



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Renan Vinícius da Silva

**ANÁLISES *IN SILICO* PARA INVESTIGAÇÃO DE AGENTES INFLAMATÓRIOS  
EM CÉLULAS DAS VIAS AÉREAS INFECTADAS COM SARS-COV-2 E  
REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA A COVID-19.**

Florianópolis  
2023

Renan Vinícius da Silva

**ANÁLISES *IN SILICO* PARA INVESTIGAÇÃO DE AGENTES INFLAMATÓRIOS  
EM CÉLULAS DAS VIAS AÉREAS INFECTADAS COM SARS-COV-2 E  
REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA A COVID-19.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Edroaldo Lummertz da Rocha

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Renan Vinícius da  
ANÁLISES IN SILICO PARA INVESTIGAÇÃO DE AGENTES INFLAMATÓRIOS  
EM CÉLULAS DAS VIAS AÉREAS INFECTADAS COM SARS-COV-2 E  
REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA A COVID-19. / Renan Vinícius  
da Silva ; orientador, Edroaldo Lummertz da Rocha, 2023.  
110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Reposicionamento de fármacos. 3.  
COVID-19. 4. Tempestade inflamatória. 5. Biologia de sistemas. I.  
Rocha, Edroaldo Lummertz da. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.  
Título.

Renan Vinícius da Silva

**ANÁLISES *IN SILICO* PARA INVESTIGAÇÃO DE AGENTES INFLAMATÓRIOS EM  
CÉLULAS DAS VIAS AÉREAS INFECTADAS COM SARS-COV-2 E  
REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS PARA A COVID-19.**

O presente trabalho em nível mestrado foi avaliado e aprovado em 29/03/2023 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Daniel Santos Mansur, Dr.  
Instituição (Universidade Federal de Santa Catarina)

Prof. Glauber Wagner, Dr.  
Instituição (Universidade Federal de Santa Catarina)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Edroaldo Lummertz da Rocha, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2023.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao longo de todo o período para a elaboração deste trabalho, pude contar com o apoio e a ajuda de pessoas e entidades das quais, sem elas, não teria chegado até aqui. Agradeço primeiramente ao meu orientador, o Prof. Dr. Edroaldo Lummertz da Rocha, por todo o aprendizado e conhecimento compartilhado que me guiou sob uma área da pesquisa científica que me era nova, pela visão crítica ao decorrer das etapas do projeto que me ajudou a discernir as melhores decisões, por toda a paciência, compreensão e apoio para além do cabível, o que me faz admirá-lo como profissional e ser humano.

Agradeço também à equipe do laboratório pelo suporte e disposição nos momentos de dúvidas, pelas discussões que somaram à construção do escopo do projeto e que me ajudaram a compreender melhor os detalhes no âmbito da programação: Giovanni Crestani, Marrick Starick, Rafael Peixoto, Marcelo Falchetti, Mylla Dimas, Breno Corã e Ana Elisa Orsi.

Ao programa de pós-graduação em farmacologia como um todo, a todos os professores e colegas de aula, pelo aprendizado mútuo e a troca de experiências durante as disciplinas e os trabalhos em grupo, que agregaram ao meu lado profissional e pessoal, agradeço pelos ensinamentos que me foram importantes na execução deste projeto.

Aos funcionários e técnicos do CCB dos quais direta ou indiretamente precisei do suporte e auxílio, assim como ao suporte técnico da SeTIC, que mesmo em período pandêmico foram sempre atenciosos quando precisei.

E por fim, agradeço ao órgão de fomento à pesquisa da CAPES e à UFSC pelos recursos e a estrutura concedida que foram de vital importância para a continuidade do trabalho e para o livre exercício da vivência acadêmica.

## RESUMO

A COVID-19 é uma doença viral sistêmica causada pelo SARS-CoV-2, a qual tornou-se responsável pela recente pandemia que infectou milhões de pessoas no Brasil e no mundo. Em seu estágio grave, a COVID-19 gera um quadro de insuficiência respiratória resultado de um evento denominado tempestade inflamatória. Para melhor compreender o microambiente de infecção, a biologia de sistemas junto do sequenciamento de RNA em células únicas (scRNA-seq) compõem ferramentas promissoras na área. O objetivo deste trabalho busca identificar marcadores biológicos e fatores de transcrição associados com a inflamação na COVID-19, a partir de análises *in silico* de células infectadas das vias aéreas superiores (NS) e inferiores (BALF), para eleição de opções terapêuticas. A metodologia utilizou-se de dados de amostras disponíveis em bancos de dados de scRNA-seq, com análises conduzidas no RStudio utilizando o pacote de programação FUSCA e os algoritmos do CellRouter e Celcomm, além dos recursos do DrugBank para o reposicionamento de fármacos. Utilizando o CellRouter, foram identificados 24 clusters celulares para NS e 19 para o BALF, sendo o cluster FOXN4 específico para amostras infectadas. Os genes diferencialmente expressos revelaram células ciliadas anômalas envolvidas com a inflamação, assim como a expressão de MUC5AC/MUC5B, potenciais alvos para o anti-inflamatório ibudilast. A inferência da trajetória celular apresentou em sua maioria genes envolvidos na diferenciação celular (FOXJ1), com predominância em células infectadas. Nas células imunológicas várias citocinas/quimiocinas foram expressas, como IL-8, IL-17A, IL-1 $\beta$ , CCL5 (associado à linfopenia) e CXCL10 (indutor apoptótico), sugerindo o uso de fármacos inibidores de interleucinas, como o ixekizumab e o reparixin. Nesse contexto, o emricasan é um fármaco inibidor da CASP3 identificado com possível aplicação clínica. A relativa baixa expressão de ACE-2 pode ser justificada pelo estímulo de interferons (via STAT1) e da co-dependência de CTSL/TMPRSS2 para sua total funcionalidade, evidenciando o fostamatimib como fármaco de interesse (inibidor de CTSL). Já para os genes do extravasamento vascular, destacou-se o VEGFA e o ITGB1, envolvidos na intercomunicação de células imunológicas. Utilizando o CellComm, observou-se as interações celulares entre grupos, com maior intensidade entre macrófagos e neutrófilos no BALF. Vários pares de ligante-receptores foram destacados para NS, como o CCL5/CCR1, de ação pró-inflamatória, com outros alvos em potencial ainda pouco explorados. Para o BALF destacou-se o ANXA1/FPR1, o NAMPT/INSR, além de outros pares potenciais. Dada a importância do CCL5/CCR1, o ceniciviroc foi apontado como um antiviral de possível aplicabilidade. Os principais fatores de transcrição previstos para NS foram o RUVBL2 (respostas pró-inflamatórias de macrófagos) em células ciliadas, e o HMGB1 (inibição da fagocitose e regulação de IL-1 $\beta$ .) em nrMa. Logo, o fármaco anakinra foi proposto devido sua função inibitória de IL-1. Já no BALF, pode-se destacar para células secretoras o fator EGFR, enquanto que para os macrófagos o fator NLRP3, ambos agindo na inflamação e tendo como fármacos propostos o dapansutrile (anti-NLRP3) e o nimotuzumab (anti-EGFR). Esses resultados auxiliam a compreender a complexidade celular sob infecção do SARS-CoV-2, aprofundando sobre as interações celulares para a eleição de agentes com potencial terapêutico, e estabelecendo relações a serem exploradas em futuras pesquisas.

**PALAVRAS-CHAVE:** COVID-19; SARS-CoV-2; scRNA-seq; biologia de sistemas; nasofaringe; BALF; tempestade de citocinas; reposicionamento de fármacos.

## ABSTRACT

COVID-19 is a systemic disease caused by SARS-CoV-2 virus which became responsible for the recent pandemic that infected millions of people worldwide. In its severe stage, COVID-19 generates respiratory failure as a result of an event called inflammatory storm. To better understand the microenvironment of infection, systems biology together with single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) constitute promising tools in the area. The aim of this project seeks to identify gene markers and transcription factors associated with inflammation in COVID-19, based on analyzes *in silico* of infected cells from the upper (NS) and lower (BALF) airways, for the selection of therapeutic targets. The methodology used data from samples available in scRNA-seq databases, with analyzes conducted in RStudio using the FUSCA programming package and the CellRouter and Celcomm algorithms, in addition to DrugBank resources for drug repositioning. Using CellRouter, 24 cell clusters were identified for NS and 19 for BALF, with the FOXN4 cluster being specific for infected cells. The differentially expressed genes revealed anomalous ciliated cells involved in inflammation, as well as the expression of MUC5AC/MUC5B, potential targets for the anti-inflammatory drug ibudilast. The inference of the cell trajectory showed mostly genes involved in cell differentiation (FOXJ1), with predominance in infected cells. In immune cells, several cytokines/chemokines were expressed, such as IL-8, IL-17A, IL-1 $\beta$ , CCL5 (associated with lymphopenia) and CXCL10 (apoptotic inducer), suggesting the use of interleukin inhibitor drugs, such as ixekizumab and or reparixin. In this context, emricasan is a CASP3 inhibitor drug identified with possible clinical application. The relative low expression of ACE-2 can be explained by the stimulation of interferons (via STAT1) and the co-dependency of CTSL/TMPRSS2 for its complete functionality, highlighting fostamatimib as a drug of interest (CTSL inhibitor). As for the vascular extravasation genes, it can be pointed VEGFA and ITGB1, involved in intercommunication of immune cells. Using CellComm, cellular interactions were observed between groups, with greater intensity between macrophages and neutrophils in BALF. Several pairs of ligand-receptors were highlighted for NS, such as CCL5/CCR1, with pro-inflammatory action, with other potential targets still little explored. For BALF, it was highlighted ANXA1/FPR1, NAMPT/INSR, and other potential pairs. Given the importance of CCL5/CCR1, cenicriviroc was identified as an antiviral with possible applicability. The main predicted transcription factors for NS were RUVBL2 (pro-inflammatory macrophage responses) in ciliated cells, and HMGB1 (inhibition of phagocytosis and IL-1 $\beta$  regulation.) in nrMa. Therefore, the drug anakinra was proposed due to its IL-1 inhibitory function. In BALF, the EGFR factor can be highlighted for secretory cells, while for macrophages it can be the NLRP3 factor, both acting in inflammation and having as proposed drugs dapansutrile (anti-NLRP3) and nimotuzumab (anti-EGFR). These results help to understand the cellular complexity under the SARS-CoV-2 infection, deepening the cellular interactions for the election of drugs with therapeutic potential, and establishing features to be explored in future research.

**KEY-WORDS:** COVID-19; SARS-CoV-2; scRNA-seq; systems biology; nasopharynx; BALF; cytokine storm; drug repositioning.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organização genômica do SARS-COV-2.....	17
Figura 2 - Mecanismo de entrada viral na célula hospedeira.....	18
Figura 3 - O processo de tempestade inflamatória causada pela COVID-19.....	22
Figura 4 - Abordagens de reposicionamento de fármacos.....	28
Figura 5 - Mecanismos de interpretação de dados de scRNA-seq.....	33
Figura 6 - Fluxograma do da metodologia do estudo.....	41
Figura 7 - Grupos celulares presentes nas amostras de nasofaringe (NS) para cada estágio da doença via técnica de redução dimensional UMAP.....	44
Figura 8 - Grupos celulares presentes nas amostras de fluido do lavado broncoalveolar (BALF) e escovagem brônquica protegida (PSB) via técnica de redução dimensional UMAP.....	45
Figura 9 - Proporção dos tipos celulares identificados em cada grupo amostral.....	46
Figura 10 - <i>Heatmaps</i> dos genes diferencialmente expressos em células epiteliais das amostras.....	48
Figura 11 - Gráfico dotplot dos principais genes expressos em células epiteliais.....	49
Figura 12 - <i>Heatmaps</i> dos genes diferencialmente expressos em células imunológicas das amostras.....	50
Figura 13 - Gráfico dotplot dos principais genes expressos em células imunológicas.....	51
Figura 14 - Trajetórias de diferenciação celular e seus genes marcadores.....	53
Figura 15 - Gráfico de expressão dos principais genes marcadores da trajetória a partir do score GRN.....	54
Figura 16 - Expressão gênica dos acopladores virais.....	55
Figura 17 - Gráfico dotplot de expressão gênica de agentes inflamatórios.....	57
Figura 18 - Gráfico violino da expressão gênicas de marcadores de apoptose nas amostras de pacientes infectados com COVID-19 por grau da doença.....	58
Figura 19 - Comunicação célula-célula em amostras de NS totais e no grupo moderado da doença.....	59
Figura 20 – Comunicação célula-célula em amostras de NS no estágio grave da doença e no grupo amostral do BALF.....	60

Figura 21 – Interação celular dos principais pares de ligantes-receptores relacionados com a progressão da doença.....	62
Figura 22 - Análise de predição das vias de sinalização para células da NS.....	63
Figura 23 - Análise de predição das vias de sinalização para células do BALF.....	64

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Relação entre os sintomas e estágios da COVID-19.....	19
Quadro 2 – Exemplos de fármacos reposicionados e suas novas aplicações.....	26
Quadro 3 – Exemplos de fármacos avaliados para o tratamento da COVID-19.....	31
Quadro 4 – Relação das drogas sugeridas com potencial terapêutico para tratamento da COVID-19.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Enzima conversora de angiotensina
ACE-2	Enzima conversora de angiotensina-II
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
BALF	Fluido do lavado broncoalveolar
CIVD	Coagulação vascular disseminada
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CTL	Célula T citotóxica
CTSL	Catepsina L
DC	Célula dendrítica
EGA	<i>The European Genome-phenome Archive</i>
ERK1/2	Quinase regulada por sinal extracelular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FUSCA	<i>Framework for unified single-cell analysis</i>
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
HCA	Atlas celular humano
IL	Interleucina
IMPDH	Inosina monofosfato desidrogenase
IFN	Interferon
IRC	Célula responsiva a interferon
ISG	Gene estimulado por interferon
JAK	Janus quinase
KNN	K-vizinhos mais próximos
MC	Mastócito
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MERS	Síndrome respiratória do Oriente Médio
MoDC	Célula dendrítica derivada de monócito
NF-kB	Fator nuclear <i>kappa beta</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
nrMa	Macrófago não residente
NS	Nasofaringe
OMS	Organização mundial de saúde

ORF	Fase de leitura aberta
PC	Célula plasmática
PCA	Componente principal de análise
pDC	Célula dendrítica plasmocitoide
PSB	Escovagem brônquica protegida
RBD	Domínio de ligação ao receptor
Rdrp	RNA dependente de RNA polimerase
rMa	Macrófago residente
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SARS	Síndrome aguda respiratória grave
ScRNA-seq	Sequenciamento de RNA de célula única
sIL-6Ra	Receptor solúvel de interleucina 6
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TMPRSS2	Proteína serina transmembranar do tipo II
Treg	Célula T regulatória
t-SNE	Incorporação estocástica de vizinhos distribuídos em t
UMAP	Aproximação e projeção de variedade uniforme
UTI	Unidade de tratamento intensivo
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VOC	Variante de preocupação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
1.1	A PANDEMIA DE COVID-19 E O SARS-COV-2	15
1.2	A TEMPESTADE INFLAMATÓRIA	21
1.3	REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS	24
1.3.1	Uso off-label de fármacos	24
1.3.2	Tipos de abordagens	25
1.3.3	Aplicações na pandemia	28
1.4	BIOLOGIA DE SISTEMAS E O SEQUENCIAMENTO DE RNA DE CÉLULA ÚNICA	32
1.5	CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTE TRABALHO	35
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	36
2.1	OBJETIVO GERAL	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	37
3.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	37
3.2	PROCESSAMENTO DOS DADOS	37
3.3	REDUÇÃO DIMENSIONAL E AGRUPAMENTOS CELULARES	38
3.4	ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	38
3.5	INFERÊNCIA DA TRAJETÓRIA CELULAR E SEUS PRINCIPAIS GENES MARCADORES	38
3.6	ANÁLISE DE COMUNICAÇÃO CELULAR	39
3.7	SELEÇÃO DE DROGAS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO	41
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	43
4.1	GRUPOS CELULARES IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS	43
4.2	PERFIS GÊNICOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE AS AMOSTRAS	46
4.3	TRAJETÓRIA DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS E SEUS MARCADORES DE TRANSCRIÇÃO	52
4.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES FACILITADORES DO ACOPLAMENTO VIRAL	55

4.5	NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE QUIMICIONAS E CITOCINAS NAS VIAS RESPIRATÓRIAS.....	56
4.6	COMUNICAÇÃO CELULAR.....	58
4.7	DROGAS ELEITAS DE POSSÍVEL USO PARA O TRATAMENTO DA COVID-19.....	65
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	67
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	79
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80
	<b>APÊNDICE A – CÓDIGO UTILIZADO PARA A EXECUÇÃO DAS ETAPAS DESCRITAS NA METODOLOGIA DO TRABALHO</b> .....	95
	<b>APÊNDICE B – QUADRO COM OS GRUPOS CELULARES EPITELIAIS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS DE NS E PSB+BALF E SEUS PRINCIPAIS DEZ GENES EXPRESSOS</b> .....	104
	<b>APÊNDICE C – HEATMAPS DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CÉLULAS EPITELIAIS DAS AMOSTRAS POR ESTÁGIO DA DOENÇA</b> .....	105
	<b>APÊNDICE D – QUADRO COM OS GRUPOS CELULARES IMUNOLÓGICOS IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS DE NS E PSB+BALF E SEUS PRINCIPAIS DEZ GENES EXPRESSOS</b> .....	106
	<b>APÊNDICE E – HEATMAPS DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CÉLULAS IMUNOLÓGICAS DAS AMOSTRAS POR ESTÁGIO DA DOENÇA</b> .....	107
	<b>APÊNDICE F – EXPRESSÃO DOS GENES FACILITADORES DA ACOPLAGEM VIRAL EM CÉLULAS DO BALF</b> .....	108
	<b>APÊNDICE G – GRÁFICO DOTPLOT DA EXPRESSÃO DOS GENES MARCADORES DE EXTRAVASAMENTO CELULAR EM AMOSTRAS DE NS E BALF DE PACIENTES INFECTADOS COM COVID-19 POR GRAU DA DOENÇA</b> .....	109
	<b>APÊNDICE H – INTERAÇÃO CELULAR DOS PRINCIPAIS PARES DE LIGANTES-RECEPTORES RELACIONADOS COM A PROGRESSÃO DA DOENÇA PARA OS ESTÁGIOS MODERADO E GRAVE</b> .....	110

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 A PANDEMIA DE COVID-19 E O SARS-COV-2

A COVID-19 (do inglês, *Coronavirus disease 2019*) é uma doença originária de um surto epidêmico ocorrido na província de Wuhan, China, em Dezembro de 2019, consistindo de uma infecção viral sistêmica de caráter respiratório causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, cujos sintomas causam desde desordens respiratórias e gastrointestinais, até complicações cardíacas, renais e neurais, sendo seu agente etiológico o sétimo coronavírus conhecido com capacidade de infectar humanos (ELABIYI; ADENOLA; HASSAN, 2020).

O rápido contágio observado é constatado por dados epidemiológicos que caracterizam sua transmissão principalmente por via aérea através de aerossóis e partículas leves suspensas, como também por gotículas pesadas em contatos mais diretos, além de que outras vias de transmissão também são factíveis. (GREENHALGH *et al*, 2021). Tal perfil de transmissão e sua sintomatologia fez da doença responsável pela recente pandemia considerada a maior crise sanitária do século XXI, que já infectou mais de 670 milhões de pessoas ao redor do mundo até Janeiro de 2023, totalizando mais de 6,8 milhões de óbitos, dados estes que incluem cerca de 36 milhões de brasileiros infectados e mais de 690 mil que evoluíram a óbito, configurando um dos principais problemas de saúde pública recentes no país (DONG; DU; GARDNER, 2020).

A origem do vírus e o momento de sua introdução na população ainda não foram totalmente elucidadas, embora as hipóteses mais robustas apontem a doença como resultado de uma transferência zoonótica de espécies de morcego (do gênero *Rhinolophus*, mais precisamente a espécie *R. affinis*), hospedeiro natural, para o homem (ANDERSEN *et al*, 2020; XIAO *et al*, 2020). Análises filogenéticas e de genômica comparativa revelaram 50% de similaridade entre o material genético do SARS-CoV-2 com o MERS-CoV, e 79% com o SARS-CoV, ambos coronavírus com capacidade de infectar humanos e que causaram surtos epidemiológicos de menor proporção no passado, como a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) e a síndrome aguda respiratória grave (SARS), respectivamente, enquanto que também foi reportado até mais de 95% de similaridade do material genético viral com outros

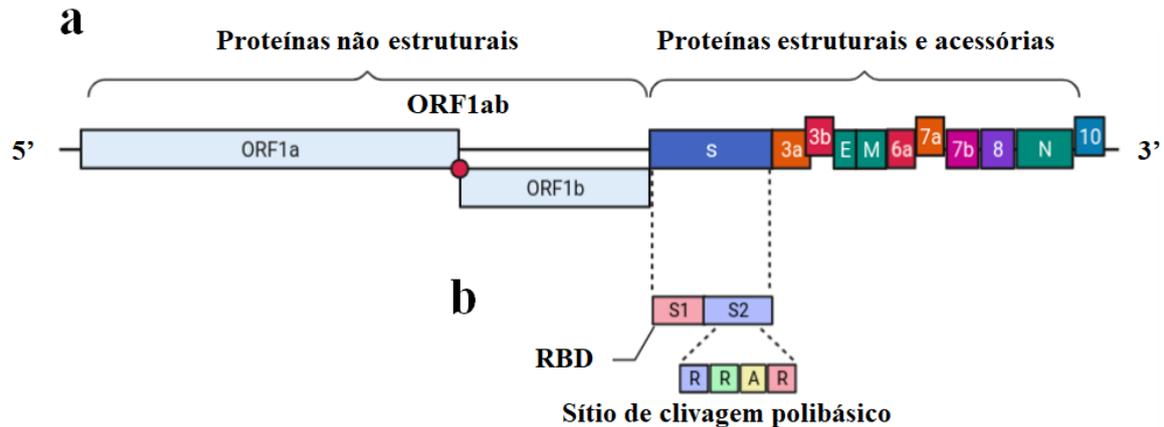
tipos de coronavírus de morcegos (Bat-CoV RaTG13) de regiões cavernosas próximas a origem do surto de 2019 na China (XIAO *et al*, 2020; TEMMAM *et al*, 2022).

As hipóteses mais difundidas sugerem transferência direta ou, à semelhança dos casos de MERS e SARS, com a participação de um hospedeiro intermediário, no qual pelas mesmas análises de proximidade genética, apontam como uma das espécies mais prováveis a de pangolins malaios (*Manis javanica*), mamíferos exóticos comercializados em vários locais da região (ANDERSEN *et al*, 2020; LU *et al*, 2020). Apesar de tais evidências serem amplamente aceitas, existem discussões sobre o momento exato de introdução e circulação do vírus em humanos, visto que estudos em diferentes países como Brasil, Espanha e Japão sugerem a presença do SARS-CoV-2 nas redes de esgoto desses locais antes mesmos do surto chinês no final do ano de 2019. (CHAVARIA-MIRÓ *et al*, 2020; FONGARO *et al*, 2021; LA ROSA *et al*, 2021).

Referente ao seu material genético, o SARS-CoV-2 é um vírus de RNA positivo com tamanho aproximado de 30kb de nucleotídeos, seu domínio apresenta uma região de fase de leitura aberta (ORF) denominada ORF1ab localizada no terminal 5', correspondente a mais de  $\frac{2}{3}$  do material genético viral, e que é responsável por codificar proteínas não estruturais. No terço restante próximo ao terminal 3' estão localizados seis genes acessórios codificados nas demais ORFs (ORF3ab, ORF6a, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF10), além dos genes que codificam proteínas estruturais, sendo eles: proteína de superfície (S), envelope (E), membrana (M), e nucleocapsídeo (N) (KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020).

Dentre as proteínas estruturais, a proteína S, ou *spike protein*, é uma glicoproteína presente na espícula viral subdividida em dois domínios, S1 e S2, em S1 está localizado o domínio de ligação ao receptor (RBD), enquanto que entre as junções está presente um sítio de clivagem por furina polibásico exclusivo para o SARS-CoV-2 e responsável por facilitar a entrada do vírus na célula hospedeira por meio de proteases, efetivando a capacidade de infectividade viral (ANDERSEN *et al*, 2020; KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020) (**Figura 1**).

Figura 1 – Organização genômica do SARS-CoV-2.



Legenda: Em **a**) partindo do terminal 5' a ORF1a e ORF1b, que juntas formam a ORF1ab, responsável por codificar proteínas não estruturais e correspondente a mais da metade do material genético do vírus. Na sequência, até o terminal 3', o gene da proteína de superfície *Spike* (S), a ORF3ab, gene da proteína do envelope (E), gene da proteína de membrana (M), ORF6a, ORF7a, ORF7b, ORF8, gene da proteína do nucleocapsídeo (N) e ORF10. Em **b**) as subunidades S1 e S2 da proteína S, contendo em S1 o RBD, e na junção S1/S2 o sítio de clivagem polibásico exclusivo para o SARS-CoV-2, consistindo na sequência de aminoácidos Arg-Arg-Ala-Arg. Fonte: Elaborado pelo autor, criado com o Biorender (2022).

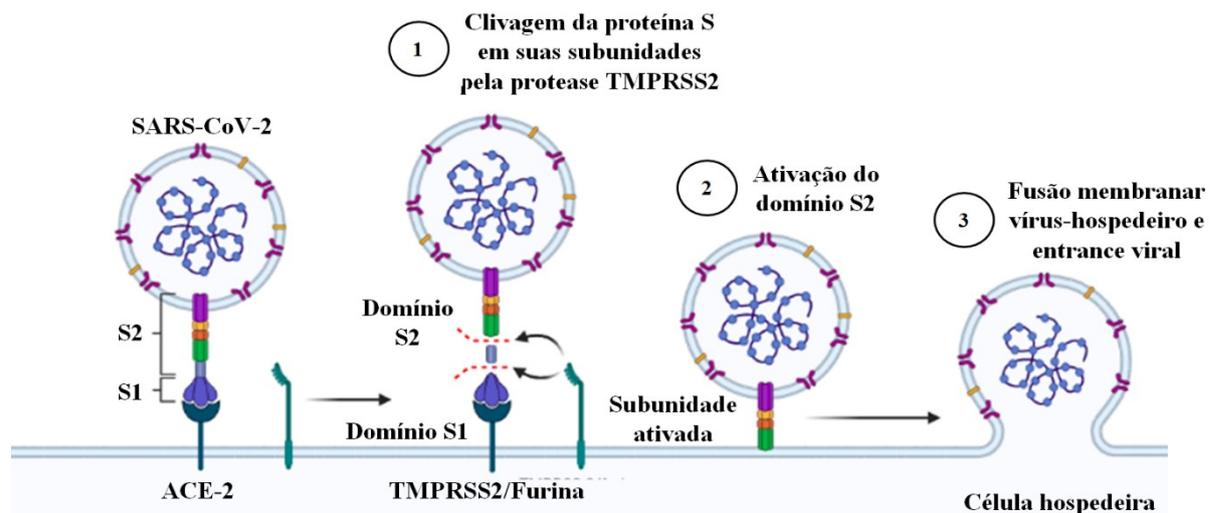
O RBD em S1 é a região mais variável do material genético dos coronavírus, enquanto que para o SARS-CoV-2, aminoácidos específicos nessa região desempenham uma função chave para o acoplamento ao receptor celular do hospedeiro (HOFFMANN *et al*, 2020; WU *et al*, 2020). Tal acoplamento é de alta afinidade com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2) humana, um homólogo da enzima conversora de angiotensina (ACE) cuja função está atrelada ao contrabalanço do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), agindo na regulação da pressão arterial, na resistência vascular sistêmica, reabsorção de sódio, inflamação e fibrose, e que sob infecção possui importância no tropismo celular ao vírus e na suscetibilidade de infecção das células do endotélio vascular (SCIALO *et al*, 2020; KHAILANY; SAFDAR; OZASLAN, 2020).

A ligação do vírus com a célula hospedeira ocorre então por meio da proteína S viral ao se acoplar com o receptor ACE-2 humano, processo relacionado tanto com a infectividade do vírus quanto com a sua transmissibilidade, de modo que a afinidade de ligação ao receptor ACE-2 é de 10 à 20 vezes maior para o SARS-CoV-2 do que para o seu antecessor SARS-CoV (WRAPP *et al*, 2020). A entrada do vírus na célula, ou *entrance* viral, é otimizado pela fusão das membranas da célula hospedeira com o envelope viral, assim como também pela atividade de proteases auxiliares à exemplo

da protease serina transmembranar do tipo II (TMPRSS2), catepsina L (CTSL), e furina, as quais são codificadas por genes homônimos e responsáveis pela clivagem da proteína S viral em suas subunidades, facilitando o acoplamento ao receptor ACE-2 da célula e dessa forma aumentando a suscetibilidade de infecção no hospedeiro (JACKSON *et al*, 2022; MATSUYANA *et al*, 2020; VANKADARI *et al*, 2020) (**Figura 2**).

As proteases TMPRSS2 e furina se destacam neste mecanismo, com uma ampla faixa de especificidade e múltiplos substratos celulares em potencial, estão envolvidas no processo proteolítico de ativação das proteínas de acoplamento de diversos vírus, especialmente de vírus respiratórios e incluindo o grupo de coronavírus SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 (JACKSON. *et al*, 2022;). A participação do TMPRSS2, por exemplo, pode ser observada a partir do trabalho de GUO *et al* (2022), onde a administração do inibidor de protease mesilato de camostato em células da via aérea respiratória humana foi capaz de não apenas reduzir significativamente a atividade do TMPRSS2, mas também desta forma reduzir o *entrance* e a infectividade do SARS-CoV-2 *in vitro*.

Figura 2 – Mecanismo de entrada viral na célula hospedeira



Legenda: A proteína S presente na espícula viral do SARS-CoV-2 se acopla ao receptor ACE-2 para então, em **1**) ser clivada pela protease TMPRSS2/furina em duas subunidades S1 e S2, o que permite em **2**) a ativação do domínio S2 da proteína S, para que em **3**) o *entrance* viral seja facilitado e a fusão de membranas do vírus com o hospedeiro seja efetuado. Fonte: Elaborado pelo autor, criado com Biorender (2022).

Ademais, o receptor ACE-2 é descrito como expresso em diversas células do organismo, incluindo em células do trato respiratório como na via aérea superior

(nasofaringe, mucosas nasais e orais) e inferior, estando em altas concentrações em células epiteliais no intestino (BOURGONJE *et al*, 2020). Estas características estão correlacionadas com as rotas de transmissão e infecção do vírus, tanto pelo sistema respiratório quanto gastrointestinal, a partir do contato pela boca, além de que a expressão do receptor também se dá em várias outras células e tecidos, como em células renais, na camada basal da epiderme, células neurais e da glia, cardiomiócitos, retina e testículos (BOURGONJE *et al*, 2020; NICIN *et al*, 2020; BAIG *et al*, 2020; MA *et al*, 2020; FAN *et al*, 2021). A presença do receptor ACE-2 nessas células não representa uma relação direta de suscetibilidade de infecção, visto que outros fatores colaboram para tal resultado, como polimorfismos genéticos do receptor e proteases relacionadas, além das rotas de circulação do vírus no organismo, embora suscetibilidades genéticas também oriundas dos polimorfismos de receptores e comorbidades pré-existentes estejam associadas com a característica sistêmica da doença e sua patogenicidade, o que contribui para a evolução clínica dos pacientes (HASHEMI *et al*, 2021; SONG *et al*, 2021; SANYAOLU *et al*, 2020). Neste cenário, considerando os sintomas totais, a COVID-19, de acordo com a organização mundial de saúde (OMS), pode apresentar desde quadros assintomáticos, até quadros sintomáticos graves, com sequelas em diversos órgãos e tecidos (**Quadro 1**).

Quadro 1 – Relação entre os sintomas e estágios da COVID-19

Sintomas	Estágio	Proporção na população
Ausência de sintomas	Assintomático	Cerca de 40% dos infectados
Febre, tosse seca, cansaço, perda de olfato e paladar	Leve	Cerca de 80% dos sintomáticos
Febre, tosse seca, cansaço, perda de olfato e paladar, dor de garganta, dor de cabeça, diarreia, dores no corpo, irritação nos olhos, erupção cutânea	Moderado	Cerca de 15% dos sintomáticos
Febre, tosse seca, cansaço, perda de olfato e paladar, dor de garganta, dor de cabeça, diarreia, dores no corpo, irritação nos olhos, erupção cutânea, dor no peito, insuficiência respiratória, perda de mobilidade, insuficiência cardíaca, injúria renal, lesão em vários órgãos	Grave	Cerca de 5% dos sintomáticos

Fonte: Adaptado de WHO, 2021; WU. *et al*, 2020; MA *et al* 2021;

O quadro clínico da COVID-19 é, portanto, específico e diverso para cada caso, com a maioria dos infectados, entre assintomáticos e casos leves, sem a necessidade de atenção médica ou hospitalar. Embora a doença acometa cerca de 20% dos infectados sintomáticos com maior rigor, passando a ser recomendado atendimento médico, a progressão severa da COVID-19 com risco de óbito caracterizada pela insuficiência respiratória e por danos severos no pulmão, representa por volta de 5% destes pacientes, sendo tais casos necessitados de assistência em unidades de tratamento intensivo (UTI) e muitas vezes com suporte de ventilação mecânica. (WU *et al*, 2020; LIM *et al*, 2021). Dentre os pacientes do grupo de alto risco de mortalidade é comum a presença de lesões teciduais graves nos pulmões, como danos alveolares difusos, embolismo e edema pulmonar, lesões vasculares e disfunção da membrana alvéolo-capilar, resultado da resposta imune exacerbada que ocorre por meio de uma tempestade inflamatória, onde o recrutamento de células imunológicas no tecido infectado ocasiona uma alta expressão de citocinas e quimiocinas na região (D'AGNILLO *et al*, 2021; HUANG *et al*, 2020).

Além disso, a rápida disseminação da doença ao redor do mundo entre populações, etnias e organismos diferentes, considerando a taxa de mutação por substituição do vírus de  $8 \times 10^{-4}$  por nucleotídeo ao ano, contribuiu para o surgimento de diversas variantes de interesse e preocupação (VOC), como as variantes gama, delta, ômicron e BA.2, resultantes de eventuais mutações que otimizaram seus *fitness* e tornando-as variantes predominantes em determinada região, o que causa novos picos de infecção (HADFIELD *et al*, 2022; ESCALERA *et al*, 2022). É importante frisar que as mutações naturais do SARS-CoV-2 nem sempre configuram em uma alteração positiva para o vírus ou notáveis para sua epidemiologia, como aumento de transmissibilidade ou alterações clínicas nos sintomas da doença, entretanto tais mudanças são observadas nas principais VOCs, à exemplo da variante ômicron, a qual possui mais de 40 mutações na proteína S viral em comparação com a cepa original, aumentando o risco de reinfecção e a taxa de transmissão (ESCALERA *et al*, 2022; RIBEIRO XAVIER *et al*, 2022; REN *et al*, 2022).

Outra preocupação referente às variantes virais é a probabilidade de escape vacinal das vacinas já existentes, uma vez que mutações específicas no RBD ou outras regiões do vírus podem burlar o sistema imune e comprometer a eficácia das vacinas (VAN OOSTERHOUT *et al*, 2021). Com a possibilidade de surgimento de

VOCs que conseqüentemente também aumentem a taxa de mortalidade do vírus, faz-se necessário compreender a dinâmica de relações existentes entre as células do microambiente infectado e o cenário de inflamação agravante mencionado para uma melhor elucidação do combate à doença.

## 1.2 A TEMPESTADE INFLAMATÓRIA

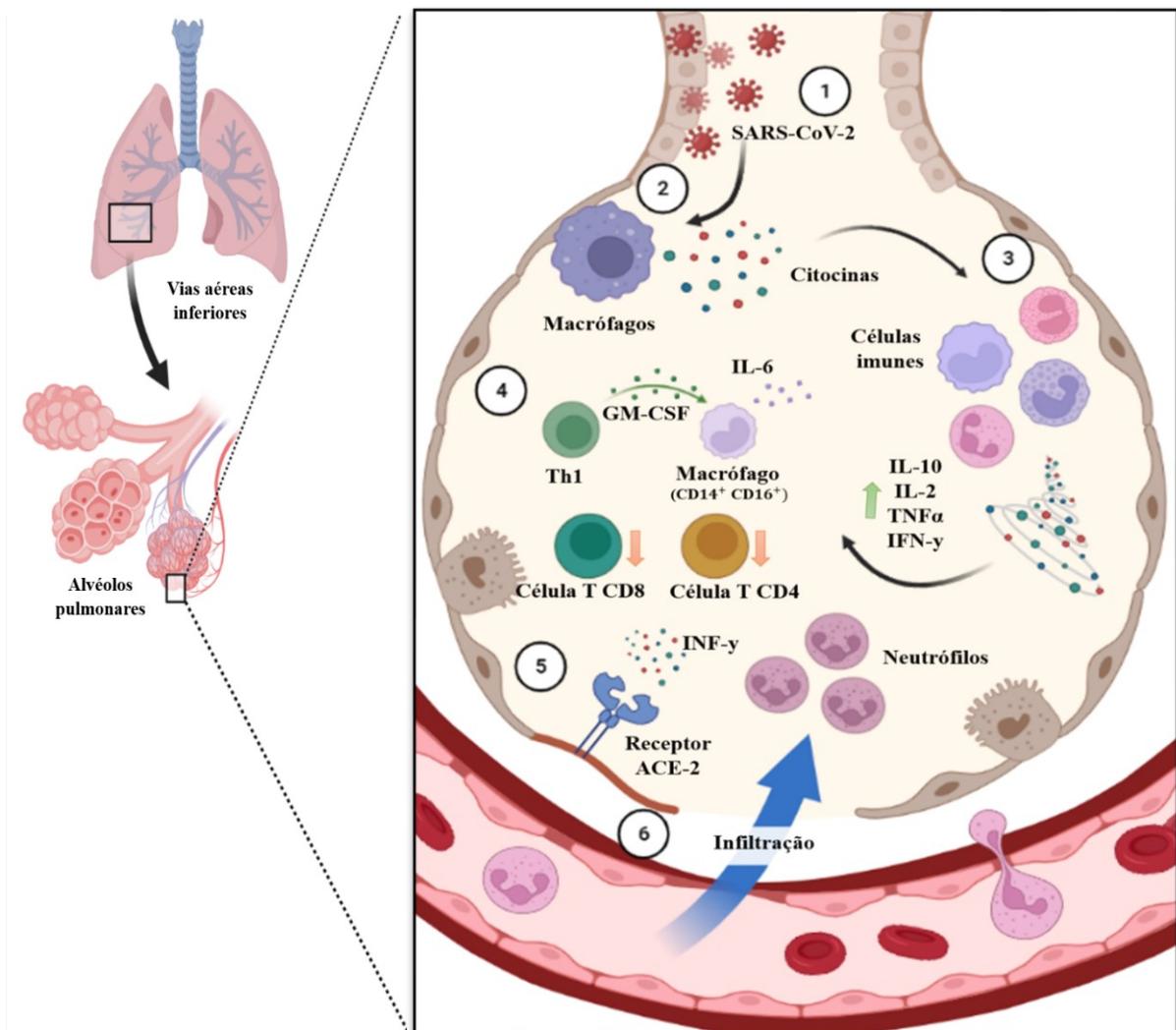
A resposta imunológica exacerbada que acomete os pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, embora ativado para o combate da infecção, acaba por agravar o estado de inflamação. O processo inicia a partir da ativação do sistema imune por células epiteliais das vias aéreas infectadas (como os pneumócitos, células ciliadas, basais e secretoras), seguido pelo recrutamento de células do sistema imune inato, como macrófagos e monócitos, para o mesmo sítio de infecção onde a interação celular é potencializada por diversos mediadores inflamatórios, como as interleucinas (IL) IL-2, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , e as quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4 (D'AGNILLO *et al*, 2021; LIAO *et al*, 2020; HUANG *et al*, 2020). Em seguida, essas citocinas inflamatórias recrutam outras células do sistema inato como neutrófilos, células dendríticas (DCs), natural killers (NK), entre outras, que por sua vez mantêm a produção das citocinas agravando a lesão tecidual no pulmão (D'AGNILLO *et al*, 2021) (**Figura 3**).

A resposta pró-inflamatória das células Th1 patogênicas também participa do processo, mediadas por receptores ligados à membrana e por vias de sinalização desreguladas, tais células secretam o fator estimulador de colônias de macrófagos e monócitos (GM-CSF) que desencadeia a ativação de monócitos inflamatórios CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> e a produção de grandes quantidades de IL-6 e outras citocinas (HU *et al*, 2021). A produção de células do sistema imune adaptativo é reduzida, chamada linfopenia, com baixas concentrações de linfócitos T CD4 e especialmente de T CD8 em casos graves da doença, assim como as concentrações de neutrófilos são aumentadas devido a infiltração dessas células nos alvéolos, caracterizando a neutrofilia (KIM *et al*, 2021; YANG *et al*, 2021).

O SARS-CoV-2 ao ocupar os receptores ACE-2 na superfície celular acabam reduzindo a expressão da enzima e aumentando a concentração da angiotensina II, o que resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e em uma ativação do fator nuclear- $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) levando ao aumento na expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como o TNF $\alpha$  e a IL-6, tal sinalização NF- $\kappa\beta$ /TNF $\alpha$  é retroativa,

desempenhando papéis patológicos importantes como a indução apoptótica de células epiteliais, contribuindo para a inflamação sistêmica (SCIALO *et al*, 2020; HU *et al*, 2021). Além do NF- $\kappa$ B, o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) é outro fator ativado durante a infecção via formação do complexo de IL-6 com a forma solúvel de seu receptor (sIL-6Ra), onde ambos STAT3 e NF- $\kappa$ B, induzem à amplificação de IL-6 e a formação de agentes pró-inflamatórios, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (YANG *et al*, 2021; MOORE; JUNE, 2020).

Figura 3 – O processo de tempestade inflamatória causada pela COVID-19



Legenda: Representação dos alvéolos pulmonares na via aérea respiratória inferior em casos graves de infecção por SARS-CoV-2, pode-se observar em **1)** a infecção viral em células epiteliais como os pneumócitos tipo II do tecido, em seguida em **2)** células do sistema imune inato, como macrófagos e monócitos, induzem a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no microambiente. Esses mediadores recrutam novas células imunológicas vistas em **3)** que intensificam o processo inflamatório a partir de interleucinas IL-6, IL-2, IL-10, IL-8, interferon IFN- $\gamma$ , o fator TNF $\alpha$ , e outros. Em **4)** a célula Th1 é ativada e induz a expressão do fator GM-CSF, citocina que ativa os monócitos inflamatórios

CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> elevando a produção de IL-6. Também é observado o quadro de linfopenia, com a redução nos níveis de linfócitos T CD4 e T CD8. Em **5**) os receptores ACE-2 têm aumento de sua expressão ao serem estimulados pela alta concentração de IFN- $\gamma$  no tecido, já em **6**) é mostrado a infiltração de neutrófilos para a área da infecção, aumentando a concentração dessas células, caracterizando um cenário de neutrofilia. Fonte: Elaborado pelo autor, criado com Biorender (2022).

Em relação ao receptor ACE-2, essa estrutura é responsiva aos interferons (IFNs) produzidos durante a infecção, em especial ao IFN- $\gamma$ , o que viabiliza o cenário descrito a tornar-se um ciclo danoso ao organismo do paciente, onde a resposta imune com as citocinas expressas lesiona ainda mais o tecido, podendo estimular a expressão de novos receptores ACE-2 que permitem novas infecções virais (ZIEGLER *et al*, 2020; COPERCHINI *et al*, 2021). Os IFNs do tipo I e III como o IFN- $\alpha$  e IFN- $\lambda$ , respectivamente, sofrem um atraso na resposta imune ainda no início do estágio de infecção caracterizado pelo baixo nível de atividade desses IFNs e pela desregulação dos genes estimulados por tais fatores, e como os IFNs do tipo I são comumente a primeira linha de proteção contra infecções e muito importantes no combate contra patógenos, tal atraso em sua atuação compromete não só uma eliminação viral adequada, mas também contribui para o estágio inflamatório avançado da COVID-19 grave (LUCAS *et al*, 2020; YANG *et al*, 2021; KIM *et al*, 2021). Hipóteses apontam que este processo ocorra devido a inibição da fosforilação de STAT1 e da transcrição de genes estimulados por IFNs (ISGs) causada pela proteína não estrutural 1 (NSP1) do SARS-CoV-2, ou por meio de mecanismos da inibição de IFNs via componentes de proteínas estruturais do vírus, como as proteínas N, M, ORF3a e ORF6 (KIM *et al*, 2021).

Diferentemente, a alta expressão do IFN de tipo II, o IFN- $\gamma$ , representa um dos agentes principais no processo de tempestade inflamatória, expresso principalmente por macrófagos, células NK, e células T, também participando na estimulação de ativação de tais células, e embora o quadro de linfopenia e exaustão celular dos linfócitos não contribua tanto para sua elevada concentração, o IFN- $\gamma$  participa ativamente na promoção da inflamação causada pelo SARS-CoV-2 (HU *et al*, 2021; CHEN *et al*, 2020).

Ademais, considerando a função do ACE-2, sua relação com a COVID-19 e os fatores específicos pré-existentes para cada paciente, algumas condições e comorbidades estão relacionadas com uma maior expressão desses receptores nas células do organismo, assim como uma maior propensão à progressão do quadro clínico, como por exemplo a idade avançada, a obesidade mórbida, doenças

cardíacas, pulmonares e renais, diabetes ou pacientes imunossuprimidos (MAUVAIS-JARVIS, 2020; DE LUCENA *et al*, 2020; GUO *et al*, 2020). Tais fatores, na maioria das vezes, contribuem para o desenvolvimento do quadro clínico de tempestade inflamatória descrita nesta secção, o que classifica estes pacientes como grupo de risco para a COVID-19 (MAUVAIS-JARVIS, 2020).

Portanto, avaliar as características virais e seu histórico de infecção nos últimos anos, levando em consideração a complexidade das interrelações presentes entre o vírus e o hospedeiro, assim como todo o microambiente pulmonar lesionado e as etapas do processo inflamatório na progressão da doença é de vital importância para o desenvolvimento de um tratamento adequado que seja seguro, eficaz e universal.

### 1.3 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS

#### 1.3.1 **Uso *off-label* de fármacos**

Na busca por opções de tratamento para a COVID-19 ao longo do período desde o início da pandemia, grupos de pesquisa ao redor do mundo têm aplicado desde estratégias mais clássicas até em conjunto de novas tecnologias no intuito de somar esforços para o desenvolvimento de uma intervenção terapêutica eficaz, diante disso o reposicionamento de fármacos se destaca como uma alternativa de diferentes possibilidades amplamente aplicada na investigação de candidatas para o tratamento da doença (NG; SALIM; CHU, 2021).

Com este objetivo definido, as opções investigadas variam independente do mecanismo de ação do fármaco ou da droga, sejam elas substâncias de atividade antiviral agindo como bloqueadores da replicação do vírus, atenuadores sintomáticos que impeçam a progressão da doença, ou de ação profilática para evitar o risco de contaminação (ALTAY *et al*, 2020; AYERDI *et al*, 2020; SINGH *et al*, 2020).

O reposicionamento de fármacos então consiste na investigação de novas aplicações terapêuticas para compostos já existentes e inicialmente indicados para determinado fim, avaliando a possibilidade de uma indicação alternativa *off-label* destes compostos aprovados por agências de regulação nacional ou internacional, a exemplo da agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) no Brasil, e o *food and drug administration* (FDA) nos EUA. (ASHBURN; THOR, 2004).

A aplicação da estratégia de reposicionamento de fármacos traz como principal vantagem a redução no tempo de desenvolvimento de um fármaco, já que o processo

de produção de um novo agente terapêutico em todas suas etapas até sua aprovação pode levar em torno de 10 a 17 anos, enquanto que o mesmo processo de descoberta via reposicionamento de fármacos pode reduzir tal estimativa em 5 ou até 7 anos, uma vez no contexto recente de urgência devido ao proceder de uma pandemia, esta aceleração de resultados torna-se uma vantagem essencial (REICHERT, 2003; ASHBURN; THOR, 2004).

Outra grande vantagem desse processo é a redução de custos e riscos da pesquisa, isso devido à disponibilidade de dados tanto *in vitro* quanto *in vivo* sobre grande parte das drogas testadas, como análises toxicológicas, segurabilidade, manufatura, formulação e desenvolvimento geral, além dos perfis farmacodinâmicos e farmacocinéticos (CHA *et al*, 2017; PARVATHANENI; GUPTA, 2020). Ao longo dos anos, o reposicionamento de fármacos se tornou uma alternativa recorrente tanto nos centros de pesquisa acadêmicos quanto nas companhias farmacêuticas, de modo que exemplos de fármacos com uso *off-label* que obtiveram êxito para suas novas terapias são cada vez mais frequentes (**Quadro 2**).

### 1.3.2 Tipos de abordagens

As abordagens utilizadas para as análises de reposicionamento dividem-se em dois subgrupos, as abordagens experimentais e as computacionais (**Figura 4**). As abordagens experimentais são aplicadas tanto para o reposicionamento de fármacos quanto para processos de descoberta de um novo composto, e dentre as técnicas utilizadas neste subgrupo pode-se citar os ensaios de ancoragem ligante-receptor para a investigação de possíveis interações com novos alvos, fazendo uso de cromatografia por afinidade e espectrometria de massa (PARVATHANENI *et al*, 2019; BREHMER *et al*, 2005).

Quadro 2 – Exemplos de fármacos reposicionados e suas novas aplicações

<b>Fármaco</b>	<b>Indicação Original</b>	<b>Indicação alternativa</b>	<b>Ano</b>	<b>Estratégia aplicada</b>	<b>Referência</b>
Minoxidil	Hipertensão	Perda de cabelo	1988	Análises clínicas retrospectivas (não computacionais)	BADEN; GRASSI; KVEDAR, 1988.
Sildenafil	Angina	Disfunção erétil	1998	Análises clínicas retrospectivas (não computacionais)	GOLDSTEIN <i>et al</i> , 1998.
Atomoxetina	Doença de Parkinson	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH)	2002	Abordagem experimental	MICHELSON <i>et al</i> , 2002.
Raloxifeno	Osteoporose	Câncer de mama	2007	Análises clínicas retrospectivas (não computacionais)	SPORN <i>et al</i> , 2004.
Tamoxifeno	Câncer de mama	Transtorno bipolar	2007	Análises clínicas retrospectivas (não computacionais) / Abordagem experimental	EINAT <i>et al</i> , 2007.
Rapamicina	Prevenção da rejeição de órgão transplantado	Síndrome linfoproliferativa autoimune	2009	Análises clínicas retrospectivas (não computacionais) / Abordagem experimental	DRAGANA <i>et al</i> , 2009.
Topiramato	Epilepsia	Obesidade	2012	Abordagem experimental	GADDE. <i>et al</i> , 2011.
Fumarato de dimetila	Psoríase	Esclerose múltipla	2013	Abordagem híbrida	LINKER; GOLD, 2013.
Aspirina	Analgésico	Câncer colorretal	2016	Abordagem híbrida	DREW; CAO; CHAN, 2016.

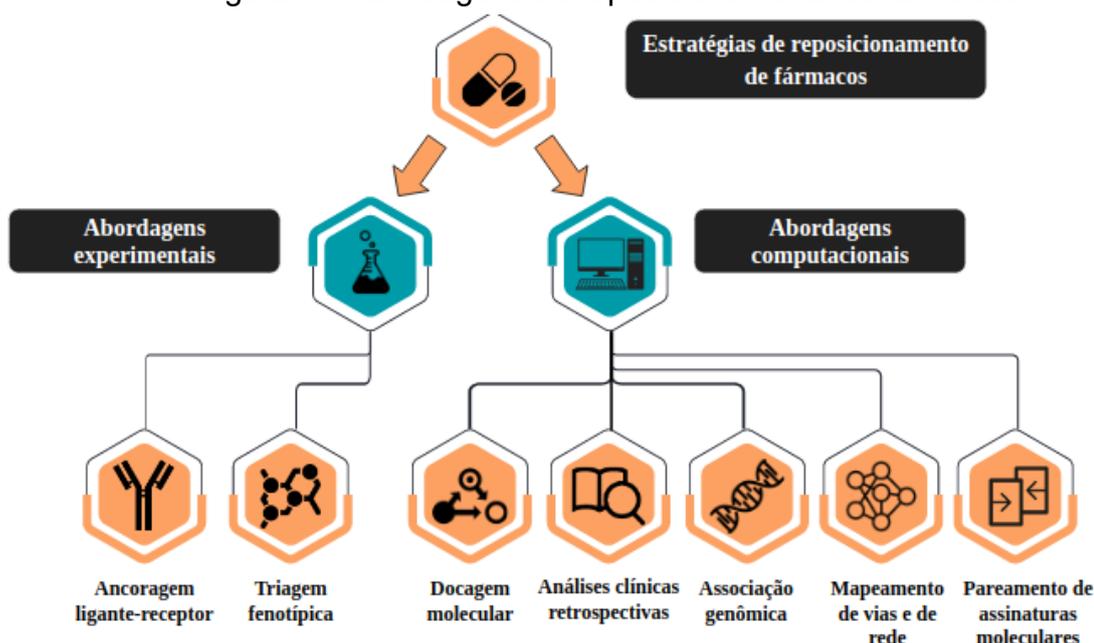
Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de PUSHPAKOM *et al*, 2018.

Igualmente, nesse grupo estão inclusos os testes de triagem fenotípica, capaz de identificar compostos com efeitos relevantes em determinado modelo de doença observado, modelos estes tanto *in vivo* quanto *in vitro*, indicando oportunidades terapêuticas fáceis de se avaliar (MOFFAT *et al*, 2017; PARVATHANENI *et al*, 2019). Além disso, vale ressaltar, os ensaios retrospectivos que, apesar de hoje serem realizados em sua maioria de forma sistemática como parte das abordagens computacionais, anteriormente eram aplicados por meio de revisões na literatura (JENSEN; JENSEN; BRUNAK, 2012).

Já as abordagens computacionais abrangem uma variedade maior de possibilidades, atrelando análises *in silico* e estudos ômicos em métodos analíticos sofisticados para identificação de novas interações farmacológicas, podendo-se citar neste subgrupo as análises de docagem molecular, para predição de sítios de ligação por meio de estratégias estruturais entre droga-alvo (KITCHEN *et al*, 2004). São também exemplos, as análises clínicas retrospectivas, estabelecendo uma curadoria de dados reportados para determinadas moléculas, e os estudos de associação genômica, por meio do qual é possível analisar dados genéticos para identificação de variações associadas com doenças, além da identificação de novos alvos farmacológicos (HURLE *et al*, 2013; SANSEAU *et al*, 2012).

As técnicas de mapeamento de vias e de redes, que exploram os dados ômicos para elucidação da interação droga-alvo, incorporam as abordagens computacionais mais recentes, assim como o pareamento de assinaturas moleculares, utilizadas para comparar as assinaturas de uma droga no organismo (sendo elas suas características transcriptômicas, estruturais e seus efeitos adversos) com outra droga ou modelo de doença para identificação de alvos inesperados (SMITH *et al*, 2012; KEISER *et al*, 2009; PUSHPAKOM *et al*, 2019; CHA *et al*, 2017).

Figura 4 – Abordagens de reposicionamento de fármacos



Legenda: As estratégias de reposicionamento de fármacos podem ser divididas em dois grupos: experimentais e computacionais. As abordagens experimentais consistem nas análises de ancoragem ligante-receptor e na triagem fenotípica, embora também possam incluir análises clínicas retrospectivas e outros métodos clássicos de descoberta de fármacos. Já as abordagens computacionais abrangem as técnicas de docagem molecular, análises clínicas retrospectivas sistemáticas, análises de associação genômica, mapeamento de vias celulares e de rede, e pareamento de assinaturas moleculares. Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de PARVATHANENI *et al*, 2019.

### 1.3.3 Aplicações na pandemia

No cenário da COVID-19 as estratégias de reposicionamento têm se utilizado de ambas abordagens, investigando o grau de eficácia de drogas que atuam no vírus, no hospedeiro ou em ambos. Dentre as possíveis estratégias para tratamento, uma das opções avaliadas é o uso de fármacos sozinhos, ou em combinação, contra outros tipos de doenças causadas por coronavírus, como SARS e MERS, à exemplo dos antivirais ribavirina, ritonavir + lopinavir, e darunavir, sendo o primeiro originalmente utilizado contra a hepatite C e os demais pertencentes à classe de antivirais do HIV (ZUMLA *et al*, 2016; HUNG *et al*, 2020; CAO *et al*, 2020; LIN *et al*, 2020).

A ribavirina apresenta como alvo a enzima inosina monofosfato desidrogenase (IMPDH), assim como a RNA dependente de RNA polimerase (RdRp) em seu efeito potencial, agindo na inibição da replicação viral, enquanto que o darunavir e o uso conjunto do ritonavir + lopinavir agem nas proteases envolvidas no processo de entrada viral, com participação na desregulação gênica do receptor ACE-2 (HUNG *et al*, 2020; CAO *et al*, 2020). Investigações também foram realizadas com o ulmifenovir, o arbidol,

um antiviral tipicamente utilizado na Ásia para casos de influenza que atua na inibição da fusão de membranas entre vírus-hospedeiro, que em testes clínicos para tratar a COVID-19 apresentaram resultados contrastantes em relação a sua eficácia (ALAVI DARAZAM *et al*, 2021; WANG *et al*, 2020).

Outro exemplo de antiviral avaliado foi o remdesivir, desenvolvido originalmente no combate ao ebola, este antiviral consiste em uma pró-droga análoga de adenosina administrada de forma intravenosa que age impedindo a replicação viral ao inibir a RdRp, no qual estudos clínicos resultaram na redução do tempo de recuperação de pacientes internados, assim como na redução da infecção do trato respiratório inferior, motivo que fez deste medicamento, sob o nome comercial de veklury, o primeiro fármaco aprovado pelo FDA contra a COVID-19 para uso em casos graves de pacientes internados em outubro de 2020, e pela ANVISA em março de 2021 (BEIGEL *et al*, 2020; FDA, 2020). Já o molnupiravir (de registro EIDD-2801) é uma pró-droga análoga do ribonucleosídeo  $\beta$ -D-N4-hidroxicitidina que também age interferindo a replicação viral ao inibir a RdRp, desenvolvido recente e primeiramente para a gripe, e cujas análises clínicas evidenciaram uma redução no número de óbitos em pacientes que foram hospitalizados, tendo seu uso aprovado pelo FDA em dezembro de 2021 para pessoas infectadas maiores de 18 anos em estágio leve ou moderado da doença (BASU; CHAVDA; MEHTA, 2022; VICENTI; ZAZZI; SALADINI, 2021; FDA, 2021).

Além dos antivirais, vários exemplos de fármacos propostos como oportunidades terapêuticas agem no hospedeiro atenuando os sintomas da COVID-19, controlando a resposta imunológica exacerbada e a inflamação aguda em quadros de tempestade de citocinas por meio da regulação e inibição da liberação de interleucinas/quimiocinas (BASU; CHAVDA; MEHTA, 2022) (**Quadro 3**). Este é o caso de anticorpos monoclonais como o tocilizumab, indicado para artrite reumatoide, que age se ligando ao receptor de interleucina-6 (IL6R) bloqueando sua via de transdução de sinal e inibindo a liberação de IL-6 no tecido do pulmão, o que ajuda a reduzir o estágio inflamatório (STONE *et al*, 2020).

Assim também ocorre com o antirreumático baricitinib, um inibidor da janus quinase 1 e 2 (JAK 1/2) atuante nas vias de citocinas corrigindo a desregulação do sistema imune com forte efeito anti-inflamatório, no qual as análises clínicas revelaram otimizar os parâmetros de internação dos pacientes sem efeitos adversos aparentes,

e por fim aprovado pelo FDA para pacientes hospitalizados em Maio de 2021 e pela ANVISA em Setembro de 2021 (SINGH *et al*, 2020; STEBBING *et al*, 2020). Outros anticorpos monoclonais também já aprovados pelo FDA, ANVISA e/ou pela OMS, mas que atuam no RBD da proteína S viral impedindo a entrada do vírus no hospedeiro são os de uso conjunto do banlanimab + etesevimab, casirivimab + imdevimab e o sotrovimab (DOUGAN *et al*, 2021; WEINREICH *et al*, 2021; GUPTA *et al*, 2021).

Por conseguinte, almejando o controle da inflamação e a regulação das citocinas superexpressas, o uso de imunossupressores e anti-inflamatórios também são avaliados como candidatos de tratamento para a COVID-19, e devido a sua facilidade de acesso são os mais usuais na clínica médica entre hospitalizados, nesta categoria estão inclusos corticosteroides como a dexametasona, comumente utilizado em diversas situações inflamatórias e que ensaios clínicos mostraram redução na taxa de mortalidade para pacientes internados em casos graves (HORBY *et al*, 2020).

Outras classes de fármacos e moléculas foram investigadas, como inibidores de proteases, anti-helmínticos, anti-hipertensivos, entre outros, alguns inclusive obtendo bons resultados em análises *in vitro*, entretanto estudos clínicos realizados posteriormente não corroboraram com sua eventual eficácia, desaprovando a indicação de uso (HOFFMANN *et al*, 2020; CALY *et al*, 2020; WANG. *et al*, 2022).

Ademais, os estudos de reposicionamento de fármacos quando avaliados *in vivo* e nas etapas seguintes de ensaios clínicos, mesmo com suas vantagens e benefícios, nem sempre têm seus resultados validados, o que evidencia a complexidade de interações possíveis no organismo e ressaltando a necessidade de um conhecimento dinâmico sobre a patobiologia da doença para o desenvolvimento de estratégias críticas na identificação de um fármaco eficaz (ASHBURN; THOR, 2004). Não obstante, a maioria dos fármacos já aprovados em uso emergencial são de uso reservado para pacientes internados (devido pesquisas em andamento sobre sua eficácia, possibilidade de resistência medicamentosa e efeitos colaterais adversos), por vias de administração intravenosa ou intramuscular e de difícil aquisição, ainda pouco difundidos na população brasileira em geral. Para ajudar a superar tal barreira, a biologia de sistemas junto da bioinformática tem contribuído na otimização de reposicionamento de fármacos, com o desenvolvimento e aplicação de novas ferramentas computacionais para obtenção, possivelmente, de resultados cada vez mais precisos (DOTOLO *et al*, 2020).

Quadro 3 – Exemplos de fármacos avaliados para o tratamento da COVID-19

<b>Fármaco</b>	<b>Classe</b>	<b>Indicação original</b>	<b>Alvo</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Referência</b>
Ribavirina	Antiviral	Hepatite C	IMPDH, RdRP	Inibição da replicação viral	HUNG <i>et al</i> , 2020.
Lopinavir + Ritonavir	Antiviral	HIV	Protease aspartato tipo 1, outras	Inibição do <i>entrance</i> viral	CAO <i>et al</i> , 2020.
Lopinavir + Nirmaltrevir	Antiviral	HIV	Protease Mpro	Inibição do <i>entrance</i> viral	LAMB, 2022.
Remdesivir	Antiviral	Ebola	Rdrp	Inibição da replicação viral	BEIGEL <i>et al</i> , 2020.
Umifenovir	Antiviral	Influenza	Proteínas virais, RdRp	Inibição da fusão viral com o hospedeiro	WANG <i>et al</i> , 2020.
Tocilizumab	Anticorpo monoclonal	Doenças reumatóides	Receptor de IL-6	Inibição da liberação de IL-6	STONE <i>et al</i> , 2020.
Baricitinib	Anticorpo monoclonal	Doenças reumatóides	JAK 1/2	Inibição de citocinas inflamatórias	STEBBING <i>et al</i> , 2020.
Dexametasona	Corticosteroide	Alergias, doenças reumatóides, transplantes	Células inflamatórias	Inibição de citocinas inflamatórias	HORBY <i>et al</i> , 2020.
Nafamostat	Anticoagulante	Pancreatite, coagulação vascular disseminada (CIVD)	Protease TMPRSS2	Inibição do <i>entrance</i> viral	HOFFMANN <i>et al</i> , 2020.
Diltiazem	Anti-hipertensivo	Hipertensão	Canais de cálcio/Via NF-kB	Inibição do <i>entrance</i> viral	WANG <i>et al</i> , 2022.

Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de SINGH *et al*, 2020; SHAH; MODI; SAGAR, 2020.

## 1.4 BIOLOGIA DE SISTEMAS E O SEQUENCIAMENTO DE RNA DE CÉLULA ÚNICA

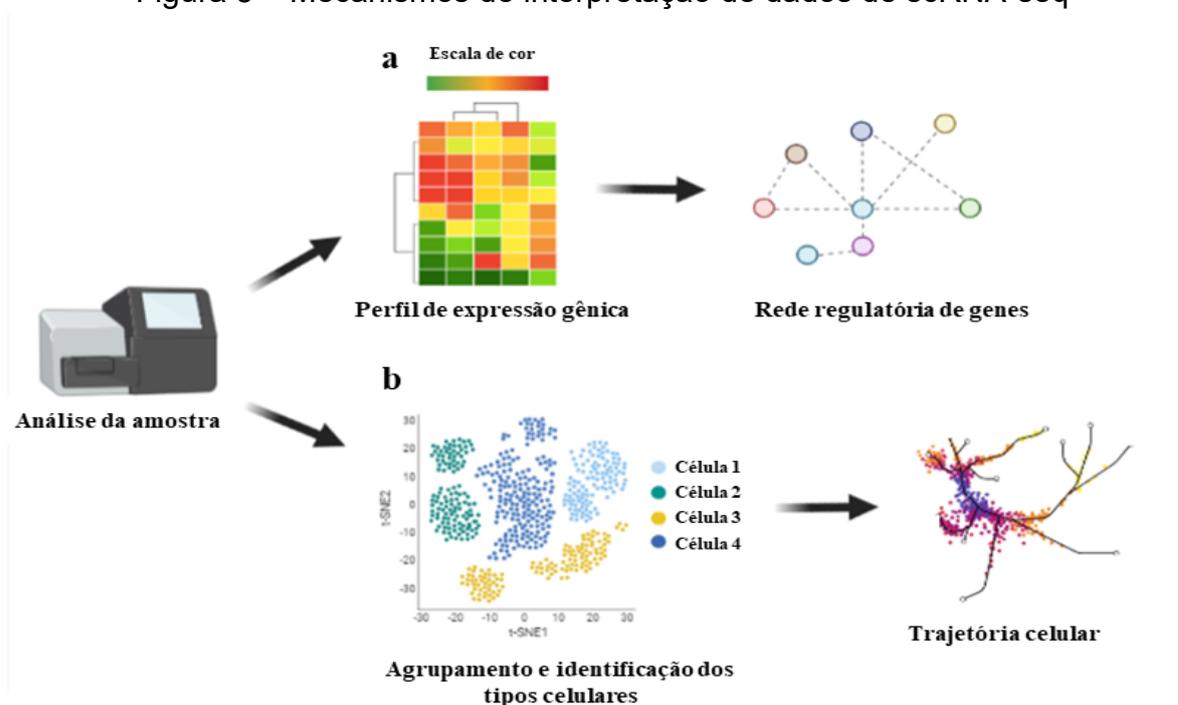
A biologia de sistemas pode ser descrita como a área de estudo responsável por compreender os componentes biológicos de um sistema, suas interações, e como eles se integram ao todo, produzindo comportamentos dinâmicos complexos cuja estrutura é sensível a alterações de suas condições, como o volume desses dados sistemáticos é vasto, usa-se abordagens e modelos computacionais para análises dos conjuntos de dados de um determinado sistema (ZOU *et al*, 2013; TURANLI *et al*, 2021). Nesse contexto, as tecnologias de alto rendimento e os dados por elas gerados a partir de análises ômicas têm se expandido nas últimas décadas, o que também gerou um rápido avanço de novas abordagens para analisá-los e interpretá-los. Em um panorama geral, aplicado à farmacologia, metodologias *in silico* vem ajudando a melhor entender as bases moleculares das doenças, mecanismo de ação de drogas, estratificações de risco e características de diagnóstico/prognóstico de biomarcadores, tornando-se indispensável nas abordagens híbridas de reposicionamento de fármacos atuais (TURANLI *et al*, 2021; JEHAN, 2019).

Dentre essas estratégias computacionais, o sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq) é uma técnica de alto rendimento que permite a obtenção de vários parâmetros da heterogeneidade celular presente em determinada amostra, como a investigação de diferenças transcricionais da expressão gênica e suas vias de interação, identificação e classificação de subpopulações celulares distintas, além de permitir estabelecer relações com doenças associadas que possuem semelhanças em sua patobiologia (JEHAN, 2019; HAN *et al* 2020). As análises de scRNA-seq ajudam a identificar esses parâmetros, traçando os perfis de expressão gênica à nível individual das células presentes nas amostras e explorando as funcionalidades de cada tipo celular no microambiente de interesse (**Figura 5**) (ROSTOM *et al*, 2017).

Devido a importância desses tipos de análises e a crescente necessidade de compartilhamento de informação global para geração de dados cada vez mais robustos, bancos de dados celulares, como o Gene Expression Omnibus (GEO) e o Human Cell Atlas (HCA), tem investido na disponibilização de recursos de forma colaborativa entre pesquisadores internacionais para maior integração, utilidade e acessibilidade dos dados (CLOUGH; BARRETT, 2016; HON *et al*, 2018). Para a COVID-19, dados de scRNA-seq de amostras de tecidos infectados das vias aéreas

superiores e inferiores, como nasofaringe (NS) e fluido do lavado broncoalveolar (BALF), respectivamente, estão dentre os tipos de amostras disponibilizadas para pesquisa (ZHAO *et al*, 2020). Tais dados e tipos de coleta dependem do estágio da doença, de modo que amostras da NS são coletadas tanto de pacientes saudáveis, quanto infectados em estágios leve, moderado ou grave, enquanto que amostras do BALF ou de escovagem brônquica protegida (PSB) geralmente são coletadas apenas de pacientes em estágio grave, internados e com auxílio de ventilação mecânica. Uma vez que essas amostras são coletadas, processadas, sequenciadas e depositadas nos bancos de dados, tornam-se disponíveis para reanálise de diferentes grupos de pesquisa com diferentes abordagens científicas (REYNOLDS. *et al*, 2021; LEONELLI, 2013).

Figura 5 – Mecanismos de interpretação de dados de scRNA-seq



Legenda: Em **a)** o sequenciamento de RNA de célula única permite definir o perfil de expressão gênica de cada célula da amostra e avaliar os genes diferencialmente expressos em um *heatmap*, assim como definir uma rede regulatória de genes a partir da interação dessas células; **b)** À nível celular é possível redimensionar e agrupar os dados para visualização das diferentes subpopulações celulares em um plano 2D, além de permitir prever a trajetória de diferenciação dessas células em um pseudotime definido. Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de ROSTOM *et al*, 2017.

Assim como os bancos de dados celulares auxiliam no fornecimento de metadados para reanálises, os resultados gerados, obtidos via scRNA-seq, podem ser aplicados e comparados com dados farmacológicos presentes em bancos de dados de moléculas bioativas como o ChEMBL, ou em bancos de drogas como o

DrugBank, que fornecem informações de milhares de drogas e seus potenciais alvos terapêuticos, assim como suas propriedades estruturais (ZHOU *et al*, 2021; MURUGAN *et al*, 2020).

Dessa forma, as diferentes metodologias para reposicionamento de fármacos se tornam ainda mais abrangentes, e recentemente, no combate à COVID-19, vários métodos com critérios e parâmetros distintos têm surgido para tal fim, como pode-se observar no trabalho de LI *et al* (2022), em que foi aplicado um algoritmo de proximidade baseado em redes entre alvos terapêuticos das drogas depositadas no DrugBank e as proteínas presentes no interatoma da fibrose pulmonar pós-covid. Neste caso, o algoritmo foi utilizado para encontrar eventuais candidatos de tratamento a partir da assinatura gênica dos vinte principais genes relacionados com a doença, sendo um inédito, identificados previamente a partir de análises de scRNA-seq.

Na estratégia empregada por LIU *et al* (2021), a partir de análises bioinformáticas de ontologia genética, foram elencados potenciais genes relacionados à COVID-19 utilizando-se dados transcriptômicos de célula única de pacientes infectados, e em seguida, estabelecida a relação droga-alvo com uso de algoritmo de proximidade baseado em redes para definição das drogas candidatas. Ainda no mesmo estudo, foram realizadas análises de enriquecimento gênico em tipos celulares específicos e aplicado um algoritmo de predição sinérgica entre as opções terapêuticas apresentadas para maior precisão dos resultados.

Outro exemplo recente é o trabalho desenvolvido por HE; GARMIRE & ASGARD (2021), onde é apresentado um programa cujo algoritmo tem como finalidade concatenar dados de scRNA-seq com dados de drogas depositadas em bancos online para melhor prever os resultados de reposicionamento de fármacos, sendo capaz de analisar e inferir uma droga candidata para cada tipo celular presente na amostra ou para a amostra como um todo. Para isso, o programa foi validado com dados celulares de três doenças diferentes, entre elas a COVID-19, e a relação entre os biomarcadores e a doença feita a partir de células do BALF de pacientes infectados.

Por fim, técnicas que incluem inteligências artificiais como aprendizado de máquinas, redes neurais artificiais e mineração de dados, também têm sido utilizadas para aprimorar a qualidade dos estudos de reposicionamento de fármacos, à exemplo do trabalho de LOPEZ-CORTES *et al* (2021), onde amostras das vias respiratórias de

pacientes infectados com COVID-19 foram submetidas à scRNA-seq e à análises *in silico* para definir a rede proteica do interatoma, e então um modelo de rede neural artificial usado para eleger as opções de tratamento.

## 1.5 CONSIDERAÇÕES SOBRE ESTE TRABALHO

Desde o advento da pandemia de COVID-19, uma quantidade massiva de dados sobre o SARS-CoV-2 e seus efeitos no organismo humano foram publicados globalmente, com o objetivo de encontrar uma solução para a atual situação pandêmica que traz graves consequências não só na área da saúde, mas também em âmbito social, econômico e político. A partir da dedicação dos pesquisadores, o compartilhamento de informações e o incentivo financeiro adequado, em aproximadamente três anos foram desenvolvidas, produzidas e distribuídas vacinas para imunizar a população e mitigar os efeitos da doença. Entretanto, referente às opções de tratamento indicadas para a COVID-19 o cenário é diferente, apesar de já existirem alternativas terapêuticas aprovadas pelos órgãos de regulamentação e pela OMS, ainda não se tem um fármaco eficaz disponível para os estágios iniciais ou mais grave da doença, que seja universal, de fácil aquisição e administrado por vias não injetáveis.

Diante disso, a literatura aponta com base nas características do vírus que a inibição do acoplamento viral a partir do bloqueio dos receptores ACE-2 e das proteases auxiliares, assim como um controle regulatório das citocinas expressas no tecido pulmonar infectado em quadros de tempestade inflamatória, são os caminhos viáveis mais explorados na investigação do uso terapêutico de fármacos. Considerando que a resposta imune exacerbada da tempestade de citocinas depende da relação entre as células do hospedeiro com o vírus e entre si, explorar os mecanismos celulares atrelados à COVID-19 continuam sendo fundamentais na elaboração de hipóteses e na obtenção de dados.

Portanto, este trabalho tem como justificativa a importância de analisar e investigar os marcadores biológicos da COVID-19 em células das vias aéreas respiratórias para diferentes estágios da doença, testando a aplicação de metodologias bioinformáticas integradas que permitem avaliar parâmetros-chaves da complexa dinâmica celular, contribuindo assim para o desenvolvimento de estratégias de reposicionamento de fármacos cada vez mais precisas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar os biomarcadores e os fatores de transcrição associados com o processo inflamatório em pacientes infectados com COVID-19, a partir de dados de scRNA-seq de amostras das vias aéreas respiratórias, para eleição de opções terapêuticas via reposicionamento de fármacos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i. Detectar as diferentes subpopulações presentes nas amostras das vias aéreas respiratórias de pacientes infectados em diferentes estágios da doença, e definir seus genes diferencialmente expressos;
- ii. Verificar as diferenças na regulação de expressões gênicas dos receptores e facilitadores virais em células das vias aéreas respiratórias infectadas com SARS-CoV-2;
- iii. Traçar a trajetória de diferenciação das células epiteliais durante o curso da infecção e apontar a dinâmica regulatória dos marcadores associados com o processo;
- iv. Estabelecer as vias de sinalização celular afetadas por reguladores transcricionais a partir da comunicação celular e interações ligante-receptor;
- v. Comparar os dados obtidos a partir das análises com as propriedades de fármacos presentes na literatura e em bancos de dados de drogas para identificação de potenciais agentes terapêuticos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Este projeto utilizou dados de scRNA-seq de amostras das vias aéreas respiratórias superiores (NS) de 5 pacientes saudáveis para o grupo controle, e de amostras das vias respiratórias tanto superiores quanto inferiores (NS, PSB e BALF) de 19 pacientes infectados com COVID-19, sendo 11 classificados em estágio grave e 8 em estágio moderado da doença de acordo com a OMS. Estes dados foram obtidos por meio do banco de dados do *The European Genome-phenome Archive* (EGA) e estão disponíveis publicamente sob o seguinte código de acesso: [EGAD00001006339](https://ega.ebi.ac.uk/data/EGAD00001006339). As análises prévias de coleta e sequenciamento das amostras, assim como o depósito no banco de dados, foram realizadas por CHUA *et al* (2020).

#### 3.2 PROCESSAMENTO DOS DADOS

As análises dos dados de scRNA-seq obtidos foram conduzidas no ambiente virtual de programação RStudio (versão 2022.02.3+492), utilizando a linguagem R (versão 4.2.0; *The R foundation for Statistical Computing*, Topeka, KS, USA), e performados por meio de dois principais algoritmos de biologia de sistemas, o CellRouter (LUMMERTZ DA ROCHA *et al*, 2018) e o CellComm (LUMMERTZ DA ROCHA *et al*, 2022). Ambos códigos dos programas foram obtidos por meio do download do pacote *Framework for unified single-cell analysis* (FUSCA; versão 1.3.1) disponível em <https://github.com/edroaldo/fusca>. Para performance das análises e total funcionalidade do pacote FUSCA, foi necessário a instalação de outros pacotes de programação adquiridos pelo CRAN (<https://cran.rstudio.com>) ou pelo Bioconductor (<https://www.bioconductor.org>), e que estão listados no tutorial fornecido no primeiro link. Os metadados carregados em formato de matriz foram filtrados em 25.000 células para melhor visualizar o volume de dados, por conseguinte o objeto de análise criado com o CellRouter foi filtrado para conter células que expressem pelo menos 50 genes, assim como genes expressos em pelo menos 25 células, em seguida os dados foram normalizados e escalonados com uso das funções *Normalize* e *ScaleData* do pacote FUSCA. Para fins de reprodutibilidade das etapas descritas neste trabalho, o código utilizado para as análises pode ser encontrado no **Apêndice A**.

### 3.3 REDUÇÃO DIMENSIONAL E AGRUPAMENTOS CELULARES

Para visualização dos diferentes grupos celulares presentes na amostra, primeiramente foram utilizadas as funções *ComputePCA* e *ComputeUMAP* para calcular a correlação entre as células usando o componente principal de análises (PCA) e aproximação e projeção de variedade uniforme (UMAP), respectivamente, tendo-se definido 50 componentes principais, além de traçar o gráfico de desvio padrão. Em seguida, a função *customSpace* foi aplicada para definir as coordenadas personalizadas utilizadas para visualizar os dados em um espaço de dimensão reduzida. Para plotar os gráficos de representação dos grupos celulares neste espaço bidimensional, utilizou-se a função *PlotReducedDimension*, definindo o objeto de análise, o tipo de amostra (neste caso RNA), o tipo de método de redução aplicado, PCA ou UMAP, e o parâmetro escolhido para visualizar o gráfico, ou seja, o tipo celular, as populações encontradas e o estágio de gravidade da doença. Os gráficos de proporção também foram construídos com base nos mesmos parâmetros citados.

### 3.4 ANÁLISE DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

Os perfis de expressão gênica em cada grupo celular são apresentados em *heatmaps* contendo a totalidade de genes diferencialmente expressos ou os principais marcadores daquele grupo especificado pelo usuário, os *heatmaps* são obtidos a partir da função *findSignatures* utilizada para identificar as assinaturas gênicas presentes, e *PlotSignaturesHeatmap* para visualizar os dados gerados. As anotações celulares dos grupos encontrados são definidas de acordo com a análise dos genes expressos e com base no que se é visto na literatura, e para este trabalho foram mantidas as anotações pré-estabelecidas a partir da função *findClusters*.

### 3.5 INFERÊNCIA DA TRAJETÓRIA CELULAR E SEUS PRINCIPAIS GENES MARCADORES

A análise de inferência da trajetória de diferenciação celular foi realizada a partir da filtragem das células imunológicas, deixando nas amostras somente as células epiteliais de interesse, e estabelecendo um pseudotempo de diferenciação para tais células de acordo com a progressão dos estágios da doença. Inicialmente foi computado o gráfico de k-vizinhos mais próximos (KNN) com a função *buildKNN*

usando os componentes estabelecidos com o PCA e as similaridades entre as células, e em seguida estabelecido e processado o tipo celular de origem e os destinos alvos para a busca das curvas de diferenciação com a função *findCurves*, neste caso as células basais foram definidas como o tipo de origem e as células ciliadas e secretoras como os destinos alvos da trajetória.

Logo após, foram computadas as correlações existentes entre a expressão gênica e o pseudotempo para cada trajetória possível, utilizando-se do método estatístico não paramétrico do coeficiente de correlação de Spearman com a função *correlationPseudotime*. Nesta etapa foram definidos os principais genes correlacionados positiva e negativamente com as trajetórias encontradas por meio da função *topGenes*, e essa dinâmica da expressão gênica normalizada utilizando regressão polinomial com intuito de agrupar padrões transcricionais complexos, através da função *smoothDynamics*. A rede regulatória de genes foi então definida considerando os parâmetros das análises anteriores e os perfis cinéticos ao longo do caminho de diferenciação utilizando a função *buildGRN*, e por meio da *plottrajectories* a dinâmica da expressão dos genes de interesse selecionados pelo usuário foram plotados.

Com tais dados obtidos, diferentes representações desses resultados foram geradas como os *heatmaps* dos genes de interesse ao longo da trajetória (*plotPathHeatmap*), a visualização bidimensional da expressão dos genes nos grupos celulares definidos (*plotDRExpression*), e a distribuição dessa expressão em formato de gráfico tipo violino (*plotViolin*). Por fim, os reguladores transcricionais dos destinos celulares investigados foram plotados ao integrar as redes reguladoras de genes com a dinâmica de expressão ao longo das trajetórias, tendo como base o cálculo da pontuação que define os genes superexpressos ou os desregulados com auxílio das funções *plottr* e *grnscores*.

### 3.6 ANÁLISE DE COMUNICAÇÃO CELULAR

O algoritmo do CellComm foi utilizado para identificar as redes de comunicação celular, podendo ser realizado a partir de dados de transcriptoma espacial, ou de RNA, no caso deste trabalho. Inicialmente foram definidos os parâmetros do objeto CellRouter para análise, onde para cada gene em cada grupo celular são calculadas as médias de expressão do gene no cluster e a porcentagem de células que

expressam tal gene, com o número de células e genes consideráveis estimados pelo usuário e citados em **3.2**. Em seguida, após repetidas as etapas de escalonamento, normalização dos dados e definição dos genes marcadores, o algoritmo infere as interações célula-célula utilizando uma lista de interações ligante-receptor publicada por BROWAEYS; SAELENS & SAEYS (2020), sendo a média da expressão de cada ligante/receptor e sua expressão em cada cluster da amostra calculada por meio das funções *ComputeValue* e *ObservedCalculatedMean*.

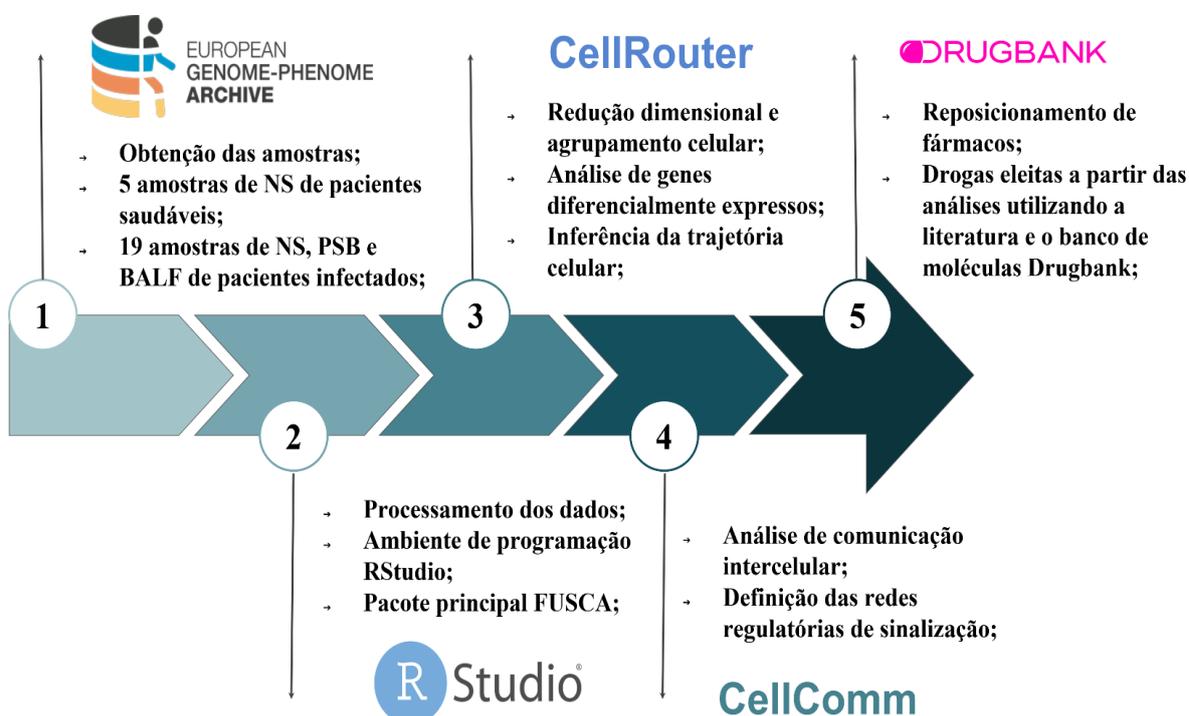
Em seguida, definiu-se um valor de  $p$  a partir da distribuição das expressões médias dos genes intracelulares, utilizado para filtragem das interações ligante-receptor e definir as redes de interação com a função *predictCellInteractions*. Após isso, foram selecionadas as principais interações célula-célula identificadas para ambos grupos amostrais, assim como também os pares de ligante-receptores com maior grau de intensidade para geração do gráfico de relação com uso da função *PlotPairDotplot*. Com intuito de identificar os fatores transcricionais (TFs) que atuam como reguladores expressos do produto das vias de sinalização de receptores de superfície ativados, a próxima etapa criou uma rede de interação ponderada (a partir da métrica de correlação de Pearson) com base nas anotações gênicas de cada célula (função *buildGNR*) e nos dados de interação proteína-proteína do banco de dados *iRefIndex* (<https://irefindex.vib.be/wiki/index.php/iRefIndex>), utilizando a função *CreatePPI*.

Finalmente, na análise de vias de sinalização entre os receptores de superfície e os TFs, a função *FindPaths.SimpleRJava* definiu as vias traçadas de uma proteína receptora até o principal regulador de transcrição determinante para a identidade celular, tendo como base o cálculo da pontuação de atividade para cada caminho possível favorecendo aqueles cujos *regulons* são enriquecidos para assinaturas celulares específicas. Essa abordagem permite que o algoritmo preveja vias de sinalização e redes de transcrição sem conhecimento prévio da estrutura da via, com os dados de saída sendo processados por meio da função *Summarize.Flow* para que se possa efetivar a visualização gráfica com as funções *activeSignaling* e *rankpaths*. Para esta última análise foram selecionados como células receptoras aquelas de maior interesse entre os grupos amostrais.

### 3.7 SELEÇÃO DE DROGAS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO

O reposicionamento de fármacos realizado teve como base os parâmetros obtidos nas análises anteriores, comparados com a ação terapêutica, mecanismo de ação e alvos estruturais de drogas depositadas no banco de drogas DrugBank, assim como uma análise da literatura sobre as estratégias farmacológicas estudadas. Para a relação das drogas sugeridas foram considerados exemplos ainda não citados em outras secções deste trabalho, assim como drogas cujas análises clínicas não apresentaram efeitos colaterais secundários aparentes. O fluxograma da metodologia deste trabalho está representado na **figura 6**.

Figura 6 – Fluxograma da metodologia do estudo



Legenda: Em **1**) a metodologia se inicia com a obtenção das amostras no *European genome-phenome archive* (EGA), onde 5 amostras foram coletadas da nasofaringe de pacientes saudáveis e 19 coletadas do fluido do lavado broncoaveolar, escovagem brônquica protegida, além da nasofaringe. Em **2**) as amostras foram conduzidas no ambiente de programação RStudio e processadas para início das análises, tendo como principal pacote de comandos utilizado o *Framework for unified single-cell analysis* (FUSCA), contendo ambos os algoritmos de análise CellRouter e CellComm. Em **3**) com uso do CellRouter as análises de redução dimensional e agrupamento celular foram realizadas, junto das análises de genes diferencialmente expressos e de inferência da trajetória celular, enquanto que em **4**) têm-se a utilização do CellComm para análise de comunicação intercelular e definição das redes regulatórias de sinalização. Por fim, em **5**) o reposicionamento de fármacos foi realizado a partir dos dados obtidos nas análises, comparados com dados da literatura e com drogas candidatas depositadas no banco de drogas do DrugBank. Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A relação do gráfico KNN e a distância inferida entre células foi realizada utilizando o parâmetro de distância euclidiana, e logo após tais distâncias foram transformadas com base na métrica de redes do coeficiente de similaridade de Jaccard. O algoritmo do CellRouter classifica os genes da trajetória com base na correlação definida pelo usuário, como o coeficiente de correlação de Pearson ou Spearman, considerando a diferenciação durante a progressão da trajetória, neste trabalho utilizou-se o coeficiente de Spearman. Para definir uma cinética de expressão gênica mais complexa, o algoritmo suaviza os perfis transcricionais por meio da regressão não-paramétrica de suavização de curvas *spline* para cada trajetória, padronizando-as. Foram considerados genes acima de 80% quantis como positivamente correlacionados com a trajetória, e genes abaixo de 10% quantis não correlacionados com a progressão da trajetória. Utilizando o CellComm, as análises performadas aplicam os dados gênicos juntos dos pares de ligantes-receptores ou dos reguladores transcricionais obtidos considerando o valor ajustado de  $p < 0,05$  estatisticamente significativo, visualizado nos resultados.

## 4 RESULTADOS

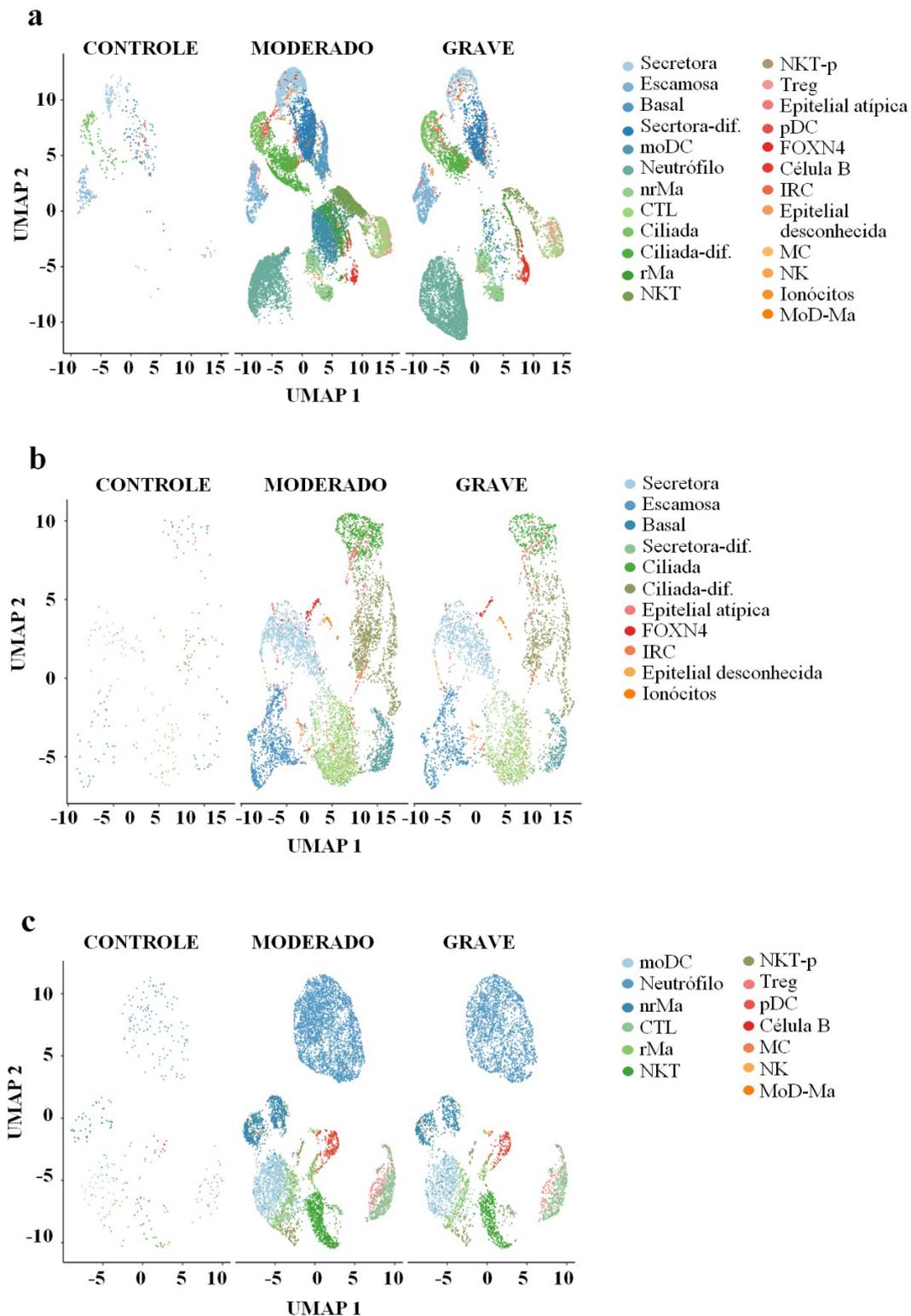
### 4.1 GRUPOS CELULARES IDENTIFICADOS NAS AMOSTRAS

A redução dimensional UMAP aplicada às amostras das vias aéreas superiores, em específico da NS, de pacientes infectados com COVID-19 mostrou diferentes populações celulares dentre as células imunológicas e epiteliais para cada estágio da doença, sendo ao todo 24 populações diferentes, onde 11 são de células epiteliais: secretoras, secretoras em diferenciação (Secretora-dif), ciliadas, ciliadas em diferenciação (Ciliada-dif), basais, escamosas, ionócitos, FOXN4 (de acordo com PLASSCHAERT *et al*, 2018, grupo de células ciliadas com expressão positiva de FOXN4 e FOXJ1, mas com baixa expressão de marcadores de maturação, como TUBB4B), célula responsiva ao IFN-  $\gamma$  (IRC), e duas células epiteliais inespecíficas; enquanto 13 grupos são de células do sistema imune: células NK, célula T regulatória (Treg), célula T citotóxica (CTL), células B, macrófagos residentes (rMa) e macrófagos não-residentes (nrMa), neutrófilos, célula dendrítica derivada de monócito (moDC), célula dendrítica plasmocitoide (pDC), mastócitos (MC), macrófago derivado de monócito (MoD-Ma), célula T natural killer (NKT) e célula T natural killer proliferativa (NKT-p), todas visualizadas nas **Figuras 7 e 8**.

Dentre as células epiteliais, observa-se uma distribuição no volume celular considerável entre o grupo controle e moderado/grave para COVID-19, sendo o moderado o de maior volume de células secretoras, basais e FOXN4. Já dentre as células imunológicas, poucas células foram encontradas no grupo controle, enquanto que nos grupos moderado e grave um maior volume pôde ser observado, incluindo uma notável concentração de neutrófilos no estágio grave (**Figuras 7, 8 e 9A**).

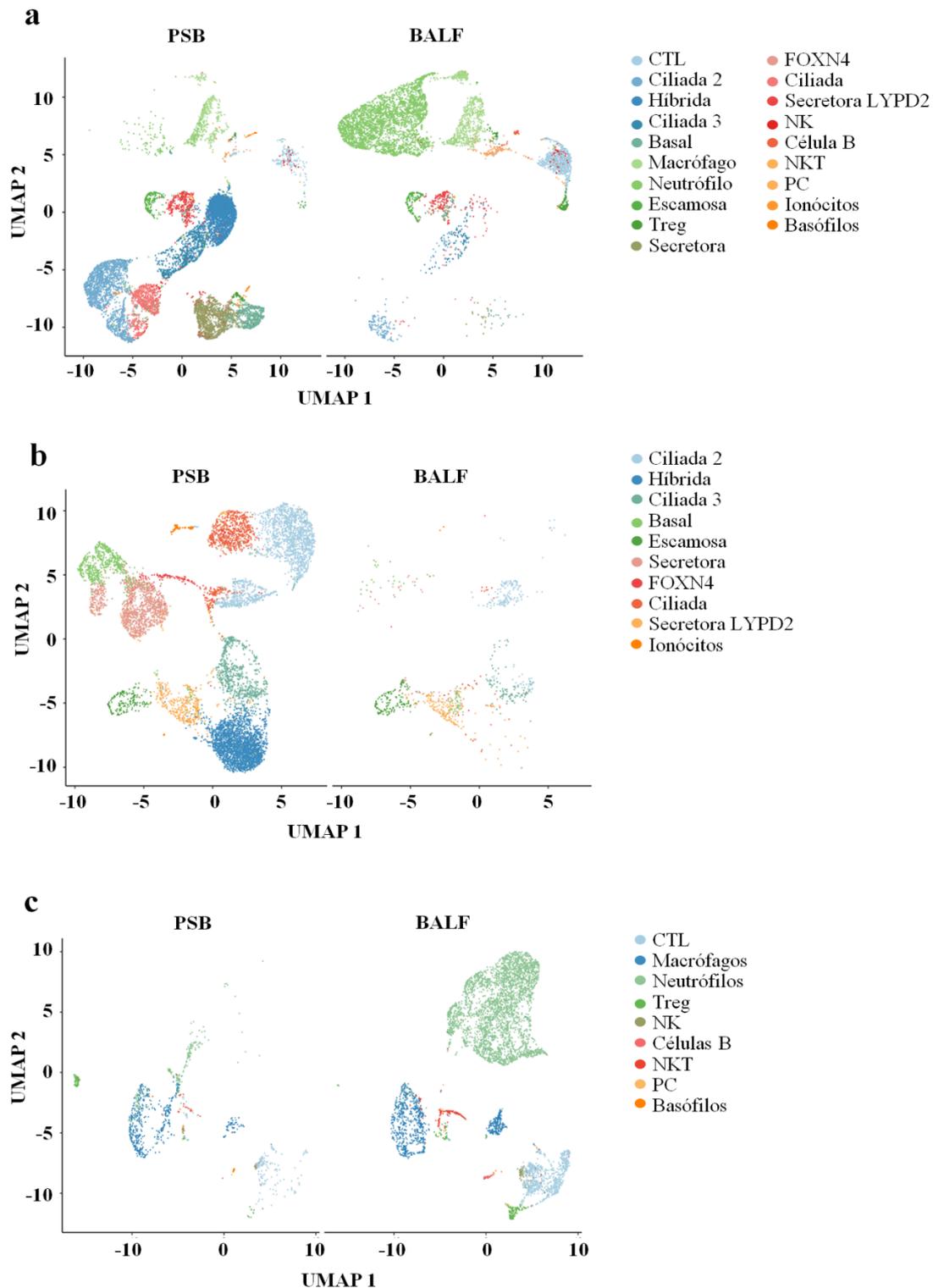
Nas vias aéreas inferiores, todos os grupos celulares pertencem ao estágio grave da doença, devido ao tipo de coleta mais invasiva. Nestas amostras observa-se uma maior proporção de células epiteliais para o grupo PSB e uma maior proporção de células imunológicas para o BALF, e ao todo foram identificados 19 tipos celulares, sendo as epiteliais: Basais, ciliadas tipo 1, 2 e 3, FOXN4, híbridas, ionócitos, dois tipos de secretoras, e células escamosas; enquanto que as imunológicas foram: Células B, basófilos, CTL, macrófagos, neutrófilos, NK, NKT, Treg e célula plasmática (PC) (**Figura 8**). A diferença entre grupos fica notável na análise de proporção, em especial na grande concentração de células CTL, NKT e neutrófilos no BALF, e uma grande concentração de FOXN4, secretoras e ciliadas no PSB, como visto na **Figura 9b**.

Figura 7 – Grupos celulares presentes nas amostras de nasofaringe (NS) para cada estágio da doença via técnica de redução dimensional UMAP



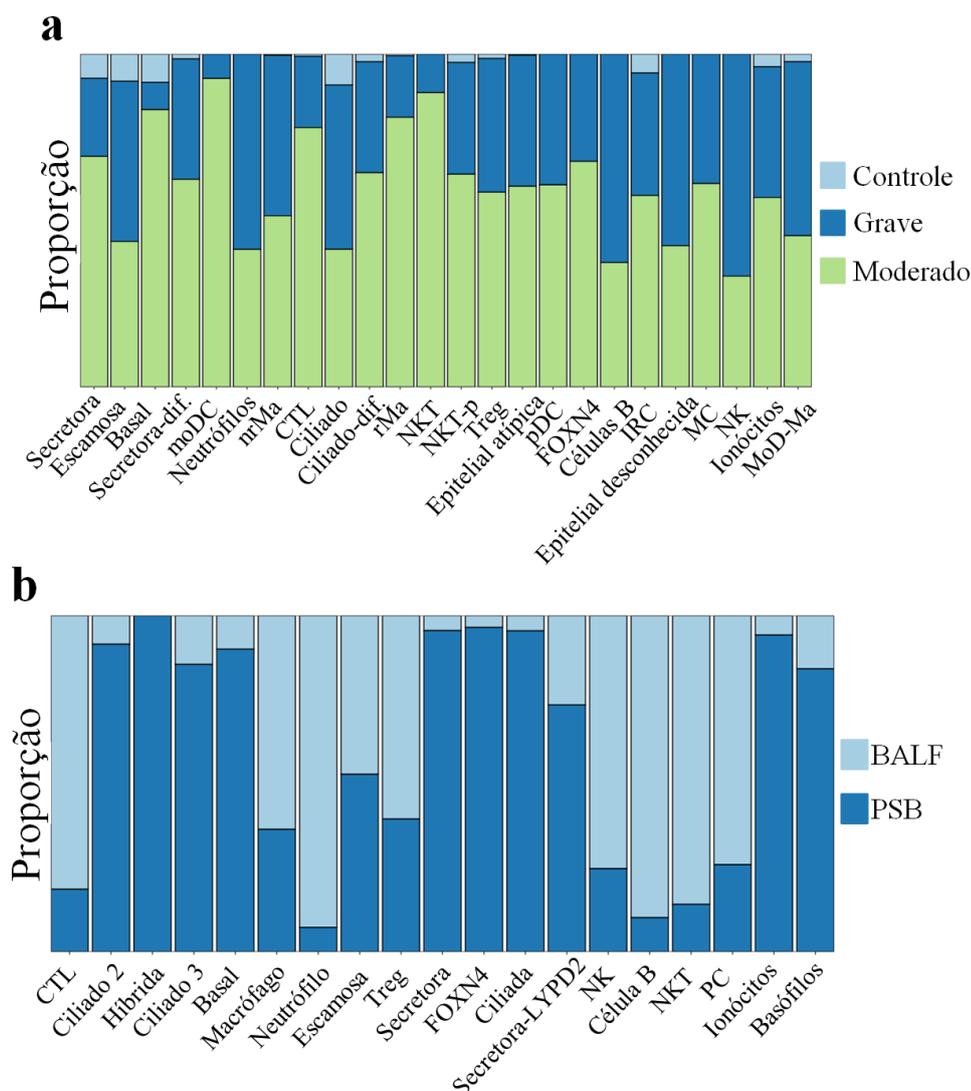
Legenda: Representação bidimensional dos grupos celulares presentes nas amostras das vias aéreas superiores, coletadas da NS de pacientes infectados com COVID-19 em diferentes estágios da doença; em **a)** os grupos celulares totais, entre células epiteliais e imunológicas para cada um dos três grupos de estágio da doença; em **b)** os grupos celulares epiteliais presentes nos grupos controle, de estágio moderado e estágio grave da doença; E em **c)** os grupos celulares imunológicos presentes nos mesmos grupos, respectivamente; Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Grupos celulares presentes nas amostras de fluido do lavado broncoaveolar (BALF) e escovagem brônquica protegida (PSB) via técnica de redução dimensional UMAP



Legenda: Representação bidimensional dos grupos celulares presentes no BALF e PSB de pacientes infectados com COVID-19 no estágio grave da doença; em **a)** os tipos celulares totais, entre células epiteliais e imunológicas para o grupo grave da doença e divididos por tipo amostral, BALF e PSB; em **b)** os grupos celulares epiteliais de pacientes no estágio grave da doença divididos por tipo amostral; e em **c)** as células imunológicas presentes nos mesmos grupos, respectivamente; Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 – proporção dos tipos celulares identificados em cada grupo amostral



Legenda: Representação gráfica em barras das proporções celulares vistas em **a)** para os grupos controle, grave e moderado nas amostras de NS de pacientes infectados com SARS-CoV-2, e em **b)** para o grupo grave de pacientes infectados com SARS-CoV-2 em amostras das vias aéreas respiratórias inferiores divididas em BALF e PSB; Fonte: Elaborado pelo autor.

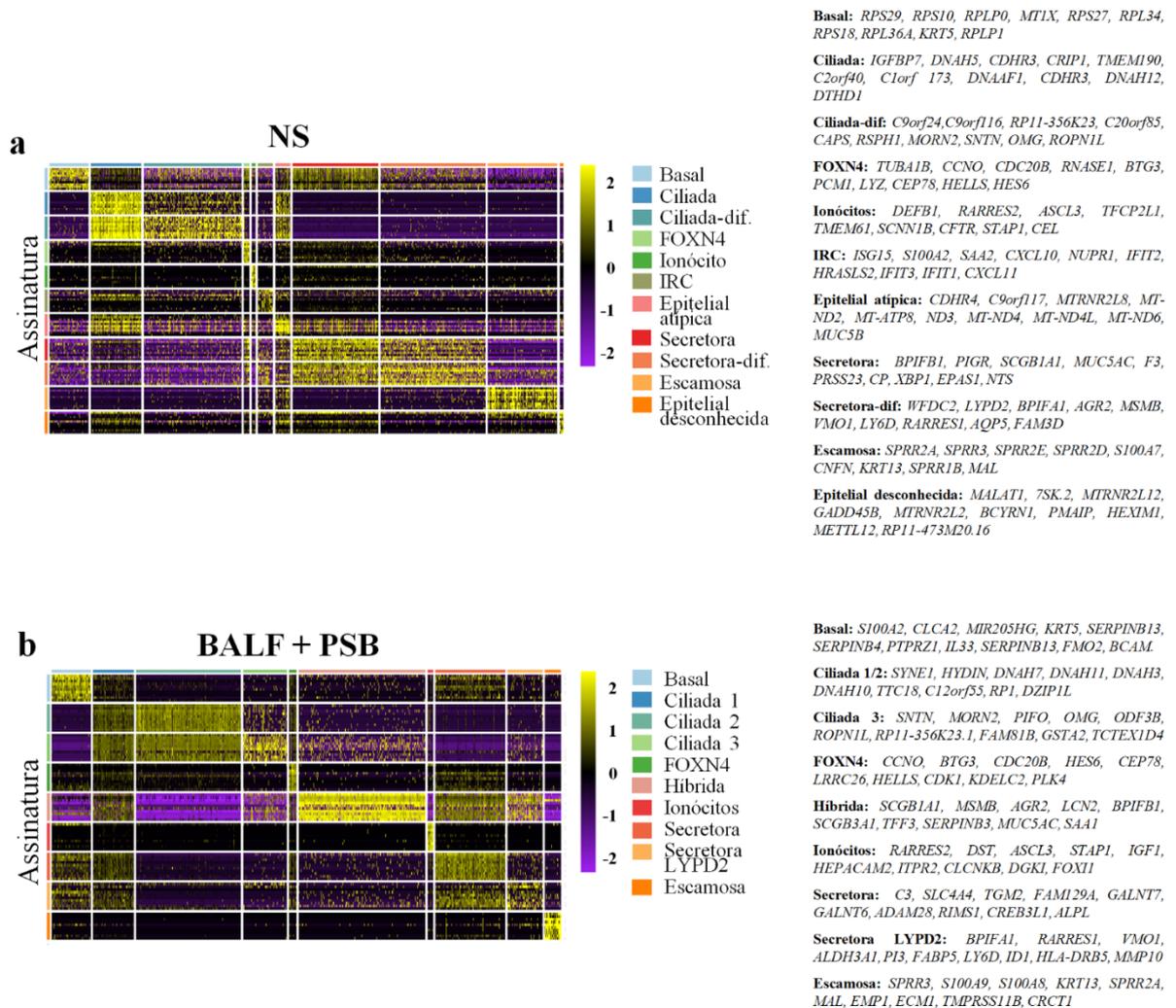
## 4.2 PERFIS GÊNICOS DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE AS AMOSTRAS

A análise de expressão gênica das amostras determinou os genes diferencialmente expressos entre os tipos celulares identificados, para tal, foram destacados os dez principais genes com os maiores níveis de expressão em cada grupo, agindo como marcadores de determinada população celular e apresentados em forma de mapas de calor, os *heatmaps*. A **Figura 10** representa os *heatmaps* para

as células epiteliais totais de NS, assim como os totais de PSB + BALF, elucidando quais genes destacam-se nessas populações, têm-se então os principais genes para NS evidenciados na parte superior da figura (**10a**), assim como também disponíveis no quadro do **Apêndice B**. Já na parte inferior da imagem, em **10b**, têm-se os principais genes para PSB e BALF, e a versão em quadro pode ser encontrada no mesmo apêndice. Além disso, em detalhes, os *heatmaps* das células epiteliais separados para cada estágio da doença podem ser vistos no **Apêndice C**.

A visualização dos genes marcadores para cada população pode ser melhor analisada no gráfico da **Figura 11**, onde a expressão média e a porcentagem foram quantificadas para cada três dos dez principais genes diferencialmente expressos nas amostras, tanto nos grupos totais de NS quanto em PSB + BALF das células epiteliais. Esta análise permitiu inferir padrões gênicos para o processo de diferenciação celular durante a infecção por COVID-19, assim como também aprofundar nos mecanismos genéticos utilizados pelas células do organismo em diferentes cenários da doença.

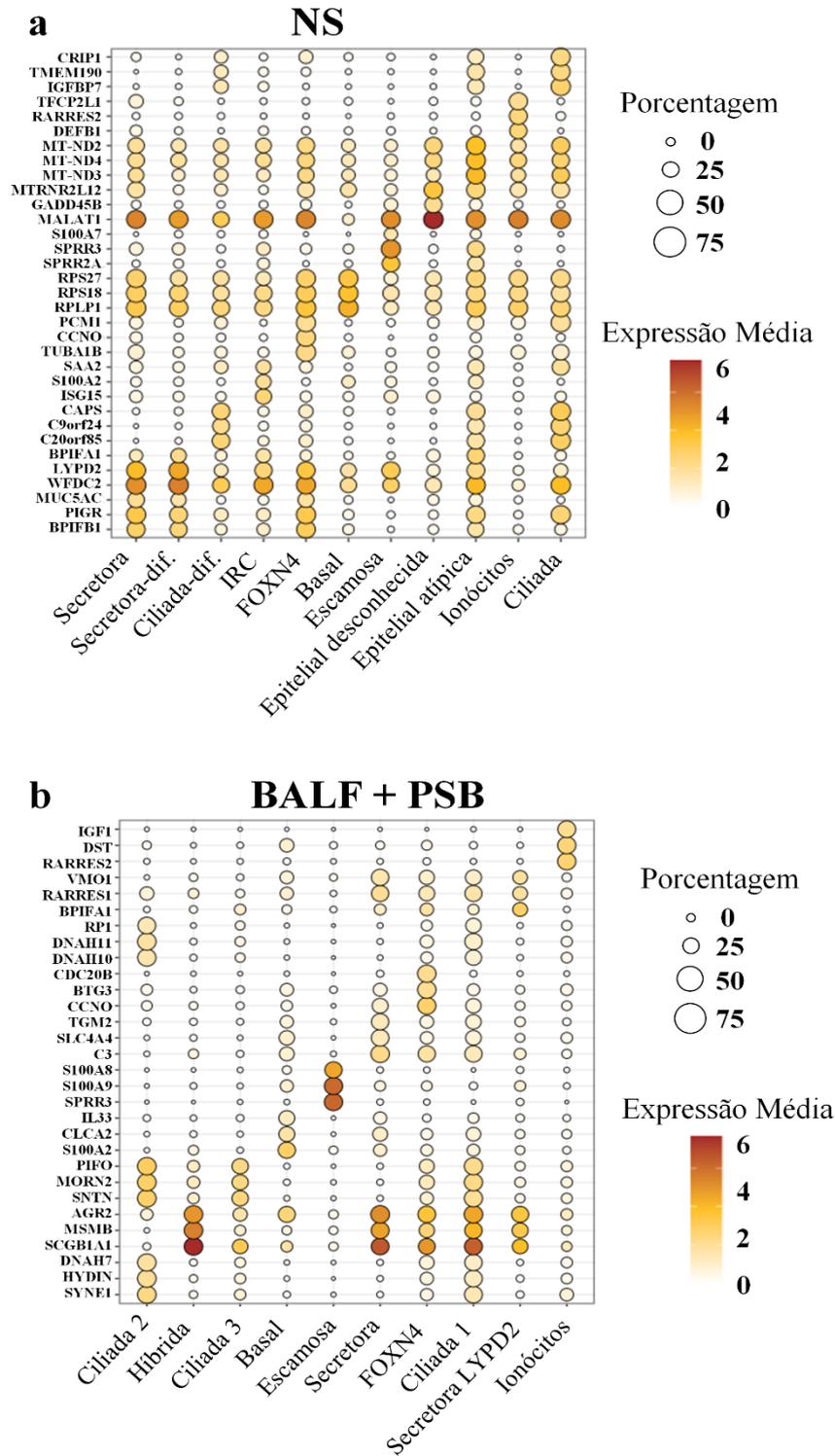
Figura 10 – *Heatmaps* dos genes diferencialmente expressos em células epiteliais das amostras



Legenda: Em **a**) o top 10 genes diferencialmente expressos para cada tipo celular epitelial identificado na amostra de NS; e em **b**) o top 10 genes diferencialmente expressos para os tipos celulares epiteliais identificados nas amostras de BALF e PSB; Fonte: Elaborado pelo autor.

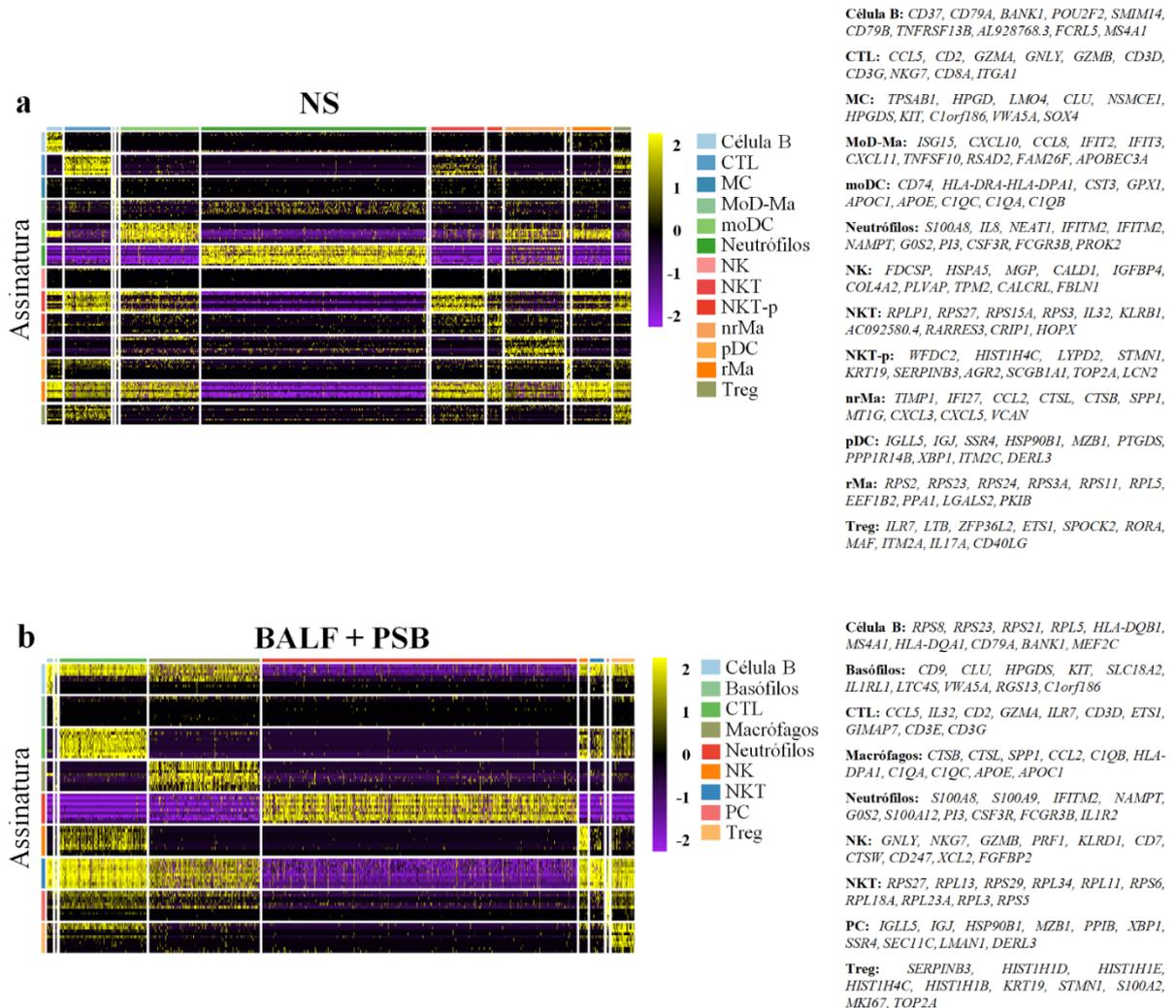
A **Figura 12** apresenta os principais genes expressos nas células imunológicas totais das amostras, tanto para as vias aéreas superiores, quanto inferiores. Assim como a figura 10, os genes são apresentados em forma de *heatmaps*, onde para NS presentes na parte superior da figura, em **12a**, enquanto que para as células do PSB + BALF os genes são evidenciados na parte inferior, na **Figura 12b**. A relação com os dez principais genes expressos neste grupo amostral pode ser observada, além da figura, em forma de quadro no **Apêndice D**, e de mesmo modo, para os genes das células imunológicas em cada estágio da doença os *heatmaps* obtidos podem ser melhor destacados no **Apêndice E**.

Figura 11 – Gráfico dotplot dos principais genes expressos em células epiteliais.



Legenda: Em **a**) os genes diferencialmente expressos para cada tipo celular epitelial identificado na amostra de NS considerando todos os níveis de severidade da doença; e em **b**) os genes diferencialmente expressos para os tipos celulares epiteliais identificados nas amostras de BALF e PSB; Fonte: Elaborado pelo autor.

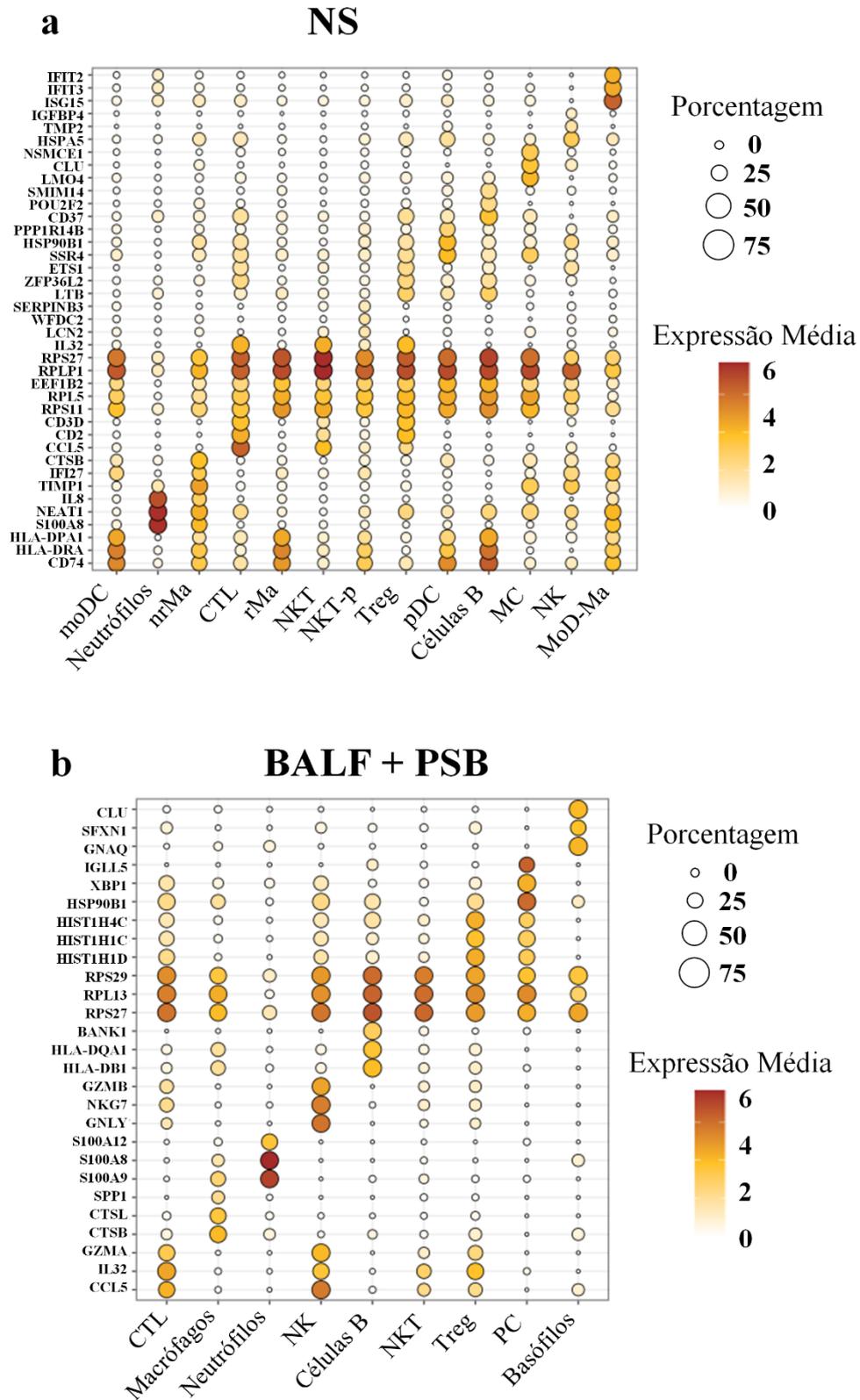
Figura 12 – *Heatmaps* dos genes diferencialmente expressos em células imunológicas das amostras.



Legenda: Em **a**) o top 10 genes diferencialmente expressos para cada tipo celular imunológico identificado na amostra de NS; e em **b**) o top 10 genes diferencialmente expressos para os tipos celulares imunológicos identificados nas amostras de BALF e PSB; Fonte: Elaborado pelo autor.

Por conseguinte, a visualização da plotagem dos dados apresentados permite comparar os genes marcadores entre os diferentes tipos celulares presentes na amostra, identificando aqueles exclusivos e de expressão comum entre os grupos, visto na **Figura 13**. Para as células imunológicas essa análise permitiu inferir a dinâmica de expressão das citocinas inflamatórias entre os estágios da COVID-19, principalmente referente ao quadro de tempestade inflamatória na amostra do BALF.

Figura 13 – Gráfico dotplot dos principais genes expressos em células imunológicas.



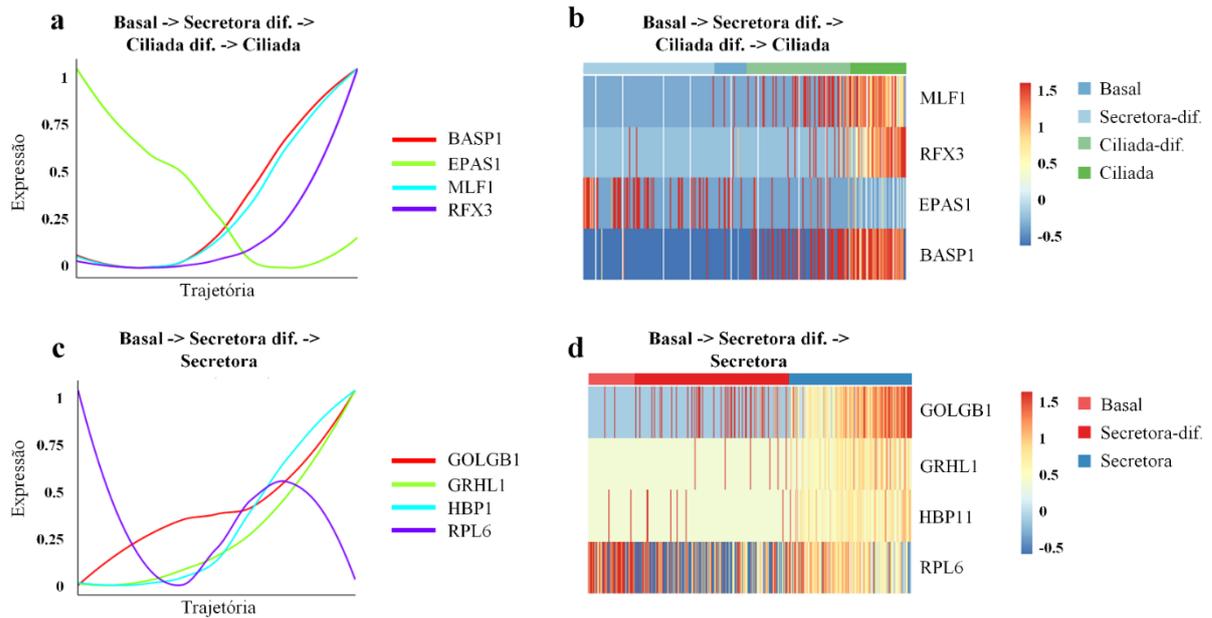
Legenda: Em **a**) os genes diferencialmente expressos para cada tipo celular imunológico identificado na amostra de NS considerando todos os níveis de severidade da doença; e em **b**) os genes diferencialmente expressos para os tipos celulares imunológicos identificados nas amostras de BALF e PSB; Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3 TRAJETÓRIA DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS EPITELIAIS E SEUS MARCADORES DE TRANSCRIÇÃO.

A análise seguinte buscou definir a trajetória de diferenciação dentro das populações celulares epiteliais a partir da capacidade das células basais de agirem como células progenitoras, podendo diferenciar-se em célula ciliada ou secretora dependendo do processo biológico no qual realiza, como renovação ou reparo celular. A **Figura 14** evidencia a rota de diferenciação de células basais em ciliadas em amostras de NS de pacientes infectados com COVID-19 passando por duas etapas intermediárias, secretora-dif. e ciliada-dif., e destaca os principais genes relacionados com a trajetória e seu *heatmap* de expressão, sendo eles os genes *BASP1*, *MLF1* e *RFX3* superexpressos, e o gene *EPAS1* desregulado.

Além disso, a figura também mostra a análise para a rota de diferenciação alternativa das células basais em secretoras com apenas uma etapa intermediária, o grupo celular secretora-dif., e seus principais genes de influência na trajetória com o respectivo *heatmap* de expressão, sendo os genes positivamente regulados *GOLGB1*, *GRHL1* e *HBP1*, enquanto que o *RPL6* encontra-se negativamente regulado.

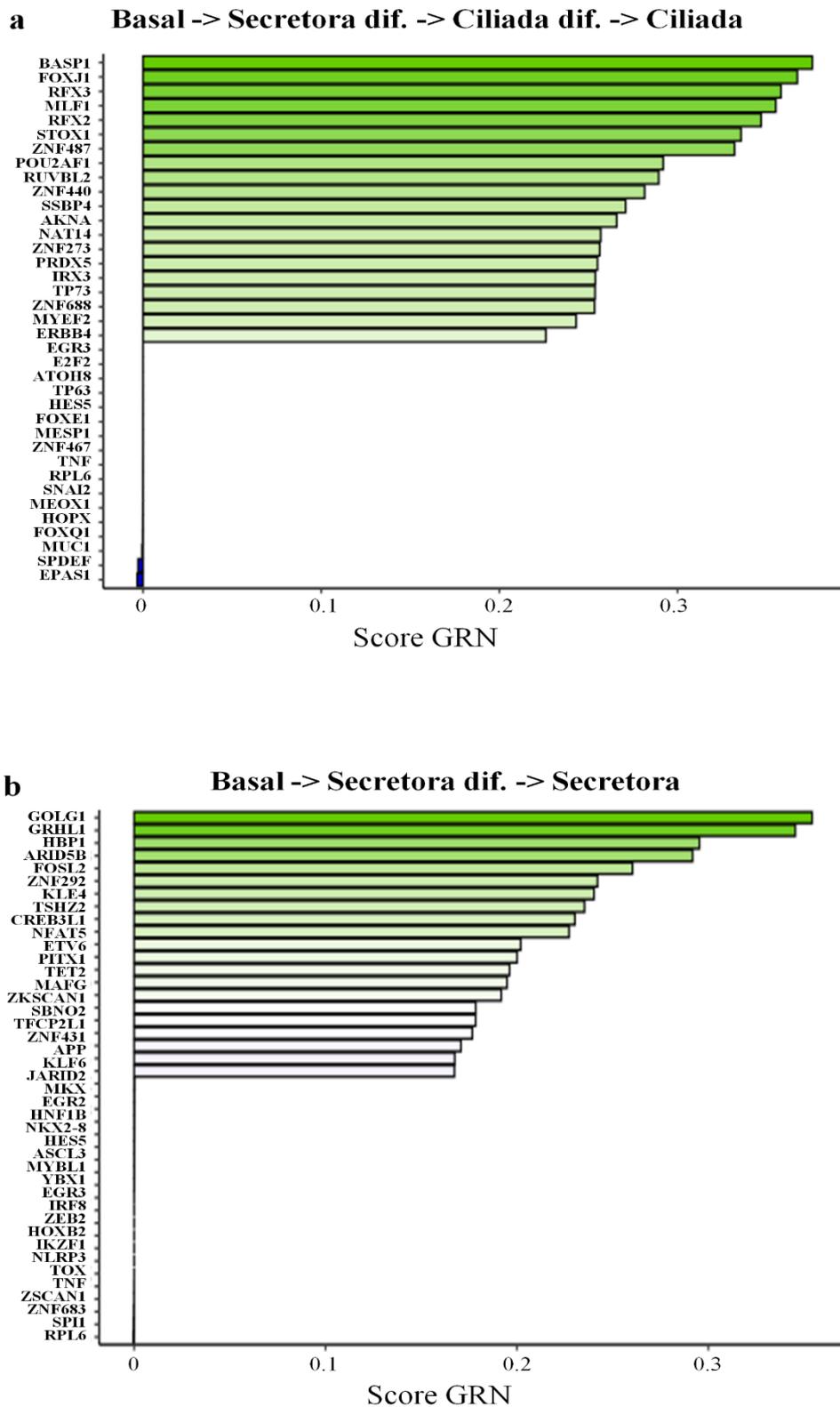
Figura 14 – Trajetórias de diferenciação celular e seus genes marcadores



Legenda: Em **a**) a trajetória de diferenciação de células basais para ciliadas em amostras de NS focando na expressão dos principais genes relacionados com a trajetória (BASP1, MLF1, RFX3 superexpressos, e EPAS1 desregulado); em **b**) o *heatmap* de expressão de tais genes para cada tipo celular da trajetória; em **c**) a trajetória de diferenciação de células basais para secretoras em amostras de NS focando na expressão dos principais genes relacionados com a trajetória (GOLGB1, GRHL1, HBP1 superexpressos, e RPL6 desregulado); e em **d**) o *heatmap* de expressão de tais genes para cada tipo celular da trajetória selecionada; Fonte: Elaborado pelo autor.

Os principais genes envolvidos com as trajetórias de diferenciação encontradas são definidos e ranqueados a partir de um score específico baseado na rede regulatória de genes determinada pelo algoritmo, tal score é denominado score GRN e a relação desses genes para cada trajetória pode ser observado na **Figura 15**. Em **15a** é exibido o gráfico contendo os principais genes da trajetória de diferenciação de células basais em ciliadas, apresentando genes tanto positiva quanto negativamente expressos a partir do score GRN, enquanto que em **15b** têm-se esta relação para a trajetória alternativa de células basais em secretoras.

Figura 15 – Gráfico de expressão dos principais genes marcadores da trajetória a partir do score GRN.

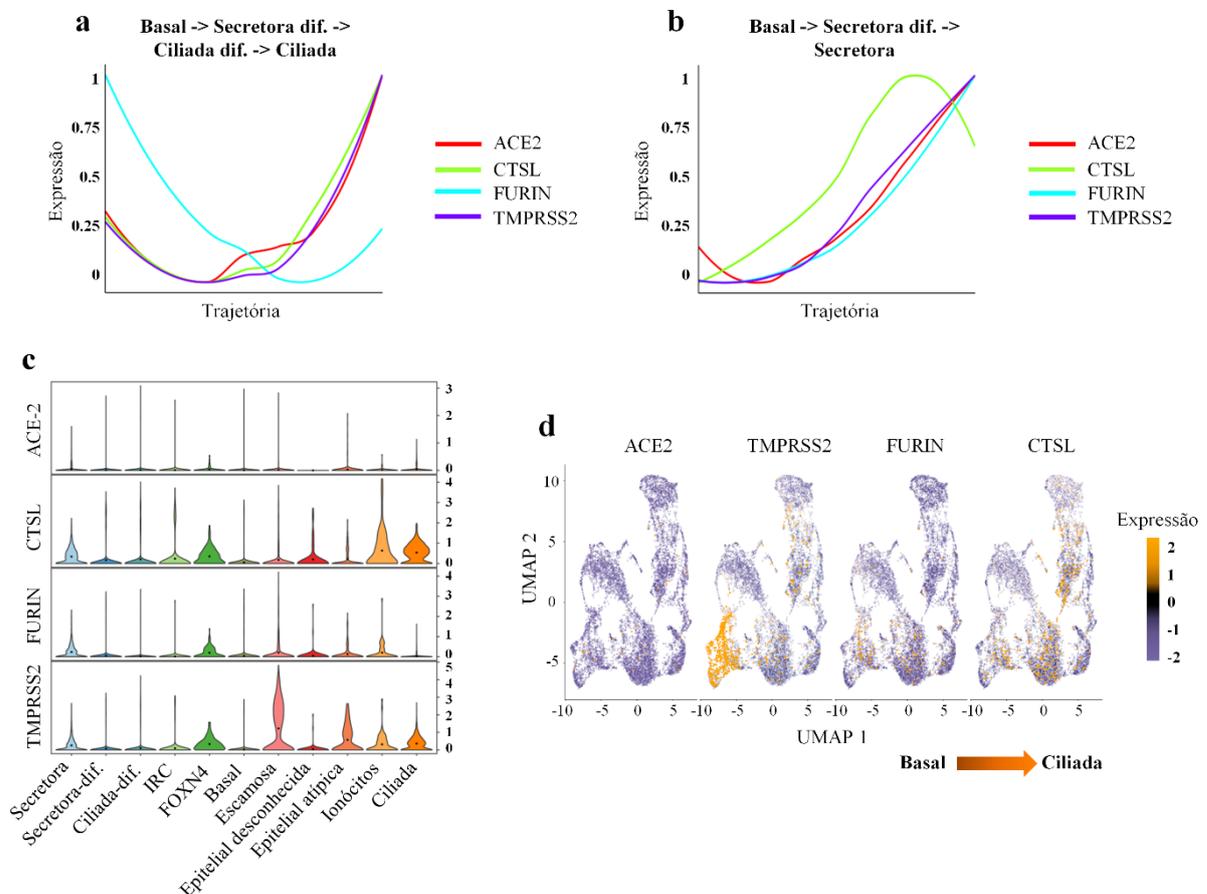


Legenda: Em **a**) a expressão dos genes marcadores para a trajetória de diferenciação de células basais em ciliadas a partir da pontuação do score GRN; e em **b**) a expressão dos genes marcadores para a trajetória de diferenciação de células basais em secretoras a partir da pontuação do score GRN; Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES FACILITADORES DO ACOPLAMENTO VIRAL

Os genes relacionados com o acoplamento viral nas células do hospedeiro são de vital importância para compreensão do mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 nas células epiteliais, diante disso, a análise de expressão dos genes ACE2, TMPRSS2, FURIN e CTSL foi mensurada tanto para as trajetórias de diferenciação definidas para as amostras de NS quanto para os grupos celulares epiteliais como um todo. A **Figura 16** mostra o nível de expressão desses genes para cada trajetória, de células basais em ciliadas e de células basais em secretoras, revelando uma regulação positiva de todos genes, com exceção do gene FURIN para a primeira trajetória, cuja expressão diminui ao longo do percurso.

Figura 16 – Expressão gênica dos acopladores virais



Legenda: Em **a**) a expressão dos genes relacionados com o acoplamento viral do SARS-CoV-2 ao longo da trajetória de diferenciação de células basais em ciliadas de amostras de NS; em **b**) a expressão dos genes relacionados com o acoplamento viral do SARS-CoV-2 ao longo da trajetória de diferenciação de células basais em secretoras de amostras de NS; em **c**) o gráfico do tipo violino para distribuição desses genes nas células epiteliais de NS; e em **d**) a expressão de cada gene nos grupos celulares a partir do método de visualização UMAP; Fonte: Elaborado pelo autor.

A figura também apresenta a expressão dos genes no formato de plotagem gráfica de violino e no método de visualização UMAP para os grupos celulares epiteliais totais, observando um alto nível de expressão dos facilitadores de acoplamento viral principalmente em células ciliadas. No **Apêndice F** também é possível visualizar a expressão desses genes em formato de plotagem de violino e por método UMAP para as células do BALF.

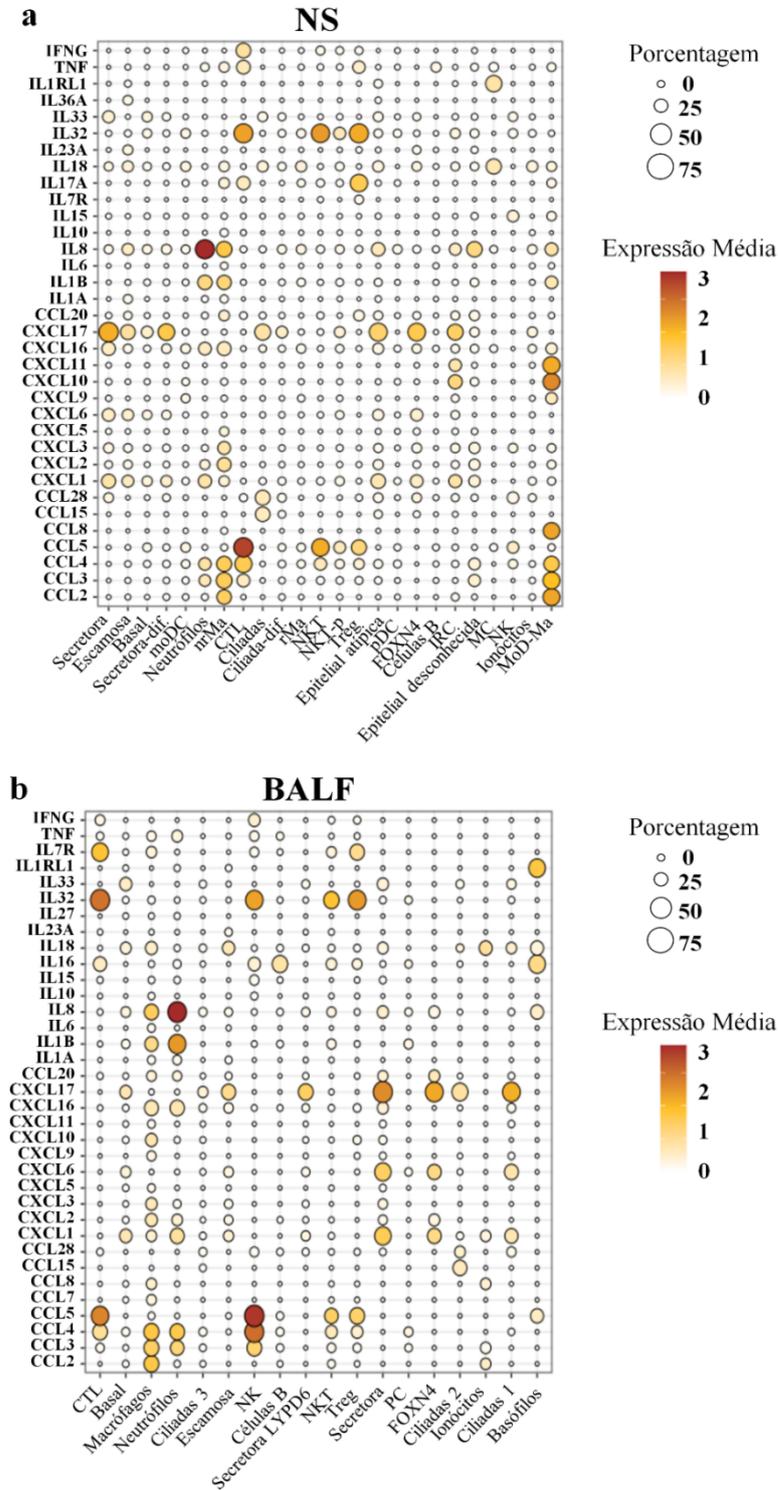
#### 4.5 NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS NAS VIAS RESPIRATÓRIAS.

Posteriormente foram investigados os níveis de expressão de citocinas, quimiocinas e outros marcadores inflamatórios nos grupos celulares identificados nas amostras. Na **Figura 17** estão presentes os gráficos plotados da expressão desses agentes inflamatórios nas amostras das vias aéreas superiores e inferiores, onde para as células de NS observa-se uma alta expressão de IL-8 em neutrófilos, de IL-32 em CTL, Treg e NKT, e CCL5 também em CTL e NKT, além de uma expressão considerável de CXCL17 em células secretoras e FOXP4, e das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL8, CXCL10 e CXCL11, no grupo celular moD-Ma. Já para as células presentes no BALF, têm-se uma expressão significativa de IL-8 e IL-1 $\beta$  em neutrófilos, de IL-32 e IL-17A em CTL, NK e Treg, assim como de CXCL17 nas células secretoras, FOXP4 e ciliadas tipo 1, da quimiocina CCL5 em CTL e NK, de CCL4 em macrófagos, neutrófilos e NK, e também de CCL3 e CCL2 nos macrófagos. Dentre os agentes inflamatórios expressos pelas células epiteliais e imunológicas, alguns genes e proteínas participam não só do recrutamento de monócitos no sítio da infecção, mas também do processo de extravasamento celular que danifica a barreira endotelial, tais genes e seu perfil de expressão podem ser observados no **Apêndice G**.

Para investigação da influência do processo de morte celular programada no quantitativo de células identificadas no curso da doença, foram realizadas análises de expressão gênica de marcadores da apoptose para cada estágio da COVID-19 em ambos grupos amostrais. A **figura 18** apresenta em gráfico violino a expressão dos marcadores CASP3, CYC5 e FAS, promotores da apoptose, nas células imunológicas e epiteliais para NS e no BALF, podendo-se observar um aumento expressivo nos três marcadores em células epiteliais como basais, secretoras e ciliadas, além das células imunológicas como um todo, com o avanço da doença, principalmente nas amostras

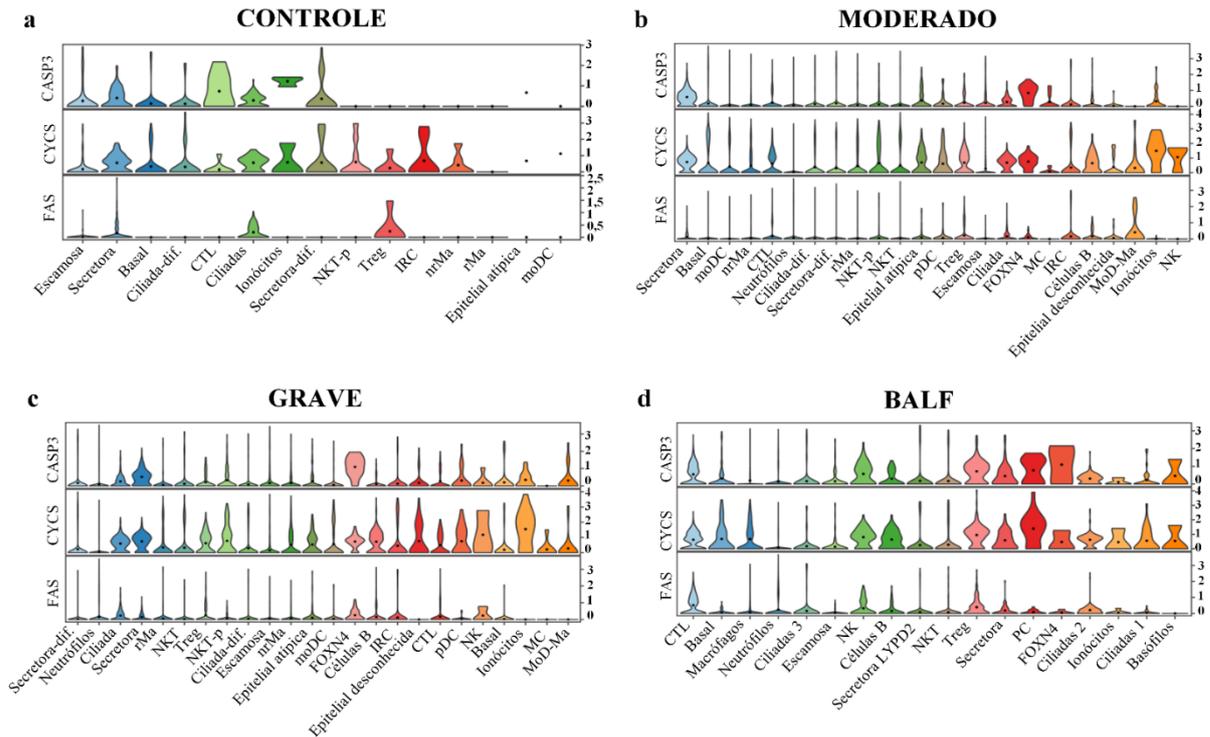
do BALF, onde as células NK, basófilos, CTL, PC e Treg, assim como as epiteliais basais, secretoras e FOXP4 expressam os marcadores em maior quantidade.

Figura 17 – Gráfico dotplot de expressão gênica de agentes inflamatórios.



Legenda: Em **a**) a expressão gênica de citocinas, quimiocinas e agentes pró-inflamatórios em células epiteliais e imunológicas presentes em amostras das vias aéreas superiores (NS); e em **b**) a expressão gênica de citocinas, quimiocinas e agentes pró-inflamatórios em células epiteliais e imunológicas presentes em amostras das vias aéreas inferiores (BALF); Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18 – Gráfico violino da expressão gênica de marcadores de apoptose nas amostras de pacientes infectados com COVID-19 por grau da doença



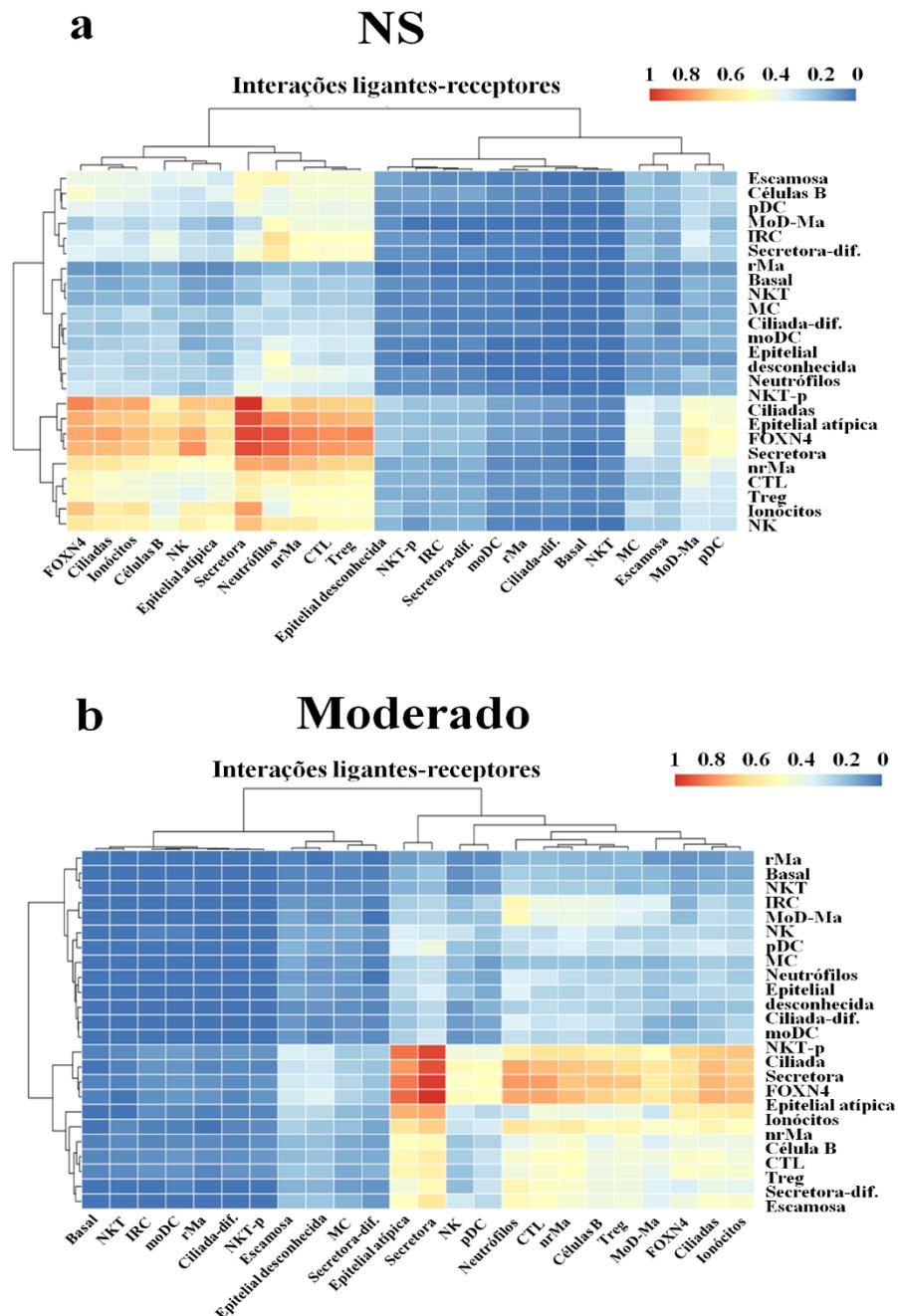
Legenda: Em **a**) o nível de expressão dos genes FAS, CYCS e CASP3, relacionados à apoptose, nas células epiteliais e imunológicas das vias aéreas superiores (NS) do grupo controle para a doença; em **b**) o nível de expressão dos mesmos genes nas células epiteliais e imunológicas de amostras de NS de pacientes no estágio moderado da doença; em **c**) o nível de expressão desses genes nas células epiteliais e imunológicas de amostras de NS no estágio grave da doença; e em **d**) o nível de expressão dos três genes nas células epiteliais e imunológicas presentes nas amostras das vias aéreas inferiores (BALF) de pacientes internados com infecção por SARS-CoV-2; Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.6 COMUNICAÇÃO CELULAR

Finalizada as análises utilizando o algoritmo do CellRouter, um segundo algoritmo para análises de comunicação celular foi utilizado tendo como base o mesmo pacote de programação *fusca* no Rstudio, o CellComm. A partir desta análise, as **figuras 19 e 20** mostram o grau de interação célula-célula para cada tipo celular presente em amostras de NS dos pacientes infectados com COVID-19, onde é possível observar uma maior interação entre os pares de ligantes-receptores para os tipos celulares epiteliais envolvidos no processo de diferenciação, como células secretoras, FOXN4, ciliadas, assim como também para com células imunológicas em grupos de nrMa, células T e neutrófilos, na expressão de citocinas e quimiocinas que contribuem para a lesão no tecido. As figuras apresentam as interações célula-célula dividindo os grupos por grau de severidade da doença, de modo que para as amostras

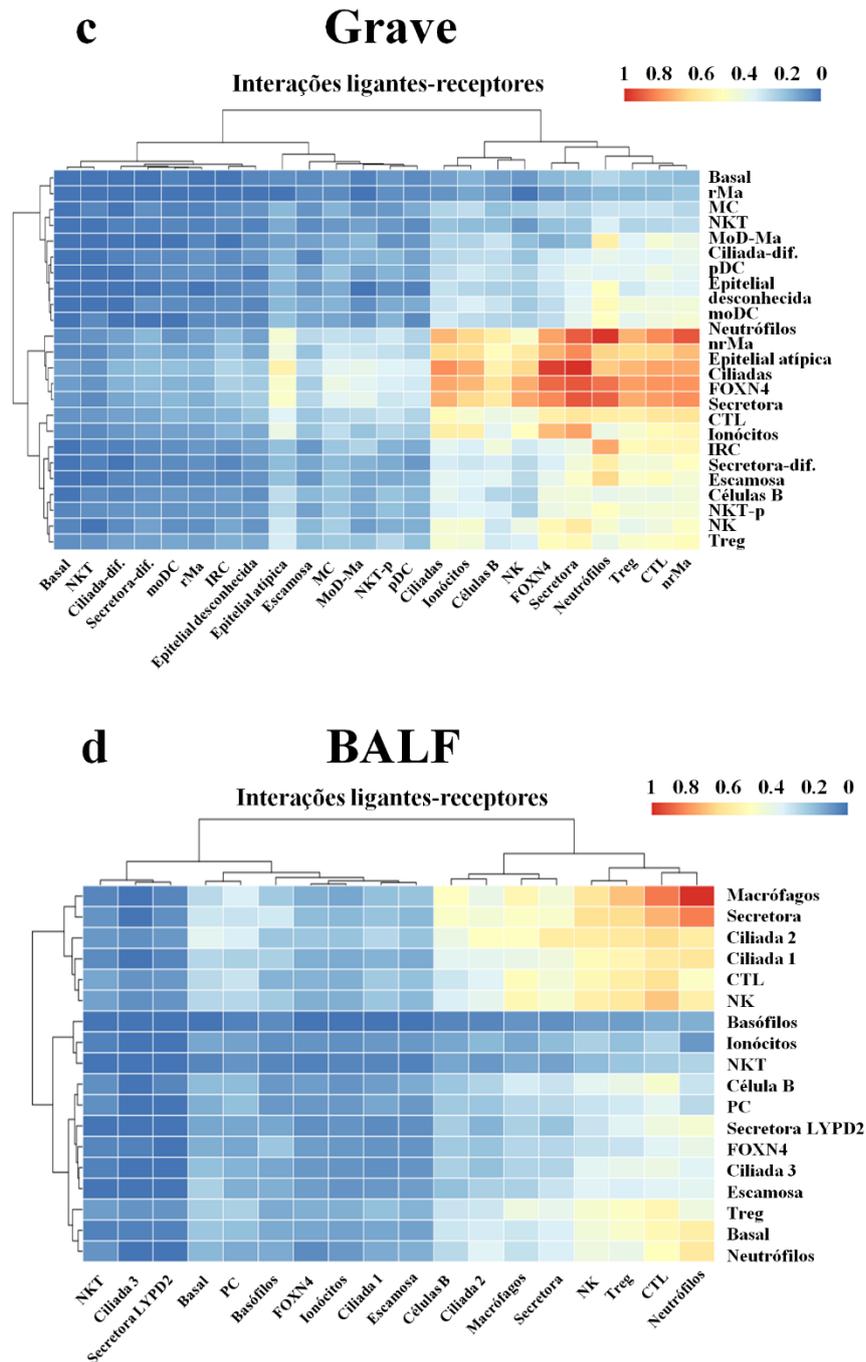
de BALF em pacientes internalizados é possível destacar principalmente a interação entre células imunológicas, como macrófagos, neutrófilos, CTL, NK e Treg, além das populações celulares epiteliais ciliadas e secretoras, elucidando uma maior comunicação e o estabelecimento de fortes relações interconexas entre diferentes grupos celulares durante o curso da infecção *in vivo*.

Figura 19 – Comunicação célula-célula em amostras de NS totais e no grupo moderado da doença



Legenda: Em **a**) a interação entre grupos celulares existentes nas amostras de NS totais de pacientes com COVID-19, para células epiteliais e imunológicas, e em **b**) a interação entre grupos celulares existentes para o estágio moderado da doença, onde o grau da amplitude na rede de interação dos pares ligantes-receptores é mostrado de azul (menor grau) até vermelho (maior grau).

Figura 20 – Comunicação célula-célula em amostras de NS no estágio grave da doença e no grupo amostral do BALF



Legenda: Em **a**) a interação entre grupos celulares existentes nas amostras de NS do estágio grave da COVID-19, para células epiteliais e imunológicas, e em **b**) a interação entre grupos celulares existentes para o estágio grave em amostras do BALF, onde o grau da amplitude na rede de interação dos pares ligantes-receptores é mostrado de azul (menor grau) até vermelho (maior grau).

A partir do gráfico de comunicação célula-célula das amostras foi possível avaliar a intensidade de interação dos pares de ligantes e receptores na superfície celular de células epiteliais e imunológicas nos diferentes grupos amostrais,

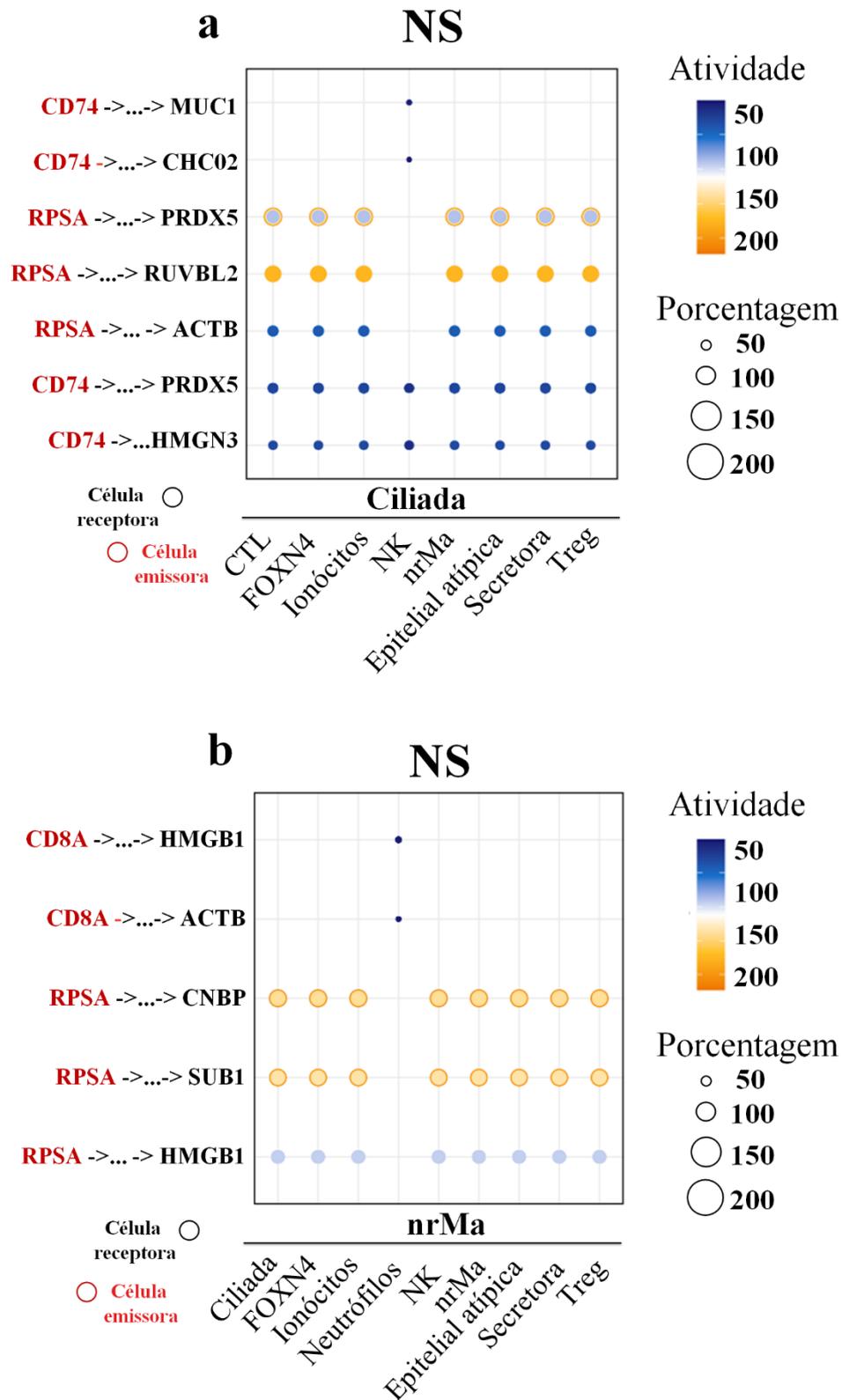
evidenciando assim interações existentes ao longo da progressão da doença e denotando os pares potencialmente relacionados com o processo de tempestade inflamatória e agravamento da COVID-19. Esta relação está presente na **figura 21**, onde é possível visualizar o grau de intensidade de cada relação ligante-receptor com base nas principais interações célula-célula da análise anterior, sendo visto em **21a**, considerando uma célula receptora e outra emissora, uma notável expressividade do ligante CCL5 interagindo com receptores de células imunológicas do grupo amostral NS. Já em **21b**, têm-se para as células do BALF uma diversidade maior de um alto grau de interações entre os ligantes-receptores dentre as populações celulares, como é visto não só para o CCL5, mas também para o NAMPT, RPS19, CD2 e outros ligantes que interagem com diferentes receptores, como o CXCR4, IL7R e CD44, sugerindo potenciais relações associadas com a inflamação agravante e eventuais alvos de ação farmacológica. A relação ligante-receptor vistas separadamente por grau da doença em NS pode ser encontrada no **apêndice H**.

Por conseguinte, tendo estabelecido as principais proteínas de superfície celular envolvidas na interação entre os grupos celulares das amostras, estando elas adjacentes ou distantes, foi realizada uma análise de predição da cascata das vias de sinalização para os receptores da superfície celular até os eventuais reguladores transcricionais utilizando um algoritmo otimizado integrado ao CellComm. A **figura 22** apresenta a predição da cascata das vias de sinalização para o grupo amostral NS, onde na parte superior, em **22a**, têm-se as vias estabelecidas para as células ciliadas como receptoras e considerando os tipos celulares de maior grau de interação como emissoras, assim como em **22b**, na parte inferior da imagem, utilizou-se as células NK como emissoras. A análise parte de um ligante no qual uma vez acoplado ao receptor de superfície desencadeia um fluxo de eventos e sinais que passam por proteínas intermediárias (representado pelo espaço entre as setas da figura), até a identificação de reguladores transcricionais de potencial mediador para tal via. Neste caso é possível observar a participação efetiva de ligantes como RPSA, ITGB1 e CD74 em diferentes vias entre os grupos celulares, resultando em reguladores distintos.

A **Figura 23** apresenta a análise de predição das vias de sinalização para o grupo amostral das células do BALF, cujas interações ligante-receptor apresentaram maior grau de intensidade entre os grupos celulares em comparação com o grupo NS. Em **23a**, têm-se a relação das vias de sinalização utilizando as células secretoras

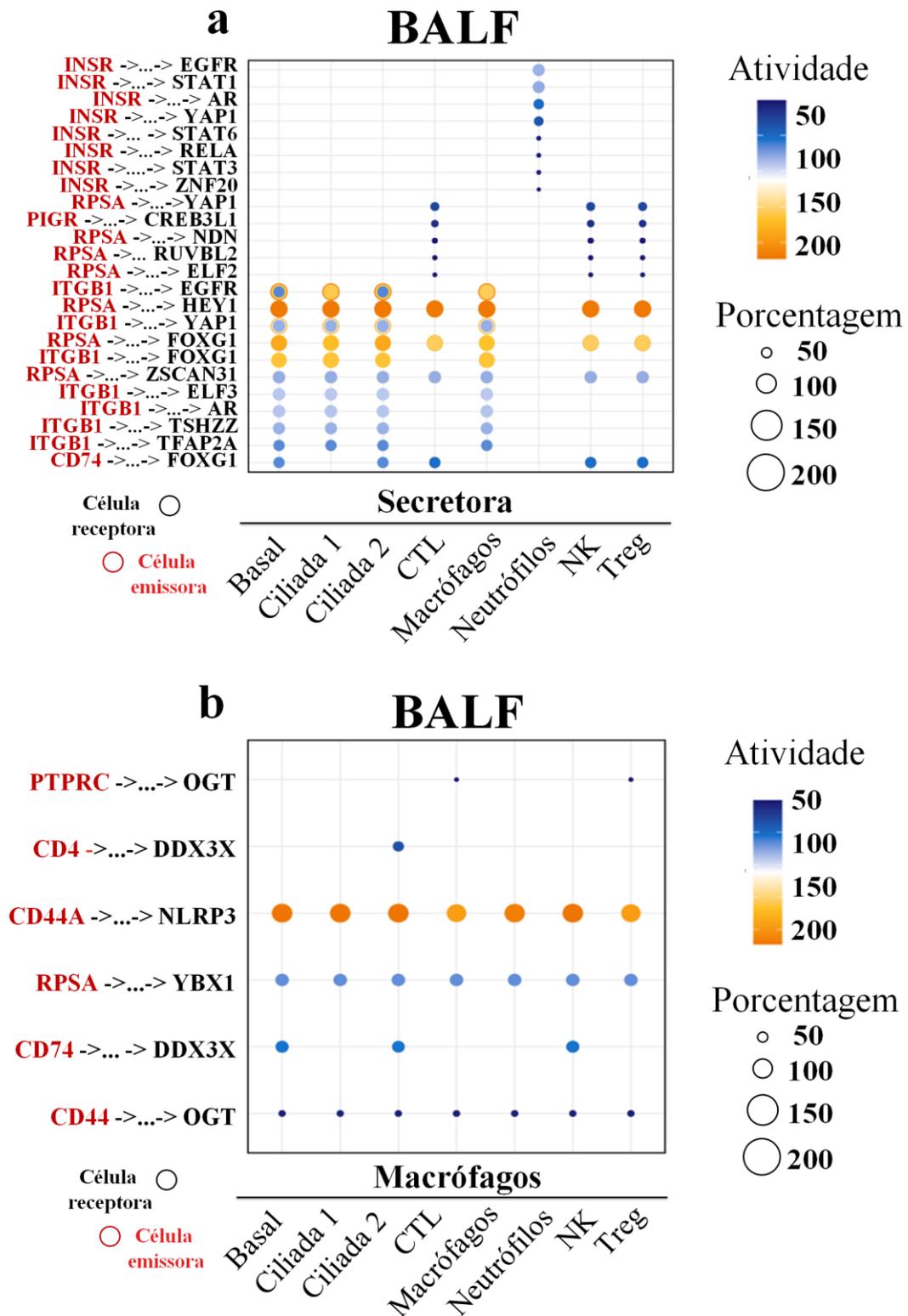


Figura 22 – Análise de predição das vias de sinalização para células da NS.



Legenda: O gráfico apresenta o grau de atuação dos potenciais fatores transcricionais (TFs) ativados a partir da cascata de eventos de vias de sinalização iniciando com o estímulo de um ligante produzido por uma célula emissora ao acoplar com uma proteína de superfície da célula receptora. Em **a)** a predição de potenciais TFs para as células da NS tendo as células ciliadas como receptoras; e em **b)** a predição de potenciais TFs para as células da NS tendo as células nrMa como receptoras.

Figura 23 – Análise de predição das vias de sinalização para células do BALF



Legenda: O gráfico apresenta o grau de atuação dos potenciais TFs ativados a partir da cascata de eventos de vias de sinalização iniciando com o estímulo de um ligante produzido por uma célula emissora ao acoplar com uma proteína de superfície da célula receptora. Em **a**) a predição da via de sinalização com potenciais TFs para as células do BALF tendo as células secretoras como receptoras; e em **b**) a predição da via de sinalização com potenciais TFs para as células do BALF tendo os macrófagos como receptores.

#### 4.7 DROGAS ELEITAS DE POSSÍVEL USO PARA TRATAMENTO DA COVID-19

Com base nos resultados obtidos a partir das análises *in silico* para as amostras de pacientes infectados com COVID-19, considerando os genes diferencialmente expressos nas células epiteliais e imunológicas, os genes relacionados com o processo de acoplamento viral ao hospedeiro, os agentes inflamatórios como citocinas e quimiocinas, as interações ligante-receptor de proteínas de superfície e os TFs decorrentes das vias de sinalização ativadas, assim como também, tendo como base o extenso conteúdo presente na literatura sobre as características virais do SARS-CoV-2, foi possível estabelecer uma seleção de drogas farmacológicas com potencial uso terapêutico para o tratamento da doença. Para isso, o banco de dados de drogas do DrugBank foi utilizado ressaltando características inerentes ao fármaco eleito, como estrutura química, alvo, mecanismo de ação e a indicação original, além de seu respectivo código de acesso.

A relação está presente no **quadro 4**, onde pode-se observar as drogas sugeridas com base em diferentes estratégias de intervenção e desconsiderando as indicações consolidadas discutidas na primeira seção deste trabalho, destacando os inibidores de interleucinas cruciais para o agravamento do processo inflamatório, à exemplo do anakinra (anti IL-1R), reparixin (anti IL-8) e do ixekizumab (anti IL-17A), assim como também, em relação às quimiocinas amplamente expressas como é o caso do CCL2 e do CCL5, a atuação do antagonista dos receptores CCR2 e CCR5, cenicriviroc. No combate ao acúmulo de muco e moléculas aderentes produzidas por mucinas que facilitam o processo inflamatório durante a infecção, pode-se citar o ibudilast, repressor de MUC5AC. Já dando destaque às vias de sinalização entre ligantes-receptores das células de maior interação e os reguladores transcricionais envolvidos na via, o nimotuzumab e o dapansutrile atuam inibindo os fatores EGFR e o NLRP3, respectivamente, expressivos principalmente em células do BALF. Referente aos receptores virais e as estruturas facilitadoras de acoplamento, o fostamatinib age como inibidor de CTSL., além de também atuar na via da tirosina quinase, já na tentativa de impedir a indução ao processo apoptótico causada pela infecção do SARS-CoV-2, o emricasan age inibindo a CASP3, um dos principais promotores da morte celular induzida.

Quadro 4 – Relação das drogas sugeridas com potencial terapêutico para tratamento da COVID-19

Fármaco	Estrutura química	Indicação original	Alvo	Mecanismo de ação	Código de acesso
Anakinra	$C_{759}H_{1186}N_{208}O_{232}S_{10}$	Atrite reumatoide, síndrome NOMID,	IL-1R	Inibição competitiva de IL-1 ao ligar-se no IL-1R	DB00026
Ibudilast	$C_{14}H_{18}N_2O$	Esclerose múltipla	MUC5AC	Anti-inflamatório supressor de MUC5AC	DB05266
Emricasan	$C_{26}H_{27}F_4N_3O_7$	Hepatite C	CASP3	Inibidor da caspase 3	DB05408
Fostamatinib	$C_{23}H_{26}FN_6O_9P$	Artrite reumatoide	SYK quinase, CTSL	Inibidor de várias quinases, incluindo SYK e CTSL	DB12010
Reparixin	$C_{14}H_{21}NO_3S$	Câncer de mama, diabetes tipo 1	IL-8	Inibidor alostérico do IL-8	DB12614
Cenicriviroc	$C_{41}H_{52}N_4O_4S$	HIV/AIDS	CCR2, CCR5	Antagonista dos receptores CCR2 e CCR5	DB11758
Dapansutrole	$C_4H_7NO_2S$	Gota, osteoartrite	NLRP3	Bloqueador de NLRP3	DB16130
Nimotuzumab	$C_{6566}H_{10082}N_{1746}O_{2056}S_{40}$	Carcinomas, glioblastomas	EGFR	Anticorpo monoclonal anti-EGFR	DB06192
Ixekizumab	$C_{6492}H_{10012}N_{1728}O_{2028}S_{46}$	Psoríase severa	IL-17A	Anticorpo monoclonal inibidor de IL-17A	DB11569

Fonte: Elaborado pelo autor, utilizando o banco de dados do DrugBank (Wishart *et al*, 2008).

### 3 DISCUSSÃO

Com o passar de mais de três anos desde o primeiro caso diagnosticado de COVID-19 em Wuhan, na China, a quantidade de dados e informações sobre a doença e seu agente etiológico têm se consolidado e gerando vários desdobramentos de interesse em diferentes campos da análise científica, dentre eles, o microambiente de infecção e a interação do vírus com as células do hospedeiro configuram uma área de contribuição importante para a formação dessa complexa dinâmica de comunicações existente durante o avanço clínico da doença. Nesse contexto, dentre os diferentes tipos celulares presentes no tecido epitelial e suas funções no processo imunológico e estrutural, os primeiros alvos utilizados pelo SARS-CoV-2 para infecção do organismo humano a partir de um forte tropismo celular são as células ciliadas das vias respiratórias superiores, em específico na NS, que mediam a replicação viral inicial e sua liberação para a face luminal, além também da participação ativa das células secretoras da mucosa (RAVINDRA *et al*, 2021; GENGLER. *et al*, 2020).

Essas células costumam apresentar uma expressão elevada de genes relacionados a estruturas de acoplamento viral, como a presença de furina e da protease TMPRSS2, o que foi reiterado pelos resultados desse trabalho, assim como também verificou-se a presença de células ciliadas de funcionalidade e estrutura anômalas, de acordo com o que é visto nas vias aéreas respiratórias sob condições de inflamação aguda como em casos de fibrose cística ou asma (LEUNG *et al*, 2019; THOMAS *et al*, 2010). Essas anormalidades ficam evidenciadas nos diferentes tipos celulares ciliados identificados nas amostras de pacientes no estágio grave da COVID-19, onde observa-se nas células ciliadas tipo 2 a alta expressão dos genes HYDIN e DNAH7, sendo o primeiro atuante na motilidade ciliar e cuja expressão desregulada pode causar problemas respiratórios, enquanto que o segundo integra o grupo de componentes protéicos das células ciliadas associado ao agravamento da COVID-19 (FARIDL *et al*, 2022; GUNTUR *et al*, 2022). De mesma forma, em células ciliadas tipo 3 foi observado uma alta expressão dos genes MORN2 e PIFO, relacionados com a organização celular e o processo de diferenciação induzido por IFN- $\gamma$  em pacientes infectados (WOODALL *et al*, 2023; CHUA *et al*, 2020).

Não obstante, a secreção excessiva de muco nas vias respiratórias promovida pela superexpressão de genes como MUC5AC e MUC5B, como visto em células epiteliais da NS, também aparenta estar associada à obstrução das vias aéreas e à

falência respiratória, sendo o MUC5AC a principal mucina presente no epitélio das vias aéreas, além de que, uma vez superexpressa, passa a ser um importante contribuinte na patobiologia de doenças respiratórias como a asma, compondo um possível alvo terapêutico para o tratamento da COVID-19 (KHAN *et al*, 2021; KOCH *et al*, 2022; SAMSUZZAMANN *et al*, 2019). De fato, a partir de dados depositadas no banco online do DrugBank, é possível identificar o fármaco ibudilast como candidato terapêutico sob teste clínico para tratar pacientes internados com COVID-19, o fármaco, um anti-inflamatório originalmente proposto para asma severa, recentemente foi apontado como um bom supressor do gene MUC5AC através da via da fosforilação de quinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), e os ensaios referente ao uso *off-label* tem previsão de conclusão no final do ano de 2023 (ISHIBASHI *et al*, 2021).

Referente às células basais, a análise de genes diferencialmente expressos revelou a presença de marcadores que induzem a expressão de interleucinas e quimiocinas, assim como o recrutamento de células imunológicas para as amostras do BALF no estágio grave da doença, à exemplo da IL-33, de agentes proliferativos como MIR205HG, além de inibidores de protease como SERPINB13 e SERPINB4, estes associados inclusive à CTSL, em uma possível resposta celular no combate à infecção por SARS-CoV-2, o que difere com os genes marcadores para as amostras de NS, onde há em termos gerais proteínas essenciais à célula, como as proteínas ribossomais e estruturais, além de promotoras da diferenciação (RPS29, RPS10, RPS27, RPL36A, KRT5) (ZHANG *et al*, 2022; WANG *et al*, 2022; SAHA *et al*, 2017).

Por conseguinte, durante a trajetória de diferenciação da célula basal, diferente do que foi debatido em CHUA *et al* (2020), foram definidas duas trajetórias possíveis com diferentes destinos celulares em dado pseudotempo, de células basais para ciliadas e de células basais para secretoras, ambas transformando os fenótipos celulares em tipos mais suscetíveis ao SARS-CoV-2. Na primeira trajetória os genes positivamente regulados de destaque incluem TFs que agem na discinesia ciliar das células e moduladores da transcrição gênica dependentes de complexos mitocondriais (RFX3 e MLF1, respectivamente), ambos genes intimamente associados com o processo de diferenciação, assim como também foram identificados agentes relacionados com a fosforilação transitória de sequências peptídicas específicas, denotando uma alta taxa de renovação celular (BASP1) (FARIDL *et al*, 2019; HOH *et al*, 2012; HARTL; SCHNEIDER, 2019).

Enquanto que para a segunda trajetória, os genes em destaque são compostos pelo gene HBP1, um ativador/repressor de estágios do ciclo celular, o gene GRHL1, um TF com função antiproliferativa, e o gene GOLGB1, um agente codificador de proteínas relacionadas ao tráfego de membrana na via secretora, sendo de papel vital para a funcionalidade do destino celular da trajetória (DI BARI *et al*, 2021; BERGEN *et al*, 2015). Para além desses marcadores que caracterizam a diferenciação, o trabalho realizado por GUNTUR *et al* (2022) apontou uma redução na expressão de TFs como FOXJ1 em pacientes assintomáticos ou no estágio leve da COVID-19, um importante fator no processo de ciliogênese e na construção do fenótipo celular do destino da trajetória, inferindo uma atividade menor do processo de diferenciação celular nesses grupos, e dessa forma, uma relação entre o agravamento da doença com o mecanismo celular descrito, o que coincide com a superexpressão do fator FOXJ1 vista na análise deste trabalho, com base no score GRN, para a primeira rota de diferenciação (SCHREINER *et al*, 2022; YU *et al*, 2008).

Além disso, para os grupos celulares de caráter imunológico identificados na pesquisa, observou-se uma maior concentração de neutrófilos em pacientes no estágio grave da doença, tanto em NS, mas principalmente nas amostras de BALF, onde uma maior concentração de células imunológicas como um todo foi identificada, o que é característico da resposta imune à um quadro infeccioso em um organismo humano saudável (LEDERER; RODRICK; MANNICK 1999). Quando analisados os principais genes expressos dentre tais populações celulares, mantêm-se um característico alto nível de expressão de mediadores pró-inflamatórios como as interleucinas IL-18, IL-32, IL-7R, IL-17A e IL-1R, e as quimiocinas CCL5, CCL2, CCL8, CXCL3, CXCL5 e CXCL17, presentes para ambas amostras de NS e BALF. O papel desses agentes no cenário da inflamação, assim como no contexto da infecção por SARS-CoV-2 são amplamente debatidos, com a alta expressão de IL-1R e IL-18 sendo um fator associado à infecção por SARS-CoV-2, não observado em casos de SARS, MERS ou de influenza. A IL-32 é um modulador chave de várias vias inflamatórias, como a TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (sendo induzida principalmente por IL-8), e embora a expressão dessas duas interleucinas seja menor na COVID-19 do que em outras doenças que causam liberação exacerbada de citocinas, é possível inferir sua participação na evolução de estágios da doença (OLBEI *et al*, 2021; BERGANTINI *et al*, 2022; CHENG *et al*, 2021).

Dentre as interleucinas citadas, a IL-8 adquire então um caráter de biomarcador para a doença além de alvo terapêutico, e quando comparada com os dados de drogas no DrugBank, a Reparixina se apresenta como uma opção em potencial, sendo um inibidor alostérico da IL-8 inicialmente proposto para o tratamento de câncer de mama, e que atualmente se encontra em estágio de recrutamento para estudos clínicos nível 3 contra a COVID-19 e com estimativa de conclusão em 2024 (LANDONI *et al*, 2022). No mesmo grupo das interleucinas, a IL-7A também é tida como alvo terapêutico, superexpressa nos resultados apresentados, o anticorpo monoclonal inibidor da molécula, ixekizumab, foi proposto inicialmente para o tratamento de psoríase severa, mas no cenário pandêmico recente teve sua ação terapêutica reavaliada para a COVID-19 em ensaios clínicos de ação conjunta com outros anticorpos monoclonais, e cujo estudo tem estimativa de conclusão no segundo semestre de 2023(LIU; WANG, 2022).

Já para as quimiocinas, o CCL5 apresentou um maior grau de expressão entre os grupos amostrais, sendo usado como um bom marcador de gravidade da doença, entretanto, também apresentou menor expressão gênica em células T no BALF em comparação com a NS, o que pode estar relacionado com o quadro de linfopenia causado pelo vírus e a ação de indutores apoptóticos, enquanto que a quimiocina CCL2 altamente expressa nas populações de macrófagos tanto da NS quanto do BALF, possui um papel quimioatraente como recrutadoras de monócitos, assim como no processo de infiltração dos alvéolos, sendo considerado um componente importante da patogênese da COVID-19. (PÉREZ-GARCÍA *et al*, 2022; RANJBAR *et al*, 2022). Similarmente, a CXCL17 também apresenta ação quimioatraente de macrófagos e tem um padrão de expressão tecidual característico nos pulmões de pacientes internados, associado muitas vezes à COVID longa, embora bastante explorado na área oncológica, ainda carece de maior profundidade para o SARS-CoV-2 (KHALIL *et al*, 2022).

Recentemente, ANDRÉ *et al* (2022) teorizaram sobre a relação do quadro de linfopenia grave (presente em pacientes em estado crítico da COVID-19) associada à depleção de células T e aos defeitos na imunidade por células Th1, com os indutores de apoptose expressos no cenário de infecção, apontando para um aumento na expressão de CD95/FAS em células do plasma desses pacientes. Um aumento significativo da morte celular por apoptose via ativação da caspase-3 em linfócitos foi

reportado para infecção por SARS-CoV-2, além de associar a expressão da quimiocina CXCL10, um biomarcador de gravidade da COVID-19, como um fator importante para o processo de morte celular programada. Neste trabalho foram então investigadas as expressões gênicas do marcador CASP3 e demais marcadores atrelados com a apoptose, podendo-se observar maior expressão desses fatores em células FOXP4, exclusivas em pacientes infectados com o vírus, além de secretoras, basais e basófilos, assim como em macrófagos e células T no BALF, populações essas que também apresentaram maior expressão da quimiocina CXCL10 e de seu receptor CXCR3, corroborando para o agravamento da inflamação, já que tal quimiocina atua no recrutamento de leucócitos, além de contribuir para a lesão tecidual pulmonar causada pela COVID-19 (GUDOWSKA-SAWCZUK; MROCZKO, 2022). Estabelecido a relação da infecção viral com os fatores apoptóticos, ao consultar o DrugBank e eventuais drogas relacionadas com o processo, pôde-se inferir o emricasan como opção terapêutica, sendo este um inibidor de CASP3 e CASP7 usado com efeito hepatoprotetor que está sob estudo clínico para a doença, sendo o estudo mais proeminente já finalizado, onde apesar da dificuldade reportada em recrutar voluntários, atestou segurança considerável para seu uso sem nenhum efeito colateral adverso grave (PLASSMEYER *et al*, 2022).

Ademais, conforme com o que foi apontado por SHARIF-ASKARI *et al* (2020), foi possível relatar neste trabalho uma considerável expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo, como S100A8 e S100A9, presentes em neutrófilos e macrófagos de pacientes internados com COVID-19 nas amostras do BALF, comprometendo a funcionalidade dos próprios macrófagos e das células T CD8. Curiosamente, KUNDURA *et al* (2022) investigaram a relação entre o estresse oxidativo e as ROS produzidas com o processo apoptótico e a progressão da COVID-19, inferindo para um aumento da produção de ROS por monócitos via ativação do receptor ACE-2, além de um aumento de dano no DNA de linfócitos vizinhos.

Relacionado a isso, a aparente baixa expressão do gene ACE-2 em comparação com outros facilitadores do acoplamento viral reportada neste trabalho pode ser melhor compreendida pela complexidade por detrás da dinâmica de infecção do SARS-CoV-2 no organismo *in vivo* apontada pelos mecanismos descritos, além de também ser interpretada pelo fato de que o ACE-2 atua como um ISG no epitélio das vias, responsivo principalmente por STAT1, altamente expresso nas análises. É

importante destacar que apesar de descrito como amplamente presente nas vias respiratórias e positivamente expresso no destino celular ao fim do processo de diferenciação apresentado neste trabalho, a expressão proteica real do gene pode ser diferente das análises de mRNA, e embora sua atuação no processo da infecção seja bem definida, ainda há discussões sobre o seu grau de expressão e de seu total protagonismo. Tal contraponto é defendido por HÖNZKE *et al* (2022), ao ponderar de que a real expressão do receptor ACE-2 em tecidos alveolares deve ser considerada escassa e que a COVID-19 em seu estágio grave está associada à ativação imunológica engatilhada por macrófagos derivada de outros mecanismos celulares, não só pelo acoplamento viral ao receptor ACE-2 em si. Nesse contexto, a expressão dos facilitadores de acoplamento torna-se tão importante quanto do ACE-2, e no caso da CTSL, estudos recentes têm avaliado seu potencial farmacológico, em específico com o uso do fostamatinib, um inibidor de quinases atuante também na inibição de CTSL e que de acordo com o Drugbank, teve seus ensaios clínicos concluídos recentemente, embora os resultados ainda não estejam disponíveis (YAN *et al*, 2022).

No que diz respeito ao processo inflamatório e a tempestade de citocinas, o extravasamento vascular resultante da disruptura da integridade de proteínas estruturais causa a disfunção endotelial responsável pelo transporte de monócitos para o sítio de infecção. Esses infiltrados inflamatórios, no contexto da infecção por SARS-CoV-2, potencializam o dano ao tecido dos alvéolos pulmonares e ocorrem com a participação de diversas moléculas e marcadores envolvidos na disfunção endotelial, podendo-se destacar o VEGFA, CCL2, CD44, ICAM1 e as integrinas ITGAX, ITGAM e ITGB1 (RAUTI *et al*, 2021; XU; ILYAS; WENG, 2022). A partir da análise de expressão gênica por estágio da doença constatou-se uma alta concentração de CD44, ITGB1 e ITGAX em células do BALF em comparação com NS, além de uma considerável expressão de VEGFA em ambos grupos amostrais.

Dentre essas, a proteína de superfície CD44 é o principal receptor de membrana do ácido hialurônico e possui função descrita na permeabilidade endotelial causando a disruptura da barreira em casos de infecção por COVID-19, assim como as integrinas ITGB1 e IGAX que atuam de forma essencial na migração de monócitos pelo endotélio, juntos, somado com a ampla atuação do fator angiogênico VEGFA que induz o recrutamento de monócitos pelos próprios monócitos ativados, configuram uma específica interação entre populações de monócitos/macrófagos com neutrófilos

que predominantemente envolvem tais fatores pró-migratórios (ZHA; FU; QIAN, 2022; WAUTERS *et al*, 2021; CHUA *et al*, 2020).

Outro aspecto de extrema importância na dinâmica de todos esses eventos são as interações célula-célula, onde a comunicação celular a partir dos pares de ligantes e receptores é considerada um fator essencial na interpretação dos efeitos da COVID-19 e suas consequências no organismo infectado. As análises de comunicação entre células reportadas neste trabalho elucidam a forte interação de células epiteliais conforme a progressão da doença, além de interações como a observada entre macrófagos e neutrófilos nas amostras de NS, o que denota uma tentativa balanceada da resposta imune em combater a infecção, enquanto que nas amostras do BALF as interações entre células imunológicas atingem maior grau de intensidade possivelmente devido ao maquinário celular ativado com o agravamento da inflamação, à exemplo da forte interação predita entre macrófagos e neutrófilos observada e descrita anteriormente. Essa relação também é corroborada por ZHANG *et al* (2022) que ao utilizar diferentes ferramentas bioinformáticas destacou a prioridade de comunicação entre macrófagos tipo M1 com neutrófilos, células T e NK.

Aprofundando nas interações entre os tipos celulares, os principais pares de ligantes/receptores apontados nas análises no estágio moderado da doença em amostras de NS confirmaram a importância do CCL5 como uma das principais quimiocinas promotoras da inflamação tendo em vista sua participação enquanto ligante nas interações das células imunológicas NK, CTL, nrMa e neutrófilos, interagindo com diferentes receptores, mas principalmente com o receptor específico CCR1. A via do par de ligante-receptor CCL5/CCR1 está presente e é compartilhada em diferentes regiões no organismo dos pacientes, como nos pulmões, no sangue e na medula óssea, deduzindo que a desregulação destes pares pode estar associada com a migração de monócitos e a ramificação da tempestade de citocinas em diferentes tecidos (QIN *et al*, 2022;). Algumas dessas moléculas possuem baixa afinidade de interação em organismos saudáveis (SLIMANI *et al*, 2003), entretanto apresentaram forte associação em pacientes com COVID-19, é o caso de CCL5/SDC4 e CCL5/SDC1 em células T associadas às células ciliadas, FOXN4 e secretora, e também de PTPRC/CD2 em macrófagos, neutrófilos e células T associadas com células epiteliais, além de interações inibitórias responsáveis pela disfunção de neutrófilos (RPS19/C5AR1) (DICK *et al*, 2018).

Várias das interações observadas para as vias de ligante-receptores ainda são pouco descritas em cenários de inflamação, de modo que podem configurar novos ou recém explorados alvos terapêuticos em caso de infecção por SARS-CoV-2, dentre essas associações identificadas pode-se destacar CCL5/PIGR, CCL5/SIPR3, CCL5/LPAR3, GSTP1/CD44 e HLA-DRA/PTPRC, e como apontado por LIU *et al* (2022), a disfunção dos pares de ligante-receptores em geral envolve uma grande quantidade de citocinas e quimiocinas essenciais para as células T e macrófagos alveolares atuarem na resposta imune à doença.

Já nas interações vistas para as células do BALF, o grau entre ligantes-receptores envolvidos com as vias de agentes pró-inflamatórios para além do CCL5 é nitidamente maior, como por exemplo na participação do par ANXA1/FPR1 como mediador da comunicação entre células epiteliais e mieloides, e em conjunto do CCL5/CCR1, na maturação e infiltração de células T (QIN *et al*, 2022). O ligante ANXA1 assim como o receptor FPR atuam como promotores da regulação positiva de GM-CSF em células Th1, favorecendo a produção de IL-6 e outros fenótipos celulares inerentes ao quadro inflamatório contribuindo para o dano pulmonar, enquanto que a interação entre os pares NAMPT/ANXA6, NAMPT/INSR e NAMPT/IGF1R é observada exclusivamente em neutrófilos interagindo com células T e NK, sendo estas interações de alta afinidade no interatoma de pacientes hospitalizados e de interesse para abordagens farmacológicas (REN *et al*, 2021; SCHLOER *et al*, 2019). Outras interações inéditas ou ainda pouco exploradas identificadas na amostra de células do BALF incluem CCL5/FPR1, CCL5/CXCR4, PTPRC/CXCR4, CALM1/TNFRSF1B e MIF/CD74.

A partir do que foi discutido e da grande participação do CCL5 com os receptores CCR1 e CCR5, foi sugerido a partir do reposicionamento de fármacos proposto neste estudo o agente terapêutico cenicriviroc, um antiviral do HIV que age como antagonista dos receptores CCR2 e CCR5, possuindo análises *in vitro* e *in vivo* de validação do seu uso em pacientes hospitalizados. O estudo mais completo com a droga foi finalizado com os resultados preliminares divulgados, apontando uma significativa redução no número de óbitos e aumento de sobrevida de pacientes em UTI quando comparado com o tratamento placebo, embora quando comparado com outras drogas avaliadas, apresentou um desempenho inferior aos demais (FILES *et al*, 2022).

Com base no panorama de comunicações célula-célula e nas interações dos principais pares de ligante-receptores, este trabalho buscou identificar os eventuais TFs envolvidos nas vias de sinalização presentes para tais interações celulares. Nas amostras de estágio moderado da COVID-19 em células da NS destacou-se como receptoras as células ciliadas, visto sua importante participação como destino celular do processo de diferenciação promovido pelas células basais, assim como os nrMa, já que possuem grande atuação na tempestade de citocinas e na comunicação com demais células imunológicas. Sendo assim, foi possível observar para as células ciliadas os fatores MUC1, CHC02, PRDX5 e HMGN3 como TFs de atuação reguladora em vias de sinalização do receptor de superfície CD74, assim como também os fatores ACTB, RUVBL2 e PRDX5 atuando na regulação de via do receptor RPSA. O principal fator identificado, o RUVBL2, é descrito como uma importante ATPase que ao ligar-se com seu parólogo RUVBL1 forma um complexo proteico envolvido em diversos processos celulares, como na motilidade ciliar de células ciliadas e como regulador da resposta pró-inflamatória de macrófagos, o que indica sua participação na resposta inflamatória das vias aéreas superiores contra o SARS-CoV-2 e apresentando como potencial terapêutico a ação de inibidores do complexo RUVBL1/2 (ZHANG *et al*, 2021; LEGENDRE; ZARAGOSI, 2021).

Já para as células de nrMa, obteve-se os TFs ACTB e HMGB1 como principais reguladores atuantes na via da proteína de superfície CD8A, enquanto que para a via do receptor RPSA os fatores identificados foram CNBP, SUB1 e HMGB1. O papel do HMGB1 no cenário de infecção é bastante difundido na literatura, sendo expresso principalmente por células epiteliais, mas também por macrófagos e outras células imunológicas durante infecções virais, está envolvido em várias doenças inflamatórias como sepse, artrite reumatoide e aterosclerose, agindo em diferentes processos celulares, como na inibição da fagocitose de células apoptóticas para benefício da sobrevivência viral e na regulação e liberação de citocinas como a IL-1 $\beta$ , que consequentemente ativa a via da NF- $\kappa$ B contribuindo para o inflamassoma celular (WULANDARI; WIBAWA, 2022; STREET, 2020). Além disso, há evidências de que o HMGB1 também facilita a replicação do SARS-CoV-2 após o *entrance* viral por mecanismos desconhecidos. Da mesma forma, FITZGERALD *et al* (2022) apontou recentemente o papel do fator CNBP na ligação direta ao RNA viral do SARS-CoV-2 e na regulação da transcrição do gene INFB, sendo então um fator antiviral.

Dessa forma, o inibidor competitivo de IL-1, o fármaco anakinra, tem sido avaliado para o tratamento da COVID-19, já que ao acoplar-se no receptor IL-1R inibe a atuação tanto de IL-1 $\alpha$  quanto de IL-1 $\beta$ , duas interleucinas cruciais na tempestade de citocinas. De acordo com o banco de dados do DrugBank e os dados disponibilizados sobre os ensaios clínicos nível 3, as análises com a droga possuem estimativa de conclusão no primeiro semestre de 2023, tal exemplo, assim como as outras intervenções discutidas nesse trabalho, corrobora para a validação da metodologia aplicada, sugerindo que a integração das análises celulares em nível único inferem informações biológicas importantes (KHANI, *et al*, 2022).

Um cenário mais complexo pôde ser observado para as células do BALF, onde foram escolhidas como parâmetros as células secretoras epiteliais e os macrófagos para melhor compreender a diferença das vias de sinalização conforme a progressão da doença. Para as células secretoras uma gama de TFs foram apresentados com potencial regulador das vias, dentre eles os fatores FOXG1 e EGFR se destacaram para o receptor de superfície ITGB1, enquanto que o HEY1 é o principal fator associado para a proteína ribossomal RPSA. O fator FOXG1 encontra-se desregulado sob infecção por SARS-CoV-2 e possui papel relevante na neuro invasão do vírus, estando também associado com a perpetuação dos sintomas da doença por um longo período, enquanto que o EGFR é estabelecido como um dos fatores mais ativos causadores da fibrose pulmonar, agindo nas vias de sinalização envolvidas com a proliferação, inflamação e angiogênese, de grande interesse terapêutico (HOU *et al*, 2022; LONDRES *et al*, 2022). Evidências também mostram que o fator HEY1 está relacionado à forma grave da COVID-19 e está envolvido com a via de sinalização NOTCH1 durante a diferenciação de células progenitoras em secretoras (LIN, 2021; BYRNES *et al*, 2022).

Por outro lado, para os macrófagos do BALF, o principal TF apontado é o NLRP3 partindo da proteína de superfície CD44A, mas também pode-se citar os fatores YBX1 e DDX3X atuando como reguladores para vias oriundas dos receptores RPSA e CD74, respectivamente. O fator do inflamassoma NLRP3 é um forte marcador da infecção grave da doença, formado principalmente no citosol de monócitos/macrófagos, sendo responsável pela ativação da piroptose e mediador da liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18, uma vez ativado por proteínas virais do SARS-CoV-2, como ORF3a, proteína N e E, acaba contribuindo para a liberação de moléculas

inflamatórias e para a exaustão de neutrófilos, configurando um dos principais agravantes imunológicos em casos de comorbidades prévias (AMIN *et al*, 2022; YIN *et al*, 2023; LEAL *et al*, 2022). Igualmente, o fator YBX1 já foi apontado como um potencial biomarcador para a COVID-19 grave envolvido no processo de tradução de proteínas, apoptose e reparo do DNA, enquanto que o TF DDX3X interage com o SARS-CoV-2 durante a replicação viral agindo na regulação do ciclo celular, na sinalização da resposta imune inata e no metabolismo do RNA, neste trabalho identificado como regulador da via de sinalização para o receptor CD74, que por sua vez é outro biomarcador da COVID-19 grave de caráter imunossupressor, além de que curiosamente também atua em conjunto com o NLRP3 na promoção da inflamação (LOH; REITER, 2022; BRAI *et al*, 2022; CHATTOPADHYAY *et al*, 2022).

Diante disso, tanto para as células secretoras quanto para os macrófagos colocados em destaque para as análises, obteve-se dois TFs de interesse na avaliação clínica devido seu eventual potencial como alvo, são eles o EGFR e o NLRP3. A partir da análise de reposicionamento de fármacos, as drogas dapansutrile e nimotuzumab apresentaram potencial terapêutico a partir de seus mecanismos de ação como inibidor de NLRP3 e como anticorpo monoclonal anti-EGFR, respectivamente. Tais drogas também vêm sendo avaliadas em ensaios clínicos para a COVID-19, o dapansutrile teve seu principal estudo de nível 2 finalizado em abril de 2023 infelizmente devido à dificuldade em conseguir voluntários viáveis para avaliação do fármaco, visto o avanço da campanha vacinal e de outros métodos terapêuticos que mitigaram a aplicação da pesquisa, enquanto que estudos preliminares com nimotuzumab apontaram redução significativa na taxa de mortalidade dos pacientes internados em comparação com o grupo controle, além de mostrar-se seguro em dosagens aplicadas por via intravenosa (POTERE *et al*, 2022; LONDRES *et al*, 2022).

É importante ressaltar que para a maioria dos genes a resposta transcricional ao SARS-CoV-2 segue um mecanismo correlacionado para os TFs apresentados, com similaridades entre vias distintas na promoção de agentes inflamatórios. Este trabalho traz então novos vislumbres para a complexa dinâmica celular durante a infecção por SARS-CoV-2 e a progressão da COVID-19, tendo uma abordagem computacional promissora, completa e integrada distinta do proposto por CHUA *et al* (2020) e de seu trabalho com os dados de origem, utilizando de amostras de scRNA-seq para avaliar desde a identificação das populações celulares presentes nas vias

aéreas respiratórias, como o nível de expressão dos receptores e facilitadores do acoplamento viral, a trajetória de diferenciação em células epiteliais, a expressão dos genes diferencialmente expressos e dos promotores da inflamação, além da comunicação celular estabelecida entre as populações identificadas, seus principais pares de ligantes e receptores e os eventuais TFs envolvidos na regulação das vias de sinalização. Com esse panorama geral de análises foi possível propor drogas de potencial ação terapêutica para tratamento da COVID-19 correlacionando seu mecanismo de ação com os alvos obtidos, desta forma, contribuindo para uma maior compreensão da gravidade inflamatória usual aos pacientes infectados e das estratégias farmacológicas empregadas para seu tratamento.

Por fim, devem ser consideradas como limitações deste trabalho, dado o período desde o surgimento do novo coronavírus, a falta de dados mais completos e estratificados considerando diferentes etnias, nacionalidades, comorbidades prévias e informações populacionais para interpretação dos resultados, assim como amostragem de cepas distintas do SARS-CoV-2 para maior elucidação do comportamento de variantes virais no organismo humano. Além disso, faz-se necessário avaliações clínicas para validação experimental das propostas terapêuticas apresentadas, de modo que em perspectivas futuras se espera que novas pesquisas com abordagem *in silico*, utilizando-se de dados de scRNA-seq que contemplem a diversidade humana e viral do SARS-CoV-2, proporcionem uma avaliação global de expressão gênica celular em casos de COVID-19, auxiliando na identificação de proteínas específicas associadas à doença, e assim otimizando o processo de reposicionamento de fármacos.

## 4 CONCLUSÃO

Diante das análises obtidas neste trabalho foi possível observar uma ampla quantidade de genes e fatores atuando na regulação da inflamação das vias aéreas durante a infecção por SARS-CoV-2, ampliando a compreensão da complexidade de interações celulares ao longo da progressão da COVID-19. As análises *in silico* utilizando o algoritmo de programação do CellRouter elucidaram sobre as diferenças para amostras celulares de NS e BALF, onde foram identificadas populações distintas conforme a doença progride, além de genes marcadores de caráter pró-inflamatório que diferem os casos moderados dos mais graves, à exemplo do SCGB1A1, MUC5AC e IL-33 em células epiteliais. De mesma forma, citocinas e quimiocinas expressas foram estabelecidas como cruciais para o agravamento do estado clínico, como IL-8, IL-17A, IL-1 $\beta$ , CCL5 e CXCL10, envolvidas em processos inflamatórios e no recrutamento de monócitos. Vista em paralelo, a inferência das trajetórias de diferenciação celular permitiu deduzir a presença de genes intrínsecos ao processo, como o FOXJ1, e inferir tal processo como recorrente no estágio grave da doença.

Outro fator importante analisado foi a expressão do receptor ACE-2 e demais facilitadores do acoplamento viral, que permitiu vislumbrar a participação significativa de CTSL e TMPRSS2 em detrimento do ACE-2, possivelmente devido à indução de expressão do receptor via IFN- $\gamma$ . Em conjunto, as análises de comunicação celular utilizando o algoritmo do CellComm permitiram concluir que as interações entre macrófagos, neutrófilos e células T em casos graves da doença são imprescindíveis para a inflamação generalizada do processo de tempestade de citocinas, assim como seus principais pares de ligantes-receptores envolvidos nessas interações, CCL5/CCR1 em NS e ANXA1/FPR1 no BALF, além também da ampla participação dos TFs destacados na promoção do quadro inflamatório, como NLRP3 e EGFR.

Diante dos dados gerados, a aplicação de estratégias de reposicionamento de fármacos tornou-se viável e mais refinada, com o emprego de dados inéditos ou pouco explorados em conjunto dos dados de drogas do DrugBank, apresentando uma diversidade de fármacos com distintos mecanismos de ação avaliados e propostos como alternativas terapêuticas para o tratamento da COVID-19. Sendo assim, faz-se necessários que pesquisas futuras integrem dados de diferentes grupos celulares e populacionais para fornecer um panorama cada vez mais amplo acerca da dinâmica de interações celulares sob infecção por SARS-CoV-2.

## REFERÊNCIAS

- ALAVI DARAZAM, Ilad *et al.* Umifenovir in hospitalized moderate to severe COVID-19 patients: A randomized clinical trial. ***International Immunopharmacology***, vol. 99, p. 107969, Oct. 2021.
- ALTAY, Ozlem *et al.* Current status of COVID-19 therapies and drug repositioning applications. ***Science***, v. 23, n. 7, p. 101303, 2020.
- AMIN, Saiful *et al.* NLRP3 inflammasome activation in COVID-19: an interlink between risk factors and disease severity. ***Microbes and Infection***, v. 24, n. 1, p. 104913, 2022.
- ANDERSEN, Kristian G. *et al.* The proximal origin of SARS-CoV-2. ***Nature Medicine***, vol. 26, no. 4, p. 450-452, 17 Mar. 2020.
- ANDRÉ, Sonia *et al.* T cell apoptosis characterizes severe Covid-19 disease. ***Cell Death & Differentiation***, v. 29, n. 8, p. 1486-1499, 2022.
- ASHBURN, Ted T.; THOR, Karl B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. ***Nature reviews Drug discovery***, v. 3, n. 8, p. 673-683, 2004.
- AYERDI, Oskar *et al.* Preventive Efficacy of Tenofovir/Emtricitabine Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Among Pre-Exposure Prophylaxis Users. ***Open Forum Infectious Diseases***, vol. 7, no. 11, 25 Sept. 2020.
- BADEN, Howard P.; GRASSI, Anita; KVEDAR, Joseph. The effect of the drug minoxidil on hair growth. ***The Biology of Wool and Hair***, p. 217-226, 1989.
- BAIG, Abdul Mannan *et al.* Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host–Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. ***ACS Chemical Neuroscience***, vol. 11, no. 7, p. 995-998, 13 Mar. 2020.
- BASU, Debdoot; CHAVDA, Vivek P.; MEHTA, Anita A. Therapeutics for COVID-19 and post COVID-19 complications: An update. ***Current Research in Pharmacology and Drug Discovery***, vol. 3, p. 100086, 2022.
- BEIGEL, John H. *et al.* Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. ***New England Journal of Medicine***, vol. 383, no. 19, p. 1813-1826, 5 Nov. 2020.
- BERGANTINI, Laura *et al.* Cytokine profiles in the detection of severe lung involvement in hospitalized patients with COVID-19: The IL-8/IL-32 axis. ***Cytokine***, v. 151, p. 155804, 2022.
- BERGEN, D. *et al.* In vivo characterisation of the Golgi matrix protein giantin: linking extracellular matrix secretion and cilia function. ***Cilia***, v. 4, n. 1, p. 1-1, 2015.

BOURGONJE, Arno R. *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 ( ACE2 ), SARS-CoV-2 and the pathophysiology of coronavirus disease 2019 ( COVID -19). **The Journal of Pathology**, vol. 251, no. 3, p. 228-248, 10 June 2020.

BREHMER, Dirk *et al.* Cellular Targets of Gefitinib. **Cancer Research**, vol. 65, no. 2, p. 379-382, 15 Jan. 2005.

BRAI, Annalaura *et al.* DEAD-Box helicase DDX3X as a host target against emerging viruses: new insights for medicinal chemical approaches. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 65, n. 15, p. 10195-10216, 2022.

BROWAEYS, Robin; SAELENS, Wouter; SAEYS, Yvan. NicheNet: modeling intercellular communication by linking ligands to target genes. **Nature methods**, v. 17, n. 2, p. 159-162, 2020.

BYRNES, Lauren E. *et al.* Opposing transcription factors MYCL and HEY1 mediate the Notch-dependent airway stem cell fate decision. **bioRxiv**, p. 2022.10. 05.511009, 2022.

CALY, Leon *et al.* The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. **Antiviral Research**, vol. 178, p. 104787, June 2020.

CAO, Bin *et al.* A Trial of Lopinavir–Ritonavir in Adults Hospitalized with Severe Covid-19. **New England Journal of Medicine**, vol. 382, no. 19, p. 1787-1799, 7 May 2020.

CHA, Y. *et al.* Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies. **British Journal of Pharmacology**, vol. 175, no. 2, p. 168-180, 18 May 2017.

CHATTOPADHYAY, Partha *et al.* Single-cell multiomics revealed the dynamics of antigen presentation, immune response and T cell activation in the COVID-19 positive and recovered individuals. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 7319, 2022.

CHAVARRIA-MIRÓ, Gemma *et al.* Sentinel surveillance of SARS-CoV-2 in wastewater anticipates the occurrence of COVID-19 cases. **MedRxiv**, 2020.

CHEN, Guang *et al.* Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 130, no. 5, p. 2620-2629, 13 Apr. 2020.

CHENG, Liang *et al.* COVID-19 induces lower levels of IL-8, IL-10, and MCP-1 than other acute CRS-inducing diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 21, p. e2102960118, 2021.

CHUA, Robert Lorenz *et al.* COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis. **Nature Biotechnology**, vol. 38, no. 8, p. 970-979, 26 June 2020.

CLOUGH, Emily; BARRETT, Tanya. The gene expression omnibus database. **Statistical Genomics: Methods and Protocols**, p. 93-110, 2016.

COPERCHINI, Francesca *et al.* Modulation of ACE-2 mRNA by inflammatory cytokines in human thyroid cells: a pilot study. **Endocrine**, 5 July 2021.

D'AGNILLO, Felice *et al.* Lung epithelial and endothelial damage, loss of tissue repair, inhibition of fibrinolysis, and cellular senescence in fatal COVID-19. **Science Translational Medicine**, vol. 13, no. 620, 17 Nov. 2021.

DE LUCENA, Thays Maria Costa *et al.* Mechanism of inflammatory response in associated comorbidities in COVID-19. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, vol. 14, no. 4, p. 597-600, July 2020.

DI BARI, I. *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 may exploit human transcription factors involved in retinoic acid and interferon-mediated response: a hypothesis supported by an in silico analysis. **New Microbes and New Infections**, vol. 41, p. 100853, May 2021.

DICK, Jonathan *et al.* C5a receptor 1 promotes autoimmunity, neutrophil dysfunction and injury in experimental anti-myeloperoxidase glomerulonephritis. **Kidney International**, v. 93, n. 3, p. 615-625, 2018.

DONG, Ensheng; DU, Hongru; GARDNER, Lauren. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. **The Lancet Infectious Diseases**, vol. 20, no. 5, p. 533-534, May 2020.

DOTOLO, Serena *et al.* A review on drug repurposing applicable to COVID-19. **Briefings in Bioinformatics**, 5 Nov. 2020.

DOUGAN, Michael *et al.* Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19. **New England Journal of Medicine**, 14 July 2021.

DRAGANA, Janić Mihailo *et al.* Rapid regression of lymphadenopathy upon rapamycin treatment in a child with autoimmune lymphoproliferative syndrome. **Pediatric Blood & Cancer**, vol. 53, no. 6, p. 1117-1119, 8 July 2009.

DREW, David A.; CAO, Yin; CHAN, Andrew T. Aspirin and colorectal cancer: the promise of precision chemoprevention. **Nature Reviews Cancer**, vol. 16, no. 3, p. 173-186, 12 Feb. 2016.

EINAT, Haim *et al.* Protein Kinase C Inhibition by Tamoxifen Antagonizes Manic-Like Behavior in Rats: Implications for the Development of Novel Therapeutics for Bipolar Disorder. **Neuropsychobiology**, vol. 55, no. 3-4, p. 123-131, 2007.

ELABIYI, M. O.; ADENOLA, O. J.; HASAN, Ali. Overview of COVID-19 and way forward. **Electronic Research Journal of Engineering, Computer and Applied Sciences**, v. 2, n. 2020, p. 28-36, 2020.

ESCALERA, Alba *et al.* Mutations in SARS-CoV-2 variants of concern link to increased spike cleavage and virus transmission. **Cell Host & Microbe**, vol. 30, no. 3, p. 373-387.e7, Mar. 2022.

FAN, Caibin *et al.* ACE2 Expression in Kidney and Testis May Cause Kidney and Testis Infection in COVID-19 Patients. **Frontiers in Medicine**, vol. 7, 13 Jan. 2021.

FARIDL, Miftahul *et al.* RNA sequence analysis of nasopharyngeal swabs from asymptomatic and mildly symptomatic patients with COVID-19. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 122, p. 449-460, 2022.

FDA, U.S. Food and drug administration (2020, October 22). **FDA Approves First Treatment for COVID-19**. Retrieved from <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-covid-19>

FDA. U.S. Food and drug administration (2021, December 22). **Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes First Oral Antiviral for Treatment of COVID-19**. Retrieved from <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-first-oral-antiviral-treatment-covid-19>.

FDA. U.S. Food and drug administration (2021, December 23). **Coronavirus (COVID-19) Update: FDA Authorizes Additional Oral Antiviral for Treatment of COVID-19 in Certain Adults**. Retrieved from <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-additional-oral-antiviral-treatment-covid-19-certain>.

FILES, Daniel Clark *et al.* Rationale of using the dual chemokine receptor CCR2/CCR5 inhibitor cenicriviroc for the treatment of COVID-19. **PLoS pathogens**, v. 18, n. 6, p. e1010547, 2022.

FITZGERALD, Katherine *et al.* CNBP restricts SARS-CoV2 by regulating IFN and disrupting RNA-protein condensates. **Research Square**, 2022.

FONGARO, Gislaine *et al.* The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. **Science of The Total Environment**, vol. 778, p. 146198, July 2021.

GADDE, Kishore M. *et al.* Effects of low-dose, controlled-release, phentermine plus topiramate combination on weight and associated comorbidities in overweight and obese adults (CONQUER): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet**, vol. 377, no. 9774, p. 1341-1352, Apr. 2011.

GENGLER, Isabelle *et al.* Sinonasal pathophysiology of SARS-CoV -2 and COVID -19: A systematic review of the current evidence. **Laryngoscope Investigative Otolaryngology**, vol. 5, no. 3, p. 354-359, 16 Apr. 2020.

GOLDSTEIN, I. *et al.* Oral Sildenafil in the Treatment of Erectile Dysfunction. **The Journal of Urology**, p. 1944-1945, Nov. 1998.

GREENHALGH, Trisha *et al.* Ten scientific reasons in support of airborne transmission of SARS-CoV-2. **The Lancet**, vol. 397, no. 10285, p. 1603-1605, May 2021.

GUDOWSKA-SAWCZUK, Monika; MROCZKO, Barbara. What is currently known about the role of CXCL10 in SARS-CoV-2 infection?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3673, 2022.

GUNTUR, Vamsi P. *et al.* Refractory neutrophilic asthma and ciliary genes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 149, n. 6, p. 1970-1980, 2022.

GUO, Weina *et al.* Diabetes is a risk factor for the progression and prognosis of COVID -19. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, vol. 36, no. 7, 7 Apr. 2020.

GUO, Wenrui *et al.* Topical TMPRSS2 inhibition prevents SARS-CoV-2 infection in differentiated human airway cultures. **Life Science Alliance**, vol. 5, no. 4, p. e202101116, 2 Feb. 2022.

GUPTA, Anil *et al.* Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. **New England Journal of Medicine**, vol. 385, no. 21, p. 1941-1950, 18 Nov. 2021.

HADFIELD, J., MEGILL, C., BELL, S.M. *et al.* (2022, June 11). **Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused globally since pandemic start**. Retrieved from <https://nextstrain.org/ncov/open/global/all-time>.

HAN, Xiaoping *et al.* Construction of a human cell landscape at single-cell level. **Nature**, vol. 581, no. 7808, p. 303-309, 25 Mar. 2020.

HARTL, Markus; SCHNEIDER, Rainer. A Unique Family of Neuronal Signaling Proteins Implicated in Oncogenesis and Tumor Suppression. **Frontiers in Oncology**, vol. 9, 17 Apr. 2019.

HASHEMI, Seyed Mohammad Ali *et al.* Human gene polymorphisms and their possible impact on the clinical outcome of SARS-CoV-2 infection. **Archives of Virology**, 2 May 2021.

HE, Bing; GARMIRE, Lana X. ASGARD: A Single-cell Guided pipeline to Aid Repurposing of Drugs. **ArXiv**, 2021.

HOFFMANN, Markus *et al.* The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells. **BioRxiv**, p. 2020.01. 31.929042, 2020.

HOFFMANN, Markus *et al.* Nafamostat Mesylate Blocks Activation of SARS-CoV-2: New Treatment Option for COVID-19. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 64, no. 6, 20 Apr. 2020.

HOH, Ramona A. *et al.* Transcriptional Program of Ciliated Epithelial Cells Reveals New Cilium and Centrosome Components and Links to Human Disease. ***PLoS ONE***, vol. 7, no. 12, p. e52166, 31 Dec. 2012.

HON, Chung-Chau *et al.* The Human Cell Atlas: technical approaches and challenges. ***Briefings in functional genomics***, v. 17, n. 4, p. 283-294, 2018.

HÖNZKE, Katja *et al.* Human lungs show limited permissiveness for SARS-CoV-2 due to scarce ACE2 levels but virus-induced expansion of inflammatory macrophages. ***European Respiratory Journal***, v. 60, n. 6, 2022.

HORBY, Peter *et al.* Effect of dexamethasone in hospitalized patients with COVID-19—preliminary report. ***MedRxiv***, 2020.

HOU, Yuxin *et al.* Enhanced replication of SARS-CoV-2 Omicron BA. 2 in human forebrain and midbrain organoids. ***Signal Transduction and Targeted Therapy***, v. 7, n. 1, p. 381, 2022.

HU, Biying; HUANG, Shaoying; YIN, Lianghong. The cytokine storm and COVID-19. ***Journal of Medical Virology***, vol. 93, no. 1, p. 250-256, 30 Sept. 2020.

HUANG, Chaolin *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. ***The Lancet***, vol. 395, no. 10223, p. 497-506, Feb. 2020.

HUNG, Ivan Fan-Ngai *et al.* Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. ***The Lancet***, vol. 395, no. 10238, p. 1695-1704, May 2020.

HURLE, M. R. *et al.* Computational Drug Repositioning: From Data to Therapeutics. ***Clinical Pharmacology & Therapeutics***, vol. 93, no. 4, p. 335-341, 15 Jan. 2013.

ISHIBASHI, Jumpei *et al.* Ibudilast suppresses MUC5AC mucus production through inhibition of ERK1/2 phosphorylation. ***Biological and Pharmaceutical Bulletin***, v. 44, n. 3, p. 404-409, 2021.

JACKSON, Cody B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. ***Nature Reviews Molecular Cell Biology***, vol. 23, no. 1, p. 3-20, 5 Oct. 2021.

JEHAN, Zeenath. Single-cell omics: an overview. ***Single-cell omics***, p. 3-19, 2019.

JENSEN, Peter B.; JENSEN, Lars J.; BRUNAK, Søren. Mining electronic health records: towards better research applications and clinical care. ***Nature Reviews Genetics***, vol. 13, no. 6, p. 395-405, 2 May 2012.

KEISER, Michael J. *et al.* Predicting new molecular targets for known drugs. ***Nature***, vol. 462, no. 7270, p. 175-181, Nov. 2009.

KHAILANY, Rozhgar A.; SAFDAR, Muhamad; OZASLAN, Mehmet. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. **Gene Reports**, vol. 19, p. 100682, June 2020.

KHALIL, Bariaa A. *et al.* Immune Profiling of COVID-19 in Correlation with SARS and MERS. **Viruses**, v. 14, n. 1, p. 164, 2022.

KHAN, Mohsin Ali *et al.* Cytokine Storm and Mucus Hypersecretion in COVID-19: Review of Mechanisms. **Journal of Inflammation Research**, Volume 14, p. 175-189, Jan. 2021.

KHANI, Elnaz *et al.* Current evidence on the use of anakinra in COVID-19. **International Immunopharmacology**, p. 109075, 2022.

KIM, Jae Seok *et al.* Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19. **Theranostics**, vol. 11, no. 1, p. 316-329, 2021.

KITCHEN, Douglas B. *et al.* Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 3, no. 11, p. 935-949, Nov. 2004.

KOCH, Clarissa M. *et al.* Cilia-related gene signature in the nasal mucosa correlates with disease severity and outcomes in critical respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Frontiers in Immunology**, vol. 13, 23 Sept. 2022.

KUNDURA, Lucy *et al.* Angiotensin II induces reactive oxygen species, DNA damage, and T cell apoptosis in severe COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, July 2022.

LA ROSA, Giuseppina *et al.* SARS-CoV-2 has been circulating in northern Italy since December 2019: Evidence from environmental monitoring. **Science of The Total Environment**, vol. 750, p. 141711, Jan. 2021.

LANDONI, Giovanni *et al.* A multicenter phase 2 randomized controlled study on the efficacy and safety of reparixin in the treatment of hospitalized patients with COVID-19 pneumonia. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 11, n. 4, p. 1559-1574, 2022.

LAMB, Yvette N. Nirmatrelvir Plus Ritonavir: First Approval. **Drugs**, vol. 82, no. 5, p. 585-591, 19 Mar. 2022.

LEAL, Vinicius NC *et al.* Severe COVID-19 patients show a dysregulation of the NLRP3 inflammasome in circulating neutrophils. **Scandinavian Journal of Immunology**, p. e13247, 2022.

LEDERER, James A.; RODRICK, Mary L.; MANNICK, John A. The effects of injury on the adaptive immune response. **Shock**, vol. 11, no. 3, p. 153-159, Mar. 1999.

LEGENDRE, Marie; ZARAGOSI, Laure-Emmanuelle; MITCHISON, Hannah M. Motile cilia and airway disease. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2021. p. 19-33.

- LEONELLI, Sabina. Why the Current Insistence on Open Access to Scientific Data? Big Data, Knowledge Production, and the Political Economy of Contemporary Biology. **Bulletin of Science, Technology & Society**, vol. 33, no. 1-2, p. 6-11, Feb. 2013.
- LEUNG, Hui Min *et al.* Intranasal micro-optical coherence tomography imaging for cystic fibrosis studies. **Science Translational Medicine**, vol. 11, no. 504, p. eaav3505, 7 Aug. 2019.
- LI, Albert *et al.* A Single-Cell Network-Based Drug Repositioning Strategy for Post-COVID-19 Pulmonary Fibrosis. **Pharmaceutics**, vol. 14, no. 5, p. 971, 30 Apr. 2022.
- LIAO, Mingfeng *et al.* Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. **Nature Medicine**, vol. 26, no. 6, p. 842-844, 12 May 2020.
- LIM, Zheng Jie *et al.* Case Fatality Rates for Patients with COVID-19 Requiring Invasive Mechanical Ventilation. A Meta-analysis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, vol. 203, no. 1, p. 54-66, 1 Jan. 2021.
- LIN, Shen *et al.* Molecular modeling evaluation of the binding effect of ritonavir, lopinavir and darunavir to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 proteases. **BioRxiv**, 2020.
- LIN, Zhicheng. Mechanisms for substance use disorders in COVID-19. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 9, p. 4568-4569, 2021.
- LINKER, Ralf A.; GOLD, Ralf. Dimethyl fumarate for treatment of multiple sclerosis: mechanism of action, effectiveness, and side effects. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 13, p. 1-7, 2013.
- LIU, Dan-Yang *et al.* Drug Repurposing for COVID-19 Treatment by Integrating Network Pharmacology and Transcriptomics. **Pharmaceutics**, vol. 13, no. 4, p. 545, 14 Apr. 2021.
- LIU, Qi *et al.* Dysregulated ligand–receptor interactions from single-cell transcriptomics. **Bioinformatics**, v. 38, n. 12, p. 3216-3221, 2022.
- LIU, Ya-ting; WANG, Shang-shang. Ixekizumab successfully treated severe pityriasis rubra pilaris after COVID-19 vaccination. **Skin Health and Disease**, p. e139, 2022.
- LOH, Doris; REITER, Russel J. Melatonin: Regulation of Viral Phase Separation and Epitranscriptomics in Post-Acute Sequelae of COVID-19. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 15, p. 8122, 2022.
- LONDRES, Henry Diaz *et al.* Blocking EGFR with nimotuzumab: a novel strategy for COVID-19 treatment. **Immunotherapy**, v. 14, n. 7, p. 521-530, 2022.
- LOPEZ-CORTES, Andrés *et al.* In silico Analyses of Immune System Protein Interactome Network, Single-Cell RNA Sequencing of Human Tissues, and Artificial

Neural Networks Reveal Potential Therapeutic Targets for Drug Repurposing Against COVID-19. **Frontiers in Pharmacology**, vol. 12, 26 Feb. 2021.

LU, Roujian *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, vol. 395, no. 10224, p. 565-574, Feb. 2020.

LUCAS, Carolina *et al.* Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463-469, 2020.

LUMMERTZ DA ROCHA, Edroaldo *et al.* CellComm infers cellular crosstalk that drives haematopoietic stem and progenitor cell development. **Nature Cell Biology**, 12 Apr. 2022.

LUMMERTZ DA ROCHA, Edroaldo *et al.* Reconstruction of complex single-cell trajectories using CellRouter. **Nature Communications**, vol. 9, no. 1, 1 Mar. 2018.  
MA, Di *et al.* Expression of SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 in human primary conjunctival and pterygium cell lines and in mouse cornea. **Eye**, vol. 34, no. 7, p. 1212-1219, 7 May 2020.

MA, Qiuyue *et al.* Global Percentage of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infections Among the Tested Population and Individuals With Confirmed COVID-19 Diagnosis. **JAMA Network Open**, vol. 4, no. 12, p. e2137257, 14 Dec. 2021.

MATSUYAMA, Shutoku *et al.* Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 117, no. 13, p. 7001-7003, 12 Mar. 2020.

MAUVAIS-JARVIS, Franck. Aging, Male Sex, Obesity, and Metabolic Inflammation Create the Perfect Storm for COVID-19. **Diabetes**, vol. 69, no. 9, p. 1857-1863, 15 July 2020.

MICHELSON, David *et al.* Once-Daily Atomoxetine Treatment for Children and Adolescents With Attention Deficit Hyperactivity Disorder: A Randomized, Placebo-Controlled Study. **American Journal of Psychiatry**, vol. 159, no. 11, p. 1896-1901, Nov. 2002.

MOFFAT, John G. *et al.* Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: an industry perspective. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 16, no. 8, p. 531-543, 7 July 2017.

MOORE, John B.; JUNE, Carl H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. **Science**, vol. 368, no. 6490, p. 473-474, 17 Apr. 2020.

MURUGAN, Natarajan Arul *et al.* Searching for target-specific and multi-targeting organics for Covid-19 in the DrugBank database with a double scoring approach. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, 5 Nov. 2020.

NG, Yan Ling; SALIM, Cyrill Kafi; CHU, Justin Jang Hann. Drug repurposing for COVID-19: Approaches, challenges and promising candidates. **Pharmacology & Therapeutics**, vol. 228, p. 107930, Dec. 2021.

NICIN, Luka *et al.* Cell type-specific expression of the putative SARS-CoV-2 receptor ACE2 in human hearts. **European Heart Journal**, vol. 41, no. 19, p. 1804-1806, 15 Apr. 2020.

OLBEI, Marton *et al.* SARS-CoV-2 causes a different cytokine response compared to other cytokine storm-causing respiratory viruses in severely ill patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 629193, 2021.

PARVATHANENI, Vineela; GUPTA, Vivek. Utilizing drug repurposing against COVID-19 – Efficacy, limitations, and challenges. **Life Sciences**, vol. 259, p. 118275, Oct. 2020.

PARVATHANENI, Vineela *et al.* Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. **Drug Discovery Today**, vol. 24, no. 10, p. 2076-2085, Oct. 2019.

PÉREZ-GARCÍA, Felipe *et al.* High SARS-CoV-2 viral load and low CCL5 expression levels in the upper respiratory tract are associated with COVID-19 severity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 225, n. 6, p. 977-982, 2022.

PLASSCHAERT, Lindsey W. *et al.* A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. **Nature**, v. 560, n. 7718, p. 377-381, 2018.

PLASSMEYER, Matthew *et al.* Caspases and therapeutic potential of caspase inhibitors in moderate–severe SARS-CoV-2 infection and long COVID. **Allergy**, v. 77, n. 1, p. 118-129, 2022.

POTERE, Nicola *et al.* Interleukin-1 and the NLRP3 inflammasome in COVID-19: Pathogenetic and therapeutic implications. **EBioMedicine**, v. 85, p. 104299, 2022.

PUSHPAKOM, Sudeep *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 18, no. 1, p. 41-58, 12 Oct. 2018.

QIN, Shijie *et al.* Ligand/Receptor-mediated Cell Communication Alteration Causes the Lung Inflammation Microenvironment and the Redistribution of Inter-tissue Immune Cells in COVID-19 Patients. **Research Square**. 2022.

RANJBAR, Mitra *et al.* Role of CCL2/CCR2 axis in the pathogenesis of COVID-19 and possible Treatments: All options on the Table. **International Immunopharmacology**, vol. 113, p. 109325, Dec. 2022.

RAUTI, Rossana *et al.* Effect of SARS-CoV-2 proteins on vascular permeability. **eLife**, vol. 10, 25 Oct. 2021.

RAVINDRA, Neal G. *et al.* Single-cell longitudinal analysis of SARS-CoV-2 infection in human airway epithelium identifies target cells, alterations in gene expression, and cell state changes. ***PLoS Biology***, vol. 19, no. 3, p. e3001143, 17 Mar. 2021.

REICHERT, Janice M. Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. ***Nature Reviews Drug Discovery***, vol. 2, no. 9, p. 695-702, Sept. 2003.

REN, Shi-Yan *et al.* Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2: Mutation, infectivity, transmission, and vaccine resistance. ***World Journal of Clinical Cases***, vol. 10, no. 1, p. 1-11, 7 Jan. 2022.

REN, Xianwen *et al.* COVID-19 immune features revealed by a large-scale single-cell transcriptome atlas. ***Cell***, v. 184, n. 7, p. 1895-1913. e19, 2021.

REYNOLDS, Daniel *et al.* Comprehensive Immunologic Evaluation of Bronchoalveolar Lavage Samples from Human Patients with Moderate and Severe Seasonal Influenza and Severe COVID-19. ***The Journal of Immunology***, vol. 207, no. 5, p. 1229-1238, 4 Aug. 2021.

RIBEIRO XAVIER, Carolina *et al.* Characterisation of Omicron Variant during COVID-19 Pandemic and the Impact of Vaccination, Transmission Rate, Mortality, and Reinfection in South Africa, Germany, and Brazil. ***BioTech***, vol. 11, no. 2, p. 12, 26 Apr. 2022.

ROSTOM, Raghd *et al.* Computational approaches for interpreting scRNA-seq data. ***FEBS Letters***, vol. 591, no. 15, p. 2213-2225, 12 June 2017.

SAHA, Anusree *et al.* Genome-wide identification and comprehensive expression profiling of ribosomal protein small subunit (RPS) genes and their comparative analysis with the large subunit (RPL) genes in rice. ***Frontiers in plant science***, v. 8, p. 1553, 2017.

SANSEAU, Philippe *et al.* Use of genome-wide association studies for drug repositioning. ***Nature Biotechnology***, vol. 30, no. 4, p. 317-320, Apr. 2012.

SANYAOLU, Adekunle *et al.* Comorbidity and its Impact on Patients with COVID-19. ***SN Comprehensive Clinical Medicine***, vol. 2, no. 8, p. 1069-1076, 25 June 2020.

SAMSUZZAMAN, Md *et al.* Natural inhibitors on airway mucin: molecular insight into the therapeutic potential targeting MUC5AC expression and production. ***Life sciences***, v. 231, p. 116485, 2019.

SCHLOER, Sebastian *et al.* The annexin A1/FPR2 signaling axis expands alveolar macrophages, limits viral replication, and attenuates pathogenesis in the murine influenza A virus infection model. ***The FASEB Journal***, v. 33, n. 11, p. 12188, 2019.

SCHREINER, Tom *et al.* SARS-CoV-2 Infection Dysregulates Cilia and Basal Cell Homeostasis in the Respiratory Epithelium of Hamsters. ***International Journal of Molecular Sciences***, vol. 23, no. 9, p. 5124, 4 May 2022.

SCIALO, Filippo *et al.* ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. **Lung**, vol. 198, no. 6, p. 867-877, 10 Nov. 2020.

SHAH, Bhumi; MODI, Palmi; SAGAR, Sneha R. In silico studies on therapeutic agents for COVID-19: Drug repurposing approach. **Life Sciences**, vol. 252, p. 117652, July 2020.

SHARIF-ASKARI, Narjes Saheb *et al.* Upregulation of oxidative stress gene markers during SARS-COV-2 viral infection. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 172, p. 688-698, Aug. 2021.

SINGH, Thakur Uttam *et al.* Drug repurposing approach to fight COVID-19. **Pharmacological Reports**, vol. 72, no. 6, p. 1479-1508, 5 Sept. 2020.

SMITH, Steven B. *et al.* Identification of Common Biological Pathways and Drug Targets Across Multiple Respiratory Viruses Based on Human Host Gene Expression Analysis. **PLoS ONE**, vol. 7, no. 3, p. e33174, 14 Mar. 2012.

SONG, Eric *et al.* Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 218, no. 3, 12 Jan. 2021.

SPORN, Michael B. *et al.* Role of raloxifene in breast cancer prevention in postmenopausal women: Clinical evidence and potential mechanisms of action. **Clinical Therapeutics**, vol. 26, no. 6, p. 830-840, June 2004.

STEBBING, Justin *et al.* Mechanism of baricitinib supports artificial intelligence-predicted testing in COVID -19 patients. **EMBO Molecular Medicine**, vol. 12, no. 8, 24 June 2020.

STONE, John H. *et al.* Efficacy of Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, vol. 383, no. 24, p. 2333-2344, 10 Dec. 2020.

STREET, Maria Elisabeth. HMGB1: a possible crucial therapeutic target for COVID-19?. **Hormone research in paediatrics**, v. 93, n. 2, p. 73-75, 2020.

TEMMAM, Sarah *et al.* Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. **Nature**, vol. 604, no. 7905, p. 330-336, 16 Feb. 2022.

THOMAS, Biju *et al.* Ciliary dysfunction and ultrastructural abnormalities are features of severe asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, vol. 126, no. 4, p. 722-729.e2, Oct. 2010.

TURANLI, Beste *et al.* Systems biology based drug repositioning for development of cancer therapy. **Seminars in Cancer Biology**, Sept. 2019.

VAN OOSTERHOUT, Cock *et al.* COVID-19 evolution during the pandemic – Implications of new SARS-CoV-2 variants on disease control and public health policies. **Virulence**, vol. 12, no. 1, p. 507-508, 1 Jan. 2021.

VANKADARI, Naveen. Structure of Furin Protease Binding to SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein and Implications for Potential Targets and Virulence. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, vol. 11, no. 16, p. 6655-6663, 28 July 2020.

VICENTI, Ilaria; ZAZZI, Maurizio; SALADINI, Francesco. SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase as a therapeutic target for COVID-19. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, vol. 31, no. 4, p. 325-337, 3 Mar. 2021.

WANG, Songyan *et al.* SERPINB3 (SCCA1) inhibits cathepsin L and lysoptosis, protecting cervical cancer cells from chemoradiation. *Communications biology*, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2022.

WANG, Xi *et al.* The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 in vitro. *Cell Discovery*, vol. 6, no. 1, 2 May 2020.

WANG, Xinxin *et al.* Diltiazem inhibits SARS-CoV-2 cell attachment and internalization and decreases the viral infection in mouse lung. *PLoS Pathogens*, vol. 18, no. 2, p. e1010343, 17 Feb. 2022.

WAUTERS, Els *et al.* Discriminating mild from critical COVID-19 by innate and adaptive immune single-cell profiling of bronchoalveolar lavages. *Cell Research*, vol. 31, no. 3, p. 272-290, 21 Jan. 2021.

WEINREICH, David M. *et al.* REGN-COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 17 Dec. 2020.

WHO, World Health Organization, 2021. *Health Topics: Coronavirus: Symptoms*. Retrieved from [https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab\\_3](https://www.who.int/health-topics/coronavirus#tab=tab_3)

WISHART, David S. *et al.* DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. *Nucleic Acids Research*, vol. 36, suppl\_1, p. D901—D906, 29 Nov. 2007.

WOODALL, Maximillian *et al.* The emergence of goblet inflammatory or ITGB6hi nasal progenitor cells determines age-associated SARS-CoV-2 pathogenesis. *bioRxiv*, p. 2023.01. 16.524211, 2023.

WRAPP, Daniel *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, vol. 367, no. 6483, p. 1260-1263, 19 Feb. 2020.

WU, Fan *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, vol. 579, no. 7798, p. 265-269, 3 Feb. 2020.

WU, Zunyou; MCGOOGAN, Jennifer M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72,314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*, v. 323, n. 13, p. 1239-1242, 2020.

WULANDARI, Sri; WIBAWA, Tri. The Role of HMGB1 in COVID-19-Induced Cytokine Storm and Its Potential Therapeutic Targets: A Review. *Immunology*, 2022.

XIAO, Kangpeng *et al.* Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. **Nature**, vol. 583, no. 7815, p. 286-289, 7 May 2020.

XU, Suo-wen; ILYAS, Iqra; WENG, Jian-ping. Endothelial dysfunction in COVID-19: an overview of evidence, biomarkers, mechanisms and potential therapies. **Acta Pharmacologica Sinica**, 17 Oct. 2022.

YAN, Lucy *et al.* 1141. Phase 3 Trial (in progress) of the SYK Inhibitor Fostamatinib in Patients Hospitalized with COVID-19: Protocol and Study Implementation Updates. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University Press, 2022. p. ofac492. 979.

YANG, Lan *et al.* The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, vol. 6, no. 1, 7 July 2021.  
YIN, Maureen *et al.* NLRP3, the inflammasome and COVID-19 infection. **QJM: An International Journal of Medicine**, 2023.

YU, Xianwen *et al.* Foxj1 transcription factors are master regulators of the motile ciliogenic program. **Nature Genetics**, vol. 40, no. 12, p. 1445-1453, 16 Nov. 2008.

ZHA, Duoduo; FU, Mingui; QIAN, Yisong. Vascular endothelial glycocalyx damage and potential targeted therapy in COVID-19. **Cells**, v. 11, n. 12, p. 1972, 2022.

ZHANG, Rui *et al.* RUVBL1/2 complex regulates pro-inflammatory responses in macrophages via regulating histone H3K4 trimethylation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 679184, 2021.

ZHANG, Wei *et al.* LncRNA MIR205HG accelerates cell proliferation, migration and invasion in hepatoblastoma through the activation of MAPK signaling pathway and PI3K/AKT signaling pathway. **Biology Direct**, vol. 17, no. 1, 7 Jan. 2022.

ZHANG, Zilong *et al.* Single-cell RNA analysis reveals the potential risk of organ-specific cell types vulnerable to SARS-CoV-2 infections. **Computers in biology and medicine**, v. 140, p. 105092, 2022.

ZHAO, Zixian *et al.* Single-cell analysis identified lung progenitor cells in COVID-19 patients. **Cell Proliferation**, vol. 53, no. 12, 22 Oct. 2020.

ZHOU, Shunheng *et al.* Single-cell RNA-seq dissects the intratumoral heterogeneity of triple negative breast cancer based on gene regulatory networks. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, Jan. 2021.

ZIEGLER, Carly G. K. *et al.* SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. **Cell**, vol. 181, no. 5, p. 1016-1035.e19, May 2020.

ZOU, Jun *et al.* Advanced Systems Biology Methods in Drug Discovery and Translational Biomedicine. **BioMed Research International**, vol. 2013, p. 1-8, 2013.

ZUMLA, Alimuddin *et al.* Coronaviruses — drug discovery and therapeutic options. ***Nature Reviews Drug Discovery***, vol. 15, no. 5, p. 327-347, 12 Feb. 2016.

## APÊNDICE A – Código utilizado para a execução das etapas descritas na metodologia do trabalho

### 1. CellRouter:

```

#Processamento dos dados (NS)
library(fusca)
tutorial_path <- '/home/renan/dados'
setwd('/home/renan/Analises_Renan/covid/nbt')
results_path <- file.path(tutorial_path, 'Results')
counts <- readRDS('NS_counts.rds')
ndata <- readRDS('NS_ndata.rds')
metadata <- readRDS('NS_metadata.rds')
umap <- readRDS('NS_UMAP.rds')

#Reduzindo para 25k
metadata25 <- metadata[sample(rownames(metadata), size = 25000),]
counts25 <- counts[,rownames(metadata25)]
umap25 <- umap[rownames(metadata25),]
saveRDS(counts25, file='NS_counts_25k.rds')
saveRDS(metadata25, file='NS_metadata_25k.rds')
saveRDS(umap25, file='NS_umap_25k.rds')

#Processamento dos dados (BL)
library(fusca)
tutorial_path <- '/home/renan/dados'
setwd('/home/renan/Analises_Renan/covid/nbt')
results_path <- file.path(tutorial_path, 'Results')
countsBL <- readRDS('BL_counts.rds')
ndataBL <- readRDS('BL_ndata.rds')
metadataBL <- readRDS('BL_metadata.rds')
umapBL <- readRDS('BL_UMAP.rds')

#Reduzindo para 25k
metadata25_BL <- metadataBL[sample(rownames(metadataBL), size = 25000),]
counts25_BL <- countsBL[,rownames(metadata25_BL)]
umap25_BL <- umapBL[rownames(metadata25_BL),]
saveRDS(counts25_BL, file='BL_counts_25k.rds')
saveRDS(metadata25_BL, file='BL_metadata_25k.rds')
saveRDS(umap25_BL, file='BL_umap_25k.rds')

#Script para NS
setwd('/home/renan/dados/Results')
counts <- readRDS('NS_counts_25k.rds')
ndata <- readRDS('NS_ndata_25k.rds')
metadata <- readRDS('NS_metadata_25k.rds')
umap <- readRDS('NS_umap_25k.rds')
cellrouter <- CreateCellRouter(counts, min.cells = 25, min.genes=50, is.expr = 0); gc();
cellrouter <- addInfo(cellrouter, metadata = metadata, colname = 'celltype',
metadata.column='celltype')
cellrouter <- addInfo(cellrouter, metadata = metadata, colname = 'sample', metadata.column='sample')
cellrouter <- addInfo(cellrouter, metadata = metadata, colname = 'severity',
metadata.column='severity')
cellrouter <- Normalize(cellrouter)
cellrouter <- scaleData(cellrouter)
cellrouter <- computePCA(cellrouter, num.pcs=50, seed=42)
cellrouter <- computeTSNE(cellrouter, num.pcs=11, seed=42, max_iter=1000)
cellrouter <- computeUMAP(cellrouter, num.pcs=11)
cellrouter <- customSpace(cellrouter, cellrouter@tsne$cell.embeddings)

```

```

plotReducedDimension(cellrouter, assay.type='RNA', reduction.type='umap',
  dims.use=c(1,2), annotation='celltype',
  annotation.color='celltype_color', showlabels=FALSE,
  3.5, 4.5)
plotReducedDimension(cellrouter, assay.type='RNA', reduction.type='pca',
  dims.use=c(1,2), annotation='celltype',
  annotation.color='celltype_color', showlabels=FALSE)

#Plotando o UMAP em grupos
colors <- unique(cellrouter@assays$RNA@sampTab[["celltype_color"]])
names(colors) <- unique(as.vector(cellrouter@assays$RNA@sampTab[["celltype"]]))
dr <- as.data.frame(cellrouter@umap$cell.embeddings)
dr <- dr[rownames(cellrouter@assays$RNA@sampTab),]
colnames(dr) <- c('UMAP1', 'UMAP2')
dr$group <- cellrouter@assays$RNA@sampTab$celltype
dr$library <- 'severity'
dr[rownames(cellrouter@assays$RNA@sampTab[which(cellrouter@assays$RNA@sampTab$severity
y == 'control'),]), 'library'] <- 'control'
dr[rownames(cellrouter@assays$RNA@sampTab[which(cellrouter@assays$RNA@sampTab$severity
y == 'moderate'),]), 'library'] <- 'moderate'
dr[rownames(cellrouter@assays$RNA@sampTab[which(cellrouter@assays$RNA@sampTab$severity
y == 'critical'),]), 'library'] <- 'critical'
dr$library <- factor(dr$library, levels=c('control', "moderate", "critical"))
p1 <- ggplot(dr, aes(x = UMAP1, y=UMAP2, colour=group)) + geom_point(size=0.01) + ggtitle("") +
theme_bw() +
  theme(legend.position = 'right', panel.border = element_rect(fill = NA, colour = "white"),
    strip.background = element_blank()) +
  theme(axis.line = element_line(colour = "black"),
    panel.grid.major = element_blank(),
    panel.grid.minor = element_blank(),
    panel.border = element_blank(), panel.background = element_blank()) +
  scale_color_manual("", values=colors) +
  facet_wrap(~library, ncol = 3) +
  guides(col=guide_legend(direction="vertical", keywidth = 0.75, keyheight = 0.85, override.aes =
list(size=3)))
filename <- paste(results_path, '/celltypes_total_NS.pdf', sep="")
pdf(file=filename, width=10, height=5)
print(p1)
dev.off();

#Filtrando NS
## Células epiteliais
metadata2 <- filter(metadata, celltype %in% c('Secretory', 'Squamous',
  'Basal', 'Secretory-diff', 'Ciliated', 'Ciliated-diff', 'outliers-epithelial',
  'FOXN4', 'unknown_epithelial', 'Ionocyte', 'IRC'))
counts2 <- counts[,rownames(metadata2)]
umap2 <- umap[rownames(metadata2),]
ndata2 <- ndata[rownames(metadata2)]
cellrouterNS2 <- CreateCellRouter(counts2, min.cells = 25, min.genes=50, is.expr = 0); gc();
cellrouterNS2 <- addInfo(cellrouterNS2, metadata = metadata2, colname = 'celltype',
  metadata.column='celltype')
cellrouterNS2 <- addInfo(cellrouterNS2, metadata = metadata2, colname = 'sample',
  metadata.column='sample')
cellrouterNS2 <- Normalize(cellrouterNS2)
cellrouterNS2 <- scaleData(cellrouterNS2)
cellrouterNS2 <- computePCA(cellrouterNS2, num.pcs=50, seed=42)
cellrouterNS2 <- computeTSNE(cellrouterNS2, num.pcs=11, seed=42, max_iter=1000)
cellrouterNS2 <- computeUMAP(cellrouterNS2, num.pcs=11)
cellrouterNS2 <- customSpace(cellrouterNS2, cellrouterNS2@tsne$cell.embeddings)
plotReducedDimension(cellrouterNS2, assay.type='RNA', reduction.type='umap',

```

```

dims.use=c(1,2), annotation='celltype',
annotation.color='celltype_color', showlabels=TRUE,
3.5, 4.5)

```

### ## Repetir o agrupamento UMAP com os parâmetros para NS - Epitelial

```

## Células imunológicas
metadata3 <- filter(metadata, celltype %in% c('moDC', 'Neu', 'nrMa',
'CTL', 'rMa', 'NKT', 'NKT-p', 'Treg', 'pDC', 'B cell', 'MC', 'NK', 'MoD-Ma'))
counts3 <- counts[,rownames(metadata3)]
umap3 <- umap[rownames(metadata3),]
cellrouterNS3 <- CreateCellRouter(counts3, min.cells = 25, min.genes=50, is.expr = 0); gc();
cellrouterNS3 <- addInfo(cellrouterNS3, metadata = metadata3, colname = 'celltype',
metadata.column='celltype')
cellrouterNS3 <- addInfo(cellrouterNS3, metadata = metadata3, colname = 'sample',
metadata.column='sample')
cellrouterNS3 <- Normalize(cellrouterNS3)
cellrouterNS3 <- scaleData(cellrouterNS3)
cellrouterNS3 <- computePCA(cellrouterNS3, num.pcs=50, seed=42)
cellrouterNS3 <- computeTSNE(cellrouterNS3, num.pcs=11, seed=42, max_iter=1000)
cellrouterNS3 <- computeUMAP(cellrouterNS3, num.pcs=11)
cellrouterNS3 <- customSpace(cellrouterNS3, cellrouterNS3@tsne$cell.embeddings)
plotReducedDimension(cellrouterNS3, assay.type='RNA', reduction.type='umap',
dims.use=c(1,2), annotation='celltype',
annotation.color='celltype_color', showlabels=FALSE,
3.5, 4.5)

```

### ## Repetir o agrupamento UMAP com os parâmetros para NS - Imunológicas

**### OBS = Criar objetos cellrouter contendo apenas os grupos controle (cellrouter\_Control), moderado (cellrouter\_Moderate) e grave (cellrouter\_Critical).**

```

#Script para BL
setwd('/home/renan/dados/Results')
countsBL <- readRDS('BL_counts_25k.rds')
metadataBL <- readRDS('BL_metadata_25k.rds')
umapBL <- readRDS('BL_umap_25k.rds')
cellrouter2 <- CreateCellRouter(countsBL, min.cells = 25, min.genes=50, is.expr = 0); gc();
cellrouter2 <- addInfo(cellrouter2, metadata = metadataBL, colname = 'celltype',
metadata.column='celltype')
cellrouter2 <- addInfo(cellrouter2, metadata = metadataBL, colname = 'sample',
metadata.column='sample')
cellrouter2 <- Normalize(cellrouter2)
cellrouter2 <- scaleData(cellrouter2)
cellrouter2 <- computePCA(cellrouter2, num.pcs=50, seed=42)
cellrouter2 <- computeTSNE(cellrouter2, num.pcs=11, seed=42, max_iter=1000)
cellrouter2 <- computeUMAP(cellrouter2, num.pcs=11)
cellrouter2 <- customSpace(cellrouter2, cellrouter2@tsne$cell.embeddings)
plotReducedDimension(cellrouter2, assay.type='RNA', reduction.type='umap',
dims.use=c(1,2), annotation='celltype',
annotation.color='celltype_color', showlabels=FALSE,
3.5, 4.5)
plotReducedDimension(cellrouter2, assay.type='RNA', reduction.type='pca',
dims.use=c(1,2), annotation='celltype',
annotation.color='celltype_color', showlabels=FALSE)

```

### ## Repetir o agrupamento UMAP com os parâmetros para BL - totais

```

#Filtrando BL
##BL Epiteliais
metadataBL2 <- filter(metadataBL, celltype %in% c("ciliated2",
'ciliated3', 'basal', 'squamous_epithelial', 'secretory', 'FOXN4',
'ciliated1', 'secretory_LYPD2', 'ionocytes', 'hybrid'))
countsBL2 <- countsBL[,rownames(metadataBL2)]

```

```

umapBL2 <- umapBL[rownames(metadataBL2),]
cellrouterBL2 <- CreateCellRouter(countsBL2, min.cells = 25, min.genes=50, is.expr = 0); gc();
cellrouterBL2 <- addInfo(cellrouterBL2, metadata = metadataBL2, colname = 'celltype',
metadata.column='celltype')
cellrouterBL2 <- addInfo(cellrouterBL2, metadata = metadataBL2, colname = 'sample',
metadata.column='sample')
cellrouterBL2 <- Normalize(cellrouterBL2)
cellrouterBL2 <- scaleData(cellrouterBL2)
cellrouterBL2 <- computePCA(cellrouterBL2, num.pcs=50, seed=42)
cellrouterBL2 <- computeTSNE(cellrouterBL2, num.pcs=11, seed=42, max_iter=1000)
cellrouterBL2 <- computeUMAP(cellrouterBL2, num.pcs=11)
cellrouterBL2 <- customSpace(cellrouterBL2, cellrouterBL2@tsne$cell.embeddings)
plotReducedDimension(cellrouterBL2, assay.type='RNA', reduction.type='umap',
dims.use=c(1,2), annotation='celltype',
annotation.color='celltype_color', showlabels=FALSE,
3.5, 4.5)

```

### ## Repetir o agrupamento UMAP com os parâmetros para BL - Epiteliais

```
##BALF imunológicas
```

```

metadataBL3 <- filter(metadataBL, celltype %in% c('CTL', 'Neu', 'B cells',
'Ma', 'Treg', 'NKT', 'NK', 'PC', 'basophil'))
countsBL3 <- countsBL[,rownames(metadataBL3)]
umapBL3 <- umapBL[rownames(metadataBL3),]
cellrouterBL3 <- CreateCellRouter(countsBL3, min.cells = 25, min.genes=50, is.expr = 0); gc();
cellrouterBL3 <- addInfo(cellrouterBL3, metadata = metadataBL3, colname = 'celltype',
metadata.column='celltype')
cellrouterBL3 <- addInfo(cellrouterBL3, metadata = metadataBL3, colname = 'sample',
metadata.column='sample')
cellrouterBL3 <- Normalize(cellrouterBL3)
cellrouterBL3 <- scaleData(cellrouterBL3)
cellrouterBL3 <- computePCA(cellrouterBL3, num.pcs=50, seed=42)
cellrouterBL3 <- computeTSNE(cellrouterBL3, num.pcs=11, seed=42, max_iter=1000)
cellrouterBL3 <- computeUMAP(cellrouterBL3, num.pcs=11)
cellrouterBL3 <- customSpace(cellrouterBL3, cellrouterBL3@tsne$cell.embeddings)
plotReducedDimension(cellrouterBL3, assay.type='RNA', reduction.type='umap',
dims.use=c(1,2), annotation='celltype',
annotation.color='celltype_color', showlabels=FALSE,
3.5, 4.5)

```

### ## Repetir o agrupamento UMAP com os parâmetros para BL - Imunológicas

#### #### OBS = Criar objetos cellrouter contendo apenas o grupo BALF (cellrouter\_BALF)

```
#Gráfico de proporção
```

```

plotProportion(cellrouter, assay.type= 'RNA', condition = 'severity', population = 'celltype', order =
NULL)
plotProportion(cellrouter2, assay.type= 'RNA', condition = 'location', population = 'celltype', order =
NULL)

```

```
#Continuando para NS/BL
```

```

markers <- findSignatures(cellrouterNS2, assay.type = 'RNA', column="celltype", pos.only=TRUE,
fc.threshold=0.5)
top10 <- markers %>% dplyr::group_by(population) %>% dplyr::top_n(10, fc)
h <- plotSignaturesHeatmap(cellrouterNS2, markers=top10, column.ann='celltype',
column.color='celltype_color', threshold=2)
filename <- paste(results_path, '/heatmap_celltype_NS_epitelial.pdf', sep='')
pdf(file=filename, width=10, height=5)
print(h)
dev.off();
dotplot(cellrouterNS2, assay.type = 'RNA', genes.use = c('GENES'),
column = 'celltype', thr = 0.5)
##GENES -> Genes escolhidos pelo usuário para o dotplot referente ao heatmap

```

```

### Repetir etapas acima para cellrouterNS3
### Repetir etapas acima para cellrouterBL2 e cellrouterBL3
cellrouterNS2 <- findClusters(cellrouterNS2, assay.type = 'RNA', method="graph.clustering",
                             nn.type='nng', num.pcs=15, k=20)
plotReducedDimension(cellrouterNS2, reduction.type='umap',
                     annotation="celltype", annotation.color='celltype_color',
                     showlabels=TRUE, dotsize=1, convex=FALSE)
cellrouterNS2 <- buildKNN(cellrouterNS2, k=10, column.ann='celltype',
                          num.pcs=20, sim.type='jaccard')
plotKNN(cellrouterNS2, reduction.type='umap', column.ann='celltype',
         column.color='celltype_color')
cellrouterNS2 <- findCurves(cellrouterNS2, assay.type = 'RNA', column="celltype",
                             find_populations=TRUE, sources=c('Basal', 'Basal'),
                             targets=c('Ciliated', 'Secretory'), dims.use=11,
                             reduction.type='pca')
cellrouterNS2 <- processCurves(cellrouterNS2,
                               genes=rownames(cellrouterNS2@assays$RNA@ndata),
                               num.cells=3, neighs=3,
                               column.ann='celltype', column.color='celltype_color')
names <- unique(names(cellrouterNS2@pathsinfo$distr))
cellrouterNS2 <- correlationPseudotime(cellrouterNS2, type='spearman')
cellrouterNS2 <- topGenes(cellrouterNS2, 0.8, 0.1)
cellrouterNS2 <- smoothDynamics(cellrouterNS2, names)
cellrouterNS2 <- clusterGenesPseudotime(cellrouterNS2, 5)
saveRDS(cellrouterNS2, file=file.path(results_path, 'CellRouterProcessed.rds'))
# Caso seja utilizado posteriormente: cellrouterNS2 <- readRDS('CellRouterProcessed.rds')
grn.data <- buildGRN(cellrouterNS2, species='Hs',
                    genes.use=rownames(cellrouterNS2@assays$RNA@ndata),
                    zscore=5, filename=paste0(results_path, '/GRN_cellrouter.R'),
                    blocksize=25)
saveRDS(grn.data, file.path(results_path, "grn_cellrouter.rds"))
gene_clusters <- plotClusterHeatmap(cellrouterNS2, names)
gene_clusters <- plotClusters(cellrouterNS2, 'Basal->Secretory-diff->Ciliated-diff->Ciliated')

##Genes da trajetória
genelist <- c('BASP1', 'EPAS1', 'MLF1', 'RFX3')
plottrajectories(cellrouterNS2, trajectories='Basal->Secretory-diff->Ciliated-diff->Ciliated',
                 geneList=genelist, rescale=TRUE)
g <- plotPathHeatmap(cellrouterNS2, assay.type='RNA',
                    paths=c('Basal->Secretory-diff->Ciliated-diff->Ciliated'),
                    genelist=genelist, threshold=2)
print(g)

##Genes relacionados ao acoplamento viral
genelist_entry <- c('ACE2', 'FURIN', 'TMPRSS2', 'CTSL')
plottrajectories(cellrouter, trajectories='Basal->Secretory-diff->Ciliated-diff->Ciliated',
                 geneList=genelist_entry, rescale=TRUE)
##Repetir etapa para a trajetória Basal->Secretory-dif->Secretory e seus respectivos genes de interesse
plotViolin(cellrouterNS2, geneList=genelist_entry, column='celltype',
            column.color='celltype_color', cols=2)
plotDRExpression(cellrouterNS2, genelist=genelist_entry, reduction.type='umap',
                 columns=4, dotsize=1, title="")
##Repetir etapa acima para cellrouterBL2

##Dotplot para expressão de agentes inflamatórios
dotplot(cellrouter, assay.type = 'RNA', genes.use = c('GENES'),
        column = 'celltype', thr = 0.5)
dotplot(cellrouter_BALF, assay.type = 'RNA', genes.use = c('GENES'),
        column = 'celltype', thr = 0.5)

```

```
### GENES -> genes selecionados presentes nas amostras relacionados com agentes inflamatórios, citocinas e quimiocinas.
```

```
##Dotplot para expressão de agentes envolvidos no extravasamento celular
dotplot(cellrouter_Moderate, assay.type = 'RNA', genes.use = c('GENES'),
        column='celltype', thr = 0.5)
```

```
dotplot(cellrouter_Critical, assay.type = 'RNA', genes.use = c('GENES'),
        column='celltype', thr = 0.5)
```

```
dotplot(cellrouter_BALF, assay.type = 'RNA', genes.use = c('GENES'),
        column='celltype', thr = 0.5)
```

```
### GENES -> genes selecionados presentes nas amostras relacionados com agentes envolvidos no extravasamento celular
```

```
##Gráfico violino para os marcadores de apoptose
```

```
genelist_apoptosis <- c('FAS', 'CASP3', 'CYCS')
```

```
plotViolin(cellrouter_Control, geneList=genelist_apoptosis, column='celltype',
           column.color='celltype_color', cols=2)
```

```
plotViolin(cellrouter_Moderate, geneList=genelist_apoptosis, column='celltype',
           column.color='celltype_color', cols=2)
```

```
plotViolin(cellrouter_Critical, geneList=genelist_apoptosis, column='celltype',
           column.color='celltype_color', cols=2)
```

```
plotViolin(cellrouter_BALF, geneList=genelist_apoptosis, column='celltype',
           column.color='celltype_color', cols=2)
```

## 2. CellComm:

```
#Processamento dos dados (NS):
```

```
library("fusca")
```

```
library("devtools")
```

```
library("dplyr")
```

```
library("igraph")
```

```
library("scales")
```

```
library("ggplot2")
```

```
tutorial_path <- '/home/renan/dados'
```

```
setwd('/home/renan/dados/Results')
```

```
results_path <- file.path(tutorial_path, 'Results')
```

```
counts <- readRDS('NS_counts_25k.rds')
```

```
ndata <- readRDS('NS_ndata_25k.rds')
```

```
metadata <- readRDS('NS_metadata_25k.rds')
```

```
umap <- readRDS('NS_umap_25k.rds')
```

```
## Repetir etapa para BALF
```

```
#Iniciando com NS
```

```
##Etapa primária com cellrouter
```

```
sample_names <- c("Sample1")
```

```
cellrouter <- CreateCellRouter(counts, assay.type = "RNA",
                              min.genes = 100, min.cells = 25, is.expr = 0)
```

```
var.genes <- FindVariableGenes(cellrouter, assay.type = "RNA",
                              method = "coefficient_variation", pvalue = 0.05)
```

```
var.genes <- var.genes[order(var.genes$adj.pvalue, decreasing = FALSE), ]
```

```
cellrouter@var.genes <- rownames(var.genes[1:3000, ])
```

```
cellrouter <- addInfo(cellrouter, metadata = metadata, colname = 'celltype',
                    metadata.column='celltype')
```

```
cellrouter <- addInfo(cellrouter, metadata = metadata, colname = 'sample', metadata.column='sample')
```

```
cellrouter <- addInfo(cellrouter, metadata = metadata, colname = 'severity',
                    metadata.column='severity')
```

```
cellrouter <- Normalize(cellrouter, assay.type = "RNA")
```

```
cellrouter <- scaleData(cellrouter, assay.type = "RNA",
                       genes.use = cellrouter@var.genes, blocksize = nrow(cellrouter@assays$RNA@ndata))
```

```
cellrouter <- computePCA(cellrouter, assay.type = "RNA",
                       seed = 42, num.pcs = 50, genes.use = cellrouter@var.genes)
```

```

plot(cellrouter@pca$sdev)
cellrouter <- computeTSNE(cellrouter,
  seed = 1, num.pcs = 8, max_iter = 1000)
cellrouter <- computeUMAP(cellrouter,
  seed = 1, num.pcs = 8, metric = "euclidean", n_neighbors = 15, spread = 1, min_dist =
0.1)
cellrouter <- findClusters(cellrouter, assay.type = "RNA",
  num.pcs = 8, nn.type = "knn", k = 20)
plotReducedDimension(cellrouter, assay.type = "RNA", reduction.type = "umap", annotation =
"celltype", annotation.color = 'celltype_color',
  dotsize = 1.5, showlabels = TRUE, labelsiz = 3, convex = FALSE)
markers <- findSignatures(cellrouter, assay.type = "RNA",
  column = "celltype", pos.only = TRUE, fc.threshold = 0.2); gc();
markers.top <- markers %>% group_by(population) %>% top_n(10, fc)
markers.top <- as.data.frame(markers.top)
h <- plotSignaturesHeatmap(cellrouter, assay.type = 'RNA',
  markers.top, genes.show = as.vector(markers.top$gene),
  column.ann = 'celltype', column.color = 'celltype_color',
  num.cells = 700, threshold = 2)
filename <- paste(results_path, '/heatmap_celltype_cellcomm.pdf', sep='')
pdf(file=filename, width=10, height=5)
print(h)
dev.off();

#Análise de interação celular
lr_network = readRDS(url("https://zenodo.org/record/3260758/files/lr_network.rds"))
head(lr_network)
pairs <- lr_network
pairs$Pair.Name <- paste(pairs$from, pairs$to, sep = "_")
ligands <- unique(lr_network$from)
ligands <- intersect(ligands, rownames(cellrouter@assays$RNA@ndata))
receptors <- unique(lr_network$to)
receptors <- intersect(receptors, rownames(cellrouter@assays$RNA@ndata))
ligands.receptors <- unique(c(ligands, receptors))
mean.expr <- computeValue(cellrouter, assay.type = "RNA",
  genelist = ligands.receptors, "celltype", fun = "mean"); gc();
interactions <- population.pairing(mean.expr = mean.expr, pairs = pairs, ligands = ligands, receptors
= receptors, threshold = 0.25)
interactions <- calculateObservedMean(mean.expr = mean.expr, interactions = interactions)
head(interactions)
genelist <- unique(c(interactions$ligand, interactions$receptor))
p <- clusterPermutation(cellrouter, assay.type = "RNA",
  genelist = genelist, interactions = interactions, cluster.label = "celltype", nPerm = 500)
interactions.p <- calculatePvalue(p, nPerm = 500, interactions2 = interactions)
saveRDS(interactions.p, file = paste(results_path, "/interactions_with_Pvalue500cluster.rds", sep = ""))
interactions.p <- readRDS(paste(results_path, "/interactions_with_Pvalue500cluster.rds", sep = ""))
tmp <- interactions.p[which(interactions.p$pvalue < 0.01),]
head(tmp)
my_matrix <- interactionmatrix(tmp)
head(matrix)
my_graph <- cellnetwork3(tmp, threshold = 5)
plots <- predictCellInteractions(cellrouter, assay.type = "RNA", sample.name = "Sample1", cluster.type
= "Subcluster", graph = my_graph, distance.threshold = 0.75)
gridExtra::grid.arrange(grobs = plots, ncol = 3)
## Repetir etapa para cellrouter_Moderate e cellrouter_Critical
## Repetir etapa para cellrouter_BALF

# Análise de interação entre grupos de ligantes-receptores
x <- tmp[which(tmp$pair %in% c(CCL5_PIGR, RPS19_RPSA, CALM1_RPSA, GSTP1_IL7R, HLA-
A_CD8A, CCL5_CXCR4, PTPRC_CD2, CD2_PTPRC, CCL5_C5AR1, LGALS3_ITGB1, ,

```

```
CCL5_SDC4, GSTP1_CD44, CCL5_CDH1, CCL5_FPR1, CCL5_SDC1, HLA-DRA_PTPRC,
CCL5_CXCR6, CCL5_CCR1, ANXA1_CD44, RPS19_C5AR1, CCL5_CCR6, NAMPT_IGF1R,
LGALS3_NPTN, NAMPT_INSR, CCL5_LPAR3, MIF_CD74, NAMPT_ANXA6, CCL5_ACKR4,
CCL5_S1PR3, CCL5_S1PR4 ), ]
```

```
NSsending_NSreceptor <- c('FOXN4_Ciliated', 'FOXN4_outliers-epithelial', 'FOXN4_Secretory',
'FOXN4_nrMa', 'FOXN4_CTL', 'FOXN4_Treg', 'FOXN4_Ionocyte', 'FOXN4_NK', 'FOXN4_Neu',
'Ciliated_FOXN4', 'Ciliated_outliers-epithelial', 'Ciliated_Secretory', 'Ciliated_nrMa',
'Ciliated_CTL', 'Ciliated_Treg', 'Ciliated_Ionocyte', 'Ciliated_NK', 'Ciliated_Neu',
'outliers-epithelial_Ciliated', 'outliers-epithelial_FOXN4', 'outliers-epithelial_Secretory',
'outliers-epithelial_nrMa', 'outliers-epithelial_CTL', 'outliers-epithelial_Treg', 'outliers-
epithelial_Ionocyte', 'outliers-epithelial_NK', 'outliers-epithelial_Neu',
'Secretory_FOXN4', 'Secretory_outliers-epithelial', 'Secretory_CTL', 'Secretory_nrMa',
'Secretory_Ciliated', 'Secretory_Treg', 'Secretory_Ionocyte', 'Secretory_NK', 'Secretory_Neu',
'nrMa_FOXN4', 'nrMa_outliers-epithelial', 'nrMa_Ciliated', 'nrMa_Secretory',
'nrMa_CTL', 'nrMa_Treg', 'nrMa_Ionocyte', 'nrMa_NK', 'nrMa_Neu',
'Ionocyte_FOXN4', 'Ionocyte_outliers-epithelial', 'Ionocyte_Secretory', 'Ionocyte_nrMa',
'Ionocyte_CTL', 'Ionocyte_Treg', 'Ionocyte_Ciliated', 'Ionocyte_NK', 'Ionocyte_Neu',
'Treg_FOXN4', 'Treg_outliers-epithelial', 'Treg_Secretory', 'Treg_nrMa', 'Treg_CTL',
'Treg_Ciliated', 'Treg_Ionocyte', 'Treg_NK', 'Treg_Neu',
'NK_FOXN4', 'NK_outliers-epithelial', 'NK_Secretory', 'NK_nrMa', 'NK_CTL', 'NK_Treg',
'NK_Ciliated', 'NK_Ionocyte', 'NK_Neu',
'CTL_FOXN4', 'CTL_outliers-epithelial', 'CTL_Secretory', 'CTL_nrMa', 'CTL_Treg',
'CTL_Ciliated', 'CTL_NK', 'CTL_Ionocyte', 'CTL_Neu',
'Neu_FOXN4', 'Neu_outliers-epithelial', 'Neu_Secretory', 'Neu_nrMa', 'Neu_CTL',
'Neu_Treg', 'Neu_Ciliated', 'Neu_NK', 'Neu_Ionocyte')
gene.pairs <- plotPairDotplot(x, interactionList = NSsending_NSreceptor, num.pairs = 50)
head(gene.pairs$markers)
print(gene.pairs$plot)
```

**## Repetir etapa para cellrouter\_Moderate e cellrouter\_Critical utilizando os pares de ligantes-receptores de maior interação para cada grupo, assim como as células emissoras e receptoras de interesse.**

**## Repetir etapa para cellrouter\_BALF utilizando os pares de ligantes-receptores de maior interação para cada grupo, assim como as células emissoras e receptoras de interesse.**

```
#Análise de predição dos fatores de transcrição e das vias de sinalização
filename <- paste(results_path, "/GRN_CellComm.R", sep = "")
grn.data <- buildGRN(cellrouter, assay.type = "RNA", species = "Hs", genes.use =
rownames(cellrouter@assays$RNA@ndata), zscore = 4, filename = filename)
filename <- "9606.mitab.05-29-2019_zcat.txt"
inetwork <- createPPI(filename = filename, expr = cellrouter@assays$RNA@ndata)
filename <- paste(results_path, "/9606.mitab.05-29-2019_zcat.R", sep = "")
save(inetwork, file = filename)
corTables <- cellnetworksPPI2(ppi = inetwork$network, expr = cellrouter@assays$RNA@ndata,
samples = cellrouter@assays$RNA@sampTab, column = 'Subpopulation', corThr1 = 0.10, corThr2 =
0.25, dir.prefix = "")
grn.data <- get(load(paste(results_path, '/GRN_CellComm.R', sep="")))
tfs <- intersect(grn.data$tfs, rownames(cellrouter@assays$RNA@ndata))
v <- gene.pairs$markers
head(v, n = 3)
sts2 <- list()
  for(i in unique(v$celltypes)){ tmp <- v[which(v$celltypes == i),]
rs <- unique(tmp$receptor)
sts2[["receptor"]][[i]]$sources <- rs
sts2[["receptor"]][[i]]$targets <- tfs }
wd_package <- getwd()
setwd(wd_package)
maindir <- paste0(wd_package, "")
interactionList <- c(NSsending_NSreceptor)
cellcomm <- CreateCellComm()
```

```

for(interaction in interactionList){
  interaction <- gsub(" ", ".", interaction)
  print(interaction)
  celltype <- strsplit(interaction, split = "[_"])[[1]][2]
  cat("Using ", celltype, " coexpression network\n")
  filename <- paste(celltype, ".txt", sep="")
  dirname <- gsub("[.]", ".", interaction)
  cellcomm <- findpaths.simpleRJava(cellcomm, sources.targets = sts2$receptor[[interaction]],
file = filename, dir = dirname, maindir = maindir) }
files <- list()
  for(i in interactionList){
    f <- paste(strsplit(i, split = "_")[[1]][2], ".txt", sep = "")
    files[[i]] <- f }
summary <- summarize.flow(files, prefix = "")
grn <- grn.data$GRN_table
colnames(grn) <- c("target", "reg", "zscore", "corr")
sampTab <- cellrouter@sampTab
apathways <- activeSignaling(data = cellrouter@assays$RNA@ndata, sampTab =
cellrouter@assays$RNA@sampTab, grn = grn, markers = markers, summary = summary, fc = 0.2)
npaths <- rankpaths(summary, apathways$pathways)

```

```

options(repr.plot.width = 7, repr.plot.height = 7)
a1 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[1])
a2 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[19])
a3 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[32])
a4 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[39])
a5 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[52])
a6 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[60])
a7 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[70])
a8 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[78])
a9 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[88])
combined <- do.call(rbind, list(a1$df, a2$df, a3$df, a4$df, a5$df, a6$df, a7$df, a8$df, a9$df))
## Para células ciliadas como células de interesse

```

```

options(repr.plot.width = 7, repr.plot.height = 7)
a1 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[4])
a2 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[13])
a3 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[22])
a4 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[31])
a5 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[49])
a6 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[58])
a7 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[67])
a8 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[76])
a9 <- signaling2TF(npaths, num.pathways = 20, interaction = NSsending_NSreceptor[85])
combined <- do.call(rbind, list(a1$df, a2$df, a3$df, a4$df, a5$df, a6$df, a7$df, a8$df, a9$df))
## Para células nrMa como células de interesse

```

```

g <- ggplot(combined, aes(path, interaction)) + geom_point(aes(colour=score, size=score)) +
scale_colour_gradientn("Activity score",colours=c("midnightblue", "dodgerblue3", "white", "goldenrod1",
"darkorange2")) +
theme_bw() + xlab("") + ylab("") +
theme(legend.position="top", axis.text.x = element_text(size=rel(1), angle=45,
hjust=1), panel.grid.minor = element_blank(),
axis.ticks=element_blank(),#)+#,
panel.border=element_rect(fill = NA, colour=alpha('black', 1),size=1)) +
guides(colour = guide_colourbar(title.position="top", title.hjust = 0.5),
size = guide_legend(title.position="top", title.hjust = 0.5)) + coord_flip()
g
## Repetir as etapas acima para cellrouter_BALF utilizando as células secretoras e os
macrófagos como células de interesse.

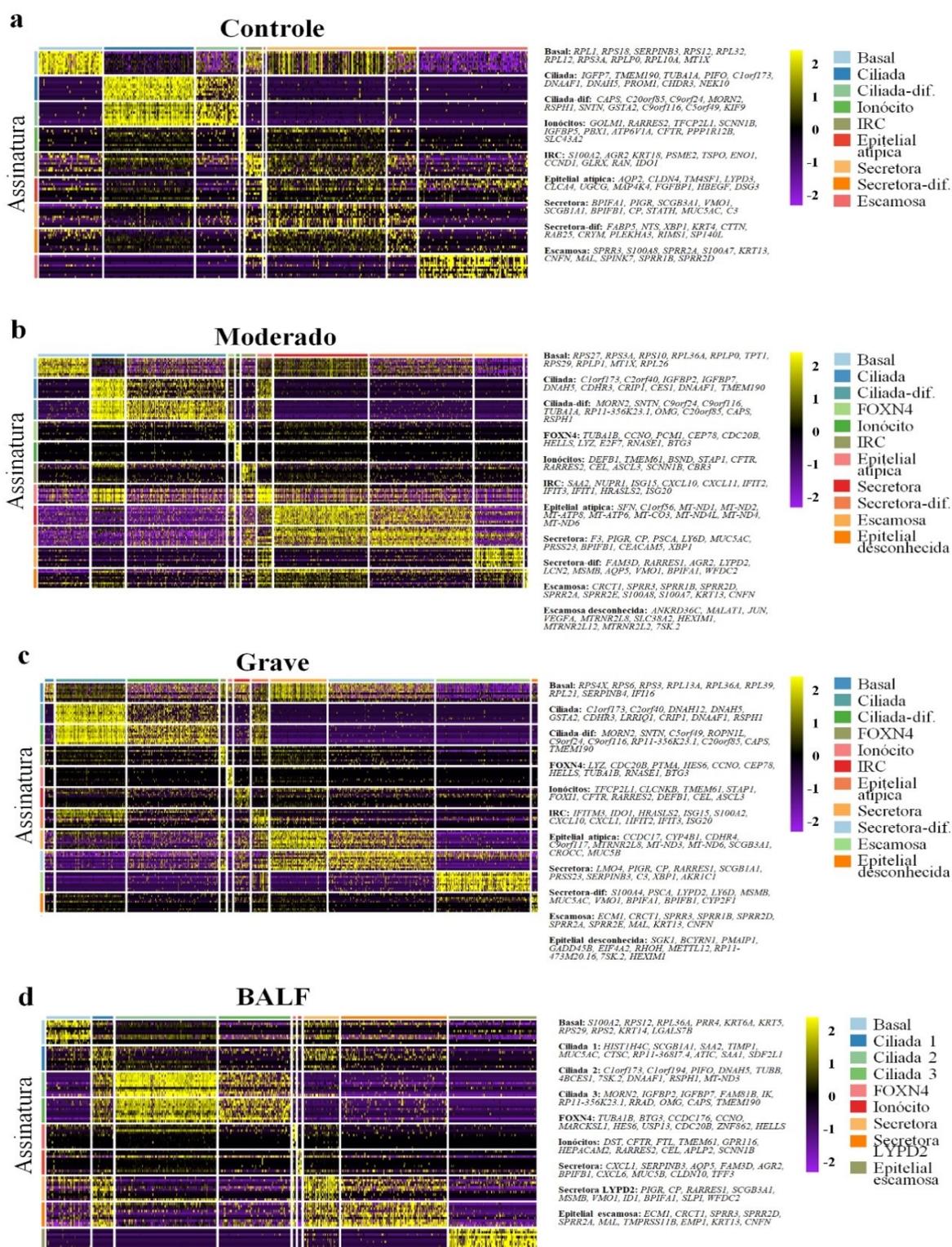
```

**APÊNDICE B – Quadro com os grupos celulares epiteliais identificados nas amostras de NS e PSB+BALF e seus principais genes expressos**

NS		PSB + BALF	
Grupos celulares	Top 10 genes	Grupos celulares	Top 10 genes
Basal	<i>RPS29, RPS10, RPLP0, MT1X, RPS27, RPL34, RPS18, RPL36A, KRT5, RPLP1</i>	Basal	<i>S100A2, CLCA2, MIR205HG, KRT5, SERPINB13, SERPINB4, PTPRZ1, IL33, FMO2, BCAM</i>
Ciliada	<i>IGFBP7, DNAH5, CDHR3, CRIP1, TMEM190, C2orf40, C1orf173, DNAAF1, CDHR3, DNAH12</i>	Ciliadas 1 e 2	<i>SYNE1, HYDIN, DNAH7, DNAH11, DNAH3, DNAH10, TTC18, C12orf55, RP1, DZIP1LI</i>
Ciliada-dif.	<i>C9orf24, C9orf116, RP11-356K23, C20orf85, CAPS, RSPH1, MORN2, SNTN, OMG, ROPN1L</i>	Ciliada 3	<i>SNTN, MORN2, PIFO, OMG, ODF3B, ROPN1L, RP11-356K23.1, FAM81B, GSTA2, TCTEX1D4</i>
FOXN4	<i>TUBA1B, CCNO, CDC20B, RNASE1, BTG3, PCM1, LYZ, CEP78, HELLS, HES6</i>	FOXN4	<i>CCNO, BTG3, CDC20B, HES6, CEP78, LRRC26, HELLS, CDK1, KDELC2, PLK4</i>
Ionócitos	<i>DEFB1, RARRES2, ASCL3, TFCP2L1, TMEM61, SCNN1B, CFTR, STAP1, CEL</i>	Híbrida	<i>SCGB1A1, MSMB, AGR2, LCN2, BPIFB1, SCGB3A1, TFF3, SERPINB3, MUC5AC, SAA1</i>
IRC	<i>ISG15, S100A2, SAA2, CXCL10, NUPR1, IFIT2, HRASLS2, IFIT3, IFIT1, CXCL11</i>	Ionócitos	<i>RARRES2, DST, ASCL3, STAP1, IGF1, HEPACAM2, ITPR2, CLCNKB, DGKI, FOXI1</i>
Epitelial atípica	<i>CDHR4, C9orf117, MTRNR2L8, MT-ND2, MT-ATP8, ND3, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND6, MUC5B</i>	Secretora	<i>C3, SLC4A4, TGM2, FAM129A, GALNT7, GALNT6, ADAM28, RIMS1, CREB3L1, ALPL</i>
Secretora	<i>CDHR4, C9orf117, MTRNR2L8, MT-ND2, MT-ATP8, ND3, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND6, MUC5B</i>	Secretora LYPD2	<i>BPIFA1, RARRES1, VMO1, ALDH3A1, PI3, FABP5, LY6D, ID1, HLA-DRB5, MMP10</i>
Secretora-dif.	<i>WFDC2, LYPD2, BPIFA1, AGR2, MSMB, VMO1, LY6D, RARRES1, AQP5, FAM3D</i>	Escamosa	<i>SPRR3, S100A9, S100A8, KRT13, SPRR2A, MAL, EMP1, ECM1, TMPRSS11B, CRCT1</i>
Escamosa	<i>SPRR2A, SPRR3, SPRR2E, SPRR2D, S100A7, CNFN, KRT13, SPRR1B, MAL</i>		
Epitelial desconhecida	<i>(MALAT1, 7SK.2, MTRNR2L12, GADD45B, MTRNR2L2, BCYRN1, PMAIP, HEXIM1, METTL12, RP11-473M20.16</i>		

Legenda: Do lado esquerdo do quadro os genes referentes à figura 10a, enquanto que do lado direito estão os genes referentes à figura 10b; Fonte: Elabora do pelo autor.

## APÊNDICE C - Heatmaps dos Genes diferencialmente expressos em células epiteliais das amostras por estágio da doença



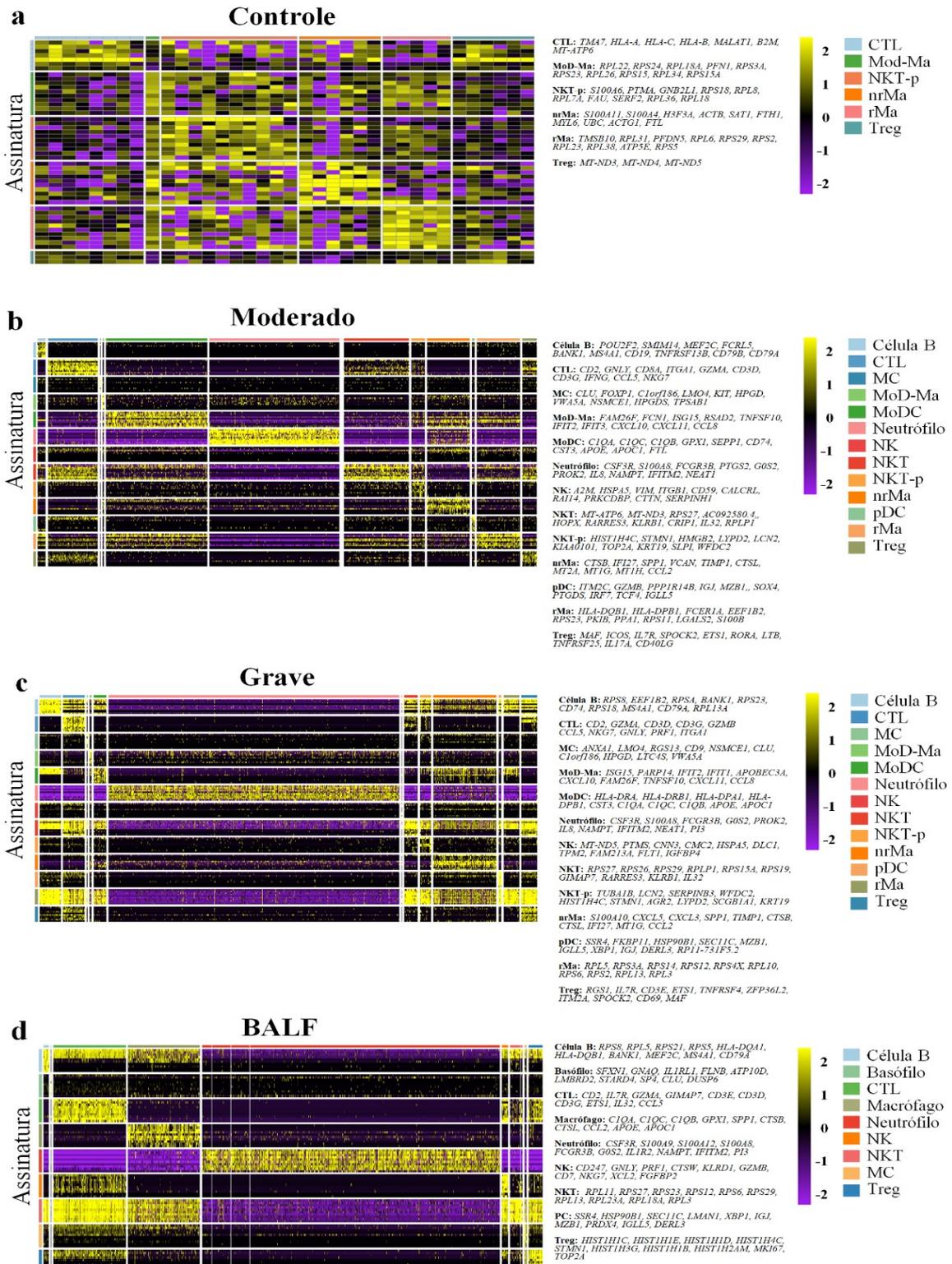
Legenda: Em **a**) o top 10 genes diferencialmente expressos para cada tipo celular epitelial identificado na amostra de NS no grupo controle; em **b**) os principais genes diferencialmente expressos para os tipos celulares epiteliais em NS no grupo moderado; em **c**) o top 10 genes diferencialmente expressos para os tipos celulares epiteliais em NS para o grupo grave; e em **d**) os principais genes expressos para os grupos celulares epiteliais presentes na amostra de BALF em estágio grave da COVID-19; Fonte: Elaborado pelo autor.

**APÊNDICE D – Quadro com os grupos celulares imunológicos identificados nas amostras de NS e PSB+BALF e seus principais dez genes expressos**

NS		PSB + BALF	
Grupos celulares	Top 10 genes	Grupos celulares	Top 10 genes
Célula B	<i>CD37, CD79A, BANK1, POU2F2, SMIM14, CD79B, TNFRSF13B, AL928768.3, FCRL5, MS4A1</i>	Célula B	<i>RPS8, RPS23, RPS21, RPL5, HLA-DQB1, MS4A1, HLA-DQA1, CD79A, BANK1, MEF2C</i>
CTL	<i>CCL5, CD2, GZMA, GNLY, GZMB, CD3D, CD3G, NKG7, CD8A, ITGA1</i>	Basófilos	<i>CD9, CLU, HPGDS, KIT, SLC18A2, IL1RL1, LTC4S, VWA5A, RGS13, C1orf186</i>
MC	<i>TPSAB1, HPGD, LMO4, CLU, NSMCE1, HPGDS, KIT, C1orf186, VWA5A, SOX4</i>	CTL	<i>CCL5, IL32, CD2, GZMA, IL7R, CD3D, ETS1, GIMAP7, CD3E, CD3G</i>
MoD-Ma	<i>ISG15, CXCL10, CCL8, IFIT2, IFIT3, CXCL11, TNFSF10, RSAD2, FAM26F, APOBEC3A</i>	Macrófagos	<i>CTSB, CTSL, SPP1, CCL2, C1QB, HLA-DPA1, C1QA, C1QC, APOE, APOC1</i>
moDC	<i>CD74, HLA-DRA-HLA-DPA1, CST3, GPX1, APOC1, APOE, C1QC, C1QA, C1QB</i>	Neutrófilos	<i>S100A8, S100A9, IFITM2, NAMPT, G0S2, S100A12, PI3, CSF3R, FCGR3B, IL1R2</i>
Neutrófilos	<i>S100A8, IL8, NEAT1, IFITM2, IFITM2, NAMPT, G0S2, PI3, CSF3R, FCGR3B, PROK2</i>	NK	<i>GNLY, NKG7, GZMB, PRF1, KLRD1, CD7, CTSW, CD247, CXCL2, FGF2</i>
NK	<i>FDCSP, HSPA5, MGP, CALD1, IGFBP4, COL4A2, PLVAP, TPM2, CALCRL, FBLN1</i>	NKT	<i>RPS27, RPL13, RPS29, RPL34, RPL11, RPS6, RPL18A, RPL23A, RPL3, RPS5</i>
NKT	<i>RPLP1, RPS27, RPS15A, RPS3, IL32, KLRB1, AC092580.4, RARRES3, CRIP1, HOPX</i>	PC	<i>IGLL5, IGJ, HSP90B1, MZB1, PPIB, XBP1, SSR4, SEC11C, LMAN1, DERL3</i>
NKT-p	<i>WFDC2, HIST1H4C, LYPD2, STMN1, KRT19, SERPINB3, AGR2, SCGB1A1, TOP2A, LCN2</i>	Treg	<i>SERPINB3, HIST1H1D, HIST1H1E, HIST1H4C, HIST1H1B, KRT19, STMN1, S100A2, MKI67, TOP2A</i>
nrMa	<i>TIMP1, IFI27, CCL2, CTSL, CTSB, SPP1, MT1G, CXCL3, CXCL5, VCAN</i>		
pDC	<i>IGLL5, IGJ, SSR4, HSP90B1, MZB1, PTGDS, PPP1R14B, XBP1, ITM2C, DERL3</i>		
rMa	<i>RPS2, RPS23, RPS24, RPS3A, RPS11, RPL5, EEF1B2, PPA1, LGALS2, PKIB</i>		
Treg	<i>IL7R, LTB, ZFP36L2, ETS1, SPOCK2, RORA, MAF, ITM2A, IL17A, CD40LG</i>		

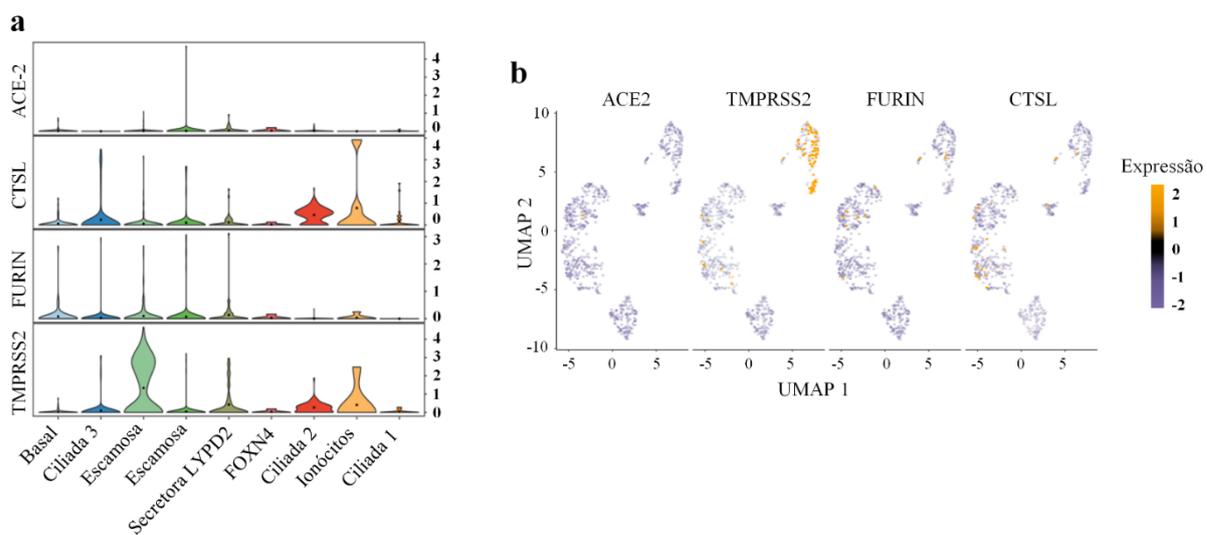
Legenda: Do lado esquerdo do quadro os genes referentes à figura 13a, enquanto que do lado direito estão os genes referentes à figura 13b; Fonte: Elaborado pelo autor.

## APÊNDICE E – Heatmaps dos Genes diferencialmente expressos em células imunológicas das amostras por estágio da doença



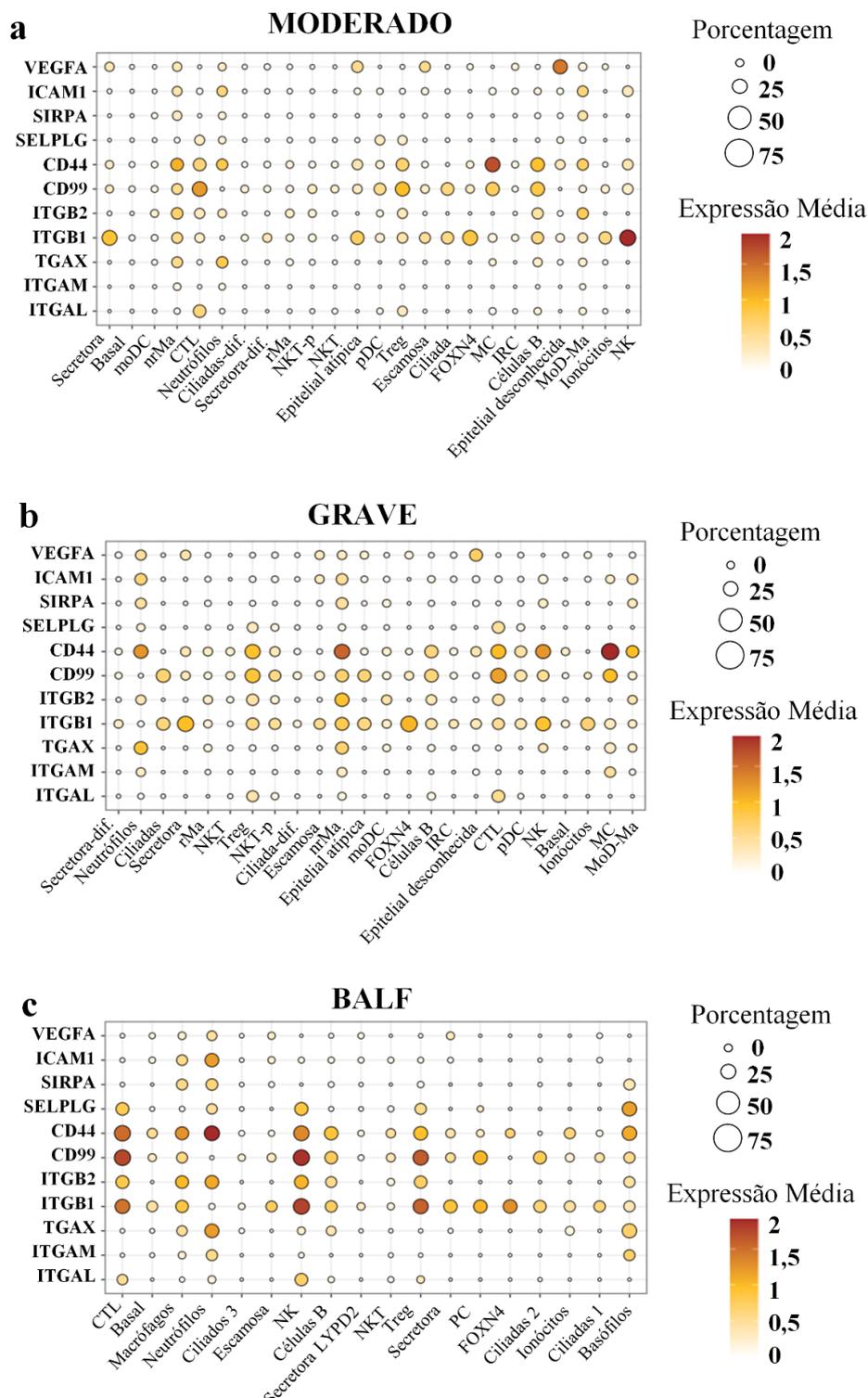
Legenda: Em **a)** o top 10 genes diferencialmente expressos para cada tipo celular imunológico identificado na amostra de NS no grupo controle; em **b)** os principais genes diferencialmente expressos para os tipos celulares imunológicos em NS para o grupo moderado; em **c)** o top 10 genes diferencialmente expressos para os tipos celulares imunológicos em NS no grupo grave; e em **d)** os principais genes expressos para os grupos celulares imunológicos presentes na amostra de BALF em estágio grave da COVID-19; Fonte: Elaborado pelo autor.

## APÊNDICE F: Expressão dos genes facilitadores da acoplagem viral em células do BALF



Legenda: Em **a**) a visualização em formato de plotagem em violino dos genes ACE2, TMPRSS2, FURIN e CTSL para cada tipo celular epitelial presente na amostra de pacientes em estado grave da COVID-19; e em **b**) a expressão dos mesmos genes em formato de visualização UMAP; Fonte: Elaborado pelo autor.

**APÊNDICE G – Gráfico dotplot da expressão dos marcadores de extravasamento celular em amostras de NS e BALF de pacientes infectados com COVID-19 por grau da doença**



Legenda: Em **a**) a expressão dos marcadores para as células epiteliais e imunológicas de amostras de NS de pacientes no estágio moderado da doença; em **b**) a expressão dos mesmos marcadores para as células epiteliais e imunológicas de amostras de NS de pacientes no estágio grave da doença; e em **c**) a expressão desses marcadores para amostras de BALF de pacientes internados em estágio grave da COVID-19; Fonte: Elaborado pelo autor.

