

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 30/09/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



# **ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DO SECRETOMA DO LAVADO BRONCO ALVEOLAR EM PACIENTES COM RISCO DE COVID-19 SEVERA**

**ANA LUIZA LABBATE BONALDO**

**BOTUCATU - SP  
2022**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL  
“Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

# **ANÁLISE DO PERFIL TRANSCRICIONAL DO SECRETOMA DO LAVADO BRONCO ALVEOLAR EM PACIENTES COM RISCO DE COVID-19 SEVERA**

**Mestranda: Ana Luiza Labbate Bonaldo**

**Orientador: Robson Francisco Carvalho**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética), como uma das exigências para a obtenção do título de Mestre.

**BOTUCATU - SP  
2022**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bonaldo, Ana Luiza Labbate.

Análise do perfil transcricional do secretoma do lavado bronco alveolar em pacientes com risco de COVID-19 severa / Ana Luiza Labbate Bonaldo. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Robson Francisco Carvalho  
Capes: 20205007

1. COVID-19 (Doença). 2. Secretoma. 3. Transcriptoma.  
4. Análise da expressão gênica de célula única.

Palavras-chave: COVID-19 severa; Infecção por SARS-CoV-2; LRP11; Secretoma; scRNA-Seq.

## **Dedicatória**

Aos que perderam  
alguém e aos que se foram  
para a COVID-19, dedico.

## Agradecimentos

Aos meus pais, *Carlos* e *Rita*, meu grande alicerce, que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio e colo quando necessário. Obrigada por se orgulharem de mim e me deixarem bater asas. Sempre saberei para onde voltar. Eu amo vocês.

Ao meu noivo, *João Luís*, essencial nos bons e nos maus momentos. Sou eternamente grata pelos puxões de orelha e por ser minha metade pé no chão. Obrigada por me ouvir e se interessar pelo meu trabalho, por me distrair e me acolher. Te amo.

Aos meus colegas de laboratório *Amanda*, *Jakeline*, *Sarah*, *Victória*, *Jeferson*, *Caio* e *Fernando*. Vocês me tiraram risos e sorrisos em dias nublados. Sou extremamente grata por tudo que aprendo com vocês.

Aos meus amigos *Verônica*, *Felipe*, *Gabriel*, *Luiza*, *Sabrina* e *Laura*, que mesmo sem saber, deixavam os dias mais fáceis e leves. Tenho muita sorte em ter vocês ao meu lado.

Às minhas queridas companheiras de vôlei. Vocês foram essenciais pra esse momento. Obrigada por torcerem por mim. Estarei sempre torcendo por vocês.

Aos membros da banca, professoras *Flávia Delella* e *Célia Regina*. Obrigada por aceitarem estar presentes em um momento tão importante para mim, tanto profissional e quanto pessoal.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) e a CAPES pela infraestrutura e bolsa concedidos para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, professor *Robson Carvalho*. Por cada conselho e por acreditar em mim, mesmo quando as coisas não estavam tão bem. É uma honra poder aprender diariamente com você. Que esse trabalho seja o primeiro de vários. Obrigada por não desistir de mim.

Por fim, agradeço à *Deus* por sua infinita bondade sobre a minha vida (Habacuque 3:18).

## Epígrafe

Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
**(Ricardo Reis)**

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 1.</b> Análise da expressão gênica do secretoma do BALF de pacientes nas comparações estudadas (idade, gênero e carga viral). .....	31
<b>Figura 2.</b> Caracterização do grupo de 43 genes exclusivos em comum no grupo de melhor prognóstico (mulheres, jovens e baixa carga viral). .....	34
<b>Figura 3.</b> <i>Violin plot</i> demonstrando os níveis de expressão dos ligantes e receptores presentes no cluster A usando os dados do <i>conjunto de dados</i> GSE145926 com adicional da amostra de BALF saudável GSM3660650 do <i>conjunto de dados</i> GSE128033.....	34
<b>Figura 4.</b> <i>Box plot</i> do <i>time course</i> dos níveis de expressão dos ligantes e receptores presentes no cluster A nas amostras de BALF de nove macacos rhesus adultos infectados com SARS-CoV-2 (GSE156701). .....	35
<b>Figura 5.</b> Gráfico UMAP representando a distribuição de expressão dos ligantes e receptores do cluster A nos tipos celulares presentes no BALF .....	37
<b>Figura 6.</b> <i>Dotplot</i> representando a expressão de cada ligante e receptor presentes no cluster A em cada tipo celular encontrado no BALF .....	37

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Comparações para cada análise de expressão diferencial e as novas nomenclaturas, com seus respectivos números de pacientes (n).....	25
<b>Tabela 2.</b> Número total e de cada grupo analisado de DEGs com aumento e diminuição de expressão.....	29

## Lista de Abreviações

<b>COVID-19</b>	Doença causada pelo novo coronavírus 2
<b>SARS-CoV-2</b>	Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave
<b>GEO</b>	<i>Gene Expression Omnibus</i>
<b>RNA-Seq</b>	Sequenciamento de RNA
<b>DEGs</b>	<i>Differentially expressed genes</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>RT-qPCR</b>	PCR quantitativo em tempo real
<b>CT</b>	Tomografia computadorizada
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>SARS-CoV</b>	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i>
<b>MERS-CoV</b>	<i>Middle East respiratory syndrome</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ORF</b>	<i>Open Read Frames</i>
<b>scRNA-Seq</b>	Sequenciamento de RNA de célula única
<b>IUPHAR</b>	<i>The International Union of Basic and Clinical Pharmacology</i>
<b>STRING</b>	<i>Search Tool for Retrieval of Interacting Genes</i>
<b>PPI</b>	<i>Protein-protein interaction</i>
<b>PCA</b>	<i>Principal Components Analysis</i>
<b>BALF</b>	<i>Bronchoalveolar lavage fluid</i>
<b>UMAP</b>	<i>Uniform manifold approximation and projection</i>
<b>t-SNE</b>	<i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i>
<b>Ct</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>GO</b>	<i>Gene ontology</i>
<b>MP</b>	Melhor prognóstico

<b>PP</b>	Pior prognóstico
<b>mDC</b>	<i>Myeloid dendritic cell</i>
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>LDL</b>	<i>Low-density lipoprotein</i>
<b>LDLR</b>	<i>Low-density lipoprotein receptor</i>

## Resumo

A doença causada pelo novo coronavírus (COVID-19) se tornou uma pandemia e já atingiu mais de 595 milhões de pessoas em todo o mundo, ultrapassando os 6 milhões e 400 mil mortos após dois anos e meio. Pacientes com comorbidades, como diabetes e hipertensão, ou do sexo masculino e idosos são descritos como grupo de pior prognóstico. Já mulheres, jovens e pacientes com carga viral baixa são considerados grupo de melhor prognóstico. A produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, conhecida como tempestade de citocinas (*cytokine storm*), também está relacionada com a severidade e mortalidade da COVID-19. Portanto, a análise do conjunto de moléculas secretadas pelas células (secretoma) de tecidos alvos do SARS-CoV-2 é de extrema importância para o prognóstico e para a identificação de mediadores dessa doença. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil transcricional do secretoma de amostras de lavado bronco alveolar em pacientes com risco distintos de desenvolvimento de COVID-19 severa. A hipótese desse trabalho é que a análise do perfil do secretoma utilizando dados de transcriptoma, permitir predizer genes envolvidos com o prognóstico da infecção pelo SARS-CoV-2 e com a progressão da doença. Foi reanalisado um conjunto de dados de transcriptoma (RNA-Seq) com 430 pacientes positivos para COVID-19 e 54 pacientes negativos, disponível no repositório *Gene Expression Omnibus* (GEO; GSE152075), separados por gênero, idade (<60 anos, jovens; ≥60 anos, idosos) e carga viral (baixa e alta). Os genes diferencialmente expressos (DEGs) entre as condições foram utilizados para identificação de genes que codificam proteínas secretadas, utilizando os dados disponíveis na plataforma *The Human Protein Atlas*. Identificamos um conjunto de DEGs exclusivo do grupo de melhor prognóstico (mulheres, jovens e baixa carga viral). Desse conjunto de genes, caracterizamos quais codificam ligantes e receptores e, posteriormente, analisamos, através do método de análise de sequenciamento de células únicas (*single-cell RNA-Seq*), a expressão dos genes selecionados em células únicas do lavado bronco-alveolar de pacientes com COVID-19. Como método de validação dos nossos achados, utilizamos o conjunto de dados GSE145926 (GEO) para análise temporal (dias 1, 2, 4, 7, 10 e 12) do lavado bronco alveolar de macacos rhesus adultos infectados com SARS-CoV-2. Nossos dados demonstraram a relevância do receptor LRP11, como um potencial biomarcador de melhor prognóstico para COVID-19. Esse receptor faz parte da família de receptores de LDL, o qual altera sua expressão em infecções virais. Além disso, observamos que esse receptor tem sua expressão predominantemente em células epiteliais, que expressam o receptor ACE2 e, portanto, são mais susceptíveis às infecções pelo SARS-CoV-2. Esses resultados são relevantes pois os genes identificados podem determinar o prognóstico dos pacientes com COVID-19 e constituem potenciais alvos de drogas para redução da mortalidade pela doença.

**Palavras-chave:** Infecção por SARS-CoV-2, COVID-19 severa, Secretoma, LRP11, scRNA-Seq

# Abstract

The disease caused by the new coronavirus (COVID-19) has become a pandemic and has already reached more than 595 million people worldwide, exceeding 6 million and 400 thousand dead after two and a half years. Patients with comorbidities such as diabetes and hypertension, or male and elderly patients are described as groups with the worst prognosis. On the other hand, women, young people and patients with low viral loads are considered groups with the best prognosis. Excessive production of pro-inflammatory cytokines, known as cytokine storm, is also linked to the severity and mortality of COVID-19. Therefore, the analysis of the set of molecules secreted by the cells (secretome) of SARS-CoV-2 target tissues is extremely important for the prognosis of the disease. Our study analyzed the transcriptional profile of the secretome of bronchoalveolar lavage samples in patients at different risks of developing severe COVID-19. We hypothesized that a transcriptomic-based secretome analysis allows the prediction of genes involved in the prognosis of SARS-CoV-2 infection and the progression of the disease. We applied a transcriptome dataset (RNA-Seq) with 430 COVID-19 positive patients and 54 negative patients, available in the Gene Expression Omnibus repository (GEO; GSE152075), which was separated by gender, age (<60 years, young; ≥60 years, elderly), and viral load (low and high). Differently expressed genes (DEGs) between conditions were used to identify genes encoding secreted proteins, using data available on The Human Protein Atlas platform. We identified a set of DEGs exclusive to the group with the best prognosis (women, young people, and low viral load). From this set of genes, we characterized those encoding ligands and receptors. Next, we analyzed, through the single-cell sequencing analysis method (single-cell RNA-Seq), the expression of the selected genes in single cells from the bronchoalveolar lavage of patients with COVID-19. To validate our findings, we used the GSE145926 (GEO) dataset for a time course analysis (days 1, 2, 4, 7, 10, and 12) of bronchoalveolar lavage samples of adult rhesus monkeys infected with SARS-CoV-2. Our data demonstrated the relevance of the LRP11 receptor as a potential biomarker of better prognosis for COVID-19. This receptor is part of the LDL receptor family, which presents gene expression changes-induced by viral infections. We also observed that this receptor is predominantly expressed in epithelial cells, which express the ACE2 receptor and, consequently, are more susceptible to SARS-CoV-2 infections. These results are relevant because the genes identified in our analysis can determine the prognosis of COVID-19 patients and constitute potential drug targets to reduce disease mortality.

**Keywords:** SARS-CoV-2 infection, severe COVID-19, Secretome, LRP11, scRNA-Seq

# SUMÁRIO

<b>1 - Introdução</b>	13
1.1 Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19)	13
1.2 A infecção pelo SARS-CoV-2	14
1.3 Resposta transcricional das células pulmonares à infecção pelo SARS-CoV-2	16
1.4 O secretoma na infecção viral	17
<b>2 - Objetivos</b>	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos Específicos	20
<b>3 – Artigo científico</b>	21
<b>4 - Conclusão</b>	40
<b>5 – Referências bibliográficas</b>	42
<b>6 – Apêndices A</b>	51
6.1 Figuras suplementares	51

### **3 – Artigo científico**

#### **Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 11 (LRP11) as a protective role in the severity of COVID-19**

Ana Luiza Labbate Bonaldo<sup>1</sup>, Jakeline Santos Oliveira<sup>1</sup>, Sarah Santiloni Cury<sup>1</sup>, Jeferson dos Santos Souza<sup>1</sup>, Amanda Piveta Schnepfer<sup>1</sup>, Victória Larissa Schimidt Camargo<sup>1</sup>, Caio Fernando Ferreira Mussato<sup>1</sup> & Robson Francisco Carvalho<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

## RESUMO

### **Background**

A COVID-19 se espalhou rapidamente pelo mundo, fazendo milhões de vítimas fatais. Pacientes do sexo masculino, idosos, com alta carga viral e com comorbidades como diabetes e hipertensão, caracterizam um grupo de pior prognóstico para a COVID-19. A produção excessiva de mediadores inflamatórios e citocinas, conhecida como tempestade de citocinas (do inglês, *cytokine storm*), também está associada com o aumento da mortalidade. Visto isso, é de extrema importância determinar o conjunto de moléculas secretadas (secretoma) pelas células de tecidos alvos do SARS-CoV-2 de pacientes com COVID-19, a fim de identificar mediadores e biomarcadores para a doença. No presente trabalho, nós analisamos o perfil transcricional do secretoma das células do fluido do lavado bronco alveolar de pacientes com risco de desenvolver COVID-19 severa, buscando determinar os principais fatores que modulam a severidade e mortalidade nestes pacientes.

### **Métodos**

Foram analisadas amostras de fluido do lavado bronco alveolar (BALF) de 430 pacientes positivos para COVID-19 e 54 negativos. O conjunto de dados (GSE152075; GEO) (77) de *RNA sequencing* (RNA-Seq) foi processado usando o *NetworkAnalyst* (70) para identificar os genes diferencialmente expressos (DEGs; de  $\text{Log}_2 \text{Fold Change} \geq |1.5|$  e  $p\text{-value} \leq 0.05$ ) nos grupos de acordo com gênero, idade e carga viral, quando comparados com os respectivos controles (negativos). Posteriormente, os DEGs foram filtrados pela lista de proteínas secretadas do *The Human Protein Atlas* (71). Utilizando a ferramenta online *Intervene* (72), foram visualizadas intersecções de genes com alteração de expressão nos grupos analisados, de acordo com o risco para desenvolvimento de COVID-19 severa. Foi caracterizado o perfil de expressão gênica do interactoma (ligantes e respectivos receptores) em comum no grupo de melhor prognóstico (mulheres, jovens e baixa carga viral). Por fim, através de sequenciamento de RNA célula única (scRNA-Seq), usando a linguagem R com o pacote Seurat (v.3), foi analisada a expressão gênica dos genes identificados ao nível de célula única do lavado bronco alveolar. Foi utilizado o conjunto de dados GSE145926 (GEO), com 12 amostras de BALF, sendo 6 pacientes severos, 3 moderados e 6 saudáveis, e também foi adicionada uma amostra de BALF saudável (GSM3660650) do conjunto de dados GSE128033 (GEO). Para validação dos achados, foi feita uma análise temporal do BALF de 9 macacos rhesus adultos infectados com SARS-CoV-2 nos dias 1, 2, 4, 7, 10 e 12 (GSE156701).

## 5 – Referências bibliográficas

1. Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. março de 2020;579(7798):265–9.
2. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak – an update on the status. *Military Med Res*. dezembro de 2020;7(1):11.
3. COVID-19 Map - Johns Hopkins Coronavirus Resource Center [Internet]. Disponível em: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
4. Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted? - World Health Organization (WHO) [Internet]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted>
5. World Health Organization (COVID-19) [Internet]. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
6. Guan W jie, Ni Z yi, Hu Y, Liang W hua, Ou C quan, He J xing, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med*. 30 de abril de 2020;382(18):1708–20.
7. Zhang J jin, Dong X, Cao Y yuan, Yuan Y dong, Yang Y bin, Yan Y qin, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*. 27 de fevereiro de 2020;all.14238.
8. Gautier J, Ravussin Y. A New Symptom of COVID-19: Loss of Taste and Smell. *Obesity*. maio de 2020;28(5):848–848.
9. Xydakis MS, Dehgani-Mobaraki P, Holbrook EH, Geisthoff UW, Bauer C, Hautefort C, et al. Smell and taste dysfunction in patients with COVID-19. *The Lancet Infectious Diseases*. abril de 2020;S1473309920302930.
10. Mao L, Jin H, Wang M, Hu Y, Chen S, He Q, et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol*. 1º de junho de 2020;77(6):683.
11. Burki TK. Coronavirus in China. *The Lancet Respiratory Medicine*. março de 2020;8(3):238.
12. Cascella M, Rajnik M, Cuomo A, Dulebohn SC, Di Napoli R. Features, Evaluation and Treatment Coronavirus (COVID-19). Em: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [citado 4 de agosto de 2020]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>
13. Palaiodimos L, Kokkinidis DG, Li W, Karamanis D, Ognibene J, Arora S, et al. Severe obesity, increasing age and male sex are independently associated with worse in-hospital outcomes, and higher in-hospital mortality, in a cohort of patients with COVID-19 in the Bronx, New York. *Metabolism*. julho de 2020;108:154262.

14. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med*. 26 de março de 2020;382(13):1199–207.
15. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. fevereiro de 2020;395(10223):497–506.
16. Docherty AB, Harrison EM, Green CA, Hardwick HE, Pius R, Norman L, et al. Features of 20 133 UK patients in hospital with covid-19 using the ISARIC WHO Clinical Characterisation Protocol: prospective observational cohort study. *BMJ*. 22 de maio de 2020;m1985.
17. The OpenSAFELY Collaborative, Williamson E, Walker AJ, Bhaskaran KJ, Bacon S, Bates C, et al. Factors associated with COVID-19-related hospital death in the linked electronic health records of 17 million adult NHS patients. [Internet]. *Epidemiology*; 2020 maio [citado 17 de junho de 2020]. Disponível em: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.05.06.20092999>
18. Pujadas E, Chaudhry F, McBride R, Richter F, Zhao S, Wajnberg A, et al. SARS-CoV-2 viral load predicts COVID-19 mortality. *The Lancet Respiratory Medicine*. agosto de 2020;S2213260020303544.
19. Liang W, Guan W, Chen R, Wang W, Li J, Xu K, et al. Cancer patients in SARS-CoV-2 infection: a nationwide analysis in China. *The Lancet Oncology*. março de 2020;21(3):335–7.
20. Zhang L, Zhu F, Xie L, Wang C, Wang J, Chen R, et al. Clinical characteristics of COVID-19-infected cancer patients: a retrospective case study in three hospitals within Wuhan, China. *Annals of Oncology*. julho de 2020;31(7):894–901.
21. Alsharif W, Qurashi A. Effectiveness of COVID-19 diagnosis and management tools: A review. *Radiography*. maio de 2021;27(2):682–7.
22. Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. junho de 2009;7(6):439–50.
23. Bermingham A, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, Langrish C, et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012. *Euro Surveill*. 4 de outubro de 2012;17(40):20290.
24. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. abril de 2020;181(2):271–280.e8.
25. Sharma O, Sultan AA, Ding H, Triggler CR. A Review of the Progress and Challenges of Developing a Vaccine for COVID-19. *Front Immunol*. 14 de outubro de 2020;11:585354.
26. Ge H, Wang X, Yuan X, Xiao G, Wang C, Deng T, et al. The epidemiology and clinical information about COVID-19. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. junho de 2020;39(6):1011–9.

27. Harapan H, Itoh N, Yufika A, Winardi W, Keam S, Te H, et al. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): A literature review. *Journal of Infection and Public Health*. maio de 2020;13(5):667–73.
28. Weinstein RA. Planning for Epidemics — The Lessons of SARS. *N Engl J Med*. 3 de junho de 2004;350(23):2332–4.
29. Zaki AM, van Boheemen S, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*. 8 de novembro de 2012;367(19):1814–20.
30. Wan Y, Shang J, Graham R, Baric RS, Li F. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. Gallagher T, organizador. *J Virol*. 29 de janeiro de 2020;94(7):e00127-20, /jvi/94/7/JVI.00127-20.atom.
31. Li M, Chen L, Zhang J, Xiong C, Li X. The SARS-CoV-2 receptor ACE2 expression of maternal-fetal interface and fetal organs by single-cell transcriptome study. Chan RWY, organizador. *PLoS ONE*. 16 de abril de 2020;15(4):e0230295.
32. Yang X, Zhao H, Li Y, Zhang P. Angiotensin Converting Enzyme 2 in Coronavirus Disease (COVID-19): Evidence from Bioinformatics Analysis [Internet]. *MEDICINE & PHARMACOLOGY*; 2020 abr [citado 29 de junho de 2020]. Disponível em: <https://www.preprints.org/manuscript/202004.0466/v1>
33. Hamming I, Timens W, Bulthuis M, Lely A, Navis G, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. junho de 2004;203(2):631–7.
34. HCA Lung Biological Network, Sungnak W, Huang N, Bécavin C, Berg M, Queen R, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med*. maio de 2020;26(5):681–7.
35. the STACOV-XULA research group, Masana L, Correig E, Ibarretxe D, Anoro E, Arroyo JA, et al. Low HDL and high triglycerides predict COVID-19 severity. *Sci Rep*. dezembro de 2021;11(1):7217.
36. The NHLBI LungMap Consortium, The Human Cell Atlas Lung Biological Network, Muus C, Luecken MD, Eraslan G, Sikkema L, et al. Single-cell meta-analysis of SARS-CoV-2 entry genes across tissues and demographics. *Nat Med*. março de 2021;27(3):546–59.
37. Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA*. 25 de agosto de 2020;324(8):782.
38. Daniels LB, Sitapati AM, Zhang J, Zou J, Bui QM, Ren J, et al. Relation of Statin Use Prior to Admission to Severity and Recovery Among COVID-19 Inpatients. *The American Journal of Cardiology*. dezembro de 2020;136:149–55.
39. Wang S, Li W, Hui H, Tiwari SK, Zhang Q, Croker BA, et al. Cholesterol 25-Hydroxylase inhibits SARS -CoV-2 and other coronaviruses by depleting membrane cholesterol.

- EMBO J [Internet]. 2 de novembro de 2020 [citado 31 de agosto de 2022];39(21). Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/embj.2020106057>
40. Sanders DW, Jumper CC, Ackerman PJ, Bracha D, Donlic A, Kim H, et al. SARS-CoV-2 requires cholesterol for viral entry and pathological syncytia formation. *eLife*. 23 de abril de 2021;10:e65962.
  41. Wang H, Yuan Z, Pavel MA, Jablonski SM, Jablonski J, Hobson R, et al. The role of high cholesterol in age-related COVID19 lethality [Internet]. *Cell Biology*; 2020 maio [citado 31 de agosto de 2022]. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.05.09.086249>
  42. Constantino FB, Cury SS, Nogueira CR, Carvalho RF, Justulin LA. Prediction of Non-canonical Routes for SARS-CoV-2 Infection in Human Placenta Cells. *Front Mol Biosci*. 8 de novembro de 2021;8:614728.
  43. Codo AC, Davanzo GG, Monteiro LB, Souza G, Muraro S, Carregari V, et al. Elevated Glucose Levels Favor Sars-Cov-2 Infection and Monocyte Response Through a Hif-1 $\alpha$ /Glycolysis Dependent Axis. *SSRN Journal* [Internet]. 2020 [citado 28 de junho de 2020]; Disponível em: <https://www.ssrn.com/abstract=3606770>
  44. Moraes D de, Paiva BVB, Cury SS, Ludwig RG, Junior JPA, Mori MA da S, et al. Prediction of SARS-CoV Interaction with Host Proteins during Lung Aging Reveals a Potential Role for TRIB3 in COVID-19. *Aging and disease*. 2021;12(1):42.
  45. Angelidis I, Simon LM, Fernandez IE, Strunz M, Mayr CH, Greiffo FR, et al. An atlas of the aging lung mapped by single cell transcriptomics and deep tissue proteomics. *Nat Commun*. dezembro de 2019;10(1):963.
  46. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*. dezembro de 2020;12(1):8.
  47. Jia HP, Look DC, Shi L, Hickey M, Pewe L, Netland J, et al. ACE2 Receptor Expression and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Depend on Differentiation of Human Airway Epithelia. *JVI*. 15 de dezembro de 2005;79(23):14614–21.
  48. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. junho de 2020;20(6):363–74.
  49. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC, Uhl S, Hoagland D, Møller R, et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*. maio de 2020;181(5):1036-1045.e9.
  50. tenOever BR. The Evolution of Antiviral Defense Systems. *Cell Host & Microbe*. fevereiro de 2016;19(2):142–9.
  51. Janeway CA, Medzhitov R. Innate Immune Recognition. *Annu Rev Immunol*. abril de 2002;20(1):197–216.

52. Hur S. Double-Stranded RNA Sensors and Modulators in Innate Immunity. *Annu Rev Immunol.* 26 de abril de 2019;37(1):349–75.
53. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity.* abril de 2019;50(4):907–23.
54. Sokol CL, Luster AD. The Chemokine System in Innate Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* maio de 2015;7(5):a016303.
55. Proudfoot AEI. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol.* fevereiro de 2002;2(2):106–15.
56. Zhang B, Zhou X, Qiu Y, Song Y, Feng F, Feng J, et al. Clinical characteristics of 82 cases of death from COVID-19. Jin X, organizador. *PLoS ONE.* 9 de julho de 2020;15(7):e0235458.
57. Freire PP, Marques AHC, Baiocchi GC, Schimke LF, Fonseca DLM, Salgado RC, et al. The relationship between cytokine and neutrophil gene network distinguishes SARS-CoV-2–infected patients by sex and age. *JCI Insight.* 24 de maio de 2021;6(10):e147535.
58. Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, Bron S, van Dijl JM. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1º de setembro de 2000;64(3):515–47.
59. Talbert EE, Lewis HL, Farren MR, Ramsey ML, Chakedis JM, Rajasekera P, et al. Circulating monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is associated with cachexia in treatment-naïve pancreatic cancer patients: A biomarker analysis in pancreatic adenocarcinoma-induced cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle.* abril de 2018;9(2):358–68.
60. Penafuerte CA, Gagnon B, Sirois J, Murphy J, MacDonald N, Tremblay ML. Identification of neutrophil-derived proteases and angiotensin II as biomarkers of cancer cachexia. *Br J Cancer.* março de 2016;114(6):680–7.
61. Makridakis M, Vlahou A. Secretome proteomics for discovery of cancer biomarkers. *Journal of Proteomics.* novembro de 2010;73(12):2291–305.
62. Patel S, Wetie AGN, Darie CC, Clarkson BD. Cancer Secretomes and Their Place in Supplementing Other Hallmarks of Cancer. Em: Woods AG, Darie CC, organizadores. *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2014 [citado 28 de junho de 2020]. p. 409–42. (*Advances in Experimental Medicine and Biology*; vol. 806). Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-06068-2\\_20](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-06068-2_20)
63. Zhang H, Wu P, Chen F, Hao Y, Lao Y, Ren L, et al. SILAC-based quantitative proteomic analysis of secretome between activated and reverted hepatic stellate cells. *Proteomics.* setembro de 2014;14(17–18):1977–86.
64. Bauer JW, Baechler EC, Petri M, Batliwalla FM, Crawford D, Ortmann WA, et al. Elevated Serum Levels of Interferon-Regulated Chemokines Are Biomarkers for Active Human Systemic Lupus Erythematosus. Sontheimer R, organizador. *PLoS Med.* 19 de dezembro de 2006;3(12):e491.

65. Schaaïj-Visser TBM, de Wit M, Lam SW, Jiménez CR. The cancer secretome, current status and opportunities in the lung, breast and colorectal cancer context. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. novembro de 2013;1834(11):2242–58.
66. Brown KJ, Seol H, Pillai DK, Sankoorikal BJ, Formolo CA, Mac J, et al. The human secretome atlas initiative: Implications in health and disease conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. novembro de 2013;1834(11):2454–61.
67. Chen G, Chen J, Liu H, Chen S, Zhang Y, Li P, et al. Comprehensive Identification and Characterization of Human Secretome Based on Integrative Proteomic and Transcriptomic Data. *Front Cell Dev Biol*. 21 de novembro de 2019;7:299.
68. Mukherjee P, Mani S. Methodologies to decipher the cell secretome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. novembro de 2013;1834(11):2226–32.
69. Robinson JL, Feizi A, Uhlén M, Nielsen J. A Systematic Investigation of the Malignant Functions and Diagnostic Potential of the Cancer Secretome. *Cell Reports*. março de 2019;26(10):2622-2635.e5.
70. Chua RL, Lukassen S, Trump S, Hennig BP, Wendisch D, Pott F, et al. COVID-19 severity correlates with airway epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis. *Nat Biotechnol*. agosto de 2020;38(8):970–9.
71. Shaath H, Vishnubalaji R, Elkord E, Alajez NM. Single-Cell Transcriptome Analysis Highlights a Role for Neutrophils and Inflammatory Macrophages in the Pathogenesis of Severe COVID-19. *Cells*. 29 de outubro de 2020;9(11):2374.
72. Zinellu A, Paliogiannis P, Fois AG, Solidoro P, Carru C, Mangoni AA. Cholesterol and Triglyceride Concentrations, COVID-19 Severity, and Mortality: A Systematic Review and Meta-Analysis With Meta-Regression. *Front Public Health*. 18 de agosto de 2021;9:705916.
73. Song D, Yang D, Powell CA, Wang X. Cell–cell communication: old mystery and new opportunity. *Cell Biol Toxicol*. abril de 2019;35(2):89–93.
74. Lin YT, Salihovic S, Fall T, Hammar U, Ingelsson E, Ärnlov J, et al. Global Plasma Metabolomics to Identify Potential Biomarkers of Blood Pressure Progression. *ATVB* [Internet]. agosto de 2020 [citado 9 de setembro de 2022];40(8). Disponível em: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.120.314356>
75. Armingol E, Officer A, Harismendy O, Lewis NE. Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. *Nat Rev Genet*. fevereiro de 2021;22(2):71–88.
76. Newton AH, Cardani A, Braciale TJ. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin Immunopathol*. julho de 2016;38(4):471–82.

77. Lieberman NAP, Peddu V, Xie H, Shrestha L, Huang ML, Mears MC, et al. In vivo antiviral host transcriptional response to SARS-CoV-2 by viral load, sex, and age. Cadwell K, organizador. PLoS Biol. 8 de setembro de 2020;18(9):e3000849.
78. Song JW, Zhang C, Fan X, Meng FP, Xu Z, Xia P, et al. Immunological and inflammatory profiles in mild and severe cases of COVID-19. Nat Commun. dezembro de 2020;11(1):3410.
79. Guan W jie, Liang W hua, Zhao Y, Liang H rui, Chen Z sheng, Li Y min, et al. Comorbidity and its impact on 1590 patients with COVID-19 in China: a nationwide analysis. Eur Respir J. maio de 2020;55(5):2000547.
80. Pastor-Barriuso R, Pérez-Gómez B, Hernán MA, Pérez-Olmeda M, Yotti R, Oteo-Iglesias J, et al. Infection fatality risk for SARS-CoV-2 in community dwelling population of Spain: nationwide seroepidemiological study. BMJ. 27 de novembro de 2020;m4509.
81. Ward H, Atchison C, Whitaker M, Ainslie KEC, Elliott J, Okell L, et al. SARS-CoV-2 antibody prevalence in England following the first peak of the pandemic. Nat Commun. dezembro de 2021;12(1):905.
82. Perez-Saez J, Lauer SA, Kaiser L, Regard S, Delaporte E, Guessous I, et al. Serology-informed estimates of SARS-CoV-2 infection fatality risk in Geneva, Switzerland. The Lancet Infectious Diseases. abril de 2021;21(4):e69–70.
83. The Massachusetts Consortium for Pathogen Readiness, Fajnzylber J, Regan J, Coxen K, Corry H, Wong C, et al. SARS-CoV-2 viral load is associated with increased disease severity and mortality. Nat Commun. dezembro de 2020;11(1):5493.
84. Mallapaty S. The coronavirus is most deadly if you are older and male — new data reveal the risks. Nature. 3 de setembro de 2020;585(7823):16–7.
85. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. Nature. novembro de 2003;426(6965):450–4.
86. Messner CB, Demichev V, Wendisch D, Michalick L, White M, Freiwald A, et al. Ultra-high-throughput clinical proteomics reveals classifiers of COVID-19 infection. Cell Systems. junho de 2020;S2405471220301976.
87. Pernitzsch SR, Sharma CM. Transcriptome Complexity and Riboregulation in the Human Pathogen *Helicobacter pylori*. Front Cell Inf Microbio [Internet]. 2012 [citado 15 de agosto de 2022];2. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2012.00014/abstract>
88. Peng Z, Cheng Y, Tan BCM, Kang L, Tian Z, Zhu Y, et al. Comprehensive analysis of RNA-Seq data reveals extensive RNA editing in a human transcriptome. Nat Biotechnol. março de 2012;30(3):253–60.
89. Liao M, Liu Y, Yuan J, Wen Y, Xu G, Zhao J, et al. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19. Nat Med. junho de 2020;26(6):842–4.

90. Morse C, Tabib T, Sembrat J, Buschur KL, Bittar HT, Valenzi E, et al. Proliferating SPP1/MERTK-expressing macrophages in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. agosto de 2019;54(2):1802441.
91. Aid M, Busman-Sahay K, Vidal SJ, Maliga Z, Bondoc S, Starke C, et al. Vascular Disease and Thrombosis in SARS-CoV-2-Infected Rhesus Macaques. *Cell*. novembro de 2020;183(5):1354-1366.e13.
92. Home - GEO - NCBI [Internet]. Disponível em: [ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://ncbi.nlm.nih.gov/geo)
93. Ye Q, Wang B, Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *Journal of Infection*. junho de 2020;80(6):607–13.
94. Ferrara JL, Abhyankar S, Gilliland DG. Cytokine storm of graft-versus-host disease: a critical effector role for interleukin-1. *Transplant Proc*. fevereiro de 1993;25(1 Pt 2):1216–7.
95. Champion O, Al Khalifa T, Langlois B, Thevenard-Devy J, Salesse S, Savary K, et al. Contribution of the Low-Density Lipoprotein Receptor Family to Breast Cancer Progression. *Front Oncol*. 30 de julho de 2020;10:882.
96. Sviridov D, Bukrinsky M. Interaction of pathogens with host cholesterol metabolism: Current Opinion in Lipidology. outubro de 2014;25(5):333–8.
97. Cure E, Cumhuri Cure M. Strong relationship between cholesterol, low-density lipoprotein receptor, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger, and SARS-COV-2: this association may be the cause of death in the patient with COVID-19. *Lipids Health Dis*. dezembro de 2021;20(1):179, s12944-021-01607–5.
98. Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, Davulcu O, Diep J, Ishikawa Y, et al. An essential receptor for adeno-associated virus infection. *Nature*. 4 de fevereiro de 2016;530(7588):108–12.
99. Devignot S, Sha TW, Burkard T, Schmerer P, Hagelkruys A, Mirazimi A, et al. Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1) is a host factor for RNA viruses including SARS-CoV-2 [Internet]. *Microbiology*; 2022 fev [citado 13 de julho de 2022]. Disponível em: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2022.02.17.480904>
100. Zhao Y, Zhao Z, Wang Y, Zhou Y, Ma Y, Zuo W. Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *Am J Respir Crit Care Med*. 1º de setembro de 2020;202(5):756–9.
101. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. março de 2020;579(7798):270–3.