

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA

O INTERACTOMA DE RNA MENSAGEIROS E MICRORNAS EM CARDIOMIÓCITOS
INFECTADOS COM SARS-COV-2.

ALUNA: IVANA SILVA FERREIRA
ORIENTADOR: OTÁVIO CABRAL MARQUES, MSc, PhD

SÃO PAULO

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA

IVANA SILVA FERREIRA

O INTERACTOMA DE RNA MENSAGEIROS E MICRORNAS EM CARDIOMIÓCITOS
INFECTADOS COM SARS-COV-2.

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Imunologia

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Otávio Cabral Marques, MSc, PhD

SÃO PAULO

2021

RESUMO

A atual doença COVID-19 (do inglês, *coronavirus disease 2019*) tornou-se rapidamente uma pandemia, configurando um estado de emergência pública internacional. O vírus causador da doença, denominado síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2) desencadeia manifestações clínicas que variam de casos assintomáticos à síndrome respiratória aguda grave e à morte. Além dos sintomas respiratórios, pacientes com COVID-19 podem apresentar complicações cardíacas, incluindo miocardite viral e arritmias. Embora as respostas isquêmicas e inflamatórias causadas por COVID-19 possam afetar negativamente a função cardíaca, o impacto direto da infecção em cardiomiócitos humanos ainda não é bem compreendido. Muitos pesquisadores estão explorando as alterações moleculares a nível transcricional, porém pouco se sabe sobre os fatores que regulam pós-transcricionalmente a expressão gênica após a infecção. Os microRNAs (miRs) são uma classe de pequenos RNAs não codificantes que regulam pós-transcricionalmente a expressão gênica e apresentam um potencial terapêutico em diversas patologias. Buscamos identificar nesse estudo o perfil específico de expressão de miRs e vias moleculares envolvidas na resposta imune ao SARS-CoV-2 em cardiomiócitos. Realizamos uma abordagem de imunologia sistêmica e integrativa de dados transcriptômicos, objetivando à identificação das redes moleculares reguladas por miRs. Utilizamos a ferramenta NetworkAnalyst 3.0 para a análise de expressão diferencial de dados de *RNA sequencing* (RNAseq) de quatro conjuntos de dados de transcriptoma de cardiomiócitos infectados com SARS-CoV-2. Os read counts foram utilizados para identificação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) através do pipeline DESeq2. Os processos biológicos enriquecidos foram identificados através das ferramentas WebGestalt e EnrichR. Enquanto DEGs up-regulados em todos esses estudos enriqueceram processos biológicos relacionados à resposta imune (ex: ativação de células T, produção de citocinas e regulação da hematopoiese), os down-regulados enriqueceram genes relacionados a desregulação do metabolismo (ex: montagem do complexo NADPH desidrogenase; geração de metabólitos precursores e energia; processo catabólico de pequena molécula) e do sistema muscular. Foram identificados um total de 601 DEGs comuns entre todos os conjuntos de dados. Para a análise do interactoma dos miRs e desses mRNA, focamos em DEGs associados à resposta imune, contração do músculo cardíaco, remodelação da matriz extracelular e coagulação. Utilizando a ferramenta MiRTarBase, identificamos 331 potenciais miRs reguladores dos DEGs de cardiomiócitos infectados. Destes, 19 miRs são potenciais reguladores de genes de resposta imune, 4 miRs associados à contração do músculo cardíaco, 21 associados a matriz extracelular e 6 reguladores de alvos associados à coagulação. Destacamos alguns miRs que potencialmente regulam os genes envolvidos na resposta inflamatória e via de sinalização de interferon do tipo I, como miR-155-5p e os envolvidos com o processo de contração da célula muscular cardíaca como miR-29a-3p, miR-29b-3p e miR-146b-3p. Nossa análise sistêmica e integrativa de miRs-mRNA identificou possíveis redes e vias moleculares reguladoras, revelando potenciais miRs e genes relacionados a resposta imune em cardiomiócitos infectados com SARS-CoV-2. Na última etapa desse projeto realizaremos uma abordagem experimental para avaliarmos a expressão desses miRs e proteínas expressas pelos cardiomiócitos através da análise do microRNAoma e do proteoma das células infectadas com o SARS-CoV-2.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, microRNA, cardiomiócitos infectados.

ABSTRACT

The Coronavirus 2019 (COVID-19) quickly became a pandemic, configuring an international public state of emergency. The virus that causes the disease, called severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) triggers clinical manifestations ranging from asymptomatic infection to severe acute respiratory syndrome and death. In addition to respiratory symptoms, patients with COVID-19 may experience cardiac complications, including viral myocarditis and arrhythmias. Although the ischemic and inflammatory responses caused by COVID-19 can negatively affect cardiac function, the direct impact of the infection on human cardiomyocytes is still not well understood. Many researchers are exploring molecular changes at the transcriptional level, but little is known about the factors that post-transcriptionally regulate gene expression during SARS-CoV-2 infection. MicroRNAs (miRs) are a class of small non-coding RNAs that post-transcriptionally regulate gene expression and have therapeutic potential in several pathologies. We employed a systems and integrative immunology approach by analyzing transcriptomic data, aiming to identify the molecular networks regulated by miRs. We used the NetworkAnalyst 3.0 tool for differential expression analysis of RNA sequencing (RNAseq) data from four public datasets. Read counts were used to identify differentially expressed genes (DEGs) through the DESeq2 pipeline. The enriched biological processes identified using the WebGestalt and EnrichR tools. While up-regulated DEGs across these studies enriched BPs related to the immune response (e.g., T cell activation, cytokine production and regulation of hematopoiesis), the down-regulated DEGs enriched BPs related to metabolic dysregulation (e.g., complex assembly NADPH dehydrogenase; generation of precursor metabolites and energy; small molecule catabolic process) and the muscular system. A total of 601 common DEGs across all datasets were identified. For the interactome analysis of miRs and these common DEGs, we focused on those associated with the immune response, cardiac muscle contraction, extracellular matrix remodeling and thrombosis, using the QUICKgo platform to select BPs while avoiding overlapping category terms. Using the MiRTarBase tool, we identified 331 potential regulatory miRs of SARS-CoV-2 infected cardiomyocytes. Of these, 19 miRs are potential regulators of immune response genes, 4 miRs associated with cardiac muscle contraction, 21 associated with extracellular matrix and 6 target regulators associated with coagulation. Of note, there are miRs that potentially regulate genes involved in the inflammatory response and interferon type I signaling pathway, such as miR-155-5p and those involved in the cardiac muscle cell contraction process, such as miR-29a-3p, miR-29b-3p and miR-146b-3p. Our systems and integrative immunology approach of identified possible miR-mRNA regulatory molecular networks and pathways potentially associated with immune response-related molecules of cardiomyocytes infected with SARS-CoV-2. In the last phase of this project, we will carry out an experimental approach to evaluate the expression of these miRs and proteins by SARS-CoV-2 infected cardiomyocytes through the analysis of their microRNAoma and proteome.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos desenhos experimentais analisados.	24
Tabela 2. Termos ontológicos e seus respectivos números de genes de cada categoria analisada.	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. O mapa produzido pela World Health Organization mostra a expansão do coronavírus pelo mundo desde que foi descoberto na província de Hubei em dezembro de 2019.	10
Figura 2. Fisiopatologia de COVID-19.	13
Figura 3. A imunopatologia de COVID-19.	15
Figura 4. Manifestações extrapulmonares de COVID-19.....	17
Figura 5. Número de notificações, internações, ocupação de UTI e óbitos por fatores de risco das doenças crônicas não transmissíveis nos casos da COVID-19 no estado do Rio de Janeiro, 2020.....	19
Figura 6. Representação em gráfico de barras do número de genes regulados positivamente (Up-Regulated) e negativamente (Down-Regulated) de cada um dos desenhos experimentais.	26
Figura 7. Upset plot para representar o número de DEGs compartilhados entre cada estudo analisados.	27
Figura 8. Circus Plot representando quantos genes de modelos iPSC e ESC são compartilhados entre os desenhos experimentais.	27
Figura 9. Os Volcano plots apresentam os termos enriquecidos pelos genes up e down regulados e representação das vias de resposta imune e contração muscular reguladas positivamente e negativamente.	29
Figura 10. Representação em gráfico de barras do número de genes associados as 4 categorias, regulados positivamente (up-regulados) e negativamente (down-regulados) de cada um dos desenhos experimentais.	30
Figura 11. Circos Plot representando quantos genes de cada categoria apresentavam-se diferencialmente expressos em cada um dos desenhos experimentais.	31
Figura 12. <i>Upset plot</i> para representar o número de DEGs compartilhados entre cada estudo analisado.	32
Figura 13. a) Heatmap apresentando os principais DEGs das categorias de resposta imune e Contração do Músculo Cardíaco (b), e uma análise de enriquecimento funcional dos principais clusters de cada heatmap.....	33
Figura 14. Heatmap apresentando os principais DEGs das categorias de matriz extracelular (a) e coagulação (b), e uma análise de enriquecimento funcional dos principais clusters de cada heatmap.	34
Figura 15. Heatmap apresentando os 40 miRS que potencialmente regulam os DEGs nos experimentos analisados.....	36
Figura 16. Redes de interação entre os miRs geradas através da ferramenta Cytoscape.....	37
Figura 17. Redes de interação entre os miRs e genes alvo geradas através da ferramenta Cytoscape	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ANG II	Angiotensina 2
CD38	Grupo de Diferenciação 38
CD4	Grupo de Diferenciação 4
CD69	Grupo de Diferenciação 69
CD8	Grupo de Diferenciação 8
FC	Fold Change
CM	Cardiomiócitos
COVID-19	<i>Coronavirus Disease-2019</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DEG	Genes Diferencialmente Expressos
GEO	Gene Expression Omnibus
hESC-CMs	Cardiomiócitos Derivados de Celulas Tronco Embrionarias
hiPSC-CMs	Cardiomiócitos Derivados de Celulas Tronco Induzidas
IFN γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
miRs	MicroRNAs
MOI	Razão Entre o Número de Partículas de Vírus e o Número de Células Alvo Presentes em um Espaço Definido
NKG2A	Receptor Para Células Naturais Assassinas (células NK)
PBMCS	Célula Mononuclear do Sangue Periférico
PD1	Receptor de Morte Celular Programada 1
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico Mensageiro
RNA _r	Ácido Ribonucleico Ribossômico
RNA _t	Ácido Ribonucleico Transportador
SDRA	Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
SRAG	Síndromes Respiratórias Agudas Graves
TIM3	Domínio de Mucina-3
TMPRSS2	Serina Protease Transmembranar 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE TABELAS	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	8
1. INTRODUÇÃO	10
1.1 CORONAVIRUS DISEASE-2019 (COVID-19)	10
1.2 IMUNOPATOLOGIA DA COVID-19	12
1.3 COVID-19 E CARDIOPATIAS	16
1.4 ACE2 E O SISTEMA CARDIOVASCULAR NA COVID-19	18
1.5 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E COVID-19	19
2. OBJETIVO GERAL	21
3. METODOLOGIA	21
3.1 Seleção dos conjuntos de dados transcriptômicos de cardiomiócitos	21
3.2 Análise de expressão diferencial	22
3.3 Seleção dos genes analisados	22
3.4 Análise de enriquecimento funcional	23
3.5 Predição dos miRs	23
3.6 Representação dos dados	24
3.7 Reconstrução de redes moleculares	24
4. RESULTADOS	24
4.1 Reanálise e expressão diferencial entre os datasets.	24
4.3 Identificação dos potenciais miRs associados aos CM infectados com SARS-CoV-2	35
5. DISCUSSÃO	39
6. PLANOS FUTUROS	42
7. ATIVIDADES COMPLEMENTARES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO	43
8. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 CORONAVIRUS DISEASE-2019 (COVID-19)

Em 30 de janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o surto de infecção pelo novo coronavírus, SARS-CoV-2, como emergência de saúde pública de interesse internacional e a seguir nomeou a doença de *Coronavirus Disease-2019* (COVID-19). Em 11 de março de 2020, a COVID-19 foi classificada como uma pandemia quando o número de casos confirmados em todo o mundo chegou a 118.319, sendo destes 4.292 óbitos (“Organização Mundial de Saúde”, [s.d.]). Laboratórios de pesquisa em todo o mundo têm trabalhado incansavelmente para obtenção, o quanto antes, de estratégias de imunoprofilaxia e de terapêutica para a infecção causada pelo vírus SARS-CoV-2. Até o momento, já foram diagnosticadas mais de 260 milhões de pessoas infectadas com SARS-CoV-2 em todo o mundo e mais de 5,2 milhões de mortes já foram relatadas (“Organização Mundial de Saúde”, [s.d.])**(Figura 1)**.

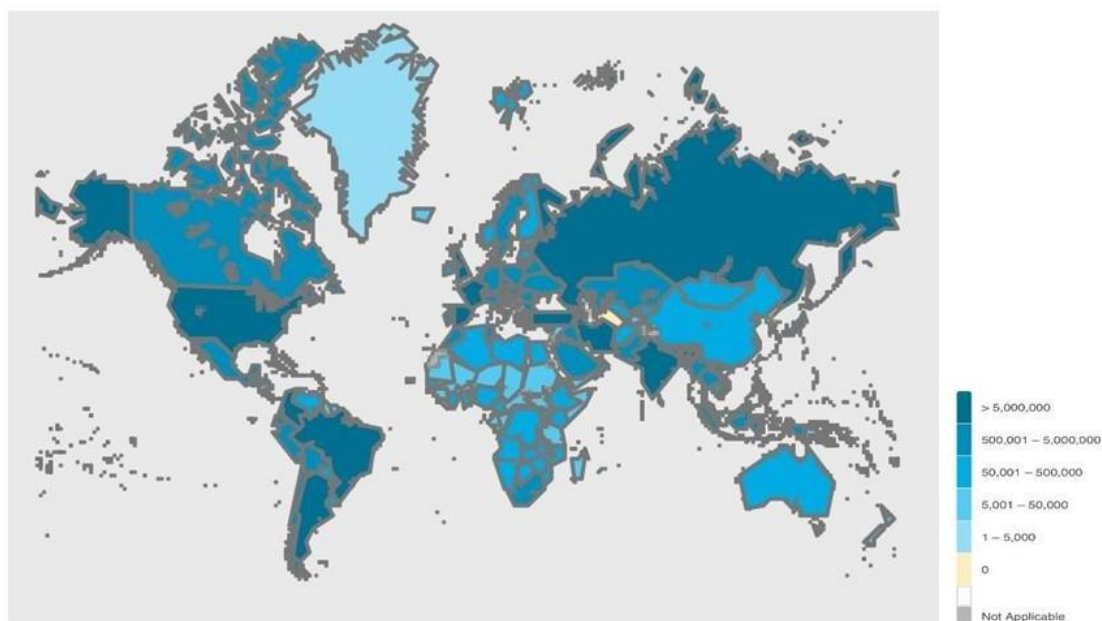


Figura 1. O mapa produzido pela World Health Organization mostra a expansão do coronavírus pelo mundo desde que foi descoberto na província de Hubei em dezembro de 2019.

Epidemiologistas alertam que a descoberta de novas variantes em diversos países potencializa o risco de crescimento acentuado dos índices de morbidade e mortalidade pelo vírus (CHALLEN et al., 2021). Até o presente momento, o Brasil já relatou mais de 21 milhões de casos

de infecção pelo novo coronavírus que resultaram em pouco mais de 605 mil mortes por COVID-19, conforme divulgado pela OMS.

A nomenclatura adotada para esse vírus foi estabelecida a partir de um estudo que utilizou amostras da secreção broncoalveolar de paciente com COVID-19, em 2019, por pesquisadores de Wuhan. Após a análise filogenética dos genomas, o SARS-CoV-2 foi incluído no gênero betacoronavírus da subfamília Orthocoronavirinae pertencente à família dos Coronaviridae compartilhando 89,1% da identidade da sequência do genoma com o SARS-CoV (agente causal dos surtos de SARS em 2002 e 2003, na província de Guangdong, China) e também uma grande similaridade com o MERS-CoV (reconhecido como agente etiológico da MERS, no Oriente Médio) (WU et al., 2020). Os coronavírus foram assim batizados em virtude de sua aparência semelhante a coroa solar, que reflete suas glicoproteínas de superfície quando observadas à microscopia eletrônica (TYRRELL et al., 1975).

O vírus possui genoma de RNA não segmentado, fita simples, codificando quatro proteínas principais: glicoproteína espicular (S) que dá ao vírus sua aparência característica de coroa, proteína do envelope (E), glicoproteína da membrana (M) e proteína do nucleocapsídeo (N) que envolve o RNA viral. A proteína S (de *spike*, espícula) desempenha um papel primordial para a entrada do vírus nas células, pois é ela que reconhece o receptor ACE2 (do inglês, *angiotensin-converting enzyme 2*; enzima conversora de angiotensina 2) (HOFFMANN et al., 2020) uma proteína transmembrana expressa na superfície de diversas células do corpo, como o epitélio do sistema respiratório, coração, rim, fígado e intestino (SUNGNAK et al., 2020). Juntamente com essa ligação, proteases, em especial a TMPRSS2 (do inglês, *transmembrane serine protease 2*; serino protease transmembranar 2), clivam a proteína S o que permite a fusão do vírus com a célula facilitando sua entrada (**Figura 2**) (Gupta et al. Nat Med. 2020;26:1017–1032.)

Após as etapas de adesão e penetração ocorre a liberação do material genético (RNA) do vírus no citoplasma da célula hospedeira. (HOFFMANN et al., 2020). O vírus carrega consigo importantes proteínas virais necessárias para sua sobrevivência inicial na célula alvo, iniciando o processo de replicação viral. Diferentemente do DNA, o RNA é uma estrutura genética instável, e por isso esse tipo de vírus é mais suscetível a mutações e, conseqüentemente, ao surgimento novas variantes (HOFFMANN et al., 2020).

1.2 IMUNOPATOLOGIA DA COVID-19

O SARS-CoV-2, da mesma forma que outros vírus respiratórios, é transmitido principalmente por três modos: contato direto com uma pessoa infectada, gotículas respiratórias expelidas contendo vírus ou por aerossol que são gotículas respiratórias menores (ROTHAN; BYRAREDDY, 2020). A apresentação clínica da doença demonstra sintomas predominantemente pulmonares e característicos de resfriados comuns, incluindo tosse, falta de ar e fadiga (HUANG et al., 2020). Em relação aos dados laboratoriais, nota-se uma diminuição da contagem de leucócitos e linfócitos (leucopenia e linfopenia, respectivamente) e um aumento no número de neutrófilos (neutrofilia) característico de processos inflamatórios (YANG et al., 2020). A doença pode evoluir para casos mais graves como pneumonia e até quadros sistêmicos caracterizados por síndrome respiratória aguda severa, podendo ocorrer, concomitantemente, coagulopatias e distúrbios neurológicos. Uma característica marcante dos casos graves é a inflamação sistêmica grave, caracterizada por ocorrer uma "tempestade de citocinas", que consiste em uma produção excessiva de citocinas e mediadores inflamatórios ou pró-inflamatórias, como IL1, IL-6 IL-10, IFN γ , TNF- α etc (YANG et al., 2020).

1.2.1 Aumento da produção de citocinas

Uma vez que o patógeno (no caso estuda o vírus SARS-CoV-2) se liga ao receptor de reconhecimento de padrão presente na célula, esta é ativada desencadeando uma cascata de sinalização que resulta na síntese e liberação de citocinas, principalmente pró-inflamatórias. Essas citocinas são fundamentais, atuando como sinais para o sistema imunológico, regulando a duração e a intensidade da resposta imunológica. Porém, níveis elevados dessas citocinas podem causar danos aos tecidos em que estão atuando. (MARES et al., 2008).

Níveis plasmáticos aumentados de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), fator estimulador de colônia de macrófagos de granulócitos (GM-CSF), proteína induzível por interferon-10 (IP10), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1), proteína de inflamação de macrófagos-1 α , IFN- γ e TNF- α , foram encontrados em pacientes com COVID-19, principalmente em casos mais graves da doença, provocando a chamada “tempestade de citocinas” (HUANG et al., 2020) **Figura 2**.

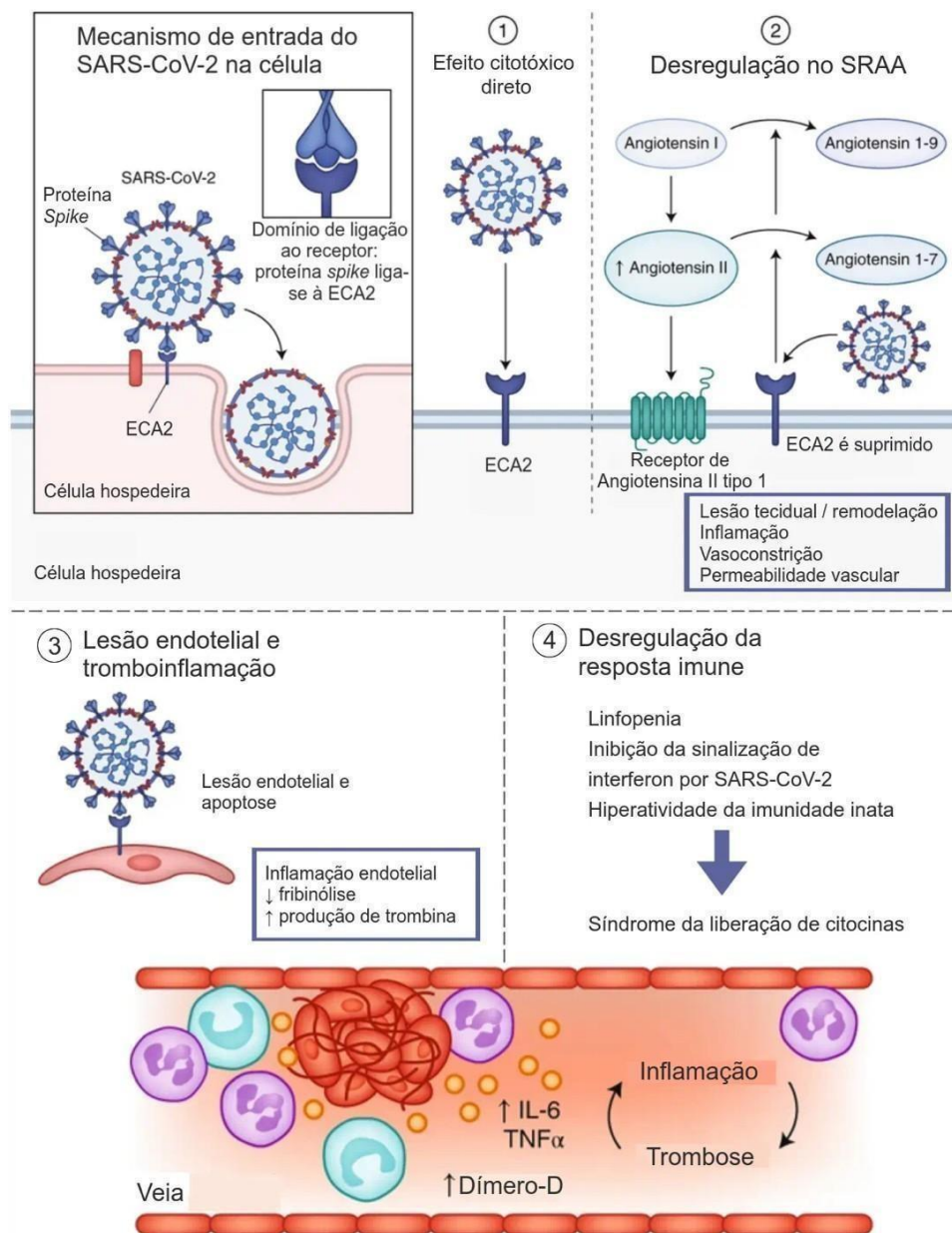


Figura 2. Fisiopatologia de COVID-19. O SARS-CoV-2 entra nas células hospedeiras por meio da interação de sua proteína spike com o receptor de entrada ACE2 na presença de TMPRSS2 (extrema esquerda). Os mecanismos propostos para COVID-19 causados por infecção com SARS-CoV-2 incluem (1) dano celular direto mediado por vírus; (2) desregulação do SRAA como consequência da regulação negativa de ACE2 relacionada à entrada viral, o que leva à diminuição da clivagem da angiotensina I e angiotensina II; (3) dano às células endoteliais e tromboinflamação; e (4) desregulação da resposta imune e hiperinflamação causada por inibição da sinalização do interferon pelo vírus, depleção de células T e produção de citocinas pró-inflamatórias, particularmente IL-6 e TNF α . (Gupta et al. Nat Med. 2020;26:1017–1032.).

Junto com a tempestade de citocinas, uma série de alterações celulares ocorrem durante a infecção pelo SARS-CoV-2, conforme apresentado a seguir.

1.2.2 Anormalidades de granulócitos e monócitos

Também foi observado anormalidades no número de granulócitos e monócitos em pacientes com COVID-19. Observa-se uma neutrofilia e uma proporção elevada de neutrófilos/linfócitos - geralmente indicadores importantes para casos graves e pior prognóstico (LIPPI; PLEBANI, 2020; ZHANG et al., 2020). Sobre o aumento exacerbado de neutrófilos, podemos teorizar uma estreita associação com a linfopenia. Sabe-se que a infecção com microorganismos pode induzir diretamente o recrutamento de neutrófilos para os locais dos tecidos infectados (DESHMUKH et al., 2014; SMITH; TRINCHIERI, 2018) Assim, podemos dizer que a infecção por SARS-CoV-2 compromete o indivíduo primeiro por apresentar a linfopenia, o que deixa o paciente mais susceptível à outras infecções, e ao mesmo tempo promovendo ainda mais a ativação e o recrutamento de neutrófilos para os tecidos atingidos para compensar.

1.2.3 Linfopenia associada a COVID-19

A linfopenia é uma característica marcante em pacientes com COVID-19, especialmente em casos graves. (LIPPI; PLEBANI, 2020; TAN et al., 2020a). Foi observado uma forte redução no número de linfócitos T CD4+ e T CD8+, células NK e linfócitos B (TAN et al., 2020b; XU et al., 2020). Qin et al. relataram que a porcentagem de células T de memória (CD3+ CD4+ CD45RO+) também estão diminuídas em casos graves em comparação com casos não graves (QIN et al., 2020). Esses dados indicam que a linfopenia pode ser usada como um indicador da gravidade da doença e do prognóstico de pacientes com COVID-19.

1.2.4 Ativação anormal dos linfócitos T e B

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) após serem estimuladas com proteína do nucleocapsídeo (NP) recombinante e o RBD (do inglês, receptor-binding domain; domínio de ligação ao receptor) da proteína Spike do vírus, foram analisadas por citometria de fluxo e observou-se um aumento de 2 vezes no número de células T secretoras de IFN- γ , fator de necrose tumoral (TNF) - α e interleucina (IL) -2 no grupo que recebeu alta comparado ao de doadores saudáveis. (NI et al., 2020). Linfócitos T CD4+ de pacientes infectados com SARS-CoV-2 apresentaram maior expressão de CD69, CD38 e CD44 em comparação com controles saudáveis, o que indica que estas células estavam ativadas. Também foi possível observar, principalmente em pacientes graves, uma maior expressão da molécula OX40, que

desempenha um papel importante na promoção da expansão clonal e indução da produção de

várias citosinas inflamatórias (ZHOU et al., 2020). Por outro lado, Diao et al. mostraram que pacientes que tiveram a forma grave da doença e foram internados na UTI apresentaram redução drástica de linfócitos T CD4+ e T CD8+, além de um fenótipo de exaustão na maioria dos linfócitos presentes (DIAO et al., 2020). Além disso, ZHAO et al., 2020 mostraram que durante a infecção viral por SARS-CoV-2 os níveis de anticorpos totais, seguidos IgG aumentaram descontroladamente, principalmente, no 15º dia da doença. De acordo com (ZHANG et al., 2020) os níveis elevados de IgG foram frequentemente encontrados em pacientes com doença grave, indicando que, além da eficácia antiviral, a resposta de anticorpos pode estar associada com danos aos tecidos.

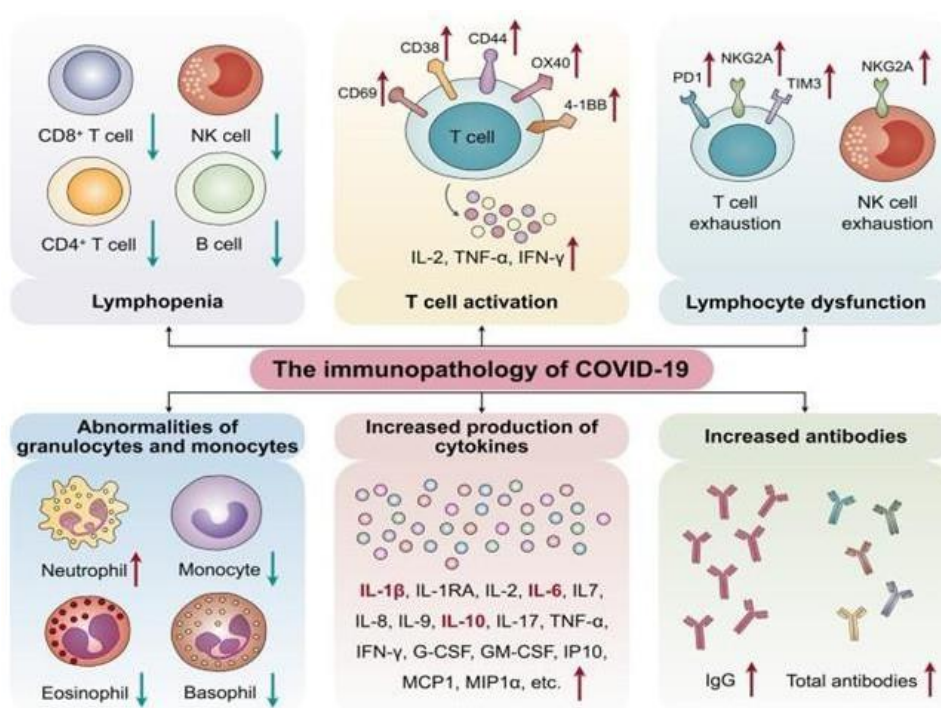


Figura 3. A imunopatologia de COVID-19. Os padrões imunológicos de COVID-19 incluem linfopenia, ativação e disfunção de linfócitos, anormalidades de granulócitos e monócitos, aumento da produção de citocinas e aumento de anticorpos. A linfopenia é uma característica fundamental dos pacientes com COVID-19, especialmente em casos graves. CD69, CD38 e CD44 são altamente expressos em CD4+ e CD8+ células T de pacientes e células T específicas de vírus de casos graves exibem um fenótipo de memória central com altos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-2. No entanto, os linfócitos mostram um fenótipo de exaustão com proteína-1 de morte celular programada (PD1), domínio de imunoglobulina de células T e domínio de mucina-3 (TIM3) e supra regulação do receptor de células assassinas semelhante à lectina da subfamília C do membro 1 (NKG2A). Os níveis de neutrófilos são significativamente mais elevados em pacientes graves, enquanto a porcentagem de eosinófilos, basófilos e monócitos é reduzida. O aumento da produção de citocinas, especialmente de IL-1 β , IL-6 e IL-10, é outra característica chave da COVID-19 grave. Os níveis de IgG também estão aumentados e há um título mais alto de anticorpos totais (Yang, L., Liu, S., Liu, J. et al. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. Sig Transduct Target Ther 5, 128 (2020).

1.2.5 Fatores que influenciam a resposta imune na COVID-19

As condições sistêmicas dos indivíduos infectados estão relacionadas à gravidade das manifestações clínicas de COVID-19. Condições como diabetes, obesidade, hipertensão, doenças cardiovasculares e renais comprometem a eficácia da resposta imune inata e adaptativa do paciente, resultando em maior dificuldade no combate à infecção viral pelo sistema imunológico e, conseqüentemente, maior possibilidade de óbito (SINGH; GUPTA; MISRA, 2020). Estudos mostram que indivíduos idosos (60 anos ou mais) apresentam maior risco de agravamento da COVID-19 em comparação a indivíduos jovens, porque seu sistema imunológico apresenta-se em imunosenescência, que é caracterizada pela diminuição das funções do sistema imunológico à medida que se envelhece (HUANG et al., 2020). Idosos apresentam uma diminuição fisiológica das células de Langerhans da pele, que diminuem cerca de 70% durante o início da fase adulta até à velhice (JING LOO; BURROWS, 2004). Também foi relatado uma atrofia fisiológica do timo de indivíduos com mais de 60 anos de idade, o que acomete as atividades dos linfócitos timo-dependentes (MACEDO et al., 2018). Foi visto que o sistema imunológico de homens e mulheres respondem de forma diferente durante a infecção, principalmente em relação à quimiotaxia de neutrófilos que é maior nos homens do que em mulheres (FREIRE et al., 2020).

1.3 COVID-19 E CARDIOPATIAS

Dado que os fatores de entrada do SARS-CoV-2, tais como a ACE2 e a TMPRSS2 são expressos em múltiplos tecidos incluindo vias aéreas, córnea, esôfago, íleo, cólon, fígado, vesícula biliar, coração, rim e testículo, a invasão viral direta em diferentes tecidos é um evento comumente visto em pacientes infectados. Além disso, estudos mostraram que TMPRSS2 foi expresso apenas em um subconjunto de células que expressam ACE2, sugerindo que o vírus pode usar vias alternativas (SUNGNAK et al., 2020). Sabe-se que a COVID-19 é uma doença multisistêmica com diversas manifestações extrapulmonares, incluindo alterações renais, gastrointestinais, hepáticas, hematológicas, doenças neurológicas, complicações dermatológicas e cardiovasculares como miocardite por SARS-CoV-2 (**Figura 4**) (GUPTA et al., 2020). Estudos recentes mostram que as complicações cardíacas evidenciadas nos pacientes com COVID-19 resultam de vários mecanismos, que vão desde lesão cardíaca direta pelo vírus até complicações secundárias à resposta inflamatória e trombótica desencadeada pela infecção, que podem causar arritmias, insuficiência cardíaca, síndrome de Takotsubo (ST), miocardite e choque (CLERKIN et al., 2020).

Essas lesões cardíacas podem ser mediadas por isquemia e cascatas inflamatórias (SHI et al., 2020). O relatório do Conselho Nacional de Saúde da China relatou que quase 12% dos pacientes sem doença cardiovascular conhecida apresentaram níveis elevados de

troponina ou parada cardíaca durante a hospitalização por COVID-19 (GUAN et al., 2020). Pacientes com fatores de risco cardiovascular como idade avançada, sedentarismo, diabetes e hipertensão são mais comumente afetados por dano ao sistema cardiovascular decorrente da COVID-19 (HO et al., 2020), mas a etiologia da lesão cardíaca em COVID-19 permanece obscura. Embora muitos estudos venham explorando as alterações moleculares a nível transcricional, pouco se sabe sobre os fatores que regulam pós-transcricionalmente a expressão gênica após a infecção.

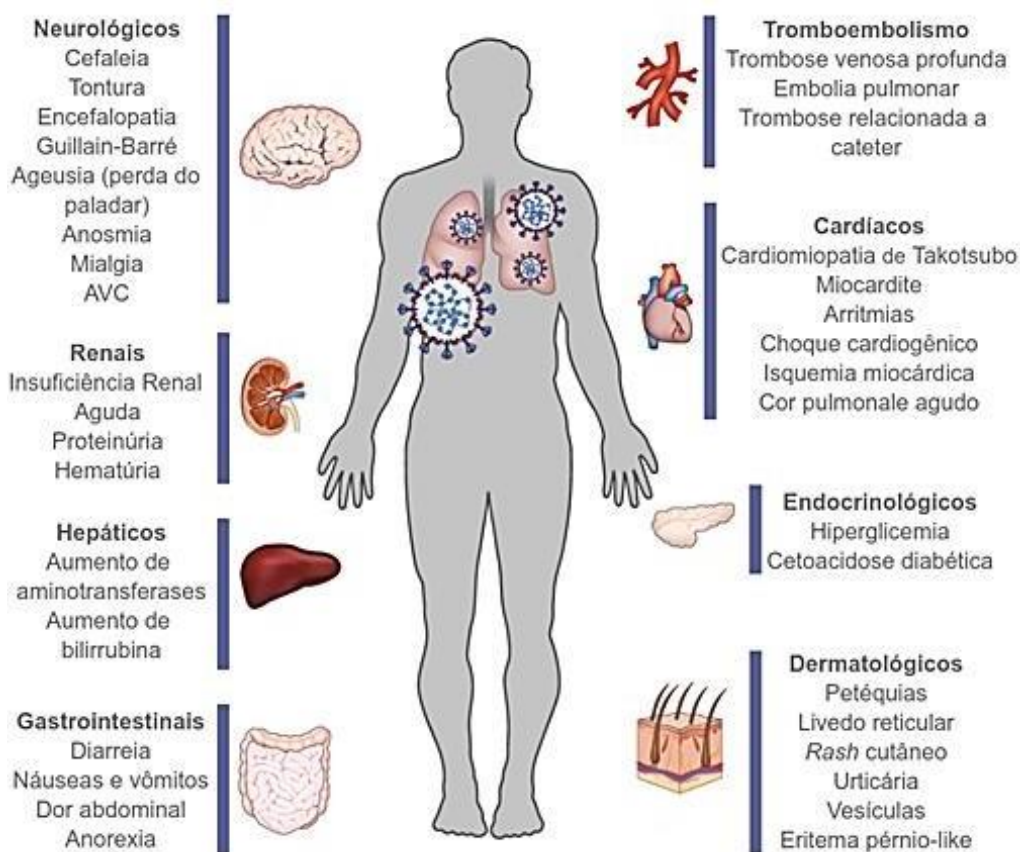


Figura 4. Manifestações extrapulmonares de COVID-19. As manifestações pulmonares de COVID-19 causadas por infecção com SARS-CoV-2, incluindo pneumonia e (SDRA), são bem conhecidas. Além disso, COVID-19 é associado a efeitos deletérios em muitos outros sistemas de órgãos como, incluindo alterações neurológicas, renais, hepáticas, gastrointestinais, venosas, cardíacas, endócrinas e dermatológicas. As manifestações extrapulmonares de COVID-19 são resumidas aqui. (Gupta et al. Nat Med. 2020;26:1017–1032.).

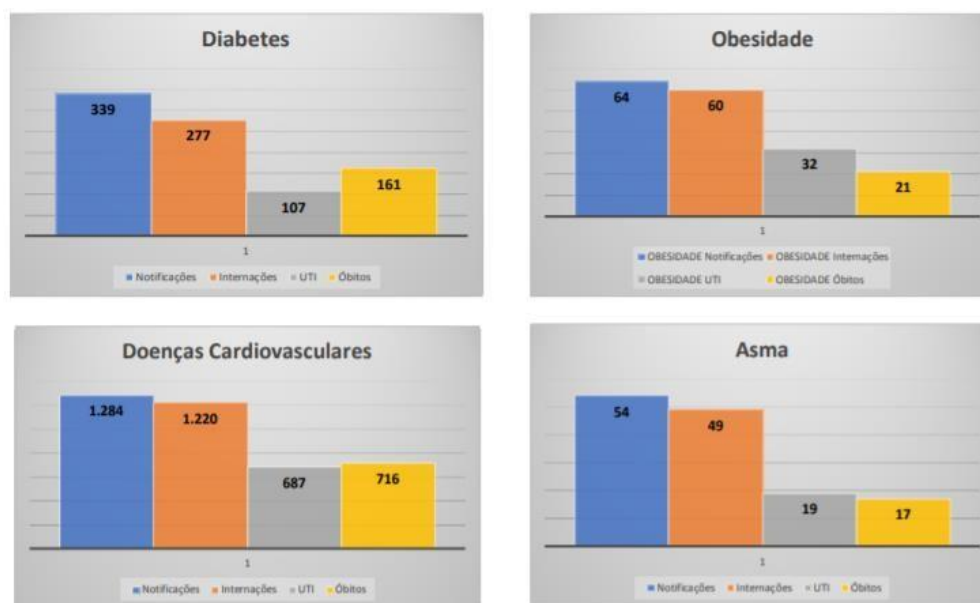
1.4 ACE2 E O SISTEMA CARDIOVASCULAR NA COVID-19

ACE2 é uma enzima que está expressa na superfície das células de vários órgãos, incluindo o coração e nada mais é do que um homólogo da já conhecida ACE, responsável pela regulação da pressão arterial dentro do Sistema Renina-Angiotensina. (JIANG et al., 2014)(CRACKOWER et al., 2002). ACE2 promove vasodilatação e, conseqüentemente, diminui a pressão arterial tendo como função biológica proteger o organismo através da redução de concentração de Angiotensina II (ANG II). Está relacionada à patogênese de várias desordens cardiovasculares, como por exemplo, hipertensão, arteriosclerose e infarto do miocárdio. (CRACKOWER et al., 2002)13.

Estudos demonstraram que assim que o SARS-COV-2 se liga à ACE2 ocorre a endocitose e a redução de expressão da proteína, impedindo que ACE2 execute sua função normal de regular a sinalização de ANG II, o que leva a uma lesão tecidual no coração, pulmão, entre outros órgãos. (JIANG et al., 2014).

Doenças crônicas como hipertensão, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica e obesidade podem desencadear uma série de eventos bioquímicos que levam a um aumento na expressão de ACE2, e por isso leva a crer que pacientes que possuem doenças crônicas tenham uma quantidade maior de células afetadas pelo vírus SARS-CoV-2 e, conseqüentemente, um quadro mais grave da doença (SINGH; GUPTA; MISRA, 2020).

A **figura 5** mostra dados gerados a partir do Sistema de Vigilância Epidemiológico referente às Síndromes Respiratórias Agudas Graves (SRAG), no período de 1º de janeiro a 11 de maio de 2020 no estado do Rio de Janeiro. Pode-se notar que dentre os indivíduos acometidos pela COVID-19 e portadores de doenças cardiovasculares 55,7% vieram a óbito.



Fonte: SIVEP/tabnet SES-RJ (01/01 a 11/0/2020).

Figura 5. Número de notificações, internações, ocupação de UTI e óbitos por fatores de risco das doenças crônicas não transmissíveis nos casos da COVID-19 no estado do Rio de Janeiro, 2020. (SIVEP/tabnet SES-RJ (01/01 a 11/0/2020).

1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DE CARDIOMIÓCITOS

A célula muscular cardíaca, também chamada de cardiomiócitos (CMs), desempenha papel fundamental para a manutenção da vida, uma vez que é a responsável pela atividade elétrica e contrátil do coração. (PFEIFFER et al., 2014) Portanto, a maioria dos distúrbios cardíacos se deve à redução da atividade dos CMs. São altamente diferenciadas e param de proliferar já nos primeiros anos de vida fazendo com que o crescimento do coração seja consequência da hipertrofia e não da hiperplasia celular (SCORSIN; GUARITA-SOUZA, 2001). Tecidos do coração são muitas vezes escassos, limitando assim os estudos *in vivo* sobre células cardíacas (KOLANOWSKI; ANTOS; GUAN, 2017), com isso o uso de tecnologias com células-tronco é um grande avanço para as pesquisas, com imenso potencial para várias aplicações (ZHANG et al., 2013). Cardiomiócitos humanos primários obtidos através de biopsia representariam um excelente modelo para o estudo de infecções cardíacas, porém é uma técnica invasiva e essas células possuem baixo potencial de proliferação *in vitro*, o que reduziria o número de amostras da pesquisa (KÜHN et al., 2007). Por isso, modelos celulares derivados de células tronco vem ganhando destaque, dentre eles, destacam-se as células hESC e iPSC para os estudos de cardiomiócitos *in vitro*. Apesar de ESC (do inglês, embryonic stem cells; células tronco embrionárias) serem consideradas padrão-ouro para a diferenciação em outros tipos celulares, o seu uso esbarra em questões éticas e de rejeição imunológica (ROBERTSON, 2001). Nesse

sentido, derivados de iPSC (do inglês, induced pluripotent stem cells; células tronco pluripotentes induzidas) são altamente investigados e mostraram ser capazes de se diferenciarem em cardiomiócitos ritmicamente contráteis (LAFLAMME et al., 2007). O desafio agora é obter CMs derivados de iPSC semelhantes aos CMs humanos primários (KOLANOWSKI; ANTOS; GUAN, 2017).

1.6 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA E COVID-19

O genoma humano codifica uma ampla gama de tipos de RNAs, tais como RNA mensageiro (RNAm), RNA transportador (RNAt), RNA ribossomal (RNAr) e os microRNAs (miRs). Descobertos pela primeira vez em 1993 por Lee et al. (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993), os miRs são um grupo de pequenos RNAs, não codificadores de proteínas ou oligopeptídeos, com aproximadamente 19-25 nucleotídeos de extensão (KIM, 2005). São conhecidos e ganharam destaque por sua habilidade em modular pós-transcricionalmente uma enorme rede de genes através da degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvo (RNAm) (AMBROS, 2004; BEREZIKOV et al., 2005). Para dimensionar sua importância, estima-se que os miRs regulem cerca de 1/3 da expressão gênica global em mamíferos (MATTICK; MAKUNIN, 2006). A expressão dos miRs se apresenta desregulada em diversos processos patológicos, incluindo infecções virais, e com isso oferecem uma visão única das vias celulares associadas à replicação, patogênese do vírus e respostas antivirais do hospedeiro.

O mecanismo de ação dos miRs envolvem a modulação da expressão gênica através da ligação de seus nucleotídeos aos do RNA mensageiro (RNAm)-alvo. Essa ligação impossibilita que os ribossomos consigam traduzir a informação genética contida no RNAm e isso leva a

diminuição da síntese proteica do gene alvo sem impactar nos níveis correspondentes de RNAm (BEREZIKOV et al., 2005). A interação miR-RNAm, entretanto, não precisa ser necessariamente perfeita, ou seja, nem todos os nucleotídeos do miR precisam estar ligados aoRNAm. Normalmente em mamíferos essa ligação é imperfeita e um único miR pode regular centenas de genes-alvo diferentes (KIM, 2005).

Os vírus de RNA representam a causa predominante de muitas doenças virais clinicamente relevantes em humanos (HOLMES; GRENFELL, 2009). Entre as várias vantagens evolutivas adquiridas pelos vírus de RNA, prevalece a capacidade de usurpar a maquinaria celular do hospedeiro e evitar as respostas imunes antivirais. Em infecções virais, os miRs podem ter como alvo os genomas de vírus de RNA para controlar a produção de proteínas virais, a replicação e modificar a patogênese viral. Esta infecção pode afetar a regulação positiva ou negativa de miRs da célula hospedeira infectada, causando modificações no transcriptoma dessa célula (TROBAUGH et al., 2014). No caso do SARS-CoV-2, existem vários mecanismos que fariam os miRs impactar o vírus, como interferir na replicação viral, tradução e até mesmo modular a expressão do hospedeiro (ALAM; LIPOVICH, 2021). Compreender o papel dos miRs durante a infecção viral pode levar à identificação de novos mecanismos que bloqueie a replicação do vírus de RNA ou a regulação específica das células do hospedeiro.

2. OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar potenciais microRNAs que desregulam molecularmente os cardiomiócitos infectados com SARS CoV 2. Para isso, no tocante a esse exame de qualificação, os objetivos específicos foram:

- 2.1) Caracterizar a intercessão transcricional (DEGs comuns) dos estudos GSE150392, GSE151879, GSE156754 e GSE162736 de cardiomiócitos
- 2.2) Caracterizar o perfil de expressão de microRNAs em cardiomiócitos, diferenciados a partir de células tronco, durante a infecção por SARS CoV 2.
- 2.3) Eleger possíveis genes alvo para os principais microRNAs encontrados, a partir de análises computacionais.
- 2.4) Estudar as possíveis consequências funcionais associadas a regulação desses genes alvo, a partir da análise computacional das redes de interações moleculares (interactomas) de RNA mensageiros e microRNAs.

3. METODOLOGIA

3.1 Seleção dos conjuntos de dados transcriptômicos de cardiomiócitos

Perfis de expressão por sequenciamento de alto rendimento (publicados até 09/03/2021) foram obtidos do banco de dados GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (EDGAR, 2002) com a seguinte estratégia de pesquisa: SAR-CoV-2 AND cardiomyocytes. Após essa pesquisa, resgatamos quatro conjuntos de dados, que incluíam experimentos realizados com cardiomiócitos primários, cardiomiócitos derivados de células iPSC (células tronco pluripotente induzidas) e cardiomiócitos derivados de células hESC (células tronco embrionárias). Os conjuntos de dados GSE150392 (SHARMA et al., 2020), GSE151879 (CHEN et al., 2020), GSE156754 (PEREZ-BERMEJO et al., 2021) e GSE162736 (MARCHIANO et al., 2021) foram incluídos no presente estudo. Ao final da seleção foram incluídas 42 amostras tratadas com SARS-CoV-2 e 36 amostras controle.

GSE150392: cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas por humanos (hiPSC-CMs) infectados com SARS-CoV-2. Utilizaram 6 amostras (3 amostras infectadas com SARS-CoV-2 e 3 amostras controle).

GSE151879: Cardiomiócitos derivados de hESC (hESC-CMs), cardiomiócitos primários de humanos adultos. Utilizaram 6 amostras de hESC (3 amostras infectadas com SARS-CoV-2 e 3 amostras controle) e 6 amostras de cardiomiócitos humanos adultos (3 amostras infectas com SARS-CoV-2 e 3 amostras controle).

GSE156754: cardiomiócitos derivados de iPSC foram infectados com SARS-CoV-2 e comparados com células não infectadas 48 horas após a infecção, em várias multiplicidades de infecção. Utilizaram 12 amostras (9 amostras infectadas com SARS-CoV-2 e 3 amostras controle).

GSE162736: ESC diferenciados em cardiomiócitos infectados com SARS-CoV-2 em comparação com amostras controle e cardiomiócitos diferenciados com iPSC, infectados com SARS-CoV-2 em comparação com o amostras controle. Utilizaram 48 amostras (24 amostras infectadas com SARS-CoV-2 e 24 amostras controle).

3.2 Análise de expressão diferencial

Utilizamos a ferramenta online *NetworkAnalyst* 3.0 (<https://www.networkanalyst.ca/>) (ZHOU et al., 2019) para identificar os DEGs entre as células infectadas e grupo controle. Cada conjunto de dados individual foi transformado em LOG2 e o pacote *DESeq2* foi utilizado para identificar os DEGs. Aplicamos um *cutoff* de *fold change* (FC) de 2 e *p*-ajustado < 0.05.

3.3 Seleção dos genes analisados

A fim de investigar os genes associados à resposta imune, contração do músculo cardíaco, remodelação da matriz extracelular e coagulação, nós selecionamos termos ontológicos através da plataforma QUICKgo (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/>). Foram incluídos nessa análise os genes dos seguintes termos: Inflammatory response (GO:0006954), Cytokine activation (GO:0005125), Cytokine binding GO:0019955), Cytokine receptor interaction (GO:0090722), Viral process (GO:0016032) smooth muscle

contraction (GO:0006939) cardiac conduction (GO:0061337) muscle contraction (GO:0006936) striated muscle contraction (GO:0006941) extracellular matrix organization (GO:0030198) Integrin activation (GO:0033622) Thromboembolism. (GO:0005577 GO:0030168 GO:0007596 GO:0070527) Subdividimos esses termos em 4 categorias: Os termos Inflammatory response, Cytokine activation, Cytokine binding, Cytokine receptor interaction e Viral process, foram agrupados na categoria 1 classificada como resposta imune, o qual resultou em 1280 genes após retirada das duplicatas. Os termos smooth muscle contraction, cardiac conduction, muscle contraction e striated muscle contraction, foram agrupados na categoria 2 classificada como contração do músculo cardíaco, a qual resultou em 282 genes após retirada das duplicatas. Os termos extracellular matrix organization e Integrin activation foram agrupados na categoria 3 classificada como remodelação da matriz extracelular, a qual resultou em 342 genes após retirada das duplicatas. Os termos fibrinogen complex, platelet activation, blood coagulation e platelet aggregation foram agrupados na categoria 4 classificada como coagulação, a qual resultou em 419 genes após retirada das duplicatas.

3.4 Análise de enriquecimento funcional

Os genes diferencialmente expressos de cada categoria foram analisados na ferramenta *Enrichr* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) (KULESHOV et al., 2016). Foram consideradas para representação os termos que apresentaram $P < 0,05$. Além disso, também utilizamos a ferramenta *WebGestalt*, considerando os termos como enriquecidos quando apresentavam $p < 0.05$ e combined score > 10 . Os dados gerados pelo *Webgestalt* e do enriquecimento gerado via Reactome Pathway Database foram representados através de um *volcano plot* usando o pacote do R *clusterProfiler* (YU et al., 2012) para obter gráficos de pontos de termos enriquecidos associados aos genes.

3.5 Predição dos miRs

A identificação dos genes alvos dos miRs foi feita através do banco de dados de alvos de miRs *miRTarBase 2017* (CHOU et al., 2018), considerando apenas as interações verificadas pelo método de *reporter assays*. Selecionamos a plataforma do *miRTarBase* devido aos seus diferentes métodos de validação de interação entre mRNAs e miRs,

variando de forte a fraca evidência de interação, sendo o “*reporter assays*” o método com evidência mais forte de interação miR-gene alvo.

3.6 Visualização dos dados

Para representação do número de DEGs utilizamos a ferramenta GraphPad Prisma v.8. Para representação dos genes diferencialmente expressos foram gerados *bubble* *heatmaps* através da ferramenta Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>) (STARRUSS et al., 2014). Os genes compartilhados entre datasets e os genes pertencentes a cada uma das 4 categorias foram representados através de um *Circos plot* (<http://circos.ca/>) (KRZYWINSKI et al., 2009). Além disso os genes compartilhados entre cada dataset também foram representados através de um *Upset plot* utilizando a ferramenta *Intervene* (<https://asntech.shinyapps.io/intervene/>).

3.7 Reconstrução de redes moleculares

As redes de interação miRs-miRs e miRs-Alvo foram geradas através da ferramenta Cytoscape versão 3.7.124.

4. RESULTADOS

4.1 Análise integrativa da expressão gênica diferencial entre os datasets.

A fim de obter novos *insights* a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos com a infecção por SARS-CoV-2 em cardiomiócitos, fizemos uma análise integrativa de quatro conjunto de dados (GSE150392, GSE151879, GSE156754 e GSE162736) obtidos do banco de dados GEO. Estes estudos realizaram diferentes desenhos experimentais utilizando cardiomiócitos primários humanos, cardiomiócitos derivados de células tronco embrionárias humanas (hESCs-CMs) e cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes (hiPSC-CMs). Cada um desses conjuntos de dados contava com diferentes MOIs (do inglês, *multiplicity of Infection*; que é a razão entre o número de partículas de vírus e o número de células alvo presentes em um espaço definido) e diferentes tempos de exposição ao vírus. A **Tabela 1** traz o detalhamento dos estudos e desenhos experimentais acima mencionados.

Para identificar os DEGs de cada um dos desenhos experimentais, utilizamos a ferramenta NetworkAnalyst 3.0 para a análise de expressão diferencial dos dados de RNA-Seq. Os *read counts* foram utilizados para identificação dos DEGs através do pipeline DESeq2. A partir dessa análise, observamos que cada um dos experimentos apresentava um número específico de genes diferencialmente expressos. No experimento de Yang L et al 2020 foram identificados 951 DEGs nos CM primários humanos, enquanto que as células hESC infectadas apresentaram 2947 DEGs. No experimento de Hsiang T et al 2021 foram identificados em células hESC: 1169 DEGs com tempo de exposição ao vírus de 24h e MOI de 5; 3250 DEGs em 48h a um MOI de 5; 4 DEGs em 48h a um MOI de 0,1); 1698 DEGs em 72 horas a um MOI de 0,1. Nas células iPSC foram identificados: 34 DEGs em 24 horas a um MOI 5; 2931 DEGs EM 48 horas a um MOI de 5; 0 DEGs em 48h a um MOI de 0,1 e 1 DEG em 72 horas a um MOI de 0,1. No experimento de Pérez-Bermejo JA et al 2020 foram identificados em células iPSC: 3055 DEGs em 48 horas de exposição a um MOI de 0,001; 6640 DEGs em 48 horas a um MOI de 0,01 e 2758 DEGs em 48 horas a um MOI de 0,1. No experimento de Sharma A et al 2020 foram identificados em células iPSC 3174 DEGs em 72 horas de exposição a um MOI de 0,1. Esses resultados sugerem que o perfil transcricional sofre influência do tempo de exposição ao vírus e do MOI, bem como é específico para cada modelo de desenvolvimento de cardiomiócitos. Para as análises subsequentes, utilizamos apenas os desenhos experimentais que apresentaram mais de 100 DEGs.

Dataset	Tipo de Célula	MOI	Horas de Exposição	Número amostral	Total DEGs (DESeq2)	Grupo
GSE151879 Yang L et al 2020	Primary Human Cardiac Myocytes	0,1	24h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	951	A
	hESC	0,1	24h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	2947	B
GSE162736 Hsiang T et al 2021	hESC	5	24h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	1169	C
	hESC	5	48h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	3250	D
	hESC	0,1	48h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	4	-
	hESC	0,1	72h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	1698	E
	iPSC	5	24h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	34	-
	iPSC	5	48h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	2931	F
	iPSC	0,1	48h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	0	-

	iPSC	0,1	72h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	1	-
GSE156754 Pérez-Bermejo JA et al 2020	iPSC	0,001	48h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	3055	G
	iPSC	0,01	48h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	6640	H
	iPSC	0,1	48h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	2758	I
GSE150392 Sharma A et al 2020	iPSC	0,1	72h	3 SARS-CoV-2 e 3 MOCK	3174	J

Tabela 1. Descrição dos desenhos experimentais analisados.

hESC = cardiomiócitos derivados de células tronco embrionárias humanas

iPSC = cardiomiócitos derivados de células tronco pluripotentes

MOI = razão entre o número de partículas de vírus e o número de células alvo presentes em um espaço definido

Na **figura 6** está representado o número de genes *up*-regulados e *down*-regulados dos desenhos experimentais analisados.

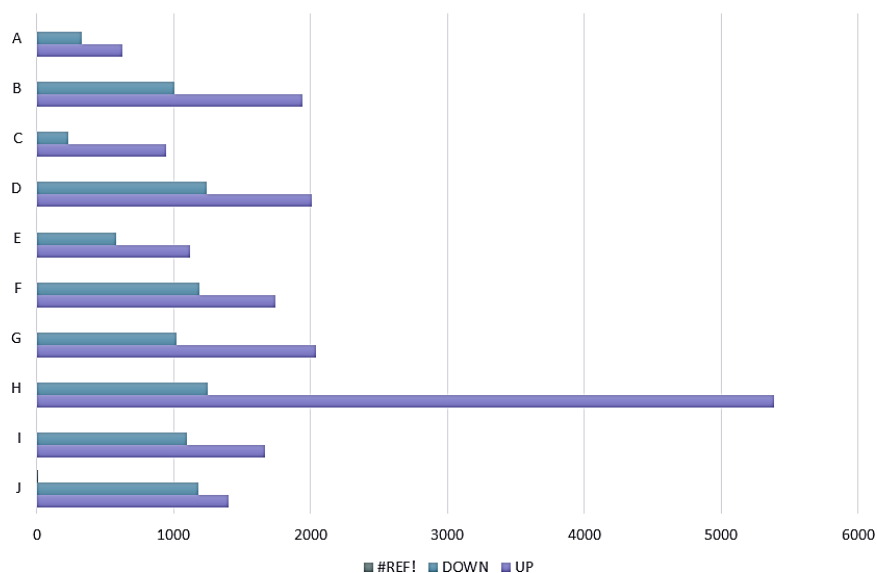


Figura 6. Representação em gráfico de barras do número de genes regulados positivamente (Up-Regulated) e negativamente (Down-Regulated) de cada um dos desenhos experimentais.

Em seguida, nós buscamos os genes compartilhados (intercessão transcricional) entre os diferentes desenhos experimentais. Notamos que alguns experimentos apresentaram um grande número de *overlaps*, como o experimento D e E que compartilham 38 DEGs, experimento F e E compartilham 23 DEGs e o experimento A e E que compartilham 22 DEGs (**Figura 7**).

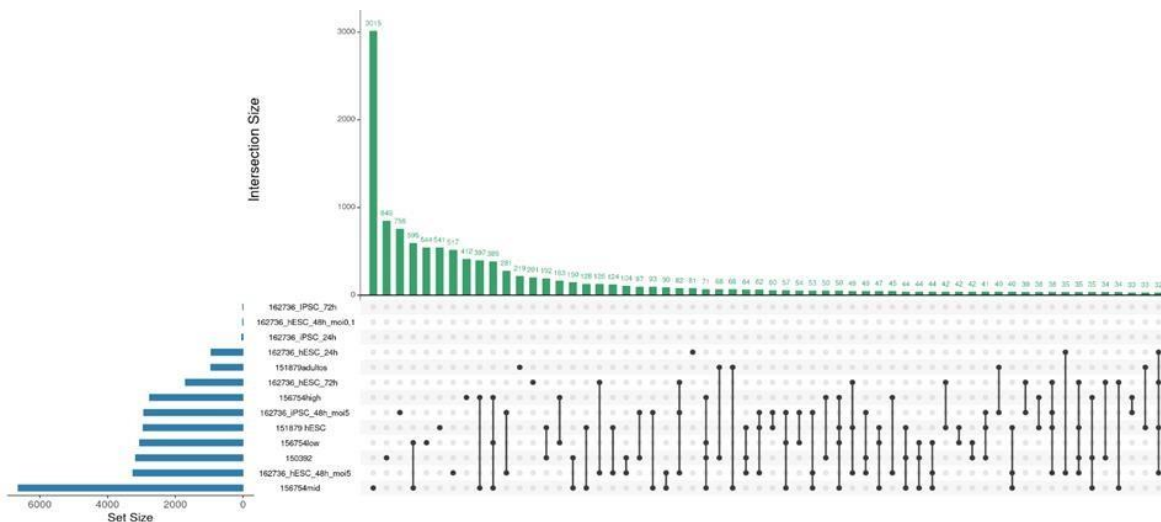


Figura 7. Upset plot para representar o número de DEGs compartilhados entre cada estudo analisados.

Sabendo-se que células iPSC e ESC possuem diferenças no perfil transcricional, notamos também que modelos de iPSC apresentaram um maior número de genes compartilhados tanto entre desenhos experimentais que utilizaram células iPSC como os que utilizaram ESC (B, C, D e E) e CMs primários humanos (A). (**Figura 8**)

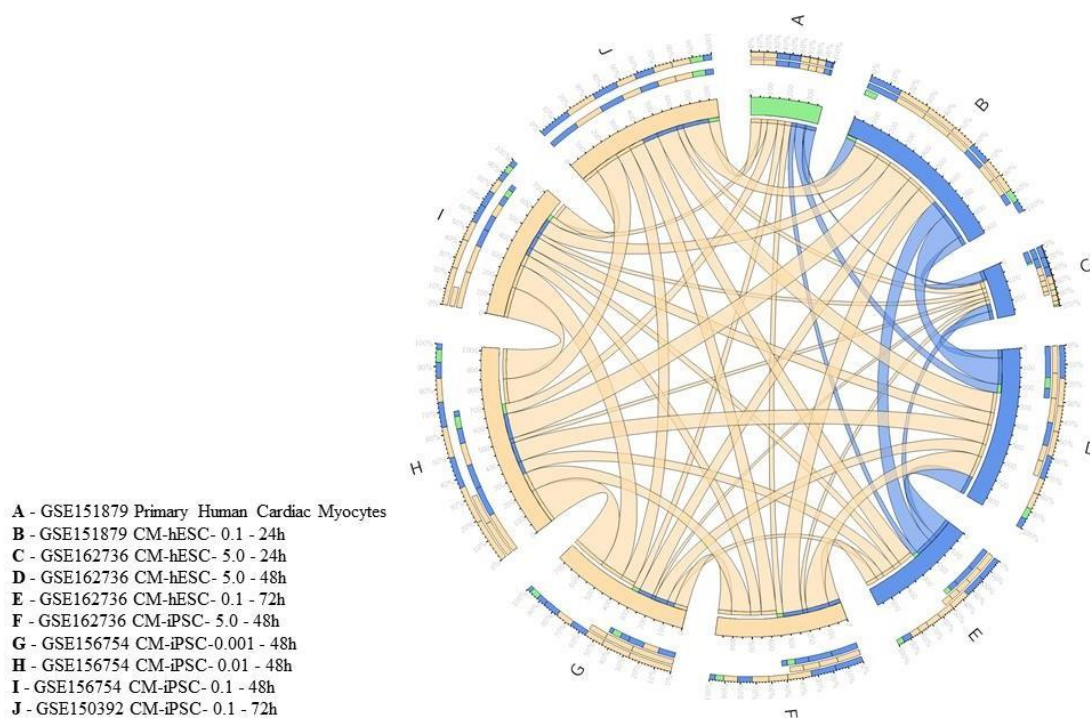


Figura 8. Circus Plot representando genes compartilhados entre os modelos iPSC e ESC dentro dos diferentes desenhos experimentais.

4.2 Análise de Enriquecimento Funcional

Para analisarmos quais os processos biológicos enriquecidos pelos DEGs, utilizamos a ferramenta WebGestalt e consideramos os termos como enriquecidos quando apresentavam $p < 0.05$ e combined score > 10 . A partir dessa análise observamos que, de uma maneira geral, os genes regulados positivamente estavam associados a resposta imune, como ativação de linfócitos T, produção de citocinas, regulação da hematopoiese, quimiotaxia de neutrófilos etc. E os genes regulados negativamente estavam mais associados a alterações na contração muscular, como deslizamento dos filamentos de actina e miosina, vasoconstrição entre outros (**Figura 9**).

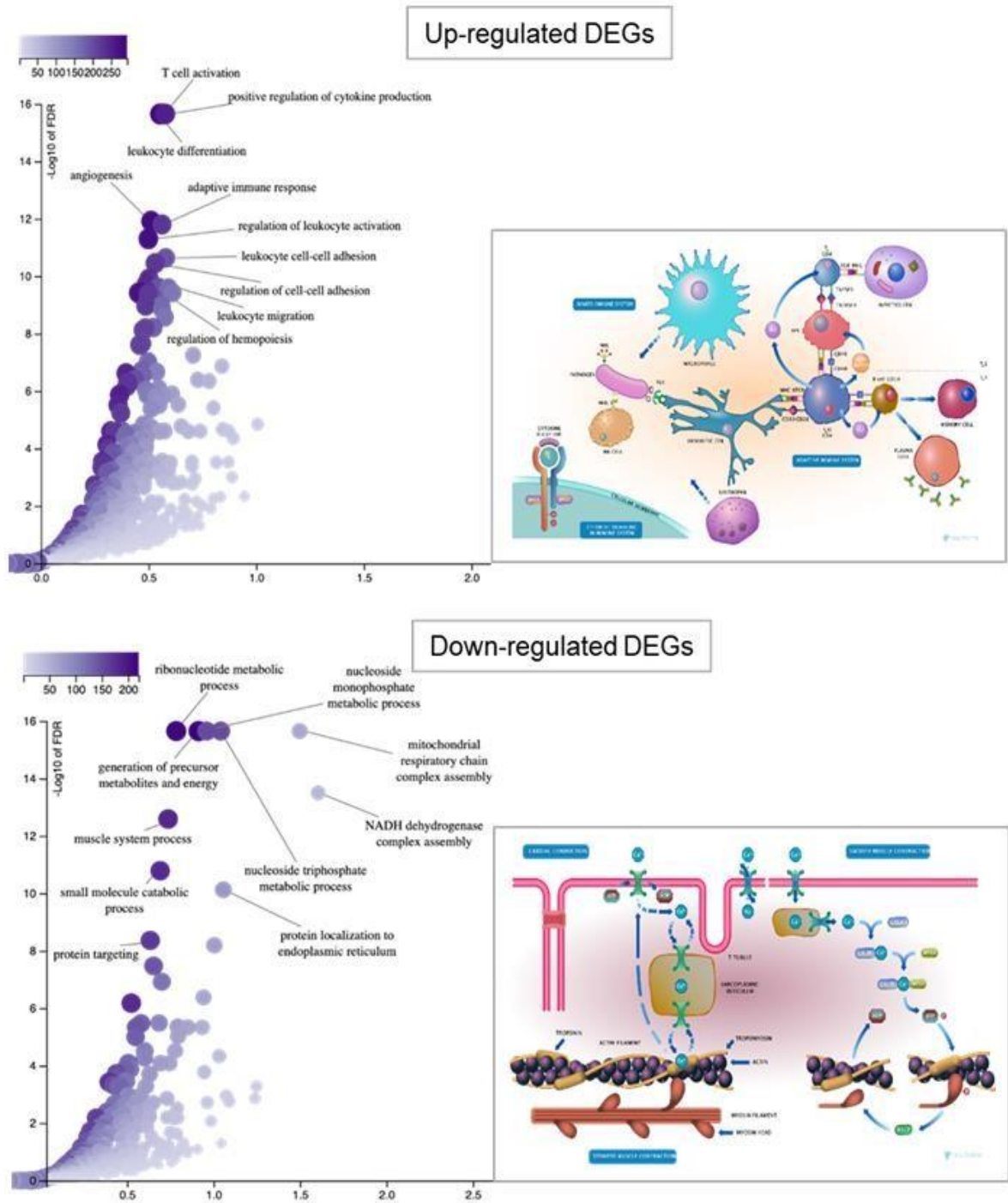


Figura 9. Os Volcano plots apresentam os termos enriquecidos pelos genes up e down regulados e representação das vias de resposta imune e contração muscular reguladas positivamente e negativamente através do Reactome Pathway Database.

A fim de facilitar a nossa compreensão a respeito dos processos biológicos encontrados, nós categorizamos os termos enriquecidos em cada um dos desenhos

experimentais. Classificamos como categoria 1 os termos que estavam associados a resposta imune, como categoria 2 os associados com contração do músculo cardíaco, categoria 3 associados a matriz extracelular e categoria 4 a coagulação. Na categoria 1 analisamos 1280 genes, na categoria 2 analisamos 282 genes, na categoria 3 analisamos 342 genes e na categoria 4 analisamos 419 genes. A **Tabela 2** apresenta o detalhamento do número de genes e das categorias acima mencionadas.

Número das Categorias	Categorias	Termos	GO	Número de Genes	Total de genes sem duplicatas
1	Resposta Imune	Inflammatory response	GO:0006954	583	1280
		Cytokine activation	GO:0005125	315	
		Cytokine binding	GO:0019955	169	
		Cytokine receptor interaction	GO:0090722	186	
		Viral process	GO:0016032	303	
2	Contração do músculo cardíaco	Smooth muscle contraction	GO:0006939	55	282
		Cardiac conduction	GO:0061337	75	
		Muscle contraction	GO:0006936	246	
		Striated muscle contraction	GO:0006941	113	
3	Remodelação da matriz extracelular	Extracellular matrix organization	GO:0030198	296	342
		Integrin activation	GO:0033622	47	
4	Coagulação	Fibrinogen complex	GO:0005577	8	419
		Platelet activation	GO:0030168	108	
		Blood coagulation	GO:0007596	262	
		Platelet aggregation	GO:0070527	49	

Tabela 2. Termos ontológicos e os respectivos números de genes de cada categoria analisada.

Na **Figura 10** está representado o número de genes *up*-regulados e *down*-regulados dos desenhos experimentais analisados, e é possível observar que a maioria dos experimentos apresenta mais de 50% de genes regulados positivamente.

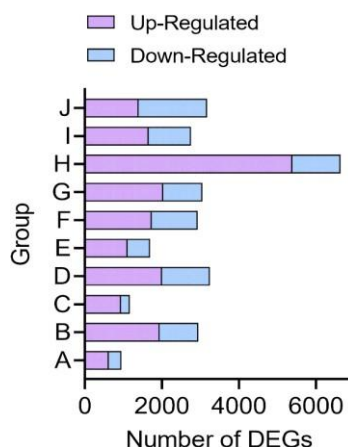


Figura 10. Representação em gráfico de barras do número de genes associados as 4 categorias, regulados positivamente (up-regulados) e negativamente (down-regulados) de cada um dos desenhos experimentais.

Em seguida analisamos quantos genes de cada categoria apresentavam-se diferencialmente expressos em cada um dos desenhos experimentais (**Figura 11**). Notamos que cada desenho experimental era composto por um número específico de genes de cada uma das categorias, sendo que em todos, quase que 50% dos genes presentes são associados a resposta imune. O desenho experimental “H” que utilizou CM-iPSC por 48 horas a um MOI de 0,01 é o que mais apresentou genes diferencialmente expressos, sendo a maior parte de genes associados à resposta imune. CM-hESC por 24 horas a um MOI de 5 foi o que menor apresentou DEGs.

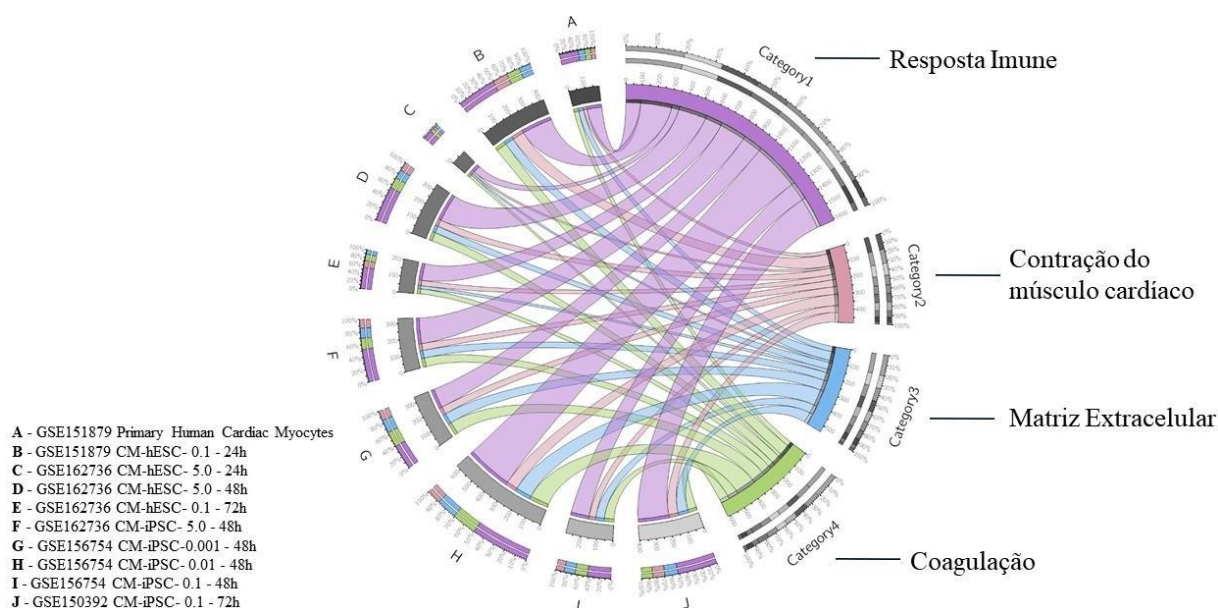


Figura 11. Circus Plot representando quantos genes de cada categoria apresentavam-se diferencialmente expressos em cada um dos desenhos experimentais.

Dentre os genes associados às quatro categorias descritas acima, identificamos os genes compartilhados entre os diferentes desenhos experimentais. O experimento “D” e “E” apresentaram 38 genes em comum. Os experimentos “F”, “D” e “E” possuem 20 genes em comum (**Figura 12**).

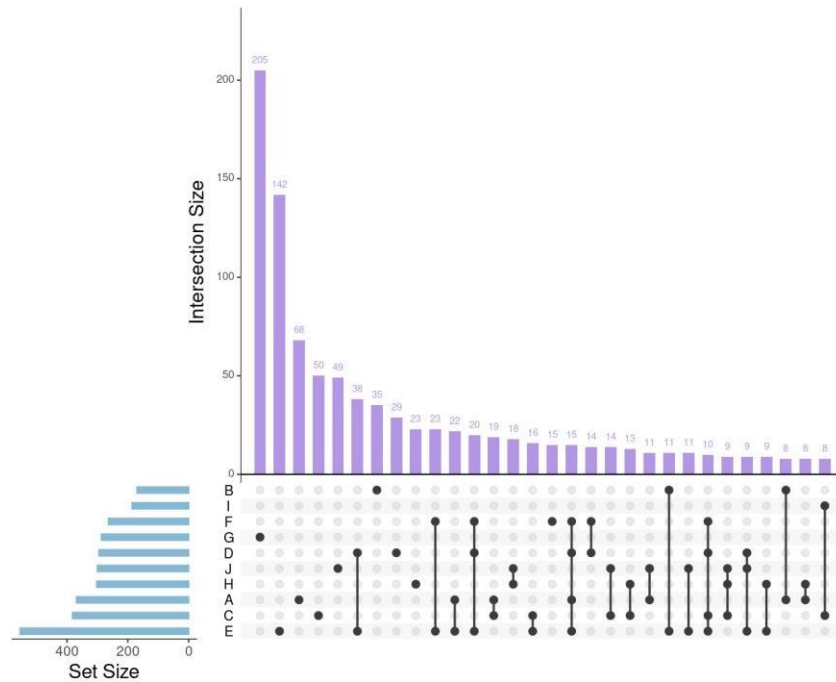


Figura 12. Upset plot para representar o número de DEGs compartilhados entre cada estudo analisado.

Para analisarmos os processos biológicos enriquecidos pelos principais DEGs, filtramos os DEGs que estavam presentes em pelo menos 5 desenhos experimentais em cada categoria e fizemos a representação através de um *heatmap*, demonstrado pelo *combined score* (cor do círculo) e *p-value* (diâmetro do círculo). Realizamos uma clusterização não supervisionada utilizando Euclidian distance, que mostra sete, três, dois e quatro grandes *clusters* nas 4 categorias, respectivamente, com perfis de DEGs similares entre os grupos. Fizemos uma análise de enriquecimento funcional dos principais clusters de cada categoria (**Figuras 13 e 14**).

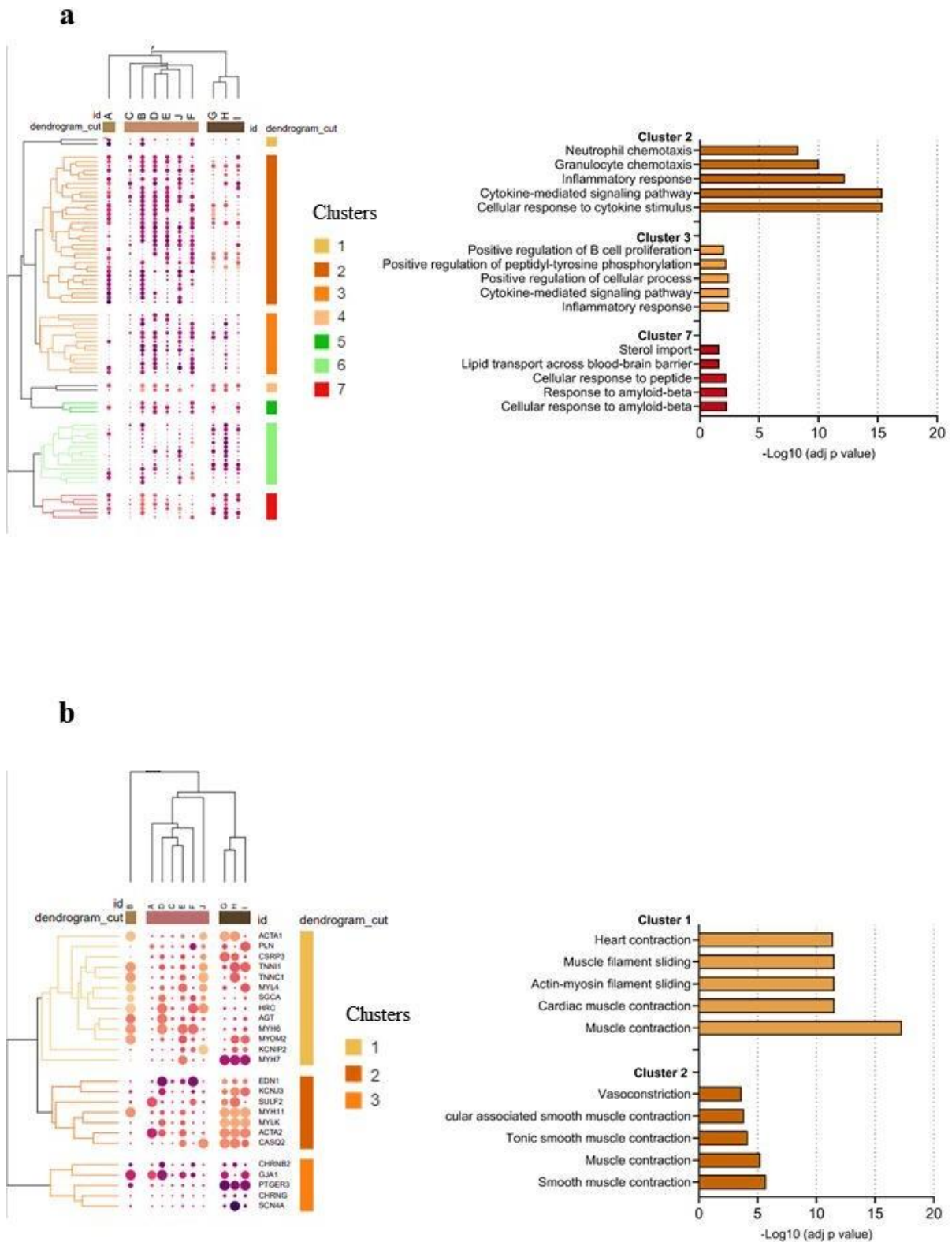


Figura 13. a) Heatmap apresentando os principais DEGs das categorias de resposta imune (a) e Contracao do Músculo Cardíaco (b), e uma análise de enriquecimento funcional dos principais clusters de cada heatmap.

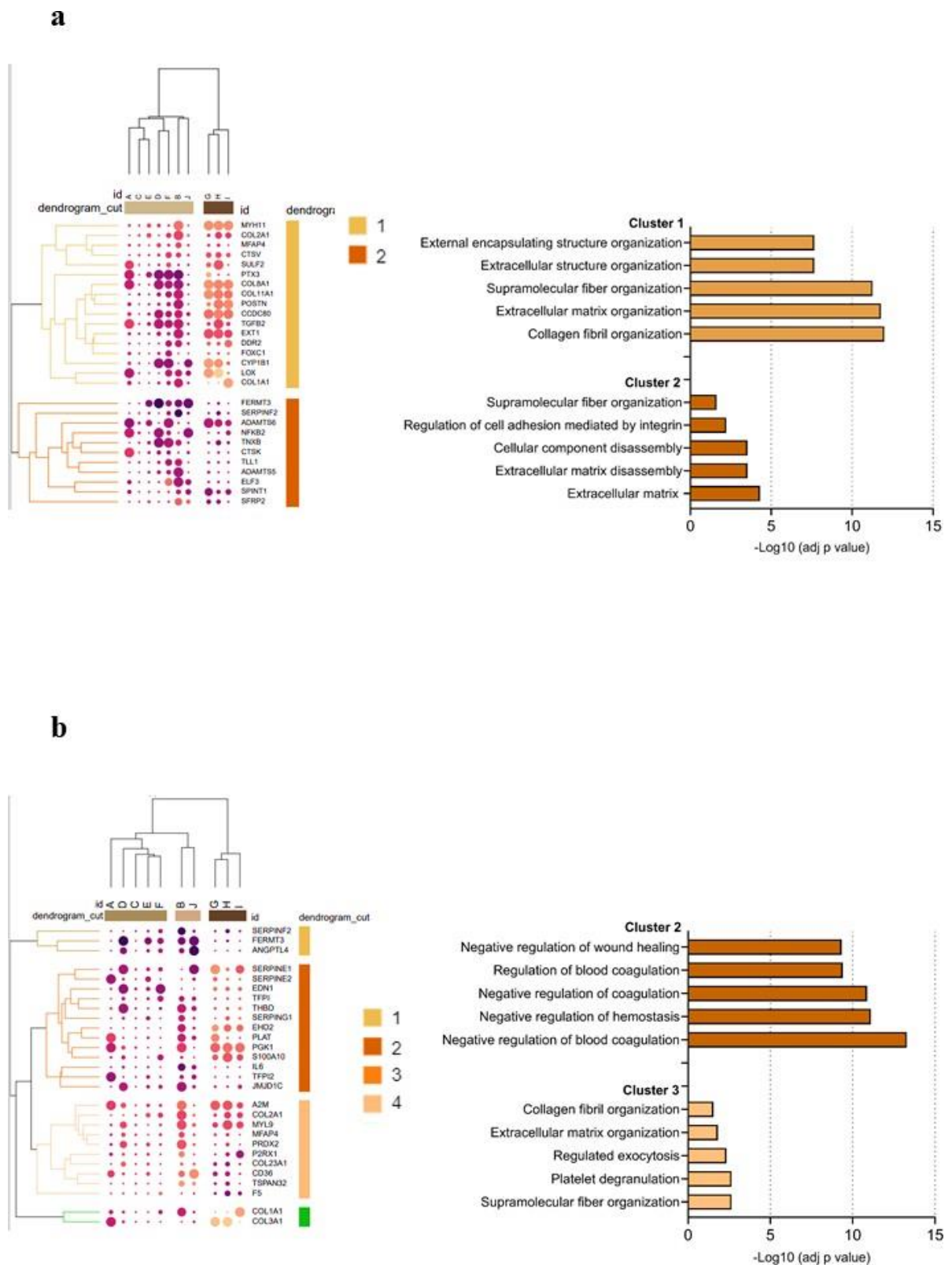


Figura 14. *Heatmap* apresentando os principais DEGs das categorias de matriz extracelular (a) e coagulação (b), e uma análise de enriquecimento funcional dos principais clusters de cada *heatmap*.

4.3 Potenciais miRs associados aos cardiomiócitos infectados com SARS-CoV-2

A fim de buscar pelos miRs que potencialmente regulavam os DEGs em cada um dos experimentos, utilizamos ferramentas computacionais e identificamos 886 microRNAs como potenciais reguladores do DEGs. Para representação, utilizamos apenas os microRNAs que foram identificados em pelo menos 5 dos experimentos analisados, resultando em 40 miRs. A representação desses microRNAs foi realizada através de um Heatmap (**Figura 15**), demonstrado pelo *combined score* (cor do círculo) e p value (diâmetro do círculo). Realizamos uma clusterização não supervisionada utilizando *Euclidian distance*, que mostra quatro grandes *clusters* com perfis de microRNAs similares entre os grupos. que mostra microRNAs bem interessantes como o miR-98-5p, miR-34a-5p e o miR-155-5p associados a inflamação; e o miR-1-3p associado a contração do músculo cardíaco.

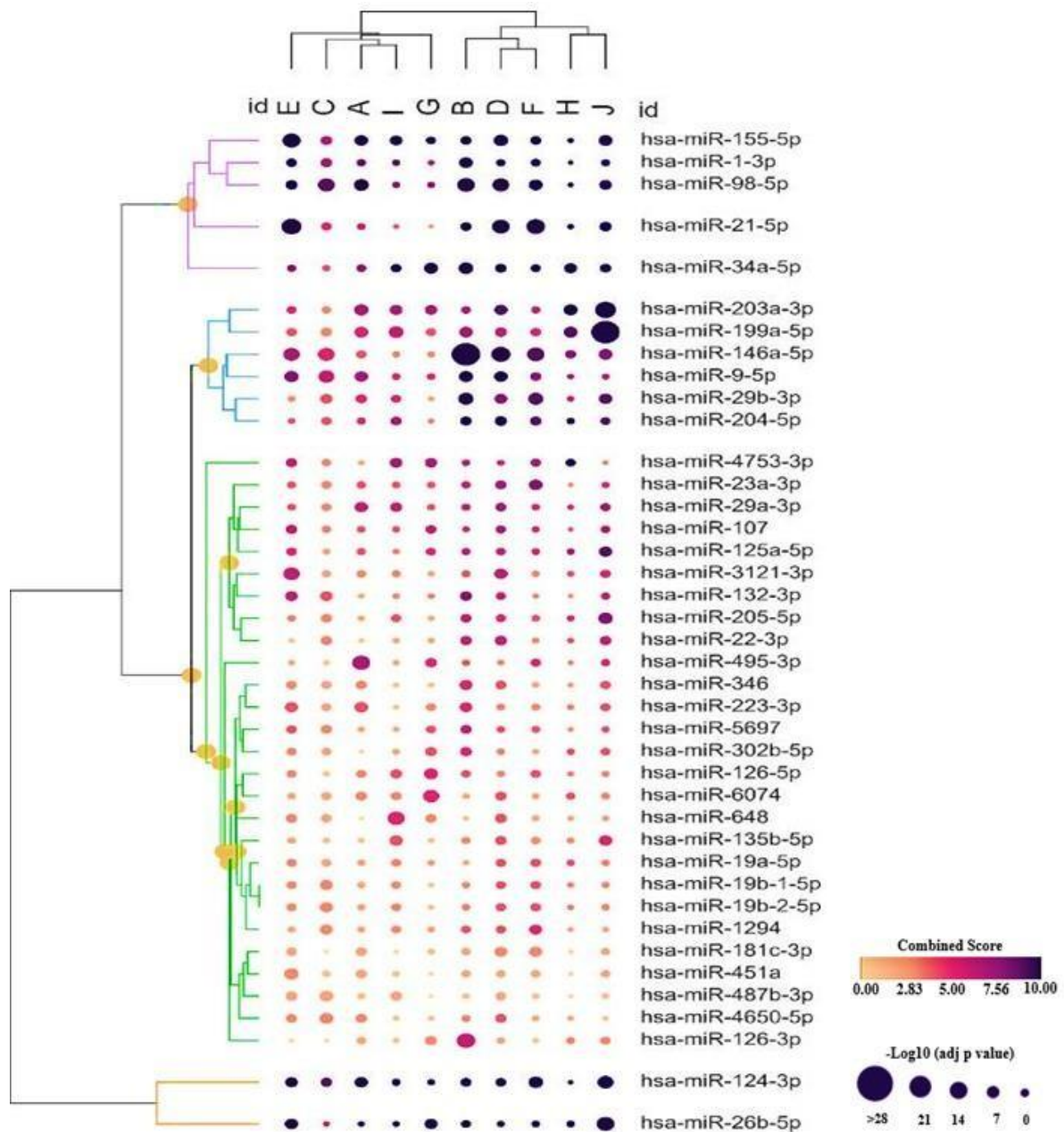


Figura 15. Heatmap apresentando os 40 microRNAs que potencialmente regulam os DEGs nos experimentos analisados.

Geramos redes de interação para melhor visualizarmos os genes alvos compartilhados entre esses microRNAs e o número total de genes alvos de cada um dos microRNAs (**Figuras 16 e 17**). Na primeira figura de redes moleculares, as arestas equivalem ao número de genes diferencialmente expressos que são compartilhados entre os diferentes miRs, portanto quanto maior a espessura da aresta maior o número de genes compartilhados. O tamanho dos círculos representam o número total de alvos que cada miR regula dentro da categoria analisada. Dentro da categoria de resposta imune, notamos que o miR-21-5p e o miR-146a-5p

compartilham cinco genes alvos. Em relação a matriz extracelular, o miR145-5p e miR143-3p compartilham sete genes alvos. E na categoria contração muscular, o miR133b e miR133a-3p foram os que mais compartilharam genes, totalizando 9 genes alvos. Foi possível observar miRs que estão presentes em mais de uma categoria, como por exemplo o miR-29b-3p que regula tanto genes de resposta imune como de matriz extracelular. O miR-133a-3p e o miR-133b regulam tanto genes associados a contração do músculo cardíaco como matriz extracelular. Os miRs da categoria 4 não apresentaram *overlaps*.

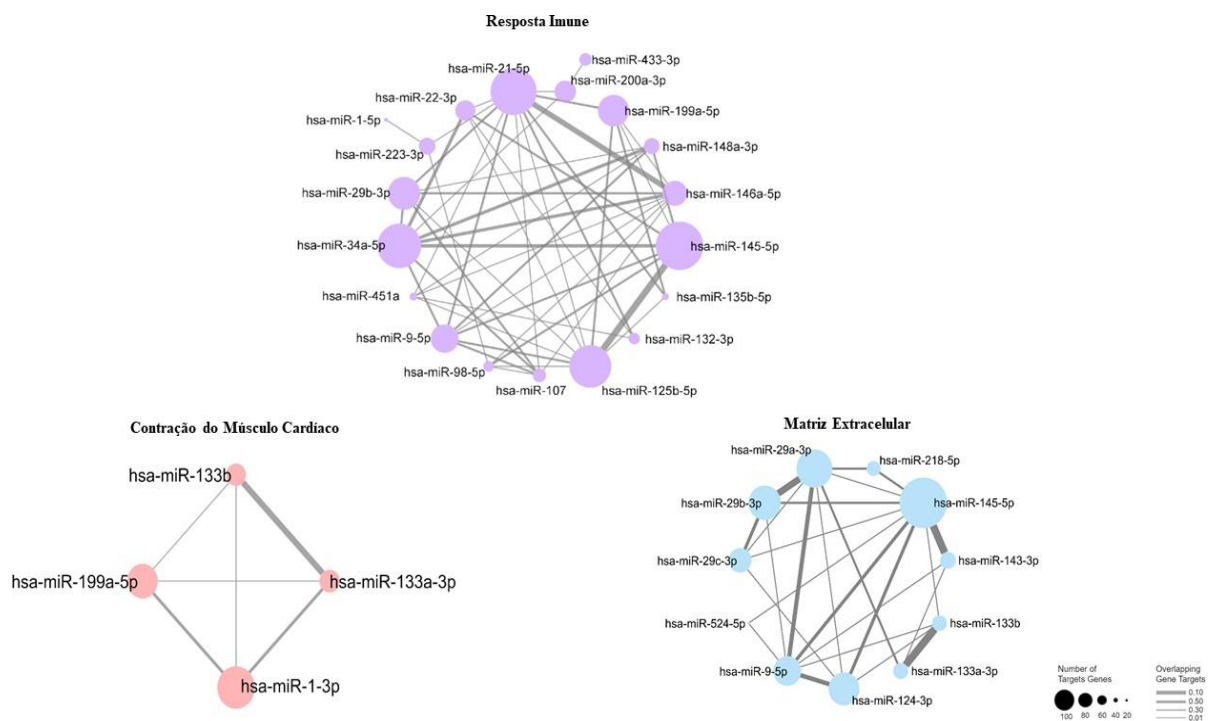


Figura 16. Redes de interação entre os microRNAs geradas através da ferramenta Cytoscape. As arestas equivalem ao número de genes diferencialmente expressos que são compartilhados entre os diferentes miRs, e o tamanho dos círculos representam o número total de genes alvos que cada miR regula dentro da categoria analisada.

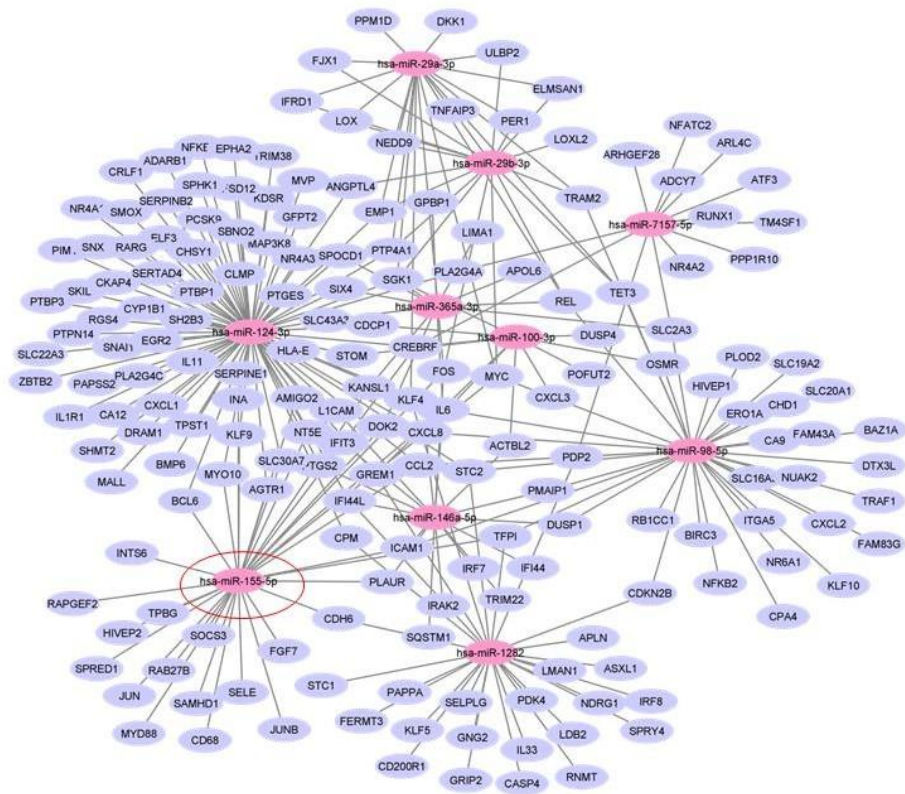


Figura 17. Redes de interação entre os microRNAs e genes alvo geradas através da ferramenta Cytoscape.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As complicações cardíacas observadas em pacientes infectados com SARS-CoV-2 estão diretamente associadas ao pior desfecho clínico e pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares subjacentes a essas complicações. Os cardiomiócitos derivados de células-tronco apresentam-se como uma ferramenta promissora para as pesquisas envolvendo cardiomiócitos após infecção. Nossos resultados demonstram que:

- O perfil transcricional de cardiomiócitos infectados por SARS-CoV-2 é distinto para cada modelo experimental. Entretanto, todos os modelos reanalisados neste estudo resgataram alterações no perfil de genes associados à resposta imunológica, alterações de contração muscular, remodelação de matriz extracelular e associados ao processo de coagulação.
- Identificamos um conjunto de miRs reguladores dos genes de resposta imune, de contração muscular e de remodelação da matriz extracelular;
- Dentre o miRs identificados, o miR-155-5p apresenta um forte potencial na regulação de genes envolvidos na resposta inflamatória e via de sinalização de interferon do tipo I;
- Além disso, identificamos os miRs miR-29a-3p, miR-29b-3p e miR-146b-3p, importantes moléculas envolvidas com o processo de contração da célula muscular cardíaca;
- A integração dos miRs e mRNA-alvos identificou possíveis vias moleculares reguladoras, revelando potenciais miRs e genes associados a resposta imune de cardiomiócitos infectados com SARS-CoV-2.

Nossa reanálise de dados de transcriptoma possibilitou a identificação das diferenças obtidas do perfil transcricional em diferentes modelos experimentais (CM primários, iPSC e hESC) utilizados para estudar CMs após a infecção por SARS-CoV-2. Nossa análise transcricional mostrou que células iPSC infectadas com SARS-CoV-2 possuem um maior número de DEGs associados a resposta imune do que células hESC. Embora não existam ainda estudos comparando cardiomiócitos derivados de hESC e iPSC infectados com SARS-CoV-2, nossos resultados sugerem que o modelo iPSC possa resgatar um maior número de DEGs condizente com a infecção. Os estudos que comparam células iPSC e hESC mostram divergências associadas ao perfil do transcriptoma dessas células, supostamente implicados na regulação genética da pluripotência (FORT et al., 2015), e apesar de serem consideradas “padrao-ouro” por seu grande potencial de diferenciação, o uso de células ESC é limitado ou proibido em alguns países devido a questões éticas e religiosas para fins de pesquisa (ROBERTSON, 2001). Ainda não existe um

consenso sobre qual o melhor modelo experimental, hESC ou iPSC, para estudo relacionados a infecções virais. O modelo de cardiomiócitos humanos primários permanece como o melhor para estudo *in vitro* de cardiomiócitos, visto que as células não precisam passar pelo processo de diferenciação celular para apresentar o fenótipo de interesse. Por outro lado, existe a dificuldade associada à obtenção de cardiomiócitos primários humanos por ser um procedimento invasivo (FROM; MALESZEWSKI; RIHAL, 2011) e apresentarem baixo potencial de proliferação *in vitro* (KÜHN et al., 2007).

Análises transcriptômicas mostraram que CMs infectados com SARS-CoV-2 tiveram uma regulação negativa de expressão da ACE2 e uma regulação positiva da quimiocina CXCL2, juntamente com outras citocinas imunomoduladoras, além de uma redução na expressão de genes contráteis específicos do coração, como o TNNT2, que leva a um comprometimento das suas funções eletromecânicas (SHARMA et al., 2020). Os corações de hamsters infectados com SARS-CoV-2 mostraram regulação positiva de genes associados a ROS (do inglês, reactive oxygen species; espécies reativas de oxigênio) e quimiocina CCL2 que recruta monócitos, células T de memória e células dendríticas para os locais de inflamação, aumentando ainda mais a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Esses achados foram posteriormente validados usando amostras de autópsia de pacientes com COVID-19 (CHEN et al., 2020). Essas alterações na expressão gênica levam a uma regulação negativa nas vias correspondentes à organização do tecido muscular cardíaco e à respiração celular. Enquanto que vias relacionadas à resposta imune inata e apoptose são reguladas positivamente (PEREZ-BERMEJO et al., 2021). Genes envolvidos na função mitocondrial e na produção de energia foram regulados negativamente sugerindo que SARS-CoV-2 pode induzir ampla reprogramação epigenética nos CMs para promover sua própria replicação (MARCHIANO et al., 2021).

A partir dos dados de transcriptoma, foi possível resgatar os potenciais miRs associados aos DEGs envolvidos com a resposta imunológica e aos envolvidos com contração muscular. Alguns miRs desempenham funções essenciais na remodelação cardíaca e no desenvolvimento da insuficiência cardíaca, sugerindo um alvo terapêutico potencial para o diagnóstico e novas terapias (GOREN et al., 2012). Entre os miRs identificados, foram encontrados potenciais miRs associados a resposta imune como o miR-155-5p, miR-146a-5p e o miR-1-3p associado às alterações musculares nos CMs infectados.

O miR-155-5p vem sendo associado a diversos distúrbios, incluindo doenças cardiovasculares, inflamação e câncer (REBANE; AKDIS, 2013; THAI et al., 2007) Além disso, este miR apresenta um papel fundamental no processo de inflamação e regula o desenvolvimento e a diferenciação de células hematopoiéticas e imunes (O'CONNELL et al., 2007). Dentre os genes alvo que são regulados pelo miR-155 incluem aproximadamente 140 genes que codificam proteínas imunomoduladoras, proteínas supressoras de tumor e proteínas relacionadas à inflamação (XIAOYAN et al., 2017). Em relação à

infecções virais, Mirzaei et al. mostraram que o miR-155 é uma molécula essencial para a regulação da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-4, IL-5, IFN (MIRZAEI et al., 2021). Na COVID-19, (WYLER et al., 2021). mostrou que esse miR pode regular genes associados a produção de interferons. Entretanto, ainda não foi mostrado o papel desse miR em cardiomiócitos infectados com SARS-CoV-2.

Além do miR-155, o miR-146a-5p quando estudado *in vitro* e *in vivo* também apresentou um efeito pró-inflamatório, o que leva a produção de citocinas, ativação do sistema complemento e ativação de leucócitos (FENG et al., 2017). Por meio da sinalização gerada através do reconhecimento por TLR7 (*toll like receptor 7*) o miR-146a tem sua expressão aumentada em CMs, modulando a inflamação do miocárdio e disfunção contrátil de CMs infectados (SHIMADA et al., 2020).

Dentre os miRs reguladores dos genes de contração muscular, o miR-133a-3p é um dos miRs mais abundantes no miocárdio (LIANG et al., 2017). Até o presente momento, não localizamos estudos mostrando a participação desse miR. Entretanto, em relação às doenças cardiovasculares, sabe-se que modelos animais com expressão de miR-133 reduzida manifestaram cardiomiopatia, insuficiência cardíaca e uma proliferação anormal dos cardiomiócitos (LIU et al., 2008). Além do miR-133a-3p, o miR-1-3p também apresenta um papel essencial no desenvolvimento e na fisiologia dos tecidos musculares, incluindo o coração (LI et al., 2014). Alterações na expressão do miR-1-3p levam à ocorrência de diversas doenças cardíacas, como hipertrofia, infarto do miocárdio e arritmias (LI et al., 2014).

6. PRÓXIMAS ETAPAS

Nossos resultados apresentam limitações por se tratarem de *análises computacionais* que trazem informações de evidências experimentais dos miRs e seus alvos de outros modelos experimentais que ainda não foram validados no contexto dos cardiomiócitos infectados com SARS-CoV-2. Para fortalecer nossos resultados, *antes da publicação de nossos achados*, iremos realizar ainda experimentos *in vitro* utilizando CMs (derivados de células iPSC) infectados com SARS-CoV-2 como detalhado a seguir.

Realizaremos ensaios *in vitro* com cardiomiócitos iPSC infectados com as três variantes de SARS-CoV-2: variante de Wuhan, Gamma (P.1) e Delta (B.1.617.2) para compararmos a diferença no microRNAoma e do transcriptoma após a infecção com as três variantes. Cardiomiócitos serão incubados com o vírus por um período de 48 horas a um MOI de 0,1. Para controle da qualidade das amostras de RNAs dos cardiomiócitos infectados, utilizaremos a ferramenta *Bioanalyzer* que fornece informações sobre a integridade e pureza das amostras.

As células, então, serão lisadas para extração de RNA total para análise de padrões da expressão gênica através do sequenciamento de larga escala do RNA presente nas amostras (RNAseq). Utilizando a plataforma *TaqMan low density array* iremos mensurar o perfil de expressão de miRs nos diferentes grupos. Através do banco de dados mirTaRBase será possível uma análise das integrações entre microRNAs e seus genes alvos. O software Cytoscape será usado para identificarmos as redes de interações miRs-mRNAs.

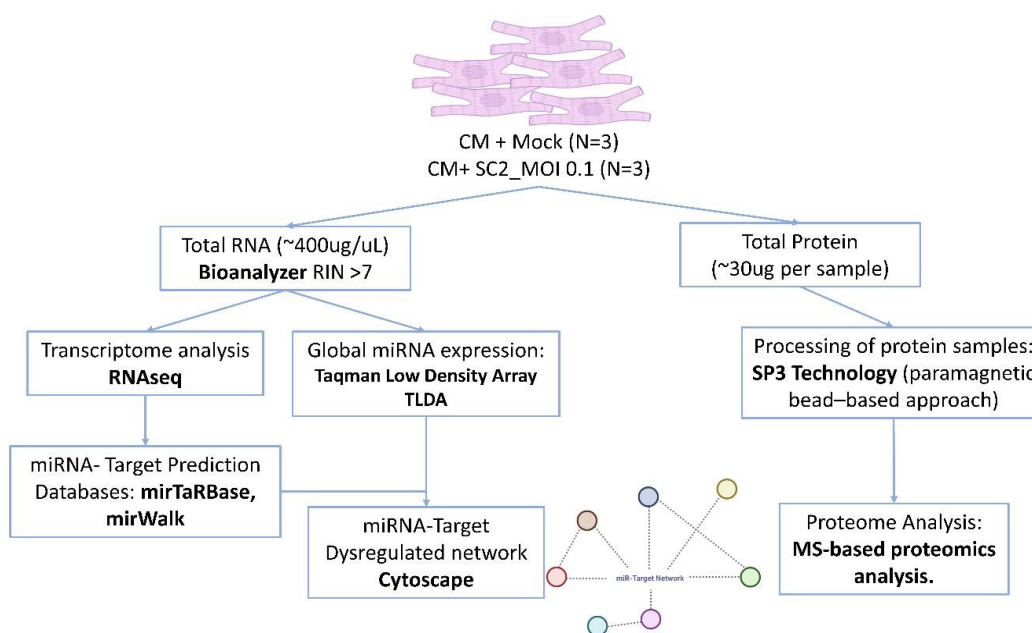


Figura 16. Fluxograma dos próximos passos da pesquisa.

7. ATIVIDADES COMPLEMENTARES DESENVOLVIDAS DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO

- Monitoria no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino, do departamento de imunologia da USP, com foco em preparação pedagógica e estágio supervisionado em docência, no primeiro semestre de 2021.
- Encontro anual do programa de pós-graduação em Imunologia, com a apresentação na categoria oral do trabalho “O interactoma de RNA mensageiros e microRNAs em cardiomiócitos infectados com SARS-CoV-2”, nos dias 9 e 10 de setembro de 2020 em Sao Paulo-SP.
- Webinar “COVID-19 CENÁRIOS ATUAIS E PERSPECTIVAS PÓS PANDEMIA”, nos dias 14 e 15 de outubro de 2020, na qualidade de ouvinte, com carga horária de 11 horas e 30 minutos.
- I Semana de Imunologia da Universidade Federal do Ceará (evento online) do dia 26 a 29 de abril de 2021, na qualidade de ouvinte, com carga horária de 10 horas.
- Participação em seminários online (webinar) do Departamento de Imunologia, na qual os alunos de pós-graduação assistem a apresentação de diversos pesquisadores na área da imunologia. Todas as Terças-feiras.
- Participação em Reuniões do Laboratório de Imunologia Sistêmica e Integrativa, na qual discutimos artigos/livros da área de imunologia, programas de análise de dados e resultados de projetos de pesquisa. Todas as Segundas-Feiras.

8. REFERÊNCIAS

- CHALLEN, R. et al. Risk of mortality in patients infected with SARS-CoV-2 variant of concern 202012/1: matched cohort study. **BMJ**, p. n579, 9 mar. 2021.
- CHOU, C.-H. et al. miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D296–D302, 4 jan. 2018.
- DESHMUKH, H. S. et al. The microbiota regulates neutrophil homeostasis and host resistance to Escherichia coli K1 sepsis in neonatal mice. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 524–530, 20 maio 2014.
- DIAO, B. et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in Immunology**, v. 11, 1 maio 2020.
- EDGAR, R. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 1, p. 207–210, 1 jan. 2002.
- FORT, A. et al. Nuclear transcriptome profiling of induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells identify non-coding loci resistant to reprogramming. **Cell Cycle**, v. 14, n. 8, p. 1148–1155, 18 abr. 2015.
- FROM, A. M.; MALESZEWSKI, J. J.; RIHAL, C. S. Current Status of Endomyocardial Biopsy. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 11, p. 1095–1102, nov. 2011.
- GOREN, Y. et al. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. **European Journal of Heart Failure**, v. 14, n. 2, p. 147–154, fev. 2012.
- HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.
- KRZYWINSKI, M. et al. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. **Genome Research**, v. 19, n. 9, p. 1639–1645, set. 2009.
- KÜHN, B. et al. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. **Nature Medicine**, v. 13, n. 8, p. 962–969, 15 ago. 2007.
- KULESHOV, M. V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W90–W97, 8 jul. 2016.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, dez. 1993.
- LIANG, H. et al. Utility of miR-133a-3p as a diagnostic indicator for hepatocellular carcinoma: An investigation combined with GEO, TCGA, meta-analysis and bioinformatics. **Molecular Medicine Reports**, 14 nov. 2017.
- LIPPI, G.; PLEBANI, M. Laboratory abnormalities in patients with COVID-2019 infection. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 58, n. 7, p. 1131–1134, 25 jun.

2020.

MARES, C. A. et al. Initial Delay in the Immune Response to *Francisella tularensis* Is Followed by Hypercytokinemia Characteristic of Severe Sepsis and Correlating with Upregulation and Release of Damage-Associated Molecular Patterns. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3001–3010, jul. 2008.

MATTICK, J. S.; MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. suppl_1, p. R17–R29, 15 abr. 2006.

MIRZAEI, R. et al. The emerging role of microRNAs in the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. **International Immunopharmacology**, v. 90, p. 107204, jan. 2021.

O'CONNELL, R. M. et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 5, p. 1604–1609, 30 jan. 2007.

QIN, C. et al. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 762–768, 28 jul. 2020.

REBANE, A.; AKDIS, C. A. MicroRNAs: Essential players in the regulation of inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 1, p. 15–26, jul. 2013.

ROBERTSON, J. A. Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 1, p. 74–78, jan. 2001.

SMITH, C. K.; TRINCHIERI, G. The interplay between neutrophils and microbiota in cancer. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 104, n. 4, p. 701–715, 25 out. 2018.

STARRUSS, J. et al. Morpheus: a user-friendly modeling environment for multiscale and multicellular systems biology. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1331–1332, 1 maio 2014.

TAN, L. et al. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 33, 27 dez. 2020a.

TAN, M. et al. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China. **Immunology**, v. 160, n. 3, p. 261–268, 8 jul. 2020b.

THAI, T.-H. et al. Regulation of the Germinal Center Response by MicroRNA-155. **Science**, v. 316, n. 5824, p. 604–608, 27 abr. 2007.

WYLER, E. et al. Transcriptomic profiling of SARS-CoV-2 infected human cell lines identifies HSP90 as target for COVID-19 therapy. **iScience**, v. 24, n. 3, p. 102151, mar. 2021.

XIAOYAN, W. et al. MicroRNA-155: a Novel Armamentarium Against Inflammatory Diseases. **Inflammation**, v. 40, n. 2, p. 708–716, 15 abr. 2017.

XU, Z. et al. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress

syndrome. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 4, p. 420–422, abr. 2020.

YU, G. et al. clusterProfiler: an R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 16, n. 5, p. 284–287, maio 2012.

ZHANG, B. et al. Immune Phenotyping Based on the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio and IgG Level Predicts Disease Severity and Outcome for Patients With COVID-19. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 3 jul. 2020.

ZHOU, G. et al. NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W234–W241, 2 jul. 2019.