de toda amostra, 700 µL de tampão RWT serão adicionados a coluna, a qual será centrifugada novamente a 13.000 rcf por 15 segundos à temperatura ambiente para retirada dos possíveis restos celulares presentes na amostra. Desta vez, serão adicionados 700 µL de tampão RPE (para retirada de possíveis fragmentos de DNA que ainda estiverem presentes na amostra) e centrifugado novamente nas mesmas condições, passo este repetido por mais uma vez e seguido

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

da adição de 500 µL de etanol 80% à coluna. A mesma será centrifugada a 13.000g por 2 minutos à temperatura ambiente e logo após centrifugada novamente por 5 minutos a velocidade máxima a fim de secar a coluna por completo. Por fim, a coluna de eluição será transferida para novo tubo e onde serão adicionados 14 µL de água livre de RNase. Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, a coluna será centrifugada por 1 minuto em velocidade máxima para eluição de todo miRNA contido no filtro. Após secagem do filtro, a coluna será então descartada e o tubo com os miRNAs extraídos será armazenado em freezer - 80 °C até a realização das próximas etapas.

Sequenciamento dos miRNAs: Após a extração dos miRNAs conforme descrito no item anterior, será realizada a montagem das bibliotecas para posterior sequenciamento. A Figura 3 mostra as etapas necessárias para análise dos miRNAs por sequenciamento.

A montagem das bibliotecas de miRNAs será realizada utilizando o QIAseq™ miRNA Library Kit (Qiagen, Cat No./ID: 331502). A montagem das bibliotecas se baseia na ligação de adaptadores nos grupos hidroxil 3' e fosfato 5' dos miRNAs maduros, permitindo a transcrição reversa através de primers específicos, contendo Identificadores Únicos Moleculares (UMI), que se ligam na região do adaptador 3'. Em seguida é realizada a limpeza do cDNA através da adsorção do DNA em esferas magnéticas na presença de álcool. Após a limpeza, é realizada a amplificação da biblioteca através do pareamento de primers forward, ligados a identificadores específicos para cada amostra, e de um primer reverso universal. Por fim é feita uma limpeza da biblioteca utilizando novamente esferas magnéticas. A Figura 4 mostra todas as etapas realizadas durante a montagem das bibliotecas.

Será realizado o controle de qualidade das bibliotecas antes do sequenciamento através da análise do tamanho das mesmas pelo 4200 TapeStation Instrument (Agilent Technologies) e da concentração (em ng/µL) pelo Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific). A molaridade de cada biblioteca será calculada segundo a equação $(X \text{ ng}/\mu\text{L})(106)/(112450) = Y \text{ nM}$ e as bibliotecas serão então diluídas para 4 nM para realização do sequenciamento. O sequenciamento em si será realizado utilizando o MiSeq Reagent Kit v3, 150- cycle (Illumina, MS-102-3001). Será utilizado um kit para cada 8 amostras (total 4 kits), gerando uma quantidade de 2.000.000 a 5.000.000 leituras por amostras, número adequado para análise de sequenciamento de miRNAs. A análise do sequenciamento será realizada através do GeneGlobe Data Analysis Center (Qiagen). Será utilizado o método DESeq2 para normalização. DESeq2 se trata de um método para testar a expressão diferencial através de modelo linear generalizado com distribuição binomial negativa. O próprio GeneGlobe software nos fornece o Fold-change (FC = expressão

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

grupo caso/ expressão grupo controle), o Fold-Regulation ($FR = FC$ quando $FC = 1$ e $FR = 1/FC$, quando $FC < 1$), e o p valor, calculado com base no teste de Wald.

Análise in silico dos potenciais alvos dos miRNAs identificados no seqüenciamento: Serão selecionados para análise in silico os miRNAs plasmáticos diferentemente expressos com $FR > 2,5$ ou $FR < -2,5$. Para a identificação de potenciais genes alvos preditos desses miRNAs, será utilizado o miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uniheidelberg.de/mirwalk2>) 177. O miRWalk nos fornece os alvos preditos de acordo com 12 bases de dados diferentes, incluindo o TargetScan (www.targetscan.org) 178. Serão selecionados para as análises posteriores apenas os genes alvos preditos pelo TargetScan e por no mínimo 5 bases de dados diferentes.

A fim de visualizar a integração conjunta dos diferentes miRNAs e seus genes alvos, serão construídas matrizes. Após ordenadas essas matrizes de acordo com os genes preditos por mais miRNAs diferentes, serão selecionados todos genes preditos por no mínimo 2 miRNAs diferentes para realizar uma análise de enriquecimento não supervisionada pelo software Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, Qiagen bioinformatics) a fim de identificar as principais vias de sinalização canônicas nas quais os miRNAs diferentemente expressos estão envolvidos.

Validação dos miRNAs selecionados: Neste momento as amostras serão cegadas para o pesquisador responsável por executar e interpretar as análises. O cegamento será realizado pela coordenadora do projeto. Serão selecionados até 3 miRNAs de plasma diferentemente expressos que apresentaram um $FR > 5,0$ ou $FR < -5,0$ e valor de $p < 0,05$. Após a extração dos miRNAs conforme descrito, será realizada a síntese de cDNA utilizando o TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Cat No. /ID: A28007) e a qPCR utilizando o TaqMan™ Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems, Cat No./ID:A25576). Além dos miRNAs selecionados para validação, também será realizada a qPCR do controle exógeno cel-miR-39 e do controle endógeno hsa-miR-16 para normalização. A análise dos miRNAs será feita através do QuantStudio™ Real Time PCR Software 6. As expressões relativas dos miRNAs serão obtidas através do método 2-CT 181, onde $CT = CT_{miR\ candidato} - CT_{cel-miR-39}$ e $CT = CT - médiaCTs$ dos pacientes controle.

Metodologia de análise de dados: As frequências dos dados clínicos/demográficos e caracterização da gravidade serão apresentadas com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%) e medidas descritivas (média, desvio padrão). A análise estatística será feita utilizando o Statistics Program for Social Science for Windows (SPSS® 16.0, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Para dados paramétricos será utilizado o teste t Student. Para dados não paramétricos será utilizado o teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Para comparar as frequências das variáveis

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.214.696

qualitativas será realizado o teste de qui-quadrado ou Exato de Fisher. Análises de regressão logística/linear poderão ser realizadas de acordo com a necessidade. O nível de significância adotado para o estudo será de 5%. Será realizado o cálculo da força da amostragem ao final do estudo.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Identificar através de sequenciamento os principais miRNAs plasmáticos e polimorfismos no gene do receptor ECA relacionados à gravidade induzidas pela COVID-19.

Desenho de estudo: Este é um estudo observacional, analítico, coorte retrospectivo, cuja amostragem é não probabilística do tipo consecutiva.

Critérios de inclusão: Sujeitos de ambos os sexos, entre 18 e 80 anos que tiveram seu exame para SARSCoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR).

Critérios de exclusão: Dados incompletos nos prontuários.

Caracterização dos pacientes: Serão coletados de 200 pacientes dados demográficos, incluindo identificação do sujeito, idade, sexo e cor da pele. Serão coletados também dados referentes a estado civil e presença de comorbidades nos prontuários. Serão avaliados nos prontuários os medicamentos utilizados durante a internação e possíveis eventos adversos a estes, como também, os resultados de exames laboratoriais e exames de imagem (tomografia) para posterior relação com a gravidade e com os miRNAs.

Obtenção do plasma para os experimentos laboratoriais: Serão necessários 300 uL de plasma dos sujeitos de pesquisa para determinação de miRNA. As amostras serão obtidas da soroteca do HES em dois momentos da internação do paciente, nos primeiros dois dias e após 7 dias de internação. O plasma será armazenado em freezer -80°C até a realização dos experimentos. Gostaria de salientar que a manipulação de sangue total ou plasma de pacientes em infecção ativa de SARS-CoV-2, até o momento, parece ser segura aos manipuladores. A revisão sistemática realizada por Andersson M, et al. 2020, demonstrou que o RNA viral foi detectado em um número muito pequeno de amostras de sangue de pacientes com infecção ativa e nos que foram detectados existia uma baixa concentração de RNA viral, mas que este, pelos estudos não era infectante (ANDERSSON; CARCAMO; AUCKLAND; BAILLIE, 2020).

Avaliação da gravidade: Para as análises de relação da gravidade da infecção causada pela COVID-19 com os polimorfismos e miRNAs os pacientes serão separados em grupos dependendo da gravidade apresentada durante a internação. A gravidade será classificada segundo quadro 1.

Metodologia radiologia: De forma rotineira, todo paciente com diagnóstico confirmado ou suspeito de Covid-19 realiza uma tomografia de tórax de alta resolução no momento da internação. Este

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.214.696

exame de rotina será usado para avaliar a extensão da lesão pulmonar e correlacioná-la com os achados de miRNAs. A extensão da lesão pulmonar será avaliada seguindo a mesma metodologia utilizada por Francone M, et al. 2020, (FRANCONE; IAFRATE; MASCI; COCO et al., 2020) na qual: 1. Os aspectos radiológicos de vidro-fosco, pavimentação em mosaico e consolidação seguem o glossário da Fleischner Society (HANSELL; BANKIER; MACMAHON; MCLOUD et al., 2008). 2. Uma pontuação semi-quantitativa da gravidade da TC proposta será calculada para cada um dos 5 lobos, considerando a extensão do envolvimento anatômico: 0, nenhum envolvimento; 1, envolvimento 75% de envolvimento. A pontuação global da TC resultante será a soma de cada pontuação lobar individual, variando de 0 a 25 como resultado final (PAN; YE; SUN; GUI et al., 2020). Quando presentes, também serão descritas características relacionadas a fibrose, linhas subpleurais, “sinal de halo” invertido, derrame pleural e linfadenopatia. 3. A distribuição da lesão também será descrita entre: predominantemente periférica, central ou ambas; além de anterior e posterior (ZHOU; WANG; ZHU; XIA, 2020).

Determinação de vitamina D plasmática: Serão utilizados 200 uL de plasma para detecção de vitamina D (25-OH-Vit D2 e 25-OH-Vit D3). A determinação será realizada por HPLC-MS-MS seguindo a metodologia descrita por Garg U, et al. 2012 (GARG; MUNAR; FRAZEE; SCOTT, 2012).

miRNAs, Extração dos miRNAs: Para realização do sequenciamento e análise diferencial dos miRNAs expressos serão extraídos os miRNAs de amostras de plasma de 6 pacientes que apresentaram gravidade de leve a moderada e de 6 pacientes que apresentaram gravidade grave ou crítica para COVID-19. O sequenciamento será dividido nos dois tempos de coleta, o primeiro tempo (antes dos dois dias) para verificar algum miRNA preditor de gravidade e após 7 dias algum miRNA marcador de gravidade. As extrações dos miRNAs para sequenciamento e validação, assim como as análises de sequenciamento, validação e análise in silico dos potenciais alvos dos miRNAs identificados no sequenciamento serão realizadas conforme já descrito anteriormente no projeto no item 3.2.

Análise das Variantes Genéticas (polimorfismos na ECA): A pesquisa de variantes genéticas será realizada pelo sistema de genotipagem TaqMan® Genotyping Assays [Life Technologies (Foster City, CANA)]. A genotipagem dos pacientes para as variantes genéticas na ACE1DD-genotype (rs4646994, rs1799752, rs4340, rs13447447) e ACE28790 A-allele (rs2285666), serão realizados através da técnica de PCR em tempo real (qPCR) utilizando os ensaios TaqMan® Genotyping (Thermo Fisher Scientific Inc., Foster City, Califórnia, EUA). A reação de PCR será realizada em um aparelho de sistema StepOnePlus® (AppliedBiosystems®, Foster City, CA, EUA) utilizando um volume de 5 L por poço, consistindo em 2,5 L de TaqMan® GTXpres™ Master Mix (2), 25 L

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

de TaqMan genotyping assay mix (20) e 1,0 L de DNA (10 ng) diluídos em água livre de nuclease (1,25 L). O ensaio de qPCR terá fase inicial de 20 segundos a 95°C, seguida de 40 ciclos de 3 segundos a 95°C e 20 segundos a 60°C. A precisão da genotipagem será avaliada por análise em duplicata de 20% das amostras selecionadas aleatoriamente e, além disso, serão incluídas amostras de controle em cada experimento.

Análise estatística: As frequências dos dados clínicos/demográficos e caracterização da gravidade serão apresentadas com valores de frequência absoluta (n) e percentual (%) e medidas descritivas (média, desvio padrão). A análise estatística será feita utilizando o Statistics Program for Social Science for Windows (SPSS® 16.0, SPSS Inc, Chicago, IL, EUA). Para dados paramétricos será utilizado o teste t Student. Para dados não paramétricos será utilizado o teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Para comparar as frequências das variáveis qualitativas será realizado o teste de qui-quadrado ou Exato de Fisher. Análises de regressão logística/linear poderão ser realizadas de acordo com a necessidade. O nível de significância adotado para o estudo será de 5%. Será realizado o cálculo da força da amostragem ao final do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Justificativa: Acredita-se que este estudo contribuirá para o melhor entendimento da gravidade causadas pela COVID-19. Reconhecer antecipadamente qual paciente poderá ter um quadro mais grave da COVID-19 é importante para o direcionamento precoce de cuidados e para melhorar a estratégia do tratamento. A identificação de biomarcadores mais sensíveis e específicos de gravidade, assim como possível marcador de doença (diagnóstico mais sensível e específico) permitirá o melhor controle da mesma na prática clínica, e conseqüentemente, melhorando o tratamento. Por fim, o trabalho também contribuirá para a caracterização das gravidades geradas pela COVID-19 em pacientes com a doença, fornecendo informações importantes para a personalização terapêutica.

Hipótese: Nossas principais hipóteses são: que a COVID-19 induz a expressão diferencial de alguns miRNAs específicos dependendo da gravidade da doença; que a presença/ausência de polimorfismos na ECA2 estarão relacionadas a gravidade da doença; que o SARS-CoV-2 induz a expressão diferencial de alguns miRNAs específicos que só existirão na presença deste.

Objetivo primário: Avaliar miRNAs e polimorfismos no gene do receptor da ECA2 como possíveis biomarcadores de doença induzida pelo COVID-19.

Objetivos secundários: Objetivos específicos comuns • Caracterizar os pacientes em relação à idade, sexo, peso, altura, etnia, estado civil, tabagismo/etilismo, presença de comorbidades; e dados referentes a evolução da doença; • Caracterizar os pacientes em relação aos medicamentos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

utilizados; • Determinar a concentração de vitamina D plasmática.

Objetivo específico 1 • Identificar através de sequenciamento os principais miRNAs plasmáticos que possam ser biomarcadores de diagnóstico da COVID-19; • Realizar análise in silico dos miRNAs identificados pelo sequenciamento a fim de visualizar as vias de sinalização nas quais os miRNAs atuam e a integração entre os miRNAs e seus genes alvos envolvidos no diagnóstico da COVID-19 • Validar a expressão dos miRNAs plasmáticos como diagnóstico diferentemente expressos selecionados pelo sequenciamento. Objetivo específico 2 • Identificar através de sequenciamento os principais miRNAs plasmáticos e polimorfismos no receptor ECA relacionados à gravidade induzidas pela COVID-19; • Caracterizar os sujeitos em relação à gravidade da doença COVID-19; • Realizar análise in silico dos miRNAs identificados pelo sequenciamento a fim de visualizar as vias de sinalização nas quais os miRNAs atuam e a integração entre os miRNAs e seus genes alvos envolvidos na gravidade da COVID-19; • Avaliar polimorfismos no receptor ECA e sua relação com a gravidade da doença; • Validar a expressão dos miRNAs plasmáticos diferentemente expressos selecionados pelo sequenciamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores informaram quanto aos riscos e desconfortos previstos para os participantes da pesquisa que “Para o grupo Caso não existe risco relativo à coleta de amostras uma vez que estas serão obtidas da soroteca; Para o grupo Controle existe o risco do desconforto no momento da coleta do swab nasal e da coleta de sangue. Na coleta de sangue o braço poderá ficar roxo após coleta”.

Os pesquisadores informaram quanto aos benefícios diretos previstos para os participantes da pesquisa que “O benefício é indireto para os sujeitos, uma vez que os mesmo não se beneficiarão diretamente com os resultados. O benefício para a sociedade é claro, uma vez que os testes diagnósticos ainda são limitados, ou por sensibilidade ou por tempo que se pode ser coletado os exames, assim se a hipótese do trabalho for respondida poderemos ter um exame diagnóstico mais sensível e preciso; e ainda poderemos entender, e talvez prever por biomarcadores, o risco do indivíduo positivo evoluir pra quadros mais graves”.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A EQUIPE DE PESQUISADORES citada na capa do protocolo e na PB (em ordem alfabética, exceto a pesquisadora responsável) inclui PATRÍCIA MORIEL (Graduada em Farmácia, Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF-UNICAMP, Pesquisadora Responsável), ALINE DE SOUZA NICOLETTI (Graduada em Farmácia, Doutoranda no PPG em Farmacologia da FCM-UNICAMP), CARLA REGINA DA SILVA CORREA DA RONDA (Graduada em Farmácia e Bioquímica, Doutoranda no

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

PPG em Ciências Farmacêuticas da FCF/UNICAMP), EDER DE CARVALHO PINCINATO (Graduado em Farmácia e Bioquímica, Pesquisador colaborador da FCF-UNICAMP), JOSÉ LUIZ DA COSTA (Graduado em Farmácia e Bioquímica, Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF-UNICAMP), LAIR ZAMBON (Médico, Docente do Departamento de Clínica Médica da FCM-UNICAMP), LILIAN FERREIRA DE SOUZA SILVA (Enfermeira, Supervisora da Unidade de Terapia Intensiva Adulto no Hospital Estadual Sumaré – SP), MARCELO LANCELOTI (Graduado em Ciências Biológicas, Docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCF-UNICAMP), MARÍLIA BERLOFA VISACRI (Graduada em Farmácia, Pós-doutoranda na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - FCF-UNICAMP) e MAURÍCIO WESLEY PERROUD JUNIOR (Médico, Docente do Departamento de Clínica Médica da FCM-UNICAMP).

O orçamento descrito na PB informa que a pesquisa terá custo de R\$ 68.500,00 para aquisição de material de consumo, material para testes e coleta de amostras e para processamento de amostras e será bancado pela “Capes - Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” como patrocinador Institucional Principal, conforme registrado na PB.

A pesquisa foi classificada na Grande Área 4 (Ciências da Saúde) e tem como título público “miRNAs E POLIMORFISMOS NO RECEPTOR DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA 2 COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE DOENÇA INDUZIDA PELO SARS-CoV-2”.

A pesquisa não foi classificada nas áreas temáticas especiais, mas envolve COVID-19 e foi avaliada conforme as recomendações específicas da CONEP para esta temática.

A Instituição proponente da pesquisa é o Hospital Estadual Sumaré Dr. Leandro Francheschini – HES e não foi listada Instituição Coparticipante.

O cronograma proposto no projeto informa início da pesquisa em 10/08/2020, o término em 01/08/2022, e prevê cerca de 24 meses para conclusão da pesquisa. O cronograma descrito na PB indica que a pesquisa será iniciada em 10/08/2020 e será concluída em 01/08/2022, em cerca de 24 meses.

Foi informado que haverá uso de fontes secundárias de dados (prontuários, dados demográficos, etc), sob a seguinte descrição: “Serão avaliados nos prontuários os medicamentos utilizados durante a internação e possíveis eventos adversos a estes, como também, os resultados de exames laboratoriais e exames de imagem (tomografia) para posterior relação com a gravidade e com os miRNAs”.

Foi solicitada a dispensa da obtenção do consentimento e aplicação de TCLE aos participantes/pacientes do grupo caso, sob a seguinte justificativa: “Solicitamos a dispensa para o grupo Caso. Foi solicitado dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), pois o

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

contato com estes pacientes ou responsáveis legais é restrito: por isolamento de contato do paciente dentro da instituição ou por isolamento de contato dos familiares por serem comunicantes; devido à taxa de mortalidade entre pacientes internados, é esperado que cerca de 40% dos pacientes tenham ido a óbito no momento da coleta de dados. Além disso, a exposição dos investigadores ao ambiente de internação ou ao contato com os familiares, implicaria em risco de infecção para os mesmos. A dispensa do TCLE é solicitada uma vez que as amostras serão obtidas a partir da soroteca do Laboratório de Análises Clínicas do HES, a quantidade de amostra necessária para a realização dos experimentos é muito pequena, portanto, é possível conseguir a amostra da soroteca do laboratório”. Destaca-se que será aplicado TCLE aos participantes do grupo controle.

Serão elaboradas duas teses de DOUTORADO a partir dos resultados deste protocolo:

1) Doutoranda: Ms. Aline de Souza Nicoletti Doutoranda do Programa de Farmacologia da FCM/UNICAMP Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Moriel Título do projeto: MICRORNAS CIRCULANTES COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE DOENÇA INDUZIDA PELO SARS-CoV-2.

2) Doutoranda: Ms. Carla Regina da Silva Correa Da Ronda Doutoranda do Programa de Ciências Farmacêuticas da FCF/UNICAMP Orientadora: Profa. Dra. Patricia Moriel Título do projeto de doutorado: POLIMORFISMOS NO GENE DO RECEPTOR DA ECA2 COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE DOENÇA INDUZIDA PELO COVID-19.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos e blocos de informação utilizados para elaboração do parecer foram:

Registro do protocolo na Plataforma Brasil: Arquivo “PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1600977.pdf” de 13/08/2020.

Carta resposta ao parecer: Arquivo “respostafinal.pdf” de 13/08/2020.

Projeto de pesquisa: Arquivo “projetofinal.pdf” de 13/08/2020.

Modelo ajustado de TCLE a ser aplicado ao grupo controle: Arquivo “TCLEcontroles.pdf” de 13/08/2020.

Modelo de TCLE a ser aplicado ao grupo Caso: Arquivo “TCLEcaso.pdf” de 13/08/2020.

Regulamento de Biorrepositório para a pesquisa: Arquivo “Biorepositorio_covid_final.pdf” de 13/08/2020.

Autorização para acesso às amostras do Laboratório de Patologia Clínica do HES: Arquivo “carta_anuencia.pdf” de 13/08/2020.

Foi reapresentada a Folha de Rosto do protocolo: Arquivo “folha_rosto_cep_covid003.pdf” de 28/07/2020. A FR foi apresentada preenchida (250 participantes) e assinada pela pesquisadora

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

responsável (Dra. Patrícia Moriel) e pela Diretora Técnica do Hospital Estadual Sumaré Dr. Leandro Francheschini de Sumaré – SP (Dra. Maria Isabel Higasi Narvion) e cita a CAPES como patrocinador institucional principal.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há mais pendências por resolver:

Pendência 1 (atendida em 13/08/2020)– Quanto à caracterização da amostra nas duas etapas da pesquisa os pesquisadores informaram que “Sim, existe superposição. Serão envolvidos um total 250 participantes, sendo 50 sujeitos no grupo Controle e 200 sujeitos no grupo Caso. Para objetivo 1 ser cumprido existe a necessidade de 50 sujeitos do grupo Caso, que serão os primeiros sujeitos do grupo Caso incluídos no estudo; para o objetivo 2 ser cumprido há necessidade de 200 sujeitos (os 50 sujeitos do objetivo 1 também fazem parte deste grupo). Para facilitar o entendimento foi acrescentado no projeto: Grupos de estudo No total serão 200 amostras do grupo Caso (sujeitos de pesquisa que tiveram seu exame para SARS-CoV-2 positivo no teste referência (RT-PCR)) e 50 amostras para o grupo Controle (sujeitos que tiveram seu exame negativo para SARS-CoV-2 no teste referência). A divisão destas amostras por objetivo está demonstrada na figura 3”.

Pendência 2 (atendida em 13/08/2020)– Quanto à questão da aplicação do TCLE ao grupo caso, os pesquisadores informaram que “Diante do exposto pelo assessor vamos apresentar o TCLE também para o grupo Caso, como sugerido “por meios eletrônicos (e-mail, whatsapp, formulários eletrônicos, etc.) ou ligação gravada”. O TCLE para o grupo caso foi acrescentado no projeto”.

Pendência 3 (atendida em 13/08/2020)– Quanto ao modo esperado de movimentação dos participantes do grupo controle os pesquisadores informaram que “Como escrito no projeto, para inclusão dos sujeitos de pesquisa do grupo Controle, será realizado convite a comunidade UNICAMP para recrutar possíveis voluntários; este convite será realizado para pessoas que já estejam trabalhando presencialmente na UNICAMP, muitos alunos de pós-graduação, docentes e funcionários tem vindo rotineiramente ao Campus, com isso eles não irão se deslocar para a UNICAMP para fazer a coleta, eles já estarão na UNICAMP e facilmente podem se deslocar de seu local de trabalho para o local da coleta (FCF/UNICAMP). Recomendamos que o deslocamento seja feito a pé, ou em automóvel próprio. Em relação ao contato com o pesquisador para apresentação do projeto e assinatura do TCLE, este poderá ocorrer por telefone ou por meios eletrônicos. No momento da coleta o sujeito da pesquisa assina o TCLE. O contato deste com os pesquisadores só será no momento das coletas onde os pesquisadores estarão equipados com todos os EPIs recomendados para tal (luvas, máscara n95, faceshield e avental descartável), o sujeito deverá

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

estar de máscara, só retirando a mesma no momento da coleta do swab. Portanto, entendemos que não há previsão de ressarcimento pelo deslocamento, pois ele será mínimo dentro da UNICAMP. Em relação aos riscos e desconfortos, acrescentamos que o deslocamento do sujeito dentro do campus UNICAMP deverá seguir todas as normatizações publicadas pela reitoria da universidade para minimizar a possibilidade da contaminação pelo SARS-CoV-2, que qualquer deslocamento pode gerar risco de contaminação, mas se for seguindo as normas da UNICAMP o risco é mínimo. Foi incluída essa explicação no projeto, na plataforma e no TCLE”.

Pendência 4 (atendida em 13/08/2020)– Quando à descrição de desconforto e risco para os participantes do grupo controle os pesquisadores informaram que “O texto foi reescrito e inserido no TCLE com maior detalhamento: A coleta de sangue é um procedimento invasivo, que rotineiramente é realizada em qualquer exame de sangue e que provavelmente o senhor já deve ter realizado. No momento da coleta será colocado um garrote em seu braço, o qual faz uma leve pressão e pode causar algum desconforto; após colocação do garrote o local onde será inserida a agulha será limpo com álcool, no momento em que a agulha é inserida pode ocasionar uma dor no local, passageira. Nesse momento o tudo de sangue é inserido e a amostra é coletada. Algumas pessoas podem sentir, durante o procedimento, tontura e queda de pressão relacionada principalmente ao medo do procedimento, caso haja desmaio, o profissional que está fazendo coleta é treinado para dar o suporte necessário até o paciente retomar a consciência. Após retirada da agulha e do garrote é colocado curativo, que para algumas pessoas pode dar alergia, recomenda-se a retirada do mesmo após 30 minutos. Ainda poderá ter hematoma local, que irá desaparecer em alguns dias. A coleta será realizada por profissional qualificado e você está assegurado de acompanhamento e tratamento médico dentro do Hospital Estadual Sumaré (HES), caso ocorra algum problema relacionado ao procedimento da coleta de sangue. A coleta de swab de nasofaringe (SNF) e swab de orofaringe (SOF) será realizada exclusivamente com swab de Rayon (de haste plástica). Para a coleta de swab de nasofaringe, o swab será retirado de seu envelope apenas na hora da coleta. O participante da pesquisa irá se sentar em uma cadeira e irá inclinar a cabeça para trás. O swab será introduzido no nariz até encostar na região posterior do meato nasal (no fundo do nariz) e será friccionado para obtenção de células da mucosa. Neste momento, pode haver pequeno desconforto e dor momentânea, desaparecendo minutos após o procedimento. Após o procedimento, o swab é retirado e acondicionado em um frasco contendo solução salina. Para a coleta de swab de orofaringe, o swab será retirado de seu envelope apenas na hora da coleta. O participante da pesquisa irá se sentar em uma cadeira e irá inclinar um pouco a cabeça para trás e abrirá a boca. O swab será introduzido na boca até a região posterior da

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

faringe e tonsilas (no fundo da boca), evitando tocar na língua. Neste momento, pode haver pequeno desconforto, dor e náusea momentânea, desaparecendo minutos após o procedimento. O swab será friccionado para obtenção de células da mucosa, depois será retirado e acondicionado em um frasco contendo solução salina”.

Pendência 5 (atendida em 13/08/2020)– Quanto à possibilidade de que eventuais amostras do grupo controle resultem positivas para SARS-CoV-2 os pesquisadores informaram que “Caso o resultado do participante do grupo controle seja positivo, uma vez que os sujeitos são da comunidade UNICAMP, iremos informá-lo sobre todas as recomendações relativas ao seu isolamento e prevenção de contágio de outras pessoas e orientá-lo a procurar o CECOM. Também daremos a informação ao CECOM para convocar o participante para teste confirmatório oficial da Universidade. Essa informação foi acrescentada no TCLE”.

Pendência 6 (atendida em 13/08/2020)– Os dados do pesquisador ÉDER foram atualizados na capa do projeto de pesquisa.

Pendência 7 (atendida em 13/08/2020)– Os dados da pesquisadora ALINE foram atualizados na capa do projeto de pesquisa.

Pendência 8 (atendida em 13/08/2020)– Os dados da pesquisadora CARLA foram atualizados na capa do projeto de pesquisa.

Pendência 9 (atendida em 13/08/2020)– Os cronogramas descritos no projeto de pesquisa e na PB foram harmonizados quanto à duração (24 meses).

Pendência 10 (atendida em 13/08/2020)- Foi apresentado o regulamento de Biorrepositório para a pesquisa: O material biológico (DNA extraído provenientes de sangue e plasma) será armazenado em equipamentos de congelação (freezers -20C e -80C) específicos e utilizados somente para este fim, localizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas, na Universidade Estadual de Campinas. As amostras serão codificadas apenas por números e a chave de ligação entre números e nomes dos indivíduos será armazenada em programa de computador protegido por senha. O material biológico condicionado em tubos próprios e os dados clínicos a ele correspondente (idade, sexo, raça e número de registro no Hospital Estadual de Sumaré) dispostos em planilhas pertinentes, acompanhados dos respectivos Termos de Consentimento dos pacientes, serão transferidos e mantidos no Biorrepositório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. O material biológico humano dos pacientes será armazenado durante todo o período da pesquisa, do momento da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa até o momento da defesa da tese de doutorado que é a origem deste projeto e 10 anos após o término do doutorado para a publicação de artigos científicos relacionados ao tema da tese. O material será mantido em Biorrepositório por

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

10 anos após o término do doutorado para a publicação de artigos científicos relacionados ao tema da tese mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e, após este período, será descartado.

Pendência 11 (atendida em 13/08/20)– Foi apresentada a anuência da responsável pela soroteca do HES com o uso das amostras, assinada pela Dra Adriana Eguti, Supervisora do Laboratório de Patologia Clínica do HES.

Pendência 12 (atendida em 13/08/20)– O item da PB “Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?” foi assinalado como “Sim”.

Pendência 13 (atendida em 13/08/20)– Foi apresentado o modelo ajustado de TCLE a ser aplicado aos participantes/pacientes negativos para SARS-CoV-2.

Pendência 14 (atendida em 13/08/20)– Foi apresentado o modelo de TCLE a ser aplicado aos participantes ou responsáveis pelos participantes do grupo caso.

Pendência 15 (atendida em 13/08/20)– Foi informado que o estudo será utilizado como tese de doutorado de duas pesquisadoras, devidamente identificadas, conforme pode ser visto ao final do bloco de texto do item “comentários e considerações sobre a pesquisa” acima.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.214.696

e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.

- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais semestrais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1600977.pdf	13/08/2020 10:17:50		Aceito
Outros	respostafinal.pdf	13/08/2020 10:17:07	Patricia Moriel	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCcontroles.pdf	13/08/2020 10:16:00	Patricia Moriel	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCcaso.pdf	13/08/2020 08:37:39	Patricia Moriel	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetofinal.pdf	13/08/2020 08:35:51	Patricia Moriel	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio_covid_final.pdf	13/08/2020 08:30:53	Patricia Moriel	Aceito
Declaração de concordância	carta_anuencia.pdf	13/08/2020 08:30:30	Patricia Moriel	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_cep_covid003.pdf	28/07/2020 15:20:49	Patricia Moriel	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.214.696

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 15 de Agosto de 2020

Assinado por:

**Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

**COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA****PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DO VÍRUS SARS-CoV-2 EM FLUIDOS CORPORAIS E AR ESPIRADO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROTEÇÃO CRUZADA DO BCG

Pesquisador: Leonardo Oliveira Reis

Área Temática: A critério do CEP

Versão: 4

CAAE: 31049320.7.1001.5404

Instituição Proponente: SAO PAULO SECRETARIA DA SAUDE

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.173.069

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1564546_E1.pdf, de 17/07/2020).

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019 surgiu uma pneumonia inexplicável em um grupo de pessoas em Wuhan na China, o qual posteriormente resultou na identificação de um novo coronavírus nomeado de SARS-CoV-2, o qual atualmente originou a pandemia de COVID-19 (Zhu et al., 2020). SARS-CoV-2 é o nome oficial dado ao novo coronavírus, que significa "Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2" (no português, Síndrome Respiratória Aguda Grave de Coronavírus 2) que recebeu essa nomenclatura por possuir grande semelhança com o vírus SARS-CoV, agente causador da epidemia de SARS, em 2002. A doença causada por SARS-CoV-2 foi nomeada de COVID-19, que quer dizer "Coronavirus Disease 2019" (Doença do Coronavírus 2019, em português), uma forma encontrada para se referir à condição sintomática de forma simplificada. O panorama epidemiológico mundial descreve 1.282.931 casos confirmados na data de 07/04/2020, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS). No que tange o perfil no Brasil, no momento existem 11.130 casos diagnosticados com 486 mortes (World Health Organization, 2020). Por ser um vírus de rápida propagação e a maioria dos casos primários serem oriundos de áreas endêmicas, uma

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

das propostas para diminuir sua propagação foi o fechamento de fronteiras, redução das escalas de voos, isolamento social, fechamento de escolas, interrupção fabricas e comércios de produtos não essenciais, promovendo um impacto direto na economia nacional e mundial. O impacto da pandemia já se estende para a uma crise econômica mundial, sendo esperado para o ano de 2020 uma redução de meio ponto percentual do produto interno bruto mundial, passando de 2,9 para 2,4% (Gupta et al., 2020). Em relação às estratégias de prevenção e controle da disseminação na atual pandemia viral, incluem-se medidas comportamentais básicas para população em geral como distanciamento adequado, cobrir tosse e espirros com tecidos descartáveis, higienização adequada das mãos com água, sabão e se disponível, álcool 70% líquido ou gel. O uso da máscara facial descartável é recomendado para paciente sintomáticos ou indivíduos que estão em contato com os já citados. Cuidados mais cautelosos e específicos são destinados somente a profissionais da saúde que entrarão em contato direto com casos diagnosticados ou que irão manejar a via aérea de pacientes suspeitos (Adhikari et al., 2020; World Health Organization, 2020). Já é estabelecido que a transmissão do vírus se dá por meio de gotículas e aerossóis, no entanto, o mesmo pode ser encontrado em outros fluidos corporais e ar expirado que ainda estão sendo foco de estudos e podem ter um grande potencial de transmissibilidade (Wang et al., 2020). O método diagnóstico recomendado atualmente se baseia na detecção do RNA viral através da técnica molecular “Reverse transcription polymerase chain reaction” (no português, Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa - RT-PCR) nas amostras de material biológico colhido por suabe de naso ou orofaringe.

Esse método apresenta significativas limitações relacionadas a fatores como: coleta inadequada da amostra, tipo de amostra biológica, tempo decorrido entre a coleta e o início dos sintomas, e oscilação da carga viral, podendo culminar em resultados falsos negativos ou inviabilização do uso da amostra para teste. Portanto, sempre que houver discordância com o quadro clínico epidemiológico, o exame deve ser repetido em outra amostra do trato respiratório, o que pode onerar o processo diagnóstico (Wang et al., 2020).

Metabolômica e inteligência artificial.

Em paralelo aos desafios envolvendo o diagnóstico diferencial de doenças virais, a metabolômica, vem ganhando destaque e tem sido utilizada na detecção rápida de moléculas que se modificam ou certificam um processo, estado ou doença. A metabolômica é uma estratégia utilizada no estudo de pequenas moléculas provenientes do perfil metabólico de células, tecidos ou fluidos, que auxiliam na caracterização de determinado fenótipo. Tais moléculas, denominadas biomarcadores, são fundamentais na prática clínica para a determinação do estado de uma doença

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

(Goldansaz et al., 2017). Dessa forma, a metabolômica tem auxiliado na identificação de biomarcadores com potencial de diagnóstico e descrição de vias metabólicas nas mais diversas situações clínicas, incluindo aquelas envolvendo patógenos virais e bacterianos (Lima et al., 2015; Rees et al., 2016; Voge et al., 2016; Melo et al., 2017; Melo et al., 2018a; Byers et al., 2019; Van Oort et al., 2019), e mais especificamente vírus causadores de doenças respiratórias como Influenza (Chandler et al., 2016; Banoei et al., 2017) e SARS (Wu et al., 2017). Em estudo desenvolvido por Wu et al. (2017), pacientes recuperados de síndrome respiratória aguda grave causada por coronavírus (SARSCoV) foram recrutados após 12 anos de infecção para avaliação metabolômica das consequências da doença. A comparação do soro dos pacientes com indivíduos saudáveis demonstrou diferenças em ácido orgânicos, aminoácidos, fosfolípidos e derivados de carnitina e inositol (Wu et al., 2017). Tais resultados exemplificam a aplicação prática da metabolômica na avaliação de desfechos a longo prazo. A espectrometria de massas é uma das ferramentas analíticas comumente empregadas em metabolômica para a definição do perfil molecular das amostras. Essa técnica baseia-se na detecção de moléculas ionizadas as quais são traduzidas em espectros de intensidade (abundância) versus razão massa sobre carga (m/z), fornecendo informações químicas altamente específicas que estão diretamente relacionadas com a estrutura química das moléculas (Gross, 2006). Para a análise de tais metabólitos emprega-se comparações estatísticas dos espectros de moléculas obtidos pela análise por espectrometria de massas para as amostras caso e controle. Dentre os métodos estatísticos para a validação experimental encontram-se a análise multivariada por Análise de Componentes Principais (PCA, Principal Component Analysis) e a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA, Partial Least Squares Discriminant Analysis). Tais ferramentas permitem determinar um perfil químico que descreva a disfunção em estudo. Portanto, o conjunto dessas diferenças podem ser transcritos em um padrão para o reconhecimento de uma doença ou processo (Scalbert et al., 2014). Estudos recentes tem demonstrado que a associação da espectrometria de massas com a inteligência artificial (Machine Learning, ML) aplicada a metabolômica vantajosa para a determinação de biomarcadores e consequente diagnóstico de doenças como câncer (Murata et al., 2019), Parkinson (Glaab et al., 2019) e Alzheimer (Huan et al., 2018), incluindo trabalhos desenvolvidos pelo grupo para a predição de ganho de peso (Dias-Audibert et al., 2020) e diagnóstico de Zika vírus (Melo et al., 2018b). Algoritmos matemáticos de ML podem ser divididos em não-supervisionados (onde conhece-se pouco ou quase nada do resultado esperados) e supervisionados (onde há um resultado esperado e/ou conhecido). As abordagens por ML permitem a comparação de uma maior quantidade de dados de grupo de amostras gerados por

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

espectrometria de massas, em comparação com a análise estatística multivariada (Breiman, 2001; Kourou et al., 2015). Não obstante, também com o uso de inteligência artificial pretende-se desenvolver metodologias rápidas e diretas e que requeiram poucos recursos, como é o caso do método diagnóstico desenvolvido para ZIKV, o qual envolve conceitos de metabolômica e Machine Learning; tal modelo apresenta a capacidade de prever e se auto-otimizar conforme novos dados são imputados, garantindo que o método se torne constantemente atualizado e com resposta rápida na detecção de SARS-Cov-2.1.3-Exposição ao BCG e proteção cruzada inicialmente formulada para combate à tuberculose, o bacilo Calmette Guérin (BCG), uma vacina viva atenuada, é uma antiga ferramenta que ainda não foi completamente elucidada, eficaz tanto no tratamento do carcinoma de bexiga não musculo invasivo (CBNMI) há 40 anos, como, de forma menos específica, para diminuir infecções agudas de origem bacteriana e viral (Hollm-Delgado et al, 2014; Pettenati e Ingersoll, 2018). Os mecanismos ativados pela vacinação BCG são complexos, envolvendo ao menos duas respostas: células T específicas do antígeno e memória (imunidade adaptativa clássica), e imunidade “treinada” (reprogramação epigenética) mediada pelas células imunes inatas (Kleinnijenhuis et al. 2012; Arts et al., 2018), resultando em maior produção de citocinas pró-inflamatórias (Arts et al., 2016; Hegarty et al., 2020). Essa reprogramação possivelmente ocorre através receptor NOD2 ao nível de metilação da histona (H3K4me3; H3K9me3), induzindo alterações conformacionais persistentes da cromatina em célula mononuclear e exibindo um fenótipo duradouro após vacinação e com capacidade de mediar proteção inespecífica (cruzada) contra outras infecções, levando a uma resposta imune robusta mais rápida comparada a adaptativa (Kleinnijenhuis et al. 2012; Arts et al., 2016). Assim, considerando que a exposição prévia ao BCG (“BCG priming effect”) melhora respostas dos anticorpos, como por exemplo, à vacina contra a gripe pandêmica A (H1N1) de 2009 (Leentjens et al, 2015), ao agente *C. albicans* (Kleinnijenhuis et al., 2014), ao vírus da febre amarela (Arts et al., 2018), dentre tantos outros agentes (Netea et al., 2016), existe potencial do BCG contra SARS-CoV2, visto que a menor incidência e taxa de mortalidade por COVID-19 se apresentou em países com amplo programa de vacinação nacional com BCG (Arts et al., 2018; Aaron et al, 2020; Hegarty et al., 2020).

HIPÓTESE

Meios alternativos de disseminação do vírus SARS-CoV-2 podem colocar em xeque as ações atuais de prevenção e controle de disseminação da pandemia da COVID-19, além de implicações em exposições de profissionais da saúde.- O diagnóstico laboratorial da COVID-19 é feito a partir de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

RT-PCR em tempo real, em swab de naso ou orofaringe, com risco significativo de falso negativo, de modo que um único resultado não detectado para SARS-CoV-2 não exclui o diagnóstico da COVID-19.

Persistência de SARS-CoV-2 em fluidos corporais por tempo maior do que aquele passível de identificação por RT-PCR do swabe de naso- ou orofaringe, dificulta a determinação de pacientes recuperados e livres de disseminação da doença (Chen et al., 2020).

Efeitos não-específicos do BCG causados devido à reprogramação epigenética dos monócitos pode resultar em maior produção de citocinas pró-inflamatórias, conferindo imunidade inata (treinada) e proteção contra infecções virais, inclusive SARS-CoV-2 (Arts et al., 2018; Miller et al., 2020).

METODOLOGIA

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), até 500 pacientes diagnosticados com COVID-19 no Hospital Estadual de Sumaré/SP, Unicamp, serão avaliados e acompanhados.

Cada paciente poderá ser submetido a até 2 coletas de fluidos corporais em momentos diferentes: T0 (inicial – entrada do paciente) e T1 (final - na alta do paciente) para melhor entendimento da eventual variação na eliminação de vírus ao longo da evolução clínica. Os fluidos coletados (soro, plasma, urina, sêmen, swab urogenital e anal e ar expirado) serão avaliados através da análise metabólica. Não haverá interferência no tratamento dos pacientes que seguirá protocolo institucional ou protocolo de pesquisa quando for o caso. Dos 500 pacientes diagnosticados com COVID-19, 300 pacientes serão avaliados quando ao potencial de resposta anti-BCG conferir ou não impacto na eliminação de vírus, na soroconversão (IgA, IgM, IgG anti SARS-CoV-2) e na evolução da doença, randomizados 1:1 para receber:

- a) Grupo BCG: 150 pacientes, receberão “boost” de 0,1 ml de vacina liofilizada, viva e atenuada (BCG cepa Moreau) intradérmica contendo entre 2 e 8 x 10⁵ C.F.U em dose única;
- b) Grupo placebo: 150 pacientes, receberão apenas solução fisiológica 0,9% no mesmo volume da vacina de BCG em dose única.

Os pacientes randomizados para placebo terão seu contato prévio à vacinação com BCG ou exposição ao M. tuberculosis detectada através do teste Interferon Gama Release Assay (IGRA) em sangue periférico para detecção da concentração de IFN- contra BCG, o mesmo utilizado para correlação com resultados de análise metabólica.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

- a) Caso confirmado de doença pelo coronavírus 2019 (COVID-19) laboratorial ou clínico-epidemiológico:
- laboratorial: caso suspeito ou provável com resultado de exame positivo em RT-PCR em tempo real, pelo protocolo Charité ou equivalente;
 - clínico-epidemiológico: caso suspeito ou provável com histórico de contato próximo ou domiciliar com caso confirmado laboratorialmente por COVID-19, que apresente febre ou pelo menos um dos sinais ou sintomas respiratórios, nos últimos 14 dias após o contato, e para o qual não foi possível realizar a investigação laboratorial específica.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- a) Não aceitar participação ou não assinatura TCLE;
- b) Casos suspeitos ou prováveis.
- c) Imunosuprimidos de qualquer natureza.
- d) Gestantes.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Avaliar as diversas formas de disseminação potencial e oportunidades diagnósticas e prognósticas através da análise dos diversos fluídos corporais e ar expirado, correlacionando os mesmos com as diversas apresentações e evoluções clínicas em pacientes diagnosticados com COVID-19, considerando o impacto da exposição ao bacilo Calmette Guérin (BCG), com avaliação do potencial de proteção cruzada do BCG.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Os riscos envolvidos na participação desse estudo são mínimos, pois não há interferência no seu tratamento padrão. Adicionalmente, a grande parte destas coletas é feita rotineiramente como parte do seu tratamento e monitoramento, de modo que os desconfortos serão também mínimos, uma vez que o material coletado habitualmente poderá fornecer amostra para este estudo sem prejuízo à sua saúde.

A vacina de BCG aplicada no braço é semelhante a aplicada em você quando era criança, e cuja reação adversa normal consiste em processo inflamatório cutâneo autolimitado de pequena duração. Os efeitos adversos (em neonatos) geralmente são decorrentes do tipo de cepa utilizada,

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

da quantidade de bacilos atenuados administrada, da técnica de aplicação e da presença de imunodepressão congênita ou adquirida. Eles são classificados dependendo de localização, extensão e gravidade da seguinte forma:

1) Lesões locais e regionais:

- a) úlcera com diâmetro maior que 1cm;
- b) abscesso subcutâneo frio;
- c) abscesso subcutâneo quente;
- d) linfadenopatia regional supurada;
- e) cicatriz quelóide;
- f) reação lupóide.

A úlcera com diâmetro maior que 1cm (item a), abscesso (itens b e c) e linfadenopatia regional supurada (item d) são decorrentes, na maioria dos casos, de técnica incorreta na aplicação da vacina. Neste estudo, os profissionais designados para aplicação da vacina possuem experiência e, portanto, a aplicação da técnica é realizada da forma mais correta possível.

2) Lesões resultantes de disseminação (extremamente raras):

- a) lesões localizadas em pele; osteoarticulares; em linfonodos; em um único órgão.
- b) lesões generalizadas, acometendo mais de um órgão.

Todas as reações adversas que podem ocorrer serão acompanhadas pelo médico responsável por seu protocolo clínico dentro do Hospital Estadual de Sumaré (UNICAMP) ou Hospital Municipal de Paulínia e, portanto, terá toda assistência para que estes afeitos adversos sejam extinguidos.

BENEFÍCIOS

Ao participar deste trabalho, por meio das informações clínicas fornecidas e dos exames coletados, estará proporcionando novas descobertas em relação ao COVID-19, possivelmente auxiliando na melhoria dos métodos diagnósticos, e avanço no conhecimento das formas de transmissão e disseminação do vírus.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo nacional, multicêntrico, prospectivo e randomizado.

Braços:

- (1) Placebo;
- (2) Vacina BCG;

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

Financiamento: CAPES.

Número de participantes de pesquisa: 800.

Participarão os seguintes centros de pesquisa no Brasil: Secretária de Saúde de São Paulo (Centro coordenador) e Centro de Saúde da Comunidade da UNICAMP (CECOM); - Hospital Estadual Sumaré, HES -UNICAMP; Instituto de Infectologia Emílio Ribas-SP; Hospital das Clínicas Ribeirão Preto-USP; Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP, UNESP; Hospital São Paulo-Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP; Hospital Municipal de Paulínia-SP, Brasil; Sociedade Campineira de Educação e Instrução.

Amostras de soro, plasma, urina, sêmen, suabe urogenital e anal e ar expirado, serão coletadas e armazenadas à -30oC até envio de alíquota para o Laboratório Inovare de Biomarcadores para análise metabólica.

Previsão de início do estudo: 16/08/2020.

Previsão de encerramento do estudo: 16/08/2023.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de análise de respostas ao parecer pendente nº 4.165.144 emitido pela Conep em 21/07/2020.

Vide itens 1.c, 1.d, 1.e, 1.f e 1.g:

1. Quanto ao projeto Detalhado referente ao arquivo "COVID_BCG_boost_27_04_2020.pdf" postado na Plataforma Brasil em 27/04/2020:

1.1. Quanto a metodologia do estudo, solicita-se apresentar:

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

a) Plano de acompanhamento e análise de eventos adversos, com o sistema de notação e critérios de avaliação empregados;

RESPOSTA: O sistema de notação e critérios de avaliação empregados foram adicionados ao projeto: “Todos os eventos adversos ocorridos no decorrer deste estudo serão analisados pelo “Comitê Independente de Monitoramento de Segurança” e tratados conjuntamente pelos pesquisadores responsáveis até sua resolução ou estabilização. Eventos adversos provocados pela vacinação com BCG serão notados/avaliados utilizando como critério a presença de lesões locais/regionais (úlceras com diâmetros maiores que 1cm de diâmetro), abscesso subcutâneo, linfadenopatia regional supurada, cicatrizes/reações lupóides ou em casos mais raros, lesões presentes na pele e em linfonodos, lesões osteoarticulares ou presentes em um ou mais órgãos. Os eventos adversos serão classificados com base no escore abaixo: escore 1: eventos leves (pápula, ulceração leve, linfadenopatia leve); escore 2: eventos severos locais (abscesso subcutâneo, cicatriz quelóide, linfadenite supurada, linfadenopatia supurada e reação lupóide); escore 3: eventos severos sistêmicos (lesões cutâneas, lesões osteoarticulares e disseminação sistêmica do BCG); Scores 2 e 3 serão notificados ao CONEP, à Anvisa e ao patrocinador (Capes).”.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

b) Compromisso formal de encaminhamento dos eventos adversos graves para a Conep em até 24 horas (submissão de notificação via Plataforma Brasil);

RESPOSTA: Compromisso formal de encaminhamento dos eventos adversos graves foram adicionados ao projeto: “Todos os eventos adversos em decorrência do uso da vacina de BCG, serão tratados na instituição sede e equipe de pesquisa até sua resolução ou estabilização. Em caso de evento adverso grave, o patrocinador e o investigador notificarão em até 24 horas à CONEP e à Anvisa e descreverão as medidas adotadas no Formulário para notificação de Eventos Adversos Graves (EAG's) em Ensaios Clínicos com Dispositivos Médicos disponível no link: http://formsus.datasus.gov.br/site/formulario.php?id_aplicacao=28308” ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

c) Comitê Independente de Monitoramento de Segurança, com a descrição de sua composição e o plano de atividades;

RESPOSTA: Apesar do estudo em questão se caracterizar como ensaio clínico fase III, visto se tratar da vacina BCG já registrada (registro 101660017) junto à Anvisa e de uso no Sistema Único de Saúde há mais de 40 anos, aplicada por via intradérmica e no mesmo volume e concentração

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

utilizado usualmente em posto de saúde e clínicas particulares, o monitoramento de segurança se fará a partir de “Comitês Independentes de Monitoramento de Segurança” composto por ao menos 3 médicos infectologistas da instituição sede que receberá e aprovará todos os relatórios médicos colhidos no T0, T1, T2, T3 e T4, assim como acompanhará qualquer evento adverso descrito até sua resolução, conforme Diretrizes Operacionais para o Estabelecimento e o Funcionamento de Comitês de Monitoramento de Dados e de Segurança.

ANÁLISE: PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. Cabe lembrar que, para manter o caráter de independência deste Comitê, seus membros não devem estar vinculados às instituições participantes (Diretrizes Operacionais para o Estabelecimento e o Funcionamento de Comitês de Monitoramento de Dados e de Segurança / Ministério da Saúde, Organização Mundial da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008);

RESPOSTA: “Apesar do estudo em questão se caracterizar como ensaio clínico fase III, visto se tratar da vacina BCG já registrada (registro 101660017) junto à Anvisa e de uso no Sistema Único de Saúde há mais de 40 anos, aplicada por via intradérmica e no mesmo volume e concentração utilizado usualmente em posto de saúde e clínicas particulares, o monitoramento de segurança se fará a partir de “Comitês Independentes de Monitoramento de Segurança” composto por ao MENOS 3 MÉDICOS INFECTOLOGISTAS NÃO VINCULADOS ÀS INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES que receberão e aprovarão todos os relatórios médicos colhidos no T0, T1, T2, T3 e T4, assim como acompanharão qualquer evento adverso descrito até sua resolução, conforme Diretrizes Operacionais para o Estabelecimento e o Funcionamento de Comitês de Monitoramento de Dados e de Segurança”.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

d) Justificativa do tamanho amostral;

RESPOSTA: O n amostral de 600 pacientes é representativo da população para o estudo mecanístico do uso de BCG junto a pacientes COVID-19 e justificado pelo n entre 200-500 (fase II) e >600 contido nas fases III.

ANÁLISE: PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. Tais critérios devem constar no protocolo, com detalhes do racional estatístico do cálculo e em item específico para justificativa do tamanho amostral.

RESPOSTA: “Determinação do tamanho amostral com base na estimativa da proporção populacional.

A determinação do tamanho da amostra irá utilizar o método de Amostragem Aleatória Simples (AAS), no qual seleciona-se sequencialmente cada unidade amostral (paciente) com igual

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

probabilidade, de tal forma que cada amostra tenha a mesma chance de ser escolhida dentro do universo amostral de pacientes diagnosticados com COVID-19. O parâmetro de interesse é a proporção de pessoas que entram em óbito devido a COVID-19.

$n = \frac{Z^2 \cdot p \cdot q}{e^2}$ Onde n = número de indivíduos na amostra; Z = valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado; p = proporção populacional de indivíduos que pertence a categoria que estamos interessados em estudar; q = proporção populacional de indivíduos que não pertence à categoria que estamos interessados em estudar ($q = 1 - p$); e = margem de erro. Identifica a diferença máxima entre a proporção amostral e a verdadeira proporção populacional.

A equação é multiplicada por 2, devido a presença de dois grupos, um grupo de controle e um grupo experimental. O grau de confiança definido para este estudo foi de 95%, correspondendo a um valor crítico de $Z = 1,96$. As estimativas p e q são obtidas através de pesquisas anteriores da instituição sede (Hospital das Clínicas da Unicamp) que evidenciam uma proporção de óbitos devido a COVID de 4%. A margem de erro foi definida como uma variação de $\pm 20\%$ em relação a proporção p ($[0,046; 0,034]$), portanto a margem de erro será de $\pm 0,006$. $n = \frac{1,96^2 \cdot 0,04 \cdot 0,96}{0,0002^2} = 376,32$ $n = 752,64$ Devemos, portanto, obter uma amostra de ao menos 753 pacientes de COVID-19, selecionadas aleatoriamente nos dois grupos (controle e experimental), para que tenhamos 95% de confiança de que a proporção amostral difira em menos 0,04 da verdadeira proporção populacional p . Assim considerando os cálculos com dados Covid-19/Brasil/Unicamp mais recentes (amostra de 753 pacientes), o n representativo final será de 800 pacientes (>600 contido na fase III) visto que há perda de seguimento.” Foi adicionado ao protocolo no item 5.11- Determinação do tamanho amostral.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

e) Critérios para interrupção do estudo;

RESPOSTA: Análise interina que define benefício ou malefício inequívocos e ocorrência de eventos adversos sérios (sistêmicos) repetidos.

ANÁLISE: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. Tais critérios devem constar no protocolo com melhor detalhamento e em item específico.

RESPOSTA: “O pesquisador deve descontinuar o estudo (interrupção do mesmo) somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou e frente as reações adversas graves frequentes decorrentes da vacina com desfechos: óbito; evento adverso potencialmente fatal (risco imediato de morte devido ao evento adverso ocorrido); incapacidade/invalidez persistente ou significativa; que exige internação hospitalar do paciente ou prolonga internação preexistente

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

devido ao efeito adverso;" Foi adicionado ao protocolo no item 5.8- Critérios para interrupção do estudo;
ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

f) Critérios para interrupção do tratamento experimental nos participantes; RESPOSTA: Desistência do paciente em continuar participando da pesquisa ou ocorrência de eventos adversos sérios (sistêmicos). ANÁLISE: PENDÊNCIA PARCIALMENTE ATENDIDA. Tais critérios devem constar no protocolo com melhor detalhamento e em item específico.

RESPOSTA: "A interrupção do tratamento experimental nos participantes será em decorrência de eventos adversos graves baseados nos:

A. Escores de severidade: escore 2: eventos locais como abscesso subcutâneo, cicatriz quelóide, linfadenite supurada e reação lupóide; ou escore 3: eventos sistêmicos como lesões cutâneas, lesões osteoarticulares e disseminação sistêmica do BCG;

B. Resultados de análises interinas que comprovem baixa eficácia do tratamento;

C. Desistência do participante em continuar o tratamento experimental;"

Foi adicionado ao protocolo no tem 5.9- Critérios para interrupção do tratamento experimental nos participantes.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

g) Análise interina e critérios para interrupção do estudo.

RESPOSTA: Identificação de benefício ou malefício inequívocos na análise interina.

ANÁLISE: PENDÊNCIA NÃO ATENDIDA. Tais critérios devem constar no protocolo com melhor detalhamento e em item específico.

RESPOSTA: "A análise interina será realizada por um estatístico independente que analisará os dados gerados nos grupos placebo e BCG anualmente (com início ao final do primeiro ano de seguimento do estudo, data está de publicação dos dados parciais apresentados no cronograma - meses Agosto/Setembro de 2021/2022/2023). Os dados serão gerados por análises prévias de caracterização imunológica e carga viral das amostras obtidas dos pacientes, além da análise de acompanhamento do seu quadro clínico. O estudo será interrompido a partir de análises interinas, a qualquer momento, no caso de observação, através dos dados gerados, de malefício inequívoco (complicações/ piora do quadro clínico do paciente) ou benefício inequívoco em que tratamento (aplicação da vacina BCG) proporcione evidência significativa de proteção e, neste caso, a vacina

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

será recomendada a todos os pacientes.” Foi adicionado ao protocolo no item 5.10- Análise interina e critérios para interrupção do estudo.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2. No item "Critérios de exclusão", consta que não poderão participar indivíduos imunossuprimidos. Solicita-se que sejam detalhados os exames prévios a serem realizados para que sejam esclarecidas as condições clínicas e/ou os exames prévios a serem realizados nos critérios de exclusão por segurança (por exemplo, como será avaliada a presença ou não de imunodeficiência, mesmo as transitórias).

RESPOSTA: Não há ferramenta ou exame genérico que suplante a capacidade da anamnese e histórico pessoal que serão utilizados para este fim no momento da avaliação de elegibilidade. Neste sentido, uso de imunossupressores ou qualquer deficiência imunológica herdada e adquirida serão caracterizados como critérios de exclusão (vide projeto).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Quanto a Folha de rosto referente ao arquivo “FCF_COVID.pdf” postada na Plataforma Brasil em 20/04/2020, no campo “Pesquisador Responsável”, a assinatura foi retirada de outro documento. Solicita-se que a Folha de Rosto seja novamente submetida para a apreciação ética contendo o campo "Pesquisador Responsável" devidamente preenchido e assinado (de próprio punho) pelo responsável (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.3.a).

RESPOSTA: A folha de rosto foi novamente submetida na Plataforma Brasil constando as alterações requisitadas na assinatura.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Solicita-se que o pesquisador insira documento garantindo divulgar os resultados da pesquisa para os participantes e instituições onde os dados foram coletados, ao término do estudo (Resolução CNS nº 580 de 2018, Art. 9º).

RESPOSTA: O documento foi redigido e anexado à Plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido referente ao arquivo “TCLE.pdf” postado na Plataforma Brasil em 27/04/2020, seguem as considerações:

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

4.1. Na página 1 de 4, lê-se: “COLETA em dois tempos diferentes (uma coleta no dia da entrada e uma coleta no dia de alta) de UMA AMOSTRA DE SANGUE, de uma amostra de urina (por micção espontânea), de secreção genital e perianal através de uso de suabe ou “cotonete”, e de amostra de ar expirado que serão colhidos e armazenados em local seguro para o presente estudo e POSSÍVEIS ESTUDOS FUTUROS;”. (Destaque nosso). Diante do exposto, seguem as considerações:

4.1.1. Solicita-se que seja informado no TCLE o volume total de sangue a ser retirado do participante de pesquisa. Para melhor informar o participante de pesquisa, além de informar a quantidade total de sangue que será coletado, solicita-se que o volume total seja acompanhado de outra unidade de medida que possa facilitar o entendimento (Resolução CNS nº 466 de 2012, item II.23).

RESPOSTA: “As coletas de sangue e de urina serão semelhantes a uma coleta de exame de rotina realizadas em laboratório de análises clínicas: o sangue será retirado por agulha e seringa do antebraço (volume menor que uma xícara de chá), enquanto a coleta da urina será por micção espontânea, ou seja, você irá urinar diretamente no potinho de coleta (coletor universal de, em média, 50 ml). Após análise deste material, o mesmo será armazenado por 3 anos (tempo de duração deste estudo) e depois descartado. Para a coleta do ar expirado, você irá inspirar profundamente e expirar o ar pela boca (soprar) dentro de um tubo plástico contendo uma placa de sílica em seu fundo. O tubo será imediatamente fechado e a amostra coletada será imediatamente identificada e armazenada para posterior análise.” foi inserida no TCLE (item 3. Procedimentos).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.1.2. É necessário descrever no TCLE todos os procedimentos envolvidos na pesquisa, incluindo quais análises serão realizadas nas amostras biológicas e suas respectivas finalidades, em linguagem clara e acessível à compreensão leiga. Por fim, solicita-se ainda, descrever quais biomarcadores serão pesquisados nas amostras biológicas coletadas dos participantes, bem como o objetivo de cada análise (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.a).

RESPOSTA: “À partir das amostras coletadas, serão realizados os testes: Teste IGRA: uma vez que você foi diagnosticado como positivo para SARS-CoV-2, você realizará o teste IGRA, a partir do sangue, para detecção de uma proteína produzida quando você foi vacinado contra com BCG quando criança. Citometria de fluxo: este método identificará as células de defesa circulantes no sangue: linfócitos T, linfócitos B, células NK, monócitos e células dendríticas. RT-PCR: este método

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

será utilizado para a detecção da presença do vírus (através do seu material genético -RNA) nos diversos fluídos corporais. Quimioluminescência (CLIA): teste sorológico comumente realizado determinará a quantidade de vírus nas amostras de sangue (soro) através da detecção de moléculas de defesa (anticorpos) que são produzidas para reagirem contra o vírus: anticorpos anti- SARS CoV-2 IgA, IgG e IgM. ELISA / Multiplex: este método quantificará, a partir do soro obtido do sangue, proteínas (chamadas citocinas) produzidas pelas células de defesa do seu organismo em reações de inflamação: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), INF- e TNF-; Metabolômica: técnica de detecção de moléculas envolvidas no metabolismo das células (ácidos orgânicos, aminoácidos, etc) que podem estar alteradas durante a infecção pelo vírus nos diversos fluídos corporais e ar expirado. Imunoprecipitação de cromatina (técnica CHiP): técnica será utilizada para investigar (a partir do sangue) alterações na expressão e na função de diversos genes (presentes nas células do seu organismo) envolvidos na resposta imunológica contra o vírus. As retiradas de sangue nos dias 0, 7, 14, 21 e 45 serão utilizados exclusivamente para esta pesquisa, não fazendo parte da rotina. Junto a coleta de fluidos e ar expirado você preencherá um questionário semanal (a cada 7 dias a partir da assinatura deste documento) com algumas informações clínicas como sinais e sintomas apresentados durante a doença, até o final das coletas. Para o seu conforto e segurança, este questionário poderá ser realizado por meio digital a partir de endereço eletrônico (acessado através de SMS/Whatsapp/E-mail) ou por aplicativo de celular. Você será inserido dentro de um dos grupos existentes neste estudo: Grupo BCG que receberá uma dose única da vacina de BCG (uma seringa pequena de volume 0.1mL) por via intradérmica; ou Grupo Placebo que receberá dose única de solução fisiológica 0.9% (mesmo volume da vacina de BCG) também por via intradérmica. O grupo placebo consiste na administração de uma substância que não exerce nenhum efeito terapêutico, ou seja, não realiza nenhuma alteração no organismo de quem o recebe. Este grupo é importante para que no final do estudo os resultados sejam comparados aos do grupo vacinado com BCG e será verificado se o tratamento foi eficaz ou não na resposta do organismo contra o vírus SARS-CoV-2. Para assegurar que não haja nenhum tipo de interferência nos resultados em sua análise, apenas o pesquisador responsável pelo estudo saberá qual grupo experimental você está inserido (grupo Placebo ou grupo BCG). Desta forma, você somente será informado sobre o tratamento administrado no término do estudo ou em caso de emergência.” foi inserida no TCLE (item 3. Procedimentos).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.1.3. Solicita-se que seja informado no TCLE que a retirada do consentimento de guarda das

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

amostras biológicas humanas armazenadas em banco deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 10.I).

RESPOSTA: “ O material biológico armazenado, ou seja, amostra de saliva, sangue, urina, suabe da secreção genital (sêmen no homem) e perianal serão armazenados em Freezers à - 20°C localizados no Laboratório de Investigação Clínica de Resistência à Insulina (LICRI) localizado na Faculdade de Ciências Médicas (FCM), na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), e identificados por código específico. Este código que permite identificar a origem do material (aqui referido como participante), bem como os dados de contato deste os quais serão armazenados em computador com acesso apenas pelo pesquisador responsável (Prof. Dr. Leonardo Oliveira Reis). O prazo previsto para armazenamento do material biológico é de 3 anos (tempo de desenvolvimento deste projeto). Ao final do prazo de armazenamento previsto, ou estendido com autorização pelo CEP, o material biológico armazenado deverá ser descartado ou destruído. Com relação a coleta, o armazenamento e a utilização do material biológico mencionado anteriormente, o paciente abaixo identificado e/ou seu representante legal: () concorda(m) em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZA(m) o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa. () concorda(m) em participar do presente estudo e AUTORIZA(m) o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, por meio de um TCLE específico (ou, quando devidamente justificado, a obtenção de aprovação da dispensa do Termo pelo Comitê) e apresentação desse novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo Sistema CEP/Conep.” (item 8. Armazenamento de material) foi inserida no TCLE O descarte do material armazenado será autorizado em caso de falecimento ou condição incapacitante e os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____ (PESSOA INDICADA PELO PACIENTE E/OU SEU REPRESENTANTE LEGAL). O paciente e/ou seu representante legal poderão retirar o consentimento da guarda de suas amostras armazenadas em banco que deverá ser realizada POR ESCRITO E ASSINADA, podendo dar-se a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data da comunicação da decisão.” foi inserida no TCLE (item 8. Armazenamento de material).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.1.4. As amostras biológicas armazenadas podem ser utilizadas em pesquisas futuras, desde que previamente aprovadas pelo Sistema CEP/Conep. Sendo assim, solicita-se descrever NESSE ITEM

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

do TCLE que cada nova pesquisa realizada pelo patrocinador ou por PESQUISADORES INDEPENDENTES está condicionada a: (a) apresentação de novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo Sistema CEP/Conep e (b) reconsentimento do participante de pesquisa por meio de um TCLE específico referente ao novo projeto de pesquisa (ou, quando devidamente justificado, a obtenção de aprovação da dispensa do Termo pelo Comitê) (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 6; Portaria MS nº 2.201 de 2011, capítulo IV, seção II, artigos 17, 18 e 22 e capítulo II, artigo 5º).

RESPOSTA: “() concorda(m) em participar do presente estudo e AUTORIZA(m) o armazenamento do meu material biológico, sendo necessário meu consentimento a cada nova pesquisa, por meio de um TCLE específico (ou, quando devidamente justificado, a obtenção de aprovação da dispensa do Termo pelo Comitê) e apresentação desse novo projeto de pesquisa para ser analisado e aprovado pelo Sistema CEP/Conep.” (item 8. Armazenamento de material) foi inserida no TCLE.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.1.5. Sempre que houver previsão de armazenamento de material biológico humano no País visando à possibilidade de utilização em investigações futuras deve ser apresentada justificativa quanto à necessidade e oportunidade para utilização futura. Diante do exposto, solicita-se a apresentação desta justificativa (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 2.I).

RESPOSTA: “A pandemia COVID-19 tem impactado negativamente a sociedade no mundo todo, tanto com perdas econômicas de qualidade e quantidade de vida além da inexistência de tratamento ou vacina efetivos até o momento. Considerando o desenho do estudo e a coleta seriada de amostras, a proposta em tela se caracteriza como excelente oportunidade de expansão do conhecimento no tema sem prejuízo aos sujeitos de estudo, utilizando de maneira anônima o material coletado” foi inserido no TCLE (item 8: “Armazenamento do Material”).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.2. Na página 1 de 4, lê-se: “E de acordo com O GRUPO EM QUE ESTIVER INSERIDO neste estudo, receber uma aplicação da vacina BCG em seu braço.”. (Destaque nosso). No TCLE devem estar descritos TODOS os procedimentos que serão realizados na pesquisa, com o DETALHAMENTO DOS MÉTODOS A SEREM UTILIZADOS. Não está explícito que o participante de pesquisa poderá receber a vacina ou o PLACEBO (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.a). Adicionalmente, solicita-se incluir no TCLE informações sobre a possibilidade do participante ser incluído no grupo placebo, bem como uma explicação do que é placebo.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

RESPOSTA: “Você será inserido dentro de um dos grupos existentes neste estudo: Grupo BCG que receberá uma dose única da vacina de BCG (uma seringa pequena de volume 0.1mL) por via intradérmica; ou Grupo Placebo que receberá dose única de solução fisiológica 0.9% (mesmo volume da vacina de BCG) também por via intradérmica. O grupo placebo consiste na administração de uma substância que não exerce nenhum efeito terapêutico, ou seja, não realiza nenhuma alteração no organismo de quem o recebe. Este grupo é importante para que no final do estudo os resultados sejam comparados aos do grupo vacinado com BCG e será verificado se o tratamento foi eficaz ou não na resposta do organismo contra o vírus SARS-CoV-2. Para assegurar que não haja nenhum tipo de interferência nos resultados em sua análise, apenas o pesquisador responsável pelo estudo saberá qual grupo experimental você está inserido (grupo placebo ou grupo BCG). Desta forma, você somente será informado sobre o tratamento administrado no término do estudo ou em caso de emergência.”foi inserida no TCLE (item 3. Procedimentos).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.3. Na página 3 de 4, lê-se: “Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador Ivan Borin Selegatto, R. Vital Brasil, 251 - Cidade Universitária, Campinas – SP, Hospital das Clínicas no departamento de urologia ou pelo e-mail ivanselegatto@gmail.com.”. Solicita-se que conste em ambas as vias do TCLE o contato telefônico dos responsáveis pela pesquisa (do centro de pesquisa e emergencial) (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d).

RESPOSTA: “Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:00hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:30hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@unicamp.br Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador Ivan Borin Selegatto, R. Vital Brasil, 251 - Cidade Universitária, Campinas – SP, Hospital das Clínicas no departamento de urologia ou pelo e-mail ivanselegatto@gmail.com ou com o pesquisador responsável Dr. Leonardo Oliveira Reis, telefone de contato (19) 983723732, e-mail: reisleo@unicamp.br e Centro de pesquisa UroScience pelo telefone de contato (19) 35217481.” foi inserida no TCLE (item 10. Contato).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.4. Solicita-se incluir os dados de contato da Conep no TCLE (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP SRTV 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar – Asa Norte CEP:

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

70719-040, Brasília/DF) (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.5.d).

RESPOSTA: “O projeto em questão foi analisado e aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), localizado no endereço: CONEP SRTV 701 - Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar – Asa Norte CEP: 70719-040, Brasília/DF, que está diretamente ligada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS).” foi inserida no TCLE (item 10. Contato).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.5. Solicita-se inserir no TCLE a explicitação acerca do direito de buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.3.h).

RESPOSTA: “Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.” foi inserida no TCLE (item 7. “Ressarcimento e Indenização”).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.6. No TCLE as justificativas para a realização do estudo e a descrição dos objetivos estão pouco detalhadas. Solicitam-se adequações.

RESPOSTA: “A vacina BCG é constituída da cepa atenuada (bactéria ativa, porém, sem capacidade de produzir a doença) de Mycobacterium bovis e é comumente aplicada em recém-nascidos para a prevenção da tuberculose e no tratamento de câncer de bexiga em adultos há mais de 40 anos. A prévia vacinação com BCG estimula a defesa do organismo (através da produção de anticorpos) contra infecções, incluindo o vírus da gripe pandêmica A H1N1 (ocorrida em 2009), o vírus da febre amarela e, atuais estudos têm observado que países que possuem programa vacinal com BCG, apresentaram menores taxas de novos casos e mortalidade por COVID-19. Uma vez que a transmissão do coronavírus SARS-CoV-2 pode ocorrer através do ar expirado, gotículas e aerossóis, também pode ser encontrado em diferentes fluidos corporais, como saliva, sangue e lavado nasal. Assim, as análises de fluidos seriam uma ferramenta importante para determinar não somente o diagnóstico do indivíduo mas também o acompanhamento do quadro clínico do paciente, além da gravidade da doença e da certificação de sua recuperação após tratamento. Desta forma, este estudo tem como objetivo avaliar as possíveis formas de disseminação da COVID-19 e descobrir novas oportunidades diagnósticas através das análises dos diversos fluidos corporais e ar expirado, correlacionando-as com os variados quadros clínicos apresentados. Considerando que a população brasileira possui uma grande cobertura de vacinação com BCG, o estudo também irá verificar se a exposição prévia ou atual (reforço por vacinação intradérmica) ao BCG confere ou não proteção cruzada contra o coronavírus SARS-CoV-2, impedindo complicações

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

clínicas relacionadas ao mesmo.” foi inserida no TCLE (item 1. Justificativa e Objetivos).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4.7. Os eventos adversos estão minimizados pelo investigador, pois consta que "Os riscos envolvidos na participação desse estudo são mínimos, pois não há interferência no seu tratamento padrão". Não cabe ao investigador qualificar a natureza dos riscos e sim citá-los, deixando livre a apreciação do participante. Ademais, não estão expressos todos os riscos do uso da vacina BCG em adultos, conforme preconizado no documento "World Health Organization (WHO) Surveillance of adverse events following immunization—field guide for managers of immunization programmes Global programmes for vaccines and immunization: expanded programme on immunization.1997.Geneva.WHO." Nota-se que existe também o risco de infecção disseminada pelo BCG, não informado nesta versão do documento. Além disso, trata-se de tratamento experimental e os efeitos da vacinação com BCG em indivíduos portadores de Covid-19 podem ser imprevisíveis e ir além dos conhecidos. Solicita-se adequar o TCLE para contemplar estas informações.

RESPOSTA: “A vacina de BCG aplicada no braço é semelhante à aplicada em você quando era criança, e cuja reação adversa normal consiste em processo inflamatório cutâneo autolimitado de pequena duração. Os eventos adversos da vacinação com BCG podem ser leves a severos (no caso de indivíduos imunossuprimidos) e são classificados segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) da seguinte forma: Eventos leves (locais) Pápula vermelha no local da injeção: ocorre a partir da segunda semana pós vacinação; Formação de úlcera leve: geralmente com tamanho menor que 1 cm, ocorre 1 a 2 meses após a vacinação; Cicatriz superficial (característica da vacinação): ocorre após 2 a 5 meses após a vacinação; Linfadenopatia leve: pequeno inchaço (menor que 1,5 cm) nos linfonodos regionais (axilares, cervicais ou supraclaviculares). As reações leves podem ocorrer mesmo na administração correta do BCG e a extensão da reação depende de fatores como tipo de cepa de BCG utilizada, da quantidade de bacilos atenuados administrada e da técnica de aplicação da vacina. Não é necessário nenhum tipo de tratamento para os eventos leves.

2. Eventos severos 2.1. Locais a) abscesso subcutâneo local; b) cicatriz quelóide (espessamento do tecido cicatricial); c) linfadenite supurada (evento raro): inchaço de linfonodos com dimensão maior de 1 cm e aderentes à pele superficial. d) reação lupóide: indivíduos com sistema imune suprimido (imunossupressão). As reações de abscesso (a) e linfadenite supurada (c) são decorrentes, na maioria dos casos, de técnica incorreta na aplicação da vacina. Neste estudo, os profissionais designados para aplicação da vacina possuem experiência e, portanto, a aplicação da

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

técnica é realizada da forma mais correta possível. 2.2. Sistêmicas (extremamente raras e associadas à imunossupressão) a) Lesões na pele (cutâneas); b) Lesões osteoarticulares; c) Disseminação do BCG (ou BCG-ite sistêmica): infecção disseminada pelo BCG e diferentes órgãos. Os eventos adversos sistêmicos são muito raros e ocorrem em indivíduos extremamente imunossuprimidos. Uma vez que efeitos da vacinação com BCG em pacientes com COVID-19 ainda não são completamente conhecidos, em caso de ocorrência de reações adversas, estas serão acompanhadas pelo médico responsável do estudo no Hospital do estudo em questão e, portanto, você terá toda assistência para que estes eventos adversos sejam eliminados. É importante salientar que para qualquer um dos efeitos citados, ou em qualquer momento da pesquisa o participante tem o total direito de interromper sua participação, mesmo após ter assinado este termo e ter aceitado a participação na pesquisa. Será garantida a assistência médica durante toda a sua participação do estudo e mantidos todos seus direitos, inclusive de indenizações e garantias diante de eventuais danos decorrentes da participação até a conclusão do projeto. Será garantida a assistência imediata e integral, gratuita, pelo tempo que for necessário, em relação a dano direto ou indireto relacionado à pesquisa.” foi inserida no TCLE (item 4. Desconfortos e riscos).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

CENTROS PARTICIPANTES INCLUÍDOS:

- Hospital Estadual Sumaré, HES-UNICAMP;
- Instituto de Infectologia Emilio Ribas-SP;
- Hospital das Clinicas Ribeirão Preto-USP;
- Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Botucatu-SP, UNESP;
- Hospital São Paulo-Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP;
- Hospital Municipal de Paulínia-SP, Brasil;
- Sociedade Campineira de Educação e Instrução.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.173.069

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1564546_E1.pdf	22/07/2020 21:05:56		Aceito
Outros	Carta_resposta_22_07_2020.pdf	22/07/2020 19:16:17	KAREN LINARES FERRARI MARINS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	COVID_BCG_boost_22_07_2020.pdf	22/07/2020 19:15:50	KAREN LINARES FERRARI MARINS	Aceito
Outros	carta_resposta_17_07_2020.pdf	17/07/2020 00:35:15	ANA CAROLINA PAGLIARONE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_17_07_20.pdf	17/07/2020 00:26:53	ANA CAROLINA PAGLIARONE	Aceito
Outros	biorepositorio.pdf	16/07/2020 22:12:32	ANA CAROLINA PAGLIARONE	Aceito
Outros	termo_divulgacao_resultados.pdf	16/07/2020 21:03:20	ANA CAROLINA PAGLIARONE	Aceito
Folha de Rosto	07_2020_FCF_COVID.pdf	06/07/2020 10:43:39	ANA CAROLINA PAGLIARONE	Aceito
Outros	VNCULOUnicamp.pdf	20/04/2020 12:09:01	KAREN LINARES FERRARI MARINS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 25 de Julho de 2020

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador(a))

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

This is a License Agreement between University of Campinas (“User”) and Copyright Clearance Center, Inc. (“CCC”) on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	27-Nov-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1420533-1	Publisher	FUTURE MEDICINE LTD.
ISSN	1752-0363	Portion	Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	Biomarkers in medicine	Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Date	01/01/2007		
Language	English	Rightsholder	Future Medicine Ltd.
		Publication Type	Journal

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page Range(s)	1785-1795	Distribution	Worldwide
Total Number of Pages	11	Translation	Original language of publication
Format (select all that apply)	Electronic	Copies for the Disabled?	No
Who Will Republish the Content?	Author of requested content	Minor Editing Privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental Promotional Use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	USD

NEW WORK DETAILS

Title	Role of miRNAs as biomarkers of COVID-19: a scoping review of the status and future directions for research in this field	Institution Name	University of Campinas
		Expected Presentation Date	2023-11-30
Instructor Name	Aline S Nicoletti		

ADDITIONAL DETAILS

Order Reference Number	N/A	The Requesting Person / Organization to Appear on the License	University of Campinas
------------------------	-----	---	------------------------

REQUESTED CONTENT DETAILS

Title, Description or Numeric Reference of the Portion(s)	Role of miRNAs as biomarkers of COVID-19: a scoping review of the status and future directions for research in this eld	Title of the Article / Chapter the Portion Is From	N/A
Editor of Portion(s)	N/A	Author of Portion(s)	N/A
Volume / Edition	N/A	Issue, if Republishing an Article From a Serial	N/A
Page or Page Range of Portion	N/A	Publication Date of Portion	2007-01-01

Marketplace Permissions General Terms and Conditions

The following terms and conditions (“General Terms”), together with any applicable Publisher Terms and Conditions, govern User’s use of Works pursuant to the Licenses granted by Copyright Clearance Center, Inc. (“CCC”) on behalf of the applicable Rightsholders of such Works through CCC’s applicable Marketplace transactional licensing services (each, a “Service”).

1) Definitions. For purposes of these General Terms, the following definitions apply:

“License” is the licensed use the User obtains via the Marketplace platform in a particular licensing transaction, as set forth in the Order Confirmation.

“Order Confirmation” is the confirmation CCC provides to the User at the conclusion of each Marketplace transaction. “Order Confirmation Terms” are additional terms set forth on specific Order Confirmations not set forth in the General Terms that can include terms applicable to a particular CCC transactional licensing service and/or any Rightsholder-specific terms.

“Rightsholder(s)” are the holders of copyright rights in the Works for which a User obtains licenses via the Marketplace platform, which are displayed on specific Order Confirmations.

“Terms” means the terms and conditions set forth in these General Terms and any additional Order Confirmation Terms collectively.

“User” or “you” is the person or entity making the use granted under the relevant License. Where the person accepting the Terms on behalf of a User is a freelancer or other third party who the User authorized to accept the General Terms on the User’s behalf, such person shall be deemed jointly a User for purposes of such Terms.

“Work(s)” are the copyright protected works described in relevant Order Confirmations.

2) Description of Service. CCC’s Marketplace enables Users to obtain Licenses to use one or more Works in accordance with all relevant Terms. CCC grants Licenses as an agent on behalf of the copyright rightsholder identified in the relevant Order Confirmation.

3) Applicability of Terms. The Terms govern User’s use of Works in connection with the relevant License. In the event of any conflict between General Terms and Order Confirmation Terms, the latter shall govern. User acknowledges that Rightsholders have complete discretion whether to grant any permission, and whether to place any limitations on any grant, and that CCC has no right to supersede or to modify any such discretionary act by a Rightsholder.

4) Representations; Acceptance. By using the Service, User represents and warrants that User has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all Terms.

5) Scope of License; Limitations and Obligations. All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The License provides only those rights expressly set forth in the terms and conveys no other rights in any Works

6) General Payment Terms. User may pay at time of checkout by credit card or choose to be invoiced. If the User chooses to be invoiced, the User shall: (i) remit payments in the manner identified on specific invoices, (ii) unless otherwise specifically stated in an Order Confirmation or separate written agreement, Users shall remit payments upon receipt of the relevant invoice from CCC, either by delivery or notification of availability of the invoice via the Marketplace platform, and (iii) if the User does not pay the invoice within 30 days of receipt, the User may incur a service charge of 1.5% per month or the maximum rate allowed by applicable law, whichever is less. While User may exercise the rights in the License immediately upon receiving the Order Confirmation, the License is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if CCC does not receive complete payment on a timely basis.

7) General Limits on Use. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) involves only the rights set forth in the Terms and does not include subsequent or additional uses, (ii) is non-exclusive and non-transferable, and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Terms. Upon completion of the licensed use as set forth in the Order Confirmation, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work. User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is unlawful, including without limitation if such use would violate applicable sanctions laws or regulations, would be defamatory, violate the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit, or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. Any unlawful use will render any licenses hereunder null and void. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

8) Third Party Materials. In the event that the material for which a License is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) that are identified in such material as having been used by permission (or a similar indicator), User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service, if available, or otherwise) for any of such third party materials; without a separate license, User may not use such third party materials via the License.

9) Copyright Notice. Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any License granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Used with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either on a cover page or in another location that any person, upon gaining access to the material which is the subject of a permission, shall see, or in the case of republication Licenses, immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

10) Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs, and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein and in the Order Confirmation, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy, or other tangible or intangible property.

11) Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL, OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OR BOTH OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for the relevant License. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors, and assigns.

12) Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS." CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS, OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

13) Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the License set forth in the Order Confirmation and/or the Terms, shall be a material breach of such License. Any breach not cured within 10 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such License without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

14) Additional Terms for Specific Products and Services. If a User is making one of the uses described in this Section 14, the additional terms and conditions apply:

a) *Print Uses of Academic Course Content and Materials (photocopies for academic coursepacks or classroom handouts)*. For photocopies for academic coursepacks or classroom handouts the following additional terms apply:

i) The copies and anthologies created under this License may be made and assembled by faculty members individually or at their request by on-campus bookstores or copy centers, or by off-campus copy shops and other similar entities.

ii) No License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied) (ii) permit "publishing ventures" where any particular anthology would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any Publisher Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the academic pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to no more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular anthology, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) in the case of a photocopy permission, no materials may be entered into electronic memory by User except in order to produce an identical copy of a Work before or during the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted. In the event that User shall choose to retain materials that are the subject of a photocopy permission in electronic memory for purposes of producing identical copies more than one day after such retention (but still within the scope of any permission granted), User must notify CCC of such fact in the applicable permission request and such retention shall constitute one copy actually sold for purposes of calculating permission fees due; and

F) any permission granted shall expire at the end of the class. No permission granted shall in any way include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied).

iv) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the academic pay-per-use Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any photocopies sold or by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this License for any reason.

b) *Digital Pay-Per-Uses of Academic Course Content and Materials (e-coursepacks, electronic reserves, learning management systems, academic institution intranets)*. For uses in e-coursepacks, posts in electronic reserves, posts in learning management systems, or posts on academic institution intranets, the following additional terms apply:

i) The pay-per-uses subject to this Section 14(b) include:

A) Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for text-based content, which grants authorizations to import requested material in electronic format, and allows electronic access to this material to members of a designated college or university class, under the direction of an instructor designated by the college or university, accessible only under appropriate electronic controls (e.g., password);

B) Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks for material consisting of photographs or other still images not embedded in text, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorization: to include the requested material in course materials

for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above, including any necessary resizing, reformatting or modification of the resolution of such requested material (provided that such modification does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material, and provided that the resulting modified content is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms), but not including any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material;

C) Posting e-reserves, course management systems, e-coursepacks or other academic distribution for audiovisual content, which grants not only the authorizations described in Section 14(b)(i)(A) above, but also the following authorizations: (i) to include the requested material in course materials for use consistent with Section 14(b)(i)(A) above; (ii) to display and perform the requested material to such members of such class in the physical classroom or remotely by means of streaming media or other video formats; and (iii) to “clip” or reformat the requested material for purposes of time or content management or ease of delivery, provided that such “clipping” or reformatting does not alter the underlying editorial content or meaning of the requested material and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular authorization described in the Order Confirmation and the Terms. Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, the License does not authorize any other form of manipulation, alteration or editing of the requested material.

ii) Unless expressly set forth in the relevant Order Confirmation, no License granted shall in any way: (i) include any right by User to create a substantively non-identical copy of the Work or to edit or in any other way modify the Work (except by means of deleting material immediately preceding or following the entire portion of the Work copied or, in the case of Works subject to Sections 14(b)(1)(B) or (C) above, as described in such Sections) (ii) permit “publishing ventures” where any particular course materials would be systematically marketed at multiple institutions.

iii) Subject to any further limitations determined in the Rightsholder Terms (and notwithstanding any apparent contradiction in the Order Confirmation arising from data provided by User), any use authorized under the electronic course content pay-per-use service is limited as follows:

A) any License granted shall apply to only one class (bearing a unique identifier as assigned by the institution, and thereby including all sections or other subparts of the class) at one institution;

B) use is limited to not more than 25% of the text of a book or of the items in a published collection of essays, poems or articles;

C) use is limited to not more than the greater of (a) 25% of the text of an issue of a journal or other periodical or (b) two articles from such an issue;

D) no User may sell or distribute any particular materials, whether photocopied or electronic, at more than one institution of learning;

E) electronic access to material which is the subject of an electronic-use permission must be limited by means of electronic password, student identification or other control permitting access solely to students and instructors in the class;

F) User must ensure (through use of an electronic cover page or other appropriate means) that any person, upon gaining electronic access to the material, which is the subject of a permission, shall see:

- a proper copyright notice, identifying the Rightsholder in whose name CCC has granted permission,
- a statement to the effect that such copy was made pursuant to permission,
- a statement identifying the class to which the material applies and notifying the reader that the material has been made available electronically solely for use in the class, and
- a statement to the effect that the material may not be further distributed to any person outside the class, whether by copying or by transmission and whether electronically or in paper form, and User must also ensure that such cover page or other means will print out in the event that the person accessing the material chooses to print out the material or any part thereof.

G) any permission granted shall expire at the end of the class and, absent some other form of authorization, User is thereupon required to delete the applicable material from any electronic storage or to block electronic access to the applicable material.

iv) Uses of separate portions of a Work, even if they are to be included in the same course material or the same university or college class, require separate permissions under the electronic course content pay-per-use Service.

Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User is limited to use completed no later than the end of the academic term (or analogous period) as to which any particular permission is granted.

v) Books and Records; Right to Audit. As to each permission granted under the electronic course content Service, User shall maintain for at least four full calendar years books and records sufficient for CCC to determine the numbers of copies made by User under such permission. CCC and any representatives it may designate shall have the right to audit such books and records at any time during User's ordinary business hours, upon two days' prior notice. If any such audit shall determine that User shall have underpaid for, or underreported, any electronic copies used by three percent (3%) or more, then User shall bear all the costs of any such audit; otherwise, CCC shall bear the costs of any such audit. Any amount determined by such audit to have been underpaid by User shall immediately be paid to CCC by User, together with interest thereon at the rate of 10% per annum from the date such amount was originally due. The provisions of this paragraph shall survive the termination of this license for any reason.

c) *Pay-Per-Use Permissions for Certain Reproductions (Academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting) (Non-academic internal/external business uses and commercial document delivery)*. The License expressly excludes the uses listed in Section (c)(i)–(v) below (which must be subject to separate license from the applicable Rightsholder) for: academic photocopies for library reserves and interlibrary loan reporting; and non-academic internal/external business uses and commercial document delivery.

- i) electronic storage of any reproduction (whether in plain-text, PDF, or any other format) other than on a transitory basis;
- ii) the input of Works or reproductions thereof into any computerized database;
- iii) reproduction of an entire Work (cover-to-cover copying) except where the Work is a single article;
- iv) reproduction for resale to anyone other than a specific customer of User;
- v) republication in any different form. Please obtain authorizations for these uses through other CCC services or directly from the rightsholder.

Any license granted is further limited as set forth in any restrictions included in the Order Confirmation and/or in these Terms.

d) *Electronic Reproductions in Online Environments (Non-Academic-email, intranet, internet and extranet)*. For "electronic reproductions", which generally includes e-mail use (including instant messaging or other electronic transmission to a defined group of recipients) or posting on an intranet, extranet or Intranet site (including any display or performance incidental thereto), the following additional terms apply:

- i) Unless otherwise set forth in the Order Confirmation, the License is limited to use completed within 30 days for any use on the Internet, 60 days for any use on an intranet or extranet and one year for any other use, all as measured from the "republication date" as identified in the Order Confirmation, if any, and otherwise from the date of the Order Confirmation.
- ii) User may not make or permit any alterations to the Work, unless expressly set forth in the Order Confirmation (after request by User and approval by Rightsholder); provided, however, that a Work consisting of photographs or other still images not embedded in text may, if necessary, be resized, reformatted or have its resolution modified without additional express permission, and a Work consisting of audiovisual content may, if necessary, be "clipped" or reformatted for purposes of time or content management or ease of delivery (provided that any such resizing, reformatting, resolution modification or "clipping" does not alter the underlying editorial content or meaning of the Work used, and that the resulting material is used solely within the scope of, and in a manner consistent with, the particular License described in the Order Confirmation and the Terms.

15) Miscellaneous.

a) User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to the Terms, and that Rightsholder may make changes or additions to the Rightsholder Terms. Such updated Terms will replace the prior terms and conditions in the order work flow and shall be effective as to any subsequent Licenses but shall not apply to Licenses already granted and paid for under a prior set of terms.

b) Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online at www.copyright.com/about/privacy-policy/.

c) The License is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the License or any rights granted thereunder; provided, however, that, where applicable, User may assign such License in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in any new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

d) No amendment or waiver of any Terms is binding unless set forth in writing and signed by the appropriate parties, including, where applicable, the Rightsholder. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by or on behalf of the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the License described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any Terms set forth in the Order Confirmation, and/or in CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.

e) The License described in the Order Confirmation shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such License shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court.

Last updated October 2022

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Nov 27, 2023

This Agreement between State University of Campinas -- Aline Nicoletti ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5677051446204
License date	Nov 27, 2023
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Molecular Biology Reports
Licensed Content Title	Differentially expressed plasmatic microRNAs in Brazilian patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19): preliminary results
Licensed Content Author	Aline de Souza Nicoletti et al
Licensed Content Date	Mar 17, 2022
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29

Author of this Springer Nature content	yes
Title of new work	Differentially expressed plasmatic microRNAs in Brazilian patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19): preliminary results
Institution name	University of Campinas
Expected presentation date	Nov 2023
Requestor Location	State University of Campinas 100, Cândido Portinari Street
	Campinas, São Paulo 13083871 Brazil Attn: State University of Campinas
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH Terms and Conditions

The following terms and conditions ("Terms and Conditions") together with the terms specified in your [RightsLink] constitute the License ("License") between you as Licensee and Springer Nature Customer Service Centre GmbH as Licensor. By clicking 'accept' and completing the transaction for your use of the material ("Licensed Material"), you confirm your acceptance of and obligation to be bound by these Terms and Conditions.

1. Grant and Scope of License

1. 1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, non-sublicensable, revocable, world-wide License to reproduce, distribute, communicate to the public, make available, broadcast, electronically transmit or create derivative works using the Licensed Material for the purpose(s) specified in your RightsLink Licence Details only. Licenses are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to these Terms and Conditions. You acknowledge and agree that the rights granted to you under this License do not include the right to modify, edit, translate, include in collective works, or create derivative works of the Licensed Material in whole or in part unless expressly stated in your RightsLink Licence Details. You may use the Licensed Material only as permitted under this Agreement and will not reproduce, distribute, display, perform, or otherwise use or exploit any Licensed Material in any way, in whole or in part, except as expressly permitted by this License.

1. 2. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Terms and Conditions, by your RightsLink Licence Details and

by any applicable laws.

1. 3. A separate license may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a license has been purchased for print use only, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a License is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the License.

1. 4. Any content within the Licensed Material that is owned by third parties is expressly excluded from the License.

1. 5. Rights for additional reuses such as custom editions, computer/mobile applications, film or TV reuses and/or any other derivative rights requests require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

2. Reservation of Rights

Licensor reserves all rights not expressly granted to you under this License. You acknowledge and agree that nothing in this License limits or restricts Licensor's rights in or use of the Licensed Material in any way. Neither this License, nor any act, omission, or statement by Licensor or you, conveys any ownership right to you in any Licensed Material, or to any element or portion thereof. As between Licensor and you, Licensor owns and retains all right, title, and interest in and to the Licensed Material subject to the license granted in Section 1.1. Your permission to use the Licensed Material is expressly conditioned on you not impairing Licensor's or the applicable copyright owner's rights in the Licensed Material in any way.

3. Restrictions on use

3. 1. Minor editing privileges are allowed for adaptations for stylistic purposes or formatting purposes provided such alterations do not alter the original meaning or intention of the Licensed Material and the new figure(s) are still accurate and representative of the Licensed Material. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, and/or omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author(s) are strictly prohibited.

3. 2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

3. 3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP), but any such reuse must include a clear acknowledgment of this permission visible at the same time as the figures/tables/illustration or abstract and which must indicate that the Licensed Material is not part of the governing OA license but has been reproduced with permission. This may be indicated according to any standard referencing system but must include at a minimum 'Book/Journal title, Author, Journal Name (if applicable), Volume (if applicable), Publisher, Year, reproduced with permission from SNCSC'.

4. STM Permission Guidelines

4. 1. An alternative scope of license may apply to signatories of the STM Permissions Guidelines ("STM PG") as amended from time to time and made available at <https://www.stm-assoc.org/intellectual-property/permissions/permissions-guidelines/>.

4. 2. For content reuse requests that qualify for permission under the STM PG, and which may be updated from time to time, the STM PG supersede the terms and

conditions contained in this License.

4. 3. If a License has been granted under the STM PG, but the STM PG no longer apply at the time of publication, further permission must be sought from the Rightsholder. Contact journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

5. Duration of License

5. 1. Unless otherwise indicated on your License, a License is valid from the date of purchase ("License Date") until the end of the relevant period in the below table:

Reuse in a medical communications project	Reuse up to distribution or time period indicated in License
Reuse in a dissertation/thesis	Lifetime of thesis
Reuse in a journal/magazine	Lifetime of journal/magazine
Reuse in a book/textbook	Lifetime of edition
Reuse on a website	1 year unless otherwise specified in the License
Reuse in a presentation/slide kit/poster	Lifetime of presentation/slide kit/poster. Note: publication whether electronic or in print of presentation/slide kit/poster may require further permission.
Reuse in conference proceedings	Lifetime of conference proceedings
Reuse in an annual report	Lifetime of annual report
Reuse in training/CME materials	Reuse up to distribution or time period indicated in License
Reuse in newsmedia	Lifetime of newsmedia
Reuse in coursepack/classroom materials	Reuse up to distribution and/or time period indicated in license

6. Acknowledgement

6. 1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licensed Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract and must be hyperlinked to the journal/book's homepage.

6. 2. Acknowledgement may be provided according to any standard referencing system and at a minimum should include "Author, Article/Book Title, Journal name/Book imprint, volume, page number, year, Springer Nature".

7. Reuse in a dissertation or thesis

7. 1. Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected, the following terms apply: Print rights of the Version of Record are provided for; electronic rights for use only on institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/) and only up to what is required by the awarding institution.

7. 2. For theses published under an ISBN or ISSN, separate permission is required. Please contact journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.

7. 3. Authors must properly cite the published manuscript in their thesis according to current citation standards and include the following acknowledgement:

'Reproduced with permission from Springer Nature'.

8. License Fee

You must pay the fee set forth in the License Agreement (the "License Fees"). All amounts payable by you under this License are exclusive of any sales, use, withholding, value added or similar taxes, government fees or levies or other assessments. Collection and/or remittance of such taxes to the relevant tax authority shall be the responsibility of the party who has the legal obligation to do so.

9. Warranty

9. 1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. **You are solely responsible for ensuring that the material you wish to license is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity or third party (as credited in the published version).** If the credit line on any part of the Licensed Material indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should seek additional permission from that source to reuse the material.

9. 2. EXCEPT FOR THE EXPRESS WARRANTY STATED HEREIN AND TO THE EXTENT PERMITTED BY APPLICABLE LAW, LICENSOR PROVIDES THE LICENSED MATERIAL "AS IS" AND MAKES NO OTHER REPRESENTATION OR WARRANTY. LICENSOR EXPRESSLY DISCLAIMS ANY LIABILITY FOR ANY CLAIM ARISING FROM OR OUT OF THE CONTENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO ANY ERRORS, INACCURACIES, OMISSIONS, OR DEFECTS CONTAINED THEREIN, AND ANY IMPLIED OR EXPRESS WARRANTY AS TO MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, OR EXEMPLARY DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE LICENSED MATERIAL REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION APPLIES NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

10. Termination and Cancellation

10. 1. The License and all rights granted hereunder will continue until the end of the applicable period shown in Clause 5.1 above. Thereafter, this license will be terminated and all rights granted hereunder will cease.

10. 2. Licensor reserves the right to terminate the License in the event that payment is not received in full or if you breach the terms of this License.

11. General

11. 1. The License and the rights and obligations of the parties hereto shall be construed, interpreted and determined in accordance with the laws of the Federal Republic of Germany without reference to the stipulations of the CISG (United Nations Convention on Contracts for the International Sale of Goods) or to Germany's choice-of-law principle.

11. 2. The parties acknowledge and agree that any controversies and disputes arising out of this License shall be decided exclusively by the courts of or having jurisdiction for Heidelberg, Germany, as far as legally permissible.

11. 3. This License is solely for Licensor's and Licensee's benefit. It is not for the benefit of any other person or entity.

Questions? For questions on Copyright Clearance Center accounts or website issues please contact springernaturesupport@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777. For questions on Springer Nature licensing please visit <https://www.springernature.com/gp/partners/rights-permissions-third-party-distribution>

Other Conditions:

Version 1.4 - Dec 2022

Questions? customercare@copyright.com.
