



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Gabriel Salles Beltrão

Impacto da glicoproteína *Spike* do SARS-CoV-2 no metabolismo lipídico de células microgliais

Florianópolis

2024

Gabriel Salles Beltrão

Impacto da glicoproteína *Spike* do SARS-CoV-2 no metabolismo lipídico de células microgliais

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

Coorientador: MSc. Miguel de Abreu de Oliveira

Florianópolis

2024

Beltrão, Gabriel Salles

Impacto da glicoproteína Spike do SARS-CoV-2 no metabolismo lipídico de células microgliais / Gabriel Salles Beltrão ; orientador, Aguinaldo Roberto Pinto, coorientador, Miguel de Abreu de Oliveira, 2024.

67 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. COVID-19. 3. Imunometabolismo. 4. Lipidômica. I. Pinto, Aguinaldo Roberto. II. de Oliveira, Miguel de Abreu. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Luiz Fernando e Claci.

Agradecimentos

Em primeiro lugar eu tenho a agradecer a minha família, Pai; Mãe e Rafinha, que desde sempre apoiaram a ideia de cursar biologia e sempre me incentivaram meu sonho de me tornar um cientista. Mesmo que muitas vezes eu parecia estar mais na universidade que em casa. A ajuda que eu recebi, por menor que seja, foi essencial para conseguir aguentar todos esses anos e essa reta final da minha formação. Obrigado por tudo que vocês fazem por mim, amo muito vocês.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto, preciso agradecer por ter aberto as portas do laboratório e ter aceitado me guiar nessa jornada. Sempre me deu liberdade para tentar pesquisar sobre novos temas e técnicas, e sempre ajudou mesmo quando era uma novidade para ambos. As suas contribuições sempre foram fundamentais para minha formação como pesquisador.

Ao Miguel de Abreu de Oliveira, meu companheiro tanto dentro quanto fora do laboratório. Você sempre me ajudou, me ensinando, me guiando, exigindo sempre o melhor de mim, acreditando no meu potencial. Você é meu exemplo de pesquisador e esse trabalho não teria sucesso sem você!

A Dr^a. Martina Blank e o LABIME, obrigado pela por toda a assistência nas análises de espectrometria de massas, pela paciência em explicar e sempre tirar as minhas dúvidas.

Agradeço a banca examinadora, Profa. Dra. Tamara Silva Rodrigues; Msc. Lucas de Figueiredo Soveral e Profa. Dra. Mariana Maraschin. Obrigado por ter aceitado fazer parte desse trabalho, tenho certeza que suas considerações vão ser muito úteis para o aperfeiçoamento do mesmo.

Aos Professores Oscar Bruña-Romero, Patrícia Hermes Stoco, Edmundo Grisard, Glauber Wagner e Daniela Cristina De Toni por toda ajuda durante minha graduação e em considerações técnicas desse trabalho.

Aos meus colegas de laboratório e departamento Amanda; Anderson; Joana; Viviani; Yasmin; Loislene; Heloísa; Maria Eduarda; Laura; Estevão; Helena e Lucas. Vocês transformam os dias mais estressantes e desanimadores, é um privilégio ter a

amizade de vocês. Obrigado por cada cafezinho; caminhada para o RU e discussão sobre experimentos.

Aos meus colegas da graduação, em especial Beatriz; Emanuela; Guilherme; Henrique; Rafael e Thiago. Obrigado por todos os momentos nesses 5 anos.

A Fileira, Arthur; Bruno; Gustavo; Igor; João; Leonardo; Pietro; Reus; Rafaela; Isabella; Mari e Yan. Vocês são meus amigos mais antigos e sei que posso contar com vocês para qualquer coisa. Obrigado por fazerem parte da minha vida e por tornarem tudo mais especial com sua presença.

A minha amiga mais antiga, Sophia, obrigado por fazer parte da minha vida e deixá-la mais colorida e energizada. *Love you always darling.*

Aos Magikers que compartilham as noites de sextas comigo, Alex; Backes; Fred; Hubner; Juliano; Julio; Mota; Jorge; Pedro feio; Pedro lindo; Cadu; Siridakis; Igor; Andrei; Lucas; Vini e muitos outros. O Magic the Gathering se tornou meu hobby na mesma época que o início da minha graduação e é agora a minha válvula de escape do estresse da semana. Agradeço por todos os Gathering nesses anos.

Agradeço a todos que me acompanharam nessa trajetória e me auxiliaram de forma direta ou indireta! Agradeço também a UFSC; LAMEB; HU; ao CNPq e a CAPES, por todo o apoio financeiro e estrutural à realização deste trabalho.

A coisa mais misericordiosa do mundo, creio eu, é a incapacidade da mente humana de correlacionar todo o seu conteúdo. Vivemos em uma plácida ilha de ignorância em meio a mares negros de infinito, e não estávamos destinados a viajar tão longe.

- H. P. Lovecraft, "O Chamado de Cthulhu"

RESUMO

O SARS-CoV-2, agente etiológico da COVID-19, representa a maior crise de saúde pública do século XXI. Além das manifestações sistêmicas, a doença tem sido associada a impactos significativos no sistema nervoso central, contribuindo para quadros de neuroinflamação e neurodegeneração. Uma das hipóteses para a neuropatogênese envolve a ativação exacerbada de micróglia mediada pela glicoproteína *Spike* do SARS-CoV-2, resultando em um estado pró-inflamatório sustentado. Este estudo investigou os mecanismos imunometabólicos associados à ativação microglial por meio de análises de dosagem de citocinas e lipidômica em células BV-2 estimuladas com a glicoproteína *Spike*. Por meio de citometria de fluxo, foi observado aumento na produção de TNF- α , enquanto a espectrometria de massas identificou oito metabólitos modulados. As análises de fragmentação (MS/MS) detalharam alterações em lipídios das classes de esfingolipídios, glicerofosfolipídios e glicerolipídios, sugerindo que esses metabólitos podem desempenhar um papel na neuroinflamação.

Palavras-chave: COVID-19; Imunometabolismo; Lipidômica.

ABSTRACT

SARS-CoV-2, the etiological agent of COVID-19, represents the greatest public health crisis of the 21st century. In addition to systemic manifestations, the disease has been associated with significant impacts on the central nervous system, contributing to neuroinflammation and neurodegeneration. One hypothesis for the neuropathogenesis involves exacerbated microglial activation mediated by the SARS-CoV-2 Spike glycoprotein, resulting in a sustained pro-inflammatory state. This study investigated the immunometabolic mechanisms associated with microglial activation through cytokine assays and lipidomic analyses in BV-2 cells stimulated with the Spike glycoprotein. Flow cytometry revealed an increase in TNF- α production, while mass spectrometry identified eight modulated metabolites. MS/MS fragmentation analyses detailed alterations in lipids belonging to the sphingolipid, glycerophospholipid, and glycerolipid classes, suggesting that these metabolites may play a role in neuroinflammation.

Keywords: COVID-19; Immunometabolism; Lipidomic

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sumário dos resultados obtidos nas análises de anotação de lipídios.....	39
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Taxonomia e estrutura SARS-CoV-2 e Spike.....	17
Figura 2 - Representação dos diferentes estados funcionais da micróglia no SNC.....	21
Figura 3 - Representação das diferenças metabólicas da micróglia.....	24
Figura 4 - Delineamento experimental deste trabalho.....	27
Figura 5 - Concentração de TNF- α	33
Figura 6 - Gráficos de PCA e PLS-DA mostrando a separação metabólica.....	35
Figura 7 - Volcano plot do metabólitos modulados.....	37
Figura 8 - Heatmap dos níveis de expressão dos metabólitos modulados.....	38
Figura 9 - A anotação do metabólito com m/z 512,53.....	40
Figura 10 - A anotação do metabólito com m/z 554,40.....	41
Figura 11 - A anotação do metabólito com m/z 577,56.....	42
Figura 12 - A anotação do metabólito com m/z 579,58.....	43
Figura 13 - A anotação do metabólito com m/z 619,57.....	44
Figura 14 - A anotação do metabólito com m/z 699,62.....	45
Figura 15 - A anotação do metabólito com m/z 836,70.....	46
Figura 16 - A anotação do metabólito com m/z 911,50.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	<i>Angiotensin-converting enzyme 2</i>
ASM	Ácido Esfingomielinase
BHE	Barreira Hematoencefálica
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
DAMP	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DG	Diacilglicerol
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i>
ESI+	Ionização por <i>Electrospray</i> Positiva
ESI-	Ionização por <i>Electrospray</i> Negativa
FC	<i>Fold Change</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMDB	<i>Human Metabolome Database</i>
IFN- γ	Interferon-gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12p70	Interleucina-12
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
LD	<i>Lipid Droplet</i>
LPE	Lisofosfatidiletanolamina
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein 1
MERS-CoV	<i>Middle East respiratory syndrome</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PC	Fosfatidilcolina
PI	Fosfatidilinositol
PKC	Proteína Quinase C
PLS-DA	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrões

p38 MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
RDB	<i>Receptor-Binding Domain</i>
SL	Esfingolípido
SM	Esfingomielina
SNC	Sistema Nervoso Central
SARS-CoV-1	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SRAG	Síndrome Respiratória Aguda Grave
S1	Amino-terminal
S2	Carboxi-terminal
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TLR	Receptor do tipo Toll
TMPRSS2	<i>Transmembrane protease serine 2</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
α -CoV	<i>Alphacoronavirus</i>
β -CoV	<i>Betacoronavirus</i>
γ -CoV	<i>Gammacoronavirus</i>
δ -CoV	<i>Deltacoronavirus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 SARS-CoV-2 E COVID-19: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS.....	15
1.2 MICROGLIA E NEUROINFLAMAÇÃO: NEUROPATHOGENIA DA COVID-19.....	19
1.3 IMUNOMETABOLISMO: ALTERAÇÕES METABÓLICAS.....	22
2 HIPÓTESE.....	25
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 METODOLOGIA.....	27
4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	27
4.2 CULTURA CELULAR E TRATAMENTO.....	28
4.3 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	28
4.4 EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS.....	29
4.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	29
4.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE ESPECTROS DE MASSA.....	30
4.7 FRAGMENTAÇÃO MS/MS E ANOTAÇÃO DE LIPÍDEOS.....	31
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5 RESULTADOS.....	33
5.1 DOSAGEM DE CITOCINAS.....	33
5.2 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DIFERENCIALMENTE ABUNDANTES.....	34
5.3 ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS.....	39
1.1 ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS.....	40
6 DISCUSSÃO.....	49
6.1 ATIVAÇÃO MICROGLIAL: NEUROINFLAMAÇÃO E NEURODEGENERAÇÃO.....	49
6.2 METABÓLITOS MODULADOS: VISÃO GERAL.....	50
6.3 METABÓLITOS MODULADOS: ESFINGOLIPÍDIOS.....	51
6.4 METABÓLITOS MODULADOS: GLICEROFOSFOLIPÍDEOS E GLICEROLIPÍDEOS..	53
CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 SARS-CoV-2 E COVID-19: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

O vírus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) desencadeou a maior crise de saúde pública do século XXI: a pandemia da *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19). Declarada como uma emergência global pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020, a pandemia se estendeu até 5 de maio de 2023. Nesse período, foram confirmados mais de 765 milhões de casos e registradas oficialmente mais de 6,9 milhões de mortes em todo o mundo (OMS, 2024). Entre os países mais afetados, o Brasil se destacou como um dos líderes em número de óbitos, ultrapassando 600 mil mortes no primeiro ano da pandemia (Brasil, 2024). Apesar do fim oficial da emergência global da COVID-19 pela OMS, o SARS-CoV-2 permanece como um desafio no âmbito da saúde pública devido à circulação contínua do vírus, ao surgimento de variantes mais transmissíveis e aos efeitos prolongados dessa doença infecciosa (Chen et al., 2022; Davis et al., 2023).

O SARS-CoV-2 pertence a uma família viral com ampla diversidade e capacidade de infectar um amplo espectro de espécies de animais, como mamíferos, répteis e aves (Gorbalenya et al., 2020). Os vírus dessa família possuem um genoma de RNA de fita simples e de sentido positivo, característica que, aliada à alta taxa de mutação e recombinação, contribui para sua adaptabilidade e para o surgimento de zoonoses emergentes. Devido ao amplo estudo e caracterização genotípica, essa família foi subclassificada em duas, *Letovirinae* e *Orthocoronavirinae*, conforme exposto na figura 1. Sendo que esta última é composta por vírus capazes de causar doenças respiratórias, gastrointestinais, hepáticas e neurológicas (Zmasek et al., 2022; Woo et al., 2023). Além disso, possui quatro gêneros: *Alphacoronavirus* (α -CoVs), *Betacoronavirus* (β -CoVs), *Gammacoronavirus* (γ -CoVs) e *Deltacoronavirus* (δ -CoVs). Entre esses, os α -CoVs e β -CoVs recebem destaque pela capacidade de infectar seres humanos, sendo os β -CoVs particularmente reconhecidos devido à alta patogenicidade de alguns de seus membros, como o *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV), o *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 1* (SARS-CoV-1)

e, mais recentemente, o SARS-CoV-2 (Jelinek et al., 2021). Independentemente de sua classificação filogenética, os coronavírus compartilham uma estrutura viral composta por um envelope lipídico que contém quatro proteínas estruturais: a glicoproteína *Spike*, responsável pela ligação aos receptores celulares e entrada nas células hospedeiras; a proteína de Membrana, que participa da montagem do vírus; a proteína de Envelope, envolvida na patogênese; e a proteína do Nucleocapsídeo, responsável pela estabilização o RNA genômico (Yang et al., 2021).

A *Spike* é uma proteína de fusão essencial para a infecção das células hospedeiras. No caso do SARS-CoV-2, essa proteína pertence à classe I de glicoproteínas virais de fusão e possui uma estrutura homo-trimérica (Huang et al., 2020), sendo constituída por duas subunidades estruturais distintas (Figura 1): amino-terminal (S1) e carboxi-terminal (S2). A subunidade S1 contém o *Receptor-Binding Domain* (RBD), responsável pela ligação ao receptor *Angiotensin Converting Enzyme 2* (ACE2). A entrada do SARS-CoV-2 na célula ocorre por meio da interação entre o RBD da *Spike* e o receptor ACE2, seguida pela clivagem da proteína pelo co-receptor *Transmembrane Protease Serine 2* (TMPRSS2), que provoca uma mudança conformacional, permitindo a fusão do vírus com a membrana celular (Jackson et al., 2022). Contudo, a *Spike* não está envolvida apenas na infecção celular; estudos indicam que ela também pode ativar diretamente vias celulares que contribuem para a patogênese da COVID-19, independentemente da replicação viral. Mesmo isoladamente ou em sua forma solúvel, é capaz de induzir respostas imunes inflamatórias, particularmente pela ativação de receptores do sistema imunológico inato (Zhao et al., 2021). Essa ativação exacerbada resulta em um fenômeno denominado de tempestade de citocinas, um dos principais fatores de agravamento da doença (Fajgenbaum & June, 2020).

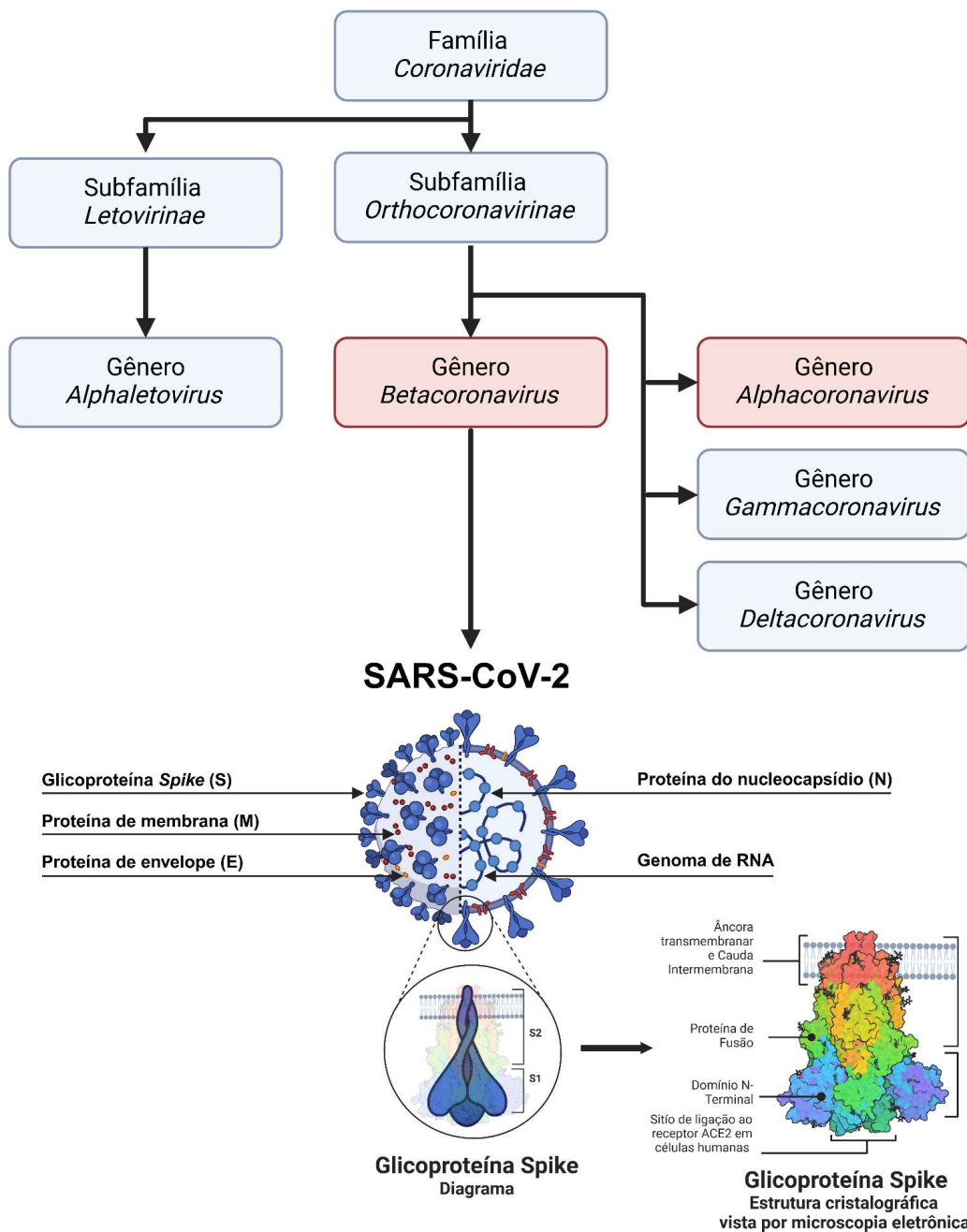


Figura 1 - Taxonomia e estrutura SARS-CoV-2 e Spike. A imagem apresenta a classificação taxonômica da família *Coronaviridae*, destacando suas subfamílias *Letovirinae* e *Orthocoronavirinae* e os respectivos gêneros. Na subfamília *Orthocoronavirinae*, estão os gêneros *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, com destaque, em vermelho, os gêneros *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus* onde se encontram os coronavírus de relevância clínica humana. Na parte inferior, a imagem apresenta a estrutura viral do SARS-CoV-2, com o envelope contendo as principais proteínas estruturais: glicoproteína Spike (S), proteína de membrana (M) e proteína de envelope (E). O detalhe ampliado evidencia a glicoproteína Spike, mostrando sua estrutura tridimensional. Fonte: Adaptado de Diana Sofia Mollocana Yanez, com modificações.

A COVID-19 apresenta como manifestações clássicas sintomas relacionados ao sistema respiratório, incluindo febre, fadiga, mialgia e tosse seca (Luo et al., 2022). Entretanto, em alguns casos, a doença pode evoluir para quadros mais graves, como a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), caracterizada por inflamação pulmonar severa, dificuldade respiratória e, em casos críticos, insuficiência respiratória (Hu et al., 2021). Essa condição, em alguns casos, ainda requer ventilação mecânica e está associada a alta mortalidade (Pfortmueller et al., 2021). Embora os sintomas respiratórios sejam os mais característicos da COVID-19, a doença também possui um caráter multissistêmico, causando complicações extrapulmonares, como tromboembolismo venoso, miocardite, lesão renal aguda e manifestações neurológicas, incluindo encefalite e acidente vascular cerebral. Nesse contexto, o comprometimento do Sistema Nervoso Central (SNC) pela COVID-19 ainda não está totalmente elucidado, assim como suas manifestações neuropsiquiátricas associadas (Azizi & Azizi, 2020; Cataldi et al., 2020; Badenoch et al., 2021; Pang et al., 2024).

A presença de manifestações neurológicas na COVID-19 reforça a compreensão de que outros β -CoVs, como o *Mouse Hepatitis Virus*, também demonstraram capacidade de infectar o SNC (Correia et al., 2020). De forma semelhante, o MERS-CoV e o SARS-CoV-1 já foram implicados em condições graves, como encefalopatia aguda e desmielinização, destacando sua neuropatogenicidade. Estudos *post mortem* em pacientes infectados pelo SARS-CoV-1 confirmaram a presença do genoma viral em células neuronais, enquanto relatos indicam a detecção do MERS-CoV em tecidos cerebrais de animais infectados (Cheng et al., 2020). Esses achados sugerem que a neuropatogenicidade pode ser uma característica comum a diversos coronavírus, incluindo o SARS-CoV-2, o que amplia a compreensão sobre o potencial de complicações neurológicas associadas a essa família viral. Ademais, o receptor ACE2 é expresso em diversas células humanas, incluindo micróglia, o que pode estar diretamente relacionado ao impacto do SARS-CoV-2 no SNC (Olajide et al., 2022).

A neuroinvasão do SARS-CoV-2 é um processo multifatorial, envolvendo diferentes vias e mecanismos que permitem ao vírus acessar e impactar o SNC (Bauer et al., 2022). Um dos principais caminhos é a via hematogênica, em que o vírus atravessa a barreira hematoencefálica (BHE), comprometida pela inflamação sistêmica, o que aumenta sua permeabilidade e facilita a entrada de partículas virais, células imunes infectadas ou mediadores inflamatórios. Além disso, o SARS-CoV-2 pode infectar diretamente as células endoteliais da BHE, devido à expressão do receptor ACE2. Outra via relevante é a via neural, na qual o vírus utiliza o transporte retrógrado axonal, especialmente pelo nervo olfatório, conectando a mucosa nasal ao SNC. Inicialmente, esse mecanismo foi associado ao sintoma de anosmia. Contudo, diferenças entre as variantes do SARS-CoV-2 e a identificação de outras rotas de neuroinvasão sugerem que esses fenômenos podem ocorrer de forma independente. A anosmia está mais associada à inflamação e aos danos no epitélio olfatório, incluindo apoptose celular e alterações estruturais, do que à presença direta do vírus no SNC. Variantes como Delta e Omicron demonstraram manter a capacidade de neuroinvasão, mas apresentaram uma incidência significativamente menor de anosmia em comparação à variante original de Wuhan, destacando o processo multifatorial dos mecanismos envolvidos (de Melo et al., 2023).

1.2 MICROGLIA E NEUROINFLAMAÇÃO: NEUROPATOGENIA DA COVID-19

A micróglia é a célula imune residente do SNC, originada de progenitores do saco vitelino durante o desenvolvimento embrionário, e que desempenha papéis fundamentais na manutenção da homeostase do SNC. A micróglia é altamente dinâmica, monitora o ambiente ao redor, remove detritos celulares, sustenta o desenvolvimento neural e mantém a integridade das conexões sinápticas (Paolicelli et al. 2022). Quando exposta a estímulos como lesões, infecções ou doenças neurodegenerativas, responde de forma plástica, ativando diferentes vias moleculares e desempenhando funções específicas, como fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios e remodelagem de redes neurais (Cherry et al. 2014). Quando a micróglia está em um estado homeostático ela promove a liberação de fatores neuroprotetores, como fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e Interleucina 10 (IL-10), o que destaca a sua função na manutenção da homeostase

neural, os quais são mostrados na figura 2. Porém, durante uma infecção, a micróglia pode adotar um fenótipo pró-inflamatório, liberando citocinas como Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6), Fator de necrose tumoral α (TNF- α), exacerbando o dano tecidual, também indicados na figura 2. As alterações entre os diferentes estados da micróglia vão além da liberação das suas moléculas, mudando também sua morfologia. Ademais, micróglia em diferentes estados de ativação expressam diferentes receptores de superfície (Smith et al., 2012).

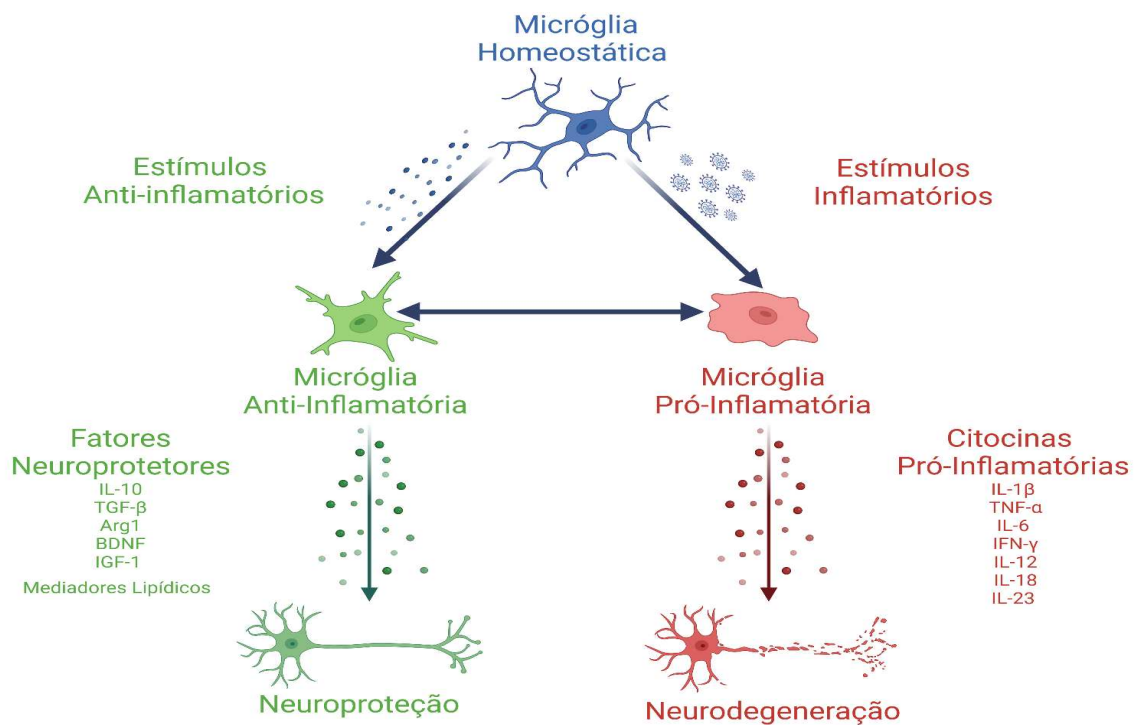


Figura 2 - Representação dos diferentes estados funcionais da micróglia no SNC. A micróglia homeostática (azul), sob estímulos inflamatórios, é induzida para o estado pró-inflamatório (vermelho), caracterizado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, que amplificam a neuroinflamação e promovem a neurodegeneração. Em contrapartida, a exposição a estímulos anti-inflamatórios induz a polarização para o estado anti-inflamatório (verde), marcado pela produção de fatores neuroprotetores, que favorecem a neuroproteção e o reparo tecidual. Fonte: elaborado pelo autor.

A neuroinflamação é desencadeada quando a micróglia reconhece sinais de perigo, que podem ser classificados como: Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) ou Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs). Os PAMPs são moléculas associadas à presença de agentes infecciosos, sendo a *Spike* considerada um PAMP (Zhao et al., 2021; Frank et al., 2023). Já os DAMPs são

moléculas liberadas por células do próprio organismo que sofreram estresse. O reconhecimento desses sinais ocorre por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores do tipo toll (TLRs). Quando ativados, os PRRs iniciam cascatas de sinalização intracelular, como a via do *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B* (NF- κ B). Essa cascata leva à produção e liberação de mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6), que contribuem para o recrutamento e ativação de outras células imunológicas. Essa liberação de mediadores inflamatórios pode desencadear um aumento exacerbado na produção de citocinas pró-inflamatórias, levando a uma resposta inflamatória descontrolada conhecida como tempestade de citocinas (Hu, Huang & Yin, 2020).

A tempestade de citocinas é caracterizada pela liberação excessiva e contínua de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) que resulta em um ciclo vicioso de amplificação inflamatória (Montazersaheb et al., 2022). No SNC, essa condição compromete a BHE, permitindo a infiltração de células imunes periféricas e amplificando ainda mais a resposta inflamatória local. Micróglias ativadas tornam-se fontes adicionais de citocinas e espécies reativas de oxigênio (EROs), causando neurotoxicidade direta e disfunção neuronal (Zanza et al., 2022). Além disso, a tempestade de citocinas pode desencadear apoptose neuronal, disfunção sináptica e inflamação crônica, contribuindo para as complicações neurológicas observadas em casos graves de COVID-19 (Soung et al., 2022).

A inflamação causada pela infecção por SARS-CoV-2 pode resultar em sintomas neurológicos que se estendem além da fase aguda, culminando na COVID Longa. Pacientes que apresentam COVID Longa frequentemente relatam fadiga crônica e comprometimento cognitivo, sintomas que podem ser atribuídos a esta resposta inflamatória exacerbada (Gutman et al., 2024). Esta ativação contínua de células imunológicas no cérebro afeta a integridade da BHE e pode resultar em disfunção sináptica e um ambiente favorável à senescência celular (Greene et al., 2024; Gutman et al., 2024). Este processo, em conjunto com a inflamação perivascular, acelera o envelhecimento cerebral. Além disso, a interação do vírus com receptores como ACE2, amplamente expressos no SNC, exacerba o

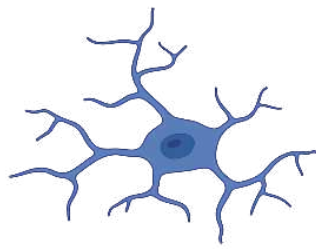
desequilíbrio entre circuitos excitatórios e inibitórios, aumentando o risco de morte celular. Estudos recentes destacam uma conexão potencial entre a COVID longa e patologias neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, uma vez que o vírus pode estimular processos como a agregação de proteínas amilóides e a hiperfosforilação da Tau, características da neurodegeneração observadas em Alzheimer (Amadoro et al., 2023; Rahmati et al., 2023; Zhao et al., 2024).

1.3 IMUNOMETABOLISMO: ALTERAÇÕES METABÓLICAS

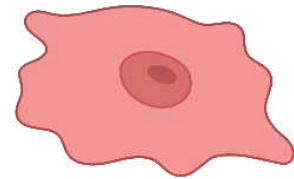
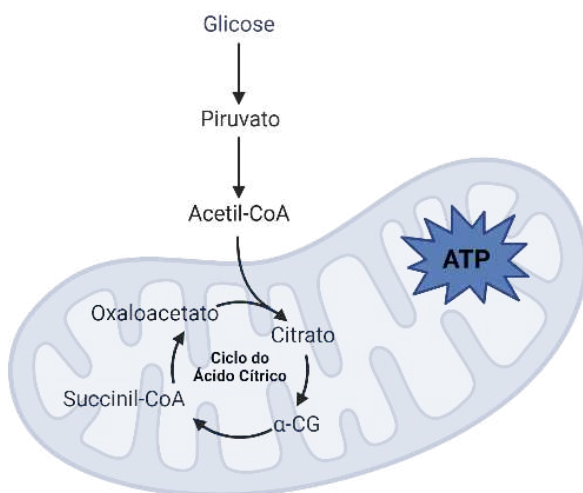
O metabolismo celular influencia a ativação e a função de células imunológicas durante a resposta inflamatória. Durante uma infecção, células imunes, como macrófagos, linfócitos T e micróglias, reprogramam seu metabolismo para atender às demandas energéticas e funcionais (O'Neill et al., 2016). Em conjunto com as mudanças celulares para suprir a demanda energética, o SARS-CoV-2 reprograma o metabolismo das células hospedeiras para atender às suas necessidades de replicação. O vírus promove mudanças específicas nas vias metabólicas, aumentando a entrada de carbono derivado da glicose no ciclo do ácido tricarboxílico por meio da ativação da enzima piruvato carboxilase, enquanto reduz a utilização oxidativa da glutamina, embora mantenha a carboxilação redutiva (Mullen et al., 2021). Essas alterações favorecem a produção de metabólitos essenciais para a replicação viral e montagem de novas partículas virais. Como consequência para a célula hospedeira, a diminuição da oxidação de glutamina pode comprometer a eficiência energética e o metabolismo redox, enquanto o aumento na utilização de glicose pela via da piruvato carboxilase pode sobrecarregar o sistema metabólico, tornando a célula mais suscetível ao estresse oxidativo (Gain et al., 2023).

Foi demonstrado que a proteína *Spike* do SARS-CoV-2 modifica a sinalização purinérgica na micróglia, aumentando a secreção de ATP e a expressão de receptores purinérgicos, o que está diretamente associado à produção de EROs (Alves et al., 2023). O excesso de EROs, resultado do estresse mitocondrial, amplifica o estresse oxidativo e provoca danos ao DNA mitocondrial, prejudicando sua replicação e ativando inflamassomas, como o NLRP3 (Pan et al., 2021; Albornoz

et al., 2022; Guarnieri et al., 2023). A ativação do inflamassoma intensifica a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18, contribuindo para a neuroinflamação. Além dessas alterações, a glicoproteína *Spike* também afeta o metabolismo lipídico da micróglia. Durante a ativação para um estado pró-inflamatório observa-se uma reprogramação metabólica para atender os novos gastos energéticos, exemplificado na Figura 3 (Folick, Koliwad & Valdearcos, 2021). Caracterizada pelo aumento na síntese de lipídios e pelo acúmulo de *lipid droplets* (LDs) (Chausse et al., 2020). Esses LDs funcionam como plataformas para a produção de mediadores inflamatórios derivados de lipídios, mas seu acúmulo excessivo compromete a capacidade da micróglia de realizar fagocitose e de promover reparo tecidual, agravando o processo inflamatório (Marschallinger et al., 2020).



Micróglia Homeostática



Micróglia Pró-Inflamatória

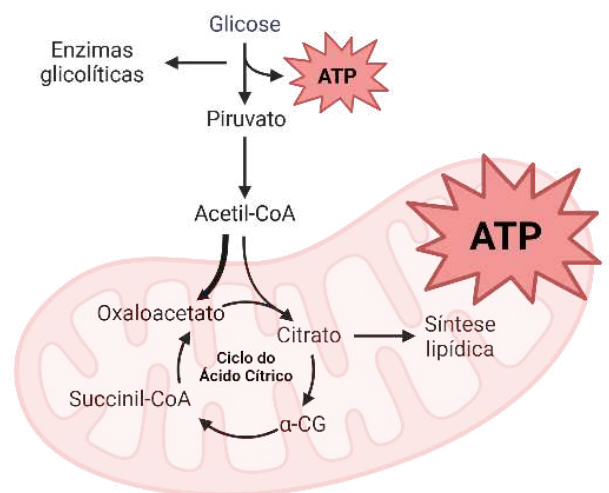


Figura 3 - Representação das diferenças metabólicas da micróglia. A micróglia homeostática (azul) utiliza o metabolismo oxidativo mitocondrial eficiente para a produção de ATP, contribuindo para a homeostase do SNC. Em contraste, a micróglia pró-inflamatória (vermelha) apresenta aumento da glicólise aeróbica e alterações no ciclo de Krebs, direcionando o metabolismo para a síntese de lipídios e produção de intermediários pró-inflamatórios, que favorecem o desenvolvimento da neuroinflamação. Fonte: elaborado pelo autor.

Investigações conduzidas no Laboratório de Imunologia Aplicada da Universidade Federal de Santa Catarina demonstraram que a ativação de células microgлияis pela glicoproteína *Spike* do SARS-CoV-2 impacta o metabolismo celular, com alterações na glicólise e na beta-oxidação lipídica (Oliveira, 2024). Observou-se um aumento nos níveis de oxaloacetato e uma redução no aconitato, indicando possíveis modulações metabólicas que afetam a atividade enzimática e a geração de intermediários para a produção de energia e precursores biossintéticos. Essas alterações foram associadas à diminuição da atividade da aconitase e à redução de carnitinas, sugerindo uma atenuação da beta-oxidação lipídica, com consequente acúmulo de lipídios e disfunção mitocondrial. Entretanto, a relação dessas alterações com vias metabólicas lipídicas ainda representa uma lacuna na pesquisa, uma vez que as análises metabólicas anteriores se concentraram em identificar metabólitos hidrofílicos. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo identificar os lipídios modulados pela *Spike* e investigar as vias metabólicas lipídicas potencialmente alteradas em células microgлияis, ampliando o entendimento sobre o impacto metabólico dessa glicoproteína no SNC.

2 HIPÓTESE

A glicoproteína *Spike* do vírus SARS-CoV-2 ativa as células microgliais para um estado pró-inflamatório e modula seu metabolismo lipídico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar alterações do metabolismo lipídico associadas ao processo inflamatório causado pela estimulação com a glicoproteína *Spike* do vírus SARS-CoV-2 em células da microglia da linhagem BV-2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a ativação de células microgliais pela glicoproteína *Spike* através da produção de citocinas pró-inflamatórias.
- b) Extrair e identificar lipídios modulados pela estimulação com a glicoproteína *Spike* utilizando espectrometria de massas.
- c) Investigar vias metabólicas potencialmente alteradas pela estimulação com a glicoproteínas *Spike*, com foco na biossíntese e degradação lipídica

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

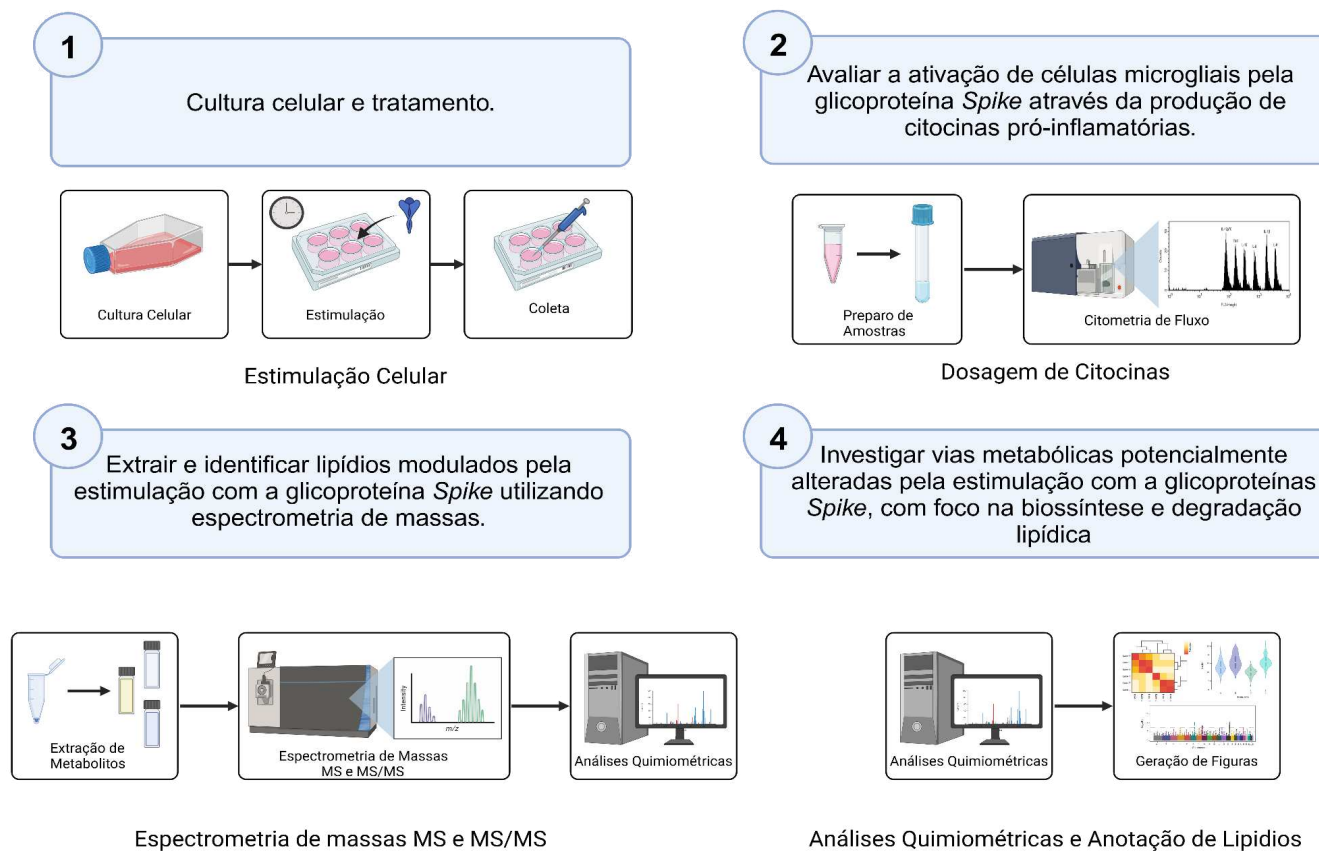


Figura 4 - Delineamento experimental deste trabalho. Fonte: elaborado pelo autor.

4.2 CULTURA CELULAR E TRATAMENTO

Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando a linhagem celular BV-2 (código 0356, Banco de Células do Rio de Janeiro), derivada de micróglia de camundongos C57BL/6 e imortalizada por transfecção viral dos oncogenes v-raf e v-myc, preservando características morfológicas e funcionais de macrófagos murinos (BLASI et al., 1990). As células foram cultivadas em DMEM High Glucose (HyClone, EUA), suplementado com 10 mM de HEPES, 1,0 mM de piruvato de sódio, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio, 1,0 U/mL de penicilina/estreptomicina, 0,125 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich) e 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, Brasil), em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Após atingirem a confluência, as células foram plaqueadas e incubadas por 24 horas para adesão celular. O meio foi renovado e as células foram divididas em três grupos experimentais, em sextuplicada. Tratado com a glicoproteína *Spike* recombinante (3 µg/mL) por 60 horas; tratado com lipopolissacarídeo (LPS) (1 µg/mL) por 60 horas e grupo controle, conforme padronizado por Oliveira (2024). Quatro horas antes do término, o sobrenadante foi coletado e o meio foi trocado para DMEM sem soro fetal bovino. Após esse período, as células foram coletadas para análises posteriores.

4.3 DOSAGEM DE CITOCINAS

A secreção de citocinas foi analisada por meio do *CBA Mouse Inflammation kit* (BD Pharmingen, EUA). Para isso, o sobrenadante das células estimuladas com a proteína S foi incubado com microesferas revestidas com anticorpos contra TNF-α, IL-6, MCP-1, IL-10, IL-12p70 ou IFN-γ. Em seguida, as microesferas foram conjugadas ao fluorocromo ficoeritrina, de acordo com as recomendações da fabricante. A aquisição de dados foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Pharmingen, EUA), previamente calibrado e com compensação fluorocromática adequada. Análises de intensidade de fluorescência, quantificação e demais parâmetros foram realizadas através do *software* FCAP Array™ v. 3.0 (BD Pharmingen, EUA).

4.4 EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS

A extração foi realizada utilizando uma adaptação do método de Nakayasu e colaboradores (2016). Os *pellets* celulares foram ressuspensos em água, seguida da adição de cinco volumes de uma mistura de clorofórmio e metanol na proporção de 2:1 (v/v), previamente resfriada a -20°C. As amostras foram incubadas em gelo por 5 minutos, agitadas em vórtex por 1 minuto e, em seguida, centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C para promover a separação das fases. Após a centrifugação, a fase aquosa, contendo metabólitos hidrofílicos, e a fase orgânica, rica em lipídios, foram cuidadosamente coletadas separadamente para análises posteriores. As interfaces proteicas foram submetidas a uma lavagem adicional com 1 mL de metanol resfriado, agitadas em vórtex e centrifugadas novamente sob as mesmas condições. As três fases resultantes (aquosa, orgânica e proteica) foram secas em centrifugador a vácuo *Concentrator plus* (Eppendorf, Alemanha). Para a etapa de normalização foi executada a quantificação de proteínas por meio do ensaio colorimétrico Pierce™ *BCA Protein Assay* (Thermo Fisher, EUA).

4.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As amostras provenientes da fase orgânica e o branco da extração foram reconstituídas em 200 µL de uma mistura de solventes composto por 2-propanol/acetonitrila/água (ISO/ACN/H₂O, 90:8:2 v/v/v; 10 mM acetato de amônio; 0,1% ácido fórmico), sonicadas e agitadas em vortex por 30 segundos e mantidas no gelo. Em seguida, para a análise de espectrometria de massas, 50 µL de cada amostra foi infundida diretamente em um espectrômetro de massas *Amazon X IonTrap* (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando uma bomba de infusão e uma seringa *Hamilton* de vidro de 250 µL através de uma fonte de ionização por *eletrospray* (ESI). A taxa de fluxo de infusão foi de 3 µL/min e a aquisição dos dados foi realizada durante um total de 2,5 min no modo positivo (ESI+) e no modo negativo (ESI-) sequencialmente. Os espectros foram adquiridos após 30 segundos do início da infusão e, inicialmente, com a ionização no modo positivo com voltagem de capilar 4500 V, *offset* final de -500 V, A pressão do nebulizador de nitrogênio (N₂) de 0,4 e fluxo de gás seco de 4 L·min⁻¹ a 200 °C, tune de m/z para 600. Após 1 min

de aquisição no modo ESI+, o método alternou para o modo ESI- reduzindo a voltagem do capilar para -4000 V, offset final de 500 V, mantendo a pressão do nebulizador de N₂ de 0,4 e fluxo de gás seco de 4 L·min⁻¹ a 200 °C. Após 20 segundos, os espectros foram adquiridos por mais 1 min. Os espectros de massas foram adquiridos com o *software trapControl v.7.2* (Bruker Daltonics, Alemanha) na faixa de m/z 50 a 2000 e as amostras infundidas de forma randomizada com limpeza completa do equipamento entre cada infusão. Infusões de branco da extração e branco do solvente de diluição também foram realizadas e os espectros adquiridos da mesma forma que as amostras.

4.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE ESPECTROS DE MASSA

Para o estudo de classificação/caracterização e identificação de possíveis marcadores, os dados brutos foram inicialmente processados e convertidos com o *software DataAnalysis v4.3* (Bruker Daltonics, Alemanha) para o formato de saída mzXML. As impressões digitais de DI-ESI-*IonTrap*-MS foram transformadas em matrizes de dados (intensidades de sinal de íons organizadas em função das amostras nas colunas e variáveis m/z nas linhas) utilizando o *software mzMine 4.2.0* (Schimid et al., 2013). No *software* foi utilizada a função *mzWizard*, onde padrões utilizados na ferramenta foram configurados para um ensaio de injeção direta de baixa resolução e uma aquisição dependente de dados.

A primeira etapa consistiu na detecção de analitos. Foram definidos um intervalo de tempo de pico de 0,04 – 2,17 min, a polaridade correspondente, um nível de ruído de 3.0E6. Em seguida, os sinais falsos foram removidos com o filtro *FTMS shoulder peak*, ajustando uma função de modelo de pico Gaussiano e uma resolução de massa padrão do programa. Para extrair os cromatogramas de íons das massas detectadas continuamente ao longo de um tempo determinado foi utilizada a função *chromatogram builder*, definindo o tamanho mínimo do grupo de varredura em 5 e seguindo as definições do programa. O alinhamento das massas detectadas entre as amostras analisadas foi realizado utilizando-se a função *Join Aligner* seguindo os padrões do programa. Por fim, as massas encontradas na amostra, branco da extração e branco do solvente foram subtraídas pela função

Feature List e *Blank Subtraction*, a lista final de íons alinhados foi exportada no formato CSV para realização da análise quimiométrica subsequente. As dimensões das matrizes de dados obtidas foram 12×254 e 12×353 para os modos de ionização negativa e positiva, respectivamente.

Os dados do arquivo CSV foram analisados em *software* online gratuito *MetaboAnalyst 6.0* (Pang et al., 2024), verificados quanto à integridade, filtrados pelo intervalo interquartil, normalizados pela mediana, transformados por raiz cúbica e escalonados por *Range Scaling*. O *MetaboAnalyst* foi utilizado para confirmar a diferença entre os grupos, por meio de um PLS-DA. Para filtrar mudanças significativas nos níveis lipídicos, foi realizado um *volcano plot* e um *heatmap* para visualizar a expressão relativa destes metabólitos.

4.7 FRAGMENTAÇÃO MS/MS E ANOTAÇÃO DE LIPÍDEOS

Para tentativa de identificação das espécies lipídicas foram realizados experimentos de dissociação induzida por colisão (CID), das m/z diferenciais, para análise dos padrões de fragmentação no modo manual MS/MS direcionada para cada molécula extraída nas análises estatísticas. Uma solução com a mistura de 10 μL de cada uma das amostras foi preparada para cada grupo. As amostras foram novamente introduzidas no espectrômetro de massas em uma taxa de fluxo de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ nas mesmas condições de ionização anteriores. O CID foi empregado com energia de colisão ajustada para cada molécula.

Com os dados de CID adquiridos, foi realizada a anotação de possíveis lipídios. Presumiu-se que um pico de sinal específico seja provavelmente uma combinação de várias espécies lipídicas devido às limitações já indicadas do método de análise. A anotação foi baseada na m/z com erro de 0,05 Da e, adicionalmente, em dados de fragmentação do ícone mais predominante por meio de análises de MS/MS e comparação com dados disponíveis na literatura (Han et al., 2016). Três bancos de dados foram utilizados para as buscas: *Swisslipids* (Aimo et al., 2015); *LipidMaps* (O'Donnell et al., 2019) e/ou *Human Metabolome Database* (HMDB) (Wishart et al., 2022). Opções de adutos além de $[M+H]^+$ foram

[M+Na]⁺, [M+NH₄]⁺ e [M+H-H₂O]⁺ para o modo positivo e [M-H]⁻ e [M-OAc]⁻ para o modo negativo

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparações entre dois grupos foi utilizado o teste t de *Student*. Para comparações envolvendo mais de dois grupos, empregou-se a análise de variância unidimensional (*one-way* ANOVA). As análises pelo teste t de *Student* foram conduzidas com nível de significância estabelecido em $p < 0,01$. Enquanto os testes estatísticos por *one-way* ANOVA o nível de significância foi definido como $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 DOSAGEM DE CITOCINAS

Os resultados apresentados na Figura 5 demonstram que a estimulação das células microgliais BV-2 com a proteína *Spike* do SARS-CoV-2 resultou em um aumento nos níveis de TNF- α em relação ao controle, indicando que a *Spike* é capaz de induzir uma resposta inflamatória inicial. Em contraste, o grupo tratado com LPS exibiu uma elevação nos níveis de TNF- α em comparação a ambos os grupos, corroborando sua eficácia como controle positivo. As demais citocinas testadas pelo *kit* não mostraram diferença estatística entre o controle positivo e as células tratadas.

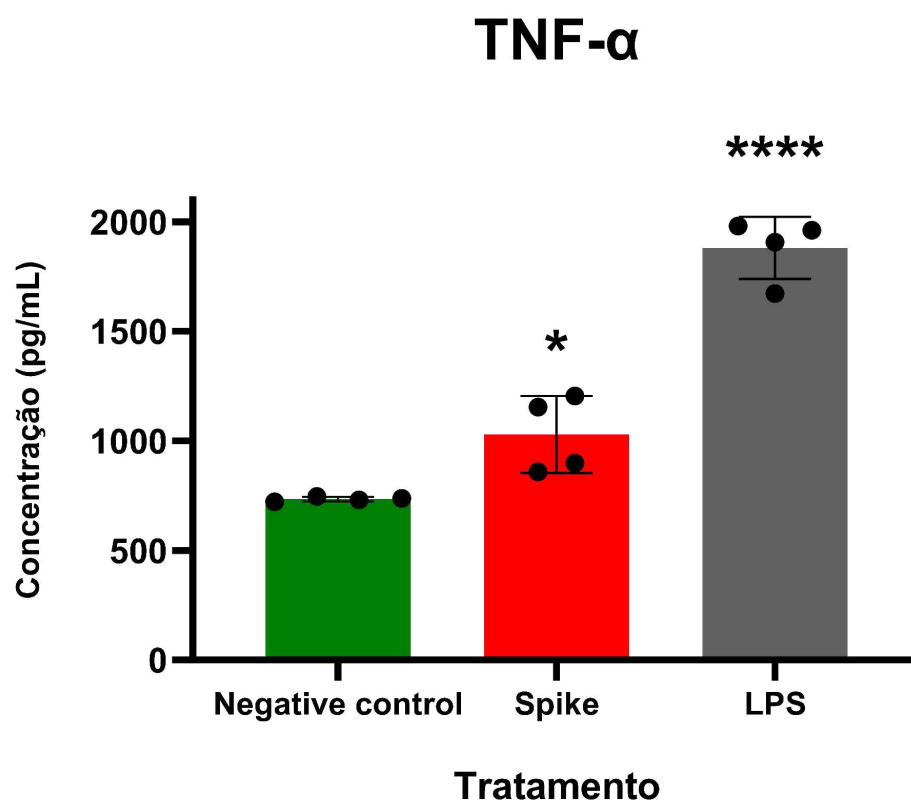


Figura 5 - Concentração de TNF- α no sobrenadante de células BV-2 tratadas com a proteína *Spike* do SARS-CoV-2. Células BV-2 foram estimuladas com *Spike* e LPS. Após 60 horas, o sobrenadante foi coletado para avaliação da concentração de TNF- α por citometria de fluxo. Mostrando uma diferença entre os grupos. Os marcadores de significância estatística (* e ****) indicam diferença significativa entre as condições, com $p < 0,05$ e $p < 0,001$.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DIFERENCIALMENTE ABUNDANTES

Foi realizada uma análise de PCA (*Principal Component Analysis*) para investigar a distribuição global das amostras metabólicas entre os grupos controle (C) e estimulado pela Spike (S). O gráfico A (Figura 6) revelou que os dois primeiros componentes principais, PC1 e PC2, explicaram 16,7% e 13,8% da variância total dos dados, respectivamente. Cada ponto no gráfico representa uma amostra individual, com o grupo C em verde e o grupo S em vermelho. Embora haja certa sobreposição entre os grupos, observa-se uma tendência de separação, sugerindo a presença de diferenças metabólicas entre os grupos controle e estimulado pela Spike. Para confirmar a separação dos perfis metabólicos foi realizada uma análise de PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*). Ao contrário do PCA, que é uma técnica não supervisionada, o PLS-DA utiliza informações dos grupos pré-definidos para maximizar a separação entre eles, facilitando a identificação de padrões ou diferenças. O gráfico B (Figura 6) revelou que os dois primeiros componentes latentes, Componente 1 e Componente 2, explicaram, respectivamente, 11% e 14,1% da variância total dos dados. As elipses em torno dos grupos indicam intervalos de confiança de 95%, representando a variação metabólica interna de cada grupo. A separação evidente entre as elipses dos grupos indica que o estímulo pela *Spike* induziu alterações metabólicas significativas, levando a perfis metabólicos distintos entre os grupos C e S, e ausência de sobreposição entre as amostras dos dois grupos reforça a consistência das alterações metabólicas observadas.

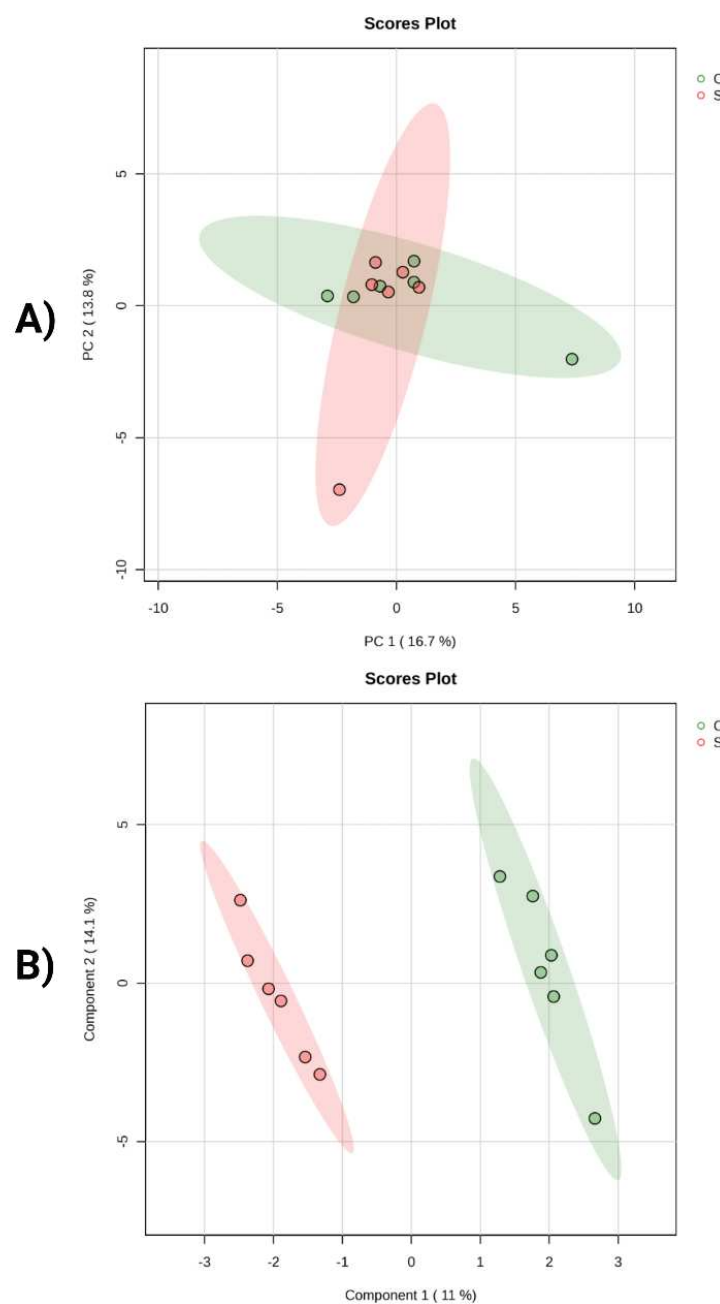


Figura 6 - Gráficos de PCA e PLS-DA mostrando a separação metabólica. Células foram estimuladas com Spike. Após 60 horas, foram coletadas para avaliação dos metabólitos por espectrometria de massas. O grupo controle (C, em verde) e estimulado pela *Spike* (S, em vermelho). Em A o gráfico de PCA mostrando sobreposição no perfil metabólico dos dois grupos. Em B o gráfico de PLS-DA mostrando separação entre os grupos após análise de discriminação supervisionada.

A análise do *volcano plot* foi realizada para identificar metabólitos diferencialmente expressos entre os grupos S e C (Figura 7). Através da relação entre o $\log_2(\text{Fold Change, FC})$ (eixo X) e o $-\log_{10}(\text{p-valor})$ (eixo Y), foram evidenciadas alterações significativas em oito metabólitos, sendo dois destes identificados a partir do modo de ionização negativa (554,41 e 911,51). Os metabólitos 512,53 (*Fold Change*: 1,79) e 836,7 (*FC*: 1,31) foram os únicos que apresentaram aumento significativo na expressão. Esses metabólitos demonstraram uma elevação consistente no grupo S em relação ao grupo C. Por outro lado, a maioria dos metabólitos modulados apresentou uma redução na expressão no grupo S. Os metabólitos 577,56 (*FC*: 0,75), 619,57 (*FC*: 0,68) e 554,41 (*FC*: 0,66) destacaram-se como os mais reduzidos, enquanto m/z 911,51 (*FC*: 0,70), 699,63 (*FC*: 0,79) e 579,58 (*FC*: 0,83) também exibiram reduções significativas.

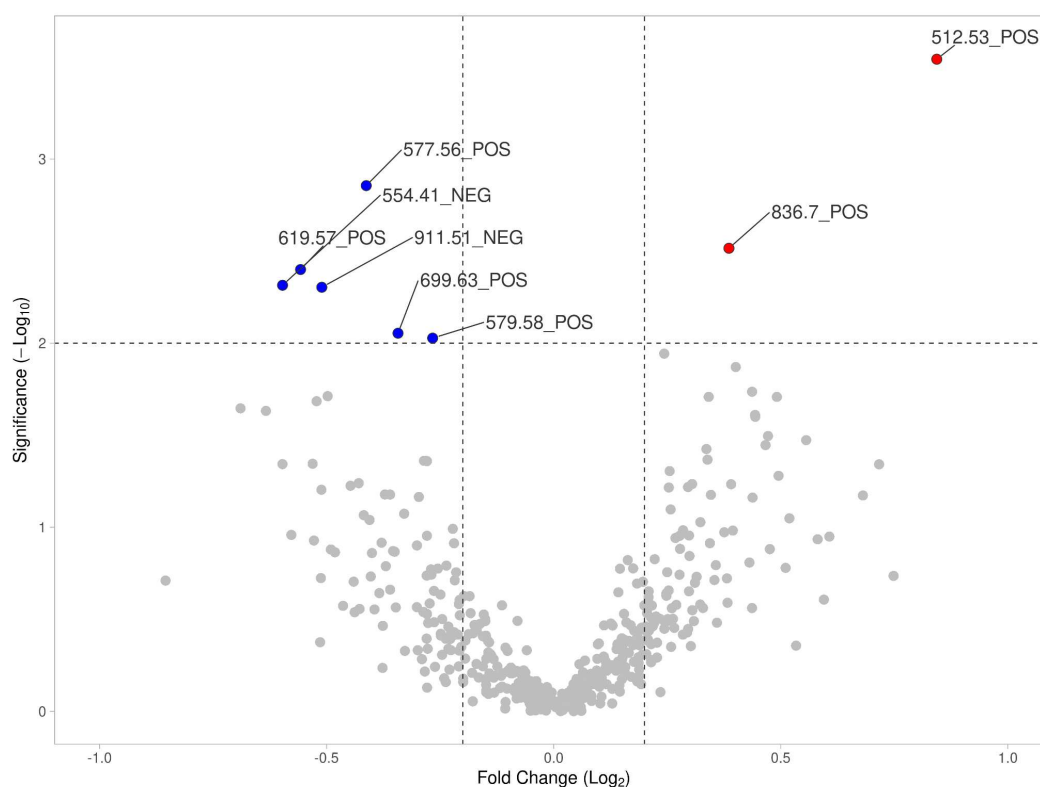


Figura 7 - Volcano plot do metabolitos modulados. Células foram estimuladas com Spike. Após 60 horas, foram coletadas para avaliação dos metabólitos por espectrometria de massas. Alteração de expressão ($\log_2(\text{Fold Change})$, eixo X) e sua significância estatística ($-\log_{10}(\text{p-valor})$, eixo Y). Os pontos em vermelho representam os metabólitos com aumento significativo na expressão (2 metabólitos), enquanto os pontos em azul indicam os metabólitos com redução significativa (6 metabólitos). Os pontos em cinza correspondem aos metabólitos sem alterações significativas (601 metabólitos).

Os padrões de expressão metabólica entre os grupos C e S foram analisados e visualizados por meio de um *heatmap* (Figura 8), reforçando os resultados previamente identificados no *volcano plot*. A análise confirmou que os oito metabólitos diferencialmente expressos apresentaram alterações consistentes com os padrões observados anteriormente. Os níveis normalizados de expressão, representados pelas cores do *heatmap*, mostraram que os metabólitos 579,58; 577,56; 699,63; 911,51; 619,57 e 554,41 apresentaram maior expressão no grupo C, evidenciado pelos tons de vermelho, e indicando sua redução no grupo S. Em contrapartida, os metabólitos 512,53 e 836,7 exibiram maior expressão no grupo S, corroborando os resultados observados no *volcano plot*. Além disso, a clusterização das amostras no *heatmap* demonstrou uma separação clara e consistente entre os grupos, sem sobreposição entre as amostras. Essa distinção reflete que os padrões metabólicos de cada grupo são suficientemente únicos, validando a qualidade dos dados. A clara separação entre os *clusters* reforça a confiabilidade das alterações metabólicas identificadas e destaca a relevância dos metabólitos modulados no contexto do trabalho.

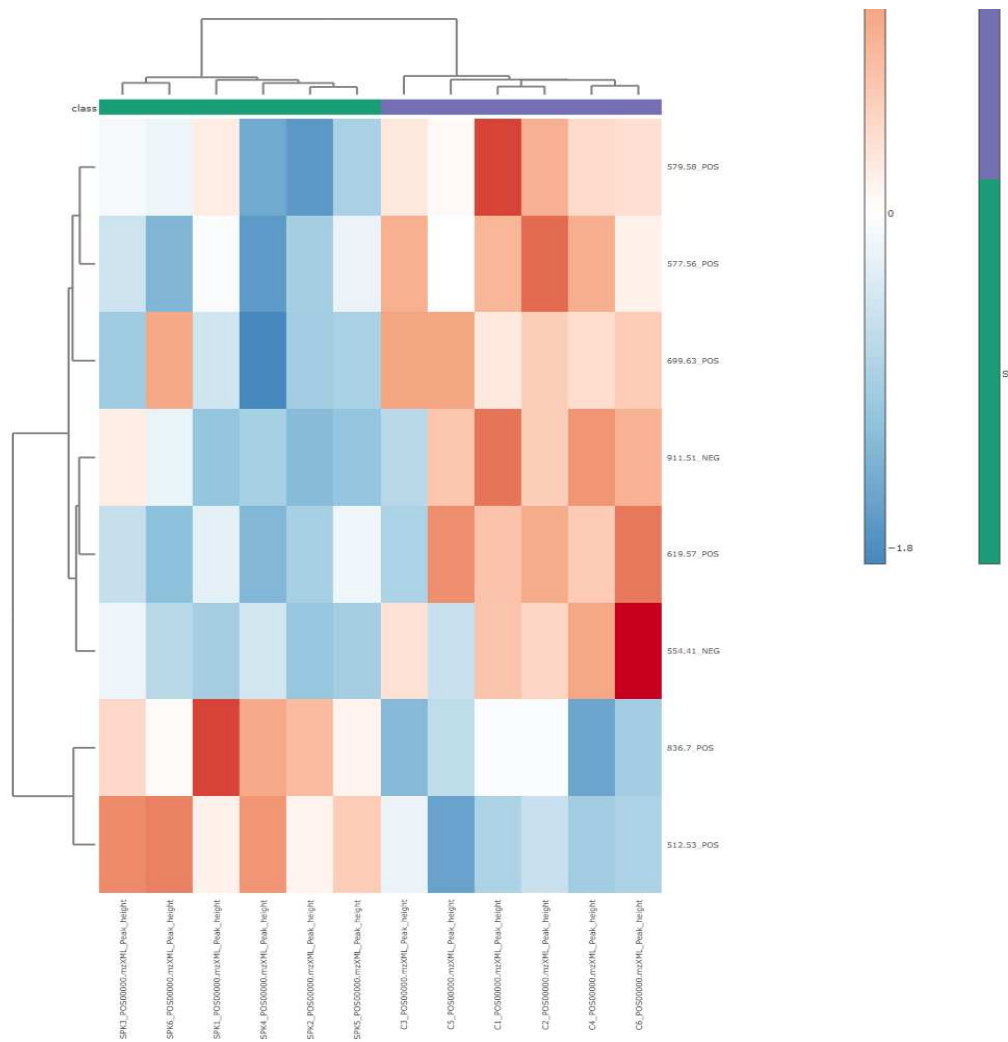
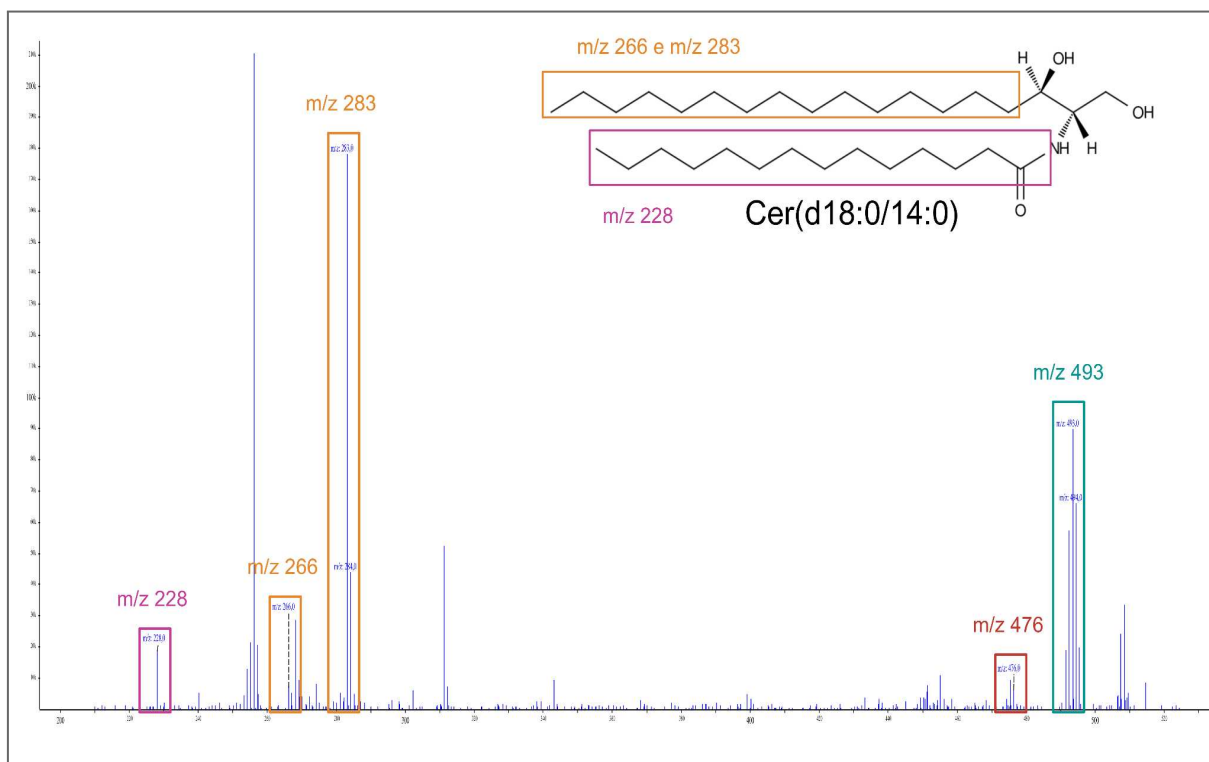


Figura 8 - Heatmap dos níveis de expressão dos metabólitos diferencialmente modulados. Realizado entre os oito metabólitos presentes nos grupos controle (C) e estimulado pela *Spike* (S). Tons de azul indicam redução na expressão, enquanto tons de vermelho representam aumento.

5.3 ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS

A anotação dos metabólitos foi realizada a partir da comparação dos dados obtidos do CID e bancos de dados disponíveis, utilizando padrões de fragmentação característicos observados na literatura. A análise considerou as massas exatas e os erros de ppm, aliada à identificação de fragmentos específicos que confirmaram a estrutura química dos metabólitos. As espécies encontradas são sugestões que são corroboradas pelas anotações.

m/z	Classe	m/z teórico	Erro de ppm	Possível espécie	<i>Fold Change</i>	Expressão no grupo tratado com <i>Spike</i>
512,53	Esfingolípido Ceramida	512,50	58	Cer(d18:0/14:0)	1,79	Aumentado
554, 41	Glicerofosfolípido Lisofosfatidiletanolamina	554,38	36	LPE(O/20:0)	0,66	Reduzido
577,56	Glicerolípido Diacilglicerol	577,52	69	DG(16:0/18:1)	0,75	Reduzido
579,58	Glicerolípido Diacilglicerol	579,58	69	DG(16:0/18:0)	0,83	Reduzido
619,57	Glicerolípido Diacilglicerol	619,56	16	DG(18:0/16:0)	0,68	Reduzido
699,63	Esfingolípido Esfingomielina	699,58	57	SM(d18:1/17:0)	0,79	Reduzido
836,7	Glicerofosfolípido Fosfatidilcolina	836,7	0	PC(20:1/20:4)	1,31	Aumentado
911,51	Glicerofosfolípido Fosfatidilinositol	911,58	-87	PI(18:0/17:0)	0,70	Reduzido

Tabela 1 - Sumário dos resultados obtidos nas análises de anotação de lipídios.

1.1 ANOTAÇÃO DE METABÓLITOS

Figura 9 - A anotação do metabólito com m/z 512,53. Células foram estimuladas com Spike. Após 60 horas, foram coletadas para avaliação dos metabólitos por CID. Eixo X representa a razão massa/carga (m/z) e o eixo Y a intensidade relativa. O metabólito foi atribuído a ceramida Cer(18:0/14:0), baseado nos picos de perda de uma molécula de água (m/z 493, destacado em verde) e de duas moléculas de água (m/z 476, destacado em vermelho). A base esfingóide d18:0 foi confirmada pelos fragmentos em m/z 266 e 283 (destacados em laranja), enquanto a cauda 14:0 foi confirmada pelo pico em m/z 228 (destacado em rosa).

A análise do metabólito de m/z 512,53 (m/z teórico 512.50, erro 58 ppm) permitiu sua identificação como uma ceramida, Cer(18:0/14:0) (Figura 9). Com base nos padrões de fragmentação típicos observados em CID. Sob condições ácidas no modo positivo, as ceramidas formam íons protonados $[M+H]^+$, que são instáveis e perdem rapidamente uma molécula de água, formando o fragmento predominante $[M+H-18]^+$ (m/z 493). Esse fragmento pode sofrer a perda adicional de uma segunda molécula de água, gerando o íon $[M+H-36]^+$ (m/z 476). A fragmentação também mostrou íons característicos da base esfingóide presente na molécula, esses fragmentos estão localizados em m/z 266 e 283 (d18:0, esfinganina). A cauda 14:0 foi confirmada pelo fragmento em m/z 228, correspondente à quebra característica

de sua estrutura. Para confirmar essa análise, a fragmentação foi comparada aos dados disponíveis nos bancos de dados *LipidMaps* e HMDB, sendo que os picos de fragmentação observados apresentaram correspondência com os registrados nestes bancos de dados.

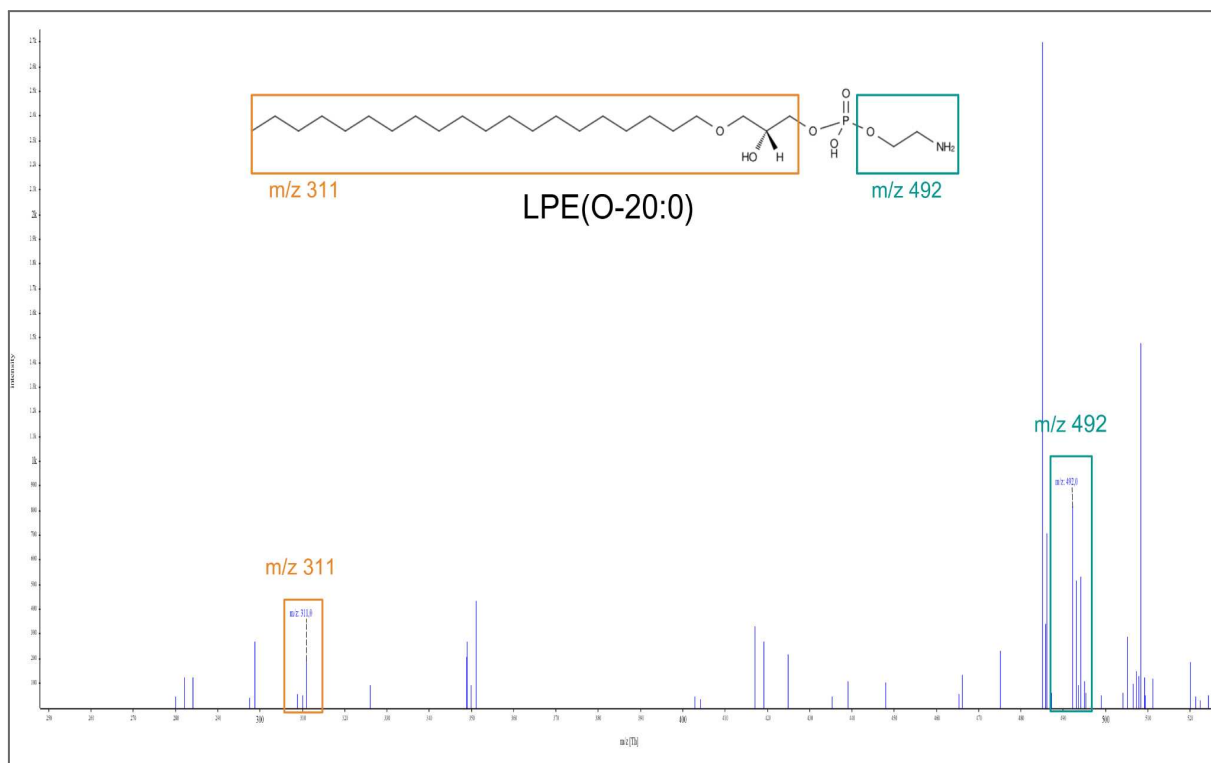


Figura 10 - A anotação do metabólito com m/z 554,40. Células foram estimuladas com Spike. Após 60 horas, foram coletadas para avaliação dos metabólitos por CID. Eixo X representa a razão massa/carga (m/z) e o eixo Y a intensidade relativa. O metabólito foi atribuído a lisofosfatidiletanolamina, LPE(O-20:0). A identificação foi baseada nos picos de fragmentação característicos, como o fragmento em m/z 311, associado à cadeia lateral do ácido graxo FA20:0 (destacado em laranja), e o fragmento em m/z 492, referente à perda da etanolamina (destacado em verde).

A análise do metabólito com m/z 554,40 (m/z teórico 554,38, erro de 36 ppm) identificou-o como uma lisofosfatidiletanolamina, especificamente LPE(O-20:0) [M+OAc]⁻ (Figura 10). No modo de ionização negativa, os espectros de fragmentação mostraram sinais característicos, sendo observada a perda neutra da molécula de etanolamina, resultando no fragmento em m/z 492 ([M+OAc-62]⁻). O fragmento em m/z 311 foi associado à cadeia lateral do ácido graxo FA20:0. Esses padrões de fragmentação reforçam a identificação do metabólito como LPE(O-20:0),

e sua análise foi consistente com dados de referência disponíveis no banco de dados *Swisslipids*.

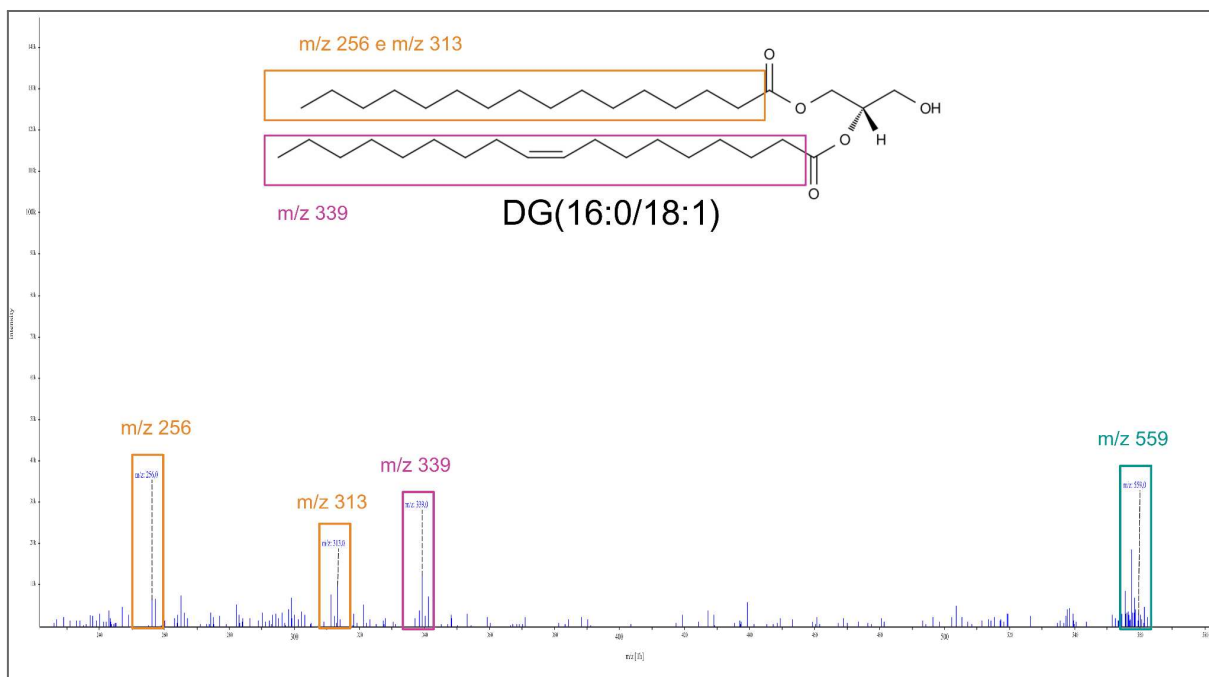


Figura 11 - A anotação do metabólito com m/z 577,56. Células foram estimuladas com Spike. Após 60 horas, foram coletadas para avaliação dos metabólitos por CID. Eixo X representa a razão massa/carga (m/z) e o eixo Y a intensidade relativa. O metabólito foi atribuído ao diacilglicerol DG(16:0/18:1). Perda de uma molécula de água (m/z 559, destacado em verde). O fragmento em m/z 339 (destacado em rosa) corresponde à perda do ácido graxo FA18:1, enquanto os fragmentos em m/z 256 e 313 (destacados em laranja) indicam a presença do ácido graxo FA16:0.

A análise do metabólito de m/z 577,56 (m/z teórico 577,52, erro de 69 ppm) permitiu sua identificação como um diacilglicerol, DG(34:1), com base nos padrões de fragmentação característicos observados (Figura 11). O metabólito foi detectado com o íon $[M+H-18]^+$ (m/z 559), evidenciando a perda de uma molécula de água, típica de glicerolípídios. A fragmentação revelou fragmentos em m/z 256 e 313, associados ao ácido graxo FA16:0 (ácido palmítico), e em m/z 339, característico do ácido graxo FA18:1 (ácido oleico). Outro fragmento, como m/z 284 (FA18:0), também foi observado. Novamente, como meio de confirmação, os fragmentos foram comparados às plataformas HMDB e *LipidMaps*.

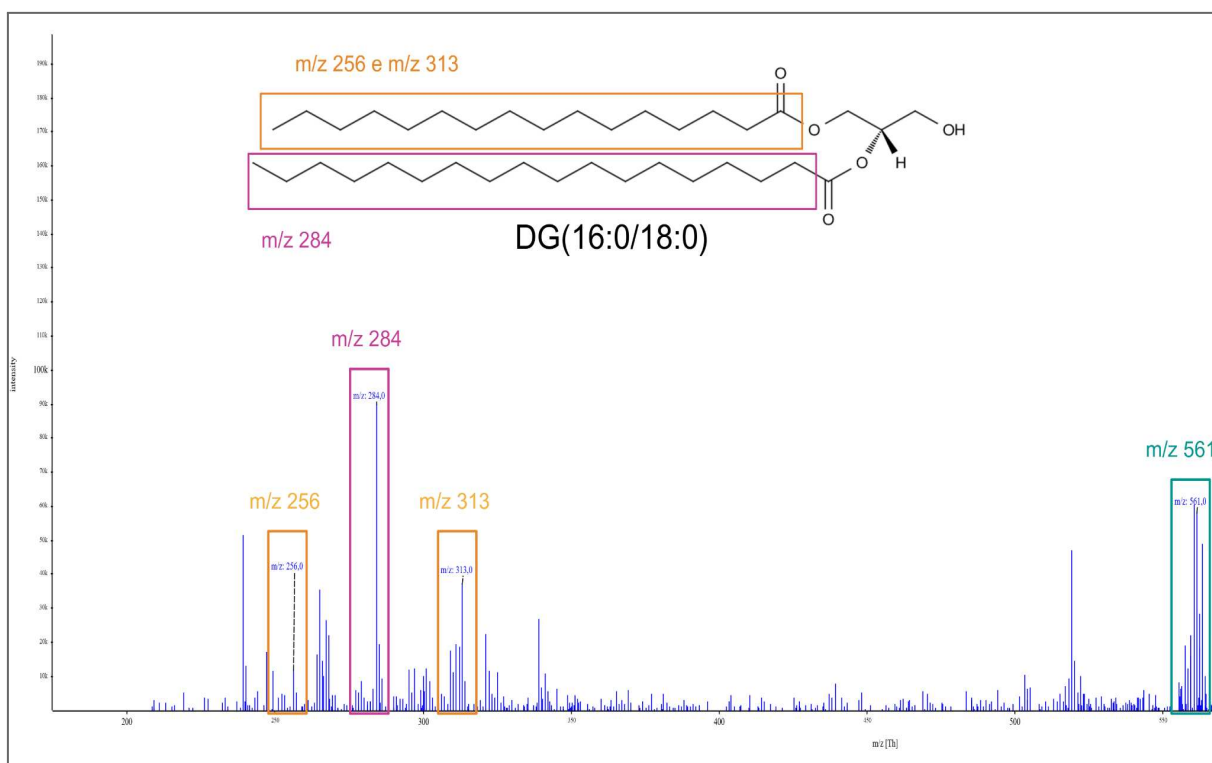


Figura 12 - A anotação do metabólito com m/z 579,58. Células foram estimuladas com Spike. Após 60 horas, foram coletadas para avaliação dos metabólitos por CID. Eixo X representa a razão massa/carga (m/z) e o eixo Y a intensidade relativa. O metabólito foi atribuído ao diacilglicerol DG(16:0/18:0). Perda de uma molécula de água (m/z 561, destacado em verde). O fragmento em m/z 284 (destacado em rosa) corresponde à perda do ácido graxo FA18:0, enquanto os fragmentos em m/z 256 e 313 (destacados em laranja) indicam a presença do ácido graxo FA16:0.

A análise do metabólito com m/z 579,58 (m/z teórico 579,54, erro de 69 ppm) permitiu sua identificação como um diacilglicerol, DG(34:0) (Figura 12), diferindo do metabólito anterior por não apresentar insaturações na cadeia carbônica. Foi detectado o íon $[M+H-18]^+$ em m/z 561, evidenciando a perda de uma molécula de água. Os padrões de fragmentação observados incluem os fragmentos em m/z 256 e m/z 313, característicos do ácido graxo FA16:0, e o fragmento em m/z 284, associado ao ácido graxo FA18:0 (ácido esteárico). Os fragmentos foram comparados com outros metabólitos nos bancos de dados *LipidMaps* e *HMDB*, confirmando sua identificação.

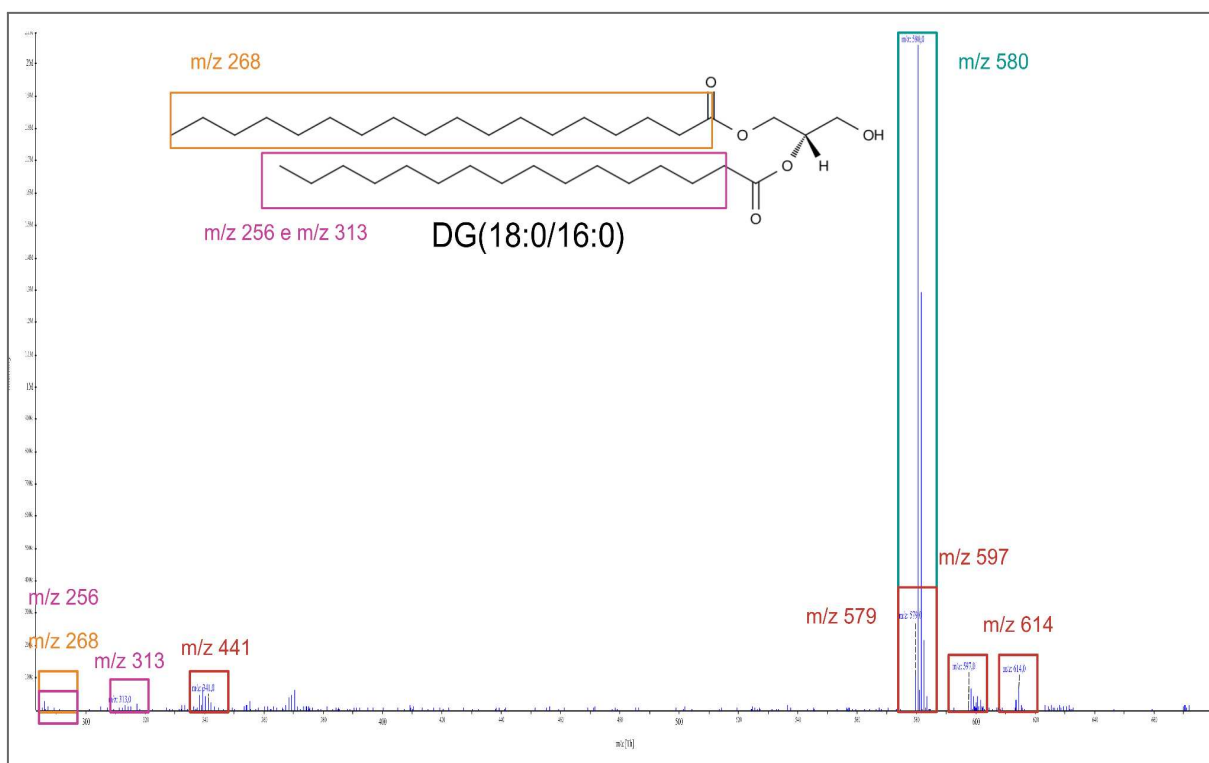


Figura 13 - A anotação do metabólito com m/z 619,57. Células foram estimuladas com Spike. Após 60 horas, foram coletadas para avaliação dos metabólitos por CID. Eixo X representa a razão massa/carga (m/z) e o eixo Y a intensidade relativa. O metabólito foi atribuído ao diacilglicerol DG(18:0/16:0). A perda de sódio e a subsequente perda de uma molécula de água (m/z 580, destacado em verde) foram observadas. O fragmento em m/z 268 (destacado em laranja) corresponde à perda do ácido graxo FA18:0, enquanto o fragmento em m/z 256 e m/z 313 (destacado em rosa) indica a presença do ácido graxo FA16:0. Ademais fragmentos encontrados em comparação com a fragmentação no banco de dados HMDB m/z 341; m/z 579 e m/z 614 destacados em vermelho.

A análise do metabólito com m/z 619,57 (m/z teórico 619.56, erro 16 ppm) permitiu sua identificação como outro diacilglicerol, possivelmente DG(34:0) (Figura 13). O metabólito foi detectado como o íon aduzido ao sódio $[M+Na]^+$. A perda de sódio (-22) resultou no fragmento m/z 597 e foi detectado o íon $[M+H-18]^+$ em m/z 580, evidenciando a perda de uma molécula de água. Ademais, os padrões de fragmentação observados incluem fragmentos em m/z 256 e m/z 313, que são característicos do ácido graxo FA16:0, e um fragmento em m/z 284, indicativo do ácido graxo FA18:0. Como os metabólitos diacilgliceróis encontrados são muito similares, esses picos são indicativos que corroboram na sua identificação. Os fragmentos adicionais m/z 341; m/z 579 e m/z 614 são fragmentos encontrados em

comparação com o banco de dados HMDB, esses foram encontrados em adição aos anteriores na plataforma *LipidMaps*, reforçando a confirmação.

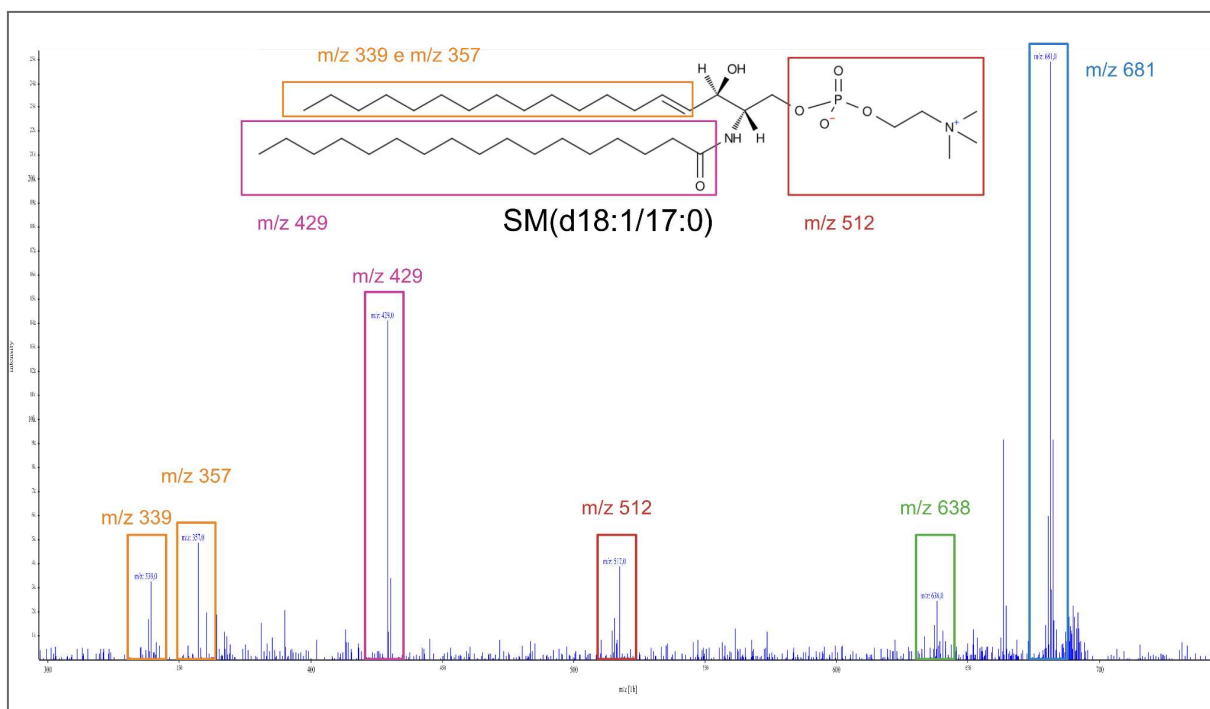


Figura 14 - A anotação do metabólito com m/z 699,62. Células foram estimuladas com Spike. Após 60 horas, foram coletadas para avaliação dos metabólitos por CID. Eixo X representa a razão massa/carga (m/z) e o eixo Y a intensidade relativa. O metabólito foi atribuído à esfingomielina SM(d18:1/17:0). Perda de uma molécula de água (m/z 681, destacado em azul). O fragmento em m/z 429 (destacado em rosa) corresponde à base esfingóide d18:1 com ligação à fosfocolina, enquanto os fragmentos em m/z 339 e 357 (destacados em laranja) indicam a presença da cadeia lateral do ácido graxo FA17:0. Fragmentos adicionais, como m/z 638 (destacado em verde) e m/z 517 (destacado em vermelho), reforçam a identificação.

A análise do metabólito com m/z 699,62 (m/z teórico 699,58, erro de 57 ppm) identificou-o como uma esfingomielina, especificamente SM(d18:1/17:0) (Figura 14). No modo de ionização positiva, o metabólito foi detectado como o íon $[M+H-18]^+$, indicando a perda de uma molécula de água e resultando no fragmento em m/z 681. Os padrões de fragmentação característicos de esfingomielinas foram observados, incluindo o fragmento em m/z 638, associado à perda do grupo trimetilamina $[M+H-59]^+$, e o fragmento em m/z 517, relacionado à perda da cabeça fosfocolina $[M+H-183]^+$. Ademais, os fragmentos em m/z 339 e m/z 357 confirmam a presença da cadeia lateral do ácido graxo FA17:0, enquanto o fragmento em m/z 429 reforça a

identificação da base esfingóide d18:1 com ligação à fosfocolina. A comparação dos fragmentos com os bancos de dados HMDB e *LipidMaps* confirmou os padrões analisados.

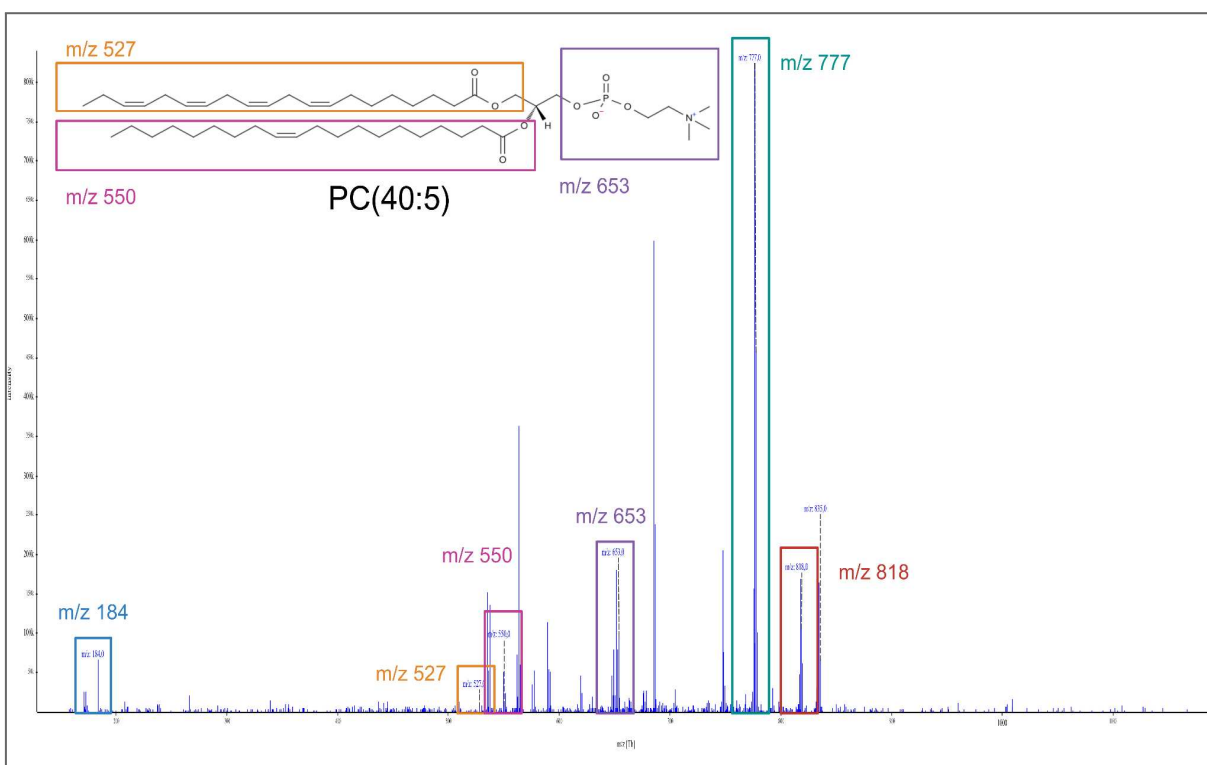


Figura 15 - A anotação do metabólito com m/z 836,70. Células foram estimuladas com Spike. Após 60 horas, foram coletadas para avaliação dos metabólitos por CID. Eixo X representa a razão massa/carga (m/z) e o eixo Y a intensidade relativa. O metabólito foi atribuído à fosfatidilcolina PC(40:5). No modo de ionização positiva, apresentou fragmentos característicos em m/z 184 a cabeça fosfocolina (em azul), m/z 777 a perda de trimetilamina (em verde), m/z 818 perda de uma água (em vermelho), m/z 653 a perda da cabeça fosfocolina (em roxo), m/z 527 a cadeia lateral do ácido graxo FA20:1(em laranja) e m/z 550 cadeia lateral do ácido graxo FA20:4 (em rosa)

A análise do metabólito com m/z 836,70 (m/z teórico 836,70, erro de ppm) identificou-o como uma fosfatidilcolina (PC), especificamente PC(40:5) (Figura 15), composta pelas cadeias FA20:1 e FA20:4. No modo de ionização positiva, foi detectado o íon $[M+H]^+$, com fragmentação característica em m/z 184, associado à cabeça fosfocolina. Além disso, foram observadas perdas neutras típicas, como a perda da água ($[M+H-18]^+$) em m/z 818 e nos fragmentos em m/z 777 ($[M+H-59]^+$), devido à quebra do grupo trimetilamina. Em m/z 653 ($[M+H-183]^+$), teve a quebra restante da molécula após a perda da cabeça fosfocolina. A fragmentação das

cadeias laterais reforçou a identificação, com os fragmentos em m/z 527 e m/z 550, presumivelmente correspondendo aos ácidos graxos FA20:1 e FA20:4, respectivamente. Os fragmentos foram comparados com as plataformas *LipidMaps* e HMDB, corroborando a identidade do metabólito.

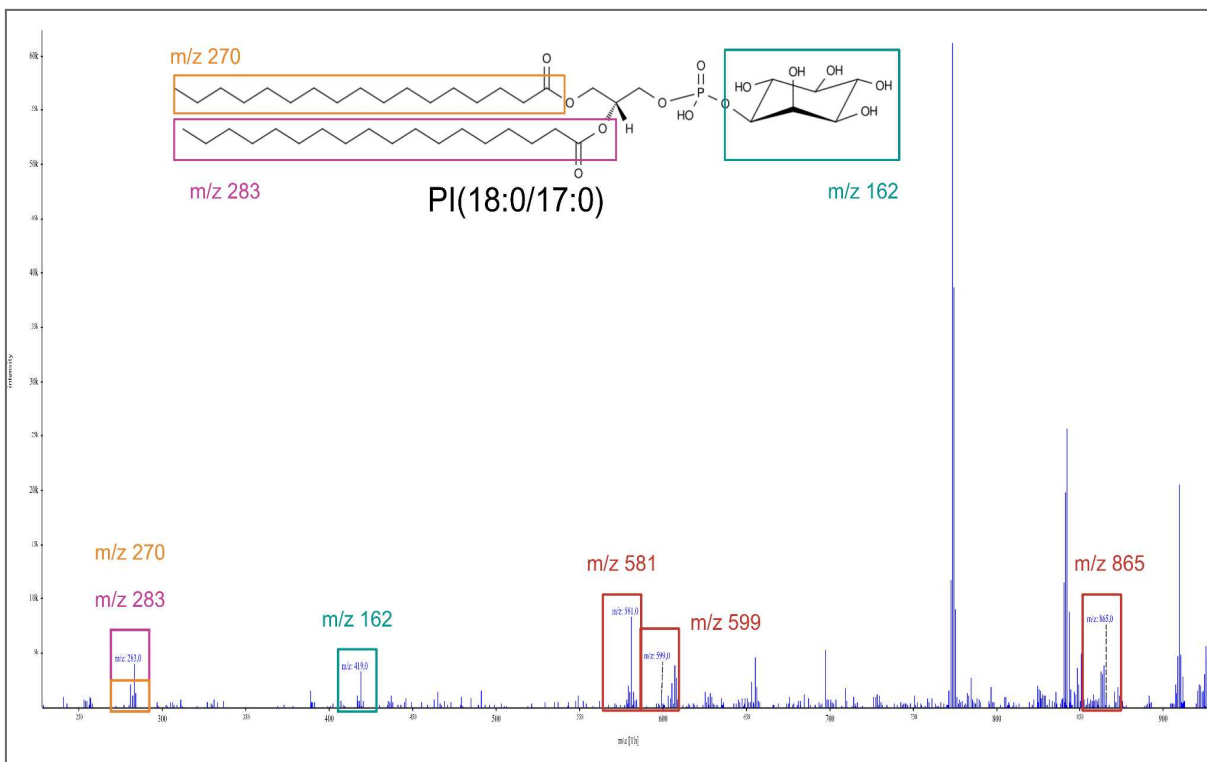


Figura 16 - A anotação do metabólito com m/z 911,50. Células foram estimuladas com Spike. Após 60 horas, foram coletadas para avaliação dos metabólitos por CID. Eixo X representa a razão massa/carga (m/z) e o eixo Y a intensidade relativa. O metabólito foi atribuído ao fosfatidilinositol PI(18:0/17:0). O fragmento em m/z 283 (destacado em rosa) é característico do ácido graxo FA18:0, enquanto o fragmento em m/z 419 (em verde) indica a presença do ácido graxo FA17:0. O m/z 162 é resultante da perda neutra da cadeia de ácido graxo e do inositol. Fragmentos adicionais (em vermelho), como m/z 581, m/z 599 e m/z 865, foram identificados após comparação com banco de dados.

Análise do metabólito com m/z 911,50 (m/z teórico 911,58, erro de -87 ppm) permitiu sua identificação como um fosfatidilinositol, possivelmente PI(35:0) (Figura 16). No modo de ionização negativa, o metabólito foi detectado como íon aduzido de acetato $[M+OAc]^-$. Os fragmentos associados às cadeias de ácidos graxos incluem m/z 283, característico do ácido graxo FA18:0, e fragmento m/z 419, indicando a presença do ácido graxo FA17:0, resultante da perda neutra da cadeia de ácido

graxo (-270) e o inositol (-162), representado como $[M+OAc - 432]^-$. Outros fragmentos característicos foram encontrados comparado com outros metabolitos no banco de dados do HMDB e *LipidMaps*, sendo eles m/z 581; m/z 599 e m/z 865. Esses padrões de fragmentação são consistentes com os descritos para fosfatidilinositóis, validando a identificação.

6 DISCUSSÃO

6.1 ATIVAÇÃO MICROGLIAL: NEUROINFLAMAÇÃO E NEURODEGENERAÇÃO

Neste trabalho, foi observado um aumento significativo na liberação de TNF- α por células microgliais estimuladas pela proteína *Spike* do SARS-CoV-2. Esse achado corrobora o estudo de Olajide e colaboradores (2022), que demonstraram que a subunidade S1 da *Spike* pode ativar a micróglia por meio do receptor TLR4. Essa ativação inicia uma cascata de sinalização intracelular dependente de NF- κ B e p38 MAPK, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e na polarização das micróglia para um estado pró-inflamatório.

Devido ao aumento na produção de TNF- α nas micróglia do grupo S, podemos presumir sua polarização para um estado pró-inflamatório. Consequentemente, ocorre uma resposta inflamatória exacerbada, a qual está ligada a danos no SNC, comprometendo a homeostase neuronal e favorecendo a progressão de neuroinflamação crônica, que é um fator de risco para doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinsons e infecções virais (Leng & Edison, 2020; Jeong et al., 2022; Isik et al., 2023). Essa ativação das micróglia reflete mecanismos observados em outras infecções virais, como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que também utiliza o TLR4 para induzir neuroinflamação. Assim como na COVID-19, a infecção pelo HIV resulta em ativação crônica da micróglia, produção contínua de citocinas inflamatórias e disfunção neural (Borrajo et al., 2020; Bai et al., 2023; Kong et al., 2024).

Os resultados do presente trabalho corroboram a literatura e podem sugerir a explicação para os mecanismos subjacentes aos sintomas neurológicos persistentes observados em neuroCOVID e COVID longa. A ativação crônica da micróglia e a polarização para um estado pró-inflamatório pode levar a uma neuroinflamação prolongada. Esse estado inflamatório sustentado, caracterizado pela produção contínua de citocinas como TNF- α , está associado a alterações na homeostase, disfunção sináptica e danos ao tecido nervoso. Esses processos resultam nos sintomas relatados em pacientes com COVID longa, como fadiga, déficits cognitivos e névoa mental, que compartilham semelhanças com outras

patologias neurodegenerativas. Além disso, a neuroinflamação prolongada observada na COVID-19 pode ser agravada pela desregulação metabólica lipídica demonstrada neste trabalho.

6.2 METABÓLITOS MODULADOS: VISÃO GERAL

Os resultados deste estudo revelaram a detecção de 609 analitos, entre os quais oito apresentaram alterações metabólicas significativas entre os grupos controle (C) e estimulado pela *Spike* (S). A análise de PLS-DA (Figura 6) demonstrou uma clara separação entre as amostras, indicando que as diferenças metabólicas observadas estão diretamente relacionadas à estimulação com a glicoproteína *Spike* do SARS-CoV-2. O *volcano plot* (Figura 7) demonstra a significância estatística destes metabólitos modulados. Ademais, esses achados foram corroborados pelo *heatmap* (Figura 8), que confirmou os padrões consistentes de expressão metabólica, evidenciando a homogeneidade das amostras dentro de cada grupo.

A partir dos oito metabólitos modulados foi realizada a fragmentação MS/MS para tentar identificar as possíveis classes desses metabólitos. Foram identificados dois esfingolípídeos, uma ceramida e uma esfingomielina. Três glicerofosfolípídeos, uma Lisofosfatidiletanolamina; uma fosfatidilcolina e um fosfatidilinosítol. E por fim dois glicerolípídeos, todos diacilgliceróis (Tabela 1). Estas classes de metabólitos desempenham papéis importantes na manutenção da integridade celular, na sinalização intracelular e em respostas inflamatórias (Scott et al., 2014; Hubler & Kennedy, 2016; Osawa, Fujikawa & Shimamoto, 2024). Embora alterações metabólicas no contexto de infecções virais, dentre elas SARS-CoV-2, serem amplamente investigadas, ainda existem muitas lacunas a serem completadas. Estudos recentes têm demonstrado o papel dos lipídios não apenas na entrada viral e replicação, mas também na modulação imunológica e na resposta inflamatória (Abu-Farha et al., 2020; Farley et al., 2022; Kurano et al., 2022; Gupta et al., 2023). Corroborando com os achados deste trabalho, esses resultados contribuem para a compreensão do papel do metabolismo lipídico na dinâmica de

infecções virais, destacando como as mudanças nesses lipídios podem influenciar tanto a infecção celular quanto a inflamação.

6.3 METABÓLITOS MODULADOS: ESFINGOLIPÍDIOS

Os esfingolipídios (SL) são uma classe de lipídios bioativos que desempenham papéis na estrutura e funcionalidade das membranas celulares, além de atuarem como mediadores em processos de sinalização intracelular (Hannun & Obeid, 2008; Hannun & Obeid, 2018; Lee, Lee & Bae, 2023). Eles regulam funções biológicas, como apoptose, diferenciação celular e resposta imunológica, sendo amplamente reconhecidos por sua relevância tanto na homeostase celular quanto em condições patológicas, como doenças neurodegenerativas, incluindo Alzheimer, Parkinson e infecções virais (Alaamery et al., 2020; Vos, Klein & Hicks, 2023; Lozhkina et al., 2024). Neste contexto, os resultados deste trabalho evidenciaram o impacto da glicoproteína *Spike* do SARS-CoV-2 na modulação dos SLs em células microgliais. A estimulação com a *Spike* resultou em alterações específicas nos níveis de ceramida e esfingomielina (SM). Foi observado um aumento significativo na expressão de ceramida, enquanto a SM apresentou redução expressiva no grupo estimulado em comparação ao controle, sugerindo que a *Spike* está influenciando o metabolismo destes lipídios, possivelmente pela via da degradação da SM.

O aumento de ceramida, observado neste estudo, representa um achado que destaca a interação deste SL na resposta inflamatória e em processos patológicos. Tal aumento está relacionado à ativação da via de degradação da SM mediada pela esfingomielinase ácida (ASM), uma enzima lisossomal que catalisa a hidrólise da SM, convertendo-a em ceramida e fosfocolina. Dentre as diversas consequências do aumento de ceramida, destaca-se que este metabólito facilita a formação de plataformas lipídicas na membrana plasmática, que atuam como zonas de agregação para receptores, como o ACE2, e co-receptores, como a TMPRSS2 (Kornhuber, Hoertel & Gulbins, 2022; Geiger et al., 2022; Niort et al., 2023). Esse mecanismo amplifica a eficiência da infecção viral e pode perpetuar o ciclo replicativo do vírus, contribuindo para a disseminação viral. Como este

trabalho avaliou os efeitos da *Spike* nas células microgлияis, o aumento da ceramida pode ser interpretado como uma resposta inicial ao processo da infecção celular.

A ceramida desempenha um papel também na ativação do inflamassoma NLRP3, mediador da resposta inflamatória em células sob estresse metabólico ou infectadas, como observado no contexto do SARS-CoV-2 (Alaamery et al., 2020; Kornhuber, Hoertel & Gulbins, 2022; Fenizia, Gaggini & Vassalle, 2023). O acúmulo de ceramida está associado à desestabilização da membrana lisossomal, o que resulta na liberação de DAMPs e EROs, sinais intracelulares que ativam o NLRP3. Essa ativação promove o recrutamento de proteínas adaptadoras, e a ativação da caspase-1, culminando na maturação e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18. O aumento de ceramida também interfere na agregação de componentes estruturais do inflamassoma. Estudos demonstram que a ativação exacerbada do NLRP3 está associada a casos graves de COVID-19 (Ferreira et al., 2021; Rodrigues et al., 2021; Albornoz et al., 2022; Vora, Lieberman & Wu, 2023). Os resultados indicam que a desregulação metabólica causada pela estimulação da *Spike*, especialmente o aumento de ceramida, pode estar relacionada à ativação do inflamassoma NLRP3. A conexão entre a alteração nos níveis de SL e a potencial interação com o inflamassoma sugere um papel importante da ceramida como mediadora inicial desse processo. Estudos futuros, que integrem a análise funcional do inflamassoma e suas citocinas associadas, poderão elucidar melhor a contribuição dos SL nesse mecanismo inflamatório.

Em contrapartida ao aumento de ceramida, a redução de SM observada neste trabalho, reflete alterações metabólicas que reforçam as consequências anteriormente discutidas. A diminuição de SM está associada à ativação de sua via de degradação pela ASM, que a converte em ceramida (Henry et al., 2013). No entanto, além de ser um precursor da ceramida, a esfingomielina possui outras funções. Sua redução pode desestabilizar *rafts* lipídicos, microdomínios ricos em SL e colesterol, importantes para a sinalização celular, transporte vesicular e endocitose (Barenholz, 2004; Ando et al., 2015; Miller et al., 2020). A desestabilização destes *rafts* compromete a funcionalidade das proteínas de

superfície das células. O aumento de ceramida, combinado com a redução de seu precursor, a SM, sugere uma conexão direta com a estimulação pela glicoproteína *Spike* do SARS-CoV-2. Considerando que esses SL desempenham papéis nas interações dos receptores celulares, essas alterações metabólicas destacam seu potencial como alvos para estratégias terapêuticas. Um bom candidato a ser explorado a fim de mitigar os efeitos inflamatórios e patológicos associados a neuroCOVID e COVID longa seria, por exemplo, a inibição da ASM (Abusukhun et al., 2021; Hoertel et al., 2021; Pauletto, Delgado & da Rocha, 2022).

6.4 METABÓLITOS MODULADOS: GLICEROFOSFOLIPÍDEOS E GLICEROLIPÍDEOS

Os glicerofosfolipídeos e os glicerolipídeos, juntamente com os esfingolipídios, desempenham funções de mediadores em processos de sinalização intracelular, mas são mais reconhecidos pelas funções de manutenção da integridade estrutural e funcional das membranas celulares e organelas. Neste estudo, foi observada uma redução expressiva na expressão de lisofosfatidiletanolaminas (LPE), fosfatidilinositóis (PI) e diacilgliceróis (DG) e um aumento na expressão fosfatidilcolinas (PC). Essas alterações indicam uma reprogramação metabólica significativa pela estimulação com a *Spike* e sugerem um estado de estresse metabólico e estrutural que compromete a homeostase celular.

O aumento de PCs, um dos principais componentes das membranas plasmáticas, pode impactar diretamente a fluidez e estabilidade da bicamada lipídica, interferindo na organização de proteínas de membrana envolvidas em sinalização celular. Além de influenciar na organização de moléculas sinalizadoras, as PCs são precursoras de ácido araquidônico e lisofosfatidilcolinas, cujo aumento é observado em processos inflamatórios (Xu et al., 2016; Van Der Veen et al., 2017; Law et al., 2019). O ácido araquidônico é um ácido graxo poli-insaturado que serve como substrato para a produção de eicosanóides, incluindo prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos, que regulam respostas inflamatórias e imunológicas

(Dennis & Norris, 2015; Lohitaksha et al., 2024). O aumento de PCs observado neste trabalho pode ser pela necessidade da célula de suprir a produção do ácido araquidônico e, conseqüentemente, a produção dos eicosanóides, aumentando a produção dessas moléculas inflamatórias e modulando através de tempestades de eicosanóides (Hammock et al., 2020; Mohammed, Kalle & Reddanna, 2022; Zaid et al., 2021)

A diminuição nos níveis de LPE, observada neste estudo reflete um comprometimento e alterações no metabolismo mitocondrial. Uma das principais funções das LPE é sua participação na manutenção da estrutura e dinâmica das membranas destas organelas. As mitocôndrias dependem da fosfatidiletanolamina (PE) e de seus derivados, como as LPE, para a formação de cristas mitocondriais, que são necessárias para o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons e a produção de ATP (Mayr, 2014; Calzada, Onguka & Claypool, 2015; Van Der Veen et al., 2017). A redução de LPE pode comprometer essa dinâmica mitocondrial, levando a uma menor eficiência na geração de energia e ao acúmulo de EROs, exacerbando o estresse oxidativo celular como visto anteriormente por Oliveira (2024). Os resultados deste trabalho acrescentam que essas alterações metabólicas se somam à disfunção observada em outras classes lipídicas, como os esfingolipídeos. Assim, a relação entre a redução de LPE e o aumento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , detectadas neste trabalho, sugere que a disfunção mitocondrial pode ser um gatilho na polarização microglial para um estado pró-inflamatório.

Os PIs são lipídios que desempenham papéis na ativação de vias de sinalização inflamatórias e metabólicas. Neste estudo, a redução nos níveis de PI observada sugere uma disfunção significativa nos processos de sinalização celular, especialmente em vias associadas à ativação de proteínas quinases, como a proteína quinase C (PKC). A PKC é uma enzima que regula processos celulares, incluindo respostas inflamatórias, sobrevivência celular e adaptação ao estresse metabólico (Mochly-Rosen, Das & Grimes, 2012; Newton, 2018; Kin & Kornberg, 2021; Singh et al., 2024). A ativação da PKC depende da interação com cofatores lipídicos, como os PIs e DGs, que são gerados pela clivagem de fosfolipídios na

membrana celular. A redução de PI compromete essa cascata, afetando a ativação adequada da PKC. De forma semelhante, os DGs, que também apresentaram redução significativa neste trabalho, podem comprometer a ativação de cascatas, agravando o desequilíbrio metabólico e favorecendo um estado pró-inflamatório exacerbado nas micróglia.

CONCLUSÃO

A glicoproteína *Spike* do SARS-CoV-2 induz a polarização microglial para um fenótipo pró-inflamatório e promove o remodelamento do perfil de lipídios bioativos, os quais podem desempenhar um papel na progressão da neuroCOVID.

REFERÊNCIAS

- ALBORNOZ, Eduardo A. et al. SARS-CoV-2 drives NLRP3 inflammasome activation in human microglia through spike protein. **Molecular Psychiatry**, v. 28, n. 7, p. 2878-2893, 2023.
- ABU-FARHA, Mohamed et al. The role of lipid metabolism in COVID-19 virus infection and as a drug target. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3544, 2020.
- ABUSUKHUN, Murad et al. Activation of sphingomyelinase-ceramide-pathway in COVID-19 purposes its inhibition for therapeutic strategies. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 784989, 2021.
- AIMO, L. et al. The SwissLipids knowledgebase for lipid biology. **Bioinformatics**, v. 31, n. 17, p. 2860-2866, 2015.
- ALAAMERY, Manal et al. Role of sphingolipid metabolism in neurodegeneration. **Journal of neurochemistry**, v. 158, n. 1, p. 25-35, 2021.
- ALVES, V. S. et al. SARS-CoV-2 Spike protein alters microglial purinergic signaling. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1-11, 2023.
- AMADORO, Giuseppina et al. COVID-19 and Alzheimer's Disease share common neurological and ophthalmological manifestations: A bidirectional risk in the post-pandemic future. **Cells**, v. 12, n. 22, p. 2601, 2023.
- ANDO, Jun et al. Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 15, p. 4558-4563, 2015.
- AZIZI, Sayed Ausim; AZIZI, Saara-Anne. Neurological injuries in COVID-19 patients: Direct viral invasion or a bystander injury after infection of epithelial/endothelial cells. **Journal of NeuroVirology**, v. 26, p. 631, 2020.

BADENOCH, James B. et al. Persistent neuropsychiatric symptoms after COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Brain Communications**, v. 4, n. 1, p. 1-15, 2022.

BAI, Ruojing et al. Role of microglia in HIV-1 infection. **AIDS Research and Therapy**, v. 20, n. 1, p. 16, 2023.

BARENHOLZ, Yechezkel. Sphingomyelin and cholesterol: from membrane biophysics and rafts to potential medical applications. **Membrane Dynamics and Domains: Subcellular Biochemistry**, p. 167-215, 2004.

BARNETT, Katherine C.; KAGAN, Jonathan C. Lipids that directly regulate innate immune signal transduction. **Innate Immunity**, v. 26, n. 1, p. 4-14, 2020.

BAUER, Lisa et al. The neuroinvasiveness, neurotropism, and neurovirulence of SARS-CoV-2. **Trends in Neurosciences**, v. 45, n. 5, p. 358-368, 2022.

BLASI, Elisabetta et al. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. **Journal of Neuroimmunology**, v. 27, n. 2-3, p. 229-237, 1990.

BORRAJO, A. et al. Important role of microglia in HIV-1 associated neurocognitive disorders and the molecular pathways implicated in its pathogenesis. **Annals of Medicine**, v. 53, n. 1, p. 43-69, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Painel Coronavírus (COVID-19). Disponível em: https://infoms.saude.gov.br/extensions/covid-19_html/covid-19_html.html. Acesso em: 10 set. 2024.

CALZADA, Elizabeth; ONGUKA, Ouma; CLAYPOOL, Steven M. Phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 321, p. 29-88, 2016.

CATALDI, Mauro et al. Neurobiology of coronaviruses: potential relevance for COVID-19. **Neurobiology of Disease**, v. 143, p. 1-11, 2020.

CHAUSSE, Bruno et al. Microglia and lipids: how metabolism controls brain innate immunity. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 112, p. 137-144, 2021.

CHEN, Y. et al. Emerging SARS-CoV-2 variants: Why, how, and what's next? **Cell Insight**, v. 1, n. 3, p. 1-7, 2022.

CHENG, Qi et al. "Infectivity of human coronavirus in the brain." **EBioMedicine**, vol. 56, 102799, 2020.

CHERRY, Jonathan D.; OLSCHOWKA, John A.; O'BANION, M. Kerry. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, p. 1-15, 2014.

CORREIA, Alyne Oliveira et al. Neurological manifestations of COVID-19 and other coronaviruses: a systematic review. **Neurology, Psychiatry and Brain Research**, v. 37, p. 27-32, 2020.

DAVIS, H. E. et al. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 133-146, 2023.

DE MELO, Guilherme Dias et al. Neuroinvasion and anosmia are independent phenomena upon infection with SARS-CoV-2 and its variants. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2023.

DENNIS, Edward A.; NORRIS, Paul C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 511-523, 2015.

FAJGENBAUM, D. C.; JUNE, C. H. Cytokine storm. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 23, p. 2255-2273, 2020.

FARLEY, Scotland E. et al. A global lipid map reveals host dependency factors conserved across SARS-CoV-2 variants. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 3487, 2022.

FENIZIA, Simona; GAGGINI, Melania; VASSALLE, Cristina. The sphingolipid-signaling pathway as a modulator of infection by SARS-CoV-2. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 45, n. 10, p. 7956-7973, 2023.

FERREIRA, André C. et al. SARS-CoV-2 engages inflammasome and pyroptosis in human primary monocytes. **Cell Death Discovery**, v. 7, n. 1, p. 43, 2021.

FOLICK, Andrew; KOLIWAD, Suneil K.; VALDEARCOS, Martin. Microglial lipid biology in the hypothalamic regulation of metabolic homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 668396, 2021.

FRANK, Matthew G. et al. Exploring the immunogenic properties of SARS-CoV-2 structural proteins: PAMP:TLR signaling in the mediation of the neuroinflammatory and neurologic sequelae of COVID-19. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 111, p. 259-269, 2023.

GAIN, Chandrima et al. The role of oxidative stress in the pathogenesis of infections with coronaviruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1111930, 2023.

GEIGER, Nina et al. The acid ceramidase is a SARS-CoV-2 host factor. **Cells**, v. 11, n. 16, p. 2532, 2022.

GORBALENYA, Alexander et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536-544, 2020.

GREENE, Chris et al. Blood-brain barrier disruption and sustained systemic inflammation in individuals with long COVID-associated cognitive impairment. **Nature Neuroscience**, v. 27, n. 3, p. 421-432, 2024.

GUARNIERI, Joseph W. et al. Core mitochondrial genes are down-regulated during SARS-CoV-2 infection of rodent and human hosts. **Science Translational Medicine**, v. 15, n. 708, 1-19, 2023.

GUPTA, Tinku et al. Metabolism configures immune response across multi-systems: Lessons from COVID-19. **Advances in Biological Regulation**, v. 90, p. 100977, 2023.

GUTMAN, Elisa Gouvea et al. Long COVID: plasma levels of neurofilament light chain in mild COVID-19 patients with neurocognitive symptoms. **Molecular Psychiatry**, v. 29, n. 10, p. 3106-3116, 2024.

HAMMOCK, Bruce D. et al. Eicosanoids: the overlooked storm in coronavirus disease 2019 (COVID-19)?. **The American Journal of Pathology**, v. 190, n. 9, p. 1782-1788, 2020.

HAN, Xianlin. **Lipidomics: comprehensive mass spectrometry of lipids**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016. ISBN 9781118893128.

HANNUN, Yusuf A.; OBEID, Lina M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 139-150, 2008.

HANNUN, Yusuf A.; OBEID, Lina M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 175-191, 2018.

HENRY, Brian et al. Acid sphingomyelinase. Sphingolipids: Basic Science and Drug Development. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 215, p. 77-88, 2013.

HOERTEL, Nicolas et al. Repurposing antidepressants inhibiting the sphingomyelinase acid/ceramide system against COVID-19: current evidence and potential mechanisms. **Molecular Psychiatry**, v. 26, n. 12, p. 7098-7099, 2021.

HU, Biying; HUANG, Shaoying; YIN, Lianghong. The cytokine storm and COVID-19. **Journal of medical virology**, v. 93, n. 1, p. 250-256, 2021.

HU, B. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 141-154, 2021.

HUANG, Yuan et al. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 9, p. 1141-1149, 2020.

HUBLER, Merla J.; KENNEDY, Arion J. Role of lipids in the metabolism and activation of immune cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 34, p. 1-7, 2016.

ISIK, Sevim et al. Microglia mediated neuroinflammation in Parkinson's disease. **Cells**, v. 12, n. 7, p. 1012, 2023.

JACKSON, Cody B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022.

JELINEK, Herbert F. et al. Evolution, ecology, and zoonotic transmission of betacoronaviruses: A review. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 1-18, 2021.

KIM, Paul M.; KORNBERG, Michael D. Targeting PKC in microglia to promote remyelination and repair in the CNS. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 62, p. 103-108, 2022.

KORNHUBER, Johannes; HOERTEL, Nicolas; GULBINS, Erich. The acid sphingomyelinase/ceramide system in COVID-19. **Molecular Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 307-314, 2022

JEONG, Gi Uk et al. SARS-CoV-2 infection of microglia elicits proinflammatory activation and apoptotic cell death. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 3, p. e01091-22, 2022.

KONG, Weili et al. Neuroinflammation generated by HIV-infected microglia promotes dysfunction and death of neurons in human brain organoids. **PNAS Nexus**, v. 3, n. 5, p. pgae179, 2024.

KURANO, Makoto et al. Dynamic modulations of sphingolipids and glycerophospholipids in COVID-19. **Clinical and Translational Medicine**, v. 12, n. 10, p. e1069, 2022.

LAW, Shi-Hui et al. An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 5, p. 1149, 2019.

LEE, Mingyu; LEE, Suh Yeon; BAE, Yoe-Sik. Functional roles of sphingolipids in immunity and their implication in disease. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 55, n. 6, p. 1110-1130, 2023.

LENG, Fangda; EDISON, Paul. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?. **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 3, p. 157-172, 2021

LOHITAKSHA, Koppada et al. Eicosanoid Signaling in Neuroinflammation Associated with Alzheimer's Disease. **European Journal of Pharmacology**, p. 176694, 2024.

LOZHKINA, N. G. et al. Ceramides As Potential New Predictors of the Severity of Acute Coronary Syndrome in Conjunction with SARS-CoV-2 Infection. **Acta Naturae (англоязычная версия)**, v. 16, n. 2, p. 53-60, 2024.

LUO, Xufei et al. Clinical manifestations of COVID-19: An overview of 102 systematic reviews with evidence mapping. **Journal of Evidence-Based Medicine**, v. 15, n. 3, p. 201-215, 2022.

MARSCHALLINGER, Julia et al. Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nature neuroscience*, v. 23, n. 2, p. 194-208, 2020.

MAYR, Johannes A. Lipid metabolism in mitochondrial membranes. **Journal of Inherited Metabolic disease**, v. 38, p. 137-144, 2015.

MILLER, Yury I. et al. Lipid rafts in glial cells: role in neuroinflammation and pain processing: thematic review series: biology of lipid rafts. **Journal of Lipid Research**, v. 61, n. 5, p. 655-666, 2020.

MOCHLY-ROSEN, Daria; DAS, Kanad; GRIMES, Kevin V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 12, p. 937-957, 2012.

MOHAMMED, Aameena; KALLE, Arunasree M.; REDDANNA, Pallu. Managing sars-cov2 infections through resolution of inflammation by eicosanoids: A review. **Journal of Inflammation Research**, p. 4349-4358, 2022.

MONTAZERSAHEB, Soheila et al. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. **Virology Journal**, v. 19, n. 1, p. 92, 2022.

MULLEN, Peter J. et al. SARS-CoV-2 infection rewires host cell metabolism and is potentially susceptible to mTORC1 inhibition. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1876, 2021.

NAKAYASU, Ernesto S. et al. MPLEx: a robust and universal protocol for single-sample integrative proteomic, metabolomic, and lipidomic analyses. **mSystems**, v. 1, n. 3, p. 1-14, 2016.

NEWTON, Alexandra C. Protein kinase C: perfectly balanced. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, n. 2, p. 208-230, 2018.

NIORT, Kristina et al. Cholesterol and Ceramide Facilitate Membrane Fusion Mediated by the Fusion Peptide of the SARS-CoV-2 Spike Protein. **ACS Omega**, v. 8, n. 36, p. 32729-32739, 2023.

OLAJIDE, O. A. et al. SARS-CoV-2 spike glycoprotein S1 induces neuroinflammation in BV-2 microglia. **Molecular Neurobiology**, v. 59, p. 445-458, 2022.

OLIVEIRA, M. A. **Identificação de alterações metabólicas associadas à ativação microglial induzida pela glicoproteína Spike do vírus SARS-CoV-2**. 2024. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. COVID-19 Dashboard. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>. Acesso em: 10 set. 2024.

O'NEILL, Luke AJ; KISHTON, Rigel J.; RATHMELL, Jeff. A guide to immunometabolism for immunologists. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 553-565, 2016.

OSAWA, Tsukiho; FUJIKAWA, Kohki; SHIMAMOTO, Keiko. Structures, functions, and syntheses of glycerophospholipids. **Frontiers in Chemistry**, v. 12, p. 1353688, 2024.

PAOLICELLI, R. C. et al. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. **Neuron**, v. 110, n. 21, 2022.

PAN, Pan et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 4664, 2021.

PANG, Zehan et al. Neurological complications caused by SARS-CoV-2. **Clinical Microbiology Reviews**, 2024

PANG, Zhiqiang et al. MetaboAnalyst 6.0: Towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis, and interpretation. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. 1, p. 398-406, 2024.

PAULETTO, Pedro José Tronco; DELGADO, Cassia Pereira; DA ROCHA, João Batista Teixeira. Acid sphingomyelinase (ASM) and COVID-19: A review of the potential use of ASM inhibitors against SARS-CoV-2. **Cell Biochemistry and Function**, v. 41, n. 3, p. 284-295, 2023.

PFORTMUELLER, C. A. et al. COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome (CARDS): Current knowledge on pathophysiology and ICU treatment—A narrative review. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 35, n. 3, p. 351-368, 2021.

RAHMATI, Masoud et al. New-onset neurodegenerative diseases as long-term sequelae of SARS-CoV-2 infection: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 95, n. 7, p. e28909, 2023.

RODRIGUES, Tamara S. et al. Inflammasomes are activated in response to SARS-CoV-2 infection and are associated with COVID-19 severity in patients. **Journal of Experimental Medicine**, v. 218, n. 3, 2021.

SCHMID, Robin et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. **Nature Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 447-449, 2023.

SCOTT, Sarah A. et al. Chemical modulation of glycerolipid signaling and metabolic pathways. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1841, n. 8, p. 1060-1084, 2014.

SINGH, Nishtha et al. Protein Kinase C (PKC) in Neurological Health: Implications for Alzheimer's Disease and Chronic Alcohol Consumption. **Brain Sciences**, v. 14, n. 6, p. 554, 2024.

SMITH, Joshua A. et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 1, p. 10-20, 2012.

SOUNG, Allison L. et al. COVID-19 induces CNS cytokine expression and loss of hippocampal neurogenesis. **Brain**, v. 145, n. 12, p. 4193-4201, 2022.

VAN DER VEEN, Jelske N. et al. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1859, n. 9, p. 1558-1572, 2017.

VOS, Melissa; KLEIN, Christine; HICKS, Andrew A. Role of ceramides and sphingolipids in Parkinson's disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 435, n. 12, p. 168000, 2023.

VORA, Setu M.; LIEBERMAN, Judy; WU, Hao. Inflammasome activation at the crux of severe COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 11, p. 694-703, 2021.

WISHART, David S. et al. HMDB 5.0: the human metabolome database for 2022. **Nucleic acids research**, v. 50, n. D1, p. D622-D631, 2022.

WOO, Patrick C. Y. et al. ICTV virus taxonomy profile: Coronaviridae 2023. **The Journal of General Virology**, v. 104, n. 4, 2023.

XU, Dongmin et al. Increased arachidonic acid-containing phosphatidylcholine is associated with reactive microglia and astrocytes in the spinal cord after peripheral nerve injury. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 26427, 2016.

YANG, Haitao; RAO, Zihe. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 11, p. 685-700, 2021.

ZAID, Younes et al. Chemokines and eicosanoids fuel the hyperinflammation within the lungs of patients with severe COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 148, n. 2, p. 368-380. e3, 2021.

ZANZA, Christian et al. Cytokine storm in COVID-19: **Immunopathogenesis and Therapy**. Medicina (Kaunas, Lithuania), v. 58, n. 2, p. 144, 2022.

ZHAO, Jinyang et al. Long COVID and its association with neurodegenerative diseases: pathogenesis, neuroimaging, and treatment. **Frontiers in Neurology**, v. 15, p. 1367974, 2024.

ZHAO, Yingchi et al. SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. **Cell Research**, v. 31, n. 7, p. 818-820, 2021.

ZMASEK, Christian M. et al. Genomic evolution of the Coronaviridae family. **Virology**, v. 570, p. 123-133, 2022.