

B.1. Propunerea de proiect

1. Titlul: “Caracterizarea clinică, patogeneza, factori de risc și biomarkeri moleculari predictivi în sindromul sechelelar cronic, postinfecție acută cu SARS-CoV-2 (Long COVID)”.

Domeniului științific (secțiunea VI): „**23. Monitorizarea sechelelor postinfecție acută cu SARS-CoV-2**”.

2. **Cuvinte cheie:** SARS-CoV-2, COVID-19, long COVID, scor predictiv, prognostic, sindrom metabolic, indice de masă corporală (IMC), hipertensiune arterială, tulburări de ritm cardiac, electrocardiogramă (ECG), ecografie cardiacă, tomografie computerizată toracică, serologie, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR), proteina C reactivă, D-dimeri, interleuchine, IL-6, procalcitonină, feritină, microARN, microARN-6501-5p, microARN-5695, microARN-29b-3p, microARN-133-a, microARN-618, microARN-16-2-3p, microARN-15b-5p, microARN-548c-5p, microARN-409-3p, microARN-505, microARN-30b-5p, scala statusului funcțional Post-COVID-19 (PCFS), chestionarul EQ-5D-5L QoL, scala analogică vizuală EQ (VAS).

3. Obiective

Proiectul actual își propune studiul unui sindrom emergent, foarte recent descris în literatura de specialitate, și anume sindromul Long COVID (sindromul sechelelar cronic post-infecție acută cu SARS-CoV-2). Pe o cohortă deja bine definită, și în continuă creștere, de cazuri de COVID-19, aflate sub monitorizare post-infecție acută, cu simptome persistente la peste 4 săptămâni de la debut (în momentul de față, 300 de cazuri), am condus multiple investigații premergătoare [1-7], care au permis identificarea actualelor direcții de cercetare propuse, cu scopul final de a adresa deficiențele de validare statistică existente actual, în ceea ce privește continuitatea monitorizării pacienților post-COVID; fenotipul de boală long COVID și evoluția naturală a acestuia; factorii de risc predispozanți pentru evoluția spre fenotipul long COVID; semnele inaugurale și parametrii clinici prevestitori ai evoluției cronice în infecția acută cu SARS-CoV-2; profilul imagistic cardio-pulmonar al afectării COVID-19 în fază acută și cronică; profilul biologic și modificările serologice în long COVID. Totodată, ne dorim ameliorarea capacităților clinice predictive și prognostice, printr-o componentă de cercetare fundamentală: analiza prospectivă a sensibilității și specificității unor biomarkeri circulanți moleculari emergenți (speciile de microARN), în vederea obiectivării adiționale a stratificării pe grupe de risc de a dezvolta long COVID-19. Considerăm că acest proiect este relevant, prin prisma abordării integrative (clinic și fundamental, retrospectiv și prospectiv), care va oferi o perspectivă unică asupra unui sindrom emergent și incomplet definit, long COVID-19. Posibilitatea elaborării unui scor clinic predictiv/prognostic, respectiv a unei investigații non-invasive și obiective de aceeași natură, este de o deosebită importanță, pentru a putea permite elaborarea unor strategii coezive de tratament și profilaxie.

3.1. Obiective principale:

- elaborarea unui scor clinic predictiv pentru evoluția cronică a infecției cu SARS-CoV-2 și validarea statistică retrospectivă a acestuia;
- caracterizarea clinică și paraclinică exhaustivă și integrativă a fenotipului de boală long COVID;
- caracterizarea relației dintre profilul biologic inflamator, parametrii de coagulare și fluctuațiile serologice al imunității dobândite anti-SARS-CoV-2, în evoluția naturală a long COVID;
- identificarea factorilor de risc implicați în etiopatogeneza long COVID;
- identificarea și validarea statistică a unui panel de biomarkeri moleculari predictivi (specii de microARN);
- elaborarea și validarea statistică a unui scor predictiv integrativ adițional, care să reunească componentele clinice și moleculare investigate individual și comparativ.

Finalmente, scopul acestui proiect este îmbunătățirea abilităților de management terapeutic al infecției cu SARS-CoV-2 prin facilitarea evaluării standardizate și obiective a riscului de progresie spre fenotipul long COVID din perioada acută, pentru a se putea interveni terapeutic precoce, respectiv profilactic.

3.2. Obiective secundare:

- raportarea și validarea statistică a datelor clinice și paraclinice referitoare la sindromul emergent long COVID;
- analiza statistică individuală și comparativă a rolului predictiv a multitudinii de parametri clinici și paraclinici incluși în baza de date a proiectului;
- analiza în dinamică a fluctuațiilor serologice/biologice ale răspunsului imun, funcției de coagulare și imunității dobândite anti-SARS-CoV-2;
- analiza statistică individuală și comparativă a rolului predictiv a celor 11 specii de microARN incluse în studiu, incriminate până în momentul de față, de către literatura de specialitate, ca fiind relevante în cadrul evoluției COVID-19: microARN-6501-5p, microARN-5695, microARN-29b-3p, microARN-133-a, microARN-618, microARN-16-2-3p, microARN-15b-5p, microARN-548c-5p, microARN-409-3p, microARN-505, microARN-30b-5p.

4. Metodologie

Proiectul de cercetare descris actual reprezintă apogeul unei activități investigative continue, întreprinsă încă de la început pandemiei, de către întreaga echipa de proiect, focusată pe evaluarea pacienților infectați cu SARS-CoV-2, în vederea elucidării patogenezei, factorilor de risc, complicațiilor și sechelor COVID-19. În ceea ce privește sindromul long COVID în mod specific, echipa de proiect a publicat deja, până în momentul de față, 6 lucrări in extenso [1-6], după cum urmează:

- „Evidence of pulmonary hypertension after SARS-CoV-2 infection in subjects without previous significant cardiovascular pathology”, Tudoran et al., 07.01.2021, revista Journal of Clinical Medicine, FI 4.242 Web of Science, citat de 17 ori, în care se evaluează 91 de pacienți prin ecocardiografie transtoracică (TTE) și se decelează creșterea presiunii sistolice estimate la nivelul arterie pulmonare, respectiv deformarea longitudinală globală a ventriculului drept, la pacienți fără istoric anterior de hipertensiune pulmonară (HTP), raportând o prevalență crescută pentru HTP (7.69%) și disfuncția de ventricul drept (10.28%), ca afectare cardio-pulmonară cronică, post-infecție acută cu SARS-CoV-2;
- “Associations between the severity of the post-acute COVID-19 syndrome and echocardiographic abnormalities in previously healthy outpatients following infection with SARS-CoV-2”, Tudoran et al., 26.05.2021, revista Biology, FI 5.079 Web of Science, citat de 9 ori, în care se decelează afectare cardiacă (HTP, disfuncție sistolică și diastolică) la ~25% dintre cei 150 de pacienți long COVID evaluați, fără patologie cardiacă preexistentă;
- “Alterations of left ventricular function persisting during post-acute COVID-19 in subjects without previously diagnosed cardiovascular pathology”, Tudoran et al., 22.03.2021, revista Journal of Personalized Medicine, FI 4.945 Web of Science, citat de 9 ori, în care, pe un lot de 125 de pacienți long COVID, cu vârste sub 55 de ani, se documentează prin TTE o prevalență de 8.8% pentru asocierea alterării funcției sistolice a ventriculului stâng cu disfuncție diastolică (16,8% doar disfuncție diastolică), iar aceste leziuni s-au corelat în severitate cu nivelurile inițiale ale creatinkinazei (CK-MB) și markerilor inflamatori;
- “Spontaneous Hematomas and Deep Vein Thrombosis during the Recovery from a SARS-CoV-2 Infection: Case Report and Literature Review”, Tudoran et al., 02.02.2022, revista Medicina, FI 2.43 Web of Science, în care se raportează un caz de hematom popliteal spontan, urmat de tromboză venoasă profundă și apoi hematom subpectoral și de gambă masiv, la un pacient de 76 de ani, fără coagulopatii preexistente, cu o formă ușoară de COVID-19, la o lună de zile de la faza acută paucisimptomatică;
- “Evolution of Echocardiographic Abnormalities Identified in Previously Healthy Individuals Recovering from COVID-19”, Tudoran et al., 04.01.2022, revista Journal of Personalized Medicine, FI 4.945 Web of Science, în care, un lot de 105 pacienți tineri (<55 de ani), fără patologie cardiacă preexistentă, cu sindrom long COVID, au fost

evaluați în evoluție (la 3 și 6 luni), și s-au identificat, prin TTE, următoarele anomalii cardiace: deficit funcțional ventricular stâng (35 de cazuri), presiune sistolică crescută la nivelul arterei pulmonare (51 de cazuri), disfuncție diastolică (66 de cazuri) și afectare pericardică/pericardită (23 de cazuri);

- "Factors Influencing the Evolution of Pulmonary Hypertension in Previously Healthy Subjects Recovering from a SARS-CoV-2 Infection", Tudoran et al., 12.11.2021, revista Journal of Clinical Medicine, FI 4.242 Web of Science, în care se evaluează pe o perioadă de 6 luni de zile, 116 de pacienți documentați cu HTP și/sau disfuncție ventriculară dreaptă, în cadrul sindromului long COVID, și se decelează persistența leziunilor pe termen lung la anumite cazuri, propunându-se ipoteza activării mecanismelor de autopropagare a HTP în cadrul fazei acute a COVID-19.

Ca o continuare naturală a investigațiilor anterioare, dorim să extindem adițional baza de date semnificativă statistic deja constituită (300 de cazuri), cu noi cazuri de long COVID, să continuăm monitorizarea pe termen lung a acestei cohorte și să integrăm datele clinice și paraclinice obținute, în vederea elaborării unui scor predictiv clinic, o unealtă clinică non-invazivă care să permită caracterizarea adecvată a grupelor de risc pentru long COVID-19. De asemenea, vom completa baza de date existentă cu noi investigații moleculare (determinarea speciilor de microARN anterior menționate prin qRT-PCR).

Limitările lucrărilor anterioare, care doresc a fi adresate de către proiectul de cercetare actual, sunt următoarele:

- Până în momentul de față, investigațiile publicate s-au axat exclusiv pe caracterizarea ecografică a afectării cardio-pulmonare în long COVID, însă datele emergente denotă o semiologie multiorganică complexă pentru acest nou sindrom, motiv pentru care ne dorim cuantificarea exhaustivă a diverselor modificări/leziuni asociate long COVID și caracterizarea clinică, biologică și imagistică a acestora.
- Niciuna dintre investigațiile întreprinse nu au abordat subiectul de mare interes reprezentat de posibilele unelte predictive în ceea ce privește evoluția spre o formă cronică, a infecției acute cu SARS-CoV-2;
- Puținii factori de risc identificați în investigațiile anterioare se referă la severitatea leziunilor în long COVID, care par a se corela cu severitatea formei acute, nefiind riguros evaluați statistic factorii constituționali, răspunsul inflamator, modificările parametrilor de coagulare și statusul imunității dobândite anti-SARS-CoV-2;
- Loturile de pacienți pe care s-au realizat studiile anterioare, deși statistic semnificative, sunt de dimensiuni reduse, motiv pentru care ne dorim validarea datelor publicate prin evaluarea unui lot mai extins.

Considerăm că atât lotul proiectului, cât și metoda investigativă, conferă un grad ridicat de originalitate inițiativei.

4.1. Protocol de elaborare a bazei de date

Acest proiect își propune să evalueze persoanele care au suferit o infecție confirmată cu virus SARS-CoV-2 și se prezintă după 3 până la 12 săptămâni de la episodul infecțios la un prim consult medical pentru simptome persistente, cum ar fi oboseală, dificultăți de respirație, disconfort toracic, palpitații și capacitatea redusă de efort, toți susținând că încă nu s-au atins starea lor sănătate anterioară COVID-19.

Criterii de includere:

- 1) vârsta de peste 18 ani, acceptul de a semna un consimțământ informat;
- 2) dovada prezenței unei infecții cu virus SARS-CoV-2 cu 3 până la 12 săptămâni înainte de acest studiu, certificată printr-un rezultat pozitiv al testului de reacție în lanț a polimerazei-transcriptază inversă (RT-PCR);
- 3) prezența unui bilet de externare din spital sau pentru cei neinternati a unei evaluări bazale COVID-19 incluzând evaluare clinică, radiologică - tomografică computerizată toracică (TCT) sau cel puțin radiografie toracică -, și biologică, incluzând hemoleucograma, proteina C reactivă (CRP), aspartat aminotransferaza (AST) și alanină aminotransferaza (ALT), creatinină, glicemie și, eventual D-dimeri, interleuchine, procalcitonină și feritină;
- 4) o evaluare medicală anterioară COVID-19 care să includă examen clinic, probe de laborator și, eventual, o electrocardiogramă (ECG) și o ecocardiografie transtoracică (TTE).

4.2. Protocol utilizat pentru evaluare clinică și paraclinică a cohorței

La prima evaluare, efectuată la 3 până la 12 săptămâni după episodul infecțios, se efectuează o anamneză atentă, notând statusul vaccinal, factorii de risc cardiovascular, un examen clinic detaliat cu măsurarea înălțimii, a greutateii corporale cu un cântar ce determină proporția de grăsime/apă și masa musculară, a circumferinței taliei, a tensiunii arteriale sistolice, diastolice și medii, a pulsului periferic. Se reexaminează evaluarea COVID-19 inițială și se reevaluează TCT pentru prezența imaginilor radiologice tipice, precum și severitatea leziunilor pulmonare inițiale pe baza unui scor de severitate în care leziunile <30% sunt considerate ușoare, cele între 30–60% leziuni moderate și peste 60% severe.

Ulterior, pacienții sunt recoltați sau programați pentru următoarele analize de laborator (anticorpi IgG anti-SARS-CoV-2, anticorpi neutralizanți anti-proteina Spike, glicemie bazală, creatinină, acid uric, profil lipidic, proteina C reactivă, IL-6, feritină, hemoglobina glicozilată pentru diabetici, TSH). După aceea se efectuează ECG și un TTE amănunțit, toate măsurătorile fiind efectuate conform recomandărilor ghidurilor europene și americane.

Examenul ecocardiografic include examinarea amănunțită a tuturor structurilor și funcției cardiace, inclusiv prezența unui revărsat pericardic și/sau a pericardului îngroșat de peste 4 mm sau între 2 și 4 mm, după care se efectuează următoarele evaluări:

- **Funcția sistolică a ventriculului stâng (VS)** se efectuează din incidențele standard, iar din vedere apicală 4 camere se determină:
 - fracția de ejeție a VS (FEVS); prin regula Simpson modificată, valorile sub 50% fiind considerate anormale;
 - măsurarea excursiei sistolice a planului lateral al inelului mitral (MAPSE), valorile < 10 mm fiind considerate patologice;
 - în Tissue Doppler (TDI), la nivelul inelului mitral se evaluează viteza fluxului sistolic - viteza (LV-S'); valorile sub 0,07 m/s fiind considerate anormale;
 - se realizează cuantificarea deformării longitudinale globale a VS (LV-GLS), din vedere apicală cu 2, 3 și 4 camere, regiunea de interes fiind generată automat, iar, după trasarea limitei endocardice a VS, se efectuează la nevoie corecții manuale pentru a ajusta grosimea peretelui miocardic VS [20–22]. Valorile peste -18% sugerează o afectare a funcției sistolice ale VS (LV-SF).
- **Evaluarea disfuncției diastolice a ventriculului stâng (DD)** cuprinde:
 - evaluarea indicelui de masă a ventriculului stâng (LVMI); valorile de peste 115 g/m² la bărbați și 95 g/m² pentru femei definesc hipertrofia ventriculară stângă (LVH);
 - indicele volumului al atrului stâng (LAVI); valorile peste 34 ml sunt considerate patologice;
 - în Doppler pulsatil, în incidență apicală 4 camere, se înregistrează fluxul mitral la nivelul inelului valvei mitrale și se analizează viteza maximă diastolică precoce (E) și viteza diastolică tardivă (A) și se calculează raportul E/A.
 - în TDI se înregistrează viteza diastolică precoce (e') și viteza diastolică tardivă la nivelul inelului mitral septal și lateral. Ulterior, se calculează o medie și raportul E/e'.

Tipul I de DD este definit printr-un raport E/A 0,8 și E < 50cm/Sec, în timp ce tipul III DD este confirmat de raportul E/A de peste 2. În cazul unui raport E/A < 0,8, dar cu un E de peste 50 cm/sec, sau dacă E/A este între 0.8 și 2, este luată în considerare existența unei DD de tip II care este certificată de prezența a cel puțin două dintre următoarele trei criterii: un raport mediu al E/e' > 14, LAVI > 34 mL/m² și/sau TRV > 2,8 m/sec. În cazurile în care doar unul dintre cele trei criterii menționate anterior sunt prezente se consideră DD de tip I.

- **Performanța ventriculului drept (RV)** va fi evaluată din incidență 4 camere și include:
 - măsurarea excursiei sistolice a planului inelului tricuspidian (TAPSE) la nivelul peretelui lateral al inelului valvei tricuspide în modul M, valorile < 17 mm definind disfuncția VD (RVD);
 - modificarea ariei fracționale de scurtare a VD (FAC), valorile < 35% fiind considerate patologice;
 - deformarea longitudinală globală RV (RV-GLS) efectuată din incidență 4 camere, valorile > - 28% certificând RVD;

- presiunea sistolică estimată din artera pulmonară (sPAP) se calculează pe baza vitezei maxime de regurgitare tricuspidiană (TRV), înregistrată în Doppler continuu, luând în considerare presiunea estimată din atrul drept, și de diametrul și variațiile respiratorii ale venei cave inferioare, considerându-se patologice valorile sPAP de peste 35 mmHg în repaus care definesc hipertensiunea pulmonară (HP), cu severități variind de la ușoară (35-45), la medie (45-60) și severă (peste 60 mmHg).

Scala statusului funcțional Post-COVID-19 (PCFS) este o metodă de evaluare dezvoltată pentru a evalua gradul de recuperare după COVID-19, unde 0 înseamnă „fără limitări și simptome”; 1—„limitări neglijabile ale activităților obișnuite cu simptome persistente”, 2—„ușoare limitări cu simptome semnificative”, 3—„limitări moderate și incapabile de a efectua toate activitățile obișnuite din cauza simptomelor, dar totuși capabil să aibă grijă de el/ea fără asistență” și 4—„limitare severă din cauza simptomelor și care necesită asistență pentru a se autoîngrijii”. Toți pacienții vor fi clasificați conform acestui sistem pentru a identifica severitatea limitărilor funcționale.

Chestionarul EQ-5D-5L QoL este un instrument de autoevaluare conceput de grupul EuroQoL care permite evaluarea cantitativă în 5 domenii legate de sănătate, inclusiv mobilitate, autoîngrijire, capacitatea de a efectua activități obișnuite, durere/disconfort și anxietate/depresie. Scorurile sunt un indicator al stării pacientului, pe baza scalei analogice vizuale EQ (VAS), cu puncte finale definite drept „Cea mai bună sănătate pe care v-o puteți imagina” și „Cea mai proastă sănătate pe care v-o puteți imagina” și cu 5 niveluri potențiale de severitate (fără probleme, probleme ușoare, moderate, probleme severe și probleme extrem de severe).

4.3. Selecția cazurilor și protocolul utilizat pentru evaluarea moleculară a biomarkerilor predictivi

MicroARN-urile reprezintă mici fragmente endogene, monocatenare, non-codante, de acid ribonucleic (ARN endogeni), cu o lungime de 6–8 nm și o secvență de 19–27 nucleotide, care sunt implicați în multe procese fiziologice și patologice precum hemostaza endotelială, fiind aparent implicate în bolile vasculare. COVID-19, prin receptorul de la nivelul celulei gazdă (enzima de conversie a angiotensinei 2) și dovezile emergente de modificări endoteliale extensive, cel puțin în fenotipurile severe de boală, reprezintă, a priori, o boală vasculară. Totuși, de la începutul pandemiei COVID-19 și până în prezent, doar câteva studii la nivel mondial au evaluat expresia microARN-urilor în probele biologice ale pacienților infectați cu SARS-CoV-2.

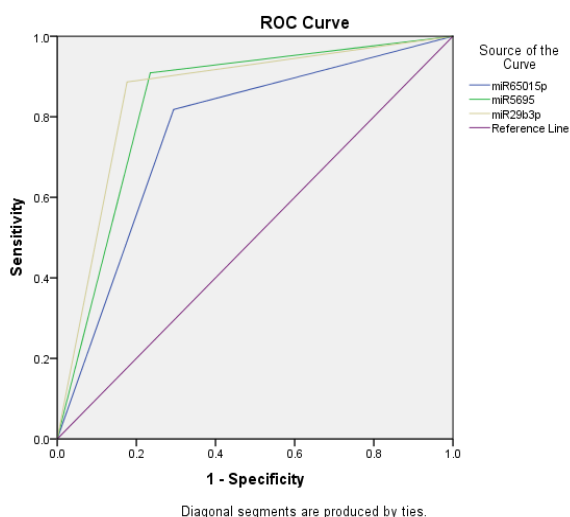


Figura 1. ROC/AUC pentru speciile de microARN

În momentul de față, o investigație retrospectivă postmortem (17 cazuri), a biomarkerilor moleculari (3 specii de microARN), elaborată de Cuț et al. [7], intitulată “Postmortem microRNAs signature as predictive markers in SARS-CoV-2 infection”, a fost acceptată pentru publicare de către revista Clinical Laboratory (ISSN 1433-6510), FI 1.138 Web of Science, și urmează a fi inclusă, în extenso, în următorul număr al revistei, care apare în martie 2022. Deși, în această lucrare inaugurală, lotul este foarte restrâns, iar speciile de microARN investigate sunt limitate, rezultatele statistice sunt promițătoare, în ceea ce privește identificarea precoce a posibilei evoluții infauste a infecției cu SARS-CoV-2 în faza acută, înspre un fenotip agresiv de boală. Expresia serologică a 3 specii de microARN (microARN-6501-5p, microARN-5695, microARN-29b-3p) a fost evaluată pentru cohorta de 17 pacienți cu pneumonie postmortem și infecție SARS-CoV-2 confirmată. S-a impus un prag de ciclurile replicative, probele cu peste 35 de cicluri nu au fost luate în considerare pentru acest studiu. Expresia microARN a fost calculată folosind formula $2^{-\Delta Ct}$, unde ΔCt = gena țintă – pragul replicativ de referință pentru gena respectivă [29]. Curba caracteristică a operatorului receptor (ROC) a fost anonimată pentru a determina sensibilitatea și specificitatea speciilor de microARN [30]. Analiza ROC a relevat potențialul celor 3 microARN-uri ca biomarkeri predictivi în evaluarea cazurilor COVID-19, cu aria de sub curba de funcționare a receptorului (AUC) după cum urmează:

microARN-6501-5p=0,762; microARN-5695=0,837 și microARN-29b-3p=0,855. Valoarea combinată AUC a fost de 0,985, o valoare mult mai mare decât fiecare microARN individual, dovedind astfel puterea de discriminare mai mare a panelului de 3 specii. Figura 1 prezintă valorile AUC pentru fiecare microARN individual.

În Italia, Musso et al. [8] au descoperit că analiza post-mortem a expresiei microARN, la cazurile fatale de COVID-19, este posibilă după un interval post-mortem îndelungat (24 de zile până la 78 de zile), cu mențiunea că, pentru această investigație, s-au utilizat probe tisulare pulmonare, obținute în cadrul autopsiei, înainte de a fi fixate cu formol. În Brazilia, Centa et al. [9] au demonstrat că, pe biopsiile pulmonare post-mortem ale pacienților infectați cu SARS-CoV-2, expresia microARN este diminuată, fiind asociată cu o disfuncție endotelială subiacentă. În unele studii, microARN-urile au fost investigate prin comparație cu răspunsul inflamator, deoarece este bine știut faptul că aceste secvențe circulante sunt implicate în căile de semnalizare asociate cu activarea endotelială, mecanism causal al leziunilor alveolare difuze caracteristice COVID-19. Doar câteva grupuri de cercetare au realizat corelații între microARN și markerii inflamatori. Unele grupuri de cercetare au demonstrat prin lucrările lor că, la pacienții COVID-19, nivelurile de microARN se corelează cu markeri inflamatori precum interleukina-1 (IL-1), interleukina-6 (IL-6) și interleukina-8 (IL-8) [10-11]. Pe deasupra, Mishra et al. au concluzionat în studiul lor că pacienții infectați cu SARS-CoV-2 care au diabet au un risc crescut de insuficiență cardiacă din cauza diminuării expresiei serologice și, implicit, a rolului cardio-protector, pentru microARN-133-a [12-13]. De asemenea, Li et al. au raportat că speciile microRNA-618, microRNA-16-2-3p și microRNA-6501-5p au fost supraexprimate la pacienții cu SARS-CoV-2 în comparație cu subiecții de control [13]. În final, Fulzele et al., au demonstrat că speciile microARN-15b-5p, microARN-548c-5p, microARN-409-3p, microARN-505 și microARN-30b-5p sunt supraexprimați în probele biologice ale pacienților cu COVID-19, față de lotul control [14].

În studiul de față, utilizând baza de date existentă, la care se vor adăuga cazurile noi, decelate pe parcursul perioadei de implementare de 2 ani, dorim să definim 3 subgrupuri: pacienți COVID-19 cu simptomatologie persistentă la externare, la 3 luni și la 6 luni. Aceste populații vor fi evaluate în dinamică, din punct de vedere al expresiei speciilor emergente de microARN, raportate în literatură ca fiind implicate în patogeniza COVID-19, în probe de sânge venos periferic, pentru a decela rolul predictiv al elementelor individuale și, cumulativ, a panelului prestabilit, în vederea identificării unei unelte moleculare noi, de evaluare a riscului de progresie a infecției SARS-CoV-2 spre un fenotip cronic, respectiv de evaluare a prognosticului leziunilor deja constituite. Un lot control de pacienți trecuți prin boală, fără sindrom long COVID rezidual, va fi utilizat ca martor.

4.3.1. Procesarea probelor de sânge periferic, în vederea cuantificării expresiei de microARN

Următoarele etape vor fi parcurse în vederea evaluării moleculare a probelor biologice descrise anterior:

1. Pre-procesarea probelor biologice

Extracția automată a microARN-urilor va fi efectuată pe Maxwell RSC 48 (Promega, SUA). Ca prim pas, se prepară soluția de DNază I, amestecând 275 μ L de apă fără nuclează, cu DNază I liofilizată. Se adaugă 5 μ L de colorant albastru la soluția reconstituită de DNază I. Urmând recomandarea producătorului, am adăugat 80 μ L de Proteinază K și 230 μ L de tampon de liză C la fiecare 200 μ L de ser și le-am amestecat timp de 5 secunde.

2. Extracția automată a ARN-ului

Se vor incuba probele biologice într-un Eppendorf Thermo Mixer C (Eppendorf, Germania), timp de 15 minute, la 37°C. Tot lizatul va fi apoi transferat în godeul 1 al cartușelor Maxwell 48 RSC, adăugându-se, în godeul 4 al cartușelor, 10 μ L de soluție albastră DNază I. Se vor plasa cartușele în tavă și se vor adăuga 50 μ L de apă fără nucleaze pe fundul fiecărui tub de eluție.

3. Reacția în lanț a polimerazei cu transcripție inversă (RT-PCR)

Mai departe, ARN-ul suferă un proces de transcripție inversă și este amplificat pe un sistem Pro-Flex PCR (Thermo Fischer, SUA), folosind teste TaqMan pentru microARN-xxxx (Thermo Fischer, SUA). RNU48 va fi utilizat ca test de control pozitiv (Thermo Fischer, SUA). Kitul de transcripție inversă TaqMan MicroRNA (Thermo Fischer, SUA) va fi utilizat pentru a prepara amestecul de reacție, așa cum este menționat în Tabelul 1.

În continuare, se amestecă 7 µL de amestec de reacție RT cu 5 µL de ARN total într-un tub de reacție PCR și se centrifugează pentru scurt timp. La final, se adaugă 3 µL de 5xRT Primer în fiecare tub de reacție. Recomandările producătorului trebuie urmate întocmai pentru partea de RT.

Componente	Volum(µL)/reacție
100mM dNTPs (with dTTP)	0.15µL
Multi Scribe Reverse Transcriptase, 50 U/µL	1.00µL
10 x Reverse-transcription Buffer	1.50µL
RNase Inhibitor, 20 U/µL	0.19µL
Nuclease-free water	4.16µL

Tabel 1 – Amestec de reactivi pentru PCR

Reactiv	Volum(µL)/reacție
TaqMan Small RNA assay (20x)	0.50 µL
TaqMan PCR Master mix	5.00µL
Nuclease-free water	3.84µL

Tabel 2 – Amestec de reactivi pentru qPCR

4. Amplificare cantitativă prin reacția în lanț a polimerazei (qPCR)

Pentru a trece la etapa de amplificare PCR, se va pregăti soluția PCR master mix, așa cum este descrisă în Tabelul 2. Volumul final de reacție va fi transferat într-o placă PCR cu 96 de godeuri, după care se vor adăuga 1,33 µL de cDNA la fiecare placă de reacție, iar placa PCR va fi introdusă în 7500 ABI real-time PCR pentru amplificarea qPCR.

5. Rezultate estimate intermediare/finale

Așadar, până în momentul de față, în urma investigațiilor anterioare întreprinse, am creat o bază de date de 300 de cazuri de long COVID, care se află sub programul de monitorizare detaliat anterior. Dorim să integrăm datele colectate, în vederea elaborării unei caracterizări temeinice a fenotipurilor de boală long COVID, determinării factorilor de risc pentru evoluția nefavorabilă a leziunilor long COVID, validării unui scor clinic pentru evoluția cronică a infecției SARS-CoV-2, stabilirea eventualelor corelații între parametrii biologici inflamatori, gradul de imunitate dobândită, parametrii de coagulare și evoluția long COVID, la care se adaugă componenta adițională de cercetare fundamentală, respectiv evaluarea expresiei a 11 specii de microARN, frecvent implicate în patogeniza COVID-19, pe probe de sânge periferic, de la pacienți long COVID, în diverse stadii evolutive.

Ca rezultate preliminare, accentuăm caracterizarea meticuloasă, în dinamică, a modificărilor ecografice cardio-pulmonare asociate long COVID-19, raportată în lucrările publicate anterior. Actualmente, elaborăm o lucrare adițională, pe tema sindromul metabolic ca factor de risc pentru apariția long COVID (“Metabolic disease and COVID-19, a risk assessment”), pentru revista International Journal of Molecular Sciences, FI 5.924 Web of Science, în care raportăm retrospectiv corelațiile statistice identificate, între elementele individuale ale sindromului metabolic, sindromul metabolic în sine și fenotipurile cronice de COVID-19, utilizând baza de date deja constituită.

În cazul unui răspuns favorabil din partea dvs., vom finaliza articolul anterior, cu menționarea afilierii dobândite, și vom începe recoltarea probelor adiționale de sange periferic, în vederea evaluării moleculare, conform metodologiei detaliate anterior și deja utilizată pe probe postmortem. În paralel, vom continua omogenizarea, extinderea și procesare statistică a bazei de date existente, cu raportarea rezultatelor obținute în jurnale cu factor de impact similar cu cel al revistei menționate anterior, adresând următoarele subiecte distincte, prin lucrări individuale:

- fenotipurile de long COVID;
- factorii de risc implicați în progresia infecției SARS-CoV-2 spre cronicizare, respectiv long COVID;
- relația dintre profilul biologic inflamator, parametrii de coagulare, fluctuațiile serologice al imunității dobândite anti-SARS-CoV-2 și evoluția long COVID;

- scor clinic de stratificare a riscului de evoluție cronică pentru infecția cu SARS-CoV-2;
- speciile de microARN cu rol predictiv al apariției, respectiv prognostic al evoluției long COVID;
- integrarea elementelor prognostice clinice și moleculare într-un scor unitar.

În funcție de rezultatele investigațiilor, noi teme de raportare vor putea fi investigate, odată ce date sunt colectate și procesate individual și statistic.

6. Articole estimate a fi elaborate cu indicarea factorului de impact minim al revistei unde vor fi publicate

Pe lângă articolele originale ce urmează a fi indicate în Tabelul 3, cohorta extensivă, numărul mare de investigații și arealul larg al tematicii multifacetate, va permite în mod sigur realizarea a multiple lucrări tip „review”.

Tabel 3 – Articole propuse a fi publicate în urma finanțării

	Titlu	Revista	Factor de impact	Termen limită	Termen propus
1.	Metabolic disease and COVID-19, a risk assessment.	International Journal of Molecular Sciences. Special Issue " COVID-19, Diabetes, Obesity and Cardiometabolic Alterations: Recent Findings and Future Perspectives ".	5.924	31.03.2022	31.03.2022
2.	Long COVID disease phenotypes and associated risk factors.	Biomedicines (ISSN 2227-9059). Special Issue "10th Anniversary of Biomedicines— Immunometabolism: Molecular Cross-Roads between Endogenous and Viral Pathology"	6.081	15.11.2022	30.09.2022
3.	The relationship between immune response, coagulopathy, fluctuation in acquired immunity and long COVID evolution.	Biomedicines (ISSN 2227-9059). Special Issue "10th Anniversary of Biomedicines— Immunometabolism: Molecular Cross-Roads between Endogenous and Viral Pathology"	6.081	15.11.2022	30.11.2022
4.	Molecular biomarkers for predicting chronic evolution of SARS-CoV-2 infection and prognosis in long COVID.	În funcție de tematicile ce urmează a fi afișate pentru anul 2023, International Journal of Molecular Sciences (FI 5.924); Viruses (FI 5.048); Biomedicines (FI 6.081); sau Journal of Clinical Medicine (FI 4.242); Pathogens (FI 3.492); ca alternative.			
5.	Integrative clinical and molecular risk assesment score for long COVID.				

Având în vedere experiența anterioară în domeniul de cercetare al echipei de proiect, suntem încrezători în a garanta publicarea a cel puțin 3 articole originale până la finalul anului 2022, cu factor de impact de aprox. 5 (Web of Science) în medie, urmând ca următoarele 2 articole originale să fie publicate în cursul anului 2023. În ceea ce privește perioadele de raportare ale proiectului, ne angajăm să obținem următoarele rezultate:

- **30 iulie 2022** – minim **un articol** publicat in extenso;
- **5 decembrie 2022** – minim **3 articole** publicate in extenso;

- 30 iunie 2023 – minim **4 articole** publicate in extenso;
- 4 decembrie 2023 – minim **5 articole** publicate in extenso.

7. Bibliografie

1. Tudoran, C.; Tudoran, M.; Lazureanu, V. E.; Marinescu, A. R.; Pop, G. N.; Pescariu, A. S.; Enache, A.; Cut, T. G. Evidence of Pulmonary Hypertension after SARS-CoV-2 Infection in Subjects without Previous Significant Cardiovascular Pathology. *Journal of clinical medicine* **2021**, *10* (2), 199.
2. Tudoran, C.; Tudoran, M.; Pop, G. N.; Giurgi-Onu, C.; Cut, T. G.; Lazureanu, V. E.; Oancea, C.; Parv, F.; Ciocarlie, T.; Bende, F. Associations between the Severity of the Post-Acute COVID-19 Syndrome and Echocardiographic Abnormalities in Previously Healthy Outpatients Following Infection with SARS-CoV-2. *Biology* **2021**, *10* (6), 469.
3. Tudoran, M.; Tudoran, C.; Lazureanu, V. E.; Marinescu, A. R.; Pop, G. N.; Pescariu, A. S.; Enache, A.; Cut, T. G. Alterations of Left Ventricular Function Persisting during Post-Acute COVID-19 in Subjects without Previously Diagnosed Cardiovascular Pathology. *Journal of Personalized Medicine* **2021**, *11* (3), 225.
4. Spontaneous Hematomas and Deep Vein Thrombosis during the Recovery from a SARS-CoV-2 Infection: Case Report and Literature Review,
https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=ro&user=co4kM9QAAAAJ&citation_for_view=co4kM9QAAAAJ:dTyEYWd-f8wC.
5. Tudoran, C.; Tudoran, M.; Cut, T. G.; Lazureanu, V. E.; Oancea, C.; Marinescu, A. R.; Pescariu, S. A.; Pop, G. N.; Bende, F. Evolution of Echocardiographic Abnormalities Identified in Previously Healthy Individuals Recovering from COVID-19. *Journal of Personalized Medicine* **2022**, *12* (1), 46.
6. Tudoran, C.; Tudoran, M.; Lazureanu, V. E.; Marinescu, A. R.; Cut, T. G.; Oancea, C.; Pescariu, S. A.; Pop, G. N. Factors Influencing the Evolution of Pulmonary Hypertension in Previously Healthy Subjects Recovering from a SARS-CoV-2 Infection. *Journal of Clinical Medicine* **2021**, *10* (22), 5272.
7. Cut, T.; Dumache, R.; Novacescu, D.; Marinescu, A.; Lazureanu, V.; Paul, C.; Voicu, M.; Dobrescu, A.; Enache, A. Postmortem microRNAs signature as predictive markers in SARS-CoV-2 infection. *Clinical Laboratory* **2022**, preprint (release date 03.2022).
8. Musso N, Falzone L, Stracquadanio S, et al. Post-Mortem Detection of SARS-CoV-2 RNA in Long-Buried Lung Samples. *Diagnostics (Basel)* **2021**, *24*;11(7):1158. PMID 34202678.
9. Centa A, Fonseca A, Da Silva Ferreira S, 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* **2020** Dec 2;320(3):L405-L412. PMID 33651636.
10. Marques-Rocha JL, Samblas M, Milagro FI, et al. Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation related diseases. *FASEB J* **2015**; *29*(9):3595–61. PMID: 26065857.
11. Mehta P, McAuley DF, Brown M, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* **2020**; *395*:1033–1034. PMID: 32192578.
12. Mishra PK, Tandon R, Byrareddy SN. Diabetes and COVID-19 risk: a microRNA perspective. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2020**; *319*:H604–H9. PMID: 32762561.
13. Li C, Hu X, Li L, et al. Differential microRNA expression in the peripheral blood from human patients with COVID-19. *J Clin Lab Anal* **2020**; *34*(10): e23590. PMID: 32960473.
14. Fulzele S, Sahay B, Yusufu I, et al. COVID-19 virulence in aged patients might be impacted by the host cellular microRNAs abundance/profile. *Aging Dis* **2020**; *11*:509–522. PMID: 32489698.

8. Suma solicitată: 60000 RON

B.2. Titlu și rezumat în limba engleză (max. 10 rânduri) :

TITLE: „Clinical characteristics, pathogenesis and predictive molecular biomarkers in long COVID”

Abstract: In the current research project, we aim to extensively characterize an emerging disease, long COVID, from a clinical, biological and paraclinical perspective, defining clear phenotypes of organ system involvement. Risk factors, both for the occurrence and persistence of long COVID, will be meticulously evaluated

and statistically verified. The relationship between immune response, coagulopathy, fluctuations in acquired immunity and long COVID evolution will be investigated. An integrative clinical predictive score for chronic evolution of COVID-19 will be elaborated and statistically verified. Molecular biomarkers (11 species of microRNA) for predicting chronic evolution of SARS-CoV-2 infection and prognosis in long COVID will be evaluated on peripheral blood samples. After statistical validation of the microRNA panel, we plan to unify all intermediary finds related to predicting long COVID into an innovative clinical tool, a novel compound score (clinical and molecular), which will hopefully offer a better predictive power than the sum of its parts.