

ALTERACIONES DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN LA INFECCIÓN POR SARS-COV-2 EN DISTINTOS MODELOS DE ESTUDIO

M. Arroyo Varela¹, B. Delgado Martín², R. Larrosa Jiménez³, R. Bautista Moreno².

¹UGC Enfermedades Respiratorias. Hospital Regional Universitario de Málaga.

²SCBI. Universidad de Málaga.

³Departamento de Arquitectura de Computadores. Universidad de Málaga.

Premio a la mejor Comunicación en el Congreso Neumosur, año 2021.

RESUMEN

Resumen abreviado: Se han usado tres modelos de estudio distintos para estudiar los perfiles de expresión génica producido por el SARS-CoV-2: cultivos de células epiteliales bronquiales, organoides de las vías respiratorias y muestras obtenidas de autopsias en pacientes, con y sin infección por SARS-CoV-2.

Fundamento: La pandemia por SARS-CoV-2 ha supuesto un auténtico reto para el mundo científico debido a la rápida transmisión y elevada mortalidad que produce este nuevo coronavirus. La enfermedad asociada se ha denominado COVID-19 y abarca desde casos asintomáticos hasta graves que evolucionan rápidamente a síndrome de distrés respiratorio agudo, alteraciones multisistémicas y la muerte. La comunidad científica ha aunado esfuerzos para tratar de conocer mejor el proceso fisiopatológico de la infección con la intención de combatir de forma más eficaz la enfermedad. En este trabajo presentamos un estudio para conocer las alteraciones de la expresión génica provocadas por la infección.

Métodos: Se han usado tres modelos de estudio distintos: cultivos de células epiteliales bronquiales, organoides de las vías respiratorias y muestras obtenidas de autopsias en pacientes, con y sin infección por SARS-CoV-2. Se han analizado los perfiles de expresión alterados por la infección en cada modelo, así como las categorías funcionales enriquecidas.

Resultados: Solo 4 genes son comunes en los tres tipos de modelos de estudio, siendo el modelo de autopsias el más dispar. Dentro de los genes comunes en los modelos de cultivo celular y organoide de pulmón encontramos funciones relacionadas con procesos inflamatorios.

Conclusiones: Los estudios in vitro son un buen modelo para tener una foto fija de las alteraciones en los patrones de infección, mientras que las autopsias no son un buen modelo debido al sesgo provocado por la necrosis.

Palabras clave: SARS-CoV-2, expresión génica, covid19, organoides, autopsia, cultivo celular.

ALTERATIONS OF GENE EXPRESSION IN SARS-COV-2 INFECTION IN DIFFERENT STUDY MODELS

ABSTRACT

Short summary: Three different study models have been used to study the gene expression profiles produced by SARS-CoV-2: bronchial epithelial cell cultures, airway organoids, and autopsy samples from patients with and without SARS-infection. CoV-2.

Basis: The SARS-CoV-2 pandemic has been a real challenge for the scientific world due to the rapid transmission and high mortality caused by this new coronavirus. The associated disease has been named COVID-19 and ranges from asymptomatic to severe cases that rapidly progress to acute respiratory distress syndrome, multisystem disorders, and death. The scientific community has joined efforts to try to better understand the pathophysiological process of the infection with the intention of combating the disease more effectively. In this work we present a study to determine the alterations in gene expression caused by the infection.

Methods: Three different study models have been used: bronchial epithelial cell cultures, airway organoids, and samples obtained from autopsies in patients with and without SARS-CoV-2 infection. The expression profiles altered by the infection in each model have been analyzed, as well as the functional categories enriched.

Results: Only 4 genes are common in the three types of study models, the autopsy model being the most disparate. Within the common genes in cell and organoid culture models of the lung, we find functions related to inflammatory processes.

Conclusions: In vitro studies are a good model to have a snapshot of alterations in infection patterns, while autopsies are not a good model due to bias caused by necrosis.

Keywords: SARS-CoV-2, gene expression, covid19, organoids, autopsy, cell culture.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SARS-CoV-2: origen, transmisión y fisiopatología

La Comisión Municipal de Salud y Sanidad de Wuhan, en la provincia de Hubei, informó el 31 de diciembre del 2019 de una serie de 27 casos que presentaban una neumonía con etiología desconocida. La mayoría de los pacientes eran trabajadores del Mercado Mayorista de Mariscos del Sur de China, situado en la provincia de Wuhan.

De ellos, 7 casos estaban en estado crítico por una neumonía grave. Días más tarde, el 7 de enero del 2020, se logró identificar el agente etiológico, un virus de la familia Coronaviridae. El 10 de enero, investigadores de la Universidad de Fudan, Shanghai, publicaron los datos de secuenciación genómica del coronavirus y determinaron que el virus es de la misma familia que el coronavirus causante del SARS.

Recibido: 16.10.2021 Aceptado: 02.02.2022

Dra. Macarena Arroyo Varela
macarrojo@gmail.com

El 30 de enero, la OMS declara a la epidemia como una emergencia de salud pública mundial y, finalmente, el 11 de marzo del 2020, se declara oficialmente la pandemia. A este virus se le ha denominado SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) y, a día de hoy, avanza por todo el planeta sumando más de 3,36 millones de fallecidos y más de 162 millones de personas infectadas.

Los coronavirus son miembros de la familia Coronaviridae, pertenecientes a la subfamilia Orthocoronavirinae, la cual está compuesta por cuatro géneros, encuadrándose el SARS-CoV-2 en el género Betacoronavirus. Hasta su aparición se habían descrito seis coronavirus en seres humanos responsables de un importante número de infecciones leves del tracto respiratorio superior en personas adultas e inmunocompetentes. Sin embargo, podían causar cuadros más graves en niños y ancianos, con una estacionalidad típica invernal. El SARS-CoV-2 supone el séptimo coronavirus aislado y se caracteriza por su capacidad de provocar infecciones respiratorias graves en humanos. La enfermedad asociada a la infección por el SARS-CoV-2 se ha denominado COVID-19 y abarca desde casos asintomáticos hasta casos graves que evolucionan rápidamente a síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) y a la muerte¹. Aproximadamente, un 15 - 20% de los pacientes contagiados requieren ingreso hospitalario. El virus tiene una amplia transmisibilidad² y es probable su contagio a partir de personas asintomáticas³. La transmisión se produce principalmente a través de aerosoles exhalados por las personas infectadas, pudiendo permanecer un tiempo suspendidas en el aire⁴. Este problema es especialmente importante en los espacios cerrados mal ventilados⁵, aunque también se han descrito otras vías de transmisión como la vertical (materno-fetal), la lactancia materna, la fecal oral o a través de fómites⁶.

En cuanto a la fisiopatología de la COVID-19, aunque aún no se ha descrito completamente, por similitudes con epidemias previas con otros coronavirus como el SARS y el MERS, se han observado respuestas inmunitarias asociadas a cantidades elevadas de citoquinas proinflamatorias⁷. En ambos cuadros se detectó una inflamación pulmonar, un daño pulmonar extenso, el desarrollo del SDRA⁸, o el síndrome de activación macrofágica y de desregulación inmune

1.2. Infección y defensa.

El SARS-CoV-2 infecta mayoritariamente a las células de las vías respiratorias superiores y al tejido pulmonar, principalmente a las células epiteliales pulmonares alveolares tipo 2, a través de la unión de una proteína de

su superficie, la proteína S, al receptor angiotensina 2 (ACE-2). Esta unión está mediada por la proteasa celular TMPRSS210, receptor que también está presente en células de otros órganos como: el corazón, riñón, vejiga y órganos del sistema digestivo..

El bloqueo de la proteína ACE-2 por la infección provoca un desequilibrio en el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), desencadenándose la producción de péptidos con efecto proinflamatorios que, unido a la activación del sistema inmune innato, son los responsables de provocar el síndrome de liberación de citoquinas, el cual causa un grave daño a nivel respiratorio, llegando a producirse la muerte¹¹. Esta enzima ACE-2 se encuentra también en otras especies animales, exceptuando ratas y ratones⁷, lo que justificaría primero el contagio del vector animal al humano, proceso conocido como zoonosis, y posteriormente la transmisión de humano a humano¹².

Por lo tanto, la repuesta ante la infección por SARS-CoV-2 es dependiente tanto de la presencia de receptores ACE-2 en los tipos celulares, como de la respuesta de la inmunidad innata puesta en marcha por el huésped. Al tratarse de un virus, este proceso está ligado a las respuestas del interferón tipo 1 (IFN-1), que al activarlo limita la replicación viral, promueve la fagocitosis por macrófagos e induce la respuesta inmune adaptativa, activando los linfocitos T. Cuando los macrófagos se infectan, se produce una presentación de antígenos a los linfocitos T que conduce a su activación y diferenciación⁹.

Un hecho relevante de esta patología es que la gran mayoría de los pacientes que padecen COVID-19, y requieren ingreso hospitalario, presentan linfopenia en el hemograma¹², que puede ser debido a la migración de linfocito T al pulmón. Su descenso relativo se ha postulado como marcador indirecto de inflamación pulmonar³, ya que, sumado a una migración de macrófago, y de linfocitos T, produce un daño intersticial pulmonar originando el SDRA. Su traducción clínica más relevante es la hipoxemia por afectación del intercambio gaseoso y disnea.

1.3 Modelos de estudio de SARS-Cov-2.

Frente a esta nueva patología se hace imprescindible tanto el conocimiento de las alteraciones funcionales que se producen a nivel celular, como el conocimiento de la respuesta fisiológica que se desencadena en el organismo frente a la infección. Esta última, desde el punto de vista clínico, se realiza observando los desequilibrios bioquímicos o las lesiones a nivel de órganos, de los cuales ya hemos hablado. Sin embargo, estas observaciones no pueden mostrar las alteraciones que se producen a nivel molecular.

Ante la imposibilidad de disponer de muestras de tejido vivo para realizar ciertos estudios moleculares, ya sea por su inaccesibilidad o por no causar un daño innecesario, se recurre a modelos de estudios celulares, muy extendidos en la comunidad científica¹³. Así, a día de hoy, se dispone de una amplia gama de modelos estandarizados de cultivo de células de distinto tipo sobre los que emular infecciones o respuesta a fármacos. En este caso, para estudiar la infección in vitro provocada por SARS-CoV-2 se utilizan cultivos de células epiteliales bronquiales (NHBE, del inglés normal human bronchial epithelial cells), ya que son los tipos celulares que primero se infectan al expresar los genes ACE2 y TMPRSS2, receptores para la entrada viral⁸. Estos modelos in vitro son muy eficaces en el estudio de la propagación del virus, sin embargo, son poco prácticos como modelos para conocer las alteraciones de la función del tracto respiratorio. Un modelo de estudio más completo consiste en la utilización de organoides, como los organoides de las vías respiratorias, que no son más que estructuras tridimensionales complejas caracterizadas por una composición celular diferente y diseñadas para imitar las estructuras pulmonares¹⁴. El uso de estos modelos de organoides nos acerca un poco más al conocimiento real de la infección. En cualquier caso, ninguno de los dos modelos anteriores poseen la complejidad del órgano completo. En este sentido, y ante la imposibilidad de disponer de tejido pulmonar de pacientes, los estudios de autopsias pueden complementar la información que se posee del desarrollo de la enfermedad a nivel molecular¹⁵.

Por tanto, en este trabajo, planteamos el estudio comparativo de los cambios moleculares a nivel transcripcional que se producen ante una infección por SARS-CoV-2 en modelos de cultivos de células NHBE, organoides de tejido pulmonar y tejido biopsiado procedentes de autopsias de fallecidos por la infección (figura 1).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Selección de muestras.

Para este estudio, se seleccionaron muestras de tres modelos de estudio pertenecientes a dos proyectos diferentes ubicadas en la base de datos *Sequence Read Archive* (SRA) del NCBI. Todas las muestras pertenecen a experimentos de secuenciación masiva de RNA (RNA-seq). Las muestras de cultivos de células NHBE proceden del SRA *BioProject* PRJNA615032, asociado a un estudio sobre la respuesta inmunitaria a la infección por SARS-CoV-2 en varios modelos de cultivos celulares¹⁶. De este proyecto, se seleccionaron 24 muestras, 12 de ellas pertenecientes a cultivos de células no infectadas y 12 pertenecientes a cultivos de células infectadas por SARS-CoV-2.

Las muestras de organoides de pulmón y de autopsias proceden del SRA *BioProject* PRJNA649019, asociado a un estudio sobre la identificación de inhibidores del SARS-CoV-2¹⁴. Se seleccionaron las 6 muestras disponibles de autopsias, 3 de ellas pertenecientes a pulmones sanos y 3 pertenecientes a pulmones de pacientes infectados por SARS-CoV-2. De organoides, se seleccionaron 6 muestras, 3 de ellas de organoides no infectados y 3 de organoides infectados por SARS-CoV-2, dejando fuera de este estudio las muestras de organoides tratados con fármacos, por ser este un factor no contemplado en los objetivos de este estudio. Los datos asociados a las muestras pueden consultarse en la **tabla suplementaria S1** : https://www.rev-esp-patol-torac.com/files/publicaciones/Revistas/2022/34.4/tabla_S1.xlsx. El procesamiento de los datos se esquematiza en la **figura 2**, detallándose con más profundidad en los siguientes apartados.

2.2. Procesamiento de los datos.

Se realizó un preprocesamiento con la herramienta *SeqTrimNext* (v2.0.67)¹⁷ para eliminar las lecturas de baja calidad, los adaptadores de secuenciación y cualquier contaminante. Las lecturas útiles fueron mapeadas sobre el genoma humano (versión hg38; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.26/) utilizando la herramienta *STAR* (v2.7.6b)¹⁸. Para cuantificar las lecturas mapeadas sobre el genoma, se utilizó la herramienta *feature Counts* del paquete *Subread* (v2.0.0)¹⁹ con la anotación *RefSeq* del genoma hg38. Para cada muestra, se obtuvieron los valores brutos de cuantificación de las lecturas mapeadas a nivel de genes, es decir, los valores brutos de la expresión de cada gen en cada muestra.

2.3. Análisis de expresión génica diferencial.

Los datos correspondientes a cada modelo de estudio fueron tratados como un conjunto, de forma que se trabajó con tres conjuntos de datos independientes: uno de cultivos celulares, otro de organoides y otro de autopsias. Los cálculos de expresión diferencial de cada conjunto de datos se realizaron utilizando la herramienta web *iDEP* (v0.92; <http://bioinformatics.sdstate.edu/idep92/>)²⁰. Los genes se filtraron por un valor mínimo de expresión normalizada de 2 cuentas por millón (CPM) en, al menos, 2 muestras y se realizó una transformación de las cuentas por el método *started log* para los análisis de agrupación de los genes y los análisis de componentes principales (PCA, del inglés *principal component analysis*)²¹. El cálculo de expresión diferencial se realizó con el algoritmo *DESeq2*²² comparando el grupo infectado por SARS-CoV-2 con el grupo control en cada conjunto de datos y con un filtro mínimo de 0,05 para la p ajustada (FDR) y de 2 para el valor de cambio de expresión (*fold change*, FC).

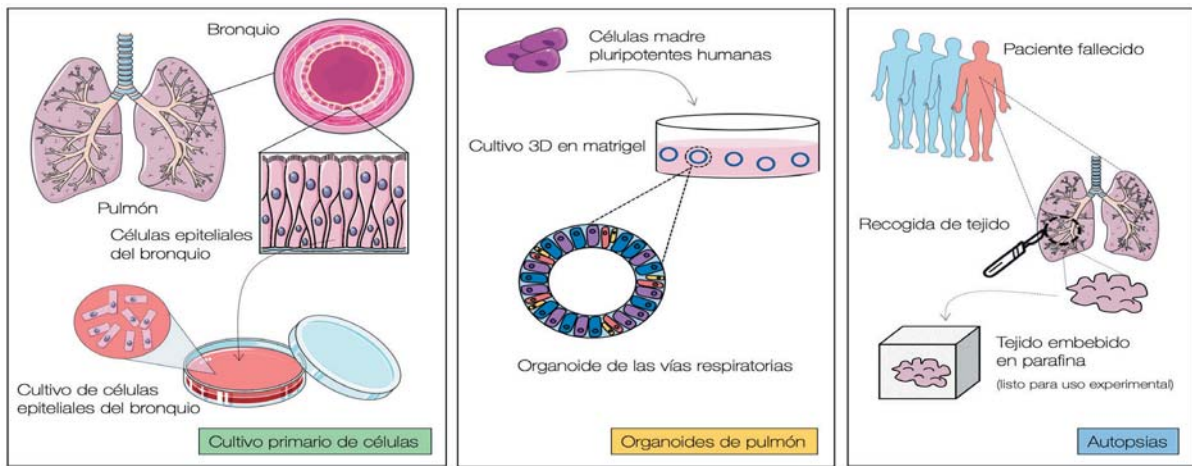


Figura 1: Modelos de estudio empleados para el análisis de las alteraciones transcripcionales en la infección por SARS-CoV-2.

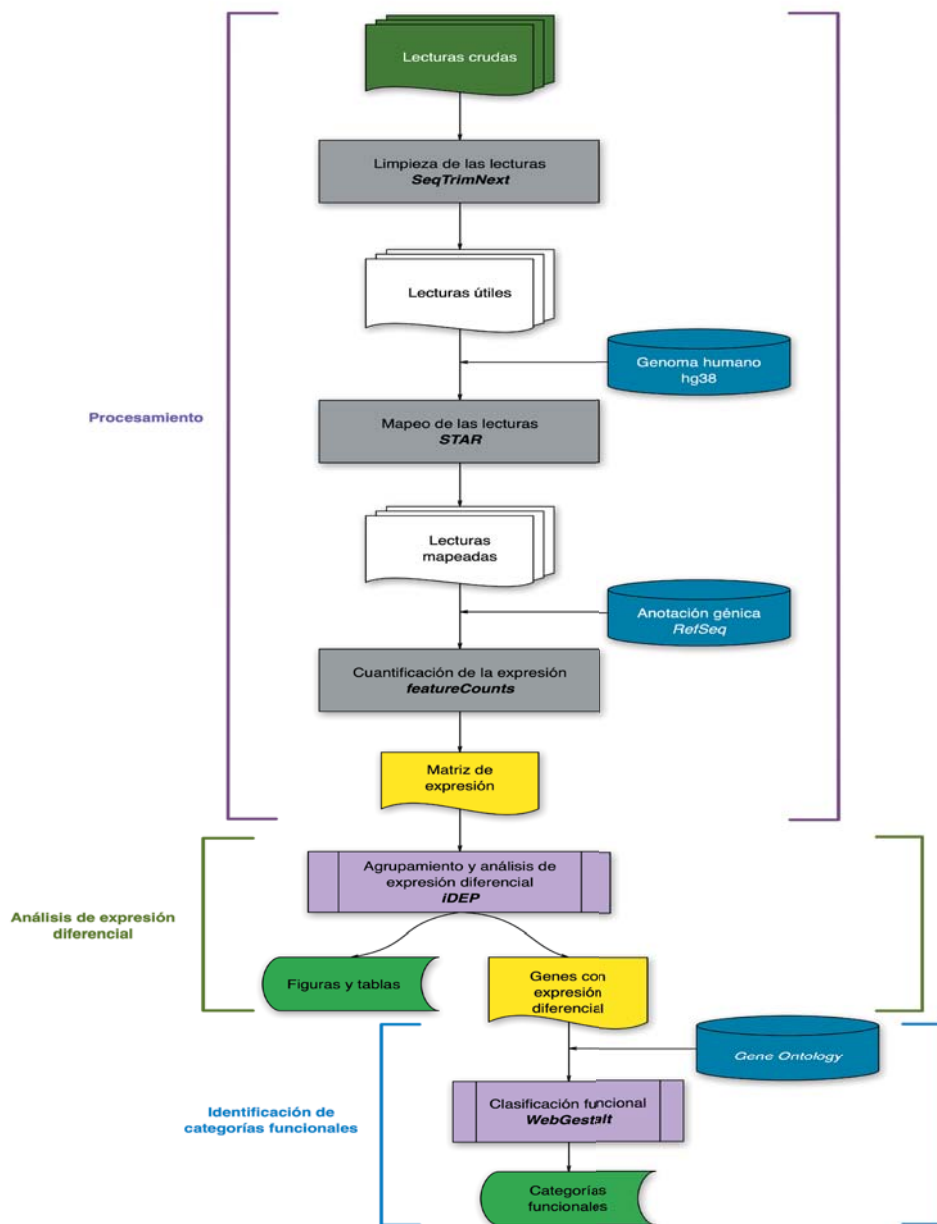


Figura 2: Flujo del trabajo del proceso de identificación de DEG afectados por la infección por SARS-CoV-2.

2.4. Comparación de los genes expresados diferencialmente en cada modelo y sus categorías funcionales.

Las listas de genes que presentaron un cambio significativo de expresión (genes expresados diferencialmente, DEG) en cada modelo se utilizaron para dibujar un diagrama de *Venn*, con el fin de identificar los genes comunes a los tres modelos, utilizando la herramienta *InteractiVenn* (<http://www.interactivenn.net>)²³. Además, se analizó si existía un enriquecimiento funcional en los DEG comunes mediante un análisis estadístico de sobrerrepresentación (ORA, del inglés *over-representation analysis*) utilizando *WebGestalt* 2019²⁴. Este análisis determina si existe una sobrerrepresentación de genes asociados con una categoría funcional anotada en la base de datos en comparación con lo que se esperaría de un conjunto aleatorio de genes, utilizando como referencia los genes de *Homo sapiens*. Para realizar la clasificación funcional, se escogió la ontología *Gene Ontology - Biological Process* (GO-BP). Esta ontología se refiere al papel biológico de los genes o de los productos génicos y, generalmente, implica un cambio físico o químico sobre alguna molécula.

3. RESULTADOS

3.1. Agrupación de los genes.

Los genes de cada conjunto se agruparon de dos formas diferentes: (1) mediante una agrupación jerárquica de los 1.000 genes con mayor desviación estándar, representada en un mapa de calor, y (2) en el espacio bidimensional mediante una transformación lineal, el PCA. Los mapas de calor proporcionan una visión general de los datos y, en ellos, se puede observar una clara diferenciación entre las muestras que pertenecen a la condición sana y a la condición de infección en los tres conjuntos de datos (**figura 3**). De la misma forma, los PCA muestran que existe una separación de las muestras de ambas condiciones en el espacio bidimensional. En el conjunto de datos de cultivos celulares, el PCA recoge el 33% de la variabilidad (información) de las muestras (**figura 4A**) y se observa una clara separación de las muestras en el componente principal 1 (PC1); en el de organoides, recoge el 65% de variabilidad (**figura 4B**) y se observa, de nuevo, una separación en el PC1; y en el de autopsias, recoge el 63% de variabilidad y se observa una separación en el PC1, excepto para una muestra (**figura 4C**). Debido al bajo número de réplicas disponibles de este conjunto de datos, se decidió conservar esta muestra para continuar con los análisis posteriores. Aun considerando esta particularidad, los PCA indican que, en los tres conjuntos, existen mayores similitudes entre las muestras que pertenecen a la misma condición que entre las muestras que pertenecen a condiciones diferentes.

Por esta razón, se conservaron todas las muestras para realizar los análisis de expresión génica diferencial.

3.2. Genes expresados diferencialmente.

Utilizando el paquete *DESeq2* sobre los niveles de expresión génica de los tres conjuntos con unos filtros de 2 para el FC y de 0,05 para la FDR, se obtuvieron los siguientes números de genes expresados diferencialmente (DEG) entre la condición de infección y la condición sana: (1) 179 DEG en cultivo de NHBE (114 DEG sobreexpresados y 65 DEG reprimidos), (2) 31 DEG en organoides (30 genes sobreexpresados y 1 reprimido) y (3) 295 DEG en autopsias (85 genes sobreexpresados y 210 genes reprimidos). Los resultados del cálculo de expresión génica diferencial se muestran en la **tabla suplementaria S2**: https://www.rev-esp-patol-torac.com/files/publicaciones/Revistas/2022/34.4/tabla_S2.xlsx.

3.3. Comparación de la expresión génica en los distintos modelos.

Para comparar la expresión génica en los modelos, se dibujó un diagrama de *Venn* con todos los DEG de cada modelo (**figura 5**). Se observa que hay únicamente 4 genes comunes a todos los modelos, que están reprimidos en autopsias y sobreexpresados en cultivos de NHBE y organoides. Los 14 genes comunes a cultivos de NHBE y organoides se encuentran sobreexpresados en ambos modelos. Los 10 genes comunes exclusivamente a cultivos de NHBE y autopsias se encuentran sobreexpresados en cultivos y reprimidos en autopsias. Los 4 genes comunes exclusivamente a organoides y autopsias se encuentran sobreexpresados en organoides y reprimidos en autopsias. La dirección de cambio de expresión observada coincide entre cultivos de células NHBE y organoides, y es contraria entre estos modelos y el modelo de autopsia. Debido a esto, se decidió realizar el análisis funcional únicamente con los DEG comunes entre cultivos de células NHBE y organoides.

3.4. Identificación de las categorías funcionales de los genes expresados diferencialmente.

Los DEG comunes a los cultivos de células NHBE y a los organoides se consultaron en *WebGestalt* 2019 para determinar si se daba a un enriquecimiento funcional en ellos. Los 18 DEG analizados a partir de sus identificadores *ENSEMBL* mapearon como genes únicos sobre los identificadores *EntrezGene* y se encontraban anotados funcionalmente en la clasificación GO-BP. Se identificaron 71 categorías funcionales como enriquecidas en el conjunto de genes analizado (FDR < 0,05). Las 20 categorías con mayor significancia estadística según su FDR se encuentran representadas en la **figura 6**, ordenadas de mayor a menor valor de enriquecimiento funcional. Un mayor valor de enriquecimiento de una categoría funcional indica que la proporción de genes anotados en

mayor de la que cabría esperar en un conjunto de genes aleatorio, tomando como referencia todos los genes humanos anotados. Por ello, se dice que dicha categoría funcional se encuentra enriquecida en el conjunto de genes analizado. Todas las categorías mostradas están relacionadas con procesos inmunológicos.

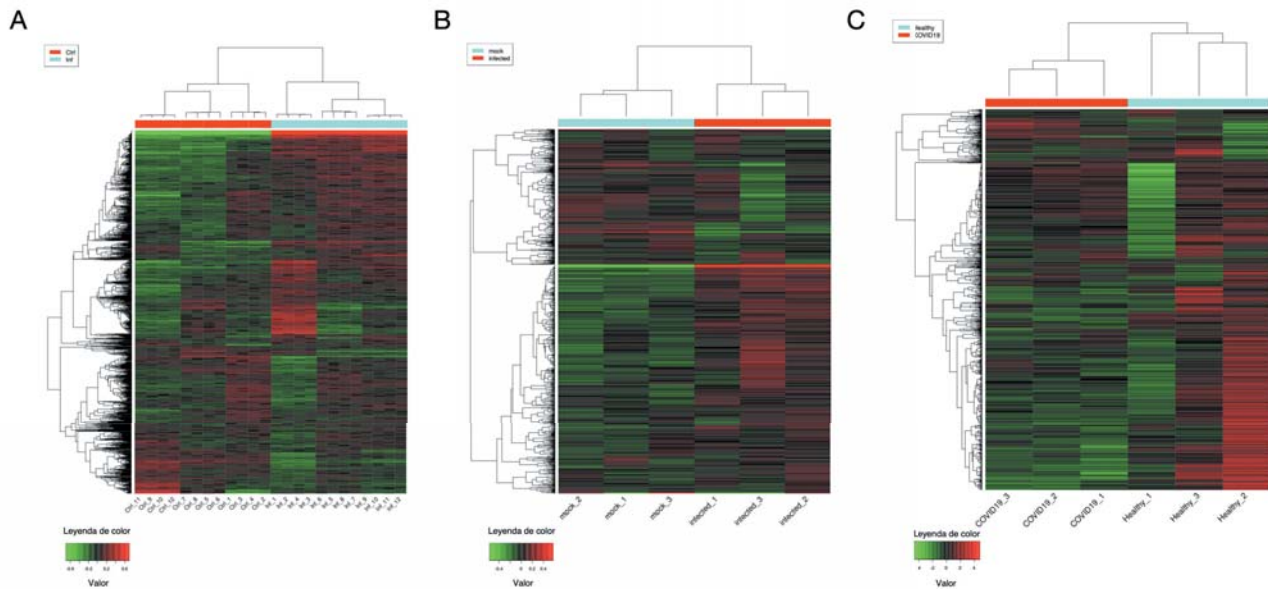


Figura 3: Mapas de calor de los 1000 genes con mayor desviación estándar en (A) cultivos de células NHBE, (B) organoides pulmonares y (C) autopsias.

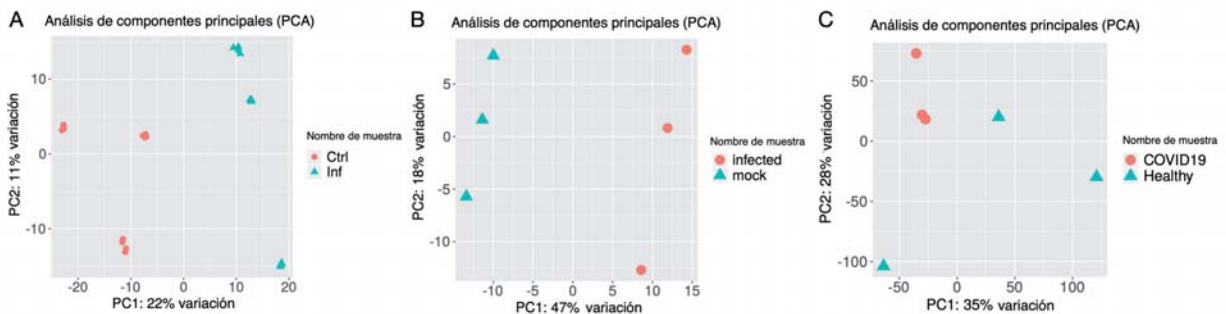


Figura 4: Representación gráfica de los PCA de (A) cultivos de células NHBE, (B) organoides pulmonares y (C) autopsias.

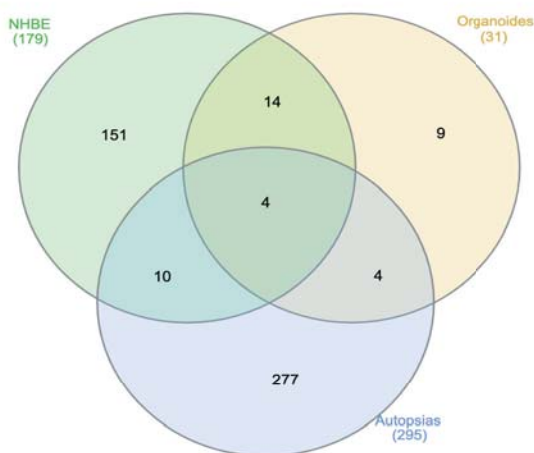


Figura 5: Representación gráfica de los PCA de (A) cultivos de células NHBE, (B) organoides pulmonares y (C) autopsias.

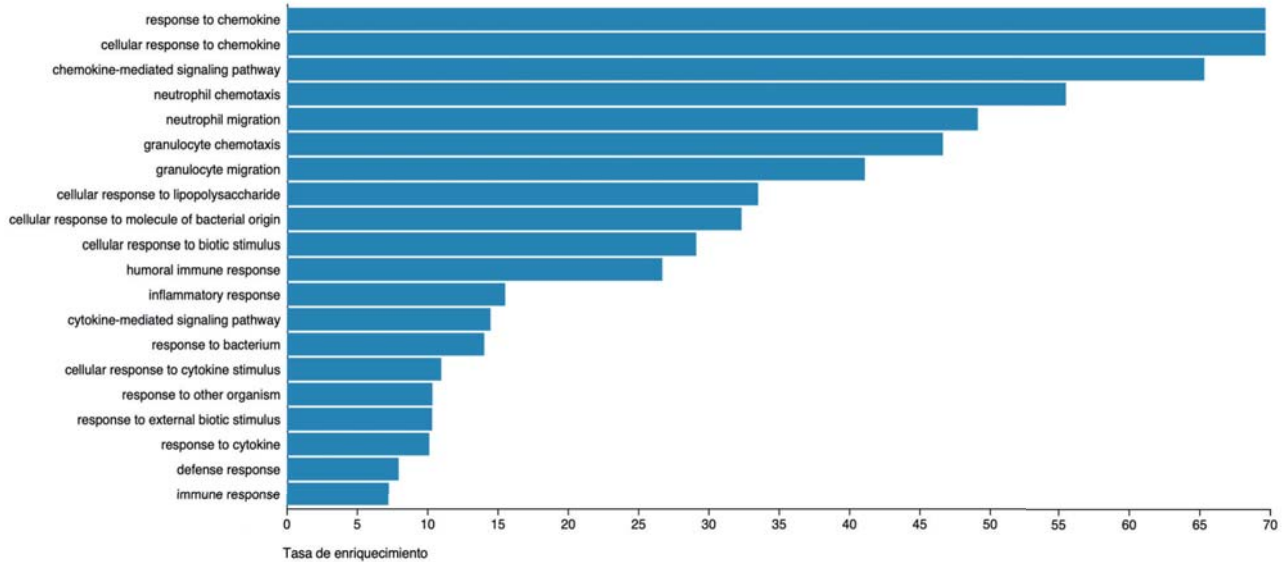


Figura 6: Categorías funcionales enriquecidas en la lista de DEG. Una mayor tasa de enriquecimiento en una categoría funcional indica mayor sobrerrepresentación de los genes anotados en dicha categoría en el conjunto analizado.

DISCUSIÓN

A partir de la agrupación de los perfiles de expresión, ya sea en el mapa de calor o en los análisis de PCA, entre las muestras infectadas y sanas en los tres modelos de estudio, se observa que la infección provoca alteraciones significativas de la expresión génica, al poder diferenciarse de forma clara las muestras infectadas y las muestras sanas.

Estos perfiles no son homogéneos a través de todos los modelos, siendo las autopsias las que muestran un mayor número de DEG, seguidas de los cultivos celulares y de los organoides, por lo que no parece existir un orden de alteraciones de los perfiles de expresión promovido por el aumento en la complejidad del modelo. Este hecho se comprueba, además, observando cómo solo 4 DEG son comunes a los tres modelos de estudio. Sin embargo, los 18 DEG comunes en cultivo de células y organoides representan un 45% de los DEG de organoides, lo que nos sugiere una mayor semejanza en estos dos modelos. De hecho, la regulación de la expresión de los DEG comunes a estos últimos se da la misma dirección (regulación positiva o regulación negativa), mientras que, en las autopsias, se da en la dirección opuesta. El bajo número de DEG identificado en el modelo de organoides concuerda con los resultados observados por los autores del estudio original¹⁴.

Entre los genes que muestran cambios significativos en su expresión en las muestras infectadas respecto a las no infectadas, se encuentran genes estimulados por interferón (ISG, del inglés *interferon-stimulated genes*), que tienen como función, entre otras, la inhibición de las infecciones virales. Algunos de los ISG identificados son CX3CL1 (que codifica la quimioquina llamada fractalquina), CXCL3 (quimioquina con motivo C-X-C), CCL2 (ligando de quimioquinas 2) y otras quimioquinas e interleuquinas, entre otros (**ver tabla suplementaria S2**): https://www.rev-esp-patol-torac.com/files/publicaciones/Revistas/2022/34.4/tabla_S2.xlsx

Basándose en la expresión de 398 ISG y mediante un ensayo específico para el análisis de perfiles de respuesta inmunitaria, Nienhold y colaboradores establecieron dos perfiles inmunopatológicos en autopsias de pulmón de pacientes de COVID-19²⁵. El número de réplicas y las técnicas de análisis empleadas en nuestro estudio no permiten distinguir estos perfiles en el modelo de autopsias, pero se observan cambios en la expresión de estos genes, especialmente, en el modelo de organoides. En las muestras de autopsias analizadas en nuestro estudio, muchos de los DEG identificados están relacionados con procesos del desarrollo, probablemente, debido al estado necrótico del tejido, lo que empaña la posibilidad de identificar los procesos celulares y moleculares en desarrollo debido a la infección o a la respuesta inmunitaria. Wu y col., analizando un mayor número de muestras de autopsias, observaron que el desenlace letal del COVID-19 se debe en mayor medida a secuelas relacionadas con la neumonía provocada por el virus que a una infección viral activa fulminante²⁶.

Según se desprende de los estudios mencionados, el uso de las autopsias como modelo de estudio permite dilucidar los motivos por los que se produce el fallecimiento de algunos pacientes de COVID-19, pero los cultivos celulares y los organoides parecen modelos más apropiados para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares que desencadena la infección por el virus y que constituyen el primer paso hacia un posible desenlace fatal, antes que la propia respuesta inmunitaria. Además, estos modelos permiten realizar experimentos como el descubrimiento de dianas farmacológicas y el estudio de la toxicidad a nivel celular de los posibles fármacos considerados para el tratamiento de la enfermedad. Esto permitiría atajar la infección antes de que se produzca una respuesta inmunitaria exacerbada que dé lugar a la muerte de los pacientes.

CONCLUSIÓN

Los estudios *in vitro* utilizando modelos celulares o modelos de organoides nos muestran una imagen fija de las alteraciones a nivel transcripcional que suceden en las células infectadas, lo que permite conocer los procesos celulares y moleculares que tienen lugar en los primeros pasos de la infección. Esto es esencial para la identificación de fármacos que puedan detener el proceso infeccioso desde el principio. Ambos modelos de estudio reflejan alteraciones primarias que suceden en las primeras etapas de la infección, como son la producción de citoquinas y la activación de la migración de granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), y sus resultados pueden ser usados en conjunto. Las autopsias permiten analizar los motivos por los que se produce el fallecimiento de los pacientes, pero el perfil transcripcional que muestran es muy distinto al de los cultivos celulares y los organoides, debido a que reflejan el resultado de una exacerbada respuesta inmunitaria y la prolongada inflamación a la que se ve sometida el tejido pulmonar, manifestándose que no es un modelo adecuado para el estudio del proceso infeccioso propiamente dicho, en comparación con los otros modelos, no permitiendo la mezcla de sus resultados con los de otros modelos.

Agradecimientos: Quisiéramos agradecer al Servicio de Supercomputación y Bioinformática (SCBI) de la Universidad de Málaga, el apoyo que ha prestado para el desarrollo de este proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zhu N, Zhang D, Wang W et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020; 382(8): 727–733. PMID: 31978945. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>.
2. Zhou F, Yu T, Du R et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet*. 2020; 395(10229):1054–1062. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673620305663>.
3. Arabi YM, Fowler R, Hayden FG. Critical care management of adults with community-acquired severe respiratory viral infection. *Intensive care medicine*. 2020; 46(2): 315–328.
4. Prem K, Liu Y, Russell TW et al. The effect of control strategies to reduce social mixing on outcomes of the COVID-19 epidemic in Wuhan, China: a modelling study. *The Lancet Public Health*. 2020; 5(5): e261–e270. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468266720300736>.
5. Morawska L, Cao J. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. *Environment International*. 2020; 139: 105730. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016041202031254X>.
6. Bulut C, Kato Y. Epidemiology of COVID-19. *Turkish journal of medical sciences*. 2020; 50(S1-1): 563–570.
7. Li G, Fan Y, Lai Y et al. Coronavirus infections and immune responses. *Journal of medical virology*. 2020; 92(4): 424–432.
8. Harcourt J, Tamin A, Lu X et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with coronavirus disease, United States. *Emerging infectious diseases*. 2020; 26(6): 1.266.
9. Prompetcha E, Ketloy C, Palaga T. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2020; 38(1): 1–9.
10. Mandolesi M, Sheward DJ, Hanke L et al. SARS-CoV-2 protein subunit vaccination elicits potent neutralizing antibody responses. *BioRxiv*. 2020.
11. Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science*. 2020; 368(6490): 473–474.
12. Guo YR, Cao QD, Hong ZS et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. *Military Medical Research*. 2020; 7(1): 1–10.
13. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *British Journal of Cancer*. 2014; 111(6): 1.021–46. Available from: <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.166>.
14. Han Y, Duan X, Yang L, Nilsson-Payant BE et al. Identification of SARS-CoV-2 inhibitors using lung and colonic organoids. *Nature*. 2021; 589(7.841): 270–275. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2901-9>.
15. Cavalli E, Petralia MC, Basile MS et al. Transcriptomic analysis of COVID 19 lungs and bronchoalveolar lavage fluid samples reveals predominant B cell activation responses to infection. *Int J Mol Med*. 2020 Oct; 46(4): 1.266–73.
16. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu WC et al. Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19. *Cell*. 2020; 181(5): 1.036–45.e9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286742030489X>.
17. Falgueras J, Lara AJ, Fernández-Pozo N et al. SeqTrim: a high-throughput pipeline for pre-processing any type of sequence read. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11(1): 38. Available from: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-38>.

18. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013 4/7/2021; 29(1): 15–21. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
19. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014 4/7/2021; 30(7): 923–930. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.
20. Ge SX, Son EW, Yao R. iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*. 2018; 19(1): 534. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2486-6>.
21. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010 4/8/2021; 26(1): 139–140. Available from: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
22. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*. 2014; 15(12): 550. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
23. Heberle H, Meirelles GV, da Silva FR et al: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*. 2015; 16(1): 169. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0611-3>.
24. Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ et al. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research*. 2019 5/3/2021; 47(W1): W199–W205. Available from: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz401>.
25. Nienhold R, Ciani Y, Koelzer VH et al. Two distinct immunopathological profiles in autopsy lungs of COVID-19. *Nature Communications*. 2020; 11(1): 5.086. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18854-2>.
26. Wu M, Chen Y, Xia H et al. Transcriptional and proteomic insights into the host response in fatal COVID-19 cases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020 11; 117(45): 28.336. Available from: <http://www.pnas.org/content/117/45/28336.abstract>.