

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Análises Clínicas

Alterações sistêmicas na assinatura do ciclo
celular de pacientes com COVID-19.

Caroline Aliane de Souza Prado

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre.
Orientador: Prof. Dr. Otávio Cabral-Marques

São Paulo

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Análises Clínicas

Alterações sistêmicas na assinatura do ciclo
celular de pacientes com COVID-19.

Caroline Aliane de Souza Prado

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre.
Orientador: Prof. Dr. Otávio Cabral-Marques

Versão Corrigida

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Prado, Caroline Aliane de Souza

P896a Alterações sistêmicas na assinatura do ciclo celular de pacientes com COVID-19 / Caroline Aliane de Souza Prado. - São Paulo, 2022.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).

Caroline Aliane de Souza Prado
Alterações sistêmicas na assinatura do ciclo celular
de pacientes com COVID-19.

Comissão Julgadora da
Dissertação/Tese para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Otávio Cabral Marques
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2022.

Dedicatória

Aos meus avós maternos, Brasília e Amélia, fonte de todo meu caráter, todo meu amor e toda minha gratidão.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)* - Código de Financiamento 001.

Agradeço a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e a aos meus mentores *Dr. Otávio Cabral Marques e Dra. Lena-Friederich Schimke*, pela oportunidade de realizar este incrível trabalho, os quais dedico profunda gratidão. À *Professora e Biomédica Me. Aline Alencar* e à *Cientista Biomédica Natália Moreno*, obrigada por tornarem esse sonho um evento na vida real.

Certa vez deparei-me com um texto declamado pela Jornalista e escritora, *Julia Tolezano da Veiga Faria*, apelidada de “Jout Jout”, o qual dizia que depois de tanto estudar sobre o amor ela chegou à conclusão de que o contrário do amor não é o ódio: é o medo. Relacionou a ideia de que amor é trabalho, é movimento constante, já o medo nos paralisa.

Gratidão às pessoas que me empurraram para frente nesse movimento constante de construção e que possibilitaram colocar o sobrenome de meus avós, *Brasílio de Souza Prado* e *Amélia Franco de Souza Prado*, feirantes de *Salesópolis*, em revistas científicas.

Agradeço aquela, que tornou possível a escrita desse texto, minha primeira professora, minha tia e pedagoga, *Paula Cristina de Souza Prado*.

Agradeço ao sorriso de *Lorena, de Luna, de Yasmin Miwa e de Miguel*, que me fizeram ver com os olhos do coração e me esperançaram de ver um futuro melhor. Agradeço, o que para alguns pode soar estranho, às minhas gatas *Mei e Mel*, ao meu cão, *Flikes*, que se foi, que me acompanharam na saga mestra sendo fonte do amor mais puro que já experienciei.

Gratidão à minha mãe, *Elaine de Souza Prado*, que se foi, e a minha irmã *Laura*, que tanto ensinaram me sobre esse medo que nos paralisa, mas que também me mostraram que nós só conseguimos dar e enxergar aquilo que temos dentro de nós. A toda a *Família Prado*, em especial à minha tia *Marisa de Almeida Prado*, grande psicanalista, que me pregou a palavra de *Freud*, ouviu minhas lamúrias com paciência e me abraçou com suas palavras. Aos meus tios *Leandro, Valdir, Ivanildo, Luiz, Vlademir e Roberto*, por toda força e positividade.

Aos meus grandes amigos, *Ranieri Salgado, Sarah Napoleão, Isis Trizan, Luiza Ferrer, Stephany Mattos, Daiane Alcantara, Bruna Miguel, Pamela Rocha, Dennysson da Fonseca, Igor Filgueiras, Gabriela Baiocchi, Desireé Praça, Kadu e Akemi*, que me ajudaram nos tropeços e diminuíram a saudade de casa.

Contribuições de Autores

Contribuição dos autores para o artigo oriundo dessa dissertação

CASP*, LFS, e OCM co-escreveram o artigo; CASP, LFS, OCM, DLMF, YS, ISF, GCB, DRP, AHCM, JNU, PPF, RCS, SMSN, GZ, NM, e IJ realizaram as análises bioinformáticas; LFS, GCM, VLGC, RNR, VR, GZ, RC, GM, NOSC, LMG, NM, FT, HN, HDO, e OCM contribuíram com insights científicos; LFS, GM, NOSC, VLGC, IJ, LMG, HDO, e OCM revisaram e editaram a versão final do artigo; OCM idealizou e desenhou o estudo; LFS e OCM supervisionaram o projeto.

***Habilidades adquiridas durante o mestrado (CASP)**

- Análise de Sequenciamento do Exoma Completo (SOPHiA DDM v4).
- Curadoria dos dados, análise de expressão diferencial, heatmaps, networks, enriquecimento funcional;
- Pacotes aprendidos com a linguagem R: complexheatmap, circularheatmap, EMAPplot, clusterProfiler, Boxplots, meltedPCA, TransgeneID, EnhancedVolcano, DSeq2, EdgeR, Cemitool, Corrplot, PCA;
- Programas adicionais: Network Analyst, Morpheus, Perseus MaxQuant, Circos.ca.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

Resumo

DE SOUZA PRADO, C.A. **Alterações sistêmicas na assinatura do ciclo celular de pacientes com COVID-19.** Dissertação (mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Com base nas perturbações fosfoproteômicas de moléculas associadas ao ciclo celular em células infectadas pelo coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV)-2, a hipótese de inibidores do ciclo celular como uma terapia potencial para a doença de coronavírus 2019 (COVID-19) foi proposta. No entanto, o cenário das alterações do ciclo celular em COVID-19 permanece inexplorado. Aqui, realizamos uma análise integrativa de sistemas imunológicos de proteoma publicamente disponível (espectrometria de massa) e dados de transcriptoma (sequenciamento de RNA em massa e de célula única [scRNAseq]), com o objetivo de caracterizar mudanças globais na assinatura do ciclo celular de pacientes com COVID-19. Além de módulos de co-expressão de genes significativos enriquecidos associados ao ciclo celular, encontramos uma rede interconectada de proteínas diferencialmente expressas associadas ao ciclo celular (DEPs) e genes (DEGs) integrando dados moleculares de 1.480 indivíduos (974 pacientes infectados por SARS-CoV-2 e 506 controles [controles saudáveis ou indivíduos com outras doenças respiratórias]). Entre esses DEPs e DEGs estão várias ciclinas (CCNs), ciclo de divisão celular (CDCs), quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e proteínas de manutenção de minicromossomos (MCMs). Embora os pacientes com COVID-19 compartilhem parcialmente o padrão de expressão de algumas moléculas associadas ao ciclo celular com outras doenças respiratórias, eles exibiram uma expressão significativamente maior de moléculas associadas ao ciclo celular relacionadas à gravidade da doença. Notavelmente, a assinatura do ciclo celular predominou nos leucócitos do sangue dos pacientes, mas não nas vias aéreas superiores. Os dados de scRNAseq de 229 indivíduos (159 pacientes com COVID-19 e 70 controles) revelaram que as alterações das assinaturas do ciclo celular predominam nas células B, T e NK. Esses resultados fornecem uma compreensão global única das alterações nas moléculas associadas ao ciclo celular em pacientes com COVID-19, sugerindo novas vias putativas para intervenção terapêutica.

Palavras-chave: COVID-19, Ciclo Celular, transcriptoma, proteoma, exoma

Abstract

DE SOUZA PRADO, C.A. **Systemic changes in the cell cycle signature of patients with COVID-19.** Dissertation (Master's) Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

Based on phosphoproteomics perturbations of cell cycle-associated molecules in severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)-2-infected cells, the hypothesis of cell cycle inhibitors as a potential therapy for Coronavirus disease 2019 (COVID-19) has been proposed. However, the landscape of cell cycle alterations in COVID-19 remains mostly unexplored. Here, we performed an integrative systems immunology analysis of publicly available proteome (mass spectrometry) and transcriptome data (bulk and single-cell RNA sequencing [scRNAseq]), aiming to characterize global changes in the cell cycle signature of COVID-19 patients. Beyond significant enriched cell cycle-associated gene co-expression modules, we found an interconnected network of cell cycle-associated differentially expressed proteins (DEPs) and genes (DEGs) by integrating molecular data of 1,480 individuals (974 SARS-CoV-2 infected patients and 506 controls [either healthy controls or individuals with other respiratory illness]). Among these DEPs and DEGs are several cyclins (CCNs), cell division cycle (CDCs), cyclin-dependent kinases (CDKs), and mini-chromosome maintenance proteins (MCMs). Although COVID-19 patients partially shared the expression pattern of some cell cycle-associated molecules with other respiratory illnesses, they exhibited a significantly higher expression of cell cycle-associated molecules associated with disease severity. Notably, the cell cycle signature predominated in the patients' blood leukocytes but not in the upper airways. The scRNAseq data from 229 individuals (159 COVID-19 patients and 70 controls) revealed that the alterations of cell cycle signatures predominate in B, T, and NK cells. These results provide a unique global comprehension of the alterations in cell cycle-associated molecules in COVID-19 patients, suggesting new putative pathways for therapeutic intervention.

Keywords: COVID-19; Cell Cycle; Transcriptome; Proteome; Exome.

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1. Fases do ciclo celular que sofreram interferências por outros tipos virais	19
2. Características clínicas e biológicas dos indivíduos envolvidos no sequenciamento do exoma	27

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Componentes celulares envolvidos na divisão eucariótica.	12
Figura 2. Cronologia dos eventos que envolvem o ciclo celular, da interfase à citocinese.	17
Figura 3. Visão geral do estudo e número total de genes e proteínas diferencialmente expressos por grupo de estudo.	24
Figura 4. Número de genes e proteínas diferencialmente expressos em todas as coortes de 11 conjuntos de dados.	29
Figura 5. Rede integrativa de dados multiômicos de moléculas associadas ao ciclo celular.	30
Figura 6. Interação proteína-proteína e enriquecimento funcional indicando alterações moleculares do ciclo celular.	32
Figura 7. A abordagem proteômica aponta para alterações moleculares do ciclo celular.	34
Figura 8. Redes modulares de co-expressão de genes de transcriptomas sanguíneos de COVID-19 associadas ao ciclo celular.	36
Figura 9. A meta-análise para a integração de estudos de leucócitos de sangue periférico total (GSE157103) e células mononucleares de sangue periférico (GSE152418) revelou a predominância de vias enriquecidas do ciclo celular.	38
Figura 10. Alterações das assinaturas do ciclo celular no sangue não presentes em transcriptomas de swabs nasofaríngeos de pacientes com COVID-19.	40
Figura 11. A expressão de genes associados ao ciclo celular é regulada positivamente durante as fases graves da doença COVID-19 e normaliza com a recuperação da doença.	42
Figura 12. Visão geral esquemática da coorte e classificação da amostra	44
Figura 13. Os genes associados ao ciclo celular estratificam o COVID-19 de outras doenças respiratórias.	46
Figura 14. A assinatura do ciclo das células sanguíneas de pacientes infectados com SARS-CoV-2 se sobrepõe a outras doenças respiratórias virais.	47
Figura 15. Os genes associados ao ciclo celular mostram forte correlação em COVID-19 grave.	49
Figura 16. Variação genética em genes associados ao ciclo celular entre pacientes com COVID-19.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEGs	Differentially Expressed Genes
DEPs	Differentially expressed proteins
GEO	Gene Expression Omnibus
HC	Healthy Control
ICU	Intensive Care Units (Unidade de Terapia Intensiva UTI)
IQR	Intervalo interquartil
MDSC	Células supressoras derivadas de mieloides imaturas
MPK	Mitogen-activated protein kinase
mRNA	Messenger RNA
MS	Mass Spectrometry
NES	Score de enriquecimento normalizado
PBL	Peripheral Blood Leukocytes
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCA	Principal Component Analysis
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
WES	Whole exome sequencing
WHO	World Health Organization

Sumário

	Página
1. Introdução	11
1.1. O ciclo celular	13
1.1.2. Interfase	14
1.1.3. Fase Mitótica	14
1.1.4. Prófase	15
1.1.5. Metáfase	15
1.1.6. Anáfase	16
1.1.7. Telófase	16
1.1.8. Citocinese	16
1.2. Mecanismos de evasão viral	18
2. Hipótese	19
3. Justificativa	19
4. Objetivo	21
5. Materiais e Métodos	21
5.1. Curadoria de dados transcriptômicos e análise de expressão gênica diferencial	21
5.2. Coleta e análise de dados proteômicos	22
5.3. Análise de Célula única (RNASeq)	22
5.4. A associação de meta-DEGs associados ao ciclo celular com a gravidade da doença	23
5.5. Meta-análise de conjuntos de dados de expressão gênica	24
5.6. Enriquecimento e análise funcional e visualização de dados	25
5.7. Análise de Componente Principal	25
5.8. Análise do interactoma	25
5.9. Análise de correlação	26
5.10. Sequenciamento completo do Exoma	26
6. Resultados	28
6.1. Identificação de estudos cruzados de moléculas associadas ao ciclo celular em pacientes com COVID-19	28
6.2. A infecção por SARS-CoV-2 altera sistemicamente a expressão de genes e proteínas associados ao ciclo celular	31
6.3. A expressão de genes associados ao ciclo celular predomina em leucócitos do sangue periférico de pacientes com COVID-19	37
6.4. Alterações compartimentadas do sangue nas assinaturas do ciclo celular	39
6.5. A expressão de meta-DEGs associados ao ciclo celular se associa à trajetória do COVID-19 e à gravidade da doença	41
6.6. Variantes genéticas em genes relacionados ao ciclo celular se associam ao COVID-19	50
7. Discussão	52
8. Conclusão	55
Referências Bibliográficas	56

Anexo I - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa.

Anexo II - Exames laboratoriais dos pacientes com COVID-19 submetidos à análise do exoma.

1. Introdução

Infecções causadas pelo coronavírus 2 causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2)(BRODIN, 2021) se espalharam pelo mundo, resultando na pandemia da doença de coronavírus 2019 (COVID-19) (CHOI; SMITH, 2021; PARASHER, 2021; POLLARD; MORRAN; NESTOR-KALINOSKI, 2020; SANYAOLU et al., 2021). Embora mais de 11,8 bilhões de doses de vacina tenham sido administradas em todo o mundo (24 de maio, painel da OMS COVID-19), com uma redução resultante nas taxas de letalidade (HACISULEYMAN et al., 2021; KONINGS et al., 2021; VICTORA et al., 2021), o SARS-CoV-2 continua a representar um desafio significativo para a saúde global. De fato, aproximadamente duas mil mortes diárias em todo o mundo podem ser atribuídas ao COVID-19 (COVID LIVE - CORONAVIRUS STATISTICS - WORLDOMETER, [s.d.]). Essa ameaça recorrente à saúde humana continua sendo uma necessidade urgente de entender melhor os mecanismos imunológicos do hospedeiro desencadeados pela infecção por SARS-CoV-2 e identificar novos alvos terapêuticos. A dinâmica de transmissão da SARS-CoV-2 ocorre por meio de gotículas respiratórias infectadas com a partícula viral, atingindo principalmente a mucosa nasal. Sabe-se que as vias aéreas superiores e a orofaringe do hospedeiro possuem a maioria dos receptores-alvo para o desencadeamento da infecção(CEVIK et al., 2020; SUNGNAK et al., 2020). Coronavírus (CoVs) são vírus da família Coronaviridae, envelopes positivos para RNA de fita simples(BRODIN, 2021), e têm diferentes hospedeiros, incluindo pássaros, gado e humanos. A transmissão de pessoa para pessoa ocorre através da passagem de gotículas respiratórias e aerossóis(CEVIK et al., 2020; CORMAN et al., 2018; SOLA et al., 2015). Ao entrar no corpo, os coronavírus precisam promover a ligação específica entre sua proteína de pico (S) e os receptores de entrada na célula hospedeira: aminopeptidase N humana (APN; HCoV-229E), enzima conversora de angiotensina-2 (ACE2; HCoV-NL63, SARS-CoV e SARS-CoV-2) e dipeptidil peptidase 4 (DPP4; MERS-CoV)(HARTENIAN et al., 2020)

Os mecanismos imunes intrínsecos do hospedeiro, que desempenham um papel fundamental no combate à infecção, são regulados por genes que podem sofrer alterações por mutações mendelianas e são altamente variáveis entre os indivíduos, o que pode ser observado por diferentes vias de respostas imunes em indivíduos com infecções causadas pelo mesmo patógeno(CASANOVA et al., 2020).

A gravidade do quadro clínico de infecções por SARS-CoV-2 se estende de assintomática a fatal, e existem várias formas clínicas de COVID-19, evidenciando que não apenas a captação viral e os fatores de virulência, mas também a eficiência da resposta do

hospedeiro desencadeada pela infecção é de grande importância(LI et al., 2022a). Um importante mecanismo hospedeiro descrito na infecção por SARS-CoV-2 é uma intensa resposta inflamatória caracterizada pelo aumento da secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias IL-6, IFN γ , MCP1 e IP-10 no sangue de pacientes afetados(LIEBERMAN et al., 2020). A secreção dessas citocinas e quimiocinas aciona o recrutamento de células imunes do sangue para o local da infecção, a fim de combater o patógeno. Na maioria dos indivíduos, as células recrutadas eliminam a infecção no pulmão, a resposta imune diminui e os pacientes se recuperam. No entanto, em alguns pacientes, ocorre uma resposta imune disfuncional, que desencadeia uma série de citocinas que medeiam a inflamação pulmonar generalizada(ZHANG et al., 2020). Neste contexto, a infecção pelo SARS-CoV-2 exibe uma diferença altamente interindividual no resultado da doença. A forma grave de COVID-19 está associada à desregulação imunológica caracterizada por baixa expressão de HLA-DR mediada por IL-6 e linfopenia, associada à produção sustentada de citocinas e hiperinflamação(GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020). Diversos estudos clínicos demonstram altas concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias em pacientes graves infectados por SARS-CoV, sendo sugerido que a gravidade da doença esteja associada a uma resposta inflamatória sistêmica. Têm sido observados em vários casos uma produção desregulada de células, com a ocorrência de linfopenia e neutrofilia em pacientes graves, e uma liberação de citocinas descontrolada, denominada “*cytokine storm syndrome (CSS)*” (GIAMARELLOS-BOURBOULIS et al., 2020; STRABELLI; UIP, 2020; YANG et al., 2020).”.

Diferentes estudos mostraram que a idade, doenças crônicas, infecções secundárias e altos marcadores inflamatórios sanguíneos como troponina C, mioglobina, proteína C reativa e IL-6 são indicadores de complicações por COVID-19 (STRABELLI; UIP, 2020). Além disso, a gravidade da doença está associada a comorbidades como diabetes, doenças pulmonares crônicas, doenças renais, hipertensão ou doenças cardiovasculares. Essas condições preexistentes podem prejudicar a resposta imune ou amplificar respostas pró-inflamatórias que afetam a evolução benigna do quadro de pacientes com COVID-19, culminando em resultados graves e fatais(CHIAPPETTA et al., 2020).

Esse estado pró-inflamatório crônico poderia levar à redução de funções imunes celulares em macrófagos e em linfócitos(YANG et al., 2020), denominado exaustão celular. Assim, tornando os indivíduos afetados por um estado de maior susceptibilidade a infecções como por SARS-CoV-2 e, conseqüentemente, mais vulneráveis ao desenvolvimento de manifestações mais graves da infecção(DOOLEY; CHAISSON, 2009; LI et al., 2022b). Contudo, a cronologia dos

eventos imunológicos associados ao desenvolvimento de um fenótipo da COVID-19 leve ou grave é complexo e vai desde a ocorrência de linfopenia até a infiltração exacerbada de células do sistema imune inata e adaptativas, oriundas da circulação sanguínea para os pulmões (TAY et al., 2020).

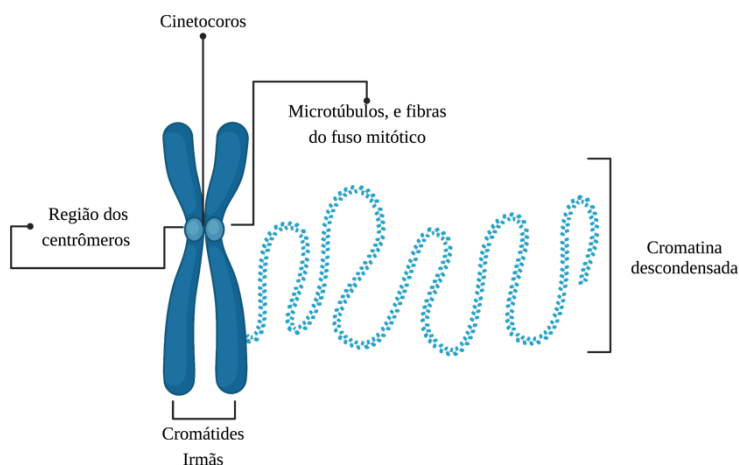
No entanto, há alguns indivíduos previamente saudáveis que desenvolvem a forma grave da Covid-19 associada à desregulação imunológica, sugerindo que variações genético moleculares nesses indivíduos podem estar subjacentes à susceptibilidade à infecção grave por SARS-CoV2.

1.1. O ciclo celular

Pacientes com COVID-19 grave têm respostas imunes inatas e adaptativas sistemicamente alteradas, caracterizadas por hiperativação de células mieloides e linfoides (ASANO et al., 2021; KOUTSAKOS et al., 2021; VAN DER MADE et al., 2020; WEBB et al., 2020; ZHANG et al., 2020) e a presença de altos níveis de autoanticorpos circulantes (CABRAL-MARQUES et al., 2022; WANG et al., 2021a). Além disso, a composição alterada das populações de granulócitos (neutrofilia e uma diminuição acentuada de eosinófilos e basófilos), surgimento de neutrófilos imaturos no sangue periférico (LOURDA et al., 2021), assim como a linfopenia (células T CD4+, células T CD8+, células B e células natural killer) estão todas ligadas a doenças mais graves. Essas observações sugerem alterações nos mecanismos moleculares que orquestram a produção e proliferação celular, incluindo eventos associados ao ciclo celular que permanecem pouco caracterizados.

O ciclo celular é um processo altamente orquestrado que consiste na duplicação de uma célula gerando duas células filhas com o mesmo material genético, e é necessário que o organismo mantenha estruturas e componentes celulares íntegros, como as fibras do fuso, por exemplo, que organizam os cromossomos e os movem durante a mitose, **Figura 1** (BAGGA; BOUCHARD, 2014; STALLER; BARCLAY, 2021). Para dividir – se, são necessárias etapas muito bem definidas e que constituem o ciclo no organismo eucariótico ele é dividido em fases ou estágios: fase gap 1 (G1), fase de síntese (S), fase gap 2 (G2) e fase mitótica (M) (D'AVINO; GIANANTI; PETRONCZKI, 2015).

Figura 1. Componentes celulares envolvidos na divisão eucariótica.



Fonte: Elaboração própria, criado com BioRender.com.

1.1.2. Interfase

A interfase pode ser interpretada como uma preparação celular para a divisão, e é composta por intervalos sendo G1, S e G2. Esta fase é intensa e composta por intervalos cruciais, onde as transições são marcadas pela ativação e inativação de moléculas, que funcionam como pontos de verificação (HODGE; RIDLEY, 2016). Essas moléculas são quinases dependentes de ciclina-E, ciclina-A e ciclina-B e do ciclo ficam ativas em momentos diferentes celular (ZHANG; LEES, 2001). Segundo PINES (1999), a ciclina E-Cdk2 parece ter um papel na promoção da fase S, ciclina A-Cdk2 na fase S e na fase G2-a-M, e ciclina B-Cdk1 durante a mitose. No fim da fase G2, a ciclina B1-Cdk1 é ativada pela fosfatase Cdc25. Por etapas, em G1, a célula cresce e torna-se fisicamente maior, copia organelas, e fabrica os componentes moleculares que precisará nas etapas posteriores (BANERJEE et al., 2011; YUAN et al., 2005). Em S, a célula produz uma cópia completa do DNA em seu núcleo, duplica estruturas associadas aos microtúbulos, que são os centrossomos, que ajudam a separar o DNA durante a fase M (BANERJEE et al., 2011; MATELLÁN; MONJE-CASAS, 2020). Precedendo a mitose, a fase G2 é o momento em que a célula cresce mais, produz proteínas e organelas, e começa a se reorganizar para a mitose (BANERJEE et al., 2011; MEIJER, 2000; NASCIMENTO; PARKHOUSE, 2007).

1.1.3. Fase Mitótica

A fase mitótica (M), marca o momento em que a célula divide seu material genético, o DNA é duplicado e o citoplasma para formar duas novas células, esses processos distintos

relacionados à divisão são nomeados: mitose e citocinese(DOVE et al., 2006; LIU et al., 2017). Nessa etapa, o DNA que está contido no núcleo celular se condensa em cromossomos visíveis e é separado pelo fuso mitótico, que é um componente especializado e formado por microtúbulos. Na fase M, mitose, quatro etapas acontecem: prófase, metáfase, anáfase, e telófase(HODGE; RIDLEY, 2016; MELLOY, 2020; ZHANG; LEES, 2001). É preciso notar que as células com capacidade mitótica levam tempos diferentes para completar o ciclo celular, entre 9-24 horas para se dividir, e é decorrente do microambiente celular (ZHANG; ZHENG, 2020).

1.1.4. Prófase

No início da prófase, a célula começa a remodelar algumas estruturas, preparando o ambiente para a divisão dos cromossomos. Assim, ocorrem os seguintes processos: condensação do cromossomo, para facilitar a separação, formação do fuso mitótico, que é uma estrutura feita de microtúbulos, as fibras fortes são parte do "esqueleto" da célula e sua função é organizar os cromossomos e movê-los durante a mitose, o fuso cresce entre os centrossomos à medida que eles se separam(SAMEJIMA et al., 2022; SCHEFFLER et al., 2022). O nucléolo, uma parte do núcleo onde são formados os ribossomos, desaparece. Já no final da prófase, o fuso mitótico começa a capturar e organizar os cromossomos em etapas: os cromossomos concluem a condensação e ficam compactos, há o rompimento do envoltório nuclear e isto libera os cromossomos, o fuso mitótico cresce mais, e alguns microtúbulos começam a "capturar" os cromossomos(DOVE et al., 2006; MAIATO, 2021).

1.1.5. Metáfase

Neste momento todos os cromossomos estão alinhados na placa metafásica, que é um termo utilizado para o plano em que os cromossomos estão alinhados. Os cinetócoros, sendo dois de cada cromossomo, se ligam aos microtúbulos de polos opostos do fuso (BARISIC; RAJENDRAPRASAD; STEBLYANKO, 2021; ORIOLA; JÜLICHER; BRUGUÉS, 2020). Precedendo a anáfase, na metáfase a célula vai verificar se todos os cromossomos estão na placa metafásica com seus cinetócoros corretamente ligados aos microtúbulos. Essa é uma etapa de checagem do fuso e ajuda a garantir que as cromátides irmãs se dividam uniformemente entre as duas células-filhas quando se separarem na próxima etapa. A célula interrompe a divisão caso um cromossomo não esteja adequadamente alinhado ou ligado, e o problema seja resolvido (BARNUM; O'CONNELL, 2014).

1.1.6. Anáfase

O momento em que as cromátides irmãs se separam uma da outra e são empurradas em direção às extremidades opostas da célula, é denominado de anáfase. As coesinas, são as proteínas "cola" que mantêm as cromátides irmãs unidas são quebradas, permitindo que elas se separem, cada par de cromossomos são puxados em direção aos polos opostos da célula (PINES, 1999; VUKUŠIĆ; BUĐA; TOLIĆ, 2019). A célula se torna fisicamente mais longa, devido aos microtúbulos não ligados aos cromossomos se alongam e se empurram mutuamente.

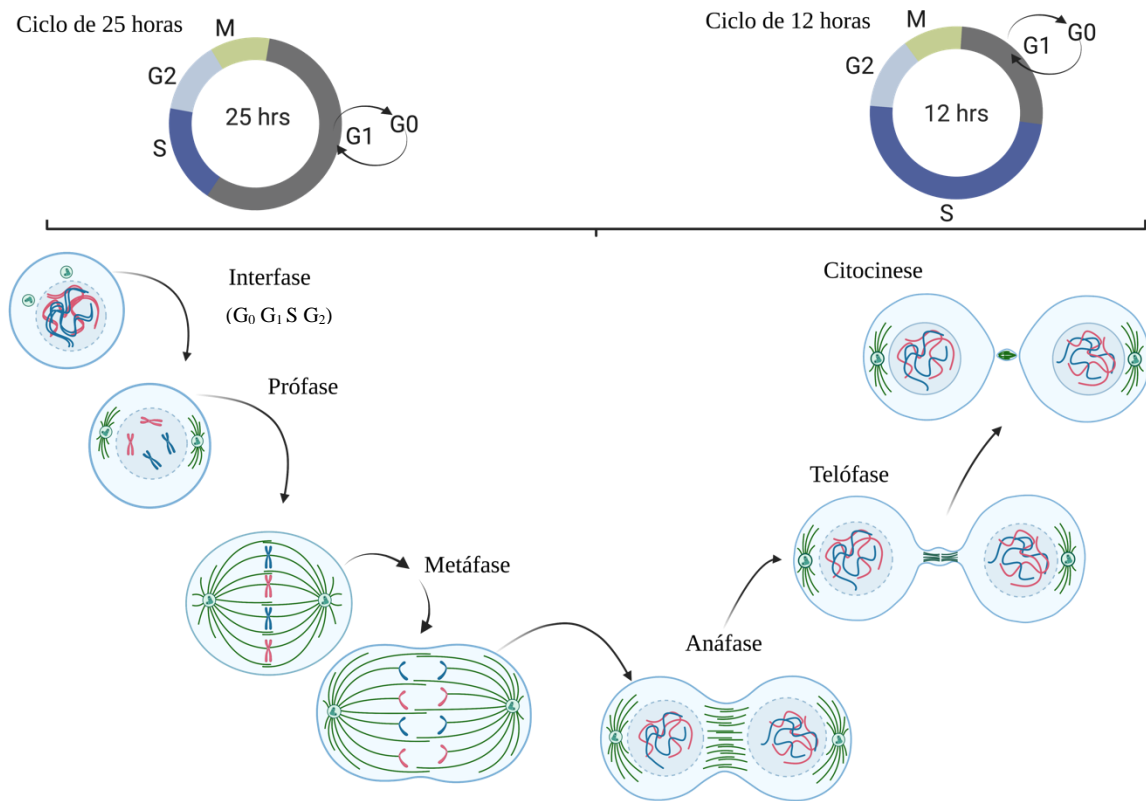
1.1.7. Telófase

Quando a célula está quase completamente dividida, marca o início da telófase, e começa a reestabelecer sua conformação normal à medida que a citocinese se inicia (MOURA; CONDE, 2019). Na telófase os processos envolvem a divisão do fuso mitótico, são formados dois novos núcleos sendo um para cada conjunto de cromossomos, há o reaparecimento nucleares e dos nucléolos e a desncondensação dos cromossomos (LOUGH et al., 2019).

1.1.8. Citocinese

Por fim, na citocinese, o citoplasma da célula é dividido em dois, formando duas novas células, esse processo começa assim que a mitose termina, com certa sobreposição, (**Figura 2**) (DOVE et al., 2006).

Figura 2 Cronologia dos eventos que envolvem o ciclo celular, da interfase à citocinese.



Fonte: Elaboração própria, 2022. Criado com BioRender.com.

Assim, os vírus utilizam diversas estratégias e alvos moleculares para criar condições favoráveis à replicação (FAN; SANYAL; BRUZZONE, 2018; YODER et al., 2017) interferindo nos processos do ciclo da célula hospedeira (NASCIMENTO; PARKHOUSE, 2007; SU et al., 2020). Vírus como influenza, herpes e coronavírus (SARS-CoV-2 e coronavírus murino/vírus da hepatite do camundongo) interferem em diferentes pontos de verificação do ciclo celular. Esses vírus promovem ou impedem a progressão do ciclo celular interrompendo a síntese de proteínas (transição G₀/G₁), a duplicação do DNA (fase G₁/S) ou a divisão celular (fase G₂/M)(COLEMAN; MARSHALL; OLSON, 2004; LI et al., 2011; PALMISANO et al., 2017).

1.2. Mecanismos de evasão viral

Os vírus se comportam como parasitas intracelulares que dependem dos recursos da célula hospedeira para replicação, e o acesso a esses recursos pode ser limitado a uma fase particular do ciclo celular (NASCIMENTO; COSTA; PARKHOUSE, 2012; NASCIMENTO; PARKHOUSE, 2007). Sabe-se que o desencadeamento de uma infecção depende da genética do hospedeiro e apresenta sintomas e morbidades variados, nos casos mais graves leva à destruição de vários tecidos. Patógenos de alto interesse clínico exploram vias e processos celulares modulando a maneira como a célula responde a estímulos externos e internos, criando um ambiente favorável para sua propagação (LOWREY; CRAMBLET; BENTZ, 2017; SURYAWANSHI et al., 2021). Estudos anteriores com modelos celulares de células A549, HEK293T e células Vero (BOUHADDOU et al., 2020; CHEN et al., 2004; NASCIMENTO; PARKHOUSE, 2007; SURJIT et al., 2006; YUAN et al., 2005, 2006), disponíveis na **Tabela 1**, demonstraram diferentes subversões de outros tipos virais, como por exemplo a subversão do vírus do papiloma humano (HPV), o vírus da dengue (DENV), o vírus da febre amarela (YFV), o vírus Ebola (EBOV) e o vírus aviário da bronquite infecciosa causada por coronavírus (IBV) (CIGNO et al., [s.d.]; DOVE et al., 2006; FAN; SANYAL; BRUZZONE, 2018, 2018; SANYAL, 2020). Dentre os tipos de subversão em geral, os estudos com tipos virais apontam para subversão da parada do ciclo celular em linfócitos T ou B, onde há inibição da expansão clonal, há também subversão, para vírus carcinogênicos, que antagonizam os checkpoints do ciclo celular para transformação do ambiente (STALLER; BARCLAY, 2021).

Desde 2008, com a revolução na genômica graças a técnicas como Next Generation Sequencing (NGS) e RNA sequencing, os estudos de transcriptoma abriram uma discussão sobre o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), e outros vírus, incluindo vírus de caráter oncogênico, sobre a possível manipulação do ciclo celular do hospedeiro (V'KOVSKI et al., 2021; YODER et al., 2017).

Tabela 1: fases do ciclo celular que sofreram interferências por outros tipos virais de acordo com outros estudos

Nome do Vírus	Abreviação	Tipo Viral RNA/ DNA	Família	Fase afetada	Referência
Human Immunodeficiency Virus type 1	HIV-1	RNA	<i>Retroviridae</i>	G1/S and G2/M	COSENZA-NASHAT et al., 2007.; LIANG et al., 2005.; Davy&Doorbar, 2007.;GROSCHER AND BUSHMAN, 2005; Brasey et al., 2003;
Human T-cell leukemia virus type I	HTLV-1	RNA	<i>Retroviridae</i>	G1/S	YODER et al., 2017.
Influenza A subtype H1N1	H1N1	RNA	<i>Orthomyxoviridae</i>	G0/G1	FAN et al., 2017.
Epstein-Barr virus	EBV	DNA	<i>Herpesviridae</i>	G0/G1	IZUMIYA et al., 2003.
Human papillomavirus	HPV	DNA	<i>Papillomaviridae</i>	G2/M	BANERJEE et al., 1993.; Reinson et al. 2015.; Busch et al., 2017.; Brenna & Syrjänen, 2003.
Dengue virus type 1	DENV-1	RNA	<i>Flaviviridae</i>	G2/M	SONG et al., 2013.; AbuBakar et al. 2014.
Dengue virus type 2	DENV-2				
Dengue virus type 3	DENV-3				
Dengue virus type 4	DENV-4				
Simian 40	SV40	DNA	<i>Polyomaviridae</i>	G1/S	LEHMAN et al., 2000.
Herpes Human Virus Type 6	HHV-6	DNA	<i>Herpesviridae</i>	G2/M	LI et al., 2011.
Infectious bronchitis virus	IBV	RNA	<i>Coronaviridae</i>	G2/M	DOVE et al., 2006.
Cytomegalovirus	CMV	DNA	<i>Herpesviridae</i>	G1/S	BRESNAHAN et al., 1996.; DITTMER & MOCARSKI, 1997.
Middle East respiratory syndrome coronavirus	MERS-CoV	RNA	<i>Coronaviridae</i>	NA	NA
Severe acute respiratory syndrome coronavirus	SARS-CoV	RNA	<i>Coronaviridae</i>	G1/S	YUAN et al., 2005.; SURJIT et al., 2006.; YUAN et al., 2006; YUAN et al., 2007.
Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	SARS-CoV-2	RNA	<i>Coronaviridae</i>	G2/S	BOUHADDOU et al., 2020.
Rotavirus	RV	RNA	<i>Reoviridae</i>	G2/S	GLUCK et al., 2017.
Ebola	EBOV	RNA	<i>Filoviridae</i>	G1/S	Kota et al., 2012.
Hepatitis B virus	HBV	DNA	<i>Hepadnaviridae</i>	G2/M	Xia et al., 2018.
Hepatitis C virus	HCV	RNA	<i>Flaviviridae</i>	G2/M	Kannan et al., 2011.
Measles virus	MV	RNA	<i>Paramyxoviridae</i>	G0/G1	NANICHE et al., 2020.
Enterovirus 71	EV71	RNA	<i>Picornaviridae</i>	S phase	YU et al., 2015.
Herpes Simplex Virus	HSV	DNA	<i>Herpesviridae</i>	G0/G1	FLEMINGTON, 2001.
Zika virus	ZIKV	RNA	<i>Flaviviridae</i>	G2/M	LIU et al., 2018.

2. HIPOTESE

Nossa hipótese é que a infecção por SARS-CoV-2 induz alterações sistêmicas nas moléculas associadas ao ciclo celular em pacientes com COVID-19 que se associam a gravidade da doença.

3. JUSTIFICATIVA

Embora mais de 12.308.330.588 doses de vacina tenham sido administradas no mundo, mais de 800 mil casos por COVID-19 são notificados a cada 24 horas, desses 33 mil só no Brasil. Além disso, a Organização Mundial da Saúde prevê a PHSM (Saúde Pública e Medidas Sociais)(WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022) que são protocolos desenvolvidos pelo órgão que regulamentam medidas tomadas por países, territórios e áreas que impõem, de forma

individual, essas regras ou diretrizes de acordo com o número de casos da região para limitar a propagação do coronavírus. Somado a isso, a fisiopatologia de COVID-19 permanece pouco esclarecida impedindo o desenvolvimento de alvos terapêuticos, além dos impactos, recentemente mensuráveis, como as sequelas pós-aguda do COVID-19 (PASC)(SU et al., 2022).

Nesse contexto, um grande esforço global tem sido empregado para desenvolver técnicas e estudos para que se ampliem aspectos associados a COVID-19(ANDREAKOS et al., 2021; BOUHADDOU et al., 2020) e medidas mais efetivas possam ser tomadas, evitando a propagação, o impacto ambiental, social e humano(GIBBONS et al., 2022; PIZARRO-ORTEGA et al., 2022). Nos últimos anos, as ferramentas de sequenciamento(CABRAL-MARQUES et al., 2022; UNTERMAN et al., 2022) apontaram grandes avanços sendo uma estratégia valiosa para estudar a heterogeneidade celular em muitos campos, como por exemplo o da virologia e a sua interação com o hospedeiro humano. Constituindo - se uma avaliação através das análises bioinformáticas, as ciências “ômicas”(FREIRE et al., 2021; SCHIMKE et al., 2022) possibilitam analisar variações em genes, proteínas e metabólitos, a fim de fornecer um perfil do organismo de forma ampla e capaz de prever, alterações em componentes celulares, moleculares, vias e processos biológicos. Os ensaios *in silico* produzem uma resposta biológica dada pelo organismo, sendo uma forma de verificar como se dá a progressão, ou quais os eventos que a conferem (LÓPEZ-CORTÉS et al., 2021; RATO et al., 2017).

Tendo como ponto o fato das vias de sinalização se conectarem a genes alvos, nas fases do ciclo celular (BERTOLI; SKOTHEIM; DE BRUIN, 2013; DALTON, 2015) e desenvolverem a ativação de programas de transcrição que direcionarão o destino da célula, os estudos se voltam não só para genética do hospedeiro, mas também para a maquinaria adquirida pelos coronavírus(BAGGA; BOUCHARD, 2014).

Os coronavírus possuem uma característica comum em suas infecções que consiste em manipular o ciclo celular do hospedeiro para replicação viral(SU et al., 2021). Os estudos recentes, envolvendo o ciclo celular humano, basearam - se na hipótese de inibidores do ciclo celular como terapia potencial para a doença de Coronavírus 2019 (COVID-19), e em paralelo outros estudos consideraram a genética do hospedeiro(ANDREAKOS et al., 2021; BARNUM; O'CONNELL, 2014; MATELLÁN; MONJE-CASAS, 2020) como um fator crucial para o desenvolvimento da COVID-19 grave. O mecanismo de manipulação de SARS-CoV-2, em relação aos distúrbios do ciclo celular no hospedeiro humano, ou em que estágio ele estaria intervindo, não é amplamente conhecido e continua a ser explorado(CORMAN et al., 2018; SANYAL, 2020). Dessa forma, buscamos entender como alterações moleculares associadas ao

ciclo celular do hospedeiro durante a resposta ao SARS-CoV-2 está associada ao desenvolvimento da gravidade da COVID-19.

4. Objetivos

Objetivo Geral

Realizar uma análise integrativa de dados ômicos (transcriptômicos, proteômicos e genômicos) de pacientes com COVID-19 para compreendermos as redes moleculares associadas ao ciclo celular envolvidas na resposta imune do SARS-CoV-2.

Objetivos específicos

Integrar dados ômicos de RNAseq de repositórios públicos a fim de identificar padrões e características genético-moleculares que indiquem especificidade para COVID-19 em comparação a outras doenças, controles saudáveis e controles negativos.

5. Materiais e Métodos

5.1. Curadoria de dados transcriptômicos e análise de expressão gênica diferencial

Pesquisamos no repositório público de dados genômicos Gene Expression Omnibus (GEO; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (CLOUGH; BARRETT, 2016) para dados de transcriptoma humano de pacientes com COVID-19, publicados entre dezembro de 2019 e janeiro de 2021. A seleção do estudo foi realizada conforme descrevemos recentemente (SCHIMKE et al., 2022) seguindo as diretrizes de meta-análise para obter análises integrativas (SANCHIS et al., 2021; ZHOU et al., 2019). Esta pesquisa resultou em um total de cinco conjuntos de dados, incluindo dois transcriptomas derivados de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (GSE152418 e GSE161731) (ARUNACHALAM et al., 2020; MCCLAIN et al., 2021), um de leucócitos de sangue periférico total (PBL) (GSE157103) (OVERMYER et al., 2021), e dois de *swabs* nasofaríngeos (GSE152075 e GSE156063) (LIEBERMAN et al., 2020; MICK et al., 2020). No total, dados de transcriptoma de 717 amostras COVID-19 e 359 amostras não COVID-19 (incluindo controles saudáveis e pacientes com outras doenças infecciosas) foram incluídos em nossa análise (**Figura 3**, primeiro quadrante). As contagens de leitura foram transformadas em contagens *log2* por milhão (CPM), e os genes expressos diferencialmente (DEGs) entre os grupos foram identificados usando o pipeline DESeq2 (LOVE et al., 2015)

através do NetworkAnalyst 3.0(ZHOU et al., 2019) plataforma de bioinformática. Os DEGs de cada conjunto de dados foram determinados aplicando os pontos de corte estatísticos de $\log_2 \text{fold-change} > 1$ (regulado para cima), $\log_2 \text{fold change} < -1$ (downregulated) e valor de p ajustado $< 0,05$. DEGs compartilhados em diferentes conjuntos de dados foram exibidos usando as ferramentas on-line *Upset plot* e *Circos ca* (KHAN; MATHELIER, 2017; KRZYWINSKI et al., 2009).

5.2. Coleta e análise de dados proteômicos

Dados proteômicos de amostras de plasma, soro e swab de pacientes com COVID-19 e não COVID-19 foram selecionados de estudos relatados anteriormente (OVERMYER et al., 2021; VANDERBOOM et al., 2021; ZHANG et al., 2020). Esses dados estão disponíveis em *Proteome X change* (<http://www.proteomexchange.org/>) (VIZCAÍNO et al., 2014) (PXD020601, PXD022889) ou *iProX* - recurso de proteoma integrado (IPX0002285000) ou dos dados suplementares de Akgun et al.(AKGUN et al., 2020). Nossa análise de proteoma incluiu um total de 191 amostras COVID-19 e 71 amostras não COVID-19 (AKGUN et al., 2020; D'ALESSANDRO et al., 2020; LI et al., 2021; OVERMYER et al., 2021; VANDERBOOM et al., 2021) (**Figura 3**, segundo quadrante). Os valores de abundância de proteína bruta foram quantificados, normalizados e \log_2 transformados. As diferenças na expressão de proteínas entre pacientes com COVID-19 e não COVID-19 foram calculadas usando o *Método de Fisher* (HUO et al., 2020) usando a plataforma computacional *Perseus* para análise abrangente de dados de proteômica(TYANOVA et al., 2016). Consideramos um ponto de corte de valor de $p < 0,05$ e $\log_2 \text{fold-change} > 0,5$ e $< -0,5$ para proteínas diferencialmente expressas.

5.3. Análise de Célula única (RNASeq)

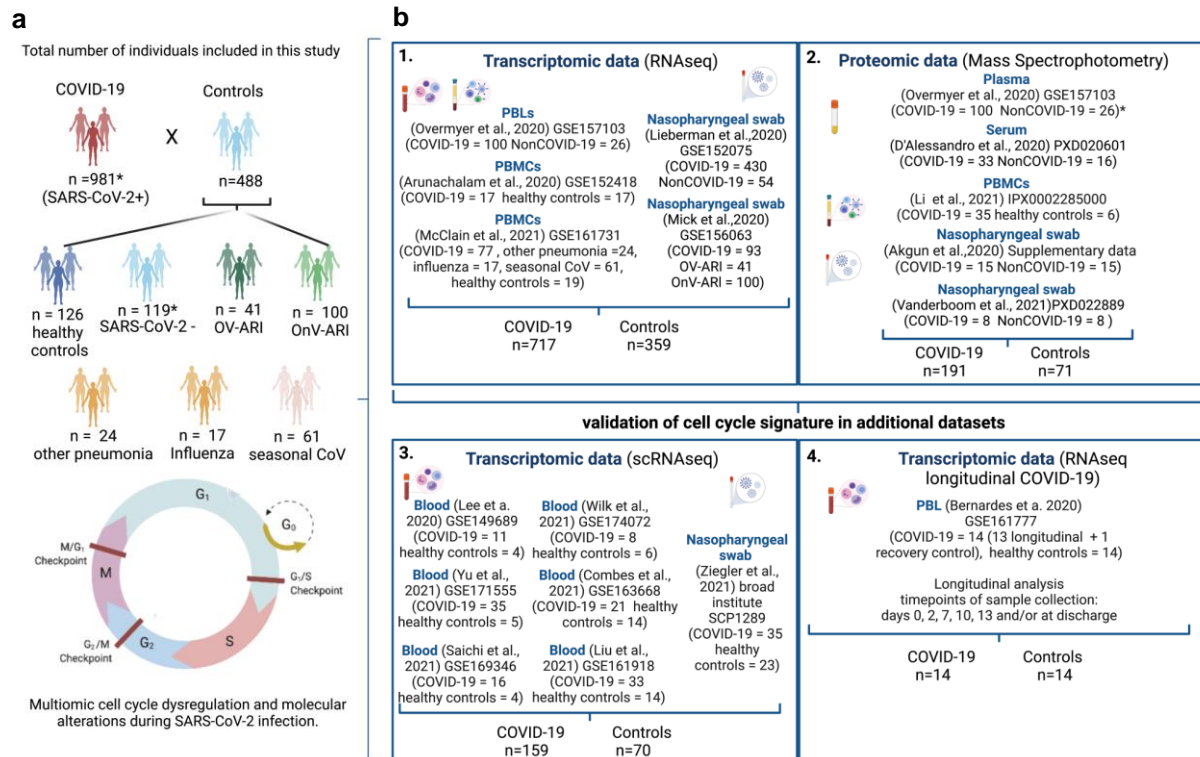
Os conjuntos de dados de célula única COVID-19 foram baixados do banco de dados GEO (GSE149689(LEE et al., 2020), GSE174072(WILK et al., 2021), GSE171555(YU et al., 2021), GSE163668(COMBES et al., 2021), GSE169346(SAICHI et al., 2021), GSE161918(LIU et al., 2021b)) e *Broad institute* (SCP1289(ZIEGLER et al., 2021)), e analisados separadamente usando o pacote *Seurat* (v.4.0.4)(HAO et al., 2021) em *software R* (v 4.1.1). No total, esses estudos contêm 159 pacientes com COVID-19 e 70 controles (**Figura 3**, terceiro quadrante). Células com mais de 200 genes expressos foram selecionadas para

análises adicionais. As características expressas em menos de três células foram removidas na análise. As células com <15% de UMIs derivadas do genoma mitocondrial foram removidas. Após a filtragem de qualidade, as matrizes de expressão gênica foram processadas através do *pipeline* de processamento padrão da *Seurat* (HAO et al., 2021). O ponto de corte para DEGs significativos correspondia a um valor de p ajustado <0,05

5.4. A associação de meta-DEGs associados ao ciclo celular com a gravidade da doença

Usamos o *ImpulseDE2*, um modelo de variação intraindividual de DEGs ao longo do tempo (SANDER; SCHULTZE; YOSEF, 2017) como descrito anteriormente (BERNARDES et al., 2020b) para caracterizar DEGs associados ao ciclo celular expressos significativamente ao longo da trajetória da doença COVID-19 usando dados de *RNAseq* em massa da coorte 1 do conjunto de dados GSE161777 (BERNARDES et al., 2020b) (**Figura 3**; quarto quadrante). Realizamos a PCA (LEVER; KRZYWINSKI; ALTMAN, 2017; RINGNÉR, 2008) e medir o poder de estratificação dos DEGs associados ao ciclo celular na distinção da gravidade do COVID-19 em PBMCs, PBLs e *swabs* nasofaríngeos usando as funções R *prcomp* e *princomp* por meio do pacote *fatoextra* (Análise de Componente Principal em R: *prcomp* vs. *princomp*) (KASSAMBARA, 2017). Além disso, empregamos modelo de floresta aleatória (*random forest*), um algoritmo de aprendizado de máquina, para classificar a importância dos DEGs associados ao ciclo celular para discriminar pacientes com COVID-19 de acordo com a gravidade da doença (COVID-19_ICU versus COVID-19_nonICU) e de outras doenças respiratórias graves (COVID-19). 19_ICU versus não COVID-19_ICU) conforme descrito anteriormente (CABRAL-MARQUES et al., 2022). Treinamos o modelo de floresta aleatória (*random forest*) usando as funcionalidades do pacote R *randomForest* (versão 4.6.14) (LIAW; WIENER, [s.d.]). Cinco mil *trees* foram utilizadas e três variáveis foram mostradas novamente. A análise de acompanhamento foi realizada com a diminuição de *Gini*, número de nós e profundidade mínima média como critérios para determinar a importância da variável. A adequação do modelo de floresta aleatória (*random forest*) como classificador foi avaliada por meio da taxa de erro *out-of-bags* e da curva *ROC*. Para validação cruzada, dividimos o conjunto de dados em conjuntos de treinamento e teste, usando 75% das observações para treinamento e 25% para teste.

Figura 3 Visão geral do estudo e número total de genes e proteínas diferencialmente expressos por grupo de estudo.



(a) Número total de indivíduos por grupo (COVID-19 e controles) incluídos no estudo. Os grupos de controle são compostos por controles saudáveis e indivíduos com outras infecções, incluindo outras doenças respiratórias agudas virais (OV-ARI), outras doenças respiratórias agudas não virais (OnV-ARI), outras pneumonias, influenza e coronavírus sazonal que não SARS-CoV-2 (CoV). (b) Visão esquemática resumindo os conjuntos de dados transcriptômicos e proteômicos usados neste estudo. *Indica o conjunto de dados que forneceu dados de transcriptoma e proteoma dos mesmos indivíduos.

5.5. Meta-análise de conjuntos de dados de expressão gênica

Uma meta-análise abrangente de conjuntos de dados de expressão gênica foi realizada por meio do *NetworkAnalyst 3.0* (ZHOU et al., 2019) usando parâmetros padrão. Resumidamente, os conjuntos de dados GSE157103 e GSE152418 foram ajustados para efeito de lote e *meta-DEGs* foram visualizados por *PCA* e gráficos de densidade. Usamos o *Método de Fisher* para obter valores de p combinados para integração de informações. Usamos um *volcano plot* e um gráfico de *Ridgeline* para exibir os *meta-DEGs* e visualizamos sua distribuição de *fold-change* nas vias enriquecidas, respectivamente. A distribuição da expressão gênica foi baseada na média de *log2 fold-change*. Um mapa de calor de agrupamento

hierárquico visualizou os padrões de expressão gênica associados aos processos do ciclo celular.

5.6. Enriquecimento e análise funcional e visualização de dados

Para realizar a análise de enriquecimento para diferentes conjuntos de DEGs, usamos o ClusterProfiler(YU et al., 2012) Pacote R no R studio Versão 1.4.1106 (RStudio; <https://www.rstudio.com>) e Enrichr (CHEN et al., 2013; KULESHOV et al., 2016) ferramenta on-line. A análise de enriquecimento de proteínas significativas foi realizada usando a ferramenta *ShinyGO* (GE et al., 2020). Conjuntos de *DEGs* e *DEPs* associados ao ciclo celular foram visualizados em mapas de calor baseados em bolhas aplicando uma semelhança de cosseno negativo usando a web ferramenta *Morpheus* (STARRUSS et al., 2014). Mapas de calor circulares representando cada fase do ciclo celular foram gerados usando o pacote *Circlize R* (GU et al., 2014) no R estúdio. Os gráficos em *boxplots* mostram os diferentes níveis de expressão de genes associados ao ciclo celular de diferentes coortes foram gerados usando os pacotes *R ggpubr*, *lemon* e *ggplot2* no *R studio*. As diferenças estatísticas nos níveis de expressão gênica foram avaliadas usando um teste de soma de classificação de *Wilcoxon* bilateral, conforme descrito anteriormente(WANG et al., 2021a). Além disso, os módulos de co-expressão gênica foram analisados por meio do *CEMiTool* (RUSSO et al., 2018).

5.7. Análise de Componente Principal

Realizamos uma Análise de Componentes Principais (*PCA*)(LEVER; KRZYWINSKI; ALTMAN, 2017; RINGNÉR, 2008) para medir o poder de estratificação dos DEGs associados ao ciclo celular na distinção da gravidade do COVID-19 em PBMCs, PBLs e *swabs* nasofaríngeos usando as funções *R prcomp* e *princomp* por meio do pacote *fatoextra* (Análise de Componente Principal em R: *prcomp* vs. *princomp*)(KASSAMBARA, 2017).

5.8. Análise do interactoma

Para análises abrangentes de rede e interagente, usamos o *NAViGaTOR 3.0.14*(BROWN et al., 2009) *software* para construir uma rede visualizando interações físicas proteína-proteína entre as moléculas associadas ao ciclo celular obtidas de nossa análise ômica. As moléculas associadas ao ciclo celular foram usadas como entrada no Banco de Dados de Interações Integradas (IID versão 2021-05; <http://ophid.utoronto.ca/iid>)(KOTLYAR et al., 2022) para

identificar interações físicas diretas de proteínas. A rede resultante foi anotada, analisada e visualizada usando o *NAViGaTOR 3.0.16* (BROWN et al., 2009). A rede final foi combinada com legendas usando o *Adobe Illustrator 26.0.3*.

5.9. Análise de correlação

Utilizamos os *datasets* GSE157103 (OVERMYER et al., 2021) e GSE152418 (ARUNACHALAM et al., 2020) para realizar a análise de correlação entre os genes associados ao ciclo celular, ou seja, os 10 principais *meta-DEGs* com a pontuação mais alta prevendo a gravidade do COVID-19, conforme obtido na análise de *random forrest*. Correlogramas foram gerados com o *webtool Intervene* (KHAN; MATHELIER, 2017) (<https://intervene.readthedocs.io/en/latest/index.html>) usando o coeficiente de *correlação de Spearman*.

5.10. Sequenciamento completo do Exoma

Para a análise do exoma, incluímos 13 pacientes brasileiros que desenvolveram doença sintomática e recorrente por COVID-19, antes de receber qualquer vacina para SARS-CoV-2. Dados e detalhes do paciente e sintomas foram descritos na **Tabela 2** os exames laboratoriais estão dispostos no **Anexo II**.

Tabela 2: Características clínicas e biológicas dos indivíduos envolvidos no estudo.

<i>N = Não</i>	<i>S = Sim</i>			<i>M = Masc.</i>	<i>F = Femin.</i>				
Caracterização clínica de pacientes com COVID-19									
Variáveis	Gênero	Idade (anos)	Peso (kg)	Altura (metros)	Histórico de doenças	Outras infecções prévias	Epsódio de Sepses	Reação adversa à vacina	Desregulação imunológica
Amostras									
AJ 01	M	54	82	1,72	N	N	N	N	N
ITA 0361	M	25	70	1,82	Hipertensão	N	N	N	N
ITA 0317	M	34	82	1,78	Diabetes mellitus II	N	N	N	N
ITA 0313	M	48	92	1,65	Obesidade	N	N	N	N
ITA 0354	M	22	72	1,8	N	N	N	N	N
ITA 0355	M	67	75	1,67	Diabetes mellitus II, Hipertensão	N	N	N	N
ITA 0352	M	19	75	1,72	N	N	N	N	N
ITA 0325	M	22	62	1,68	Diabetes mellitus I	N	N	N	S - Asma e Lúpus (Mãe)
ITA 0371	M	19	62	1,67	N	N	N	N	N
GLO 0067	F	48	62	1,6	N	S - Reinfecção tripla por COVID-19	N	N	N
GLO 0064	F	45	69	1,56	N	S - Zika	N	N	N
GLO 0120	M	42	76	1,76	N	S - Dengue	N	S	N
GLO 0066	M	40	67	1,61	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica - DPOC, paciente fumante	S - Zika, Dengue e Chikungunia	N	N	N

O Laboratório de Bioquímica e Imunologia Clínica da Universidade Federal de Sergipe (LaBiC-Immun) obteve o diagnóstico por RT-PCR e coletou amostras de sangue e soro para análise do exoma.

Após a extração do DNA, a preparação da biblioteca foi realizada com o *Nextera Flex Kit, Illumina (ILMN, San Diego, CA, EUA)*. O *XGen Exome Research Panel V2.0 (Integrated DNA Technologies, IN, EUA)* foi utilizado para reconhecer alvos e reduzir a ligação fora do alvo, maximizando a cobertura. A execução de sequenciamento foi realizada no *NovaSeq6000 Illumina*. O produto de sequenciamento foi disponibilizado no servidor Centro de Genomas através de protocolos *SSH/SFTP*. Baixamos os arquivos de dados brutos e os analisamos pelo *software* de inteligência artificial *Sophia DDM*® (CAMPANELLA et al., 2020; KYRIAZIS et al., 2019; VENDRELL et al., 2018). Dessa análise, foram extraídos genes, que atendiam aos *scores* aplicados de acordo com as diretrizes da Escola Americana de Genética Médica e Genômica (ACMG, *American School of Medical Genetics and Genomics*) (RICHARDS et al., 2015), associados ao ciclo celular e nas categorias A (Altamente Patogênico) e B (Patogênico) e os representamos utilizando o *software Circus* (<http://circos.ca/>) (KRZYWINSKI et al., 2009).

6. Resultados

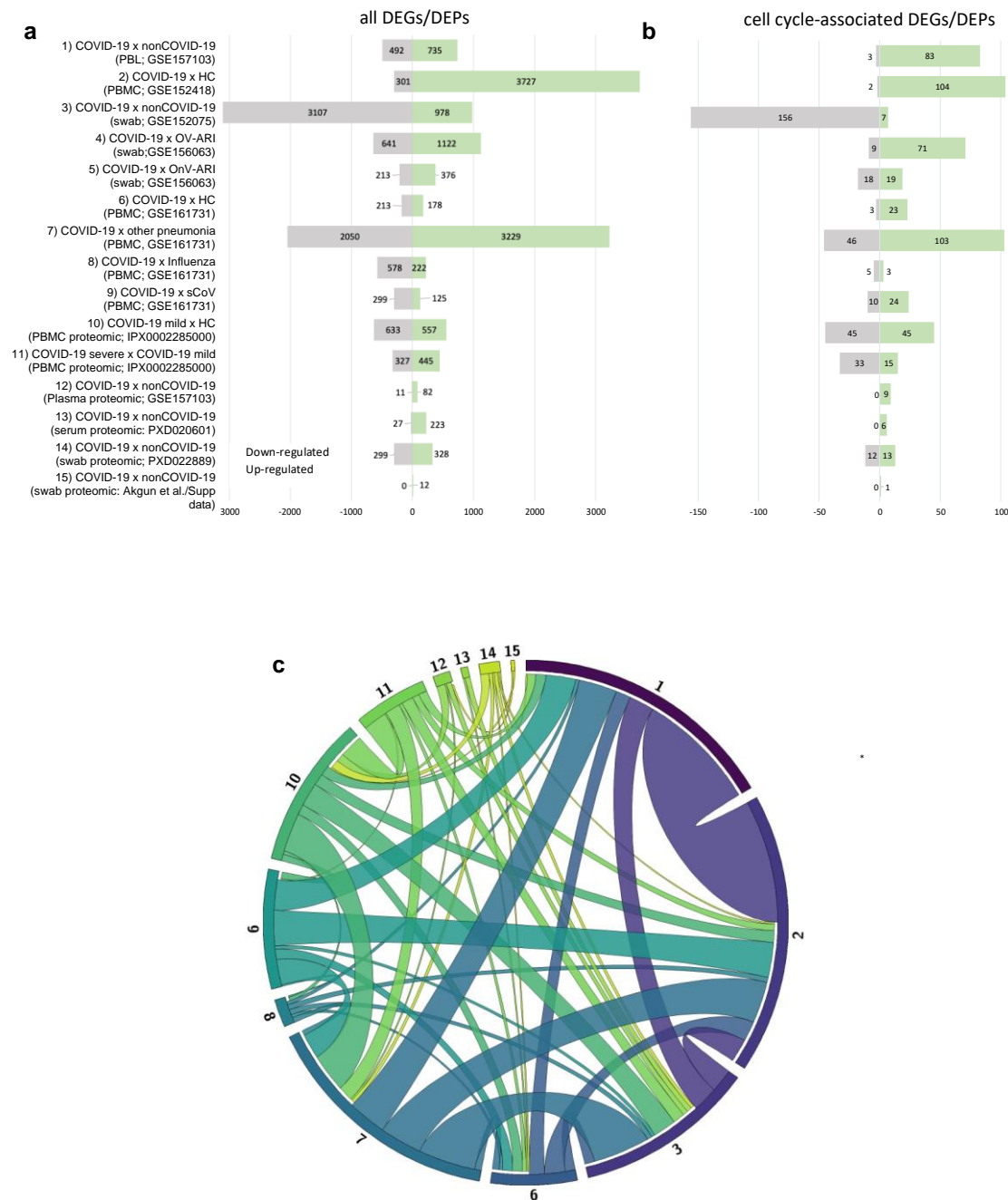
6.1. Identificação de moléculas associadas ao ciclo celular em diferentes grupos de pacientes com COVID-19.

Realizamos uma análise cruzada de 9 conjuntos de dados disponíveis publicamente, incluindo 1.212 indivíduos, dos quais 808 eram positivos para SARS-CoV-2 e 404 eram controles negativos para SARS-CoV-2 (saudáveis ou indivíduos com outras doenças respiratórias) (**Figura 3**).

Proteínas diferencialmente expressas (*DEPs*) foram obtidas a partir de cinco conjuntos de dados proteômicos gerados por espectrometria de massa (*MS*), cada um obtido de plasma, soro e PBMCs, enquanto dois usaram *swabs* nasofaríngeos. Os DEGs foram obtidos a partir de cinco conjuntos de dados de sequenciamento de RNA em massa (*RNA seq*), um de PBLs, dois de PBMCs e dois de *swabs* nasofaríngeos.

Encontramos 1.647 DEPs regulados positivamente e 1.297 regulados negativamente, enquanto 10.692 DEGs regulados positivamente e 7.894 regulados negativamente nesses 9 conjuntos de dados (**Figura 4a**). Para testar nossa hipótese, procuramos DEPs e DEGs associados ao ciclo celular e encontramos, 179 DEPs (89 regulados positivamente e 90 regulados negativamente) e 689 DEGs (437 regulados positivamente e 252 regulados negativamente) são moléculas associadas ao ciclo celular (**Figura 4b**), incluindo vários comuns DEPs e DEGs (**Figura 4c**).

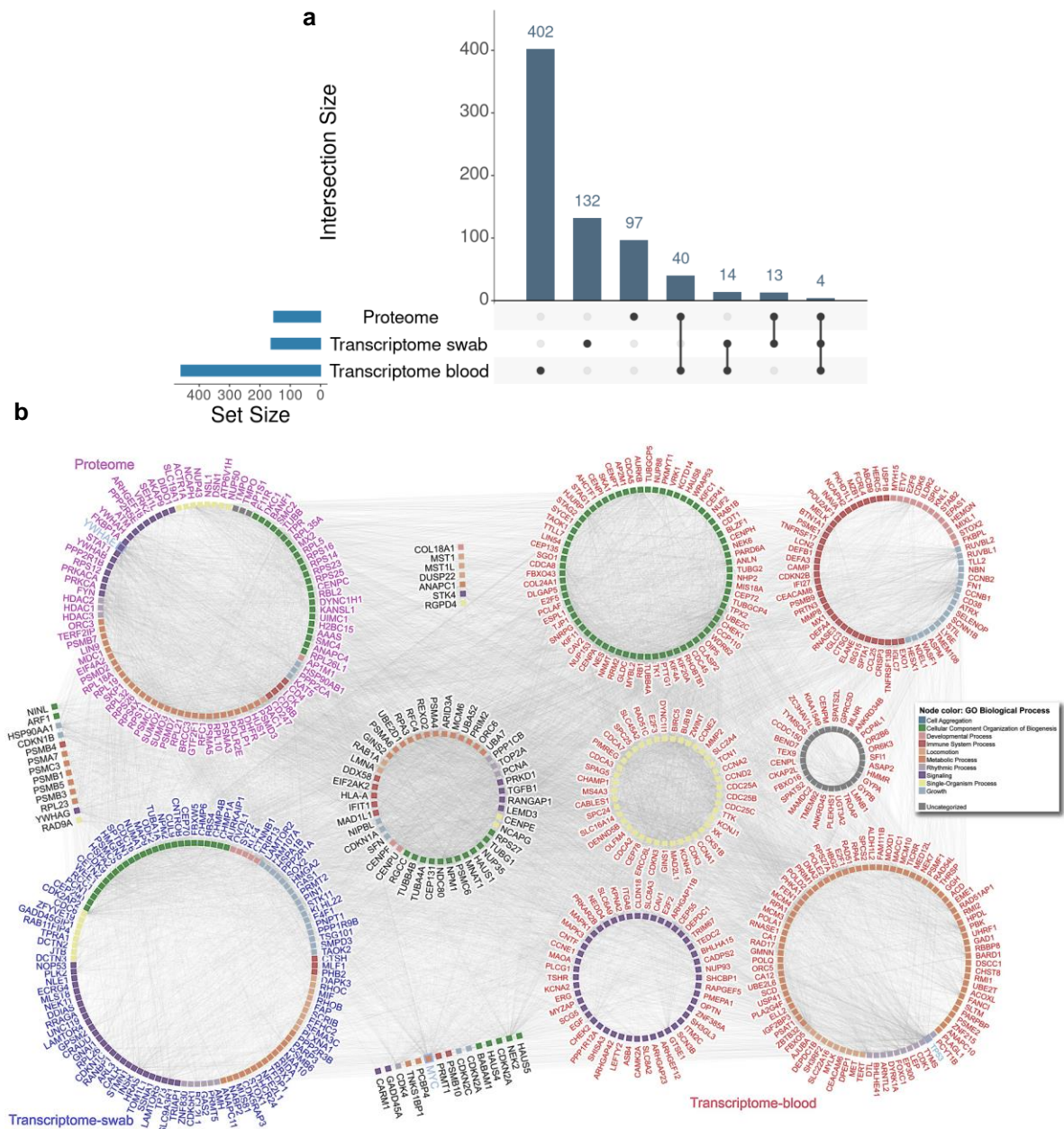
Figura 4: Número de genes e proteínas diferencialmente expressos em todas as coortes de 11 conjuntos de dados.



a-b) Número total **(a)** e número de genes diferencialmente expressos (DEGs) e proteínas diferencialmente expressas (DEPs) associados ao ciclo celular **(b)** upreguladas e downreguladas resultantes da comparação de indivíduos COVID-19 com o respectivo grupo de controle de cada conjunto de dados. **c)** Gráfico de Circos mostrando a interação de DEGs e DEPs associados ao ciclo celular. Cada coorte de estudo é indicada por números de acordo com a legenda da figura mostrada em **(a)**. A espessura da linha indica o número de DEGs/DEPs compartilhados entre as diferentes coortes. A coorte de estudo 4, 5 não tinha nenhuma das 302 moléculas comuns associadas ao ciclo celular e, portanto, foi omitida no gráfico circos.

A **Figura 5** mostra a interseção molecular e rede interconectada de DEPs e DEGs associados ao ciclo celular que encontramos por meio de nossa abordagem de imunologia de sistemas integrativos. Usamos o procedimento a seguir para dissecar o possível significado dessa rede para obter novos *insights* sobre o envolvimento de moléculas associadas ao ciclo celular que desempenham um papel durante a resposta imune contra o SARS-CoV-2.

Figura 5. Rede integrativa de dados multiômicos de moléculas associadas ao ciclo celular.



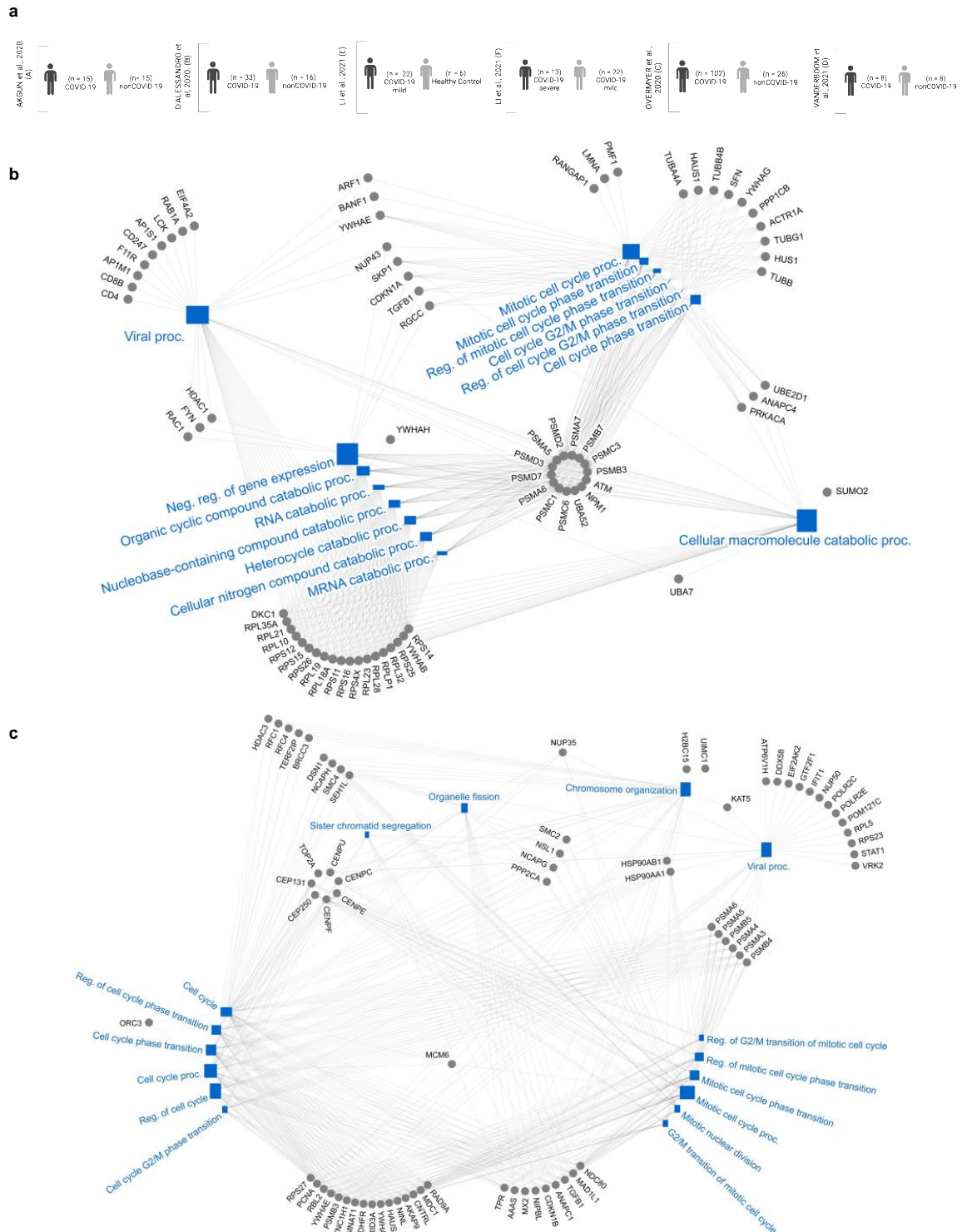
(a) Interseção de moléculas associadas ao ciclo celular (genes e proteínas) obtidas dos diferentes conjuntos de dados ômicos. (b) Rede interativa de moléculas associadas ao ciclo celular de conjuntos de dados de proteoma e transcriptoma de pacientes com COVID-19. A cor dos nós representa os processos biológicos de ontologia gênica (GO) de acordo com a legenda da figura. As moléculas marcadas em vermelho representam os DEGs dos conjuntos de dados do transcriptoma do sangue, as moléculas do transcriptoma do *swab* são indicadas em azul escuro e os

DEPs resultantes dos conjuntos de dados do proteoma são marcados em roxo. Moléculas que estavam sobrepostas nos dados ômicos são escritas em preto. A rede completa compreende 1.538 proteínas e 2.522 interações físicas diretas.

6.2. A infecção por SARS-CoV-2 altera sistemicamente a expressão de genes e proteínas associados ao ciclo celular

Em seguida, analisamos os dados proteômicos de plasma, soro, PBMCs e *swabs* nasofaríngeos obtidos de seis coortes diferentes representando cinco conjuntos de dados (AKGUN et al., 2020; D’ALESSANDRO et al., 2020; LI et al., 2021; OVERMYER et al., 2021; VANDERBOOM et al., 2021) (**Figura 6a**).

Figura 6. Interação proteína-proteína e enriquecimento funcional indicando alterações moleculares do ciclo celular.

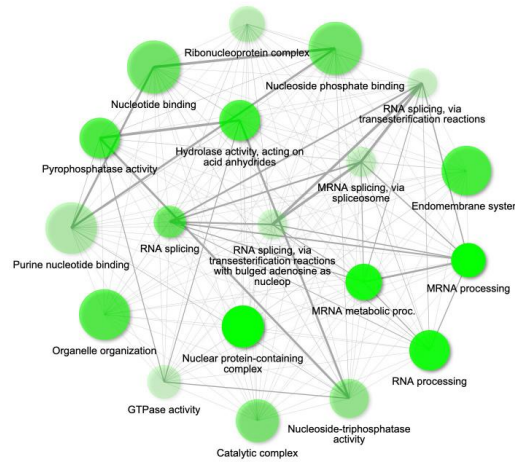


(a) Visão geral esquemática mostrando o número, classificação de pacientes, coortes de controle de cada conjunto dados usados para análise de dados proteômicos. (a-b) O interactoma de DEPs totais (nós cinzas) se fundiu a todas as coortes de estudo e vias enriquecidas associadas (nós azuis) por (b) DEPs upregulados e (c) downregulados. As bordas cinza refletem DEPs e interações de vias. A rede de interação foi visualizada usando o NAViGaTOR. Nós maiores representam conjuntos de genes maiores. O tamanho dos quadrados aumenta de acordo com o número de proteínas por vias enriquecidas

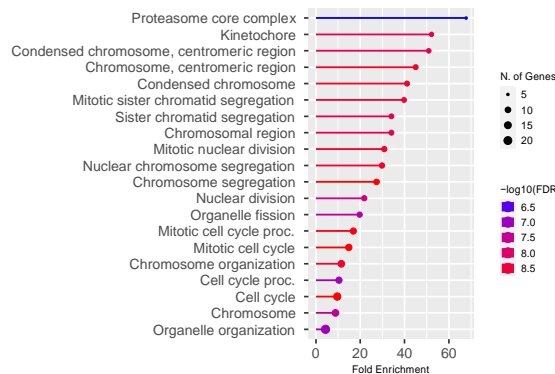
Essa abordagem revelou que o número total de DEPs e a quantidade de DEPs associados ao ciclo celular variaram consideravelmente entre os conjuntos de dados estudados. Esses DEPs totais enriquecem vários processos geneticamente associados, como ligação de nucleotídeos, *processamento/splicing* de *mRNA*, processo metabólico de *mRNA* e complexo de ribonucleoproteína (**Figura 7a**). Os DEPs associados ao ciclo celular regulados positivamente enriquecem as vias de sinalização envolvidas nas estruturas do cinetócoro, segregação cromossômica, divisão nuclear mitótica, ciclo celular mitótico e organização de organelas (**Figura 7b**). Da mesma forma, as DEPs associadas ao ciclo celular reguladas negativamente enriquecem as vias de sinalização, como aquelas relacionadas à atividade do proteassoma, endopeptidases, ribossomos e processos catabólicos de proteínas (**Figura 7b e 7c**). Vinte e quatro DEPs associados ao ciclo celular foram compartilhados entre pelo menos duas das seis coortes (**Figura 7d**).

Figura 7: A abordagem proteômica aponta para alterações moleculares do ciclo celular.

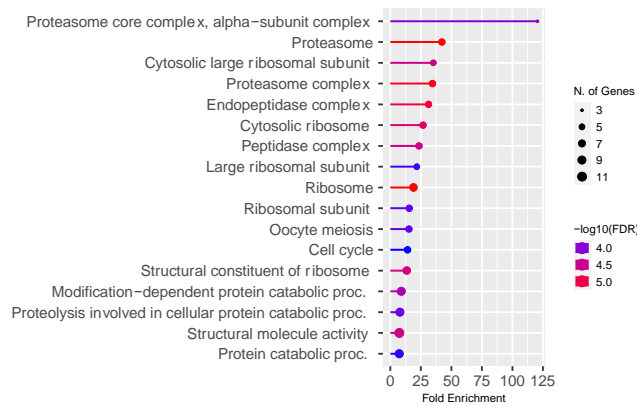
a



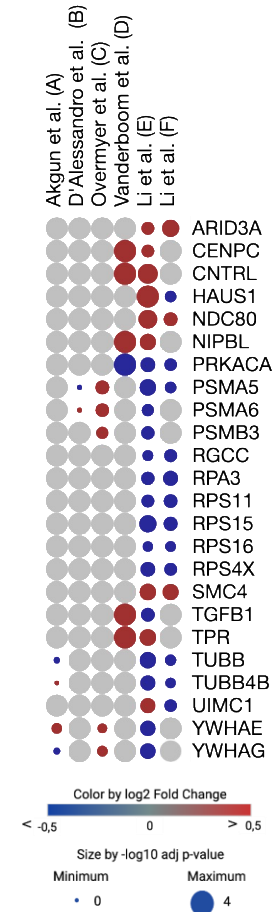
b



c



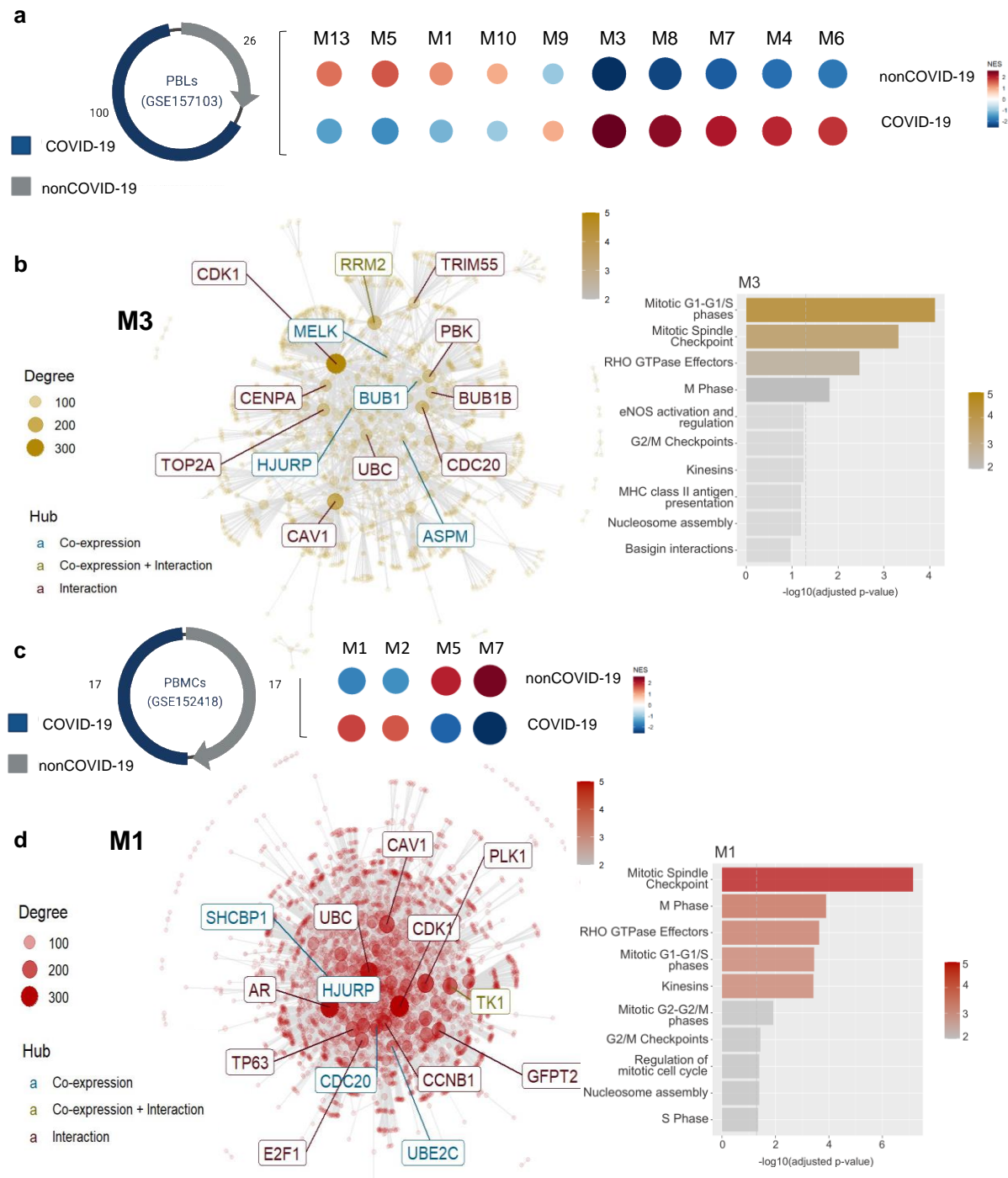
d



(a) Rede mostrando relacionamentos (bordas) de caminhos enriquecidos (nós) por DEPs totais mesclados de todas as coortes de estudo. Os nós mais escuros são conjuntos de genes mais significativamente enriquecidos. Nós maiores representam conjuntos de genes maiores. Bordas mais grossas representam genes mais sobrepostos. (b-c) Gráfico *lollipop* mostrando vias enriquecidas por ciclo celular associadas a (b) DEPs upregulados e (c) downregulados mesclados de todas as coortes do estudo. (d) Mapa de calor de bolhas de DEPs comuns entre pelo menos dois dos cinco conjuntos de dados do proteoma. O tamanho dos círculos corresponde ao $-\log_{10}$ do valor de p ajustado e a cor indica o \log_2 fold change de cada variável.

Esses resultados sugeriram que há uma mudança sistêmica nas moléculas e vias associadas ao ciclo celular, que também encontramos no nível transcricional ao realizar análises de co-expressão modulares abrangentes para buscar conjuntos de genes coexpressos e vias enriquecidas que possivelmente são associados ao ciclo celular através dos conjuntos de dados de transcriptoma sanguíneo fornecidos por Overmyer et al. (GSE157103)(OVERMYER et al., 2021) e Arunachalam et al. (GSE152418)(ARUNACHALAM et al., 2020). Ambos os conjuntos de dados revelaram módulos de genes coexpressos que parecem trabalhar juntos ou regulados de forma semelhante durante a resposta imune ao SARS-CoV-2. Entre eles, os módulos M3 (**Figura 8a e 8b**) e M1 (**Figura 8c e 8d**) foram significativamente regulados positivamente nos conjuntos de dados PBL (GSE157103) e PBMC (GSE152418), respectivamente. A análise de sobre representação desses dois módulos revelou uma variedade de vias comumente enriquecidas, incluindo aquelas relacionadas a pontos de verificação, como o ponto de verificação do fuso mitótico e o ponto de verificação G2/M, bem como outras vias relacionadas ao ciclo celular, como o G1-G1 mitótico fases /S e M e proteínas RHO GTPase. Esses módulos enriquecidos contêm *hubs*(VALLABHAJOSYULA et al., 2009) (genes mais conectados), também identificados entre os DEGs associados ao ciclo celular, como CDK1, CDC20, CCNB1, TK1, PLK1, UBE2C, E2F1, RRM2, CENPA e BUB1B. Esses achados indicam alterações moleculares substanciais do ciclo celular durante a resposta imune ao SARS-CoV-2.

Figura 8. Redes modulares de co-expressão de genes de transcriptomas sanguíneos de COVID-19 associadas ao ciclo celular.

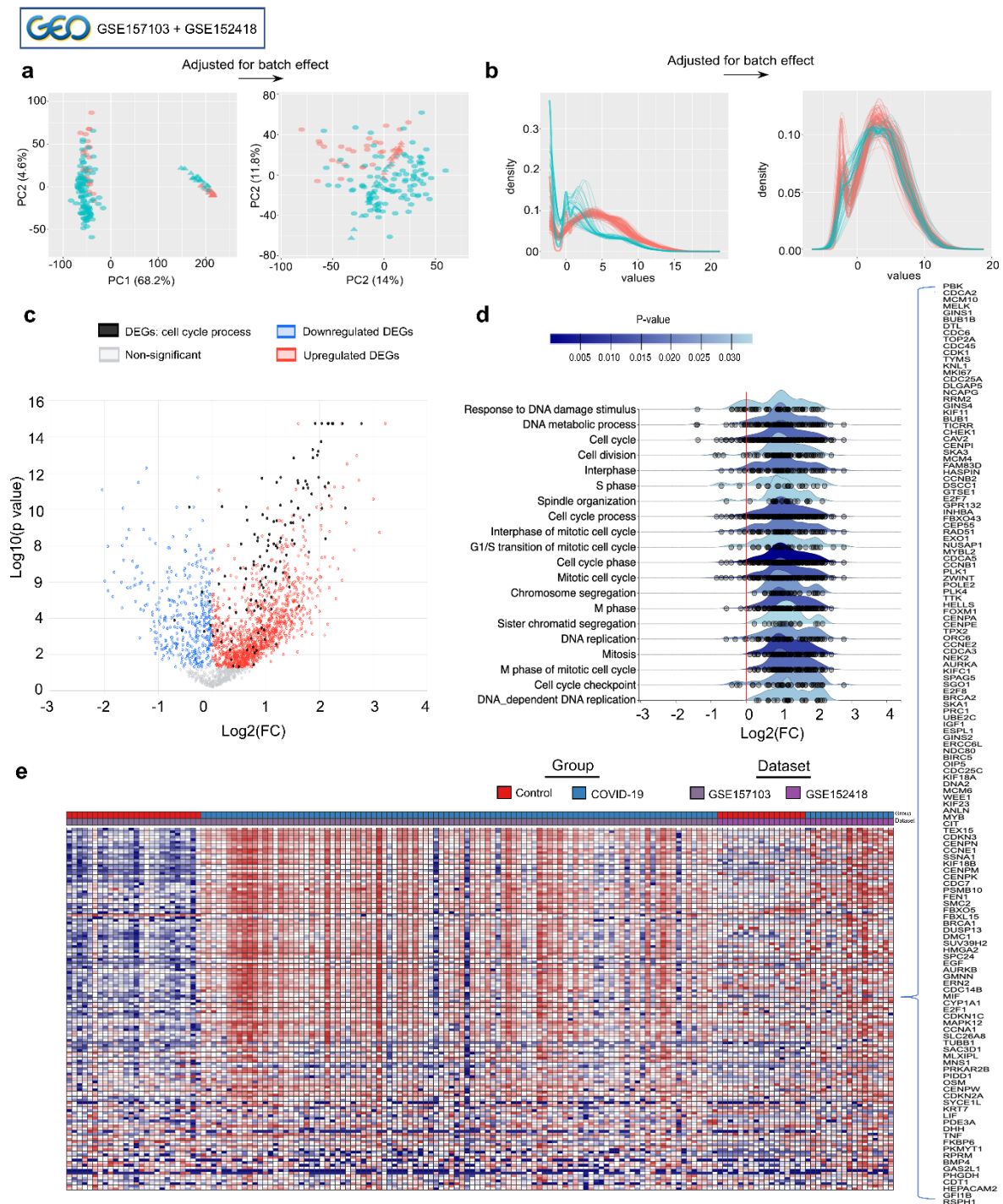


(a) Figura esquemática indicando o número de amostras do conjunto de dados PBL (GSE157103) e mapa de calor de bolhas mostrando o enriquecimento do conjunto de genes de cada atividade do módulo de indivíduos com ou sem COVID-19. O tamanho e a cor do círculo refletem o escore de enriquecimento normalizado (NES), conforme determinado pelo CEMiTool. (b) Rede de genes do módulo de co-expressão M3 mostrando os genes mais conectados (*hubs*) destacados dentro de retângulos. O tamanho do nó é proporcional ao seu grau de interatividade. Gráfico de barras indicando os dez principais caminhos enriquecidos da análise de sobre-representação do módulo M3. (c) Figura esquemática indicando o número de amostras do conjunto de dados PBMC (GSE152418) e mapa de calor de bolhas conforme descrito em (a) de indivíduos com COVID-19 e sem COVID-19. (d) Rede do módulo M1 mostrando os genes *hub* e suas interações. Gráfico de barras indicando os dez principais caminhos enriquecidos da análise de sobre-representação do módulo M1.

6.3. A expressão de genes associados ao ciclo celular predomina em leucócitos do sangue periférico de pacientes com COVID-19

Em seguida, investigamos a interseção transcricional entre DEGs de leucócitos do sangue periférico de pacientes com COVID-19. Após o ajuste para efeito de lote (*batch effect*) (**Figura 9a e 9b**), realizamos uma meta-análise para a integração dos conjuntos de dados GSE157103 (PBLs) e GSE152418 (PBMCs) resultando em 1.630 meta-DEGs (**Figura 9c**). A análise de enriquecimento desses *meta-DEGs* revelou principalmente processos do ciclo celular entre os 20 principais processos biológicos enriquecidos (**Figura 9d**), principalmente enriquecidos por *meta-DEGs* regulados positivamente (**Figura 9d**). Entre outros, os processos biológicos significativamente enriquecidos incluem processo do ciclo celular, divisão celular, interfase, fases S e M, transição G1/S do ciclo celular mitótico, fase do ciclo celular e pontos de verificação do ciclo celular. A **Figura 9e** exibe o padrão de expressão de 126 meta DEGs enriquecendo os processos e estágios do ciclo celular nos conjuntos de dados GSE157103 e GSE152418. Por exemplo, entre os *meta-DEGs* associados ao ciclo celular estão aqueles que codificam moléculas como ciclina A1 (CCNA1), B1 (CCNB1), B2 (CCNB2), E1 (CCNE1) e E2 (CCNE2). Essas moléculas são reguladoras essenciais da mitose e divisão celular, formando complexos com suas respectivas quinase 1 dependente de ciclina (CDK1, CDK2, CDK3)(SATYANARAYANA; KALDIS, 2009) e, assim, regulando e controlando a maquinaria do ciclo celular e a progressão de uma fase para outra (FOLI et al., 2007; MEIJER, 2000). Além disso, as moléculas do ciclo de divisão celular CDCs (CDC25A e CDC25C) e CDK1 também estiveram presentes como *meta-DEGs*, que são atores centrais na divisão celular interagindo com várias proteínas em vários pontos do ciclo celular (BARNUM; O'CONNELL, 2014).

Figura 9: A meta-análise para a integração de estudos de leucócitos de sangue periférico total (GSE157103) e células mononucleares de sangue periférico (GSE152418) revelou a predominância de vias enriquecidas do ciclo celular.



(a) PCA e (b) gráficos de densidade mostrando o ajuste do efeito de lote (*batch effect*) para GSE157103 + GSE152418. (c) Resultados da meta-análise exibidos pelo *volcano plot*, que é baseado no \log_2 de fold change e no p valor da meta-análise realizada para combinar os valores p dos estudos GSE157103 e GSE152418 usando o *Método de Fisher*. Pequenos círculos azuis e vermelhos denotam genes *downregulados* e *upregulados*, respectivamente. Os círculos pretos mostram genes significativos que estão associados ao processo do ciclo celular, indicando que esses genes são principalmente regulados positivamente. (d) Gráfico *Ridgeline* denotando a distribuição *fold change* das 20 principais vias enriquecidas pelos genes meta significativos, indicando a

predominância de vias enriquecidas do ciclo celular em todos os estudos. A distribuição da expressão do gene (círculos pequenos cinzas) é baseada na mudança média de \log_2 de *fold change* ao longo do processo biológico enriquecido. (e) Mapa de calor interativo exibindo o padrão de expressão de genes significativos que estão associados ao processo do ciclo celular.

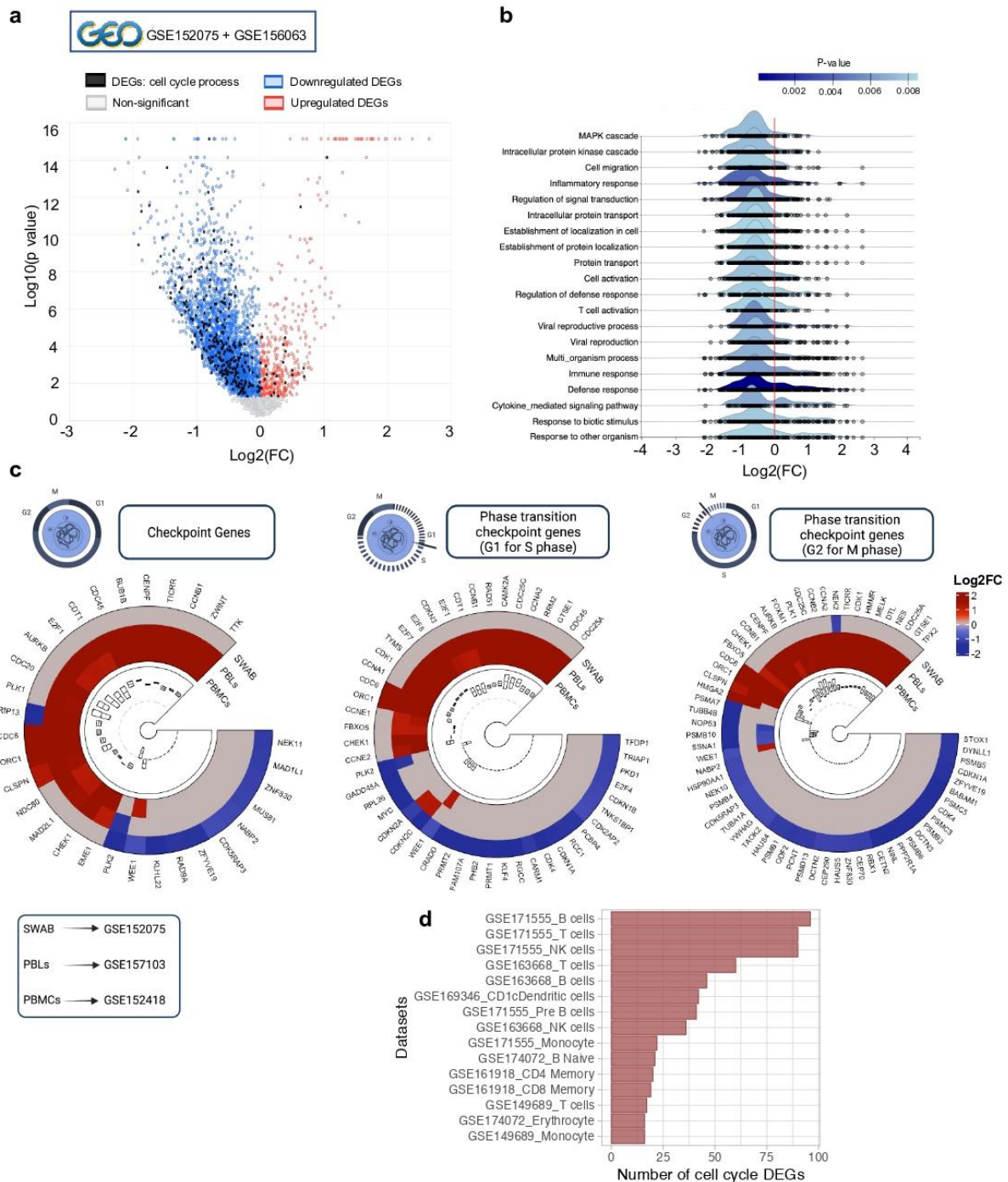
6.4. Alterações compartimentadas do sangue nas assinaturas do ciclo celular

Em seguida, perguntamos se a assinatura do ciclo celular era específica para leucócitos do sangue periférico em comparação com a de *swabs* do trato respiratório superior. Para resolver esse problema, realizamos uma meta-análise para a integração de dados de transcriptoma de *swabs* nasofaríngeos obtidos de pacientes com COVID-19 versus controles saudáveis usando o conjunto de dados GSE152075(LIEBERMAN et al., 2020) e de pacientes com COVID-19 em comparação com pacientes que tiveram outras doenças respiratórias agudas virais (OV-ARIs) ou outras IRAs não virais (OnV-ARIs) usando o conjunto de dados GSE156063(MICK et al., 2020).

Apesar da presença de DEGs associados ao ciclo celular significativos (a maioria deles com regulação negativa) entre esses estudos (**Figura 10a**), essa abordagem não revelou vias associadas ao ciclo celular significativamente enriquecidas (**Figura 10b**). Descobrimos que as 20 principais vias enriquecidas pelos *meta-DEGs* de *swab* incluem migração celular, resposta inflamatória, ativação de células T, resposta de defesa e vias de sinalização mediadas por citocinas, entre outras. Assim como os resultados proteômicos, que também mostram um número maior de DEPs associados ao ciclo celular em amostras de PBMC de pacientes com COVID-19 em comparação com *swabs* nasofaríngeos, os resultados de RNAseq indicam a singularidade da assinatura do ciclo celular do sangue. Isso é ilustrado ainda pela regulação positiva específica de vários DEGs relacionados a pontos de verificação e transição de fase no sangue, mas não nas amostras de *swab* nasofaríngeo de pacientes com COVID-19 em comparação com controles saudáveis (**Figura 10c**).

De acordo com os resultados do bulk RNAseq, a análise dos dados de scRNAseq revelou o mesmo fenômeno quando buscamos os DEGs associados ao ciclo celular meta-significativos nos conjuntos de dados de scRNAseq. Quase nenhum desses *meta-DEGs* estavam presente como diferencialmente expressos em *swabs* nasofaríngeos de pacientes com COVID-19. Em contraste, as subpopulações de linfócitos do sangue (B, T e células natural killer) foram as células que apresentaram o maior número de *meta-DEGs* associados à assinatura do ciclo celular (**Figura 10d**).

Figura 10: Alterações das assinaturas do ciclo celular no sangue não presentes em transcriptomas de *swabs* nasofaríngeos de pacientes com COVID-19.



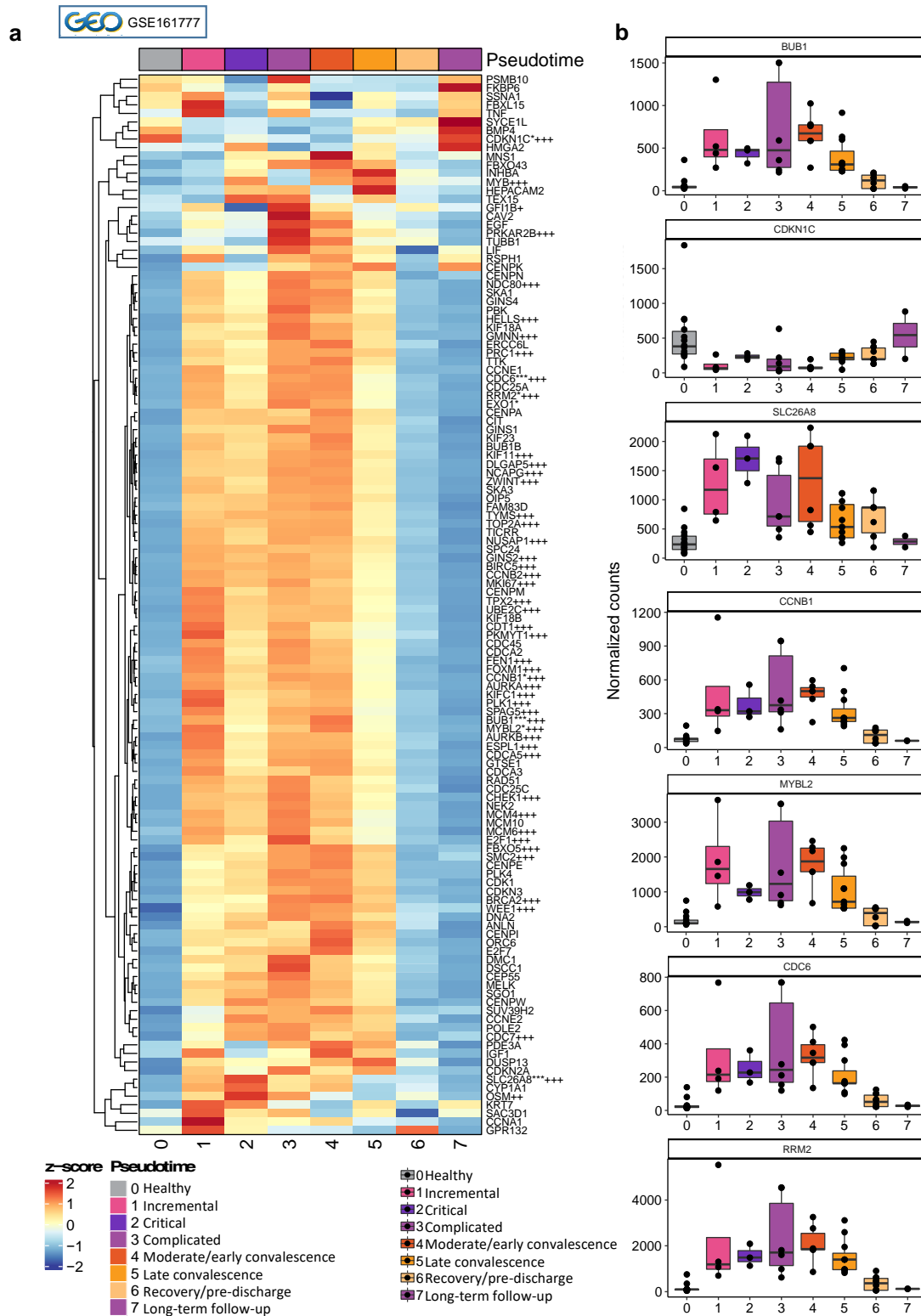
(a) Resultados da meta-análise exibidos pelo *volcano plot*, que se baseia no \log_2 de fold-change e no valor p da meta-análise realizada para combinar os valores p dos estudos GSE156063 e GSE152075 usando o *Método de Fisher*. Pequenos círculos azuis e vermelhos denotam genes *downregulados* e *upregulados*, respectivamente. Os círculos pretos mostram genes significativos que estão associados ao ciclo celular, indicando que esses genes são principalmente regulados negativamente. (b) Gráfico *Ridgeline* denotando a distribuição de \log_2 de fold-change das 20 principais vias enriquecidas pelos genes meta significativos, indicando a predominância de resposta inflamatória, ativação imunológica e de defesa, enquanto nenhuma via enriquecida do ciclo celular nos estudos de swab. A distribuição da expressão do gene (círculos pequenos cinzas) é baseada na mudança média de \log_2 de fold-change ao longo do processo biológico enriquecido. (c) Mapas de calor circulares de um conjunto de genes envolvidos em cada fase do ciclo celular em amostras de transcriptoma de swab (A) e sangue (B e C). A escala de

cores refere-se a genes *upregulados* (vermelho) e *downregulados* (azul). Os campos cinza indicam genes com valor nulo para este conjunto de dados. **(d)** Número de DEGs associados ao ciclo celular regulados positivamente em diferentes conjuntos de dados de RNAseq de célula única.

6.5. A expressão de meta-DEGs associados ao ciclo celular se associa à trajetória do COVID-19 e à gravidade da doença

Investigamos se os *meta-DEGs* de leucócitos do sangue periférico relacionados ao processo do ciclo celular representam marcadores de COVID-19 grave. Primeiro usamos *ImpulseDE2*, um modelo de variação intraindividual de DEGs ao longo do tempo (SANDER; SCHULTZE; YOSEF, 2017) usando o conjunto de dados GSE1617777, conforme descrito anteriormente (BERNARDES et al., 2020b). Usamos essa abordagem para encontrar vários genes associados ao ciclo celular expressos de forma significativamente diferencial em PBLs de pacientes com COVID-19 ao longo da trajetória da doença (**Figura 11**). Esses genes são altamente expressos durante as fases graves da COVID-19 (pseudotempos da doença, conforme caracterizado por Bernardes et al., (BERNARDES et al., 2020b)), reduzindo sua expressão durante a recuperação da doença.

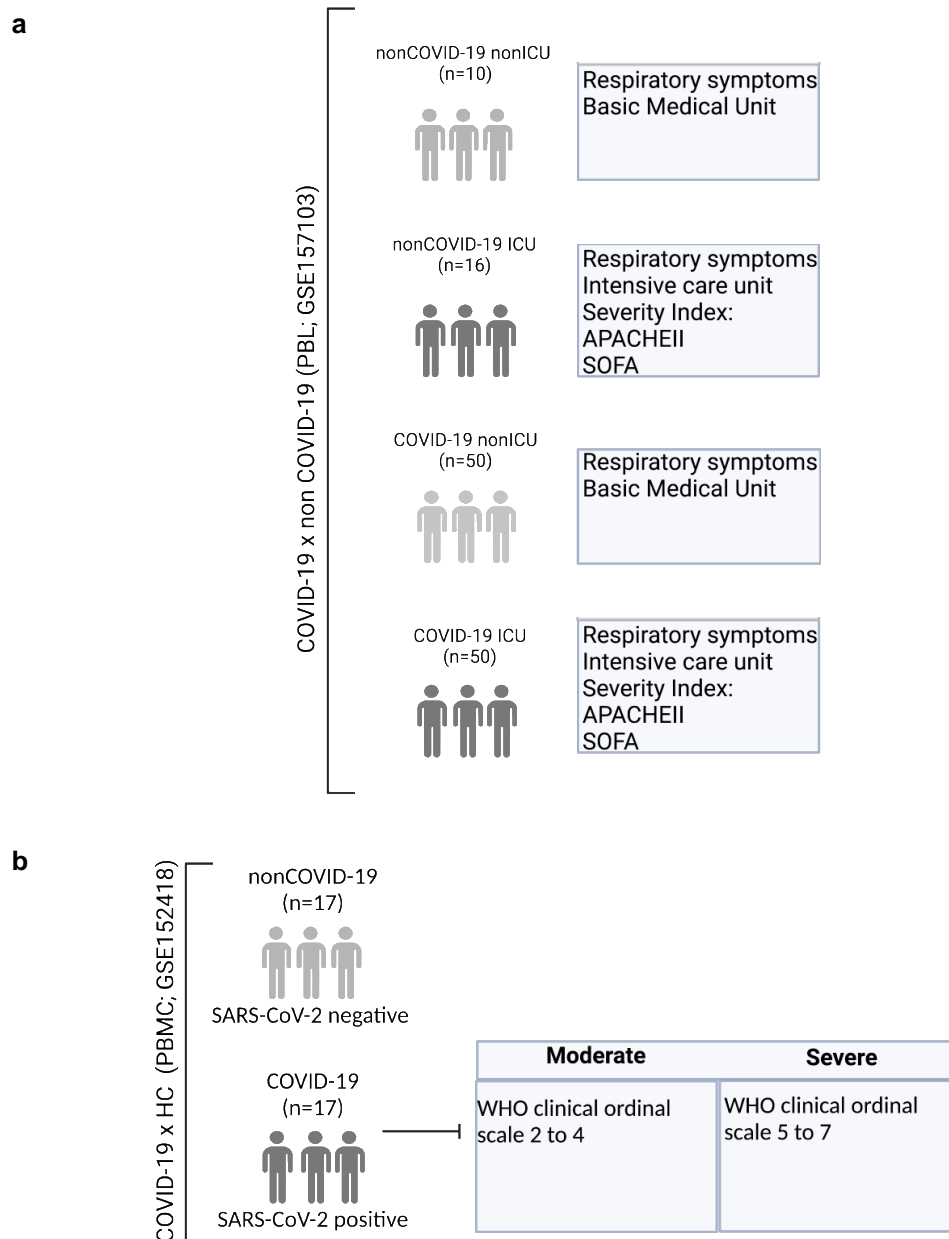
Figura 11: A expressão de genes associados ao ciclo celular é regulada positivamente durante as fases graves da doença COVID-19 e normaliza com a recuperação da doença.



(a) Mapa de calor mostrando a expressão média de 126 genes associados ao ciclo celular em diferentes estágios da doença de pacientes com COVID-19 (pseudotempos 0 a 7 de acordo com a legenda da figura) usando dados publicados anteriormente conforme relatado por Bernardes et al.. Row-wise z- pontuações da expressão média em escala por pseudotempo são plotadas e agrupadas hierarquicamente no mapa de calor. Os genes expressos diferencialmente (DEGs) na análise longitudinal são indicados com asterisco e os DEGs resultantes da comparação

de COVID-19 versus controles saudáveis são indicados pelo sinal + de acordo com o valor p ajustado (*/+ $p \leq 0,05$, **/++ $p \leq 0,01$, ***/+++ $p \leq 0,001$). **(b)** Gráficos de caixa que ilustram a distribuição de contagens normalizadas em pseudotempos (0-7) para 7 genes que são significativos em ambas as análises. Cada gráfico de caixa mostra a mediana com primeiro e terceiro intervalo interquartil (IQR), whiskers representando valores mínimos e máximos dentro de IQR e pontos de dados individuais.

Também analisamos se os *meta-DEGs* associados ao ciclo celular estratificam pacientes com COVID-19 por grupos de gravidade da doença e indivíduos com outras doenças respiratórias usando o conjunto de dados COVID-19 derivado de PBL (GSE157103)(OVERMYER et al., 2021). Primeiro realizamos PCA usando uma abordagem de decomposição espectral (RINGNÉR, 2008). Descobrimos que esse *meta-DEGs* estratificaram pacientes com COVID-19 que foram admitidos ou não na unidade de terapia intensiva (COVID-19_ICU e COVID-19_nonICU). No entanto, esses *meta-DEGs* não estratificaram indivíduos com outras infecções respiratórias internados em UTI e não UTI. A gravidade da doença na admissão na UTI foi definida com base nos escores APACHE II e SOFA(LOPES FERREIRA et al., 2001) de acordo com Overmyer et al.(OVERMYER et al., 2021)(**Figura 12**).

Figura complementar 12: Visão geral esquemática da coorte e classificação da amostra

a-b) Visão geral esquemática do número e classificação clínica de pacientes e coortes de controle de conjuntos de dados seq de RNA de transcriptoma sanguíneo usados neste estudo.

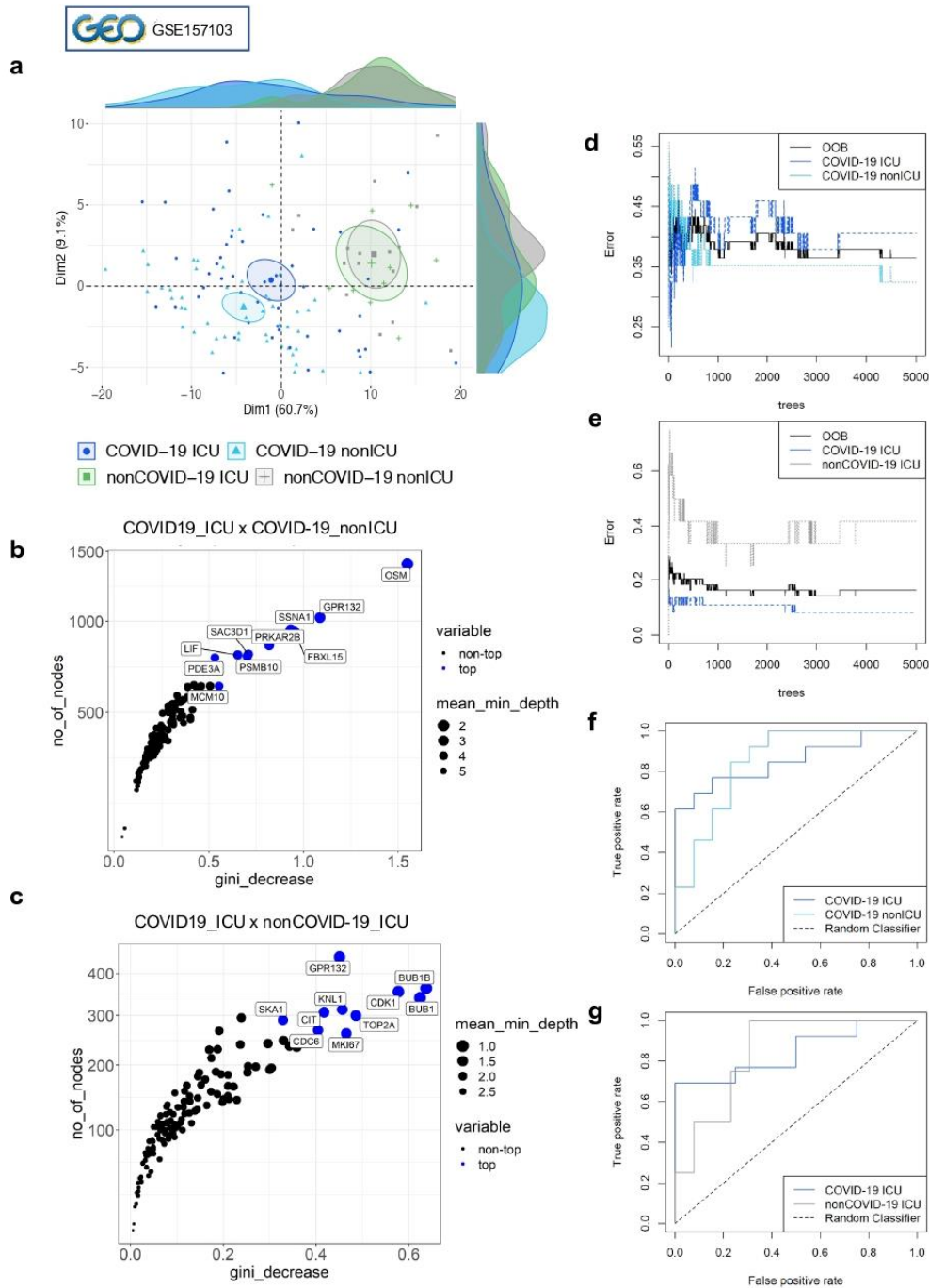
No entanto, embora esses resultados indiquem que a assinatura do ciclo celular dos pacientes com COVID-19 é muito diferente de outras doenças respiratórias, também apresenta uma sobreposição parcial com outras doenças respiratórias. Ou seja, encontramos 28 DEGs associados ao ciclo celular compartilhado em PBMCs de pacientes com COVID-19 (conjunto de dados GSE161731) (MCCLAIN et al., 2021), quando comparado com PBMCs de indivíduos com pneumonia bacteriana, vírus influenza, coronavírus sazonal diferente de SARS-CoV-2

(sCoV) (**Figura 13**). Os 28 DEGs associados ao ciclo celular compartilhados que identificamos apresentam um padrão de expressão semelhante de upregulation e downregulation em todos os grupos de doenças em comparação com controles saudáveis (HC).

Além disso, realizamos análises florestais aleatórias para identificar os meta-DEGs mais relevantes que estratificam COVID-19_ICU de COVID-19_nonICU e COVID-19_ICU de não COVID-19_ICU. O modelo de floresta aleatória classificou os dez meta-DEGs associados ao ciclo celular mais importantes para essas comparações com base em sua capacidade de discriminar entre esses grupos de doenças. A análise identificou que OSM, GPR132, SSNA1, PRKAR2B, FBXL15, SAC3D1, PSMB10, LIF, PDE3A e MCM10 discriminaram COVID19_ICU de COVID-19_nonICU (**Figura 13b**), enquanto BUB1B, BUB1, CDK1, TOP2A, MKI67, CDC6, CIT, KNL1, GPR123, SKA1 discriminou COVID19_ICU de não COVID19_ICU (**Figura 13c**).

Neste contexto, as **Figuras 13d e 13e** demonstram as curvas estáveis com base no número de árvores e taxa *out of bag* (OOB). As **Figuras 13f e 13g** mostram as curvas da característica de operação do receptor (ROC) exibindo a relação entre as taxas de classificação de verdadeiros e falsos positivos. É importante notar que a intensidade da correlação dos 10 principais *rankers* de genes da gravidade do COVID-19 (como nas **Figuras 13b e 13c**) é mais forte em pacientes com COVID-19_ICU em comparação com os grupos COVID-19_nonICU, nonCOVID-19_nonICU e nonCOVID-19_ICU.

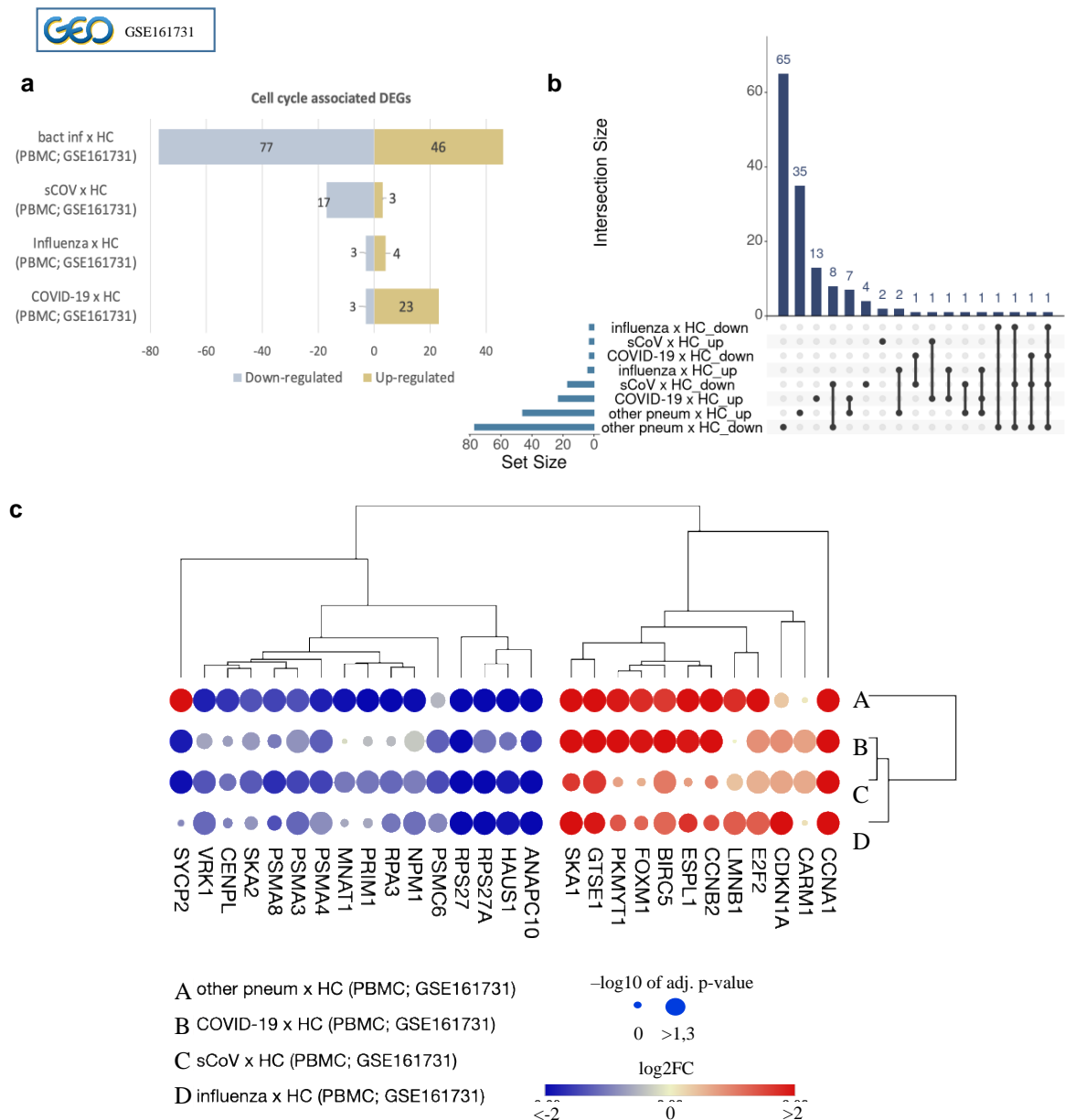
Figura 13: Os genes associados ao ciclo celular estratificam o COVID-19 de outras doenças respiratórias.



(a) Análise de componentes principais de genes associados ao ciclo celular meta-significativos mostrando a estratificação de pacientes com COVID-19 (não_UTI e UTI) de indivíduos com outras infecções do trato respiratório (coortes de pacientes do conjunto de dados GSE157103, fig. 14). As elipses de confiança são mostradas para cada grupo. Os gráficos de densidade associados ao PCA indicam a distribuição da amostra nos eixos. (b-c) Gráfico de pontuação de importância variável obtido por análise de classificação de *Random Forest*. O gráfico de pontuação de importância é baseado na diminuição de Gini e no número (nº) de nós para cada variável (*meta-DEGs* associados ao ciclo celular) indica as 10 principais variáveis com pontuação mais alta na previsão da gravidade do COVID-19 ao comparar (b) COVID-19 19 em unidade de terapia intensiva (COVID-19_ICU) versus indivíduos com outras doenças respiratórias em UTI (não COVID-19_ICU), bem como (c) COVID-19_ICU versus COVID-19_nonICU. Os 10 principais *rankers* de genes de gravidade do COVID-19 são mostrados por pequenos círculos azuis, enquanto os círculos pretos representam aqueles abaixo (com menos importância) dos 10 primeiros. (d-e) Curva estável mostrando o número de árvores e fora da bolsa (OOB) taxa de erro da análise de *Random*

Forest. (f-g) Curvas características de operação do receptor (ROC) com uma área sob a curva (AUC) exibindo a relação entre as taxas de classificação de verdadeiros e falsos positivos.

Figura 14: A assinatura do ciclo das células sanguíneas de pacientes infectados com SARS-CoV-2 se sobrepõe a outras doenças respiratórias virais.

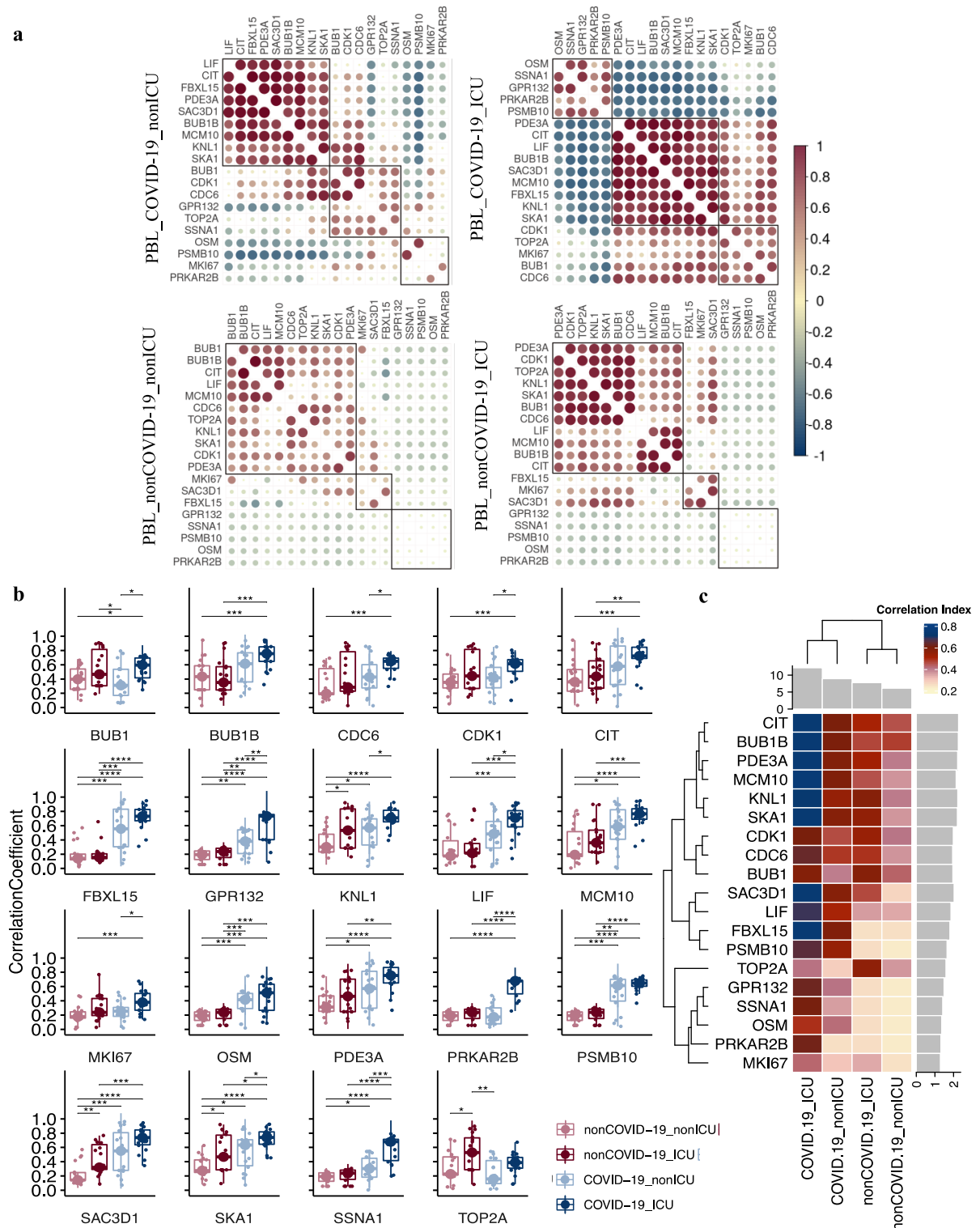


(a) Gráfico de barras mostrando o número de DEGs associados ao ciclo celular comparando pacientes com COVID-19 e pacientes com outras doenças respiratórias com controles saudáveis (HC) gerados a partir de um conjunto de dados de sangue adicional (McClain et al., GSE161731). (b) Gráfico invertido mostrando a interseção de DEGs associados ao ciclo celular regulados positivamente e regulados negativamente das coortes de estudo mostradas em (a). (c) Mapa de calor de bolhas mostrando o padrão de expressão de 28 DEGs associados ao ciclo celular em COVID-19 e outras coortes infecciosas versus HC do conjunto de dados de sangue adicional. O tamanho e a cor dos círculos correspondem ao $-\log_{10}$ do valor de p ajustado e à mudança de dobra log2 (log2FC) de cada variável, respectivamente. O ponto de corte para genes regulados para cima e para baixo foi $\log_2\text{FC} > 1$ e

< -1 , respectivamente, e valor de p ajustado $< 0,05$. As linhas e colunas foram agrupadas com base na distância euclidiana entre os valores de \log_2FC .

A análise de correlogramas (**Figura 15a**), mostra a distribuição do coeficiente de correlação (**Figura 15b**) e índice de correlação (**Figura 15c**) de cada um desses genes mais bem classificados nas coortes do estudo.

Figura 15: Os genes associados ao ciclo celular mostram forte correlação em COVID-19 grave.



(a) Análise de correlação dos principais *rankers* associados ao ciclo celular da gravidade do COVID-19 (coortes COVID-19 e não COVID-19 do conjunto de dados GSE157103). O coeficiente de correlação de posto de *Spearman* é mostrado de acordo com a barra de escala de cores variando de -1 a 1. (b) Gráficos em boxplots mostram a distribuição de valores absolutos (considerando todos os coeficientes de correlação, apesar da direção de correlação [+ ou - sinal]) de coeficientes de correlação de *Spearman* entre as coortes do estudo. Cada gráfico de caixa mostra a mediana com primeiro e terceiro intervalo interquartil (*IQR*), *whiskers* representando valores mínimos e máximos dentro de *IQR* e pontos de dados individuais. A significância foi determinada usando testes de soma de classificação de *Wilcoxon* bilateral e é indicada por asteriscos (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ e **** $p \leq 0,0001$). (c) Mapa de calor do índice de correlação, que foi obtido para cada gene da seguinte forma:

Índice de correlação = $\{(+ \text{ valor de correlação}) - (- \text{ valor de correlação})\} / \text{número de genes}$. As barras ao lado do mapa de calor representam a soma dos índices de correlação. A barra de escala de cores representa o índice de correlação para cada gene.

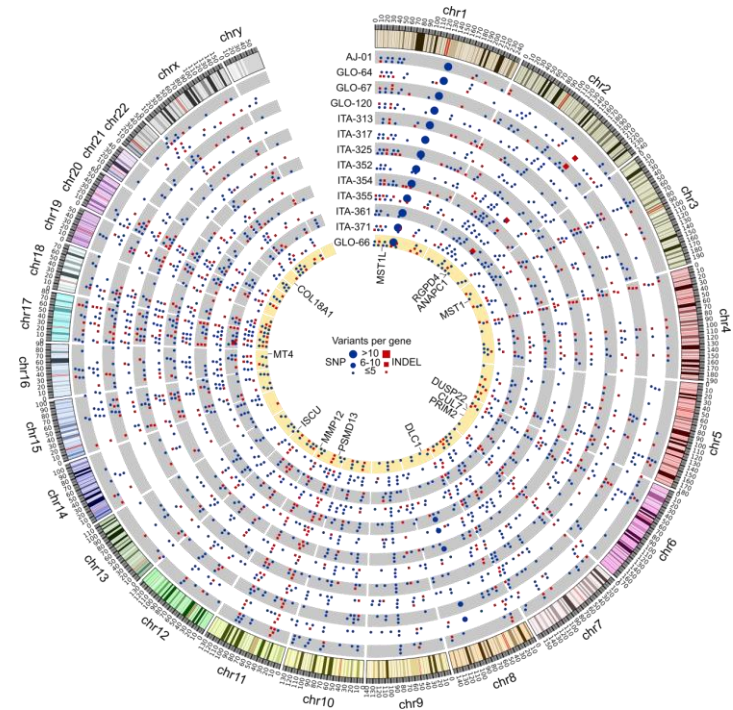
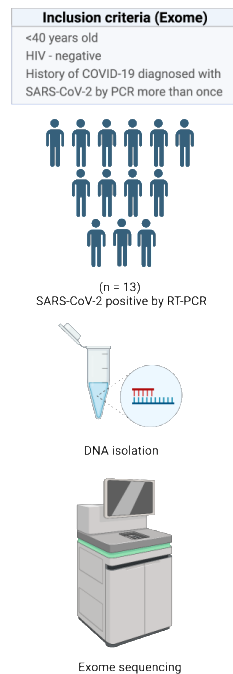
6.6. Variantes genéticas em genes relacionados ao ciclo celular se associam ao COVID-19

Após a integração dos dados transcriptômicos e proteômicos envolvendo o ciclo celular, perguntamos se essas alterações também podem ser detectadas no nível do genoma realizando o sequenciamento do exoma inteiro em 13 indivíduos com COVID-19 diagnosticados com base em sintomas clínicos e RT-PCR positivo para SARS-CoV-2 (**Figura 16a**). As características clínicas, laboratoriais desses pacientes estão descritas na **Tabela 2 e Anexo II**, respectivamente. Foram detectadas 3.520 variantes nas categorias A (altamente patogênica) e B (patogênica), sendo 105 na categoria A, destas 97 eram INDELs (inserções e deleções) e 8 SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único), e 3.415 na categoria B, onde 997 eram INDELs e 2.418 eram SNPs. Desses 13 indivíduos, foram obtidos 450 genes envolvidos nos processos do ciclo celular. Treze genes das categorias A e B foram compartilhados entre os 13 pacientes com COVID-19, esses genes foram mapeados em relação à região cromossômica e a quantidade de variante por gene (**Figura 16a**).

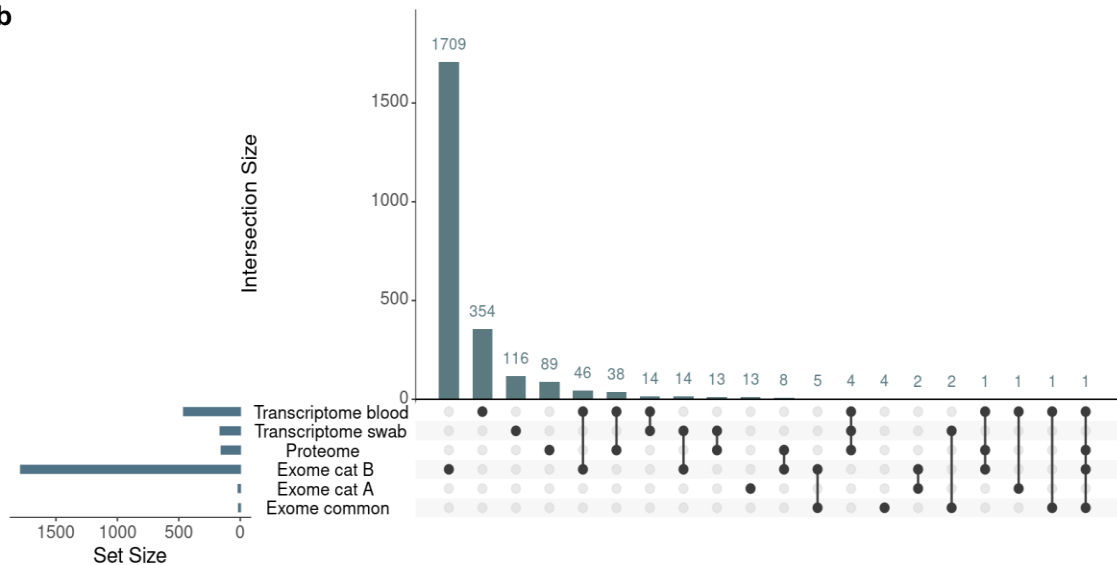
Quatro indivíduos apresentaram entre 6 e 10 inserções e deleções (INDELs) no gene ANAPC1, que é caracterizado pela subunidade 1 do complexo promotor da anáfase, sua subunidade 11 apresentou – se downregulada em estudos envolvendo swabs. Este gene desempenha um papel central na regulação e ativação da senescência celular, fosforilação mediada por CDK e remoção de Cdc6. A senescência refere-se ao processo de envelhecimento dos seres vivos e consiste no processo de interrupção da divisão celular, não causando mais reposição de células que, por algum motivo, pararam de metabolizar.

Figura 16. Variação genética em genes associados ao ciclo celular entre pacientes com COVID-19.

a



b



(a) Visão geral esquemática representando os critérios de inclusão e o número de pacientes com COVID-19 usados para sequenciamento de exoma completo. Circos mapeando genes associados ao ciclo celular com um grande número de variantes (polimorfismos de nucleotídeo único [SNP] ou inserções e deleções [INDELs] em pacientes com COVID-19 em relação à posição cromossômica. **(b)** Gráfico invertido mostrando as interseções de moléculas associadas ao ciclo celular (DEGs, DEPs e genes) obtidos de diferentes conjuntos de dados ômicos.

7. Discussão

O controle do ciclo celular ocorre através de uma complexa rede regulatória de proteínas, que são afetadas por eventos transcricionais e pós-traducionais, é sabido, também, que os vírus utilizam diversas estratégias para sobreviver aos mecanismos de defesa do hospedeiro utilizando vários recursos da célula hospedeira para replicação.

Com o avanço recente e crescente das análises ômicas para elucidação de mecanismos associados a diversas patologias, empregamos a abordagem integrativa de imunologia de sistemas para avaliar dados proteômicos, transcriptômicos disponíveis publicamente, e exômicos de pacientes brasileiros com COVID-19, sem receber qualquer vacina, a partir dessas amostras identificamos alterações na assinatura do ciclo celular de pacientes infectados por SARS-CoV-2 associadas à gravidade da doença. As coortes revelaram uma rede de DEPs e DEGs associados ao ciclo celular que sugerem uma assinatura do ciclo celular em leucócitos do sangue periférico, mas não em swabs nasofaríngeos, que distinguem – se de pacientes infectados por SARS-CoV-2 de controles saudáveis e pacientes com outras doenças respiratórias.

Os pacientes com COVID-19 compartilham um padrão de expressão comum de algumas moléculas associadas ao ciclo celular com outras doenças respiratórias (por exemplo, gripe, coronavírus sazonal, pneumonia bacteriana). No entanto, os pacientes com COVID-19 mostraram uma expressão significativamente maior de genes de checkpoints associados ao ciclo celular, indicando que essa assinatura imunológica pode ter um valor prognóstico mais substancial para pacientes com COVID-19 do que para outras doenças infecciosas. Isso poderia explicar o aumento da proporção de neutrófilos para linfócitos, e seria hipotetizado como um marcador prognóstico para SARS-CoV-2 de resultados desfavoráveis do que para outras infecções respiratórias, como influenza (PROZAN et al., 2021). Existem estudos bem consolidados que concordam com perturbações fosfoproteômicas de moléculas associadas ao ciclo celular observadas em células infectadas por SARS-CoV-2, indicando um mecanismo de manipulação do hospedeiro para subverter a resposta imune (BOUHADDOU et al., 2020).

As alterações relatadas, embora não bem definidas, estão de acordo com outros achados que relataram alterações imunológicas sistêmicas no sangue periférico de pacientes com COVID-19, e que mostraram que abordagens de imunologia de sistemas podem ser empregadas para identificar novos mecanismos imunopatológicos holisticamente associados ao COVID-19. (CABRAL-MARQUES et al., 2022; FREIRE et al., 2021; SCHIMKE et al., 2022). Indo além, o estudo fosfoproteômico in vitro (BOUHADDOU et al., 2020) usando células VeroE6 mostrou

que o SARS-CoV-2 afeta a produção de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de diferentes quinases, como caseína quinase II (CK2), quinase dependente de ciclina (CDK) e proteínas quinase ativadas por mitógeno (MPK) (BOUHADDOU et al., 2020). Estas proteínas desempenham um papel crucial na regulação e progressão da divisão celular (PALMISANO et al., 2017), e o desligamento das quinases mitóticas resulta na parada do ciclo celular em G1/S e G2/M, possivelmente fornecendo nucleotídeos importantes e proteínas essenciais que suportam a replicação viral (NDOLO et al., 2002; SU et al., 2020; YI et al., 2015). Portanto, isso indica que as alterações do ciclo celular nas assinaturas imunológicas de pacientes com COVID-19 são um mecanismo imunopatológico desencadeado pelo vírus SARS-CoV-2.

O principal achado implica em múltiplas alterações do ciclo celular molecular que sugerem que o SARS-CoV-2 afeta principalmente os leucócitos do sangue humano, conforme indicado pelas análises integrativas de dados proteômicos, bulk *RNAseq* e *scRNAseq*. Este último revelou que as alterações do ciclo celular possivelmente se concentram nas células B, T e NK, o que é um fenômeno esperado para subpopulações do sangue periférico, uma vez que a proliferação celular é uma característica fundamental da resposta das células linfocíticas à estimulação antigênica (CREVEL, 2005). No entanto, a imunopatogênese das múltiplas alterações celulares (ou seja, baixo número de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos enquanto contagem elevada de neutrófilos) (YANG et al., 2020) exibido pelas células imunes de pacientes com COVID-19 possivelmente vai além do sangue periférico. Isto é, Wang et al. (WANG et al., 2021b) relataram que as células-tronco hematopoiéticas da medula óssea de pacientes graves com COVID-19 eram propensas à apoptose e pararam na fase G1, resultando em progenitores de linfócitos diminuídos em paralelo com o acúmulo de progenitores mieloides imaturos. Além disso, estudos em modelos celulares apontam que a parada do ciclo celular pode ocorrer nas infecções virais, esse acúmulo de células em determinadas fases do ciclo podem ser cruciais para recuperação do paciente. Essas observações concordam com a descoberta de que pacientes com COVID-19 admitidos na UTI apresentam níveis mais altos de expressão de moléculas associadas ao ciclo celular do que pacientes com COVID-19 não UTI.

Se essas alterações sistêmicas do ciclo celular representam uma desregulação imunológica (por exemplo, tempestade de citocinas) ou uma resposta adaptativa ao vírus SARS-CoV-2 requer investigação futura. Enquanto a linfopenia mostrada por pacientes graves com COVID-19 (WANG et al., 2020; YANG et al., 2020) podem contrabalançar a perigosa tempestade de citocinas, as células supressoras derivadas de mieloides imaturas (MDSC) compõem um grupo heterogêneo de células com menor atividade de explosão oxidativa que

pode suprimir não especificamente as respostas dos linfócitos T e B (AGRATI et al., 2020; CONDAMINE; GABRILOVICH, 2011). Após a hiperativação inicial de neutrófilos em resposta à infecção por SARS-CoV-2 e quando a gravidade do COVID-19 avança, o sistema imunológico do hospedeiro aumenta proporcionalmente a produção de MDSCs granulocíticas enquanto reduz a quantidade de linfócitos circulantes (AGRATI et al., 2020; SCHULTE-SCHREPPING et al., 2020; SILVIN et al., 2020). As MDSCs são componentes do sistema imunológico saudável e desempenham um papel protetor na homeostase e nos contextos da doença. Ou seja, MDSCs se expandem para reduzir o dano tecidual durante doenças autoimunes e inflamatórias (GABRILOVICH; NAGARAJ, 2009; KOLLMANN et al., 2017), estresse traumático, transplante e sepse (CONDAMINE; GABRILOVICH, 2011; CROOK, 2014; GABRILOVICH; OSTRAND-ROSENBERG; BRONTE, 2012).

Considerando o Brasil como um país de etnias diversas e genoma misto, buscou-se entender como a genética de qualquer hospedeiro, desconsiderando aspectos regionais, e integrando os dados transcriptômicos, contribuiria para o desenvolvimento da gravidade da COVID-19, e se/ou como ela estaria envolvido em relação à desregulação do ciclo celular (VAN DER MADE et al., 2020). A análise do exoma de pacientes que tiveram reinfecção por COVID-19, cujas características clínicas podem ser vistas na **Tabela 2**, revelou uma lista de treze genes com SNPs e INDELs, envolvidos em processos celulares de regulação das fases S e G1. Dentre esses genes, 4 indivíduos apresentaram INDELs no gene ANAPC1 (MELLODY, 2020), uma ubiquitina ligase E3 responsável por regular a progressão do ciclo de metáfase para anáfase, e que também promove a regulação do desenvolvimento de receptores beta-adrenérgicos de fosforilação mediada por ERK, CDK e Remoção de Cdc692-94.

Esses fatos também podem sugerir um papel fisiológico para as alterações sistêmicas do ciclo celular subjacentes à neutrofilia (com uma quantidade aumentada de MDSCs) e à linfopenia. Portanto, hipotetizamos que essas alterações celulares podem representar uma tentativa do hospedeiro de retornar à homeostase após a desregulação imunológica grave desencadeada pelo SARS-CoV-2, em vez de representar apenas uma disfunção do hospedeiro. Nesse contexto, como uma miríade de alterações moleculares simultâneas do ciclo celular possivelmente regula o número de células imunes é uma questão fascinante que somente o avanço das abordagens da imunologia de sistemas nos permitirá decifrar no futuro.

8. Conclusão

Nosso trabalho caracteriza mudanças globais na assinatura do ciclo celular de pacientes com COVID-19, analisando dados de proteoma e transcriptoma publicamente disponíveis por meio de uma abordagem de imunologia de sistemas integrativos. Além de potenciais variações genéticas patogênicas em pacientes com COVID-19, encontramos módulos de coexpressão de genes associados ao ciclo celular significativamente enriquecidos e uma rede interconectada de proteínas e genes (DEGs) diferencialmente expressos associados ao ciclo celular, integrando os dados moleculares de 1.469 indivíduos (981 pacientes infectados com SARS-CoV-2 e 488 controles [controles saudáveis ou indivíduos com outras doenças respiratórias]). A assinatura do ciclo celular inclui várias ciclinas (CCNs), ciclos de divisão celular (CDCs), quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e proteínas de manutenção de minicromossomos (MCMs) e predomina nas células sanguíneas do paciente, mas não nas amostras de swab nasofaríngeo. Além disso, essa assinatura do ciclo celular se associa à gravidade do COVID-19 e às trajetórias da doença, sendo altamente regulada em fases graves da doença e retornando aos níveis normais pela recuperação. Esses resultados fornecem uma compreensão global única de alterações distintas em moléculas associadas ao ciclo celular em pacientes com COVID-19, sugerindo novas vias putativas para intervenção terapêutica.

Referências Bibliográficas

1. AGRATI, Chiara et al. Expansion of myeloid-derived suppressor cells in patients with severe coronavirus disease (COVID-19). **Cell Death and Differentiation**, [S. l.], p. 1–12, 2020. DOI: 10.1038/s41418-020-0572-6.
2. AKGUN, Emel; TUZUNER, Mete Bora; SAHIN, Betul; KILERCİK, Meltem; KULAH, Canan; CAKIROGLU, Hacer Nur; SERTESER, Mustafa; UNSAL, Ibrahim; BAYKAL, Ahmet Tarik. Proteins associated with neutrophil degranulation are upregulated in nasopharyngeal swabs from SARS-CoV-2 patients. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 10, 2020. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0240012. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7575075/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33011112/). Acesso em: 26 nov. 2021.
3. ANDREAKOS, Evangelos et al. A global effort to dissect the human genetic basis of resistance to SARS-CoV-2 infection. **Nature Immunology** **2021**, [S. l.], p. 1–6, 2021. DOI: 10.1038/s41590-021-01030-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41590-021-01030-z>. Acesso em: 20 nov. 2021.
4. ARUNACHALAM, Prabhu S. et al. Systems biological assessment of immunity to mild versus severe COVID-19 infection in humans. **Science (New York, N.y.)**, [S. l.], v. 369, n. 6508, p. 1210, 2020. DOI: 10.1126/SCIENCE.ABC6261. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7665312/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33011112/). Acesso em: 22 nov. 2021.
5. ASANO, Takaki et al. X-linked recessive TLR7 deficiency in ~1% of men under 60 years old with life-threatening COVID-19. **Science Immunology**, [S. l.], v. 6, n. 62, p. 65, 2021. DOI: 10.1126/SCIIMMUNOL.ABL4348/SUPPL_FILE/SCIIMMUNOL.ABL4348_DATA_FILES_S1_TO_S7.ZIP. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/sciimmunol.abl4348>. Acesso em: 20 nov. 2021.
6. BAGGA, Sumedha; BOUCHARD, Michael J. Cell Cycle Regulation During Viral Infection. **Cell Cycle Control**, [S. l.], v. 1170, p. 165, 2014. DOI: 10.1007/978-1-4939-0888-2_10. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7122065/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25811112/). Acesso em: 15 nov. 2021.
7. BANERJEE, N. Sanjib; WANG, Hsu-Kun; BROKER, Thomas R.; CHOW, Louise T. Human Papillomavirus (HPV) E7 Induces Prolonged G2 following S Phase Reentry in Differentiated Human Keratinocytes * □ S. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 286, p. 15473–15482, 2011. DOI: 10.1074/jbc.M110.197574. Disponível em: <http://www.jbc.org>. Acesso em: 15 nov. 2021.
8. BARISIC, Marin; RAJENDRAPRASAD, Girish; STEBLYANKO, Yulia. The metaphase

- spindle at steady state – Mechanism and functions of microtubule poleward flux. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 117, n. February, p. 99–117, 2021. DOI: 10.1016/j.semcdb.2021.05.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.05.016>.
9. BARNUM, Kevin J.; O'CONNELL, Matthew J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [S. l.], v. 1170, p. 29, 2014. DOI: 10.1007/978-1-4939-0888-2_2. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4990352/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24990352/). Acesso em: 10 nov. 2021.
 10. BERNARDES, Joana P. et al. Longitudinal Multi-omics Analyses Identify Responses of Megakaryocytes, Erythroid Cells, and Plasmablasts as Hallmarks of Severe COVID-19. **Immunity**, [S. l.], v. 53, n. 6, p. 1296–1314.e9, 2020. a. DOI: 10.1016/j.immuni.2020.11.017.
 11. BERNARDES, Joana P. et al. Longitudinal Multi-omics Analyses Identify Responses of Megakaryocytes, Erythroid Cells, and Plasmablasts as Hallmarks of Severe COVID-19. **Immunity**, [S. l.], v. 53, n. 6, p. 1296–1314.e9, 2020. b. DOI: 10.1016/J.IMMUNI.2020.11.017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33296687/>. Acesso em: 22 jul. 2022.
 12. BERTOLI, Cosetta; SKOTHEIM, Jan M.; DE BRUIN, Robertus A. M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 518–528, 2013. DOI: 10.1038/nrm3629.
 13. BOUHADDOU, Mehdi et al. The Global Phosphorylation Landscape of SARS-CoV-2 Infection. **Cell**, [S. l.], v. 182, n. 3, p. 685–712.e19, 2020. DOI: 10.1016/J.CELL.2020.06.034. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32645325/>. Acesso em: 10 fev. 2022.
 14. BRODIN, Petter. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. **Nature Medicine** 2021 27:1, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 28–33, 2021. DOI: 10.1038/s41591-020-01202-8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-01202-8>. Acesso em: 15 nov. 2021.
 15. BROWN, Kevin R.; OTASEK, David; ALI, Muhammad; MCGUFFIN, Michael J.; XIE, Wing; DEVANI, Baiju; VAN TOCH, Ian Lawson; JURISICA, Igor. NAViGaTOR: Network analysis, visualization and graphing Toronto. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 25, n. 24, p. 3327–3329, 2009. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp595.
 16. CABRAL-MARQUES, Otavio et al. Autoantibodies targeting GPCRs and RAS-related molecules associate with COVID-19 severity. **Nature Communications**, [S. l.], v. 13, n.

- 1, p. 1–12, 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-28905-5.
17. CAMPANELLA, Nathália C. et al. Mutational Profiling of Driver Tumor Suppressor and Oncogenic Genes in Brazilian Malignant Pleural Mesotheliomas. **Pathobiology**, [S. l.], v. 87, n. 3, p. 208–216, 2020. DOI: 10.1159/000507373.
18. CASANOVA, Jean Laurent et al. A Global Effort to Define the Human Genetics of Protective Immunity to SARS-CoV-2 Infection. **Cell**, [S. l.], v. 181, n. 6, p. 1194–1199, 2020. DOI: 10.1016/J.CELL.2020.05.016.
19. CEVIK, Muge; KUPPALLI, Krutika; KINDRACHUK, Jason; PEIRIS, Malik. Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. **The BMJ**, [S. l.], v. 371, 2020. DOI: 10.1136/bmj.m3862.
20. CHEN, Chun-Jen; SUGIYAMA, Kazuo; KUBO, Hideyuki; HUANG, Cheng; MAKINO, Shinji. Murine Coronavirus Nonstructural Protein p28 Arrests Cell Cycle in G 0/G 1 Phase . **Journal of Virology**, [S. l.], v. 78, n. 19, p. 10410–10419, 2004. DOI: 10.1128/jvi.78.19.10410-10419.2004.
21. CHEN, Edward Y.; TAN, Christopher M.; KOU, Yan; DUAN, Qiaonan; WANG, Zichen; MEIRELLES, Gabriela Vaz; CLARK, Neil R.; MA'AYAN, Avi. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], 2013. Disponível em: <http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>.
22. CHIAPPETTA, Sonja; SHARMA, Arya M.; BOTTINO, Vincenzo; STIER, Christine. COVID-19 and the role of chronic inflammation in patients with obesity. **International journal of obesity (2005)**, [S. l.], v. 44, n. 8, p. 1790–1792, 2020. DOI: 10.1038/S41366-020-0597-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32409680/>. Acesso em: 26 nov. 2021.
23. CHOI, Jun Yong; SMITH, Davey M. SARS-CoV-2 Variants of Concern. **Yonsei Medical Journal**, [S. l.], v. 62, n. 11, p. 961, 2021. DOI: 10.3349/YMJ.2021.62.11.961. Disponível em: </pmc/articles/PMC8542474/>. Acesso em: 12 nov. 2021.
24. CIGNO, Irene Lo; CALATI, Federica; ALBERTINI, Silvia; GARIGLIO, Marisa. pathogens Subversion of Host Innate Immunity by Human Papillomavirus Oncoproteins. [S. l.], [s.d.]. DOI: 10.3390/pathogens9040292. Disponível em: www.mdpi.com/journal/pathogens. Acesso em: 8 nov. 2021.
25. CLOUGH, Emily; BARRETT, Tanya. The Gene Expression Omnibus database. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] : Humana Press Inc., 2016. v. 1418p. 93–110. DOI: 10.1007/978-1-4939-3578-9_5.
26. COLEMAN, Mathew L.; MARSHALL, Christopher J.; OLSON, Michael F. RAS and

- RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** **2004** **5:5**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 355–366, 2004. DOI: 10.1038/nrm1365. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm1365>. Acesso em: 6 mar. 2022.
27. COMBES, Alexis J. et al. Global absence and targeting of protective immune states in severe COVID-19. **Nature**, [S. l.], v. 591, n. 7848, p. 124–130, 2021. DOI: 10.1038/S41586-021-03234-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33494096/>. Acesso em: 9 jul. 2022.
28. CONDAMINE, Thomas; GABRILOVICH, Dmitry I. **Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. Trends in Immunology** Elsevier, , 2011. DOI: 10.1016/j.it.2010.10.002.
29. CORMAN, Victor M.; MUTH, Doreen; NIEMEYER, Daniela; DROSTEN, Christian. Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. In: **Advances in Virus Research**. [s.l.] : Academic Press Inc., 2018. v. 100p. 163–188. DOI: 10.1016/bs.aivir.2018.01.001.
30. **COVID Live - Coronavirus Statistics - Worldometer**. [s.d.].
31. CREVEL, René. Lymphocyte Proliferation. **Encyclopedic Reference of Immunotoxicology**, [S. l.], p. 401–405, 2005. DOI: 10.1007/3-540-27806-0_920. Disponível em: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/3-540-27806-0_920. Acesso em: 10 jul. 2022.
32. CROOK, Kristen R. Role of myeloid-derived suppressor cells in autoimmune disease. **World Journal of Immunology**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 26, 2014. DOI: 10.5411/wji.v4.i1.26.
33. D’ALESSANDRO, Angelo et al. Serum Proteomics in COVID-19 Patients: Altered Coagulation and Complement Status as a Function of IL-6 Level. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 4417–4427, 2020. DOI: 10.1021/ACS.JPROTEOME.0C00365/SUPPL_FILE/PR0C00365_SI_001.PDF. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32786691/>. Acesso em: 15 mar. 2022.
34. D’AVINO, Pier Paolo; GIANANTI, Maria Grazia; PETRONCZKI, Mark. Cytokinesis in animal cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 1–17, 2015. DOI: 10.1101/cshperspect.a015834.
35. DALTON, Stephen. Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions. **Trends in Cell Biology**, [S. l.], v. 25, n. 10, p. 592–600, 2015. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.07.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.007>.
36. DOOLEY, Kelly E.; CHAISSON, Richard E. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics. **The Lancet. Infectious diseases**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 737–746, 2009. DOI: 10.1016/S1473-3099(09)70282-8. Disponível em:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19926034/>. Acesso em: 26 nov. 2021.
37. DOVE, Brian; BROOKS, Gavin; BICKNELL, Katrina; WURM, Torsten; HISCOX, Julian A. Cell Cycle Perturbations Induced by Infection with the Coronavirus Infectious Bronchitis Virus and Their Effect on Virus Replication. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 80, n. 8, p. 4147, 2006. DOI: 10.1128/JVI.80.8.4147-4156.2006. Disponível em: </pmc/articles/PMC1440480/>. Acesso em: 8 nov. 2021.
 38. FAN, Ying; SANYAL, Sumana; BRUZZONE, Roberto. **Breaking Bad: How Viruses Subvert the Cell Cycle**. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** Frontiers Media S.A., , 2018. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00396.
 39. FOLI, Andrea; MAIOCCHI, Maria Angela; LISZIEWICZ, Julianna; LORI, Franco. A Checkpoint in the Cell Cycle Progression as a Therapeutic Target to Inhibit HIV Replication. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 196, n. 9, p. 1409–1415, 2007. DOI: 10.1086/521832. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/196/9/1409/2192107>. Acesso em: 15 nov. 2021.
 40. FREIRE, Paula P. et al. The relationship between cytokine and neutrophil gene network distinguishes SARS-CoV-2–infected patients by sex and age. **JCI Insight**, [S. l.], v. 6, n. 10, 2021. DOI: 10.1172/jci.insight.147535.
 41. GABRILOVICH, Dmitry I.; NAGARAJ, Srinivas. **Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system**. **Nature Reviews Immunology** Nat Rev Immunol, , 2009. DOI: 10.1038/nri2506.
 42. GABRILOVICH, Dmitry I.; OSTRAND-ROSENBERG, Suzanne; BRONTE, Vincenzo. **Coordinated regulation of myeloid cells by tumours**. **Nature Reviews Immunology** Nat Rev Immunol, , 2012. DOI: 10.1038/nri3175.
 43. GE, Steven Xijin; JUNG, Dongmin; JUNG, Dongmin; YAO, Runan. ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 2628–2629, 2020. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz931.
 44. GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Evangelos J. et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure. **Cell host & microbe**, [S. l.], v. 27, n. 6, p. 992–1000.e3, 2020. DOI: 10.1016/J.CHOM.2020.04.009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32320677/>. Acesso em: 26 nov. 2021.
 45. GIBBONS, David W. et al. The relative importance of COVID-19 pandemic impacts on biodiversity conservation globally. **Conservation Biology**, [S. l.], v. 36, n. 1, p. 1–14, 2022. DOI: 10.1111/cobi.13781.
 46. GU, Zuguang; GU, Lei; EILS, Roland; SCHLESNER, Matthias; BRORS, Benedikt.

- circize Implements and enhances circular visualization in R. **Bioinformatics (Oxford, England)**, [S. l.], v. 30, n. 19, p. 2811–2812, 2014. DOI: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTU393. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24930139/>. Acesso em: 25 nov. 2021.
47. HACISULEYMAN, Ezgi et al. Vaccine Breakthrough Infections with SARS-CoV-2 Variants. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 384, n. 23, p. 2212–2218, 2021. DOI: 10.1056/NEJMOA2105000/SUPPL_FILE/NEJMOA2105000_DISCLOSURES.PDF. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2105000>. Acesso em: 20 nov. 2021.
48. HAO, Yuhang et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. **Cell**, [S. l.], v. 184, n. 13, p. 3573–3587.e29, 2021. DOI: 10.1016/j.cell.2021.04.048. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.048>.
49. HARTENIAN, Ella; NANDAKUMAR, Divya; LARI, Azra; LY, Michael; TUCKER, Jessica M.; GLAUNSINGER, Britt A. **The molecular virology of coronaviruses. Journal of Biological Chemistry**American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., , 2020. DOI: 10.1074/jbc.REV120.013930.
50. HODGE, Richard G.; RIDLEY, Anne J. Regulating Rho GTPases and their regulators. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** 2016 17:8, [S. l.], v. 17, n. 8, p. 496–510, 2016. DOI: 10.1038/nrm.2016.67. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm.2016.67>. Acesso em: 6 mar. 2022.
51. HUO, Zhiguang; TANG, Shaowu; PARK, Yongseok; TSENG, George. P-value evaluation, variability index and biomarker categorization for adaptively weighted Fisher’s meta-analysis method in omics applications. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 524–532, 2020. DOI: 10.1093/bioinformatics/btz589.
52. KASSAMBARA, Alboukadel. Principal Component Analysis in R: prcomp vs princomp - Articles - STHDA. **Principal Component Methods in R: Practical Guide**, [S. l.], 2017. Disponível em: <http://www.sthda.com/english/articles/31-principal-component-methods-in-r-practical-guide/118-principal-component-analysis-in-r-prcomp-vs-princomp/>. Acesso em: 9 jul. 2022.
53. KHAN, Aziz; MATHELIER, Anthony. Intervene: A tool for intersection and visualization of multiple gene or genomic region sets. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 18, n. 1, 2017. DOI: 10.1186/s12859-017-1708-7.
54. KOLLMANN, Tobias R.; KAMPMANN, Beate; MAZMANIAN, Sarkis K.;

- MARCHANT, Arnaud; LEVY, Ofer. **Protecting the Newborn and Young Infant from Infectious Diseases: Lessons from Immune Ontogeny**. ImmunityCell Press, , 2017. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.03.009.
55. KONINGS, Frank et al. SARS-CoV-2 Variants of Interest and Concern naming scheme conducive for global discourse. **Nature Microbiology** 2021 **6:7**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 821–823, 2021. DOI: 10.1038/s41564-021-00932-w. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41564-021-00932-w>. Acesso em: 20 nov. 2021.
56. KOTLYAR, Max; PASTRELLO, Chiara; AHMED, Zuhaib; CHEE, Justin; VARYOVA, Zofia; JURISICA, Igor. IID 2021: towards context-specific protein interaction analyses by increased coverage, enhanced annotation and enrichment analysis. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 50, n. D1, p. D640–D647, 2022. DOI: 10.1093/NAR/GKAB1034. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34755877/>. Acesso em: 1 jul. 2022.
57. KOUTSAKOS, Marios et al. Integrated immune dynamics define correlates of COVID-19 severity and antibody responses. **Cell reports. Medicine**, [S. l.], v. 2, n. 3, 2021. DOI: 10.1016/J.XCRM.2021.100208. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33564749/>. Acesso em: 20 nov. 2021.
58. KRZYWINSKI, Martin; SCHEIN, Jacqueline; BIROL, Inanç; CONNORS, Joseph; GASCOYNE, Randy; HORSMAN, Doug; JONES, Steven J.; MARRA, Marco A. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. **Genome Research**, [S. l.], v. 19, n. 9, p. 1639–1645, 2009. DOI: 10.1101/gr.092759.109.
59. KULESHOV, Maxim V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic acids research**, [S. l.], v. 44, n. W1, p. W90–W97, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw377.
60. KYRIAZIS, Zisis; KOLLIA, Panagoula; GRIVEA, Ioanna; VARITIMIDIS, Sokratis E.; CONSTANTOULAKIS, Pantelis; DAILIANA, Zoe H. Thumb duplication: molecular analysis of different clinical types. **European Journal of Orthopaedic Surgery and Traumatology**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 421–426, 2019. DOI: 10.1007/s00590-018-2343-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00590-018-2343-3>.
61. LEE, Jeong Seok et al. Immunophenotyping of COVID-19 and influenza highlights the role of type I interferons in development of severe COVID-19. **Science immunology**, [S. l.], v. 5, n. 49, 2020. DOI: 10.1126/SCIIMMUNOL.ABD1554. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32651212/>. Acesso em: 9 jul. 2022.
62. LEVER, Jake; KRZYWINSKI, Martin; ALTMAN, Naomi. Points of Significance: Principal component analysis. **Nature Methods**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. 641–642, 2017. DOI:

- 10.1038/NMETH.4346.
63. LI, Chuan-Xing; GAO, Jing; ZHANG, Zicheng; CHEN, Lu; LI, Xun; ZHOU, Meng; WHEELLOCK, Åsa M. **Multimics integration-based molecular characterizations of COVID-19. Briefings in Bioinformatics**, 2022. a. DOI: 10.1093/bib/bbab485.
 64. LI, Hongwei et al. Plasma proteomic and metabolomic characterization of COVID-19 survivors 6 months after discharge. **Cell Death and Disease**, [S. l.], v. 13, n. 3, 2022. b. DOI: 10.1038/s41419-022-04674-3.
 65. LI, Jingjiao et al. Virus-Host Interactome and Proteomic Survey Reveal Potential Virulence Factors Influencing SARS-CoV-2 Pathogenesis. **Med (New York, N.y.)**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 99, 2021. DOI: 10.1016/J.MEDJ.2020.07.002. Disponível em: /pmc/articles/PMC7373048/. Acesso em: 15 mar. 2022.
 66. LI, L. et al. Human Herpesvirus 6 Suppresses T Cell Proliferation through Induction of Cell Cycle Arrest in Infected Cells in the G2/M Phase. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 85, n. 13, p. 6774–6783, 2011. DOI: 10.1128/JVI.02577-10/FORMAT/EPUB. Disponível em: https://journals.asm.org/journal/jvi. Acesso em: 15 nov. 2021.
 67. LIAW, A.; WIENER, M. **(8) (PDF) Classification and Regression by RandomForest**. [s.d.].
 68. LIEBERMAN, Nicole A. P. et al. In vivo antiviral host transcriptional response to SARS-CoV-2 by viral load, sex, and age. **PLoS biology**, [S. l.], v. 18, n. 9, 2020. DOI: 10.1371/JOURNAL.PBIO.3000849. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32898168/. Acesso em: 15 mar. 2022.
 69. LIU, Can et al. Time-resolved systems immunology reveals a late juncture linked to fatal COVID-19. **Cell**, [S. l.], v. 184, n. 7, p. 1836- 1857.e22, 2021. a. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.018.
 70. LIU, Can et al. Time-resolved systems immunology reveals a late juncture linked to fatal COVID-19. **Cell**, [S. l.], v. 184, n. 7, p. 1836- 1857.e22, 2021. b. DOI: 10.1016/J.CELL.2021.02.018. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33713619/. Acesso em: 10 jul. 2022.
 71. LIU, Yin et al. Transcriptional landscape of the human cell cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 114, n. 13, p. 3473–3478, 2017. DOI: 10.1073/PNAS.1617636114. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28289232/. Acesso em: 5 fev. 2022.
 72. LOPES FERREIRA, F.; PERES BOTA, D.; BROSS, A.; MÉLOT, C.; VINCENT, J. L. Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. **JAMA**,

- [*S. l.*], v. 286, n. 14, p. 1754–1758, 2001. DOI: 10.1001/JAMA.286.14.1754. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11594901/>. Acesso em: 6 mar. 2022.
73. LÓPEZ-CORTÉS, 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**, [*S. l.*], v. 12, n. February, p. 1–24, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.598925.
74. LOUGH, Kendall J.; BYRD, Kevin M.; DESCOVICH, Carlos P.; SPITZER, Danielle C.; BERGMAN, Abby J.; BEAUDOIN, Gerard M.; REICHARDT, Louis F.; WILLIAMS, Scott E. Telophase correction refines division orientation in stratified epithelia. **eLife**, [*S. l.*], v. 8, p. 1–32, 2019. DOI: 10.7554/eLife.49249.
75. LOURDA, Magda et al. High-dimensional profiling reveals phenotypic heterogeneity and disease-specific alterations of granulocytes in COVID-19. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [*S. l.*], v. 118, n. 40, 2021. DOI: 10.1073/PNAS.2109123118/-/DCSUPPLEMENTAL. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/118/40/e2109123118>. Acesso em: 20 nov. 2021.
76. LOVE, Michael I.; ANDERS, Simon; KIM, Vladislav; HUBER, Wolfgang. RNA-Seq workflow: gene-level exploratory analysis and differential expression. **F1000Research**, [*S. l.*], v. 4, p. 1070, 2015. DOI: 10.12688/f1000research.7035.1.
77. LOWREY, Angela J.; CRAMBLET, Wyatt; BENTZ, Gretchen L. **Viral manipulation of the cellular sumoylation machinery. Cell Communication and Signaling** BioMed Central Ltd., , 2017. DOI: 10.1186/s12964-017-0183-0.
78. MAIATO, Helder. Mitosis under the microscope. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, [*S. l.*], v. 117, p. 1–5, 2021. DOI: 10.1016/j.semcdb.2021.06.014.
79. MATELLÁN, Laura; MONJE-CASAS, Fernando. Regulation of Mitotic Exit by Cell Cycle Checkpoints: Lessons From *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, [*S. l.*], v. 11, n. 2, 2020. DOI: 10.3390/GENES11020195. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7074328/](https://pmc/articles/PMC7074328/). Acesso em: 10 nov. 2021.
80. MCCLAIN, Micah T. et al. Dysregulated transcriptional responses to SARS-CoV-2 in the periphery. **Nature Communications** 2021 12:1, [*S. l.*], v. 12, n. 1, p. 1–8, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-21289-y. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-21289-y>. Acesso em: 6 mar. 2022.
81. MEIJER, Laurent. Cyclin-dependent kinases inhibitors as potential anticancer, antineurodegenerative, antiviral and antiparasitic agents. **Drug Resistance Updates**, [*S.*

- l.*, v. 3, n. 2, p. 83–88, 2000. DOI: 10.1054/DRUP.2000.0129.
82. MELLOY, Patricia G. The anaphase-promoting complex: A key mitotic regulator associated with somatic mutations occurring in cancer. **Genes, chromosomes & cancer**, *[S. l.]*, v. 59, n. 3, p. 189–202, 2020. DOI: 10.1002/GCC.22820. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31652364/>. Acesso em: 10 nov. 2021.
 83. MICK, Eran et al. Upper airway gene expression reveals suppressed immune responses to SARS-CoV-2 compared with other respiratory viruses. **Nature communications**, *[S. l.]*, v. 11, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/S41467-020-19587-Y. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33203890/>. Acesso em: 15 mar. 2022.
 84. MOURA, Margarida; CONDE, Carlos. Phosphatases in Mitosis: Roles and regulation. **Biomolecules**, *[S. l.]*, v. 9, n. 2, p. 1–54, 2019. DOI: 10.3390/biom9020055.
 85. NASCIMENTO, R.; COSTA, H.; PARKHOUSE, R. M. E. Virus manipulation of cell cycle. **Protoplasma**, *[S. l.]*, v. 249, n. 3, p. 519–528, 2012. DOI: 10.1007/S00709-011-0327-9/FIGURES/3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00709-011-0327-9>. Acesso em: 15 nov. 2021.
 86. NASCIMENTO, R.; PARKHOUSE, R. M. E. Murine gammaherpesvirus 68 ORF20 induces cell-cycle arrest in G2 by inhibiting the Cdc2-cyclin B complex. **The Journal of general virology**, *[S. l.]*, v. 88, n. Pt 5, p. 1446–1453, 2007. DOI: 10.1099/VIR.0.82589-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17412972/>. Acesso em: 5 jul. 2022.
 87. NDOLO, Thomas; DHILLON, Navdeep K.; NGUYEN, Hau; GUADALUPE, Moraima; MUDRYJ, Maria; DANDEKAR, Satya. Simian Immunodeficiency Virus Nef Protein Delays the Progression of CD4 T Cells through G 1 /S Phase of the Cell Cycle. **JOURNAL OF VIROLOGY**, *[S. l.]*, v. 76, n. 8, p. 3587–3595, 2002. DOI: 10.1128/JVI.76.8.3587-3595.2002.
 88. ONODERA, Kazukiyo; PATTERSON, David. Structure of Human Chromosome 21—For an Understanding of Genetic Diseases Including Down’s Syndrome—. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, *[S. l.]*, v. 61, n. 3, p. 403–409, 1997. DOI: 10.1271/bbb.61.403.
 89. ORIOLA, David; JÜLICHER, Frank; BRUGUÉS, Jan. Active forces shape the metaphase spindle through a mechanical instability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, *[S. l.]*, v. 117, n. 28, p. 16154–16159, 2020. DOI: 10.1073/pnas.2002446117.
 90. OVERMYER, Katherine A. et al. Large-Scale Multi-omic Analysis of COVID-19 Severity. **Cell Systems**, *[S. l.]*, v. 12, n. 1, p. 23, 2021. DOI: 10.1016/J.CELS.2020.10.003.

- Disponível em: /pmc/articles/PMC7543711/. Acesso em: 22 nov. 2021.
91. PALMISANO, Alida; ZÁMBORSZKY, Judit; OGUZ, Cihan; CSIKÁSZ-NAGY, Attila. Molecular Network Dynamics of Cell Cycle Control: Periodicity of Start and Finish. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [S. l.], v. 1524, p. 331–349, 2017. DOI: 10.1007/978-1-4939-6603-5_21. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27815913/>. Acesso em: 5 fev. 2022.
 92. PARASHER, Anant. **COVID-19: Current understanding of its Pathophysiology, Clinical presentation and Treatment. Postgraduate Medical Journal**BMJ Publishing Group, , 2021. DOI: 10.1136/postgradmedj-2020-138577.
 93. PAWELETZ, Neidhard. Walther Flemming: Pioneer of mitosis research. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 72–75, 2001. DOI: 10.1038/35048077.
 94. PINES, Jonathon. Four-dimensional control of the cell cycle. **Nature Cell Biology** 1999 1:3, [S. l.], v. 1, n. 3, p. E73–E79, 1999. DOI: 10.1038/11041. Disponível em: https://www.nature.com/articles/ncb0799_E73. Acesso em: 8 nov. 2021.
 95. PIZARRO-ORTEGA, Carlos Ivan; DIOSES-SALINAS, Diana Carolina; FERNÁNDEZ SEVERINI, Melisa D.; FORERO LÓPEZ, Ana D.; RIMONDINO, Guido Noé; BENSON, Nsikak U.; DOBARADARAN, Sina; DE-LA-TORRE, Gabriel Enrique. Degradation of plastics associated with the COVID-19 pandemic. **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 176, n. December 2021, 2022. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2022.113474.
 96. POLLARD, Casey A.; MORRAN, Michael P.; NESTOR-KALINOSKI, Andrea L. MINI-REVIEW The COVID-19 pandemic: a global health crisis. **Physiol Genomics**, [S. l.], v. 52, p. 549–557, 2020. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00089.2020.-The.
 97. PROZAN, Lior; SHUSTERMAN, Eden; ABLIN, Jacob; MITELPUNKT, Alexis; WEISS-MEILIK, Ahuva; ADLER, Amos; CHOSHEN, Guy; KEHAT, Orli. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in COVID-19 compared with Influenza and respiratory syncytial virus infection. **Scientific Reports** 2021 11:1, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–8, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-00927-x. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-00927-x>. Acesso em: 1 jul. 2022.
 98. RATO, Sylvie; GOLUMBEANU, Monica; TELENTI, Amalio; CIUFFI, Angela. Exploring viral infection using single-cell sequencing. **Virus Research**, [S. l.], v. 239, p. 55–68, 2017. DOI: 10.1016/j.virusres.2016.10.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.016>.
 99. RICHARDS, Sue et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and

- Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, [S. l.], v. 17, n. 5, p. 405–424, 2015. DOI: 10.1038/gim.2015.30.
100. RINGNÉR, Markus. What is principal component analysis? **Nature Biotechnology** **2008 26:3**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 303–304, 2008. DOI: 10.1038/nbt0308-303. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt0308-303>. Acesso em: 1 jul. 2022.
 101. RODRIGUES DE MOURA, Ronald; COELHO, Antonio Victor Campos; DE QUEIROZ BALBINO, Valdir; CROVELLA, Sergio; BRANDÃO, Lucas André Cavalcanti. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. **American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 674–680, 2015. DOI: 10.1002/AJHB.22714. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25820814/>. Acesso em: 10 nov. 2021.
 102. RUSSO, Pedro S. T. et al. CEMiTool: A Bioconductor package for performing comprehensive modular co-expression analyses. **BMC Bioinformatics**, [S. l.], v. 19, n. 1, 2018. DOI: 10.1186/s12859-018-2053-1.
 103. SAICHI, Melissa et al. Single-cell RNA sequencing of blood antigen-presenting cells in severe COVID-19 reveals multi-process defects in antiviral immunity. **Nature cell biology**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 538–551, 2021. DOI: 10.1038/S41556-021-00681-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33972731/>. Acesso em: 9 jul. 2022.
 104. SAMEJIMA, Itaru; SPANOS, Christos; SAMEJIMA, Kumiko; RAPPSILBER, Juri; KUSTATSCHER, Georg; EARNSHAW, William C. Mapping the invisible chromatin transactions of prophase chromosome remodeling. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 82, n. 3, p. 696–708.e4, 2022. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.12.039. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.039>.
 105. SANCHIS, Pablo; LAVIGNOLLE, Rosario; ABBATE, Mercedes; LAGE-VICKERS, Sofía; VAZQUEZ, Elba; COTIGNOLA, Javier; BIZZOTTO, Juan; GUERON, Geraldine. Analysis workflow of publicly available RNA-sequencing datasets. **STAR Protocols**, [S. l.], v. 2, n. 2, 2021. DOI: 10.1016/j.xpro.2021.100478.
 106. SANDER, Jil; SCHULTZE, Joachim L.; YOSEF, Nir. ImpulseDE: detection of differentially expressed genes in time series data using impulse models. **Bioinformatics (Oxford, England)**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 757–759, 2017. DOI: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTW665. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27797772/>. Acesso em: 22 jul. 2022.
 107. SANYAL, Sumana. How SARS-CoV-2 (COVID-19) spreads within infected hosts —

- what we know so far. **Emerging Topics in Life Sciences**, [S. l.], v. 4, n. 4, p. 383, 2020. DOI: 10.1042/ETLS20200165. Disponível em: /pmc/articles/PMC7733667/. Acesso em: 8 nov. 2021.
108. SANYAOLU, Adekunle; OKORIE, Chuku; MARINKOVIC, Aleksandra; HAIDER, Nafees; ABBASI, Abu Fahad; JAFERI, Urooj; PRAKASH, Stephanie; BALENDRA, Vyshnavy. The emerging SARS-CoV-2 variants of concern. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, [S. l.], v. 8, 2021. DOI: 10.1177/20499361211024372. Disponível em: /pmc/articles/PMC8216402/. Acesso em: 12 nov. 2021.
 109. SATYANARAYANA, A.; KALDIS, P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. **Oncogene** 2009 28:33, [S. l.], v. 28, n. 33, p. 2925–2939, 2009. DOI: 10.1038/onc.2009.170. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/onc2009170>. Acesso em: 20 maio. 2022.
 110. SCHEFFLER, Kathleen; GIANNINI, Federica; LEMONNIER, Tom; MOGESSIE, Binyam. The prophase oocyte nucleus is a homeostatic G-actin buffer. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 135, n. 6, 2022. DOI: 10.1242/jcs.259807.
 111. SCHIMKE, Lena F. et al. **Severe COVID-19 Shares a Common Neutrophil Activation Signature with Other Acute Inflammatory States**. **Cells**, 2022. DOI: 10.3390/cells11050847.
 112. SCHULTE-SCHREPPING, Jonas et al. Severe COVID-19 Is Marked by a Dysregulated Myeloid Cell Compartment. **Cell**, [S. l.], v. 182, n. 6, p. 1419- 1440.e23, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.001.
 113. SCIACCHITANO, Salvatore et al. Gene signature and immune cell profiling by high-dimensional, single-cell analysis in COVID-19 patients, presenting Low T3 syndrome and coexistent hematological malignancies. **Journal of Translational Medicine**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–19, 2021. DOI: 10.1186/s12967-021-02805-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02805-6>.
 114. SECOLIN, Rodrigo et al. Distribution of local ancestry and evidence of adaptation in admixed populations. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/S41598-019-50362-2. Disponível em: /pmc/articles/PMC6761108/. Acesso em: 10 nov. 2021.
 115. SECOLIN, Rodrigo et al. Genetic variability in COVID-19-related genes in the Brazilian population. **Human Genome Variation**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 15, 2021. DOI: 10.1038/S41439-021-00146-W. Disponível em: /pmc/articles/PMC8017521/. Acesso em: 10 nov. 2021.
 116. SILVIN, Aymeric et al. Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets

- Discriminate Severe from Mild COVID-19. **Cell**, [S. l.], v. 182, n. 6, p. 1401, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.002.
117. SOLA, Isabel; ALMAZÁN, Fernando; ZÚÑIGA, Sonia; ENJUANES, Luis. **Continuous and Discontinuous RNA Synthesis in Coronaviruses. Annual Review of Virology** Annual Reviews Inc., , 2015. DOI: 10.1146/annurev-virology-100114-055218.
 118. STALLER, Ecco; BARCLAY, Wendy S. Host Cell Factors That Interact with Influenza Virus Ribonucleoproteins. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. a038307, 2021. DOI: 10.1101/CSHPERSPECT.A038307. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32988980/>. Acesso em: 8 nov. 2021.
 119. STARRUSS, Jorn; DE BACK, Walter; BRUSCH, Lutz; DEUTSCH, Andreas. Morpheus: A user-friendly modeling environment for multiscale and multicellular systems biology. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 30, n. 9, p. 1331–1332, 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt772.
 120. STEPHENSON, Emily et al. Single-cell multi-omics analysis of the immune response in COVID-19. **Nature Medicine**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 904–916, 2021. DOI: 10.1038/s41591-021-01329-2.
 121. STRABELLI, Tânia Mara Varejão; UIP, David Everson. COVID-19 e o Coração. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S. l.], v. 114, n. 4, p. 598–600, 2020. DOI: 10.36660/ABC.20200209. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/abc/a/NWKkJDxLthWSb53XFV9Nhvn/?lang=pt>. Acesso em: 26 nov. 2021.
 122. SU, Mingjun et al. Coronavirus Porcine Epidemic Diarrhea Virus Nucleocapsid Protein Interacts with p53 To Induce Cell Cycle Arrest in S-Phase and Promotes Viral Replication. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 95, n. 16, p. 1–22, 2021. DOI: 10.1128/jvi.00187-21.
 123. SU, Mingjun; CHEN, Yaping; QI, Shanshan; SHI, Da; FENG, Li; SUN, Dongbo. A Mini-Review on Cell Cycle Regulation of Coronavirus Infection. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 7, p. 943, 2020. DOI: 10.3389/FVETS.2020.586826/BIBTEX.
 124. SU, Yapeng et al. Multiple early factors anticipate post-acute COVID-19 sequelae. **Cell**, [S. l.], v. 185, n. 5, p. 881– 895.e20, 2022. DOI: 10.1016/j.cell.2022.01.014.
 125. SUNGNAK, Waradon et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. **Nature Medicine** 2020 26:5, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 681–687, 2020. DOI: 10.1038/s41591-020-0868-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0868-6>. Acesso em: 8 nov. 2021.
 126. SURJIT, Milan; LIU, Boping; CHOW, Vincent T. K.; LAL, Sunil K. The nucleocapsid

- protein of severe acute respiratory syndrome-coronavirus inhibits the activity of cyclin-cyclin-dependent kinase complex and blocks S phase progression in mammalian cells. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 281, n. 16, p. 10669–10681, 2006. DOI: 10.1074/jbc.M509233200. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M509233200>.
127. SURYAWANSHI, Rahul K.; KOGANTI, Raghuram; AGELIDIS, Alex; PATIL, Chandrashekhar D.; SHUKLA, Deepak. **Dysregulation of Cell Signaling by SARS-CoV-2. Trends in Microbiology** Elsevier Ltd, , 2021. DOI: 10.1016/j.tim.2020.12.007.
 128. TAY, Matthew Zirui; POH, Chek Meng; RÉNIA, Laurent; MACARY, Paul A.; NG, Lisa F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature reviews. Immunology**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020. DOI: 10.1038/S41577-020-0311-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32346093/>. Acesso em: 26 nov. 2021.
 129. TYANOVA, Stefka; TEMU, Tikira; SINITCYN, Pavel; CARLSON, Arthur; HEIN, Marco Y.; GEIGER, Tamar; MANN, Matthias; COX, Jürgen. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature methods**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 731–740, 2016. DOI: 10.1038/NMETH.3901. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27348712/>. Acesso em: 1 jul. 2022.
 130. UNTERMAN, Avraham et al. Single-cell multi-omics reveals dyssynchrony of the innate and adaptive immune system in progressive COVID-19. **Nature Communications**, [S. l.], v. 13, n. 1, 2022. DOI: 10.1038/s41467-021-27716-4.
 131. UZBEKOV, Rustem; PRIGENT, Claude. A Journey through Time on the Discovery of Cell Cycle Regulation. **Cells**, [S. l.], v. 11, n. 4, 2022. DOI: 10.3390/cells11040704.
 132. V'KOVSKI, Philip; KRATZEL, Annika; STEINER, Silvio; STALDER, Hanspeter; THIEL, Volker. **Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. Nature Reviews Microbiology** Nature Research, , 2021. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.
 133. VALLABHAJOSYULA, Ravishankar R.; CHAKRAVARTI, Deboki; LUTFEALI, Samina; RAY, Animesh; RAVAL, Alpan. Identifying hubs in protein interaction networks. **PloS one**, [S. l.], v. 4, n. 4, 2009. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0005344. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19399170/>. Acesso em: 6 mar. 2022.
 134. VAN DER MADE, Caspar I. et al. Presence of Genetic Variants Among Young Men With Severe COVID-19. **JAMA**, [S. l.], v. 324, n. 7, p. 663–673, 2020. DOI: 10.1001/JAMA.2020.13719. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2768926>. Acesso em: 20 nov. 2021.

135. VANDERBOOM, Patrick M. et al. Proteomic signature of host response to sars-cov-2 infection in the nasopharynx. **Molecular and Cellular Proteomics**, [S. l.], v. 20, p. 100134, 2021. DOI: 10.1016/J.MCPRO.2021.100134/ATTACHMENT/4BFF5343-5088-422B-B6DB-B289D61F522D/MMC8.XLSX. Disponível em: <http://www.mcponline.org/article/S1535947621001067/fulltext>. Acesso em: 15 mar. 2022.
136. VENDRELL, Julie A.; VILQUIN, Paul; LARRIEUX, Marion; VAN GOETHEM, Charles; SOLASSOL, Jérôme. Benchmarking of Amplicon-Based Next-Generation Sequencing Panels Combined with Bioinformatics Solutions for Germline BRCA1 and BRCA2 Alteration Detection. **Journal of Molecular Diagnostics**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 754–764, 2018. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2018.06.003. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.06.003>.
137. VICTORA, Cesar G.; CASTRO, Marcia C.; GURZENDA, Susie; MEDEIROS, Arnaldo C.; FRANÇA, Giovanny V. A.; BARROS, Aluisio J. D. Estimating the early impact of vaccination against COVID-19 on deaths among elderly people in Brazil: Analyses of routinely-collected data on vaccine coverage and mortality. **eClinicalMedicine**, [S. l.], v. 38, 2021. DOI: 10.1016/j.eclinm.2021.101036.
138. VIZCAÍNO, Juan A. et al. ProteomeXchange provides globally coordinated proteomics data submission and dissemination. **Nature Biotechnology** 2014 32:3, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 223–226, 2014. DOI: 10.1038/nbt.2839. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt.2839>. Acesso em: 25 nov. 2021.
139. VUKUŠIĆ, Kruno; BUĐA, Renata; TOLIĆ, Iva M. Force-generating mechanisms of anaphase in human cells. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 132, n. 18, 2019. DOI: 10.1242/jcs.231985.
140. WANG, Eric Y. et al. Diverse functional autoantibodies in patients with COVID-19. **Nature** 2021 595:7866, [S. l.], v. 595, n. 7866, p. 283–288, 2021. a. DOI: 10.1038/s41586-021-03631-y.
141. WANG, Jin; JIANG, Mengmeng; CHEN, Xin; MONTANER, Luis J. Cytokine storm and leukocyte changes in mild versus severe SARS-CoV-2 infection: Review of 3939 COVID-19 patients in China and emerging pathogenesis and therapy concepts. **Journal of Leukocyte Biology**, [S. l.], v. 108, n. 1, p. 17–41, 2020. DOI: 10.1002/JLB.3COVR0520-272R. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/JLB.3COVR0520-272R>. Acesso em: 10 jul. 2022.
142. WANG, Xin et al. Dysregulated hematopoiesis in bone marrow marks severe COVID-19. **Cell Discovery**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–18, 2021. b. DOI: 10.1038/s41421-021-00296-

9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41421-021-00296-9>.
143. WEBB, Brandon J. et al. Clinical criteria for COVID-19-associated hyperinflammatory syndrome: a cohort study. **The Lancet. Rheumatology**, [S. l.], v. 2, n. 12, p. e754–e763, 2020. DOI: 10.1016/S2665-9913(20)30343-X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33015645/>. Acesso em: 20 nov. 2021.
144. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data**. [s.d.]. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em: 20 nov. 2021.
145. WILK, Aaron J. et al. Multi-omic profiling reveals widespread dysregulation of innate immunity and hematopoiesis in COVID-19. **The Journal of experimental medicine**, [S. l.], v. 218, n. 8, 2021. DOI: 10.1084/JEM.20210582. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34128959/>. Acesso em: 9 jul. 2022.
146. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO COVID-19 Dashboard**. 2022.
147. YANG, Li; LIU, Shasha; LIU, Jinyan; ZHANG, Zhixin; WAN, Xiaochun; HUANG, Bo; CHEN, Youhai; ZHANG, Yi. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1038/s41392-020-00243-2. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-020-00243-2>.
148. YI, Ruirong; SAITO, Kengo; ISEGAWA, Naohisa; SHIRASAWA, Hiroshi. Alteration of cell cycle progression by Sindbis virus infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 462, n. 4, p. 426–432, 2015. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.04.148. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.148>.
149. YODER, Alyson C. et al. The transcriptome of HIV-1 infected intestinal CD4+ T cells exposed to enteric bacteria. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 13, n. 2, 2017. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006226.
150. YU, Chen et al. Mucosal-associated invariant T cell responses differ by sex in COVID-19. **Med (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 2, n. 6, p. 755–772.e5, 2021. DOI: 10.1016/J.MEDJ.2021.04.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33870241/>. Acesso em: 9 jul. 2022.
151. YU, Guangchuang; WANG, Li Gen; HAN, Yanyan; HE, Qing Yu. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 284–287, 2012. DOI: 10.1089/omi.2011.0118.
152. YUAN, Xiaoling et al. SARS coronavirus 7a protein blocks cell cycle progression at G0/G1 phase via the cyclin D3/pRb pathway. **Virology**, [S. l.], v. 346, n. 1, p. 74–85, 2006.

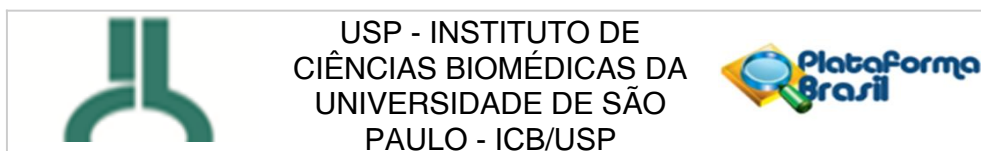
DOI: 10.1016/j.virol.2005.10.015.

153. YUAN, Xiaoling; SHAN, Yajun; ZHAO, Zhenhu; CHEN, Jiabei; CONG, Yuwen. G0/G1 arrest and apoptosis induced by SARS-CoV 3b protein in transfected cells. **Virology Journal**, [S. l.], v. 2, p. 1–5, 2005. DOI: 10.1186/1743-422X-2-66.
154. ZHANG, Qian et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 370, n. 6515, 2020. DOI: 10.1126/SCIENCE.ABD4570. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32972995/>. Acesso em: 20 nov. 2021.
155. ZHANG, Yaping; ZHENG, Junke. Functions of Immune Checkpoint Molecules Beyond Immune Evasion. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 1248, p. 201–226, 2020. DOI: 10.1007/978-981-15-3266-5_9. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-3266-5_9. Acesso em: 10 nov. 2021.
156. ZHANG, Yongke; LEES, Emma. Identification of an overlapping binding domain on Cdc20 for Mad2 and anaphase-promoting complex: model for spindle checkpoint regulation. **Molecular and cellular biology**, [S. l.], v. 21, n. 15, p. 5190–5199, 2001. DOI: 10.1128/MCB.21.15.5190-5199.2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11438673/>. Acesso em: 10 nov. 2021.
157. ZHOU, Guangyan; SOUFAN, Othman; EWALD, Jessica; HANCOCK, Robert E. W.; BASU, Niladri; XIA, Jianguo. NetworkAnalyst 3.0: A visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], v. 47, n. W1, p. W234–W241, 2019. DOI: 10.1093/nar/gkz240.
158. ZIEGLER, Carly G. K. et al. Impaired local intrinsic immunity to SARS-CoV-2 infection in severe COVID-19. **Cell**, [S. l.], v. 184, n. 18, p. 4713–4733.e22, 2021. DOI: 10.1016/J.CELL.2021.07.023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34352228/>. Acesso em: 10 jul. 2022.

Anexos

Anexo I

Parecer do Comitê de ética e Pesquisa.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise sistêmica e integrativa da resposta imune dos linfócitos T de pacientes com COVID-19: efeito das comorbidades e do tratamento com a hidroxicloroquina

Pesquisador: Otávio Cabral Marques

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 30959020.2.0000.5467

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - ICB/USP

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.098.656

Apresentação do Projeto:

trata-se de resposta de pendência de análise inicial

Objetivo da Pesquisa:

Resposta de pendência de análise inicial

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica a esta solicitação

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores responderam aos questionamentos feitos por este comitê e alteraram os documentos solicitados como o TCLE corrigindo itens e reformulando outros. Incluíram a carta de comprovação do Hospital de onde serão feitas as coletas

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os documentos solicitados

Recomendações:

Aprovar

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br

Anexo II – Caracterização clínica e laboratorial dos pacientes envolvidos na análise do exoma completo.

	RBC (Red Blood Cells) [10 ⁶ /uL]	HGB (Hemoglobin) [g/dL]	HCT (Hematocrit) [%]	VCM (Average Corpuscular Volume) [fL]	HCM (Mean Corpuscular Hemoglobin) [pg]	CHCM (Mean corpuscular hemoglobin concentration) [g/dL]	RDW-SD [fL]
Samples	ERYTHROCYTARY SERIES						
ITA 0313	5,01	44026	43,7	87,2	43919	33,6	42,7
ITA 0361	5,28	43936	46,3	87,7	43890	33,3	44,6
GLO 0067	4,63	44087	41	88,6	30	33,9	43,8
ITA 0355	4,88	43845	44,8	91,8	44104	33,7	44,2
ITA 0325	3,97	44023	34,9	87,9	43980	33,5	43,6
ITA 0371	4,55	43874	38,9	85,5	29	33,9	43,1
GLO 0064	4,37	44055	38,9	89	43919	32,9	45,7
GLO 0120	3,98	43994	37,6	94,5	44043	33,5	44,6
ITA 0317	4,89	43996	43,2	88,3	44103	33,8	41,2
ITA 0352	44169	43994	37,2	90,3	44012	33,9	41
ITA 0354	4,76	43995	39,8	83,6	44010	34,2	39,8
AJ 01	4,82	43875	44,3	91,9	43980	32,1	40,9
GLO 0066	4,46	43964	40,1	89,9	43920	33,7	40,9
Reference value	Men: 4,4 a 6,6 millions/uL	Men: 13 a 18 g/dL	Men: 39 a 54 %	Men: 76 a 96 fL	Men: 27 a 33 pg	Men: 32 a 36 g/dL	-
	Women: 4,2 a 5,4 millions/uL	Women: 12 a 16 g/dL	Women: 37 a 48%	Women: 76 a 96 fL	Women: 27 a 33 pg	Women: 32 a 36 g/dL	-

	RDW-CV [%]	WBC (White Blood Cells) [10 ³ /uL]	NEUTROPHILO [10 ³ /uL]	NEUTROPHILO [%]	LYMPHOCYTE [10 ³ /uL]	LYMPHOCYTE [%]	MONOCYTE [10 ³ /uL]	MONOCYTE [%]	EOSINOPHIL [10 ³ /uL]	EOSINOPHIL [%]	BASOPHIL [10 ³ /uL]	BASOPHIL [%]	IMMATURE GRANULOCYTES
Samples	WBC SERIES												
ITA 0313	44025	7,4	5,18	70	1,73	43944	0,4	43926	0,09	43862	0	0	0,11 43952
ITA 0361	14	6,56	2,29	34,9	2,79	42,5	0,51	44050	0,96	43996	0,01	0,2	0,01 0,2
GLO 0067	44087	8,85	4,64	52,4	3,2	36,2	0,5	43987	0,51	44048	0	0	0,03 0,3
ITA 0355	43903	6,68	4,56	68,3	1,79	44069	0,31	43986	0,02	0,3	0	0	0,01 0,1
ITA 0325	44087	7,43	4,43	59,6	2,55	34,3	0,4	43926	0,05	0,7	0	0	0,13 44013
ITA 0371	43875	5,65	3,14	55,6	2,22	39,3	0,26	43986	0,03	0,5	0	0	0,01 0,2
GLO 0064	43965	5,69	3,5	61,5	1,61	43918	0,46	43838	0,12	43832	0	0	0,02 0,4
GLO 0120	43903	7,97	5,29	66,4	2,15	27	0,53	43988	0	0	0	0	0,01 0,1
ITA 0317	44086	6,02	3,64	60,5	1,78	44011	0,46	43989	0,14	43892	0	0	0,03 0,5
ITA 0352	44024	5,82	2,87	49,3	2,09	35,9	0,46	44081	0,4	44080	0	0	0,01 0,2
ITA 0354	43874	8,09	5,04	62,3	2,14	43977	0,73	9	0,17	43832	0,01	0,1	0,04 0,5
AJ 01	43902	7,67	4,6	59,9	2,23	43859	0,45	44079	0,39	43835	0	0	0,02 0,3
GLO 0066	44024	11,8	8,43	71,4	1,47	43963	0,9	43989	0,98	43898	0,02	0,2	0,01 0,1
Reference value	Men: 11 a 16 %	4,000 a 10,000 uL	2,160 a 6,700 uL	54% a 67%	800 a 3,600 uL	20 a 36%	120 a 1,000 uL	1 a 10%	40 a 500 uL	1 a 5%	0 a 200 uL	0 a 2%	0 0
	Women : 11 a 16%	4,000 a 10,000 uL	2,160 a 6,700 uL	54% a 67%	800 a 3,600 uL	20 a 36%	120 a 1,000 uL	1 a 10%	40 a 500 uL	1 a 5%	0 a 200 uL	0 a 2%	0 0

	PLT [10 ³ /uL]	PLT FLAGS
Samples	PLAQUETARY SERIES	
ITA 0313	230	PLATELETARY AGGREGATES
ITA 0361	324	PLATELETARY AGGREGATES
GLO 0067	295	PLATELETARY AGGREGATES
ITA 0355	286	-
ITA 0325	338	-
ITA 0371	199	PLATELETARY AGGREGATES
GLO 0064	182	PLATELETARY AGGREGATES
GLO 0120	224	-
ITA 0317	232	-
ITA 0352	298	-
ITA 0354	350	PLATELETARY AGGREGATES
AJ 01	265	-
GLO 0066	309	-
Reference value	Men: 140 000 a 450 000 uL	No plateletary aggregates
	Women: 140 000 a 450 000 uL	

<i>Renal and Hepatic Profile</i>										
	UREA (mg/dL)	CREATININE (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	GGT (U/L)	ALKALINE PHOSPHATASE (U/L)	DIRECT BILIRUBIN (mg/dL)		INDIRECT BILIRUBIN (mg/dL)	TOTAL BILIRUBIN (mg/dL)
Samples										
ITA 0313	45	1,6	42	45	48	100	0,7		0,7	1,4
ITA 0361	40	1,2	38	33	16	46	0,5		0,5	1
GLO 0067	33,7	0,8	34	39	21	48	0,6		0,6	1,2
ITA 0355	28	0,7	24	22	19	45	0,5		0,5	1
ITA 0325	48,8	1,5	38	36	27	72	1		0,8	1,8
ITA 0371	43,4	1,2	40	39	33	100	0,7		0,6	1,3
GLO 0064	46,8	1,5	85	80	57	54	0,7		1	1,7
GLO 0120	43	1,3	39	42	34	65	0,6		0,7	1,3
ITA 0317	40	0,9	123	129	67	156	0,5		0,5	1
ITA 0352	38	0,8	23	26	15	46	0,6		0,5	1,1
ITA 0354	37,9	0,7	33	35	23	49	0,7		0,4	1,1
AJ 01	42	1	48	50	56	111	0,6		0,6	1,2
GLO 0066	39	1	24	21	32	54	0,6		0,2	0,8
Reference value	<i>Men/Women: 10 e 50 mg/ dL</i>	<i>Men: 0,7 e 1,3mg/dL</i>	<i>Men: < 37 U/L</i>	<i>Men: < 42 U/L</i>	<i>Men: 12 a 73 U/L</i>	<i>Men: 55 - 149 U/L</i>	<i>Men/Women: 0,20 a 1,10 mg/dL</i>		<i>Men/Women: 0,20 a 0,80 mg/dL</i>	<i>Men/Women: 0,00 a 0,30 mg/dL</i>
		<i>Women: 0,6 e 1,1mg/dL</i>	<i>Women: < 31 U/L</i>	<i>Women: < 32 U/L</i>	<i>Women: 8 a 41 U/L</i>	<i>Women: 45 - 87 U/L</i>				

Nutrition		
Samples	Vit D (ng/mL)	Zn (µg/dL)
AJ 01	29,51	143
ITA 0361	44,37	148
ITA 0317	11,27	13
ITA 0313	25,58	142
ITA 0354	21,9	47
ITA 0355	28,47	48
ITA 0352	10,68	123
ITA 0325	12,69	33
ITA 0371	23,99	64
GLO 0067	22,42	52
GLO 0064	11,72	52
GLO 0120	11,7	40
GLO 0066	17,65	41
Reference value	<i>Men/Women : >20-100 ng/mL</i>	<i>Men/Women: 50 a 110 µg/mL</i>