

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ASSINATURA DA INFECÇÃO SEVERA COM SARS-COV-2 EM AUTÓPSIAS  
PULMONARES E O SEU USO PARA O REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS:  
*Estudo comparativo de dados de amostras clínicas e de modelos pré-clínicos*

Henrique Chapola

Porto Alegre  
2021

CIP - Catalogação na Publicação

Chapola, Henrique

ASSINATURA DA INFECÇÃO SEVERA COM SARS-COV-2 EM  
AUTÓPSIAS PULMONARES E O SEU USO PARA O  
REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS: Estudo comparativo de  
dados de amostras clínicas e de modelos pré-clínicos /

Henrique Chapola. -- 2021.

70 f.

Orientador: Fábio Klant.

Coorientador: Daiani Machado de Vargas.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. COVID-19. 2. Reposicionamento de Fármaco. 3.  
Bioinformática. 4. Reguladores Mestre. 5. Assinatura  
molecular. I. Klant, Fábio, orient. II. Vargas,  
Daiani Machado de, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

ASSINATURA DA INFECÇÃO SEVERA COM SARS-COV-2 EM BIÓPSIAS  
PULMONARES E O SEU USO PARA O REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS:

*Estudo comparativo de dados de amostras clínicas e de modelos pré-clínicos*

Henrique Chapola

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Co-orientadora: Dra. Daiani M. de Vargas

Porto Alegre

2021

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Celular (Laboratório 24), do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciência Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e fomentado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia: Translacional em Medicina (INCT-TM/CNPq/FAPESP - 465458/2014-9) e IMMUNESHARE MCTI Trial (MCTI/CNPq - 401558/2021-5).

## AGRADECIMENTOS

Esse trabalho só foi finalizado graças ao carinho, compreensão, amor, e paciência de diversas pessoas.

Gra, Sé, Duda e Binho, obrigado por, nos piores dias, me lembrarem a sorte que tenho de ter uma família maravilhosa. Vocês são um farol num porto seguro.

À minha flor, muito obrigado por cuidar bem de perto de mim e não deixar eu desistir. Seu carinho com certeza apaziguou as maiores dores.

Denis, Nelson e Eduardo, obrigado por me acolherem todos esses anos, cuidarem de mim e me incluírem na família de vocês.

Bruno e Joice, obrigado por me ajudarem “a comer meio quilo de sal” em muitos momentos, por me emprestarem seus ombros, ouvidos, palavras e pelos abraços.

Fábio, por ser muito mais do que um orientador acadêmico, com ótimas ideias. Ser um amigo, me motivar com meu trabalho (muitas vezes estar mais motivado com os meus dados do que eu mesmo), e me ver mais do que um aluno.

Dai, que não imagina em quantos momentos simplesmente me fez desempacar do marasmo, seja por um *insight* preciso ou uma “dúvida boba”. E Marcelinho, nunca vou esquecer o fim de semana que você deixou de ter para me ajudar a limpar e formatar o PC.

Marco, muito obrigado por me ensinar tanta coisa na bioinformática e por me mostrar que a virtude, muitas vezes, é 5 minutos de calma para pensar.

Ivi, Cami, Lúcia, Jé, Pati, Lia, Cássio, Maria, Mery, Su, Pedro e Cinthia, obrigado por fazer essa passagem no Lab 24 tão maravilhosa, com nossos cafés, sim-eventos, não-eventos e nossas conversas para rir da desgraça ou chorar de rir!

Rodrigo e Camila, muito obrigado por serem profissionais fantásticos. Vocês catalisaram a mudança que eu precisava passar e deram sentido para minha realidade.

À Secretaria e à Comissão do Programa de Pós-Graduação, muito obrigado pelo voto de fé e por todo o amparo.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
PARTE I	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
INTRODUÇÃO	6
COVID-19: biologia molecular e características clínicas	6
Pesquisa por fármacos e reposicionamento	8
Biologia de sistemas e sistemas biológicos	11
OBJETIVOS	13
Objetivos gerais	13
Objetivos específicos	13
PARTE II	14
RESULTADOS	15
PARTE III	55
DISCUSSÃO	56
Assinatura molecular da COVID-19 severa: processos e reguladores	57
Fármacos reposicionados para a COVID-19 grave: classes e possíveis mecanismos	59
Modelos celulares pré-clínicos: representação limitada de pulmão, mas não de epitélio respiratório superior	60
Conclusões	62
Perspectivas	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

## APRESENTAÇÃO

Essa dissertação está dividida em três partes, contendo os seguintes itens:

**Parte I:** Resumo, Resumo em inglês (Abstract), Lista de abreviaturas, Introdução e Objetivos;

**Parte II:** Resultados, apresentados na forma de um manuscrito científico;

**Parte III:** Discussão e Referências Bibliográficas.

## **PARTE I**

## RESUMO

COVID-19 é uma doença viral aguda causada pelo novo coronavírus SARS-CoV-2. Com milhões de casos de COVID-19 em todo o mundo, opções terapêuticas são urgentemente necessárias para mitigar a sua morbidade e mortalidade, mas atualmente permanecem limitadas. Uma estratégia promissora para obter informações relevantes sobre sua fisiopatologia que possam ter aplicações terapêuticas é investigar os mecanismos regulatórios envolvidos na progressão para COVID-19 severa. Este trabalho tem como objetivo reconstruir a rede regulatória de COVID-19 severa e encontrar seus Reguladores Mestres (chamados de assinatura da doença). Usamos séries de conjuntos de dados de expressão gênica, disponíveis publicamente, derivados de autópsias pulmonares de pacientes para inferir a rede regulatória associada a COVID-19 severa. Identificamos um conjunto de seis fatores de transcrição (*TALI*, *TEAD4*, *EPAS1*, *ATOH8*, *ERG* e *ARNTL2*) como potenciais Reguladores Mestres da doença. Após, pela abordagem de Mapa de Conectividade para o reposicionamento de drogas, encontramos 52 drogas diferentes (anti-inflamatórios, anti-infecções, psicotrópicos, reguladores da pressão arterial e do ritmo cardíaco) que potencialmente revertem a assinatura COVID-19 severa, e podem representar novas alternativas terapêuticas para a doença. Além disso, usando o índice de Jaccard, avaliamos a sobreposição entre a assinatura clínica severa de COVID-19 inferida e os medicamentos com os resultados obtidos da análise de amostras de esfregaço (*swab*) nasofaríngeo de pacientes infectados e células Vero, A549 e NHBE infectadas com diferentes MOI (*multiplicity of infection*) de SARS-CoV-2, modelos pré-clínicos celulares amplamente usados para pesquisar novas opções terapêuticas potenciais. Nossos dados demonstram uma semelhança significativa de células NHBE com assinatura COVID-19 clínica severa, enquanto as células A549 e Vero foram mais semelhantes às amostras de *swabs* nasofaríngeos. Usando uma abordagem de transcritômica integrada, identificamos candidatos a reguladores mestres envolvidos com COVID-19 severa, bem como várias drogas que potencialmente revertem esse padrão de expressão e também fornecem novas perspectivas sobre alvos moleculares e reposicionamento de drogas para futura investigação e validação na doença. Ademais, nosso estudo demonstra a limitada sobreposição entre os dados clínicos e pré-clínicos na pesquisa COVID-19 e destaca ainda a necessidade crítica de escolher o melhor modelo pré-clínico disponível para orientar a pesquisa sobre a fisiopatologia e o reposicionamento de drogas em potencial.

## ABSTRACT

COVID-19 is an acute viral illness caused by the novel SARS-CoV-2 coronavirus. With millions of COVID-19 cases worldwide, therapeutic options are urgently needed to mitigate morbidity and mortality, but currently remain limited. A promising strategy to gain relevant information regarding its pathophysiology that could have therapeutic applications is to investigate the regulatory mechanisms involved in severe COVID-19 progression. This work aims to reconstruct the severe COVID-19 regulatory network and find its transcriptional master regulators (so called disease signature). We use a series of gene expression datasets, publicly available, from patient lung biopsies to infer the co-expression network associated with severe COVID-19. We identified a set of six transcription factors as potential master regulators (*TAL1*, *TEAD4*, *EPAS1*, *ATOH8*, *ERG*, and *ARNTL2*). After, by Connectivity Map drug repositioning approach, we found 52 different drugs (anti-inflammatories, anti-infections, psychotropics, blood pressure, and heart rhythm regulators) that potentially revert severe COVID-19 signature, and could be a new therapeutic venue for the disease. In addition, using Jaccard index, we evaluated the overlap between the inferred clinical severe COVID-19 signature and drugs with the ones obtained from infected patients nasopharyngeal swab samples of, and Vero, A549 and NHBE cells infected with different MOI (*multiplicity of infection*) of SARS-CoV-2, preclinical cell models widely used to research for new potential therapeutic options. Our data demonstrate a significant similarity of NHBE cells with clinical severe COVID-19 signature, whereas A549 and Vero cells were more similar to nasopharyngeal swabs samples. Using an integrated transcriptomics approach, we identified master regulators candidates involved with severe COVID-19, as well as several drugs that potentially reverse these expression patterns, and provides new perspectives on molecular targets and drug repositioning for future investigation and validation in severe COVID-19 management. Moreover, our study demonstrates how limited is the overlap between clinical and preclinical data in COVID-19 research and further highlights the critical need to choose the best preclinical model available to guide research into the pathophysiology and potential drugs repositioning.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2 ( <i>Angiotensin conversor enzyme 2</i> )
ARNTL2	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like 2</i>
ATC	Classificação Anatômica Terapêutica Química
ATOH8	<i>Atonal basic helix-loop-helix transcription factor 8</i>
CMap	Mapa de Conectividade ( <i>Connectivity Map</i> )
COVID-19	Doença por coronavírus de 2019 ( <i>Coronavirus Disease of 2019</i> )
DGA	<i>Dataset</i> grande de autópsias
DPA	<i>Dataset</i> pequeno de autópsias
EPAS1	<i>Endothelial Per-Arnt-Sim domain protein 1</i>
ERG	<i>Erythroblast transformation-specific-related gene</i>
GDE	Genes diferencialmente expressos
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PS	Proteína <i>Spike</i>
RM	Reguladores Mestres
SARS-CoV-2	Síndrome Aguda Respiratória Severa – Coronavírus 2
TAL1	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1</i>
TEAD4	<i>TEA Domain Transcription Factor 4</i>
TMPRSS2	Serine Protease transmembrana 2 ( <i>Transmembrane protease, serine 2</i> )

## INTRODUÇÃO

### **COVID-19: biologia molecular e características clínicas**

Em dezembro de 2019, na província de Wuhan, China, tivemos a confirmação das primeiras vítimas da doença por coronavírus de 2019 (COVID-19). Inicialmente, parecia que o mundo lidaria com uma situação semelhante ao surto de SARS de 2003, que foi contido alguns meses após seu anúncio, mas em março de 2020 a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretou a situação de pandemia global (GHEBREYESUS, 2020). O beta-coronavírus da Síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), responsável pela COVID-19, é um vírus envelopado de RNA fita simples envolvido por proteínas estruturais (Figura 1) (WANG et al., 2020). O SARS-CoV-1, que causou o surto de SARS de 2003, e o SARS-CoV-2 possuem como principal mecanismo de entrada nas células hospedeiras a ligação da proteína viral *Spike* (PS) com a enzima ACE2, clivagem pela TMPRSS2 do hospedeiro, que leva a exposição de suas regiões hidrofóbicas, e posterior fusão da membrana do vírion à da célula hospedeira. Ambos beta-coronavírus têm uma similaridade genética de 76% (HOFFMANN et al., 2020a).

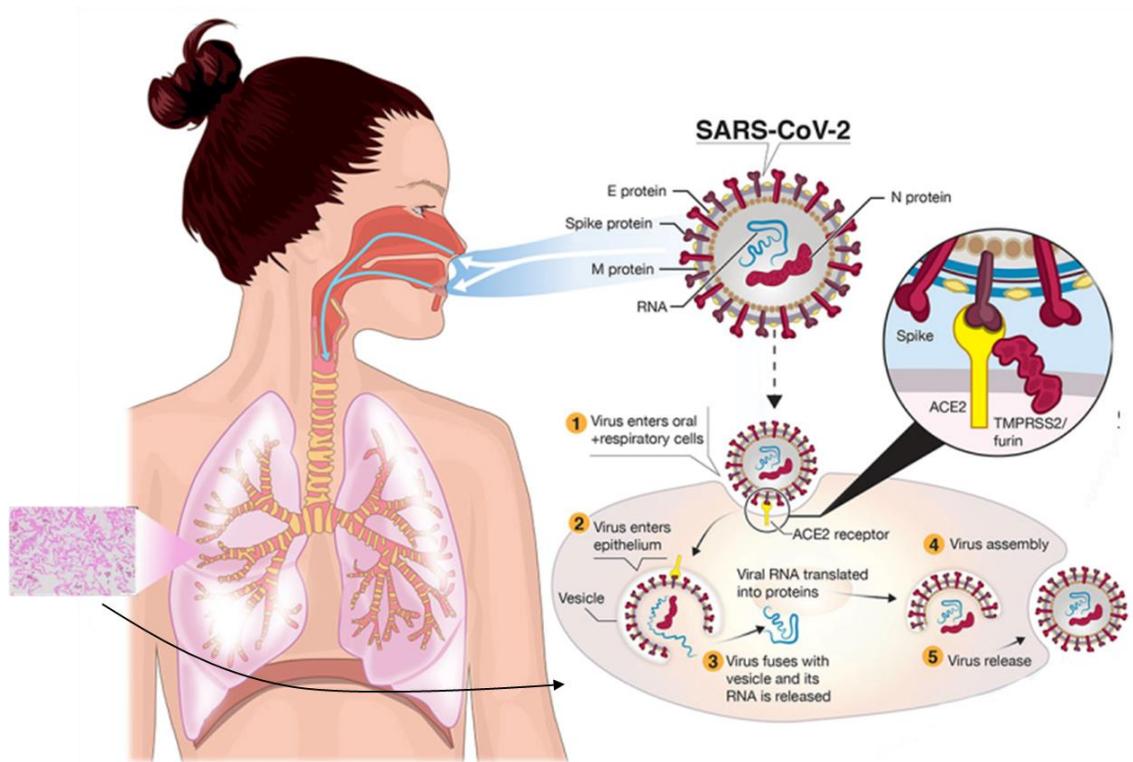


Figura 1: Esquema estrutural e mecanismo de entrada no tecido pulmonar do SARS-CoV-2.

Fonte: modificado de Funk Colin D., Laferrière Craig, Ardakani Ali: "A Snapshot of the Global Race for Vaccines Targeting SARS-CoV-2 and the COVID-19 Pandemic", *Frontiers in Pharmacology*, 11, 2020a.

Durante os primeiros meses da pandemia, foi observada a maior letalidade (mas não exclusiva) em pessoas acima de 60 anos e com comorbidades, tais como doenças crônicas renais, hepáticas, neurológicas, respiratórias, cardiovasculares, hematológicas, *diabetes mellitus*, obesidade ou imunossupressão (RANZANI et al., 2021). A doença apresenta três estágios distintos (Figura 2): a fase inicial (viral), onde o paciente costuma apresentar sintomas como tosse seca e febre; a fase pulmonar, onde o paciente apresenta dificuldade para respirar (pneumonia), podendo evoluir para um quadro hipóxico; e a fase hiper-inflamatória, na qual o paciente apresenta síndrome de angústia respiratória, insuficiência cardíaca e/ou falência de múltiplos órgãos (SIDDIQI; MEHRA, 2020). A evolução de quadros leves para severos se mostrou um desafio de manejo em meio a sobrecarga dos Sistemas Públicos e Privados de Saúde (RANZANI et al., 2021). Ainda não está claro de que maneira isso ocorre, mas o tropismo do vírus pode variar e causar

diferentes complicações no pulmão e sistema circulatório, podendo afetar também órgãos como coração e cérebro (DUARTE-NETO et al., 2021). Após mais de um ano de pandemia, protocolos de manejo dos pacientes com COVID-19 foram aprimorados, sendo atualmente, segundo o Ministério da Saúde, baseados em respostas adequadas ao quadro clínico do paciente no momento do atendimento, sem terapia farmacológica contra COVID-19 por falta de consenso científico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

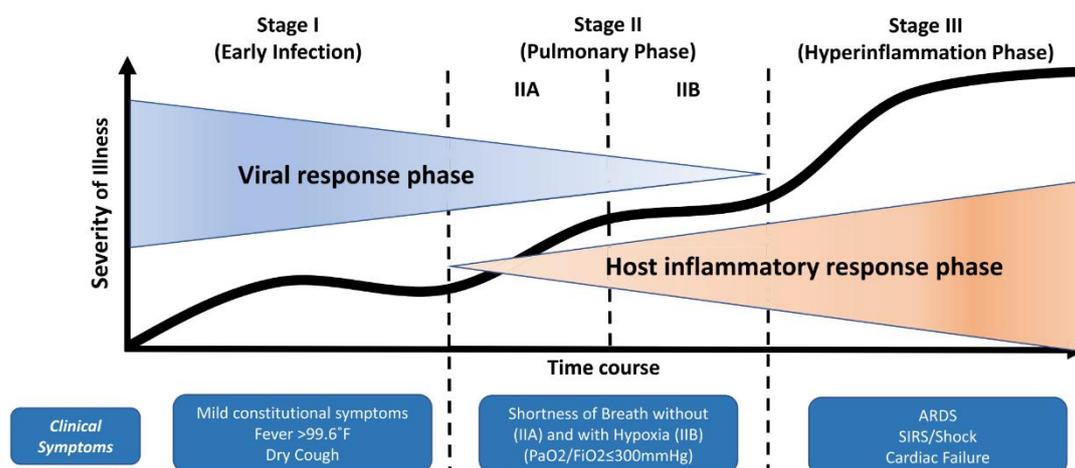


Figura 2: Estágios da COVID-19 relacionando o tempo, as respostas, e a severidade.

Fonte: Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. *J Heart Lung Transplant.* 2020;39(5):405-407. doi:10.10

Visto a dificuldade do tratamento da COVID-19 severa, a busca por potenciais fármacos que pudessem evitar a evolução dos quadros leves torna-se de suma importância. Desta forma, uma área a ser destacada é a pesquisa por intervenções farmacológicas.

### Pesquisa por fármacos e reposicionamento

Usualmente, quando acometido por uma infecção, todo indivíduo procura por um tratamento. Contudo não temos como dispor de tal recurso em uma doença nova por motivos claros: todo fármaco ou droga precisa de avaliação de segurança e eficácia para

que seja possível determinar da melhor forma possível a relação risco-benefício, o que incluem níveis seguros de consumo, metabolização, forma de administração, efeitos adversos. Desta forma, há diretrizes que uma farmacêutica tem que respeitar antes de poder disponibilizar um novo medicamento (ANVISA, 2004). O processo de desenvolvimento até a disponibilização desse medicamento pode levar uma década de trabalho, além de custar, em média, um bilhão de dólares (WOUTERS; MCKEE; LUYTEN, 2020). Dessa forma, uma alternativa para poder acelerar essa procura por tratamentos está em uma estratégia chamada de reposicionamento (Figura 3), que, baseado em dados de larga escala, ensaios *in silico*, ou evidências empíricas e literárias, propõem o uso de um fármaco conhecido e regulamentado em uma nova outra situação ao qual ele ainda não é aplicado (PUSHPAKOM et al., 2018).

Sendo a forma mais barata e rápida de se achar um tratamento, diversos cientistas propuseram o reposicionamento de inúmeras drogas em poucos meses para o tratamento da COVID-19. Uma das abordagens sistemáticas para propor esse reposicionamento de fármacos é conhecida como CMap, onde a expressão gênica do fenótipo de interesse (por exemplo, uma doença) é comparada com dados de expressão de células perturbadas com uma miríade de drogas.

Usando técnicas análogas a *Geneset Enrichment Analysis*, o ranking da expressão gênica dos dois perfis é comparado e um escore de conectividade é determinado com base no ordenamento desse ranking. O interessante, quando se quer reverter as perturbações causadas por doenças, como a COVID-19, é selecionar fármacos que apresentem uma interferência oposta (LAMB, 2007; MA'AYAN et al., 2014; SMIRNOV et al., 2016).

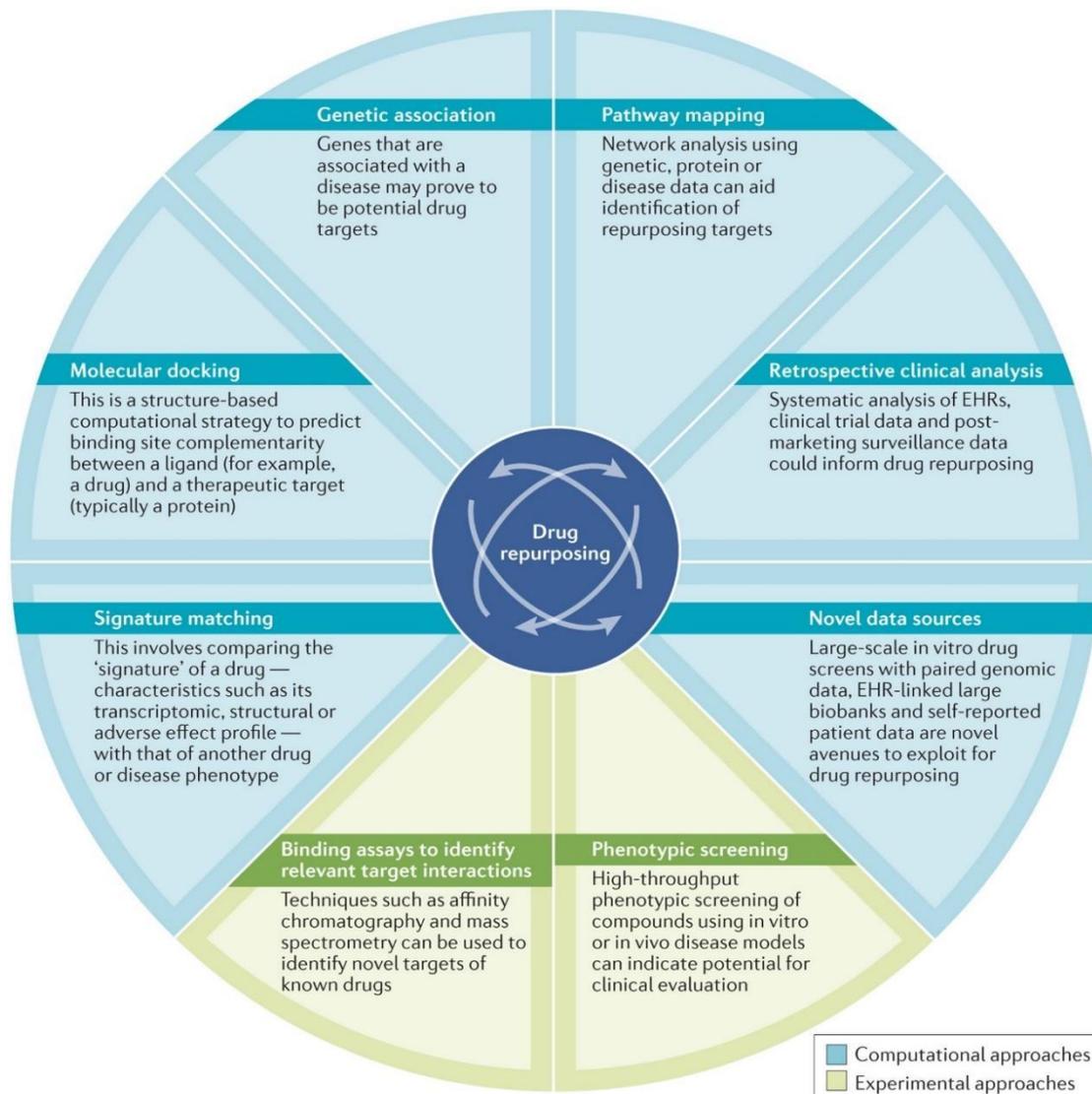


Figura 3: Possíveis estratégias usadas para o reposicionamento de fármaco.

Fonte: Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov* 18, 41–58 (2019). <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>

Contudo, existe uma importante limitação nesse tipo de estratégia, que se torna ainda mais significativa quando se trata de uma doença nova. As taxas de sucesso de reposicionamento de fármaco ainda são baixas (KHADKA et al., 2020), e dentre os diversos motivos estão a utilização de modelos pré-clínicos para a prospecção/teste de fármacos pouco fidedignos à fisiologia complexa e multi-sistêmica do corpo humano, concentração e *timing* da terapêutica para a nova doença inadequados, especialmente visando agir sobre órgão(s) alvo(s) e janela de tempo ótima e falta de conhecimento sobre

interações entre a patofisiologia causada pela doença e a ação do fármaco (PARVATHANENI; GUPTA, 2020).

### **Biologia de sistemas e sistemas biológicos**

Segundo o dicionário Michaelis, um sistema é “... conjunto de elementos distintos, com características e funções específicas, organizadas de forma natural ou por meios artificiais”. Vendo por essa ótica, a vida em qualquer uma de suas hierarquias, seja da macro à micro, pode ser considerada como um sistema. Células, organelas, e/ou proteínas trabalhando em um número infinito de componentes dentro de outro componente. Dessa noção surgiu a frase de François Jacob, aqui apresentada em livre tradução:

*“Todo objeto que se estuda na biologia é um sistema de sistemas”.*

Os sistemas biológicos assim se apresentam extremamente complexos. E com esse paradigma surge a Biologia de Sistemas, onde abordagens multidisciplinares têm como fim traduzir os dados em larga-escala a doses interpretáveis e aptas a geração de novo conhecimento. Sendo um sistema, também se pode observar algumas propriedades das entidades biológicas, que são sua estabilidade, resposta a perturbações e o controle de suas respostas (Figura 4) (TREWAVAS, 2006).

Sendo assim, sistemas não se comportam aleatoriamente, e algum nível de coerência é esperado. Anteriormente, foi comentado que um dos problemas no reposicionamento de fármacos é a utilização de modelos muito diferentes do organismo humano. No entanto, em teoria, já que ambos são sistemas com naturezas definidas, é possível comparar a correspondência entre eles. Para isso, podemos empregar a Biologia de Sistemas e usar métricas, como por exemplo, a similaridades entre genes e termos, como genes, ontologias gênicas (HENKEL et al., 2018).

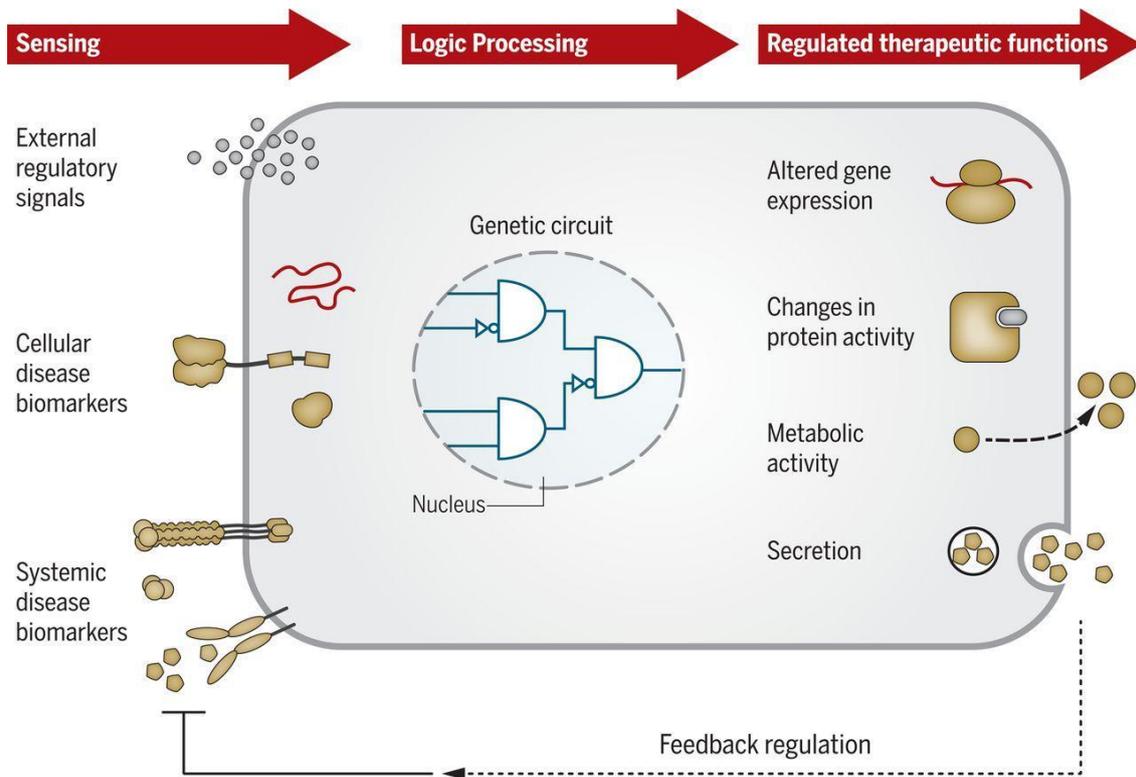


Figura 4: Representação esquemática de uma célula como um sistema e seus circuitos.

Fonte: T. Kitada, B. DiAndreth, B. Teague, R. Weiss, *Programming gene and engineered-cell therapies with synthetic biology*. *Science* 359, eaad1067 (2018).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos gerais**

O objetivo desse trabalho foi de obter a assinatura molecular da COVID-19 severa em amostras clínicas de pulmões de pacientes, usando ontologias gênicas e Reguladores Mestres, e prospectar por fármacos candidatos a reposicionamento, baseado nessa assinatura. Adicionalmente, averiguamos o nível de similaridade entre modelos clínicos de estudo e modelos celulares pré-clínicos para determinar se e quais desses possuem melhor aptidão para simular previamente os tecidos alvo do corpo humano.

### **Objetivos específicos**

- Avaliar a qualidade de dados disponibilizados no repositório público *Gene Expression Omnibus* de expressão gênica, contendo amostras de células NHBE, A549 e Vero experimentalmente infectadas com SARS-CoV2, e amostras de *swab* nasofaríngeo e autópsias de tecido pulmonar de pacientes com COVID-19 severa;
- Realizar análises de expressão diferencial, ontologias gênicas, reguladores mestres e mapa de conectividade, para obter a assinatura da COVID-19 severa nas autópsias de pulmão;
- Comparar dados de modelos *in vitro* com dados de amostras clínicas, usando coeficiente de Jaccard e teste exato de Fisher, para estabelecer graus de similaridade e inferir a adequação entre as comparações.

## **PARTE II**

## RESULTADOS

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de um manuscrito científico, para futura submissão ao Jornal *Cellular and Molecular Life Sciences* (<https://www.springer.com/journal/18>).

### **PARTE III**

## DISCUSSÃO

### **Interferência da heterogeneidade das amostras de autópsia de pulmão de pacientes com COVID-19 nas análises**

A COVID-19 é uma doença particularmente mortal por afetar o trato respiratório inferior em casos moderados e severos, causando pneumonia e danos alveolares difusos, e podendo culminar no desenvolvimento de uma síndrome respiratória aguda grave (SRAG; CARSANA et al., 2020). Assim, os dados moleculares de amostras clínicas como biópsias pulmonares de pacientes com COVID-19, são de grande valor para a elucidação da resposta induzida pela infecção viral nos casos mais graves. Infelizmente, até o momento das nossas análises, dados desta natureza são muito limitados.

Os conjuntos de dados mais apropriados para estabelecer a assinatura da doença, selecionados após uma extensa pesquisa na base de dados *GEO*, foram autópsias clínicas de tecido pulmonar de pacientes que vieram a óbito em decorrência da COVID-19. Esses dados pertencem às séries GSE150316 (54 amostras) e GSE155241 (6 amostras), e foram denominadas, em nosso estudo, de DGA (*Dataset* grande de autópsias) e DPA (*Dataset* pequeno de autópsias), respectivamente.

Após analisar os dados, no entanto, tornaram-se claras várias limitações dos dois conjuntos de dados. Presumimos que a difícil detecção dos genes diferencialmente expressos (GDE) em amostras de tecido pode ser devido a diferenças de composição celular entre amostras, que podem enviesar a quantidade de mRNA, a variabilidade genotípica entre os pacientes e a heterogeneidade da propagação da SRA-CoV-2 no pulmão (DESAI et al., 2020; ESTEVE-CODINA, 2018). Os autores do DGA confirmaram o tropismo do vírus em diferentes regiões e tecidos através do método de *PCR*, e observaram que os doentes infectados têm resultados indetectáveis em algumas

regiões pulmonares (DESAI et al., 2020). Portanto, como selecionamos as amostras clínicas apenas de acordo com o diagnóstico do paciente, esta difusão desigual do vírus nas amostras clínicas pode ter afetado o poder estatístico das análises.

### **Assinatura molecular da COVID-19 severa: processos e reguladores**

Uma observação importante sobre o nosso trabalho é que a assinatura molecular da COVID-19 inferida e os fármacos reposicionados com potencial terapêutico são relacionados à forma grave da doença, uma vez que os dados utilizados nas análises foram provenientes do conjunto de dados DPA gerados a partir de amostras de autópsia de pacientes que faleceram devido a COVID-19. A este respeito, podemos presumir que os reguladores mestres (RM) em DPA são importantes para o estadiamento da doença.

Uma característica marcante na COVID-19 é a resposta hiper-inflamatória (ANKA et al., 2021). Neste sentido, os fatores de transcrição *TALI*, *ERG*, e *ARNTL2* identificados como RM da doença, estão envolvidos na regulação da inflamação. Foi visto que o gene codificador de *TALI* tem um elemento regulatório NFκB/CREB no seu promotor e sua expressão induz à produção de citocinas em macrófagos (TERME et al., 2008), e associada a histona acetil-transferase p300 pode promover a expressão IL-6 (HUANG et al., 1999; NTRANOS; CASACCIA, 2016). Em contraponto, a *ERG* reprime a atividade transcricional de NFκB e a inflamação dependente de TNF-α em células endoteliais (SPERONE et al., 2011). Outro mediador importante conhecido da resposta imunológica é o ritmo circadiano. O fator de transcrição *ARNTL2* é um componente central da maquinaria desse ciclo, e durante infecções, mudanças na expressão de seus genes-alvos propiciam a aquisição de um estado pró-inflamatório nas células (HASPEL et al., 2020).

Quando observamos a interação com a célula-hospedeira, a SARS-CoV-2 sequestra organelas celulares e citoesqueleto, criando profundas mudanças morfológicas, como a

formação de sincício (WEN et al., 2020). *EPAS1* e *ATOH8* são ambos RM relacionadas com morfogênese celular, migração e proliferação, e tais processos estão profundamente relacionados com a dinâmica do citoesqueleto (FANG et al., 2014; ISLAM et al., 2020; PROVENZANO; KEELY, 2011). De fato, *EPAS1* e o receptor de glicocorticoide ativados por dexametasona, *nuclear receptor subfamily 3 group c member 1*, promovem a expressão *protein tyrosine kinase 6*, uma tirosina cinase que regula a via Rho/Ras, indissociavelmente importante para a organização do citoesqueleto. O *TEAD4*, o único RM partilhado com NHBE, pode estar envolvida na modulação imune, como sugerem estudos pan-cancer, onde a superexpressão de *TEAD4* é correlacionada com um infiltrado de leucócitos em tumores além de maior expressão de genes imunomodulatórios (WANG et al., 2021). Hipoteticamente, *TEAD4* também pode regular mecanismos celulares que impedem a formação de sincício, devido ao seu papel demonstrado na manutenção do estado tronco de trofoblastos (GOARDON et al., 2006). Talvez mais importante, *EPAS1* (também conhecido como *HIF2A*), *TAL1*, *ATOH8*, *EGR* e *ARNTL2* interagem com *HIF1A* e elementos de resposta à hipóxia, destacando-se uma adaptação celular à hipóxia grave encontrada nas células pulmonares infectadas pela SARS-COV-2 (GOARDON et al., 2006; ISLAM et al., 2020; KUMAR et al., 2020; LOONEY et al., 2017; MORIKAWA et al., 2019; POLOZNIKOV et al., 2021). Mesmo os inibidores de prolil hidroxilase HIF foram propostos como abordagem terapêutica para a COVID-19, com a intenção de melhorar a resposta hipóxica e aliviar o agravamento da COVID-19, diminuindo a expressão de ACE2 e da ferritina, uma proteína de armazenamento de ferro que promove anemia inflamatória crônica e pior prognóstico para pacientes internados com COVID-19 (POLOZNIKOV et al., 2021).

## **Fármacos reposicionados para a COVID-19 grave: classes e possíveis mecanismos**

Utilizando as anotações ATC, fornecidas pela OMS, podemos verificar a classificação de drogas segundo suas propriedades farmacológicas e terapêuticas. Baseado nesta classificação, as drogas com potencial terapêutico identificadas pela abordagem de CMap para o conjunto de dados DPA estão associadas principalmente ao controle da inflamação e interferência na interação vírus-hospedeiro. Isso não é particularmente surpreendente, visto a natureza dos primeiros medicamentos utilizado para aumentar a sobrevida de pacientes COVID-19, que foram a dexametasona (HORBY et al., 2021), e os inibidores de citocinas, tais como o tocilizumabe, usados para diminuir as chances de necessidade de ventilação mecânica (AZIZ et al., 2021). Porém, nos nossos resultados vemos outros fármacos, como por exemplo, a betametasona, um dos únicos corticoides sugeridos pela nossa abordagem, que foi clinicamente testado, no entanto, ele é indicado para a recuperação da anosmia, logo não se enquadra na fase da doença aqui estudada (RASHID; ZGAIR; AL-ANI, 2021). Dentre os propostos anti-inflamatórios, podemos sugerir também o potencial dos antidepressivos. Hashioka propôs que os antidepressivos também podem ter propriedades anti-inflamatórias, uma vez que aliviam a neuro-inflamação regulando os níveis de adenosina monofosfato cíclicos (HASHIOKA, 2011). Até agora, apenas foram publicados ensaios clínicos randomizados em pequena escala sugeriu a menor probabilidade de piora com o uso de fluvoxamina (não presente em nossos dados), e um estudo de associação abordou o papel terapêutico de antidepressivos em doentes com COVID-19 leve (HOERTEL et al., 2021; LENZE et al., 2020) sendo necessário mais estudos para elucidar o mecanismo e a efetividade dessa hipótese.

As interferências nos medicamentos de interação celular são agrupadas como anti-infecciosos, e são provenientes de uma série de diferentes classes farmacológicas.

Embora ainda não compreendidos mecanismos, diferentes autores exploram os mecanismos plausíveis, tais como a propriedade anti-inflamatória ou a interferência na replicação de vírus por competição com a ACE2 ou inibição de formação de endossomos (KIM et al., 2020; PODDIGHE; ALJOFAN, 2020). Curiosamente, o remdesivir não apareceu como resultado, mas isto corrobora que a inibição da atividade viral em COVID-19 severa pode não ser tão benéfica como nas fases iniciais (BEIGEL et al., 2020; GOLDMAN et al., 2020).

Curiosamente, o verapamil e o bisoprolol, fármacos cardiovasculares, teoricamente parecem cair em ambas as categorias. O verapamil é um bloqueador de canais  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem, e alguns autores sugerem que o bloqueio dos canais iônicos pode dificultar a entrada do vírus (NAVARESE et al., 2020). Além disso, foram demonstradas propriedades anti-inflamatórias do verapamil, presumivelmente impedindo a despolarização de leucócitos e secreção de citocinas (DAS et al., 2009; ETERAF-OSKOEI; MIRAK; NAJAFI, 2017). Atualmente, o potencial terapêutico do verapamil está sendo investigado no ensaio clínico NCT04351763. O bisoprolol é um fármaco para tratamento de hipertensão, e possivelmente atua contra a COVID-19 por dois meios: deve diminuir a expressão da ACE2 no pulmão, interferindo no ramo simpático do sistema renina-angiotensina-aldosterona, bem como diminuir as citocinas circulatórias (HERIANSYAH et al., 2020). É claro que estas teorias precisam de mais investigação.

### **Modelos celulares pré-clínicos: representação limitada de pulmão, mas não de epitélio respiratório superior**

Numa tentativa de procurar dados moleculares alternativos que potencialmente também refletem a assinatura da COVID-19 grave, mas que são obtidos a partir de material biológico mais acessível, analisámos também um conjunto de dados das vias respiratórias superiores, especificamente de amostras de *swabs* nasofaríngeos de

pacientes COVID (GSE152075 com 484 amostras de pacientes). Compreensivelmente, a semelhança entre o DPA e o esfregaço nasofaríngeo foi muito pequena, potencialmente um reflexo das diferentes populações celulares que compõem as vias respiratórias superior e inferior, uma vez que é sabido que os esfregaços têm sobretudo células epiteliais ciliadas (MATELSKI et al., 2020). Esse resultado pode indicar que este tipo de amostra pode ter um valor limitado para a elucidação da assinatura da doença ou para a busca *in silico* de fármacos terapêuticos.

Surpreendentemente, a maioria dos modelos celulares neste trabalho, com exceção da NHBE, são mais semelhantes às amostras de esfregaço nasofaríngeo do que as amostras clínicas derivadas de autópsias pulmonares graves de COVID-19. Células A549 são derivadas de adenocarcinoma pulmonar humano e aparentemente as alterações na citogenética, bem como a inserção do vector ACE2, podem ter feito com que as células se comportem mais como células epiteliais. As células Vero, isoladas de néfrons de macacos verdes, são amplamente utilizadas para manter culturas de vírus e prospecção de drogas reposicionadas, inclusive durante a pandemia COVID-19, apesar da discrepância ontogenética entre rim e pulmão, e acrescentando as diferenças moleculares filogenéticas interespecíficas (HARCOURT et al., 2020; KHOSHDEL RAD; AGHDAMI; MOGHADASALI, 2020; SOMESWARA RAO; VISWANADHA RAJU, 2016; WARBURTON et al., 2010). Os nossos resultados mostram que a Vero tem um grau de semelhança menor entre experiências clínicas do que A549 e NHBE.

Além disso, os resultados de RM e CMap são provavelmente demasiados otimistas. Utilizamos uma rede regulatória inferida por amostras de pulmão humano para fazer as análises porque queríamos testar a capacidade translacional dos modelos, e devido à falta de dados de expressão renal de macaco verde para inverter corretamente a regulação transcricional. Dito isto, há ainda limitações que este trabalho não conseguiu

demonstrar para compreender melhor a capacidade translacional das células Vero. Uma dessas limitações é a composição proteômica, que foi apontada pelo estudo de Hoffmann e colegas, onde mostram que células Vero com expressão estável de TMPRSS2 são infectadas por SARS-CoV-2 mesmo com o uso de 100 µM de cloroquina (HOFFMANN et al., 2020b). Isto sugere que a investigação com células NHBE é mais apta a extrapolar resultados para o pulmão humano do que as outras, mas não para o trato respiratório superior.

## **Conclusões**

O nosso estudo mostra o papel central de fatores de transcrição relacionados com a regulação do sistema imune, morfologia celular e resposta a hipóxia, assim como também a relevância de medicamentos imunomoduladores para contrapor as alterações causadas pela COVID-19 grave, de uma perspectiva holística, com considerações de acordo com a sua classe farmacológica e ação plausível. Além disso, demonstramos que cada modelo celular aqui estudado tem suas vantagens e desvantagens quando usados para pesquisa em COVID-19. Aqui temos provas de que as células NHBE são mais fiáveis para estipular mecanismos ou simular o contexto da expressão gênica do tecido pulmonar, enquanto A549, tanto no MOI 2 como no 0,2, estão mais de acordo com a natureza do epitélio do trato respiratório superior. Contudo, é necessário dizer que para o reposicionamento de drogas, nenhum modelo celular foi estabelecido como uma fonte estatisticamente fiável para a extrapolação pulmonar. Como consideração final, salientamos que o raciocínio desse trabalho poderia ser aplicado em qualquer outra doença, ou situação que se deseja investigar a sobreposição de mecanismos entre diferentes modelos. A comparação de modelos *in vitro* e clínicos deveria ser mais estudada para otimizar a medicina translacional.

## **Perspectivas**

Para ter maior robustez, pretendemos reagrupar os dados em DGA para poder maximizar o poder estatístico e realizar novamente as análises.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANKA, Abubakar Umar; TAHIR, Mohammed Ibrahim; ABUBAKAR, Sharafudeen Dahiru; ALSABBAGH, Mohamed; ZIAN, Zeineb; HAMEDIFAR, Haleh; SABZEVARI, Araz; AZIZI, Gholamreza. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): An overview of the immunopathology, serological diagnosis and management. **Scandinavian Journal of Immunology**, [S. l.], v. 93, n. 4, p. 1–12, 2021. DOI: 10.1111/sji.12998.

ANVISA. Política Vigente para a Regulamentação de Medicamentos no Brasil. [S. l.], p. 1–12, 2004.

AZIZ, Muhammad et al. Efficacy of tocilizumab in COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 1620–1630, 2021. DOI: 10.1002/jmv.26509.

BEIGEL, John H. et al. Remdesivir for the Treatment of Covid-19 — Final Report. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 383, n. 19, p. 1813–1826, 2020. DOI: 10.1056/nejmoa2007764.

CARSANA, Luca et al. Pulmonary post-mortem findings in a series of COVID-19 cases from northern Italy: a two-centre descriptive study. **The Lancet Infectious Diseases**, [S. l.], v. 20, n. 10, p. 1135–1140, 2020. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30434-5. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30434-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30434-5).

DAS, Riku; BURKE, Tim; VAN WAGONER, David R.; PLOW, Edward F. L-type calcium channel blockers exert an antiinflammatory effect by suppressing expression of plasminogen receptors on macrophages. **Circulation Research**, [S. l.], v. 105, n. 2, p. 167–175, 2009. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.109.200311.

DESAI, Niyati et al. Temporal and spatial heterogeneity of host response to SARS-CoV-2 pulmonary infection. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-20139-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20139-7>.

DUARTE-NETO, Amaro Nunes et al. An autopsy study of the spectrum of severe COVID-19 in children: From SARS to different phenotypes of MIS-C. **EclinicalMedicine**, [S. l.], v. 35, 2021. DOI: 10.1016/j.eclinm.2021.100850.

ESTEVE-CODINA, Anna. **RNA-Seq Data Analysis, Applications and Challenges**. 1. ed. [s.l.]: Elsevier B.V., 2018. v. 82 DOI: 10.1016/bs.coac.2018.06.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.coac.2018.06.001>.

ETERAF-OSKOU EI, Tahereh; MIRAK, Sevda Mikaily; NAJAFI, Moslem. Anti-inflammatory and anti-angiogenesis effects of verapamil on rat air pouch inflammation model. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 585–591, 2017. DOI: 10.15171/apb.2017.070. Disponível em: <https://doi.org/10.15171/apb.2017.070>.

FANG, Fang et al. The role of Hath6, a newly identified shear-stress-responsive transcription factor, in endothelial cell differentiation and function. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 127, n. 7, p. 1428–1440, 2014. DOI: 10.1242/jcs.136358.

GHEBREYESUS, Tedros Adhanom. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. **WHO Director General's speeches**, [S. l.], n. March, p. 4, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>.

GOARDON, Nicolas et al. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. **EMBO Journal**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 357–366, 2006. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600934.

GOLDMAN, Jason D. et al. Remdesivir for 5 or 10 Days in Patients with Severe Covid-19. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 383, n. 19, p. 1827–1837, 2020. DOI: 10.1056/nejmoa2015301.

HARCOURT, Jennifer et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with coronavirus disease, United States. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 1266–1273, 2020. DOI: 10.3201/EID2606.200516.

HASHIOKA, S. Antidepressants and Neuroinflammation: Can Antidepressants Calm Glial Rage Down? **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 11, n. 7, p. 555–564, 2011. DOI: 10.2174/138955711795906888.

HASPEL, Jeffrey A. et al. Perfect timing: Circadian rhythms, sleep, and immunity — An NIH workshop summary. **JCI Insight**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1172/jci.insight.131487.

HENKEL, Ron; HOEHNDORF, Robert; KACPROWSKI, Tim; KNÜPFER, Christian; LIEBERMEISTER, Wolfram; WALTEMATH, Dagmar. Notions of similarity for systems biology models. **Briefings in Bioinformatics**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 77–88, 2018. DOI: 10.1093/bib/bbw090.

HERIANSYAH, Teuku; CHOMSY, Indah Nur; FEBRIANDA, Lyra; HADI, Tjut Farahiya; WIHASTUTI, Titin Andri. The potential benefit of beta-blockers for the management of covid-19 protocol therapy-induced qt prolongation: A literature review. **Scientia Pharmaceutica**, [S. l.], v. 88, n. 4, p. 1–12, 2020. DOI: 10.3390/scipharm88040055.

HOERTEL, Nicolas et al. Association between antidepressant use and reduced risk of intubation or death in hospitalized patients with COVID-19: results from an observational study. **Molecular Psychiatry**, [S. l.], v. 1, n. II, 2021. DOI: 10.1038/s41380-021-01021-4. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41380-021-01021-4>.

HOFFMANN, Markus et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, [S. l.], v. 181, n. 2, p. 271–280.e8, 2020. a. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

HOFFMANN, Markus et al. Chloroquine does not inhibit infection of human lung cells with SARS-CoV-2. **Nature**, [S. l.], v. 585, n. 7826, p. 588–590, 2020. b. DOI: 10.1038/s41586-020-2575-3. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2575-3>.

HUANG, Suming; QIU, Yi; STEIN, Roland W.; BRANDT, Stephen J. p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein. **Oncogene**, [S. l.], v. 18, n. 35, p. 4958–4967, 1999. DOI: 10.1038/sj.onc.1202889.

ISLAM, Farhadul; GOPALAN, Vinod; LAW, Simon; LAM, Alfred K.; PILLAI, Suja. Molecular Deregulation of EPAS1 in the Pathogenesis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 10, n. September, p. 1–15, 2020. DOI: 10.3389/fonc.2020.01534.

KHADKA, Sitaram; YUCHI, Alamgeer; SHRESTHA, Dhan Bahadur; BUDHATHOKI, Pravash; AL-SUBARI, Saleh Musaed Mohammed; ZIAD ALHOZANI, Talal M.; ANWAR BUTT, Imamah. Repurposing Drugs for COVID-19: An Approach for Treatment in the Pandemic. **Alternative therapies in health and medicine**, United

States, v. 26, n. S2, p. 100–107, 2020.

KHOSHDEL RAD, Niloofar; AGHDAMI, Nasser; MOGHADASALI, Reza. Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Development: From the Embryo to the Kidney Organoid. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 8, n. March, p. 1–16, 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.00183.

KIM, Jason et al. Advanced bioinformatics rapidly identifies existing therapeutics for patients with coronavirus disease-2019 (COVID-19). **Journal of Translational Medicine**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1186/s12967-020-02430-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02430-9>.

KUMAR, Nilesh; MISHRA, Bharat; MEHMOOD, Adeel; MOHAMMAD ATHAR; M SHAHID MUKHTAR. Integrative Network Biology Framework Elucidates Molecular Mechanisms of SARS-CoV-2 Pathogenesis. **iScience**, [S. l.], v. 23, n. 9, p. 101526, 2020. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101526. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101526>.

LAMB, Justin. The Connectivity Map: A new tool for biomedical research. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 54–60, 2007. DOI: 10.1038/nrc2044.

LENZE, Eric J. et al. Fluvoxamine vs Placebo and Clinical Deterioration in Outpatients with Symptomatic COVID-19: A Randomized Clinical Trial. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [S. l.], v. 324, n. 22, p. 2292–2300, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.22760.

LOONEY, Agnieszka P.; HAN, Rong; STAWSKI, Lukasz; MARDEN, Grace; IWAMOTO, Masahiro; TROJANOWSKA, Maria. Synergistic role of endothelial *erg* and *fli1* in mediating pulmonary vascular homeostasis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 121–131, 2017. DOI: 10.1165/rcmb.2016-0200OC.

MA'AYAN, Avi; ROUILLARD, Andrew D.; CLARK, Neil R.; WANG, Zichen; DUAN, Qiaonan; KOU, Yan. Lean Big Data integration in systems biology and systems pharmacology. **Trends in pharmacological sciences**, [S. l.], v. 35, n. 9, p. 450–460, 2014. DOI: 10.1016/j.tips.2014.07.001.

MATELSKI, Alexander; SIDDIQUE, Nikhut; MEAD, Philip; RAIMONDI, Tommaso; JORGENSON, Laura C.; CALDERON, Omar; HARMAN, Kory; FARRELL, John J.

Microscopic Review of Nasopharyngeal Swabs as a Means of Benchside Quality Assurance. **Annals of clinical and laboratory science**, United States, v. 50, n. 5, p. 665–669, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo de Manejo Clínico para o Novo Coronavírus (2019-nCoV). **Ministério da Saúde**, [S. l.], p. 1–32, 2020. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2020/fevereiro/11/protocolo-manejo-coronavirus.pdf>.

MORIKAWA, Masato et al. The ALK-1/SMAD/ATOH8 axis attenuates hypoxic responses and protects against the development of pulmonary arterial hypertension. **Science Signaling**, [S. l.], v. 12, n. 607, 2019. DOI: 10.1126/scisignal.aay4430.

NAVARESE, Eliano P.; MUSCI, Rita L.; FREDIANI, Lara; GURBEL, Paul A.; KUBICA, Jacek. Ion channel inhibition against covid-19: A novel target for clinical investigation. **Cardiology Journal**, [S. l.], v. 27, n. 4, p. 421–424, 2020. DOI: 10.5603/CJ.a2020.0090.

NTRANOS, Achilles; CASACCIA, Patrizia. Bromodomains: Translating the words of lysine acetylation into myelin injury and repair. **Neuroscience Letters**, [S. l.], v. 625, p. 4–10, 2016. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.10.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2015.10.015>.

PARVATHANENI, Vineela; GUPTA, Vivek. Utilizing drug repurposing against COVID-19 – Efficacy, limitations, and challenges. **Life Sciences**, [S. l.], v. 259, n. July, p. 118275, 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118275. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118275>.

PODDIGHE, Dimitri; ALJOFAN, Mohamad. Clinical evidences on the antiviral properties of macrolide antibiotics in the COVID-19 era and beyond. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, [S. l.], v. 28, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1177/2040206620961712.

POLOZNIKOV, Andrey A. et al. HIF Prolyl Hydroxylase Inhibitors for COVID-19 Treatment: Pros and Cons. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 11, n. January, p. 1–11, 2021. DOI: 10.3389/fphar.2020.621054.

PROVENZANO, Paolo P.; KEELY, Patricia J. Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase

signaling. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 124, n. 8, p. 1195–1205, 2011. DOI: 10.1242/jcs.067009.

PUSHPAKOM, Sudeep et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 41–58, 2018. DOI: 10.1038/nrd.2018.168.

RANZANI, Otavio T.; BASTOS, Leonardo S. L.; GELLI, João Gabriel M.; MARCHESI, Janaina F.; BAIÃO, Fernanda; HAMACHER, Silvio; BOZZA, Fernando A. Characterisation of the first 250 000 hospital admissions for COVID-19 in Brazil: a retrospective analysis of nationwide data. **The Lancet Respiratory Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 407–418, 2021. DOI: 10.1016/S2213-2600(20)30560-9.

RASHID, Rasheed Ali; ZGAIR, Atheer; AL-ANI, Raid M. Effect of nasal corticosteroid in the treatment of anosmia due to COVID-19: A randomised double-blind placebo-controlled study. **American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 103033, 2021. DOI: 10.1016/j.amjoto.2021.103033. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2021.103033>.

SIDDIQI, Hasan; MEHRA, M. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical–therapeutic staging proposal. **Ann Oncol**, [S. l.], n. January, p. 19–21, 2020. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2010/v15n2/a64-68.pdf>.

SMIRNOV, Petr et al. PharmacoGx: An R package for analysis of large pharmacogenomic datasets. **Bioinformatics**, [S. l.], v. 32, n. 8, p. 1244–1246, 2016. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv723.

SOMESWARA RAO, Chinta; VISWANADHA RAJU, S. Similarity analysis between chromosomes of Homo sapiens and monkeys with correlation coefficient, rank correlation coefficient and cosine similarity measures. **Genomics Data**, [S. l.], v. 7, p. 202–209, 2016. DOI: 10.1016/j.gdata.2016.01.001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2016.01.001>.

SPERONE, Andrea et al. The transcription factor erg inhibits vascular inflammation by repressing NF-κB activation and proinflammatory gene expression in endothelial cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 142–150, 2011. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.216473.

TERME, Jean-Michel; WENCKER, Melanie; FAVRE-BONVIN, Arnaud; BEX,

Françoise; GAZZOLO, Louis; DUC DODON, Madeleine; JALINOT, Pierre. Cross Talk between Expression of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Transactivator and the Oncogenic bHLH Transcription Factor TAL1. **Journal of Virology**, [S. l.], v. 82, n. 16, p. 7913–7922, 2008. DOI: 10.1128/jvi.02414-07.

TREWAVAS, Anthony. A brief history of systems biology. **Plant Cell**, [S. l.], v. 18, n. 10, p. 2420–2430, 2006. DOI: 10.1105/tpc.106.042267.

WANG, Jirong; SHEN, Chengquan; ZHANG, Jipeng; ZHANG, Youzhi; LIANG, Zhijuan; NIU, Haitao; WANG, Yonghua; YANG, Xiaokun. TEAD4 is an Immune Regulating-Related Prognostic Biomarker for Bladder Cancer and Possesses Generalization Value in Pan-Cancer. **DNA and Cell Biology**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 798–810, 2021. DOI: 10.1089/dna.2021.0164.

WANG, Mei Yue; ZHAO, Rong; GAO, Li Juan; GAO, Xue Fei; WANG, De Ping; CAO, Ji Min. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. November, p. 1–17, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.587269.

WARBURTON, David et al. Lung Organogenesis. **Current Topics in Developmental Biology**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 73–158, 2010. DOI: 10.1016/S0070-2153(10)90003-3.  
Disponível em:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.

WEN, Zeyu; ZHANG, Yue; LIN, Zhekai; SHI, Kun; JIU, Yaming. Cytoskeleton - A crucial key in host cell for coronavirus infection. **Journal of Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 968–979, 2020. DOI: 10.1093/jmcb/mjaa042.

WOUTERS, Olivier J.; MCKEE, Martin; LUYTEN, Jeroen. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [S. l.], v. 323, n. 9, p. 844–853, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.1166.