



**UFAM**



**PPGIBA**  
Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia Básica e Aplicada

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**AVALIAÇÃO DA VIA DE ESFINGOSINA 1-FOSFATO (S1P) E LIPÍDIOS**  
**CORRELACIONADOS AO METABOLISMO DE CERAMIDAS NA RESPOSTA**  
**IMUNE EM PACIENTES INFECTADOS POR SARS-CoV-2**

**DIANA MOTA TORO**

**MANAUS - AMAZONAS**  
**2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**DIANA MOTA TORO**

**AVALIAÇÃO DA VIA DE ESFINGOSINA 1-FOSFATO (S1P) E LIPÍDIOS**  
**CORRELACIONADOS AO METABOLISMO DE CERAMIDAS NA RESPOSTA**  
**IMUNE EM PACIENTES INFECTADOS POR SARS-CoV-2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas para a obtenção do título de Doutora em Imunologia Básica e Aplicada.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi**

**Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia Helena Faccioli**

**MANAUS - AMAZONAS**  
**2024**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

T686a Toro, Diana Mota  
Avaliação da via de esfingosina 1-fosfato (S1P) e lipídios correlacionados ao metabolismo de ceramidas na resposta imune em pacientes infectados por Sars-CoV-2 / Diana Mota Toro . 2024  
95 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Arterio Sorgi  
Coorientadora: Lúcia Helena Faccioli  
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -  
Universidade Federal do Amazonas.

1. Esfingolipídios. 2. Biomarcador. 3. Esfingosina-1-fosfato (S1P).  
4. SARS-CoV-2. 5. Covid-19. I. Sorgi, Carlos Arterio. II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

**DIANA MOTA TORO**

**AVALIAÇÃO DA VIA DE ESFINGOSINA 1-FOSFATO (S1P) E LIPÍDIOS  
CORRELACIONADOS AO METABOLISMO DE CERAMIDAS NA RESPOSTA  
IMUNE EM PACIENTES INFECTADOS POR SARS-CoV-2**

Esta tese foi julgada para a obtenção do título de Doutora em Imunologia Básica e Aplicada e aprovada em sua versão final pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas.

Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa  
Coordenador PPGIBA

Apresentada perante a Banca Examinadora composta por:

---

Dr. Carlos Arterio Sorgi - FFCLRP - USP  
(Presidente e Membro Titular Interno do Programa)

---

Dra. Fabiola Attie de Castro - FCFRP - USP  
(Membro Titular Externo do Programa)

---

Dr. Ronaldo Bragança Martins Júnior - FCFRP - USP  
(Membro Titular Externo do Programa)

---

Dr. Eurico de Arruda Neto - FMRP - USP  
(Membro Titular Externo do Programa)

---

Dr. Gemilson Soares Pontes - INPA  
(Membro Titular Interno do Programa)

Manaus, 26 de fevereiro de 2024

## ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Os resultados desta tese estão organizados por capítulos, apresentados no formato de coletânea de artigos científicos, evidenciando a contribuição dos resultados obtidos para o entendimento da COVID-19.

**Capítulo I:** Este capítulo reúne os artigos relacionados ao metabolismo de esfingolipídios (SL) e destaca sua relevância como ferramenta diagnóstica e prognóstica, além de sua importância na compreensão da patogênese da COVID-19.

Artigo 1: *Plasma Sphingomyelin Disturbances: Unveiling Its Dual Role as a Crucial Immunopathological Factor and a Severity Prognostic Biomarker in COVID-19*. Este estudo explorou o perfil de produção de esfingolipídios e seus derivados metabólicos ativos em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2. Foram analisadas a expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo dos SL em leucócitos de sangue periférico de pacientes com COVID-19 e o potencial dos SL como biomarcadores de gravidade da doença.

Artigo 2: *High-resolution targeted mass spectrometry for comprehensive quantification of sphingolipids: clinical applications and characterization of extracellular vesicles*. Neste estudo, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem de alta resolução (LC-MS/MS com MRM-HR) para desenvolver um método direcionado à identificação e quantificação de diversas espécies de esfingolipídios. As análises foram realizadas em amostras de plasma de pacientes com COVID-19, bem como em vesículas extracelulares (EVs), permitindo um mapeamento dessas biomoléculas e suas potenciais aplicações clínicas.

**Capítulo II:** Neste capítulo, é abordada a relação entre a produção de esfingosina-1-fosfato (S1P) e parâmetros clínicos e inflamatórios em pacientes com COVID-19. Além disso, são apresentados dados sobre a expressão gênica dos receptores de S1P (S1PR) e de enzimas do metabolismo de S1P em leucócitos de pacientes com COVID-19. Este capítulo também inclui uma investigação *in vitro* sobre o papel de S1P e S1PR1 na replicação viral do SARS-CoV-2 e na modulação da atividade inflamatória em macrófagos, cujo manuscrito está em fase de publicação.

**Capítulo III:** Este capítulo lista todos os dez artigos publicados durante o período do doutorado, provenientes da colaboração com os consórcios de pesquisa IMUNOCOVID e AEROBICOVID. Também apresenta um resumo das atividades realizadas durante o período de Doutorado Sanduíche na *University of Nebraska*, nos Estados Unidos.

A conclusão foi elaborada com base nos resultados dos capítulos I e II. As referências listadas ao final desta tese correspondem às citações presentes na Introdução, no Referencial Teórico e discussão do Capítulo II. As referências específicas do Capítulo I estão localizadas no final dos respectivos artigos.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha Mãe, cuja força e amor inabaláveis moldaram a pessoa que sou hoje. Agradeço por sua dedicação na criação de seus filhos, enfrentando todas as adversidades com coragem e determinação. Também quero expressar uma dedicação especial ao meu companheiro de vida, Cláudio Henrique Albuquerque. Sua presença constante e apoio incondicional foram fundamentais para superar os desafios desta jornada. Obrigado por caminhar ao meu lado com fidelidade e amor.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos à todas as pessoas e instituições que contribuíram para a realização desta pesquisa e para a conclusão desta tese de doutorado.

Primeiramente, agradeço ao meu orientador, **Professor Dr. Carlos Arterio Sorgi**, pelo apoio e incentivo ao longo de todo o processo. Sua expertise, paciência e dedicação foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. À minha coorientadora, **Professora Dra. Lúcia Helena Faccioli**, agradeço pela generosa acolhida em seu laboratório e pelos valiosos ensinamentos. Muito obrigada por tudo!

Agradeço igualmente aos coordenadores e membros dos Consórcios de Pesquisa IMUNOCOVID e AEROBICOVID pela oportunidade de contribuir para a construção do conhecimento científico em nosso país. Além disso, expresso minha gratidão às instituições de financiamento e colaboradores que tornaram este projeto possível, bem como a todos os voluntários que participaram da pesquisa. Em especial, ao **Centro de Excelência de Quantificação e Identificação de Lipídios (CEQIL - USP)** e ao **Laboratório de Patogênese Viral, do Centro de Pesquisa em Virologia** do Departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela excelente parceria.

Agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)**, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro, que foram fundamentais para a realização deste trabalho, além de contribuírem para o avanço da Ciência e Tecnologia no Brasil. Agradeço à UFAM, à **Coordenação** e à **Secretaria do Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada - PPGIBA**, por todo o apoio e suporte fornecidos. Aos professores do PPGIBA-UFAM, expresso minha gratidão pelos valiosos ensinamentos transmitidos durante as aulas; vocês são exemplos para nós.

À **Professora Dra. Ruxana Sadikot**, expresso minha sincera gratidão pela oportunidade de realizar o doutorado sanduíche em seu laboratório, pela acolhida e pelo apoio prestado durante minha estadia nos Estados Unidos.

Aos meus amigos de laboratório e todos os colaboradores do Grupo de estudos em **Biotecnologia e Imunoquímica de Lipídios (GeBIL)** da FFCLRP-USP, que compartilharam seus conhecimentos e experiências, enriquecendo assim o desenvolvimento deste estudo. Obrigada pela amizade e pelo nosso cafezinho de cada dia.

Não poderia deixar de expressar minha profunda gratidão a **Deus**, por Seu infinito amor e misericórdia, que me deram força e determinação nos momentos mais desafiadores desta jornada. À minha mãe, **Áurea Estela Mota Toro**, meu maior exemplo de vida, agradeço por me ensinar, através de seu próprio exemplo, a ser forte e a lutar pelos meus objetivos desde cedo.

À uma pessoa especial e companheiro de vida, **Cláudio Henrique Albuquerque Rodrigues**, compartilho a felicidade e o mérito por esta e tantas outras conquistas. Agradeço imensamente por todo o companheirismo, paciência e amor ao longo dessa caminhada.

Agradeço a todos os meus amigos e companheiros de vida, especialmente a **Pedro Vieira, Gláucia Rigotto, Filipe Rocha, Jonatan de Carvalho, Malena Pérez e Vinícius Pimentel**. Obrigada por sempre me lembrarem do que realmente importa e por estarem ao meu lado ao longo dessa jornada. Sou grata por compartilharmos momentos inesquecíveis: os cafés, as risadas e até os silêncios que também falam tanto. Amo vocês!

Por fim, meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

## EPÍGRAFE

*“Educar verdadeiramente não é ensinar fatos novos ou enumerar fórmulas prontas,  
mas sim preparar a mente para pensar.”*  
Albert Einstein

*“Ele fortalece o cansado e dá grande vigor ao que está sem forças... mas aqueles que  
esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias; correm e não ficam  
exaustos, andam e não se cansam.”*  
Isaías 40:29-31"

## RESUMO

A infecção por SARS-CoV-2, causador da COVID-19, desencadeia distintos padrões patofisiológicos, resultando em alterações e desequilíbrio na resposta imunológica do hospedeiro. Em casos graves, ocorre uma inflamação pulmonar intensa, com impactos sistêmicos. A tempestade de mediadores, incluindo lipídios e citocinas, nos pacientes graves contribui para o dano tecidual. Os esfingolipídios (SL) desempenham papéis fundamentais em diversos processos celulares e teciduais, incluindo a regulação da inflamação, distúrbios metabólicos e até carcinogênese. Nossa pesquisa utilizou espectrometria de massa de alta resolução e análise de *RNAseq* para examinar o metabolismo dos SL em amostras de plasma de indivíduos controle (n = 55), pacientes com COVID-19 (n = 204) e indivíduos convalescentes (n = 77), correlacionando esses dados com parâmetros clínicos e inflamatórios relacionados à gravidade da doença. Além disso, investigamos *in vitro* o papel do receptor 1 de S1P (S1PR1) na replicação viral do SARS-CoV-2 e na atividade inflamatória em culturas de células humanas THP-1 semelhantes a macrófagos. Nossas análises revelaram alterações de espécies de SL no plasma dos participantes do estudo. As alterações mais relevantes foram observadas em pacientes com doença grave. As espécies de esfingomielina (SM) d18:1/24:0 e d18:1/24:1 foram identificadas como potenciais biomarcadores de gravidade. Além disso, notamos uma diminuição na expressão de enzimas envolvidas na via do S1P e seu receptor S1PR1, em células sanguíneas de pacientes graves com COVID-19. Observamos também, que a síntese de S1P está relacionada aos esforços do organismo para transitar para a fase de recuperação e resolução da COVID-19, embora não pareça exercer um papel anti-inflamatório definido. Nossos experimentos *in vitro* demonstraram que o bloqueio do receptor S1PR1 teve eficácia na redução da replicação viral e na modulação da resposta imune exacerbada. Assim, nossos resultados ressaltam a interação entre a produção de S1P e esfingomielinas (SM), identificadas como potenciais biomarcadores de gravidade, com o sistema imunológico na COVID-19.

**Palavras-chaves:** Esfingolipídios, Biomarcador, Esfingosina-1-fosfato (S1P), SARS-CoV-2, COVID-19.

## ABSTRACT

The SARS-CoV-2 infection, responsible for COVID-19, initiates diverse pathophysiological pathways, leading to changes and disruptions in the host's immune response. Severe cases often manifest intense pulmonary inflammation with systemic repercussions. The storm of mediators, including lipids and cytokines, in severe patients contributes to tissue damage. Sphingolipids (SL) play fundamental roles in various cellular and tissue processes, including inflammation regulation, metabolic disorders, and even carcinogenesis. Our research used high-resolution mass spectrometry and RNAseq analysis to examine SL metabolism in plasma samples from control individuals (n = 55), COVID-19 patients (n = 204), and convalescent individuals (n = 77), correlating these data with clinical and inflammatory parameters related to disease severity. Additionally, we investigated in vitro the role of Sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) in SARS-CoV-2 viral replication and inflammatory activity in THP-1 human cell cultures resembling macrophages. Our analyses revealed alterations in SL species in the plasma of study participants, with the most significant changes observed in severe disease patients. The sphingomyelin (SM) species d18:1/24:0 and d18:1/24:1 were identified as potential severity biomarkers. Additionally, we observed a decrease in the expression of enzymes involved in the S1P pathway and its receptor S1PR1 in blood cells from severe COVID-19 patients. We also noted that S1P synthesis is related to the body's efforts to transition to the recovery and resolution phase of COVID-19, although it does not seem to exert a defined anti-inflammatory role. Our in vitro experiments demonstrated that blocking the S1PR1 receptor was effective in reducing viral replication and modulating the exacerbated immune response. Thus, our findings highlight the interaction between S1P production and sphingomyelins (SM), identified as potential severity biomarkers, with the immune system in COVID-19.

**Key words:** Sphingolipids, biomarker, Sphingosine-1-phosphate (S1P), SARS-CoV-2, COVID-19.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação dos participantes do estudo conforme à gravidade da COVID-19....	26
<b>Tabela 2:</b> Sequências de Primers e sondas para detecção do genoma SARS-CoV-2 e gene <i>housekeeping</i> . .....	32

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Distribuição dos casos de COVID-19 até 04 de fevereiro de 2024. ....	12
<b>Figura 2:</b> Representação da estrutura e principais proteínas do SARS-CoV-2. ....	13
<b>Figura 3:</b> Principais etapas do ciclo de replicação do SARS-CoV-2 nas células do hospedeiro. ....	14
<b>Figura 4:</b> Eventos imunes envolvidos na imunopatogenese da COVID-19. ....	16
<b>Figura 5:</b> Biossíntese dos esfingolipídios. (SPT: serina palmitoiltransferase; KDR: 3-ceto-dihidroesfingosina redutase; CerS: ceramida sintase; CSase: ceramidase; Des: desaturase; SphK: esfingosina quinase; SPP: S1P fosfatase; SMase: esfingomielinase; SMS: esfingomielina sintase; CerK: ceramida quinase; C1PP: ceramida-1-fosfato fosfatase). ....	18
<b>Figura 6:</b> Principais vias de sinalização mediadas pelo S1PR1. AC: adenilil ciclase; cAMP: AMP cíclico; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; PLC: fosfolipase C. ....	20
<b>Figura 7:</b> Esquema ilustrando as principais etapas experimentais que compõem este estudo. ....	35
<b>Figura 8. Perturbações na abundância de S1P relacionado com o prognóstico clínico em pacientes com COVID-19.</b> (A) Perfil de produção de S1P (18:1) nos grupos controle (n=55), residencial (n=58), hospitalar (n=127) e convalescentes (n = 77). (B) Estratificação do grupo residencial por gravidade de doença: leves (n=34) e moderados domiciliares (DP) (n=24). (C) Pacientes hospitalizados estratificados conforme a gravidade doença nos grupos: moderado (n=31), grave (n= 59) e crítico (n= 37) em comparação aos convalescentes e controles. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o teste de comparações múltiplas de <i>Kruskal-Wallis</i> (não paramétrico), seguido do pós-teste de <i>Dunn</i> para comparações pareadas. Os resultados são apresentados na forma de medianas em gráficos boxplot. Os níveis de significância são indicados pela presença de valores de $p < 0,05$ , evidenciando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. ....	40
<b>Figura 9. Análise de fatores farmacológicos e antropométricos na produção de S1P em pacientes com COVID-19.</b> Produção de S1P em relação a (A) terapia com glicocorticóides, (B) sexo (masculino - <i>Man</i> e feminino - <i>Woman</i> ) e (C) Índice de Massa Corporea (IMC, do inglês <i>IBM</i> ). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o teste de comparações múltiplas de <i>Kruskal-Wallis</i> (não paramétrico), seguido do pós-teste de <i>Dunn</i> para	

comparações pareadas. Os resultados são apresentados na forma de medianas em gráficos boxplot. Os níveis de significância são indicados pela presença de valores de  $p < 0,05$ , evidenciando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. ....41

**Figura 10. Matriz de correlação das interações entre S1P e parâmetros clínicos e inflamatórios na COVID-19.** A barra lateral na esquerda indicam os coeficientes de correlação ( $r$ ) de Spearman: o vermelho indica correlação positiva, enquanto o azul indica correlação negativa. Os valores de  $r$  variam entre -1,0 e 1,0. A barra lateral da direita indica os níveis de significância do teste de correlação, considerando  $p < 0,05$ . BMI: Índice de Massa corporal; INR: razão normalizada internacional; RNL: Razão Neutrófilo Linfócito; PCR: Proteína C Reativa. TNF: Fator de necrose tumoral. ....43

**Figura 11. Expressão genética de enzimas metabólicas e receptores da via de S1P em pacientes com COVID-19.** (A) Agrupamento hierárquico em mapa de calor baseado na intensidade de expressão de genes relacionados a via S1P na gravidade do COVID-19. Análise quantitativa da expressão dos genes: (B) esfingosina quinase 1 (SPHK1); (C) SPHK2; (D) receptor de esfingosina-1-fosfato (S1PR1); (E) S1PR2; (F) S1PR4 e (G) S1PR5, em células circulantes de indivíduos controle ( $n = 12$ ), leve ( $n = 12$ ), moderado ( $n = 14$ ), grave ( $n = 14$ ) e crítico ( $n=14$ ). SGPP2/SSP: esfingosina-1-fosfato fosfatase 2; CERK: ceramida quinase; ASAH1: N-acilesfingosina amidohidrolase/ceramidase ácida; CERS: ceramida sintase; CSase: ceramidase; SphK: esfingosina quinase; SPP: fosfatase S1P. Dados em  $\log_2$  dos perfis de expressão gênica normalizados para os grupos analisados estão mostrados como *boxplots*. Diferenças significativas na expressão gênica correspondem aos valores  $p$  ajustados de Benjamini e Hochberg, obtidos a partir da análise de expressão diferencial do transcriptoma completo, considerando um limiar  $p < 0,05$  em pelo menos um par de grupos clínicos. ....44

**Figura 12. Análise de citotoxicidade nos tratamentos farmacológicos de macrófagos THP-1.** As células foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de S1P, FTY720 (Análogo de S1P), SK-I/II (Inibidor da enzima Sphk1/2, produtora de S1P) e W146 (Antagonista do receptor S1PR1). As análises estatísticas foram realizadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de *Tukey* ( $p < 0,05$ ). ....45

**Figura 13. Efeito do tratamento com S1P nas funções dos macrófago infectados por SARS-CoV-2.** O tratamento com S1P nas concentrações de  $1\mu\text{M}$  e  $5\mu\text{M}$  *in vitro* na produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6 e (C) carga viral em macrófagos THP-1 infectados com SARS-CoV-2

(MOI 1.0) por 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de *Tukey*, considerando significância para  $p < 0,05$ . ..... 46

**Figura 14. Efeito do tratamento profilático com FTY720 (Análogo de S1P) nas funções dos macrófago infectados por SARS-CoV-2.** O tratamento profilático com FTY720 nas concentrações de 1 $\mu$ M e 5 $\mu$ M *in vitro* na produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6 e (C) carga viral em macrófagos THP-1 infectados com SARS-CoV-2 (MOI 1.0) por 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de *Tukey*, considerando significância para  $p < 0,05$ . ..... 47

**Figura 15. Efeito do tratamento profilático com SKI-II (inibidor da síntese de S1P) nas funções dos macrófagos infectados por SARS-CoV-2.** O tratamento profilático com SKI-II nas concentrações de 1, 5 e 10 $\mu$ M *in vitro* na produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6 e (C) carga viral em macrófagos THP-1 infectados com SARS-CoV-2 (MOI 1.0) por 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de *Tukey*, considerando significância para  $p < 0,05$  ..... 48

**Figura 16. Efeito do tratamento profilático com W146 (antagonista do receptor S1PR1) nas funções dos macrófago infectados por SARS-CoV-2.** O tratamento profilático com W146 na concentração de 10  $\mu$ M *in vitro* na produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6 e (C) carga viral em macrófagos THP-1 infectados com SARS-CoV-2 (MOI 1.0) por 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de *Tukey*, considerando significância para  $p < 0,05$ . ..... 49

**Figura 17. Tratamento com FTY720 estimula a respiração mitocondrial em células epiteliais.** ..... 59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilil ciclase
ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
ANOVA	Análise de Variância
AUC	Área sobre a curva
BMI	Índice de Massa corporal (IMC)
C1P	Ceramida-1-fosfato
C1PP	Ceramida-1-fosfato fosfatase
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CALU-3	Células de adenocarcinoma de pulmão
cAMP	AMP cíclico
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL/ CXCL	Quimiocina
CD	<i>Cluster</i> de Diferenciação
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
cDNA	DNA complementar
CEQIL	Centro de Excelência de Quantificação e Identificação de Lipídios
Cer	Ceramida
CerK	Ceramida quinase
CerS	Ceramida sintase
CerS	Ceramida sintase
COVID-19	Doença do coronavírus 2019
Csase	Ceramidase
DAMP	Padrões moleculares associados ao perigo, do inglês <i>Danger-associated Molecular Pattern</i>
Des	Desaturase
dHCer	Diidroceramida
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsRNA	RNA de fita dupla
E3	Ubiquitina ligase
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-cético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK1/2	Quinases reguladas por sinal extracelular
ESI	Fonte de ionização por <i>electrospray</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FFCLRP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
FiO <sub>2</sub>	Fração inspirada de oxigênio
G-CSF	Fator estimulador de Colônias Granulocíticas
GeBIL	Grupo de Estudos em Biotecnologia e Imunoquímica de Lipídios
H1N1	Influenza A subtipo H1N1
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HexCer	Hexoglicosilceramida
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance

IC	Intervalo de Confiança
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Oxido nítrico-sintase induzida
INR	Razão normalizada internacional
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon-gama (CXCL10)
IQR	Intervalo interquartil
IRF3	Fator Regulador de Interferon
JNK	Proteína c-Jun N-terminal cinase
KDR	3-ceto-dihidroesfingosina
LacCer	Lactosilceramida
LC-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LIIP	Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses
MCP-1	Proteína 1 quimioatraente de monócitos (CCL2)
MDA5	Gene 5 associado à diferenciação de melanoma
MIP-1 $\alpha$	Proteína Inflamatória de Macrófagos 1-alfa
MOI	Multiplicidade de infecção
MRM-HR	Monitoramento de reações múltiplas em alta resolução
NF-K $\beta$	Fator nuclear kappa B
NF-K $\beta$	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento neural
NKT	Célula <i>natural killers</i> T
NOD	Receptor semelhante ao domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos
NS	Não estrutural
OD	Oddis Ratio
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Quadro aberto de leitura, do inglês <i>Open Reading Frame</i>
P53	Gene supressor tumoral proteína 53 kDa
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PaO <sub>2</sub>	Pressão parcial de oxigênio
Pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PCR	Proteína C Reativa
PE	Fluorocromo ficoeritrina
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
PKC $\epsilon$	Proteína quinase tipo C
PLC	Fosfolipase C
PLC	fosfolipase C
PLS-DA	Análise discriminante de mínimos quadrados parciais
PPAR $\gamma$	Receptor nuclear ativado por proliferador de peroxissoma
PPGIBA	Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
RAC	<i>Rac Family Small GTPase</i>
RdRp	RNA Polimerase dependente de RNA

RE	Retículo endoplasmático
RIG-I	Gene I induzível pelo ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucleico
RNL	Razão neutrófilos-linfócitos
RNL	razão neutrófilos-linfócitos
ROC	Curva Característica de Operação do Receptor
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
S1P	Esfingosina-1-fosfato
S1PR	Receptor de S1P
SARS-CoV-2	do inglês, <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SDS	Dodecil- sulfato de sódio
SL	Esfingolipídios
SM	Esfingomielina
Smase	Esfingomielinase
SMS	Esfingomielina sintase
SphK	Esfingosina quinases
SPP	S1P fosfatase
SPT	Serina palmitoiltransferase
SREBP-1	Proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol do fator de transcrição
ssRNA	RNA de fita simples com polaridade positiva
STAT	JAK-STAT – JAK (cinase Janus), STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMPRSS2	Serina protease transmembrana 2 celular
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAF2	Receptor de TNF associado ao fator 2
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
Vero CCL-81	Células epiteliais renais extraídas de um macaco verde africano
VIP	Importância da Variável na Projeção
VLDL	Lipoproteínas de densidade muito baixa

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
2.1 Aspectos epidemiológicos.....	12
2.2 Classificação e características estruturais do SARS-CoV-2 .....	12
2.3 Aspectos clínicos da infecção por SARS-CoV-2.....	14
2.4 Imunopatogênese da COVID-19.....	15
2.5 Bioquímica e metabolismo de esfingolípídios .....	17
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>22</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Objetivo geral.....	23
4.2 Objetivos específicos .....	23
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
5.1 Aspectos éticos.....	24
5.2 Tipo de estudo.....	24
5.3 Área de estudo.....	24
5.4 População de estudo.....	24
5.5 Tamanho da amostra .....	26
5.6 Critérios de elegibilidade.....	27
5.6.1 Critérios de inclusão.....	27
5.6.2 Critérios de exclusão.....	27
5.7 Coleta das amostras de sangue periférico .....	27
5.8 Avaliação de SL em amostras de sangue periférico .....	27
5.8.1 Extração líquido-líquido e preparação de amostras para LC-MS/MS .....	28
5.8.2 Quantificação de SL por LC-MS/MS .....	28
5.9 Dosagem de citocinas plasmáticas por <i>Cytometric Bead Array</i> - CBA.....	29
5.10 Avaliação de expressão gênica de genes relacionados à via dos esfingolípídios e ceramidas por RNA <i>Sequencing</i> (RNA-Seq) em amostras de sangue periférico.....	30
5.11 Avaliação <i>in vitro</i> do papel de S1P e S1PR1 na replicação viral do SARS-CoV-2 e atividade inflamatória .....	30
5.11.1 Cultura de células THP-1 .....	30
5.11.2 Ensaio de citotoxicidade celular .....	31
5.11.3 Preparação do inóculo viral.....	31
5.11.4 Tratamento farmacológico profilático e infecção por SARS-CoV-2 em células THP-1.....	31

5.11.5	Quantificação da carga viral do SARS-CoV-2 .....	32
5.11.6	Dosagem de citocinas do sobrenadantes de cultura por ensaio imunoenzimático (ELISA) .....	33
5.12	Análises estatísticas.....	33
5.13	Fonte de Financiamento .....	34
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
6.1	CAPÍTULO I: Artigos originais publicados relacionados ao metabolismo de esfingolípídios (SL). .....	37
	Artigo 1: Plasma Sphingomyelin Disturbances: Unveiling Its Dual Role as a Crucial Immunopathological Factor and a Severity Prognostic Biomarker in COVID-19.....	37
	Artigo 2: High-resolution targeted mass spectrometry for comprehensive quantification of sphingolipids: clinical applications and characterization of extracellular vesicles.....	38
6.2	CAPÍTULO II: Resultados e Discussão do capítulo II: Investigação da associação entre a produção de S1P e os parâmetros clínicos e inflamatórios em pacientes com COVID-19. ....	39
6.2.1	Perfil plasmático do metabólito bioativo S1P nos diferentes quadros clínicos da COVID-19.	39
6.2.2	Correlações da produção de S1P com os parâmetros clínicos e imunológicos em pacientes com COVID-19.....	42
6.2.3	Expressão gênica de receptores e enzimas envolvidas na via de S1P em pacientes com COVID-19.....	43
6.2.4	Avaliação do papel de S1P e S1PR1 na replicação viral do SARS-CoV-2 e na atividade inflamatória de macrófagos.....	44
<b>6.3</b>	<b>DISCUSSÃO (CAPÍTULO II) .....</b>	<b>50</b>
<b>6.4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>CAPÍTULO III: .....</b>	<b>53</b>
7.1	Lista dos manuscritos publicados durante o período do doutorado, em colaboração com os Consórcios IMUNOCOVID e AEROBICOVID. ....	53
	Artigo 1: Plasma Sphingomyelin Disturbances: Unveiling Its Dual Role as a Crucial Immunopathological Factor and a Severity Prognostic Biomarker in COVID-19.....	53
	Artigo 2: High-resolution targeted mass spectrometry for comprehensive quantification of sphingolipids: clinical applications and characterization of extracellular vesicles.....	53
	Artigo 3: sTREM-1 Predicts Disease Severity and Mortality in COVID-19 Patients: Involvement of Peripheral Blood Leukocytes and MMP-8 Activity. ....	54
	Artigo 4: Matrix Metalloproteinases on Severe COVID-19 Lung Disease Pathogenesis: Cooperative Actions of MMP-8/MMP-2 Axis on Immune Response through HLA-G Shedding and Oxidative Stress.....	54
	Artigo 5: Acetylcholine, Fatty Acids, and Lipid Mediators Are Linked to COVID-19 Severity..	55
	Artigo 6: The Interplay among Glucocorticoid Therapy, Platelet-Activating Factor and Endocannabinoid Release Influences the Inflammatory Response to COVID-19. ....	55

Artigo 7: Divergent androgenic modulation of SARS-CoV-2 infection cooperates with dysregulated immune response to dictate worse COVID-19 outcomes in men. ....	56
Artigo 8: The Severity of COVID-19 Affects the Plasma Soluble Levels of the Immune Checkpoint HLA-G Molecule.....	56
Artigo 9: Effects of Moderate-Intensity Training Under Cyclic Hypoxia on Cardiorespiratory Fitness and Hematological Parameters in People Recovered From COVID-19: The AEROBICOVID Study.....	57
Artigo 10: The turning point of COVID-19 severity is associated with a unique circulating neutrophil gene signature. ....	57
7.2 Resumo das atividades realizadas durante o período de Doutorado Sanduíche na <i>University of Nebraska</i> , EUA. ....	58
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>73</b>
Apêndice 1: Termo de aprovação do comitê de ética em Pesquisa (CEP- CAAE) IMUNOCOVID 30525920.7.0000.5403.....	73
Apêndice 2: Termo de aprovação do comitê de ética em Pesquisa do estudo AEROBICOVID (CAAE: 33783620.6.0000.5659 e CAAE: 33783620.6.3001.5403) .....	79
Apendice 3: Razão m/z do íon precursor e íon fragmento das subclasses e espécies lipídicas identificadas por LC/MS-MS.....	81

## INTRODUÇÃO

O agente responsável pela COVID-19 (do inglês, *coronavirus disease19*), o SARS-CoV-2, foi identificado no final de 2019 e resultou em mais de 774 milhões de casos e 7 milhões de óbitos globalmente até 2024 (1–3). Ainda que a maioria dos indivíduos possam ser assintomáticos ou manifestar sintomas leves, alguns pacientes, podem progredir para a forma grave da doença. As principais manifestações clínicas em pacientes graves foram síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), distúrbios cardiovasculares, coagulopatia, choque séptico, hiperinflamação, falência de múltiplos órgãos e, em casos extremos, óbito (4–8,8–11). Além das características virológicas, a ocorrência desses diferentes desfechos clínicos pode estar relacionada com variações na resposta imune (12).

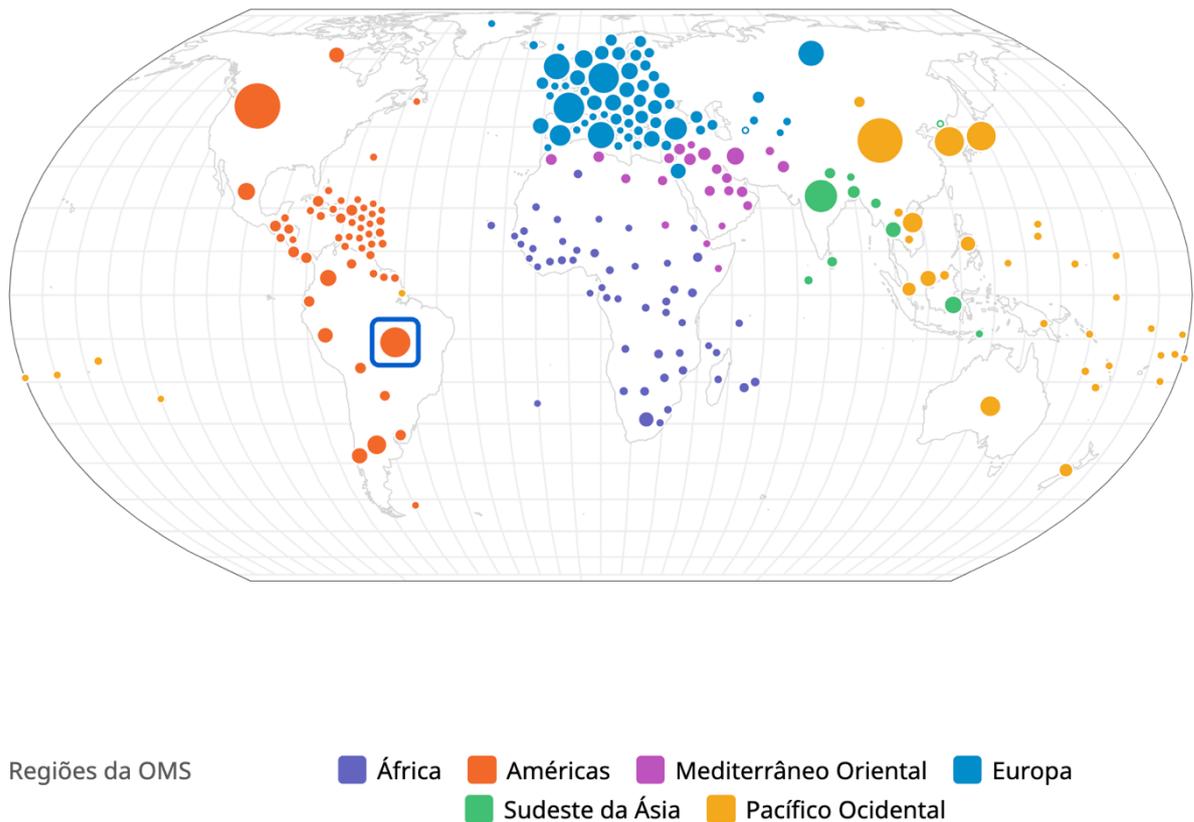
Os esfingolipídios (SL) representam a segunda maior classe de lipídios de membrana e desempenham múltiplos papéis como moléculas sinalizadoras. Eles estão envolvidos em processos celulares fundamentais, como crescimento celular, sobrevivência, migração de células imunes, integridade vascular e epitelial, além de desempenharem um papel crucial na regulação da inflamação e no desenvolvimento do câncer (13). As Ceramidas (Cer), esfingosinas (Sph) e esfingomielinas (SM), entre outros metabólitos, compõem os principais constituintes desse vasto complexo de biomoléculas (60).

A esfingosina-1-fosfato (S1P) é um mediador lipídico bioativo que desempenha funções cruciais em diversas atividades celulares, como migração, diferenciação e sobrevivência celular. A S1P é produzida a partir da esfingosina pelas esfingosina quinases (SphK1 e SphK2). Posteriormente, é secretada para o espaço extracelular, onde se liga aos receptores acoplados à proteína G, conhecidos como receptores S1P (S1PR1-5), para modular o comportamento celular (14). Além disso, a S1P induz a ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB), que regula diversos aspectos das funções imunes inatas e adaptativas, desempenhando um papel central nas respostas inflamatórias (15,16). No entanto, a S1P também demonstrou atividade anti-inflamatória ao induzir a polarização de macrófagos M1 (perfil pró-inflamatório) para o perfil M2 (anti-inflamatório) (17,18). Entretanto, pouco se sabe sobre a participação dos SL no processo inflamatório em pacientes com COVID-19. Além disso, ainda não está claro a possível participação desses lipídios na evolução da doença. Assim, temos proposto que os SL são importantes moduladores da imunidade inata e adaptativa e a produção destes mediadores na COVID-19 necessita ser melhor investigado.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos epidemiológicos

Globalmente, foram confirmados 774.593.066 casos de COVID-19 e 7.028.881 mortes até fevereiro de 2024. No Brasil, até a mesma data, foram confirmados 38.374.307 de casos e 709.601 mortes, com 1,8% de letalidade (19,20) (**Figura 1**).

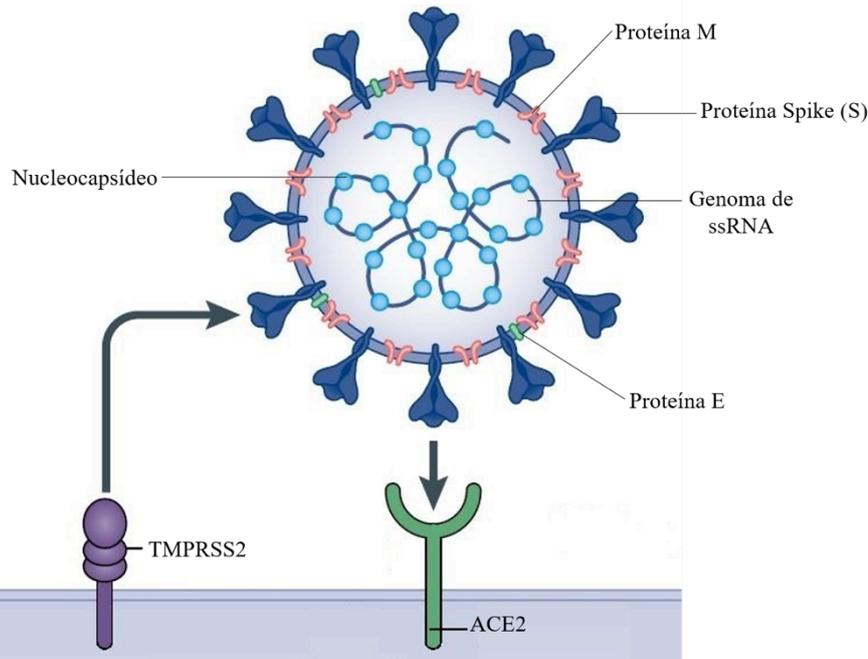


**Figura 1:** Distribuição dos casos de COVID-19 até 04 de fevereiro de 2024.

Fonte: (3).

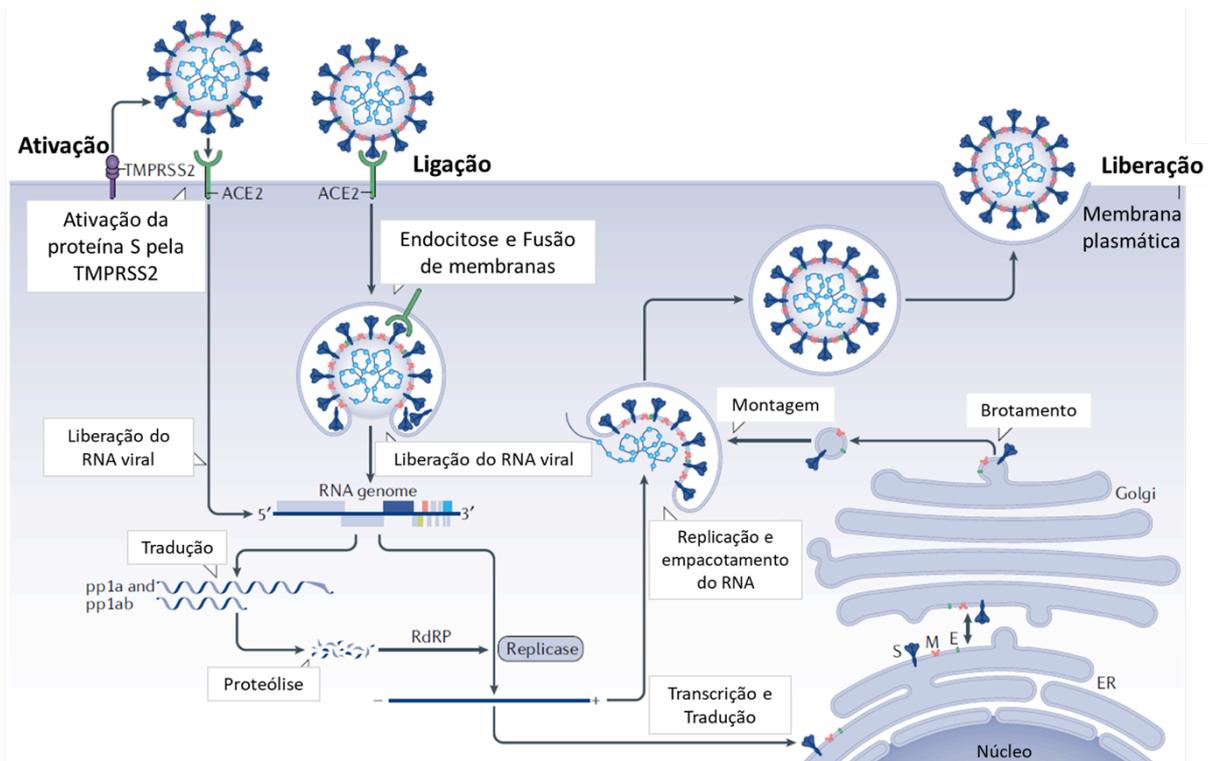
### 2.2 Classificação e características estruturais do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é classificado como um membro da família *Coronaviridae*, pertencente ao gênero *Betacoronavirus*. Ele é categorizado no grupo IV de acordo com a classificação de Baltimore, possuindo um genoma de RNA de fita simples com polaridade positiva (ssRNA), que varia de aproximadamente 26 a 32kb. A partícula viral é envelopada e tem uma morfologia esférica, com um diâmetro que varia entre 100 e 160 nm (**Figura 2**) (21–23).



**Figura 2:** Representação da estrutura e principais proteínas do SARS-CoV-2.  
**Fonte:** Adaptado de (24).

O SARS-CoV-2 se liga às células alvo dos hospedeiros através do domínio peptidase da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que é altamente expressa em células epiteliais respiratórias. A clivagem da proteína S viral é mediada pela serino-protease transmembrana tipos 2 e 11D (TMPRSS2, TMPRSS11D), que expõe uma região denominada “peptídeo de fusão” e desencadeia a fusão entre o envelope viral e as membranas celulares, permitindo a entrada do vírus (25,26). O RNA genômico viral, após ser liberado no citoplasma da célula, é inicialmente traduzido na ORF1, gerando as poliproteínas pp1a e pp1ab, que são clivadas por proteases virais (3CLpro e Mpro) em proteínas não estruturais (NSP1– NSP16), incluindo a RNA polimerase dependente de RNA (RdRP). A RdRP é responsável por copiar a fita de RNA (+) em RNA (-), que serve como molde para a síntese do RNA genômico. As proteínas estruturais (S, E, M e N) são traduzidas no retículo endoplasmático da célula hospedeira. Posteriormente, o RNA genômico e as proteínas estruturais se organizam para formar novas partículas virais, que são então liberadas por exocitose (**Figura 3**) (24,25,27).



**Figura 3:** Principais etapas do ciclo de replicação do SARS-CoV-2 nas células do hospedeiro.  
**Fonte:** Adaptado de (24).

### 2.3 Aspectos clínicos da infecção por SARS-CoV-2

As principais manifestações clínicas da COVID-19 podem variar de sintomas leves até quadros grave e críticos da doença. Os principais sintomas descritos são febre (83%), tosse (82%), falta de ar (31%), dor muscular (11%), confusão (9%), dor de cabeça (8%), dor de garganta (5%), rinorréia (4%), dor no peito (2%), diarreia (2%) e náusea e vômito (1%). As complicações mais comuns são Síndrome Respiratória Aguda Grave (17-29%), lesão cardíaca aguda (12%) e infecções secundárias (10%) (28).

A transmissão ocorre, principalmente, por meio de gotículas respiratórias liberadas por tosse ou espirro e aerossol (29). O período de incubação em média são de aproximadamente 5 a 7 dias podendo variar de 1 a 14 dias. Embora a maioria dos pacientes desenvolva doença leve a moderada, 5 a 10% progridem para forma grave ou crítica (8,30–32). A maioria dos casos de COVID-19 com complicações graves foram observados em homens, idosos, e pacientes com alguma doença de base (8,31), incluindo obesidade, diabetes, hipertensão e síndrome metabólica, cuja incidência é alta no Brasil (33).

Casos graves podem ocorrer no início do curso da doença, mas as observações clínicas geralmente descrevem uma progressão em duas etapas, começando com uma apresentação leve a moderada seguida por uma piora respiratória secundária de 9 a 12 dias após o início dos sintomas (8,34,35). A piora respiratória é concomitante com a extensão das opacidades pulmonares em vidro fosco na tomografia computadorizada do tórax, linfocitopenia, tempo de protrombina alto e aumento de dímero-D (8).

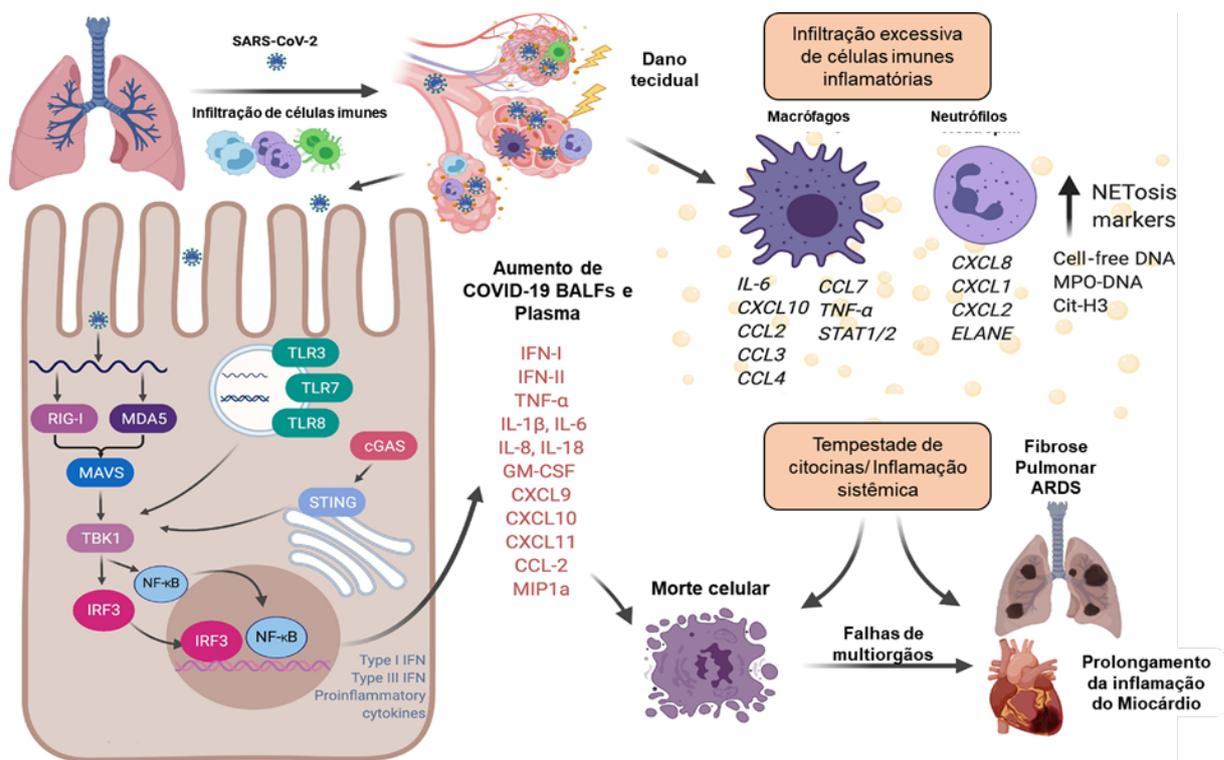
## 2.4 Imunopatogênese da COVID-19

O reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a perigo (DAMPs) pelos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) é a primeira etapa na ativação do sistema imunológico inato contra a infecção viral. Nos compartimentos endossomais, o receptor semelhante a Toll 3 (TLR-3) detecta a molécula de RNA de fita dupla (dsRNA), enquanto TLR-7 e TLR-8 reconhecem RNA de fita simples (ssRNA). No citoplasma, os receptores RIG-I (Gene I induzível pelo ácido retinóico), MDA5 (gene 5 associado à diferenciação de melanoma) e NOD (receptores semelhantes ao domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos) também podem reconhecer o ssRNA (36).

Após este reconhecimento, os PRRs induzem vias de sinalização intracelular que levam à ativação dos fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B, Fator Regulador de Interferon 3 (IRF3) e IRF7. Esses fatores de transcrição estimulam a expressão de diversos genes responsáveis pela produção de Interferons tipo I (IFN  $\alpha$  e  $\beta$ ), citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, além do aumento da expressão de moléculas coestimulatórias e moléculas de adesão endotelial para direcionar o recrutamento de células imunes para o local da infecção (36,37). A ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> é essencial e auxilia no controle da replicação e disseminação viral, bem como, na eliminação de células infectadas e regulação de danos teciduais (38,39).

A produção elevada de citocinas e quimiocinas inflamatórias estimula o recrutamento de macrófagos e neutrófilos no sítio da infecção. No entanto, a infiltração excessiva de células imunes leva a ocorrência de dano tecidual via disfunção do endotélio e vasodilatação, favorecendo o edema pulmonar, limitando a troca gasosa, levando à insuficiência respiratória (**Figura 4**) (36,37). Os casos graves de COVID-19 podem apresentar uma tempestade de citocinas associada à síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), com elevadas concentrações de mediadores inflamatórios, incluindo IL-2, IL-6, IL-

7, IL-10, G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  (8,40–45). Enquanto a resposta de IFN tipo I está bastante prejudicada em pacientes graves e críticos (com nenhuma atividade de IFN- $\beta$  e baixa produção de IFN- $\alpha$ ), associada a uma carga viral persistente no sangue e uma resposta inflamatória exacerbada, parcialmente impulsionada por NF- $\kappa$ B (46). Além disso, foi descrito a ocorrência de tempestade lipídica nos pulmões de pacientes graves com aumento de ciclooxigenase e metabólitos inflamatórios derivados da lipoxigenase (47).



**Figura 4:** Eventos imunes envolvidos na imunopatogênese da COVID-19.  
**Fonte:** Adaptada de (37).

O SARS-CoV-2 é capaz de induzir a produção de anticorpos, no entanto os títulos desses anticorpos são dependentes da gravidade da doença e carga viral (48). Além disso, pacientes com COVID-19 hospitalizados normalmente manifestam linfopenia, sugerindo que a imunidade celular pode estar comprometida pela ação do vírus (32,49). Qin et al., (2020) observaram que pacientes graves tendem a apresentar baixas contagens de linfócitos; leucocitose; elevada razão neutrófilos-linfócitos (RNL); redução nas células T auxiliares e nas células T reguladoras; menor frequência relativa de monócitos, eosinófilos e basófilos; aumento na porcentagem de células T auxiliares naïve e diminuição nas células T auxiliares de memória.

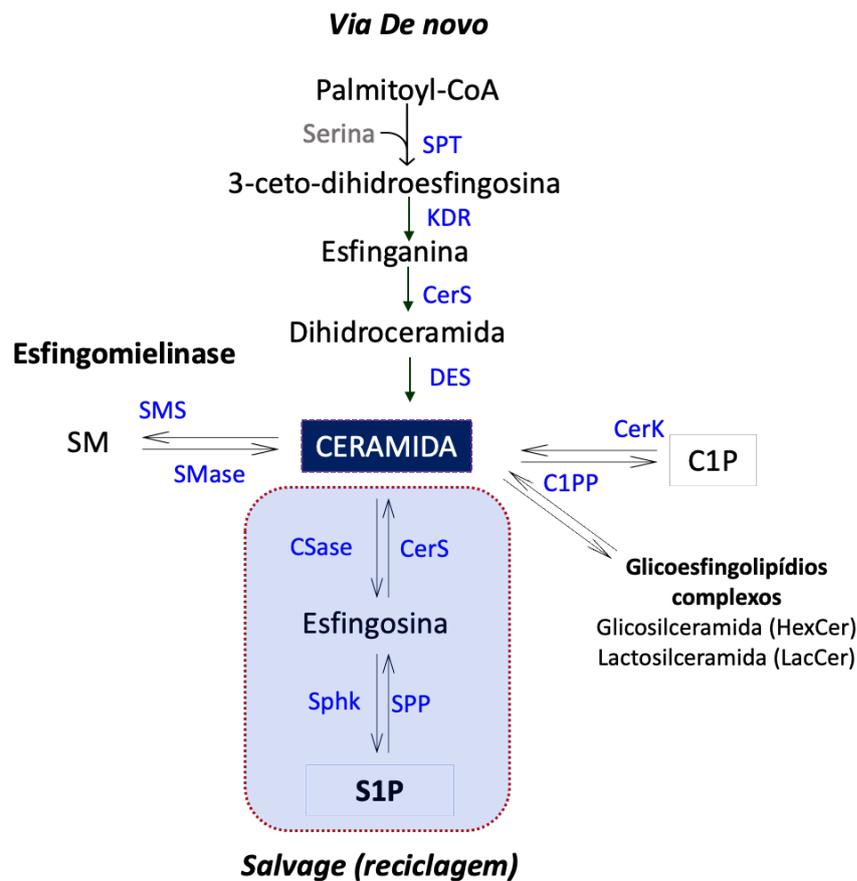
Células de lavado broncoalveolar e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de paciente com COVID-19 mostraram maior expressão dos genes de quimiocinas *Ccl2*, *Mcp-1*, *Cxcl10*, *Ccl3*, *Ccl4* e *Mip-1 $\alpha$* , e aumento da apoptose-induzida via sinalização de P53, o que pode estar associada com a linfopenia dos pacientes e com a imunossupressão nos sobreviventes (50). Além disso, para que ocorra a saída dos linfócitos de órgãos linfoides, é essencial a ação da S1P um importante mediador lipídico pleiotrópico, da classe dos SL, envolvido na regulação de diversos processos fisiopatológicos em diferentes tipos celulares, incluindo aquelas do sistema imune inato e adaptativo (13,51).

## 2.5 Bioquímica e metabolismo de esfingolipídios

Os SL representam a segunda maior classe de lipídios de membrana e desempenham funções essenciais como moléculas sinalizadoras. Eles estão envolvidos em diversos processos celulares, incluindo proliferação, crescimento celular, sobrevivência, reorganização do citoesqueleto, adesão, migração de células imunes, manutenção da integridade vascular e epitelial, além de desempenharem um papel significativo na regulação da inflamação e no desenvolvimento do câncer (13).

A ceramida (Cer) é considerada a molécula central no metabolismo dos SL (52) e pode ser sintetizada a partir de três vias diferentes (**Figura 5**): **I**) Na via *de novo*, por condensação de serina e palmitato (palmitoil-CoA) no retículo endoplasmático com ação da enzima serina palmitoil-CoA transferase, formando a 3-ceto-dihidroesfingosina (KDR), que, por sua vez, é convertida em dihidroesfingosina, a qual é acetilada em dihidroceramida pela ceramida sintase (CerS), e a sua dessaturação resulta na formação de Cer (15,53). **II**) através do catabolismo da esfingomielina (SM) na via da esfingomielinase (SMase) (54,55) e **III**) através do catabolismo de SL complexos na via de reciclagem ou catabólica (*salvage pathway*) (56).

Diferentes SL são gerados a partir do metabolismo da Cer. Sua fosforilação pela enzima ceramida quinase (CerK) resulta na formação de ceramida-1-fosfato (C1P) (57). A ceramidase (CSase) catalisa a quebra da Cer em esfingosina (Sph), que pode ser convertida de volta em Cer pela ceramida sintase (CerS) ou fosforilada pelas esfingosina quinases (SphK) para produzir S1P (**Figura 5**) (58,59).



**Figura 5:** Biossíntese dos esfingolipídios. (SPT: serina palmitoiltransferase; KDR: 3-ceto-dihidroesfingosina redutase; CerS: ceramida sintase; CSase: ceramidase; Des: desaturase; SphK: esfingosina quinase; SPP: S1P fosfatase; SMase: esfingomielinase; SMS: esfingomielina sintase; CerK: ceramida quinase; C1PP: ceramida-1-fosfato fosfatase).

**Fonte:** Adaptada de (60).

As Cer podem ativar o fator de transcrição pró-inflamatório NF- $\kappa$ B e estão relacionadas à regulação do estresse, senescência celular e apoptose (61,62). Sua produção é desencadeada por fatores de estresse celular, como TNF- $\alpha$ , fator de crescimento neural (NGF), IL-1 $\beta$ , agentes quimioterápicos e senescência celular (54,59). Especificamente, as Cer têm sido implicadas na infecção de células hospedeiras por diversos patógenos bacterianos e virais, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, micobactérias, vírus do sarampo e rinovírus (63). Embora as Cer sejam produzidas dentro das células, elas também podem ser detectadas em fluidos biológicos, como plasma ou lavado broncoalveolar, onde se ligam a proteínas transportadoras ou microvesículas lipídicas derivadas da membrana plasmática celular (64).

A desacetilação da Cer dá origem à esfingosina-1-fosfato (S1P), que desempenha um papel crucial na regulação da motilidade e invasão celular, angiogênese, maturação vascular,

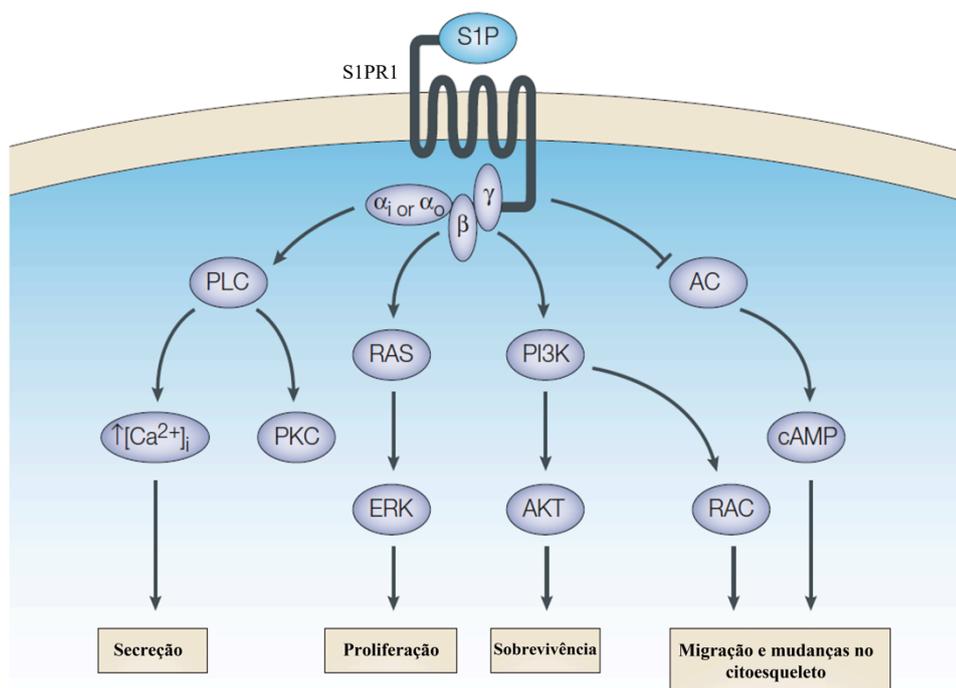
migração de linfócitos e resposta imune. Além disso, sua presença está associada a condições como câncer, alergias, aterosclerose e doenças autoimunes (59,65). A S1P é encontrada em menores concentrações nos tecidos e em concentrações mais elevadas na circulação sanguínea (~ 0.5 a 1 uM) e na linfa (~ 0.1 uM), formando um gradiente de concentração de S1P que regula o tráfego dos linfócitos (66,67).

Cerca de 65% da S1P plasmática é transportada na circulação, ligada à apoM de partículas de lipoproteína de alta densidade (HDL), enquanto 30% está ligada à albumina e pequenas quantidades estão associadas às lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) ou lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (66,68,69). Os eritrócitos produzem cerca de 75% do S1P presente no plasma, enquanto as plaquetas humanas contêm aproximadamente nove vezes mais S1P em relação aos eritrócitos. No entanto, considerando que os eritrócitos representam cerca de 95% das células sanguíneas, sua contribuição total para a concentração de S1P no sangue é maior. Além disso, as plaquetas não possuem as enzimas responsáveis pela degradação do S1P. As células endoteliais também contribuem para a produção de S1P no plasma (70–72).

A S1P é gerada pela fosforilação direta da Sph livre por enzimas conhecidas como esfingosina quinases (SphK1 e SphK2) (**Figura 5**) (73). Essas duas isoformas de quinases, juntamente com fosfatases, desempenham um papel crucial no equilíbrio entre a Sph e a S1P (74–76). A enzima SphK1 é predominantemente citoplasmática, associando-se à membrana plasmática, fagossomas e vesículas endossomais. Por outro lado, a SphK2 é encontrada em diversos compartimentos celulares, como o retículo endoplasmático, as mitocôndrias ou o núcleo, variando conforme o tipo celular (70,77), sendo mais presente no compartimento nuclear (78).

A S1P extracelular exerce sua ação por meio de uma família de receptores de S1P (S1PR1 a 5), que estão acoplados a proteínas G (79,80). Quando ativados, esses receptores desencadeiam vias efetoras e respostas celulares específicas, como secreção, proliferação, sobrevivência e migração celular (**Figura 6**) (81). O S1PR1 é expresso na maioria das células imunes e regula a migração dos linfócitos, células natural killers (NKT), células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, mastócitos e osteoclastos (51). Os outros receptores, S1PR2, S1PR3, S1PR4 e S1PR5, têm uma distribuição mais restrita nas células do sistema imunológico. A expressão seletiva desses receptores por determinadas populações de células imunes oferece uma regulação específica das suas funções efetoras. As células T expressam

predominantemente S1PR1 e S1PR4; os mastócitos e macrófagos expressam S1PR1 e S1PR2, enquanto as células dendríticas e células NK expressam S1PR5. (17,82).



**Figura 6:** Principais vias de sinalização mediadas pelo S1PR1. AC: adenilil ciclase; cAMP: AMP cíclico; ERK: quinase regulada por sinal extracelular; PI3K: fosfatidilinositol 3-quinase; PLC: fosfolipase C.

A S1P também é capaz de se ligar ao receptor de TNF associado ao fator 2 (TRAF2) e estimular a atividade da ubiquitina ligase (E3), e assim ativar a via do NF- $\kappa$ B, o qual regula vários aspectos das funções imunes inatas e adaptativas e serve como um mediador central das respostas inflamatórias (15,16). A S1P intracelular também ativa o fator de transcrição NF- $\kappa$ B por meio de TRAF2, contribuindo mais uma vez para a ativação imune (73).

No entanto, o papel do metabólito bioativo S1P na inflamação ainda é controverso, exibindo propriedades pró e anti-inflamatórias, dependendo do tipo de célula em que são geradas e do microambiente (83). Por exemplo, foi observado que a S1P pode promover a transição de macrófagos M1 (perfil pró-inflamatório) para o perfil M2 (anti-inflamatório) (17,18). Além disso, foi relatado que a S1P ligada a lipoproteínas de alta densidade (HDL) limita a linfopoiese e a neuroinflamação em camundongos, em contraste com sua ligação à albumina (84).

Além disso, diversos vírus induzem reprogramação metabólica celular em células do sistema imunológico, incluindo alterações na via glicólica, ciclo do ácido tricarbóxico, aminoácidos e síntese de lipídios (85–89). Por exemplo, células epiteliais brônquicas

infectadas com SARS-CoV-2 apresentaram 59 - 65% dos genes diferencialmente expressos relacionados ao metabolismo, incluindo 8 - 18% dos genes associados às vias metabólicas lipídicas (90).

As alterações no metabolismo energético induzidas pelo SARS-CoV-2 podem afetar o funcionamento adequado de diversos órgãos, e os padrões metabólicos modificados estão correlacionados com a progressão e gravidade da COVID-19 (91,92). Os lipídios, como diglicerídeos, ácidos graxos livres e triglicerídeos, foram encontrados em quantidades elevadas no grupo de pacientes que faleceram devido à COVID-19 (92). Estudos *ex vivo* e *in vitro* também relataram aumento na replicação viral em células com acúmulo excessivo de lipídios intracelulares, bem como a formação de corpos lipídicos em monócitos de pacientes infectados naturalmente e em infecções *in vitro* pelo SARS-CoV-2 (93). Nesses estudos, foi observado um aumento na expressão da proteína 1 de ligação ao elemento regulador de esterol do fator de transcrição (SREBP-1), que é um regulador chave da lipogênese, assim como do receptor nuclear ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPAR $\gamma$ ) após a infecção pelo SARS-CoV-2. Ehrlich et al., (2020) também relataram que o SARS-CoV-2 altera a expressão ou atividade de PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  nas células epiteliais pulmonares, indicando uma reprogramação celular para um fenótipo lipogênico. Esses resultados sugerem que os distúrbios no metabolismo lipídico, tanto sistêmicos quanto celulares, desempenham um papel relevante na gravidade da COVID-19. No entanto, ainda não está claro qual é o perfil de produção dos SL e seus derivados metabólicos durante a infecção por SARS-CoV-2, nem sua relação com os diferentes aspectos clínicos da COVID-19.

### 3 JUSTIFICATIVA

A atividade do sistema imunológico é crucial para determinar a evolução de infecções e o desfecho clínico das doenças. Em muitos pacientes com COVID-19, complicações pulmonares e sistêmicas graves podem resultar em óbito. Esses pacientes frequentemente apresentam uma resposta inflamatória robusta, caracterizada pela produção desregulada de citocinas e mediadores lipídicos, os quais contribuem na patogênese da lesão pulmonar, edema e migração de células inflamatórias. As complicações sistêmicas afetam diversos órgãos e são manifestadas por febre, citopenias, hiperferritinemia, coagulação intravascular disseminada e choque hipovolêmico, eventos influenciados por mediadores inflamatórios. Recentemente, observou-se que a ocorrência de tempestades lipídicas nos pulmões de pacientes graves também pode modular esses processos inflamatórios.

Está bem estabelecido que os SL desempenham funções estruturais e de sinalização em células eucarióticas. Os metabólitos dessa via, como o S1P, são importantes moléculas de sinalização implicadas na regulação das principais funções fisiológicas, incluindo proliferação celular, sobrevivência, desenvolvimento embrionário, organogênese e tráfico de células imunes, e estão envolvidos em uma variedade de processos patológicos, principalmente aqueles relacionados com respostas inflamatórias. Em particular, as Cer foram descritas como potentes agentes pró-inflamatórios, enquanto o S1P desempenha um papel controverso na inflamação, podendo exercer funções pró ou anti-inflamatórias. Análogos do receptor S1PR1 forneceram proteção *in vivo* contra a resposta fisiopatológica durante a infecção por influenza H1N1 e melhoraram a taxa de sobrevivência. Recentemente, foi demonstrado que o tratamento com análogo deste receptor resultou em controle significativo da resposta imune após estímulo com H1N1 em camundongos, melhorando também a sobrevivência, especialmente quando combinado com o antiviral oseltamivir. A lipidômica é uma abordagem altamente robusta, com potencial para revelar biomarcadores importantes no diagnóstico, monitoramento ou prevenção do risco de doenças. A desregulação da homeostase nas vias de formação dos SL pode fornecer candidatos promissores como biomarcadores de processos biológicos associados à imunopatogênese da COVID-19. Portanto, é determinante investigar a produção e participação dos SL na inflamação sistêmica causada pelo SARS-CoV-2, e desenvolvimento da gravidade na COVID-19.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Investigar a influência da modulação do metabolismo de esfingolipídios sistêmico nas diferentes manifestações clínicas da COVID-19, identificando biomarcadores de prognósticos e o papel da esfingosina-1-fosfato (S1P) na resposta imunológica de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2.

### 4.2 Objetivos específicos

Capítulo I:

- Descrever o perfil de produção de SL e seus derivados metabólicos ativos em pacientes infectados por SARS-CoV-2;
- Explorar o potencial dos SL como biomarcadores de gravidade na COVID-19;
- Analisar a expressão gênica de enzimas do metabolismo dos SL em leucócitos do sangue periférico de pacientes com COVID-19.

Capítulo II:

- Investigar a relação entre a produção de S1P com parâmetros clínicos e inflamatórios em pacientes com COVID-19;
- Analisar a expressão gênica dos receptores de S1P (S1PR) e de enzimas do metabolismo de S1P em leucócitos do sangue periférico de pacientes com COVID-19;
- Investigar *in vitro* o papel de S1P e S1PR1 na replicação viral do SARS-CoV-2 e atividade inflamatória em macrófagos.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Aspectos éticos

O presente trabalho é derivado do projeto intitulado “*Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave: busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes infectados por SARS-CoV-2*”, realizado na cidade de Ribeirão Preto/SP, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, sob o número de CAAE: 30525920.7.0000.5403 e Parecer nº 4.076.158 e estudo AEROBICOVID (CAAE: 33783620.6.0000.5659 e CAAE: 33783620.6.3001.5403).

### 5.2 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, analítico do tipo transversal, em pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV-2 com uma parte experimental *in vitro*.

### 5.3 Área de estudo

O estudo foi realizado na cidade de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP-USP, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – FFCLRP-USP em colaboração com o Programa de Pós-graduação em Imunologia básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

### 5.4 População de estudo

Participaram deste estudo pacientes infectados com o SARS-CoV-2, com diagnóstico molecular confirmado por Real Time PCR e apresentação clínica presente ou passada (convalescentes) da doença COVID-19, assim como os respectivos controles. Foram selecionados os seguintes participantes/grupos para o estudo:

- **Grupo de Controles:** indivíduos provenientes da comunidade USP-Campus Ribeirão Preto, com teste molecular (RT-PCR) pós-swab nasofaríngeo negativo, autodeclarados saudáveis e assintomáticos.

- **Grupo de Pacientes Domiliciare:** indivíduos assintomáticos ou oligossintomáticos e com resultado positivo para o teste molecular (RT-PCR) para SARS-CoV-2. Estes participantes foram provenientes de buscas domiciliares, após consulta de relatórios da Vigilância Epidemiológica de Ribeirão Preto e/ou sistema Hygia para identificação dos casos testados positivos, realizados via Unidades Básicas, e foram classificados conforme a gravidade da doença, em leves ou moderados.
- **Grupo de Pacientes Hospitalares:** pacientes atendidos em hospital privado/filantropico (Hospital São Paulo ou Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto), que testaram positivo para o SARS-CoV-2 como rotina hospitalar de atendimento de indivíduos com síndrome gripal por RT-PCR (kit Biomol OneStep/COVID-19; Instituto de Biologia Molecular do Paraná - IBMP Curitiba/PR) usando swabs nasofaríngeos e/ou ensaios sorológicos para detectar anticorpos IgM/IgG (teste de anticorpos SARS-CoV-2®; Guangzhou Wondfo Biotech, China).

Estes participantes hospitalares foram classificados nos grupos Moderado, Grave e Crítico seguindo as recomendações da OMS (35,46,94–96). Essas classificações foram utilizadas para definir a escala de evolução clínica dos pacientes, de acordo com os critérios para a classificação clínica dos pacientes definidas no momento da coleta da amostra, conforme mostrado na **Tabela 01**.

**Tabela 1:** Classificação dos participantes do estudo conforme à gravidade da COVID-19.

<b>Classificação</b>	<b>Sintomas, sinais e parâmetros clínicos</b>
<b>Controles saudáveis</b>	- Negativo para ácido nucleico SARS-CoV-2 - Sem sinais clínicos
<b>Leve</b>	- Positivo para ácido nucleico SARS-CoV-2 e / ou teste sorológico - Com ou sem os seguintes sintomas: diarreia, tosse, febre, dor de cabeça, perda do paladar (ageusia)/ cheiro (anosmia), mialgia, náusea e vômito - Saturação de oxigênio 94-99% no ar ambiente
<b>Moderado</b>	- Positivo para ácido nucleico SARS-CoV-2 e / ou teste sorológico - Manifestação de sintomas leves de doença, incluindo dispnéia - Saturação de oxigênio $\geq 93\%$ no ar ambiente e $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 250-300 mmHg - Não precisa de suportes invasivos: cateter nasal (oxigênio 2-4 L/min) ou reservatório de oxigênio (oxigênio 4-12 L / min)
<b>Grave</b>	- Positivo para ácido nucleico SARS-CoV-2 e / ou teste sorológico - Possível admissão em unidades de terapia intensiva - Grave dificuldade respiratória - Saturação de oxigênio $<93\%$ em ar ambiente e $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 <250$ mmHg - Não precisa de suportes invasivos: reservatório de oxigênio ou máscara facial sem reinalação (oxigênio 10-15 L/min)
<b>Crítico</b>	- Positivo para ácido nucleico SARS-CoV-2 e / ou teste sorológico - Admissão em unidades de terapia intensiva - Síndrome da insuficiência respiratória aguda - Necessita de Determinar Invasiva - $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ mmHg - Com ou sem um ou mais parâmetros adicionais: necessidade de hemodiálise, sepse, choque séptico e disfunção de órgãos múltiplos

**Abreviaturas:**  $\text{FiO}_2$ , fração inspirada de oxigênio;  $\text{PaO}_2$ , pressão parcial de oxigênio.

## 5.5 Tamanho da amostra

Foram estudados os pacientes atendidos pelos médicos/pesquisadores, no período de abril a dezembro de 2020, por demanda espontânea dos Hospitais participantes do estudo. O número amostral foi composto por 259 participantes totais. Desses, 55 foram participantes negativos para SARS-CoV-2, usados como controles das análises de sangue total. Pacientes Domiliciários (n=60) e Hospitalares (n=144), totalizando 204 pacientes positivos para COVID-19, foram categorizados em leve (n = 36), moderado (n = 60), grave (n = 67) ou crítico (n =41).

## **5.6 Critérios de elegibilidade**

### **5.6.1 Critérios de inclusão**

Indivíduos de ambos os sexos, idade igual ou superior a 18 anos, com diagnóstico molecular ou sorológico positivo para o SARS-CoV-2, atendidos no Hospital São Paulo ou Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto em Ribeirão Preto/SP.

### **5.6.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídas do estudo pacientes grávidas.

## **5.7 Coleta das amostras de sangue periférico**

As amostras de sangue de controles saudáveis e de participantes assintomáticos/leves não hospitalizados foram coletadas no Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico “Supera Park” (Ribeirão Preto/SP) ou na residência de pacientes que receberam atendimento domiciliar. As coletas de amostras de pacientes hospitalizados foram realizadas no Hospital São Paulo e Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto, ambos com unidades de internação e serviços de urgência e emergência e ambulatório especializado para o atendimento de pacientes com COVID-19.

As amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa em tubos com sistema a vácuo com gel separador (*Gel BD SST® II Advance®*); tubos com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-cético (EDTA) (*BD Vacutainer® EDTA K2*) para análises lipidômica e moleculares; e tubo PPT (*Plasma Preparation Tube, Vacutainer BD*) para dosagem de citocinas.

## **5.8 Avaliação de SL em amostras de sangue periférico**

Essas metodologias foram realizadas no Centro de Excelência de Quantificação e Identificação de Lipídios – (CEQIL), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) – USP e no Grupo de estudos em Biotecnologia e Imunoquímica de Lipídios (GeBIL).

### 5.8.1 Extração líquido-líquido e preparação de amostras para LC-MS/MS

Todas as etapas foram realizadas à temperatura ambiente, a menos que especificado de outra forma (97,98). Resumidamente, amostras de plasma (250  $\mu\text{L}$ ) foram ajustadas para 1 mL com PBS e transferidas para um frasco de centrífuga de vidro. Em seguida, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  do padrão interno (Mistura II de Cer/Sph 10  $\mu\text{M}$ , LM6005, Avanti® Polar Lipids, Alabaster, Alabama, EUA), 300  $\mu\text{L}$  de HCl a 18,5%, 1 mL de MeOH e 2 mL de  $\text{CHCl}_3$  antes de agitar o conteúdo por 30 minutos (50 rpm). As amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 2000 g, a fase orgânica inferior foi transferida para um novo tubo de ensaio, e à fase aquosa restante foram adicionados mais 2 mL de  $\text{CHCl}_3$  para repetir a extração antes de combinar as duas fases orgânicas e secar o solvente orgânico em um *speed vacuum* por 45 minutos à 60°C. As amostras foram ressuspendidas em 100  $\mu\text{L}$  de MeOH: $\text{CHCl}_3$  (4:1, v/v) e agitada por 1 min antes de ser armazenadas à -80 °C.

### 5.8.2 Quantificação de SL por LC-MS/MS

As amostras de lipídios extraídas foram analisadas para quantificação de SLs, seguindo método modificado dos previamente descritos (97,99). Em resumo, a cromatografia líquida foi conduzida utilizando uma coluna Ascentis Express C18 (Supelco, St. Louis, MO, EUA) com dimensões de 100  $\times$  2,1 mm e um tamanho de partícula de 2,7  $\mu\text{m}$ , mantida à 40 °C durante todo o procedimento em um sistema de cromatografia líquida de ultra-alto desempenho (UHPLC) (Nexera X2; Shimadzu, Kyoto, Japão). A coluna foi equilibrada por 20 min e, em seguida, uma amostra de 10  $\mu\text{L}$  foi injetada na coluna de HPLC. A eluição foi realizada usando um sistema de gradiente binário composto por Fase A ( $\text{H}_2\text{O}$  com 1% de ácido fórmico) e Fase B (MeOH). A eluição em gradiente durou 20 min a uma vazão de 0,5 mL/min, com as seguintes configurações: 0,0–1 min–30% B, 1,1–2,5 min–85% B, 2,5–5,0 min–100% B, 5,0–15 min–100% B e 15,1–20 min–re-equilibrada com 30% B. O sistema de HPLC estava conectado a um espectrômetro de massas TripleTOF 5600+ (SCIEX, Redwood City, CA, EUA). A varredura de monitoramento de reação múltipla de alta resolução (MRM<sup>HR</sup>) foi realizada usando uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) no modo de íon positivo. Calibrações externas do sistema de entrega calibrado (CDS) foram realizadas usando uma sonda de ionização química à pressão atmosférica (APCI). A calibração de massa automática (<2 ppm) foi realizada após cada uma das cinco injeções de amostra usando a Solução de Calibração Positiva APCI (SCIEX, Redwood City, CA, EUA) injetada via infusão direta a uma vazão de 300  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Os parâmetros instrumentais incluíram o seguinte: gás

nebulizador (GS1) a 50 psi, gás turbo (GS2) a 50 psi, gás de cortina (CUR) a 25 psi, voltagem de eletronebulização (ISVF) a +4500 V e temperatura da fonte de ionização por pulverização turbo a 500 °C. O tempo de permanência foi definido em 10 ms e uma resolução de massa de 35.000 foi alcançada a  $m/z$  400. A aquisição de dados foi realizada usando o software *Analyst<sup>TM</sup>* (SCIEX, Redwood City, CA, EUA). A identificação qualitativa de espécies de lipídios foi realizada usando o software *PeakView<sup>TM</sup>* (SCIEX, Redwood City, CA, EUA). Para análise quantitativa, foi utilizado o software *MultiQuant<sup>TM</sup>* (SCIEX, Redwood City, CA, EUA), permitindo a normalização da área de pico de íons moleculares individuais usando um padrão interno para SL (Avanti Polar Lipids-LM6005).

### 5.9 Dosagem de citocinas plasmáticas por *Cytometric Bead Array* - CBA

As citocinas e quimiocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8/CXCL-8, IL-10, TNF e IL-12p70 foram quantificadas nas amostras de plasma dos pacientes e indivíduos controles pela técnica de *Cytometric Bead Array* (CBA) com o Kit *Cytometric Bead Array Human Inflammatory Cytokines Kit* (BD<sup>®</sup> Biosciences, San Diego, CA, USA), seguindo as orientações descritas pelo fabricante.

O Kit BD<sup>TM</sup> CBA utiliza uma série de partículas (microesferas ou *beads*) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada *bead* de captura estava conjugada com um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra foi realizada através de anticorpos conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE) que fornecem um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a *bead*. Os complexos formados de *bead* de captura + citocina da amostra + anticorpo de detecção são quantificados através da Citometria de Fluxo. A intensidade da Fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o Citômetro de Fluxo FACSCanto II (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*). O software *FCAP-Array<sup>TM</sup>* (v3.0.1) foi utilizado para calcular as concentrações em pg/mL e Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada citocina.

## **5.10 Avaliação de expressão gênica de genes relacionados à via dos esfingolipídios e ceramidas por RNA Sequencing (RNA-Seq) em amostras de sangue periférico**

O RNA total de 12 controles e 52 pacientes com COVID-19 foi obtido a partir da camada leucocitária (*buffy coat*) congelado em Trizol e purificado usando um kit em colunas de sílica com tratamento de DNase (*Life Technologies, PureLink DNase Set, Catalog No. 12185010*) de acordo com as especificações do fabricante (*Life Technologies, PureLink RNA Mini Kit, Catalog No. 12183018A*). O RNA de alta qualidade foi eluído em um tampão especial RNase-free, pronto para uso direto ou armazenamento à -80°C. O RNA purificado estava isento de proteínas nucleases e outros contaminantes e inibidores. A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas no Fluorômetro Qubit (*Invitrogen, Qubit RNA BR Assay Kit, Catalog No. Q10211*) e no instrumento Bioanalyzer (*Agilent Technologies, Agilent 2100 Bioanalyzer system with RNA 6000 Nano kit, Catalog No. 5067-1511*), respectivamente. Todas as matrizes de expressão de transcrição foram realizadas em uma instalação de alto rendimento (*Thermo Fisher Scientific, Microarray Research Services Laboratory, Santa Clara, CA, USA*) usando a plataforma de sequenciamento *Clariom S Assay* (*Applied Biosystems, Clariom S Assay human, Catalog No. 902927*).

## **5.11 Avaliação *in vitro* do papel de S1P e S1PR1 na replicação viral do SARS-CoV-2 e atividade inflamatória.**

### **5.11.1 Cultura de células THP-1**

As células THP-1 (linhagem celular de leucemia monocítica aguda humana) foram cultivadas em meio líquido DMEM-c (suplementado com glutamina, NaHCO<sub>3</sub> (2,0 g/L), 10% de soro fetal bovino (SFB), 500 UI de penicilina, 500 µg de estreptomicina e 1,25 µg Anfotericina B (Gibco) em estufa úmida à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Para induzir a diferenciação em macrófagos aderentes, as células THP-1 foram tratadas com 25 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma Aldrich) e semeadas a uma densidade 1×10<sup>5</sup>/poço por 24 horas. Após diferenciação, as culturas de células foram lavadas uma vez com meio incompleto e as células aderidas foram então utilizadas para os testes de viabilidade celular e ensaios de replicação viral e atividade inflamatória.

### 5.11.2 Ensaio de citotoxicidade celular

A determinação da concentração padrão de S1P, FTY720 (Análogo de S1P), SK-I/II (Inibidor da enzima Sphk1/2, produtora de S1P) e W146 (Antagonista do receptor S1PR1) e a viabilidade celular foi testada pelo método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, EUA). As células THP-1 semelhantes à macrófagos, semeadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$ /poço (placas de 96 poços), foram tratadas com S1P (17:1) (Avanti® Polar Lipids), FTY720 (Sigma), SK-I/II (Abcam) e W146 (R&D Systems) nas concentrações 1.25µM, 2.5µM, 5µM, 7.5µM, 10µM e veículos por 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes de células foram retirados e substituídos por 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL), diluído em DMEM por 4 horas em estufa úmida à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Como controle positivo de morte celular foi utilizado o tratamento com DMSO 10% em DMEM. Em seguida, os sobrenadantes de cultura foram retirados e adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO)/poço por 30 min ou até total solubilização dos cristais de formazan, provenientes do metabolismo mitocondrial. As medidas de absorbância foram obtidas em espectrofotômetro de microplaca em 540 nm (Aparelho µQuant - BioTek, Instruments, INC).

### 5.11.3 Preparação do inóculo viral

O inóculo viral de SARS-CoV-2 cepa CV28/B.1.1.33 foi preparado e fornecido pelo Laboratório de Patogênese Viral, em conformidade com rigorosas condições de biossegurança de nível 3, localizado no Centro de Pesquisa em Virologia do Departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (100).

### 5.11.4 Tratamento farmacológico profilático e infecção por SARS-CoV-2 em células THP-1

O papel da via S1P/S1PR1 na infecção por SARS-CoV-2 foi estudado em culturas de células THP-1 semelhantes à macrófagos. As células ( $1 \times 10^5$ /poço) foram expostas ao tratamento profilático com S1P 1µM e 5µM, FTY720 1µM e 5µM (Análogo de S1P), SK-I/II 1µM, 5µM e 10µM (Inibidor da enzima Sphk1/2, produtora de S1P) por 24 horas e W146 10µM (Antagonista do receptor S1PR1) por 1 hora, em placas de 96 poços em DMEM-c. Após os tratamentos profiláticos, os sobrenadantes foram removidos e adicionamos as partículas viáveis de SARS-CoV-2 cepa CV28/B.1.1.33 (MOI 1.0) e incubamos por 24 horas em meio DMEM-c. Além dos grupos experimentais com a estimulação viral, foram incluídos

controles com apenas meio de cultura, apenas infectados com SARS-CoV-2 ou apenas tratamentos. Após o período de infecção por 24 horas, os sobrenadantes foram coletados para a dosagem de citocinas, enquanto o lisado de células foram utilizadas para a quantificação da carga viral. Todas as culturas foram realizadas em triplicata para garantir a replicabilidade dos resultados. O experimento foi realizado no Laboratório de Patogênese Viral, em conformidade com rigorosas condições de biossegurança de nível 3, localizado no Centro de Pesquisa em Virologia do Departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

### 5.11.5 Quantificação da carga viral do SARS-CoV-2

O genoma SARS-CoV-2 foi quantificado por RT-PCR quantitativa utilizando conjuntos de *primers* e sondas para amplificação dos genes do Nucleocapsídeo (N2) e RNase-P *housekeeping* (**Tabela 2**) (101). As amostras de RNA foram extraídas com Trizol<sup>®</sup> (*Invitrogen*, CA, EUA) a partir de 200 µL de cultura celular para determinar a carga viral da infecção nos ensaios *in vitro*. Resumidamente, foram utilizados 100 ng de RNA extraído, 20 µM dos primers específicos, 5 µM de sonda e *TaqPath 1-Step qRT-PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). Os testes de RT-PCR quantitativa foram realizados no termociclador *Step-One Plus* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) utilizando os seguintes parâmetros de ciclagem: 45°C por 10 min, 95°C por 2 min, seguido por 45 ciclos de 95°C por 5s e 60°C por 30s.

**Tabela 2:** Sequências de Primers e sondas para detecção do genoma SARS-CoV-2 e gene *housekeeping*.

	Primers	Sequência	Referência
N2	<i>Foward</i>	5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3'	Lu et al., 2020
	<i>Reverse</i>	5'-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3'	
	Sondas	5'-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1-3'	
RNase-P	<i>Foward</i>	5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3'	Lu et al., 2020
	<i>Reverse</i>	5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'	
	Sondas	5'-FAM – TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG – BHQ-1-3'	

### 5.11.6 Dosagem de citocinas do sobrenadantes de cultura por ensaio imunoenzimático (ELISA)

As concentrações das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6, a partir do sobrenadante de cultura, foram dosadas pelo teste imunoenzimático *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) sanduíche. As dosagens foram feitas a partir do plasma/soro dos indivíduos do grupo de pacientes e controles. Utilizamos kit comercial da *R&D Systems, (Minneapolis, MN, USA)*, seguindo o protocolo e recomendações técnicas descritas pelos fabricantes.

### 5.12 Análises estatísticas

Os dados clínicos e laboratoriais dos participantes do estudo foram computados e apresentados em formas de tabelas e gráficos, elaborados nos softwares Excel 2013 (*Microsoft Corporation*) e *Graphpad Prism<sup>TM</sup>* (Versão 9.0) (San Diego, CA, USA), respectivamente. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade *Shapiro-Wilk* e *D'Agostino & Pearson test*. As análises comparativas entre os grupos foram realizadas por meio dos testes *Mann-Whitney* (para dois grupos) ou *Kruskal-Wallis* seguido por comparação múltipla de *Dunn*, para três ou mais grupos. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando  $p < 0,05$ .

- **Análise discriminante de mínimos quadrados parciais (*Partial Least Squares - Discriminant Analysis - PLS-DA*)** foi realizada para determinar metabólitos de SL alterados e que possam atuar como biomarcador de gravidade na COVID-19 (102).

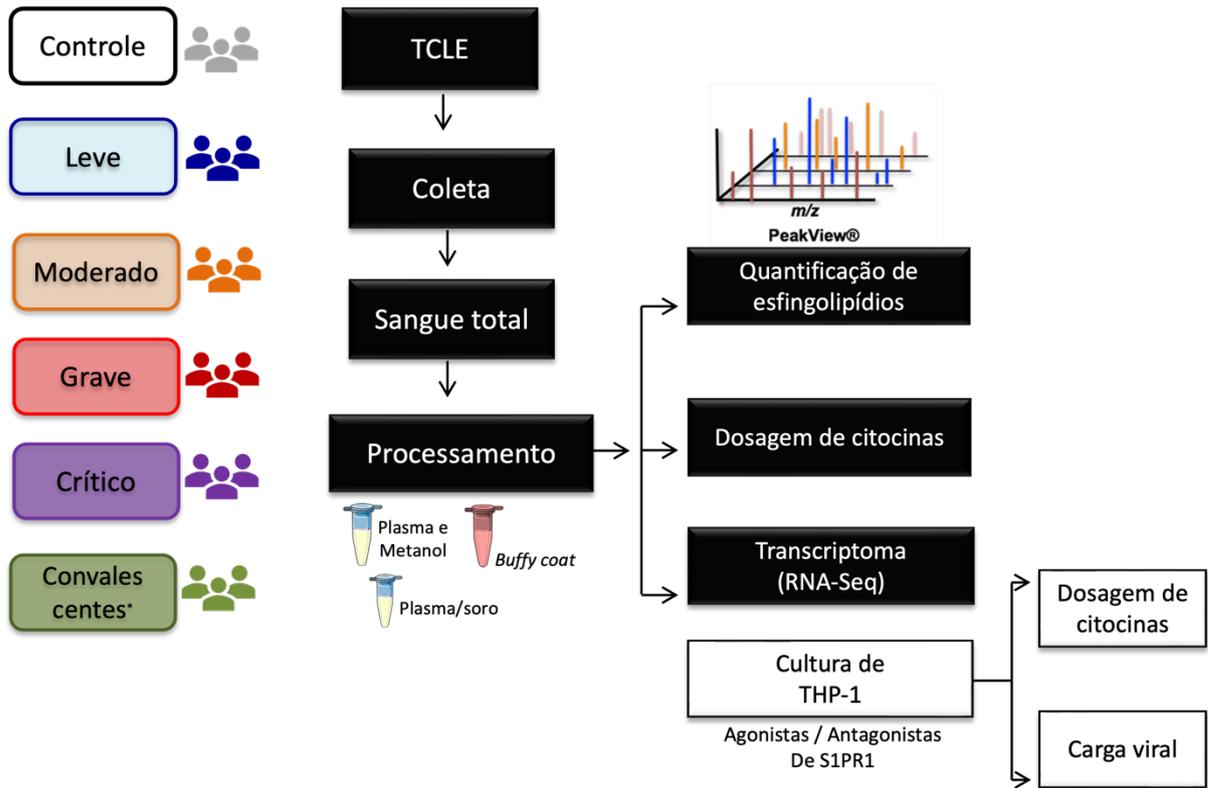
- **Análise da Curva Característica de Operação do Receptor (ROC)** foi realizada para verificar a capacidade preditiva dos possíveis biomarcadores, determinada pela área sob a curva (AUC), com intervalos de confiança de 95%.  $AUC > 0,70$  foram considerados clinicamente relevantes. A Curva ROC é um método estatístico utilizado para avaliar a eficácia de biomarcadores em distinguir dois grupos. A AUC é um indicativo para resumir a precisão geral do teste (103). AUC de 0,7 a 0,8 são aceitáveis e de relevância clínica; 0,8 a 0,9 são excelentes e 0,90 a 1,0 são excepcionais (104).

- **Análise de Regressão Logística Binomial** foi realizada para avaliar a associação de SL com os desfechos clínicos de gravidade e mortalidade usando o software *Jamovi* (Versão 1.6 - 2021).

- **Análise de correlação entre as variáveis** foi conduzida utilizando o teste não paramétrico de *Spearman*, onde diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de  $p < 0,05$ . Os resultados foram visualizados graficamente através de uma matriz de correlação utilizando a função *corrplot*. Esta representação permitiu a demonstração das interações complexas entre os dados laboratoriais, metabólitos e mediadores inflamatórios avaliados, destacando correlações positivas e negativas em cada grupo clínico.

### 5.13 Fonte de Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (bolsas n° 2020/05207-6, n° 2014/07125-6 e n° 2015/00658-1 para L.H.F.; bolsa n° 2020/08534-8 para M.M.P.; concessão n° 2020/05270-0 para V.L.D.B; e concessão n° 2021/04590-3 para C.A.S.). Apoio adicional foi fornecido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Código Financeiro 001); Fundação de apoio à Universidade de São Paulo - FUSP pelo programa USP VIDA; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Programa POSGRAD n° 005/2022 e n° 002/2023); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, bolsas n° 312606/2019-2 e n° 313259/2022-4 para M.D.B, n° 303259/2020-5 para L.H.F., n° 309583/2019-5 para C.R.B.C., e n° 314358/ 2021-8 para CAS; e concessão #R01 HL144478 NIH/NHLBI e concessão #I01 BX001786 do Departamento de Assuntos de Veteranos para R.T.S. O projeto AEROBICOVID recebeu financiamento do Projeto ‘USP Vida’ (código – 3518/2020) e Projetos Integrados de Pesquisa em Áreas Estratégicas (PIPAE) da Pró-Reitoria de Pesquisa-USP (2021.1.10424.1.9).



**Figura 7:** Esquema ilustrando as principais etapas experimentais que compõem este estudo.

## 6 RESULTADOS

Os resultados desta tese estão organizados por capítulos, apresentados no formato de coletânea de artigos científicos, evidenciando a contribuição dos resultados obtidos para o entendimento da COVID-19.

**Capítulo I:** Este capítulo reúne os artigos relacionados ao metabolismo de esfingolipídios (SL) e destaca sua relevância como ferramenta diagnóstica e prognóstica, além de sua importância na compreensão da patogênese da COVID-19.

Artigo 1: *Plasma Sphingomyelin Disturbances: Unveiling Its Dual Role as a Crucial Immunopathological Factor and a Severity Prognostic Biomarker in COVID-19.* Este estudo explorou o perfil de produção de esfingolipídios e seus derivados metabólicos ativos em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2. Foram analisadas a expressão gênica de enzimas envolvidas no metabolismo dos SL em leucócitos de sangue periférico de pacientes com COVID-19 e o potencial dos SL como biomarcadores de gravidade da doença.

Artigo 2: *High-resolution targeted mass spectrometry for comprehensive quantification of sphingolipids: clinical applications and characterization of extracellular vesicles.* Neste estudo, foi utilizada a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem de alta resolução (LC-MS/MS com MRM-HR) para desenvolver um método direcionado à identificação e quantificação de diversas espécies de esfingolipídios. As análises foram realizadas em amostras de plasma de pacientes com COVID-19, bem como em vesículas extracelulares (EVs), permitindo um mapeamento dessas biomoléculas e suas potenciais aplicações clínicas.

**Capítulo II:** Neste capítulo, é abordada a relação entre a produção de esfingosina-1-fosfato (S1P) e parâmetros clínicos e inflamatórios em pacientes com COVID-19. Além disso, são apresentados dados sobre a expressão gênica dos receptores de S1P (S1PR) e de enzimas do metabolismo de S1P em leucócitos de pacientes com COVID-19. Este capítulo também inclui uma investigação *in vitro* sobre o papel de S1P e S1PR1 na replicação viral do SARS-CoV-2 e na modulação da atividade inflamatória em macrófagos, cujo manuscrito está em fase de publicação.

**Capítulo III:** Este capítulo lista todos os dez artigos publicados durante o período do doutorado, provenientes da colaboração com os consórcios de pesquisa IMUNOCOVID e

AEROBICOVID. Também apresenta um resumo das atividades realizadas durante o período de Doutorado Sanduíche na *University of Nebraska*, nos Estados Unidos.

## 6.1 CAPÍTULO I: Artigos originais publicados relacionados ao metabolismo de esfingolipídios (SL).

### Artigo 1: Plasma Sphingomyelin Disturbances: Unveiling Its Dual Role as a Crucial Immunopathological Factor and a Severity Prognostic Biomarker in COVID-19.

DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12151938>



Article

#### Plasma Sphingomyelin Disturbances: Unveiling Its Dual Role as a Crucial Immunopathological Factor and a Severity Prognostic Biomarker in COVID-19

Diana Mota Toro <sup>1,2,†</sup>, Pedro V. da Silva-Neto <sup>1,2,†</sup>, Jonatan C. S. de Carvalho <sup>1,3,†</sup>, Carlos A. Fuzo <sup>1,†</sup>, Malena M. Pérez <sup>1</sup>, Vinicius E. Pimentel <sup>1,4</sup>, Thais F. C. Fraga-Silva <sup>4</sup>, Camilla N. S. Oliveira <sup>1,4</sup>, Gláucia R. Caruso <sup>1</sup>, Adriana F. L. Vilela <sup>3</sup>, Pedro Nobre-Azevedo <sup>3,4</sup>, Thiago V. Defelippo-Felippe <sup>3</sup>, Jamille G. M. Argolo <sup>5</sup>, Augusto M. Degiovani <sup>6</sup>, Fátima M. Ostini <sup>6</sup>, Marley R. Feitosa <sup>7,8</sup>, Rogerio S. Parra <sup>7,8</sup>, Fernando C. Vilar <sup>8,9</sup>, Gilberto G. Gaspar <sup>9</sup>, José J. R. da Rocha <sup>7</sup>, Omar Feres <sup>7,8</sup>, Gabriel P. Costa <sup>10</sup>, Sandra R. C. Maruyama <sup>11</sup>, Elisa M. S. Russo <sup>1</sup>, Ana Paula M. Fernandes <sup>5</sup>, Isabel K. F. M. Santos <sup>4</sup>, Adriana Malheiro <sup>2</sup>, Ruxana T. Sadikot <sup>12</sup>, Vânia L. D. Bonato <sup>4</sup>, Cristina R. B. Cardoso <sup>1</sup>, Marcelo Dias-Baruffi <sup>1</sup>, Átila A. Trapé <sup>10,‡</sup>, Lúcia H. Faccioli <sup>1,‡</sup>, Carlos A. Sorgi <sup>2,3,4,\*</sup> and ImmunoCovid Consortium Group <sup>§</sup>



Citation: Toro, D.M.; da Silva-Neto, P.V.; de Carvalho, J.C.S.; Fuzo, C.A.; Pérez, M.M.; Pimentel, V.E.; Fraga-Silva, T.F.C.; Oliveira, C.N.S.; Caruso, G.R.; Vilela, A.F.L.; et al. Plasma Sphingomyelin Disturbances: Unveiling Its Dual Role as a Crucial Immunopathological Factor and a Severity Prognostic Biomarker in COVID-19. *Cells* **2023**, *12*, 1938. <https://doi.org/10.3390/cells12151938>

Academic Editor: Arnold von Eckardstein

Received: 3 June 2023

Revised: 30 June 2023

Accepted: 20 July 2023

Published: 26 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Department of Clinical, Toxicological and Bromatological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto–FCFRP, University of São Paulo–USP, Ribeirão Preto 14040-903, SP, Brazil; dianamota.t@gmail.com (D.M.T.); pedrovieira\_sn11@hotmail.com (P.V.d.S.-N.); jonatancarvalho@usp.br (J.C.S.d.C.); cafuzo@usp.br (C.A.F.); malenac@usp.br (M.M.P.); viniciuspimentel@usp.br (V.E.P.); camilla.narjara@outlook.com (C.N.S.O.); g\_rigotto@hotmail.com (G.R.C.); elisa@fcfrp.usp.br (E.M.S.R.); cristina@fcfrp.usp.br (C.R.B.C.); mdbaruffi@fcfrp.usp.br (M.D.-B.); faccioli@fcfrp.usp.br (L.H.F.)
  - <sup>2</sup> Postgraduate Program in Basic and Applied Immunology–PPGIBA, Institute of Biological Sciences, Federal University of Amazonas–UFAM, Manaus 69080-900, AM, Brazil; malheiroadriana@yahoo.com.br
  - <sup>3</sup> Department of Chemistry, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto–FFCLRP, University of São Paulo–USP, Ribeirão Preto 14040-901, SP, Brazil; avilela@usp.br (A.F.L.V.); pedronobre@usp.br (P.N.-A.); thiago.felippe@usp.br (T.V.D.-F.)
  - <sup>4</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto–FMRP, University of São Paulo–USP, Ribeirão Preto 14049-900, SP, Brazil; thaisfragasilva@gmail.com (T.F.C.F.-S.); imsantos@fmrp.usp.br (I.K.F.M.S.); vlbonato@fmrp.usp.br (V.L.D.B.)
  - <sup>5</sup> Department of General and Specialized Nursing, School of Nursing of Ribeirão Preto–EERP, University of São Paulo–USP, Ribeirão Preto 14040-902, SP, Brazil; jamilleargolo@usp.br (J.G.M.A.); anapaula@eerp.usp.br (A.P.M.F.)
  - <sup>6</sup> Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto 14085-000, SP, Brazil; augustomd@msn.com (A.M.D.); tata\_ostini@hotmail.com (F.M.O.)
  - <sup>7</sup> Department of Surgery and Anatomy, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto–FMRP, University of São Paulo–USP, Ribeirão Preto 14049-900, SP, Brazil; mrfeitosa@hcrp.usp.br (M.R.F.); rsparra@hcrp.usp.br (R.S.P.); jrocha1@bol.com.br (J.J.R.d.R.); omar.feres@hspaulo.com.br (O.F.)
  - <sup>8</sup> Hospital São Paulo, Ribeirão Preto 14025-100, SP, Brazil; fcvilar@gmail.com
  - <sup>9</sup> Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto–FMRP, University of São Paulo–USP, Ribeirão Preto 14049-900, SP, Brazil; ggasparr@hcrp.usp.br
  - <sup>10</sup> School of Physical Education and Sport of Ribeirão Preto, University of São Paulo–USP, Ribeirão Preto 14040-900, SP, Brazil; costa.gabriel@usp.br (G.P.C.); atrape@usp.br (Á.A.T.)
  - <sup>11</sup> Department of Genetics and Evolution, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos 13565-905, SP, Brazil; sandracrm@ufscar.br
  - <sup>12</sup> Department of Internal Medicine, Division of Pulmonary, Critical Care and Sleep, College of Medicine, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198, USA; ruxana.sadikot@emory.edu
- \* Correspondence: carlos.sorgi@usp.br; Tel.: +55-16-3315-9176
- † These authors contributed equally to this work and share first authorship.
- ‡ These authors contributed equally to this work and share senior authorship.
- § Membership of the Group Name is provided in the Appendix A.

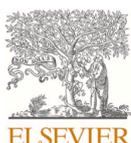
**Abstract:** SARS-CoV-2 infection triggers distinct patterns of disease development characterized by significant alterations in host regulatory responses. Severe cases exhibit profound lung inflammation and systemic repercussions. Remarkably, critically ill patients display a “lipid storm”, influencing the inflammatory process and tissue damage. Sphingolipids (SLs) play pivotal roles in various

## Artigo 2: High-resolution targeted mass spectrometry for comprehensive quantification of sphingolipids: clinical applications and characterization of extracellular vesicles.

*Primeira autoria compartilhada.*

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2024.115732>

Analytical Biochemistry 698 (2025) 115732



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Analytical Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yabio](http://www.elsevier.com/locate/yabio)



### High-resolution targeted mass spectrometry for comprehensive quantification of sphingolipids: clinical applications and characterization of extracellular vesicles

Thiago V.D. Felipe<sup>a,1</sup>, Diana M. Toro<sup>b,c,1</sup>, Jonatan C.S. de Carvalho<sup>a,b,1</sup>, Pedro Nobre-Azevedo<sup>a,d</sup>, Luiz F.M. Rodrigues<sup>a</sup>, Bianca T.M. Oliveira<sup>d</sup>, Pedro V. da Silva-Neto<sup>a,b,c</sup>, Adriana F.L. Vilela<sup>a</sup>, Fausto Almeida<sup>d</sup>, Lúcia H. Faccioli<sup>b,e</sup>, Carlos A. Sorgi<sup>a,c,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCLRP, Universidade de São Paulo-USP, Ribeirão Preto, 14040-901, SP, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP, Universidade de São Paulo-USP, Ribeirão Preto, 14040-903, SP, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada - PPGIBA, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, 69080-900, AM, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP, Universidade de São Paulo-USP, Ribeirão Preto, 14049-900, SP, Brazil

<sup>e</sup> Centro de Excelência em Quantificação e Identificação de Lipídios (CEQIL), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP, Universidade de São Paulo-USP, Ribeirão Preto, 14040-903, SP, Brazil

#### Highlights

- Targeted-high resolution LC-MS/MS workflow applied to sphingolipids analysis.
- Several classes of sphingolipids were identified in plasma samples with COVID-19.
- Sphingolipids cargo determination in macrophage-derived extracellular vesicles.
- S1P quantification after ultrasonic-treatment of extracellular vesicles.

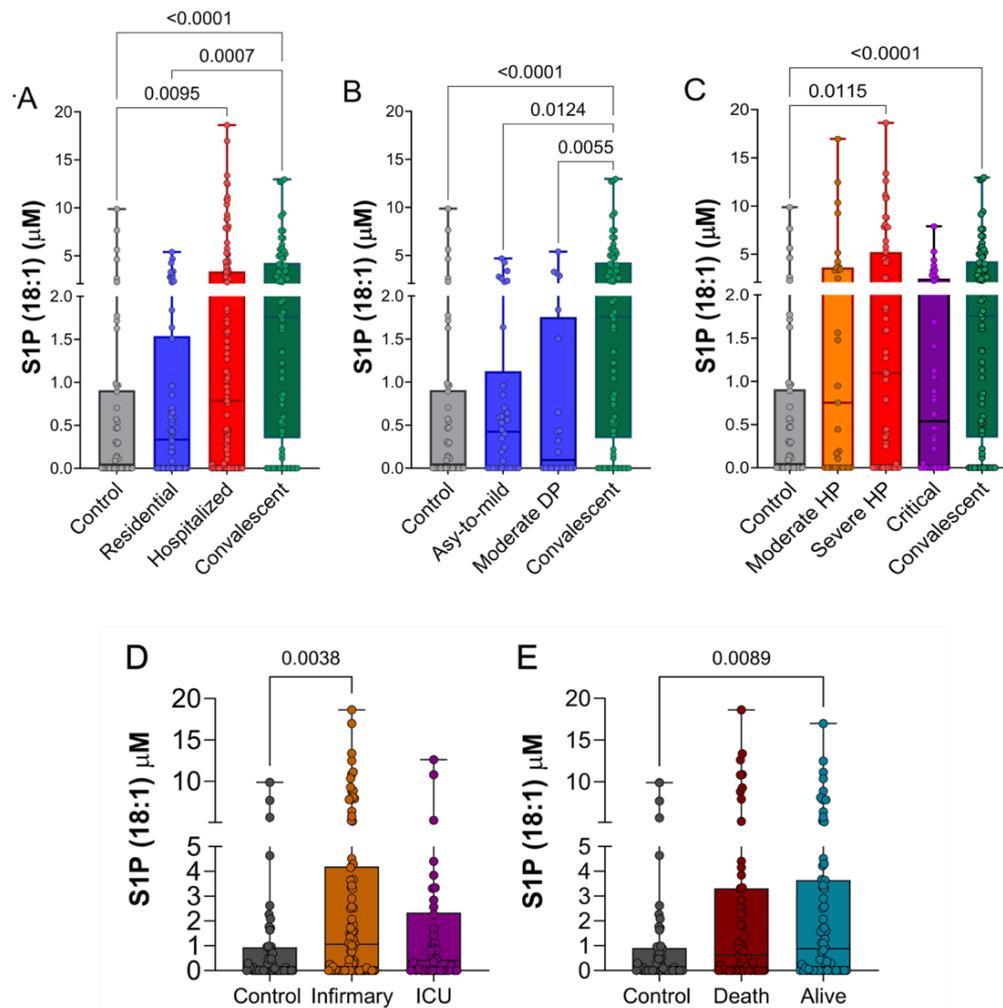
## 6.2 CAPÍTULO II: Resultados e Discussão do capítulo II: Investigação da associação entre a produção de S1P e os parâmetros clínicos e inflamatórios em pacientes com COVID-19.

### 6.2.1 Perfil plasmático do metabólito bioativo S1P nos diferentes quadros clínicos da COVID-19

A produção de S1P (18:1) foi quantificada no plasma de indivíduos controles, pacientes e convalescentes usando esfingolipidômica direcionada por LC-MS/MS. Os dados foram agrupados em categorias distintas para análise: (I) indivíduos saudáveis do grupo controle; (II) pacientes com COVID-19 classificados de acordo com a gravidade da doença, abrangendo desde casos assintomáticos e leves até moderados, graves e críticos; e (III) indivíduos convalescentes, avaliados 30 dias após a recuperação da COVID-19.

A concentração de S1P foi significativamente maior entre os pacientes hospitalizados em comparação com os controles ( $p=0,0095$ ) (**Figura 8A**). Ao analisar os pacientes em tratamento domiciliar, de acordo com a gravidade clínica da COVID-19, observamos que o grupo de pacientes com formas leves da doença mantém uma concentração ligeiramente mais elevada de S1P em comparação com aqueles com formas moderadas, embora essa diferença não tenha atingido significância estatística, quando a doença avança para o quadro moderado parece ocorrer a redução da mediana de produção de S1P (**Figura 8B**).

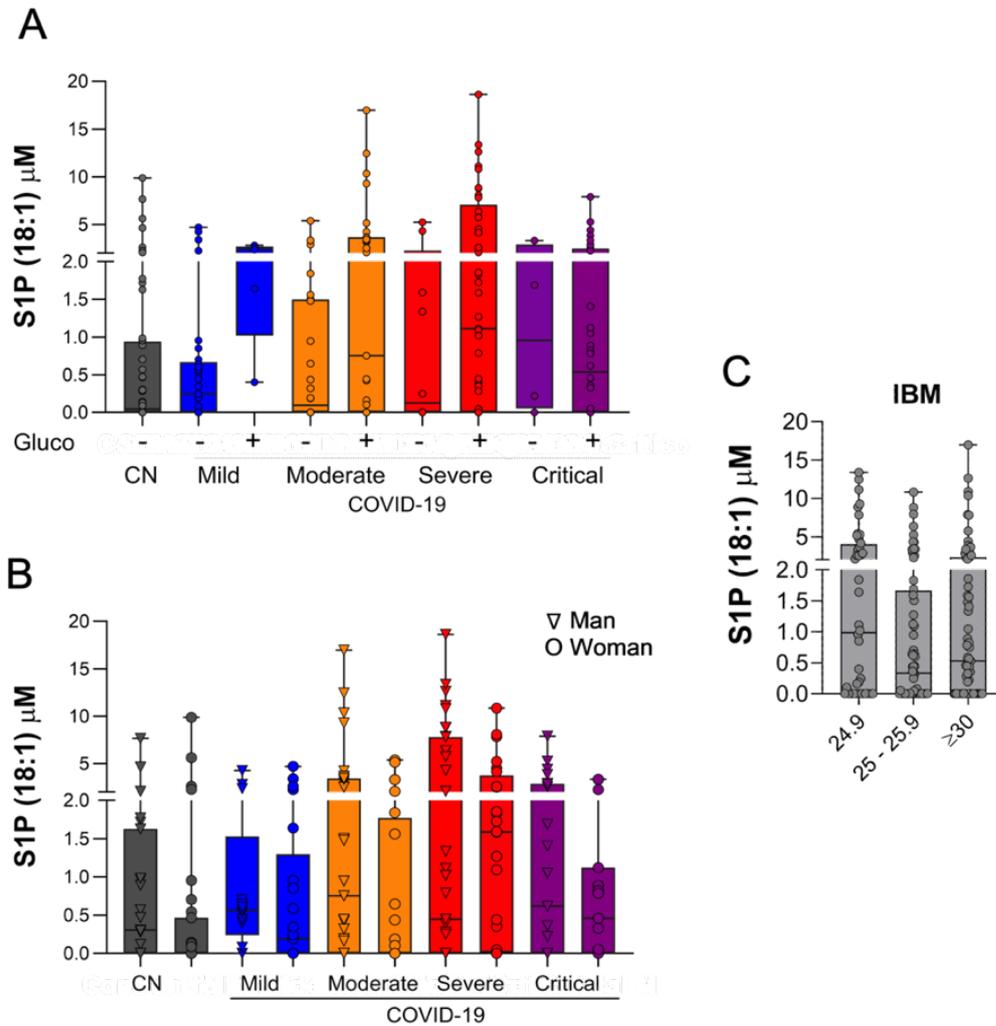
Entre os pacientes com COVID-19, a produção mais elevada de S1P foi observada no plasma dos indivíduos hospitalizados em estado grave (**Figura 8C**). Curiosamente, uma concentração alta de S1P foi detectada nos indivíduos convalescentes, sugerindo um possível papel desse SL na recuperação da doença e na restauração da homeostase (**Figura 8C**). Para uma compreensão mais aprofundada da variação de S1P em relação à gravidade da doença, analisamos sua produção em pacientes hospitalizados, diferenciando entre aqueles internados em enfermaria e os que necessitaram de cuidados intensivos. Observamos que os pacientes internados na enfermaria tendem a apresentar uma produção mais elevada de S1P ( $p=0.0038$ ) quando comparados com aqueles em estado mais grave da doença (**Figura 8D**). No entanto, não foram encontradas diferenças significativas ao considerar o desfecho clínico de alta hospitalar versus óbito (**Figura 8E**).



**Figura 8. Perturbações na abundância de S1P relacionado com o prognóstico clínico em pacientes com COVID-19.** (A) Perfil de produção de S1P (18:1) nos grupos controle (n=55), residencial (n=58), hospitalar (n=127) e convalescentes (n= 77). (B) Estratificação do grupo residencial por gravidade de doença: leves (n=34) e moderados domiciliares (DP) (n=24). (C) Pacientes hospitalizados estratificados conforme a gravidade doença nos grupos: moderado (n=31), grave (n= 59) e crítico (n= 37) em comparação aos convalescentes e controles. (D) Concentração de S1P em indivíduos controles, pacientes hospitalizados na enfermaria e na UTI. (E) Comparação de S1P entre os pacientes que sobreviveram com aqueles que evoluíram para óbito. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o teste de comparações múltiplas de *Kruskal-Wallis* (não paramétrico), seguido do pós-teste de *Dunn* para comparações pareadas. Os resultados são apresentados na forma de medianas em gráficos boxplot. Os níveis de significância são indicados pela presença de valores de  $p < 0,05$ , evidenciando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Além disso, avaliamos se a produção de S1P foi influenciada pelo uso de glicocorticoides (GCs), pelo sexo ou pelo índice de massa corporal (IMC) (**Figura 9**). Identificamos uma tendência de aumento nas concentrações plasmáticas de S1P em pacientes graves tratados com GCs, com exceção dos pacientes do grupo crítico, que podem já ter ultrapassado o ponto de não retorno clínico e imunológico, limitando a eficácia da terapia com GCs (**Figura 9A**). No total, 61,3% dos pacientes avaliados receberam terapia com GCs como parte do manejo clínico, conforme descrito no Capítulo I. Nossa análise demonstrou que os fatores sexo e índice de massa corporal (IMC) não influenciaram significativamente as

concentrações plasmáticas de S1P (Figura 9B - C). Contudo, é interessante notar que mulheres no grupo de casos graves apresentaram concentrações mais elevadas de S1P. Este achado é relevante, pois estudos anteriores sugerem que mulheres geralmente apresentam uma resposta imunológica mais robusta contra a COVID-19, e S1P pode ter um papel benéfico nesse contexto (Figura 9B).

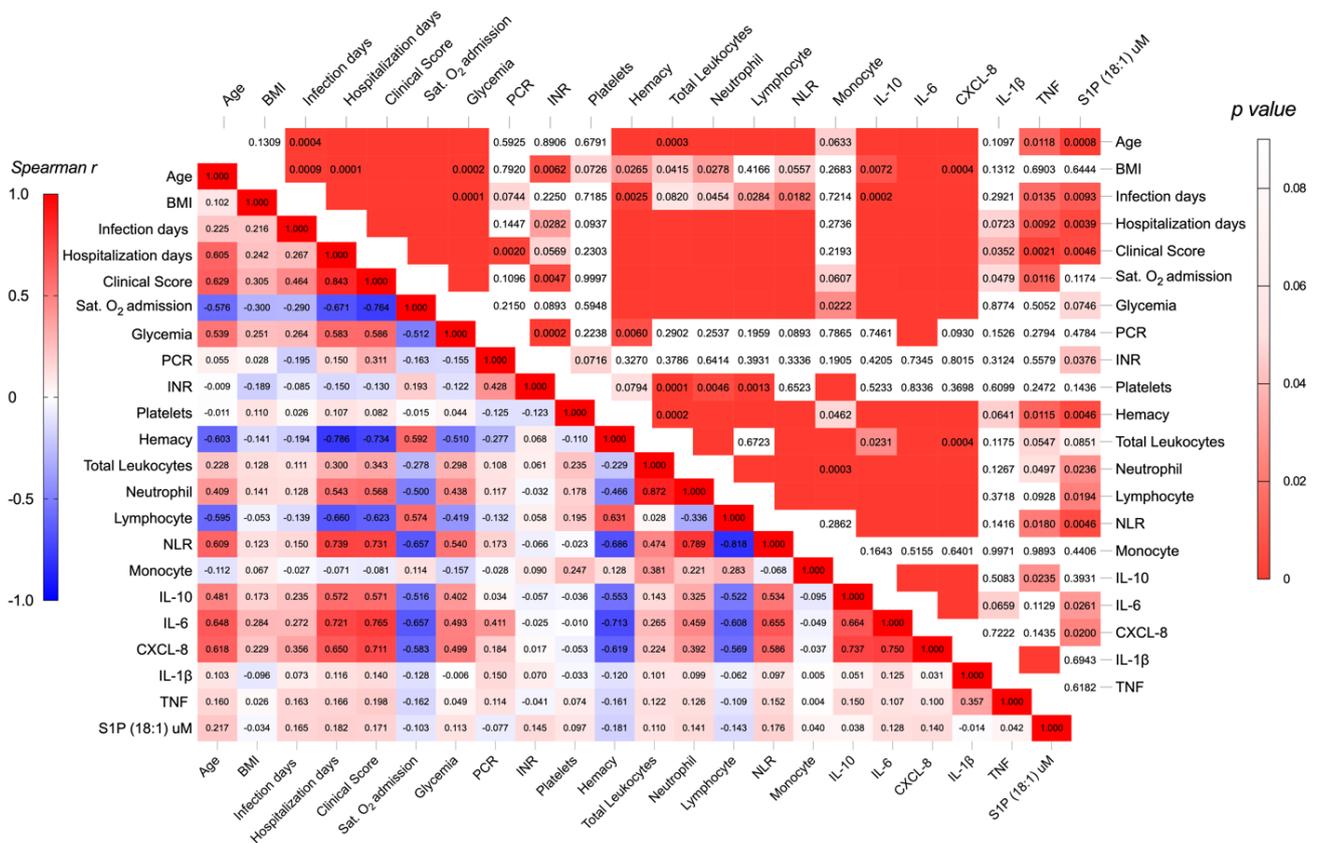


**Figura 9. Análise de fatores farmacológicos e antropométricos na produção de S1P em pacientes com COVID-19.** Produção de S1P em relação a (A) terapia com glicocorticóides, (B) sexo (masculino - *Man* e feminino - *Woman*) e (C) Índice de Massa Corporea (IMC, do inglês *IBM*). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o teste de comparações múltiplas de *Kruskal-Wallis* (não paramétrico), seguido do pós-teste de *Dunn* para comparações pareadas. Os resultados são apresentados na forma de medianas em gráficos boxplot. Os níveis de significância são indicados pela presença de valores de  $p < 0,05$ , evidenciando diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

### 6.2.2 Correlações da produção de S1P com os parâmetros clínicos e imunológicos em pacientes com COVID-19

Para entender se a produção de S1P nos pacientes com COVID-19 tinha correlações pró- ou anti-inflamatórias e se estavam relacionados à imunopatogênese da doença, utilizamos o teste de correlação de *Spearman*. Dessa forma, exploramos as relações entre os níveis plasmáticos de S1P e as características clínicas, produção de mediadores inflamatórios e parâmetros hematológicos (**Figura 10**).

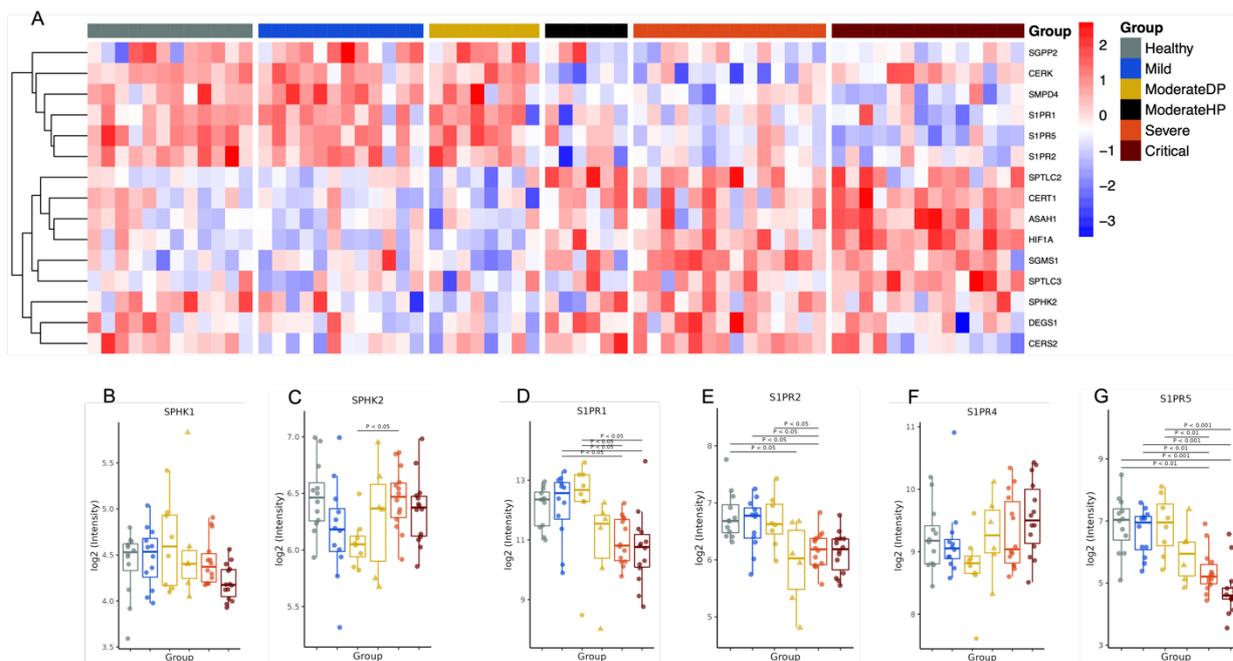
Nossos resultados demonstraram correlações estatísticas positivas e fracas entre S1P e as variáveis de idade ( $p=0,0008$ ), dias de infecção ( $p=0,0093$ ) e de hospitalização ( $p=0,0039$ ), escore clínico ( $p=0,0046$ ), INR ( $p=0,0376$ ), contagem de neutrófilos ( $p=0,0236$ ), RNL ( $p=0,0046$ ), IL-6 ( $p=0,0261$ ) e CXCL-8/IL-8 ( $p=0,0200$ ). Por outro lado, encontramos correlações estatísticas negativas e fracas com contagem de hemácias ( $p=0,0046$ ) e número de linfócitos ( $p=0,0194$ ) (**Figura 10**). Esses achados indicam que, embora os níveis de S1P (18:1) aumentem nos pacientes, eles não estão diretamente correlacionados com os principais marcadores inflamatórios associados a um pior prognóstico da doença. Isso sugere que o aumento de S1P pode ter um efeito benéfico na resolução da COVID-19.



**Figura 10. Matriz de correlação das interações entre S1P e parâmetros clínicos e inflamatórios na COVID-19.** A barra lateral na esquerda indicam os coeficientes de correlação ( $r$ ) de Spearman: o vermelho indica correlação positiva, enquanto o azul indica correlação negativa. Os valores de  $r$  variam entre -1,0 e 1,0. A barra lateral da direita indica os níveis de significância do teste de correlação, considerando  $p < 0,05$ . BMI: Índice de Massa corporal; INR: razão normalizada internacional; RNL: Razão Neutrófilo Linfócito; PCR: Proteína C Reativa. TNF: Fator de necrose tumoral.

### 6.2.3 Expressão gênica de receptores e enzimas envolvidas na via de S1P em pacientes com COVID-19

Para examinar a expressão de genes relacionados ao metabolismo de S1P em células sanguíneas de pacientes afetados pela COVID-19 utilizamos metodologia de RNAseq. Neste sentido, demonstramos um aumento significativo na expressão da enzima Sphk2 em pacientes com formas graves da COVID-19 (Figura 11A e C). No entanto, não observamos efeito semelhante na expressão de Sphk1 (Figura 11A e B). Além disso, identificamos uma redução na expressão dos receptores de S1P (S1PR1-5) em células sanguíneas de pacientes graves com COVID-19 (Figura 11A, D-G).

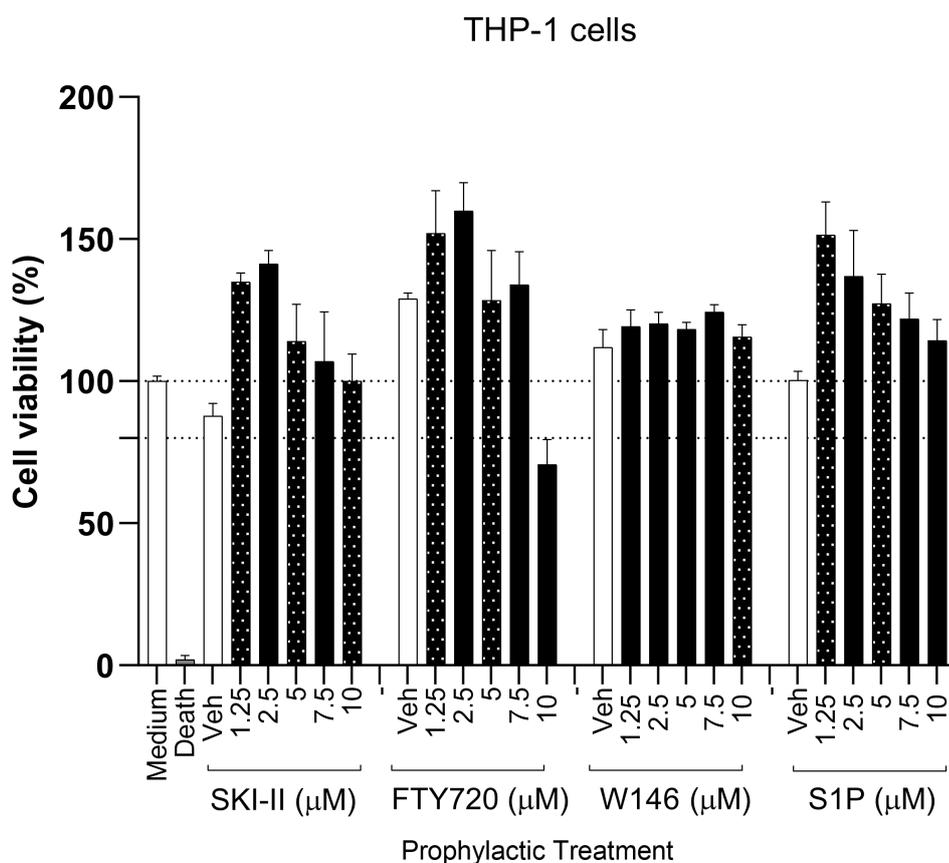


**Figura 11. Expressão genética de enzimas metabólicas e receptores da via de S1P em pacientes com COVID-19.** (A) Agrupamento hierárquico em mapa de calor baseado na intensidade de expressão de genes relacionados a via S1P na gravidade do COVID-19. Análise quantitativa da expressão dos genes: (B) esfingosina quinase 1 (SPHK1); (C) SPHK2; (D) receptor de esfingosina-1-fosfato (S1PR1); (E) S1PR2; (F) S1PR4 e (G) S1PR5, em células circulantes de indivíduos controle (n = 12), leve (n = 12), moderado (n = 14), grave (n = 14) e crítico (n=14). SGPP2/SSP: esfingosina-1-fosfato fosfatase 2; CERK: ceramida quinase; ASAH1: N-acilesfingosina amidohidrolase/ceramidase ácida; CERS: ceramida sintase; CSase: ceramidase; SphK: esfingosina quinase; SPP: fosfatase S1P. Dados em log2 dos perfis de expressão gênica normalizados para os grupos analisados estão mostrados como *boxplots*. Diferenças significativas na expressão gênica correspondem aos valores *p* ajustados de Benjamini e Hochberg, obtidos a partir da análise de expressão diferencial do transcriptoma completo, considerando um limiar  $p < 0,05$  em pelo menos um par de grupos clínicos.

#### 6.2.4 Avaliação do papel de S1P e S1PR1 na replicação viral do SARS-CoV-2 e na atividade inflamatória de macrófagos

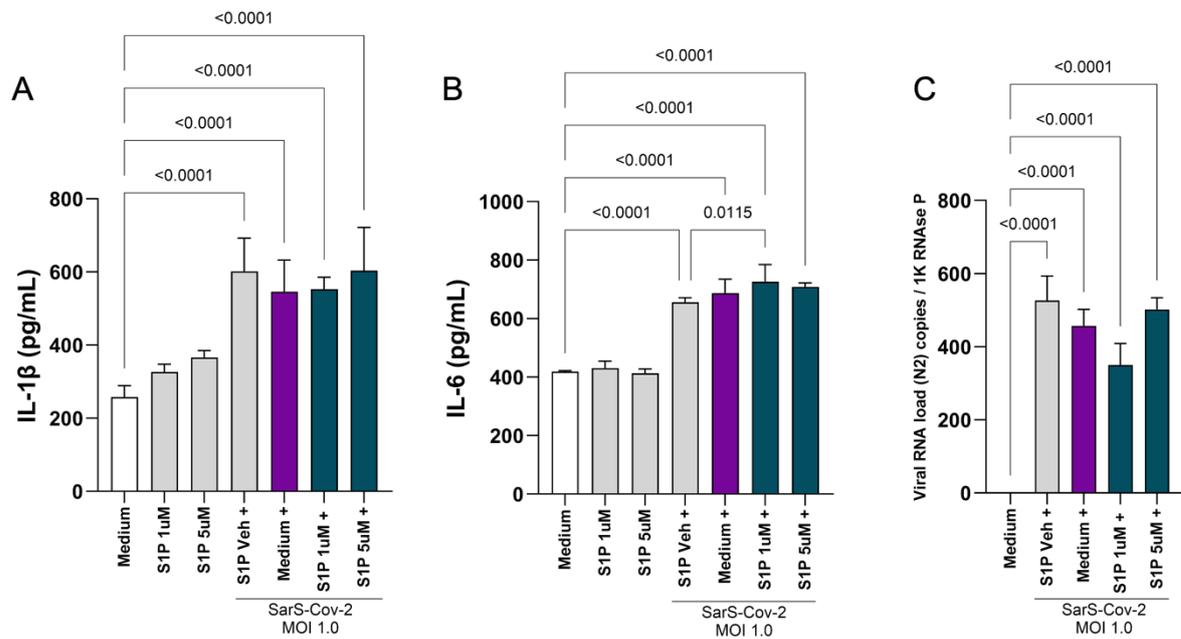
Considerando a complexidade da sinalização mediada por S1P, procuramos investigar se S1P/S1PR1 seria capaz de modular a atividade inflamatória e influenciar a replicação viral *in vitro* em células THP-1 diferenciadas em macrófagos e infectadas por SARS-CoV-2. Inicialmente, analisamos a viabilidade celular com diferentes tratamentos de S1P, FTY720 (Análogo de S1P), SK-I/II (Inibidor da enzima Sphk1/2, produtora de S1P) e W146 (Antagonista do receptor S1PR1) (Figura 12).

Com base nos resultados do teste de viabilidade celular, selecionamos as concentrações de 1 $\mu$ M e 5 $\mu$ M para S1P e FTY720; 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M para SK-I/II; 10 $\mu$ M para o W146, as quais demonstraram viabilidade celular superior a 80%, para prosseguir com os tratamentos e infecção com o SARS-CoV-2 *in vitro*.



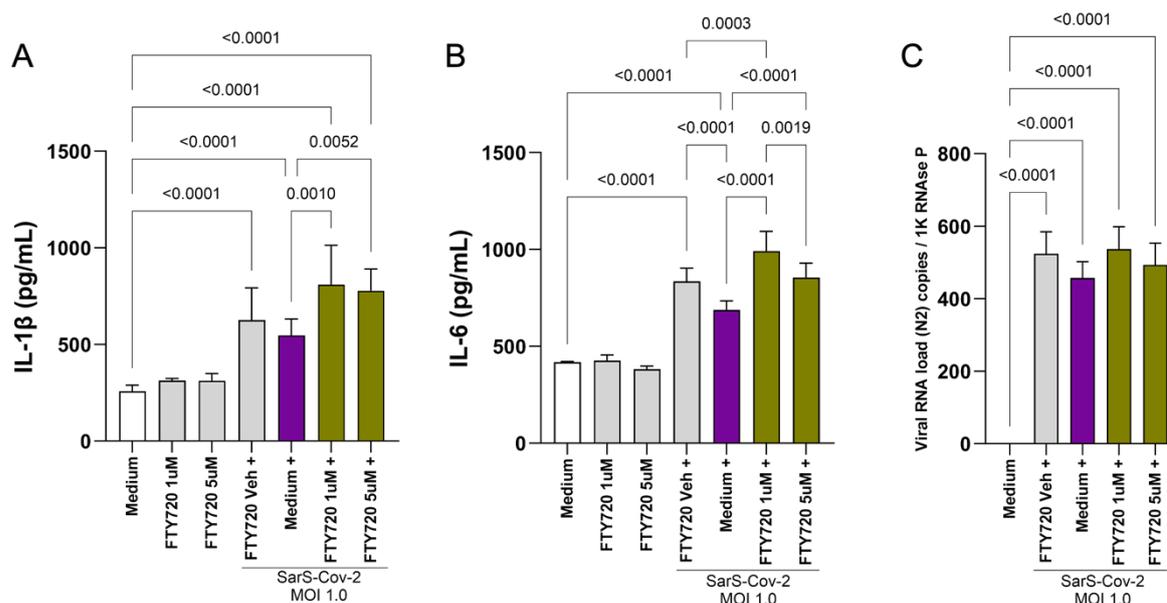
**Figura 12. Análise de citotoxicidade nos tratamentos farmacológicos de macrófagos THP-1.** As células foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações de S1P, FTY720 (Análogo de S1P), SK-I/II (Inibidor da enzima Sphk1/2, produtora de S1P) e W146 (Antagonista do receptor S1PR1). As análises estatísticas foram realizadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para investigarmos a influência da via S1P na produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e na carga viral realizamos o tratamento profilático por 24 horas com S1P nas concentrações de 1 $\mu$ M e 5 $\mu$ M. Em seguida, infectamos as células com SARS-CoV-2 (MOI 1.0) pelo período de 24 horas. Dessa forma, observamos que o enriquecimento com S1P (1 $\mu$ M e 5 $\mu$ M) não teve efeito na modulação da produção das citocinas IL-1 $\beta$  (**Figura 13A**) e IL-6 (**Figura 13B**) frente a infecção com as partículas de SARS-CoV-2 replicantes. Ademais, não foram observadas alterações significativas na carga viral (**Figura 13C**). Na ausência de partículas virais, o enriquecimento com S1P não resultou em mudanças significativas na produção das citocinas em comparação com o controle negativo (**Figura 13A e B**).



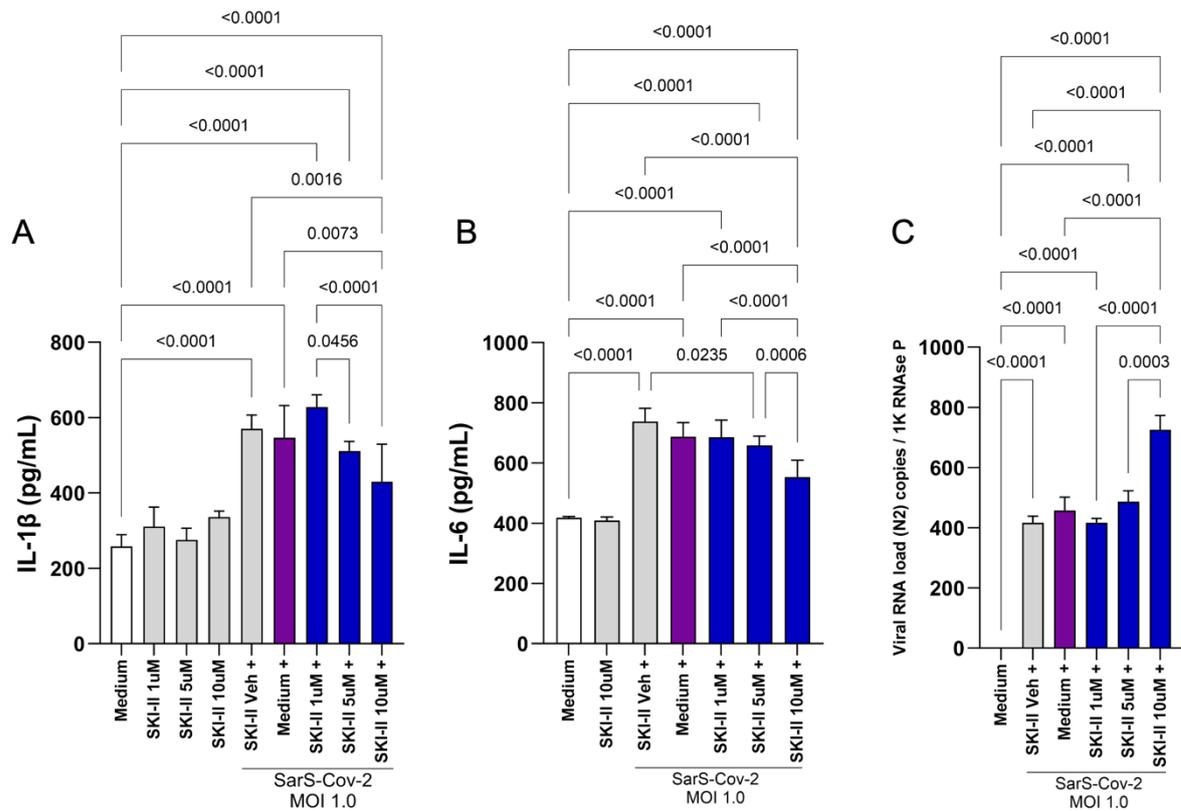
**Figura 13.** Efeito do tratamento com S1P nas funções dos macrófagos infectados por SARS-CoV-2. O tratamento com S1P nas concentrações de 1 $\mu$ M e 5 $\mu$ M *in vitro* na produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6 e (C) carga viral em macrófagos THP-1 infectados com SARS-CoV-2 (MOI 1.0) por 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de *Tukey*, considerando significância para  $p < 0,05$ .

Também conduzimos tratamentos dos macrófagos THP-1 com FTY720, um análogo de S1P que atua nos receptores S1P (S1PR1, S1PR3 - S1PR5, principalmente). Em condições basais, não observamos alterações significativas na concentração de IL-1 $\beta$  e IL-6 em relação ao controle negativo (**Figura 14A e B**). No entanto, o tratamento profilático com FTY720 nas concentrações de 1 $\mu$ M e 5 $\mu$ M resultaram em aumento significativo na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  ( $p=0,0010$  e  $p=0,0052$ , para 1 $\mu$ M e 5 $\mu$ M, respectivamente) (**Figura 14A**) e IL-6 ( $p<0,0001$  para 1 $\mu$ M e 5 $\mu$ M) (**Figura 14B**), em comparação ao grupo infectado com SARS-CoV-2, mas sem impacto na carga viral (**Figura 14C**).



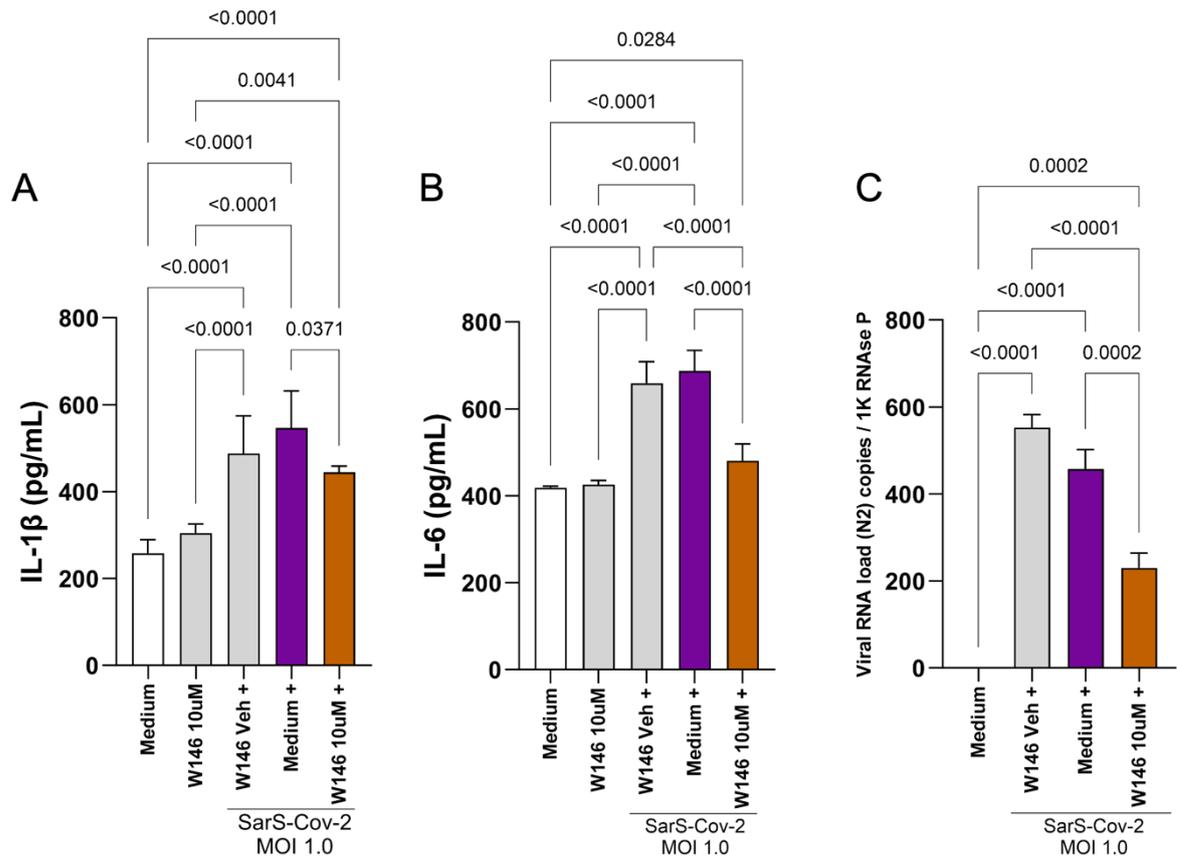
**Figura 14. Efeito do tratamento profilático com FTY720 (Análogo de S1P) nas funções dos macrófagos infectados por SARS-CoV-2.** O tratamento profilático com FTY720 nas concentrações de 1μM e 5μM *in vitro* na produção de (A) IL-1β, (B) IL-6 e (C) carga viral em macrófagos THP-1 infectados com SARS-CoV-2 (MOI 1.0) por 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey, considerando significância para  $p < 0,05$ .

Em seguida, investigamos qual seria o impacto do bloqueio de S1P na resposta inflamatória e na replicação viral, considerando que seu tratamento não apresentou efeito somatório na resposta de macrófagos infectados com SARS-CoV-2. Para isso, inibimos a enzima Sphk1/2, responsável pela síntese de S1P, através do tratamento com SKI-II em concentrações de 1μM, 5μM e 10μM. Após a infecção com SARS-CoV-2 (MOI 1.0) por 24 horas, observamos que o bloqueio de S1P com SKI-II (10μM) resultou em significativa redução na produção das citocinas IL-1β ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 15A**) e IL-6 ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 15B**). Além disso, o tratamento favoreceu o aumento da replicação viral (**Figura 15C**). Em condições basais, na ausência do vírus, o inibidor SKI-II não alterou a produção de IL-1β e IL-6 nas culturas de macrófagos (**Figura 15A e B**).



**Figura 15.** Efeito do tratamento profilático com SKI-II (inibidor da síntese de S1P) nas funções dos macrófagos infectados por SARS-CoV-2. O tratamento profilático com SKI-II nas concentrações de 1, 5 e 10 $\mu$ M *in vitro* na produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6 e (C) carga viral em macrófagos THP-1 infectados com SARS-CoV-2 (MOI 1.0) por 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey, considerando significância para  $p < 0,05$

Também investigamos o impacto do principal receptor de S1P (S1PR1) na resposta inflamatória e replicação viral *in vitro*, utilizando o antagonista W146 na concentração de 10 $\mu$ M uma hora antes da infecção com SARS-CoV-2 (MOI 1.0). Interessante, observamos que o antagonismo do receptor S1PR1 diminuiu a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  ( $p=0,0371$ ) (**Figura 16A**) e IL-6 ( $p<0,0001$ ) (**Figura 16B**) em comparação com o controle infectado. Além disso, o bloqueio do receptor S1PR1 reduziu significativamente a carga viral ( $p=0,0002$ ) nos macrófagos infectados por SARS-CoV-2 (**Figura 16C**).



**Figura 16. Efeito do tratamento profilático com W146 (antagonista do receptor S1PR1) nas funções dos macrófagos infectados por SARS-CoV-2.** O tratamento profilático com W146 na concentração de 10  $\mu$ M *in vitro* na produção de (A) IL-1 $\beta$ , (B) IL-6 e (C) carga viral em macrófagos THP-1 infectados com SARS-CoV-2 (MOI 1.0) por 24 horas. As análises estatísticas foram realizadas com teste one-way ANOVA e pós-teste de Tukey, considerando significância para  $p < 0,05$ .

### 6.3 DISCUSSÃO (CAPÍTULO II)

Nossos resultados ressaltam que a infecção pelo SARS-CoV-2 desencadeia disfunções nas vias relacionadas à síntese de esfingolipídios e aos lipídios envolvidos no metabolismo de ceramidas, enquanto a regulação da via de S1P pode desempenhar papéis cruciais na resposta imune durante a infecção. Além disso, observamos que as alterações nessas vias lipídicas estão correlacionadas com a gravidade da doença, influenciando a inflamação sistêmica, a resposta imune e a progressão da COVID-19.

Ao avaliarmos a produção de S1P em relação ao uso de glicocorticoides (GCs), identificamos uma tendência de aumento nas concentrações plasmáticas de S1P em pacientes graves tratados com GCs (**Figura 9A**). Este fenômeno pode ser devido à capacidade dos GCs de estimular a atividade da enzima esfingosina quinase (SphK), responsável pela síntese de S1P. O aumento de S1P parece ter um papel protetor nesse contexto, prevenindo a inflamação exacerbada ao regular a integridade da barreira endotelial (105,106), assim como promover uma resposta mais eficiente dos linfócitos T, tanto no *clearance* viral, como na regulação da resposta imune (107–111). Este mecanismo destaca o potencial terapêutico e envolvimento da via SphK/S1P na COVID-19. Outro achado interessante foi a observação de concentrações mais elevadas de S1P em mulheres no grupo de casos graves (**Figura 9B**). Este resultado é particularmente interessante, considerando que mulheres, em geral, apresentam uma resposta imune mais robusta contra a COVID-19. O aumento na produção de S1P em mulheres pode desempenhar um papel protetor, no entanto, os mecanismos específicos de S1P na resposta imunológica feminina à COVID-19 ainda precisam ser melhor estudados (112,113).

Dada a complexidade da sinalização mediada por S1P, buscamos investigar se o eixo S1P/S1PR1 seria capaz de modular a atividade inflamatória e influenciar a replicação viral *in vitro* em células THP-1 diferenciadas em macrófagos e infectadas por SARS-CoV-2. Nossos achados sugerem uma possível redução no sistema de S1P em pacientes com formas graves da doença. No entanto, o aumento de S1P pode indicar uma fase de recuperação da COVID-19. De acordo com outros estudos na literatura, a concentração sistêmica de S1P apresenta uma relação inversa com a gravidade da COVID-19. Valores reduzidos de S1P têm sido considerados um preditor relevante para a admissão em unidades de terapia intensiva (UTI). Pacientes com concentrações reduzidas desse SL foram identificados como portadores de um biomarcador negativo associado à gravidade da doença e maior risco de mortalidade na COVID-19 (114).

Em relação ao efeito dos tratamentos farmacológicos da via de S1P, foi descrito que além de seu modo de ação como modulador do receptor S1P, o FTY720 não fosforilado pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células (115). A produção ROS pode induzir citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 $\beta$  e IL-6. Neste sentido, um estudo demonstrou que ROS mitocondrial pode promover a produção de citocinas pró-inflamatórias (116). Além disso, outro estudo delineou o papel de ROS na modificação de várias moléculas sinalizadoras para regular a inflamação, incluindo o impacto de ROS em múltiplas vias de sinalização inflamatória, como o inflamassoma (via NLRP3), NF- $\kappa$ B e vias de sinalização MAPK, corroborando com a evidência de que a produção de ROS pode levar à ativação e ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (117). Em nossos experimentos com as culturas de macrófagos THP-1, utilizamos a forma não fosforilada do FTY720, sendo que o evento pró-inflamatório observado, no qual o FTY720 induziu o aumento das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6, possa ocorrer devido ao mesmo mecanismo citado nos trabalhos anteriores.

Em relação aos efeitos do tratamento profilático com SKI-II, um inibidor da síntese de S1P, nas funções dos macrófagos infectados por SARS-CoV-2, acreditamos que a inibição da síntese de S1P possa favorecer o acúmulo de Ceramidas, o que pode ter promovido o aumento da replicação viral e resposta inflamatória (**Figura 15C**). Isso se deve ao fato de que o aumento da concentração de Ceramidas pode levar à formação de jangadas lipídicas (do inglês, *lipid rafts*), onde podem estar presentes *clusters* do receptor ACE2, potencializando a replicação viral pelo SARS-CoV-2 (118,119).

Alguns estudos sugerem que a S1P e as suas enzimas metabólicas desempenham papéis importantes durante a infecção viral, incluindo a infecção por SARS-CoV-2, e que os agonistas S1PR1 podem ser úteis no tratamento da COVID-19, atenuando a resposta imune exacerbada e a disfunção endotelial, que são características da infecção por SARS-CoV-2. Desta forma, servindo como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da COVID-19 (120–124). Além disso, o S1PR1 está implicado na patogênese e na infecção pelo SARS-CoV-2 através da indução do eixo TMPRSS2/ACE2, promovendo a expressão da protease TMPRSS2, o que por sua vez pode facilitar a replicação viral (125,126). Essa relação pode explicar nossos resultados, nos quais a inibição de S1PR1 resultou na redução da carga viral.

## 6.4 CONCLUSÃO

Neste estudo, utilizamos uma metodologia quantitativa de esfingolipidômica para investigar os marcadores clínicos e inflamatórios associados aos níveis plasmáticos de SL e à expressão gênica relacionada ao metabolismo e sinalização destes mediadores lipídicos. As espécies de SM d18:1/24:0 e d18:1/24:1 foram identificadas como potenciais biomarcadores de gravidade em nossas análises. Observamos também que a síntese de S1P pode estar relacionada aos esforços do organismo para transitar para a fase de recuperação e resolução da COVID-19, embora não pareça exercer um papel anti-inflamatório definido. O bloqueio do receptor S1PR1 emerge como uma potencial estratégia terapêutica para o tratamento da COVID-19, demonstrando eficácia na redução da replicação viral e na modulação da resposta imune exacerbada. Essa abordagem promissora abre novas perspectivas para a terapêutica da COVID-19, oferecendo uma alternativa valiosa no arsenal de tratamentos disponíveis. Em resumo, nossos resultados evidenciaram, de modo abrangente, a interação da produção de SM e S1P com o repertório imunológico associado à COVID-19.

## 7 CAPÍTULO III:

### 7.1 Lista dos manuscritos publicados durante o período do doutorado, em colaboração com os Consórcios IMUNOCOVID e AEROBICOVID.

#### Artigo 1: Plasma Sphingomyelin Disturbances: Unveiling Its Dual Role as a Crucial Immunopathological Factor and a Severity Prognostic Biomarker in COVID-19.

DOI: <https://doi.org/10.3390/cells12151938>



Article

#### Plasma Sphingomyelin Disturbances: Unveiling Its Dual Role as a Crucial Immunopathological Factor and a Severity Prognostic Biomarker in COVID-19

Diana Mota Toro <sup>1,2,†</sup>, Pedro V. da Silva-Neto <sup>1,2,†</sup>, Jonatan C. S. de Carvalho <sup>1,3,†</sup>, Carlos A. Fuzo <sup>1,†</sup>, Malena M. Pérez <sup>1</sup>, Vinícius E. Pimentel <sup>1,4</sup>, Thais F. C. Fraga-Silva <sup>4</sup>, Camilla N. S. Oliveira <sup>1,4</sup>, Gláucia R. Caruso <sup>1</sup>, Adriana F. L. Vilela <sup>3</sup>, Pedro Nobre-Azevedo <sup>3,4</sup>, Thiago V. Defelippo-Felippe <sup>3</sup>, Jamille G. M. Argolo <sup>5</sup>, Augusto M. Degiovani <sup>6</sup>, Fátima M. Ostini <sup>6</sup>, Marley R. Feitosa <sup>7,8</sup>, Rogerio S. Parra <sup>7,8</sup>, Fernando C. Vilar <sup>8,9</sup>, Gilberto G. Gaspar <sup>9</sup>, José J. R. da Rocha <sup>7</sup>, Omar Feres <sup>7,8</sup>, Gabriel P. Costa <sup>10</sup>, Sandra R. C. Maruyama <sup>11</sup>, Elisa M. S. Russo <sup>1</sup>, Ana Paula M. Fernandes <sup>5</sup>, Isabel K. F. M. Santos <sup>4</sup>, Adriana Malheiro <sup>2</sup>, Ruxana T. Sadikot <sup>12</sup>, Vânia L. D. Bonato <sup>4</sup>, Cristina R. B. Cardoso <sup>1</sup>, Marcelo Dias-Baruffi <sup>1</sup>, Átila A. Trapé <sup>10,†</sup>, Lúcia H. Faccioli <sup>1,†</sup>, Carlos A. Sorgi <sup>2,3,4,\*</sup> and ImmunoCovid Consortium Group <sup>§</sup>

#### Artigo 2: High-resolution targeted mass spectrometry for comprehensive quantification of sphingolipids: clinical applications and characterization of extracellular vesicles.

*Primeira autoria compartilhada.*

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2024.115732>

Analytical Biochemistry 698 (2025) 115732



Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yabio](http://www.elsevier.com/locate/yabio)



#### High-resolution targeted mass spectrometry for comprehensive quantification of sphingolipids: clinical applications and characterization of extracellular vesicles

Thiago V.D. Felipe <sup>a,1</sup>, Diana M. Toro <sup>b,c,1</sup>, Jonatan C.S. de Carvalho <sup>a,b,1</sup>, Pedro Nobre-Azevedo <sup>a,d</sup>, Luiz F.M. Rodrigues <sup>a</sup>, Bianca T.M. Oliveira <sup>d</sup>, Pedro V. da Silva-Neto <sup>a,b,c</sup>, Adriana F.L. Vilela <sup>a</sup>, Fausto Almeida <sup>d</sup>, Lúcia H. Faccioli <sup>b,e</sup>, Carlos A. Sorgi <sup>a,c,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - FFCLRP, Universidade de São Paulo-USP, Ribeirão Preto, 14040-901, SP, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP, Universidade de São Paulo-USP, Ribeirão Preto, 14040-903, SP, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada - PPGIBA, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, 69080-900, AM, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP, Universidade de São Paulo-USP, Ribeirão Preto, 14049-900, SP, Brazil

<sup>e</sup> Centro de Excelência em Quantificação e Identificação de Lipídios (CEQL), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP, Universidade de São Paulo-USP, Ribeirão Preto, 14040-903, SP, Brazil

### Artigo 3: sTREM-1 Predicts Disease Severity and Mortality in COVID-19 Patients: Involvement of Peripheral Blood Leukocytes and MMP-8 Activity.

*Primeira autoria compartilhada.*

DOI: <https://doi.org/10.3390/v13122521>



Article

#### sTREM-1 Predicts Disease Severity and Mortality in COVID-19 Patients: Involvement of Peripheral Blood Leukocytes and MMP-8 Activity

Pedro V. da Silva-Neto <sup>1,2†</sup>, Jonatan C. S. de Carvalho <sup>1,3†</sup>, Vinícius E. Pimentel <sup>1,4†</sup>, Malena M. Pérez <sup>1†</sup>, Diana M. Toro <sup>1,2†</sup>, Thais F. C. Fraga-Silva <sup>4†</sup>, Carlos A. Fuzo <sup>1†</sup>, Camilla N. S. Oliveira <sup>1,4†</sup>, Lilian C. Rodrigues <sup>1</sup>, Jamille G. M. Argolo <sup>5</sup>, Ingryd Carmona-García <sup>5</sup>, Nicola T. Neto <sup>5</sup>, Camila O. S. Souza <sup>1,4</sup>, Talita M. Fernandes <sup>5</sup>, Victor A. F. Bastos <sup>1</sup>, Augusto M. Degiovani <sup>6</sup>, Letícia F. Constant <sup>6</sup>, Fátima M. Ostini <sup>6</sup>, Marley R. Feitosa <sup>7</sup>, Rogério S. Parra <sup>7</sup>, Fernando C. Vilar <sup>8</sup>, Gilberto G. Gaspar <sup>8</sup>, José J. R. da Rocha <sup>7</sup>, Omar Feres <sup>7</sup>, Fabiani G. Frantz <sup>1</sup>, Raquel F. Gerlach <sup>9</sup>, Sandra R. Maruyama <sup>10</sup>, Elisa M. S. Russo <sup>1</sup>, Angelina L. Viana <sup>5</sup>, Ana P. M. Fernandes <sup>5</sup>, Isabel K. F. M. Santos <sup>4</sup>, Vânia L. D. Bonato <sup>4</sup>, Antonio L. Boechat <sup>2</sup>, Adriana Malheiro <sup>2</sup>, Ruxana T. Sadikot <sup>11</sup>, Marcelo Dias-Baruffi <sup>1,†</sup>, Cristina R. B. Cardoso <sup>1,†</sup>, Lúcia H. Faccioli <sup>1,\*,†</sup> and Carlos A. Sorgi <sup>2,3,4,\*,†</sup> on behalf of the IMMUNOCOVID Study Group <sup>§</sup>

### Artigo 4: Matrix Metalloproteinases on Severe COVID-19 Lung Disease Pathogenesis: Cooperative Actions of MMP-8/MMP-2 Axis on Immune Response through HLA-G Shedding and Oxidative Stress.

*Primeira autoria compartilhada.*

DOI: <https://doi.org/10.3390/biom12050604>



Article

#### Matrix Metalloproteinases on Severe COVID-19 Lung Disease Pathogenesis: Cooperative Actions of MMP-8/MMP-2 Axis on Immune Response through HLA-G Shedding and Oxidative Stress

Pedro V. da Silva-Neto <sup>1,2,†</sup>, Valéria B. do Valle <sup>3,†</sup>, Carlos A. Fuzo <sup>1,†</sup>, Talita M. Fernandes <sup>4,†</sup>, Diana M. Toro <sup>1,2,†</sup>, Thais F. C. Fraga-Silva <sup>5</sup>, Patrícia A. Basile <sup>3</sup>, Jonatan C. S. de Carvalho <sup>1,6</sup>, Vinícius E. Pimentel <sup>1,5</sup>, Malena M. Pérez <sup>1</sup>, Camilla N. S. Oliveira <sup>1,5</sup>, Lilian C. Rodrigues <sup>1</sup>, Victor A. F. Bastos <sup>1</sup>, Sandra O. C. Tella <sup>7</sup>, Ronaldo B. Martins <sup>8</sup>, Augusto M. Degiovani <sup>9</sup>, Fátima M. Ostini <sup>9</sup>, Marley R. Feitosa <sup>10</sup>, Rogério S. Parra <sup>10</sup>, Fernando C. Vilar <sup>11</sup>, Gilberto G. Gaspar <sup>11</sup>, José J. R. da Rocha <sup>10</sup>, Omar Feres <sup>10</sup>, Eurico Arruda <sup>8</sup>, Sandra R. Maruyama <sup>12</sup>, Elisa M. S. Russo <sup>1</sup>, Angelina L. Viana <sup>4</sup>, Isabel K. F. M. Santos <sup>5</sup>, Vânia L. D. Bonato <sup>5</sup>, Cristina R. B. Cardoso <sup>1</sup>, Jose E. Tanus-Santos <sup>7</sup>, Eduardo A. Donadi <sup>11</sup>, Lucia H. Faccioli <sup>1</sup>, Marcelo Dias-Baruffi <sup>1,†</sup>, Ana P. M. Fernandes <sup>4,†</sup>, Raquel F. Gerlach <sup>3,\*,†</sup>, Carlos A. Sorgi <sup>2,5,6,\*,†</sup> and on behalf of the IMMUNOCOVID Study Group <sup>§</sup>

## Artigo 5: Acetylcholine, Fatty Acids, and Lipid Mediators Are Linked to COVID-19 Severity.

*Primeira autoria compartilhada.*

DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200079>

Volume 209, Issue 2

15 July 2022



RESEARCH ARTICLE | JULY 15 2022

### Acetylcholine, Fatty Acids, and Lipid Mediators Are Linked to COVID-19 Severity **FREE**

Malena M. Pérez; Vinícius E. Pimentel ; Carlos A. Fuzo; Pedro V. da Silva-Neto; Diana M. Toro ; Thais F. C. Fraga-Silva ; Luiz G. Gardinassi ; Camilla N. S. Oliveira; Camilla O. S. Souza ; Nicola T. Torre-Neto; Jonatan C. S. de Carvalho ; Thais C. De Leo ; Viviani Nardini ; Marley R. Feitosa; Rogerio S. Parra ; José J. R. da Rocha; Omar Feres; Fernando C. Vilar ; Gilberto G. Gaspar; Leticia F. Constant; Fátima M. Ostini; Augusto M. Degiovani; Alessandro P. Amorim; Angelina L. Viana ; Ana P. M. Fernandes; Sandra R. Maruyama; Elisa M. S. Russo ; Isabel K. F. M. Santos; Vânia L. D. Bonato; Cristina R. B. Cardoso; Carlos A. Sorgi; Marcelo Dias-Baruffi ; Lúcia H. Faccioli on behalf of the ImmunoCOVID Brazilian Research Consortium

+ Author & Article Information

*J Immunol* (2022) 209 (2): 250–261.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2200079> [Article history](#)

## Artigo 6: The Interplay among Glucocorticoid Therapy, Platelet-Activating Factor and Endocannabinoid Release Influences the Inflammatory Response to COVID-19.

*Primeira autoria compartilhada.*

DOI: <https://doi.org/10.3390/v15020573>



Article

### The Interplay among Glucocorticoid Therapy, Platelet-Activating Factor and Endocannabinoid Release Influences the Inflammatory Response to COVID-19

Jonatan C. S. de Carvalho <sup>1,2,†</sup>, Pedro V. da Silva-Neto <sup>2,3,†</sup>, Diana M. Toro <sup>2,3,†</sup>, Carlos A. Fuzo <sup>2,†</sup>, Viviani Nardini <sup>2,†</sup>, Vinícius E. Pimentel <sup>2,4</sup>, Malena M. Pérez <sup>2</sup>, Thais F. C. Fraga-Silva <sup>4</sup>, Camilla N. S. Oliveira <sup>2,4</sup>, Augusto M. Degiovani <sup>5</sup>, Fátima M. Ostini <sup>5</sup>, Marley R. Feitosa <sup>6</sup>, Rogerio S. Parra <sup>6</sup>, José J. R. da Rocha <sup>6</sup>, Omar Feres <sup>6</sup>, Fernando C. Vilar <sup>7</sup>, Gilberto G. Gaspar <sup>7</sup>, Isabel K. F. M. Santos <sup>4</sup>, Ana P. M. Fernandes <sup>8</sup>, Sandra R. Maruyama <sup>9</sup>, Elisa M. S. Russo <sup>2</sup>, Vânia L. D. Bonato <sup>4</sup>, Cristina R. B. Cardoso <sup>2</sup>, Marcelo Dias-Baruffi <sup>2,†</sup>, Lúcia H. Faccioli <sup>2,†</sup>, Carlos A. Sorgi <sup>1,3,4,\*,†</sup> and on behalf of the ImmunoCovid Study Group <sup>§</sup>

## Artigo 7: Divergent androgenic modulation of SARS-CoV-2 infection cooperates with dysregulated immune response to dictate worse COVID-19 outcomes in men.

*Primeira autoria compartilhada.*

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2023.08.026>



Divergent androgenic modulation of SARS-CoV-2 infection cooperates with dysregulated immune response to dictate worse COVID-19 outcomes in men



Murillo Duarte-Silva <sup>a,b,1</sup>, Camilla N.S. Oliveira <sup>a,b,1</sup>, Carlos Fuzo <sup>a,1</sup>, Pedro V. Silva-Neto <sup>a,c,1</sup>, Diana M. Toro <sup>a,c,1</sup>, Vinícius E. Pimentel <sup>a,b</sup>, Malena M. Pérez <sup>a</sup>, Thais F.C. Fraga-Silva <sup>b</sup>, Jonatan C.S. Carvalho <sup>a,d</sup>, Firmino M.S. Neto <sup>a</sup>, Ronaldo B.M. Júnior <sup>a,j</sup>, Eurico Arruda <sup>j</sup>, Fernando C. Vilar <sup>e</sup>, Augusto M. Degiovani <sup>f</sup>, Fátima M. Ostini <sup>f</sup>, Marley R. Feitosa <sup>g</sup>, Rogerio S. Parra <sup>g</sup>, Gilberto G. Gaspar <sup>e</sup>, José J.R. Rocha <sup>g</sup>, Omar Feres <sup>g</sup>, Ana P.M. Fernandes <sup>h</sup>, Sandra R. Maruyama <sup>i</sup>, Elisa M.S. Russo <sup>a</sup>, Vânia L.D. Bonato <sup>b</sup>, Isabel K.F.M. Santos <sup>b,2</sup>, Carlos A. Sorgi <sup>b,c,d,2</sup>, Marcelo Dias-Baruffi <sup>a,2</sup>, Lúcia H. Faccioli <sup>a,2</sup>, Cristina R.B. Cardoso <sup>a,2,\*</sup>, in collaboration with the ImmunoCOVID Brazilian Research Consortium<sup>3</sup>

## Artigo 8: The Severity of COVID-19 Affects the Plasma Soluble Levels of the Immune Checkpoint HLA-G Molecule.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23179736>



Article

### The Severity of COVID-19 Affects the Plasma Soluble Levels of the Immune Checkpoint HLA-G Molecule

Jéssica F. C. Cordeiro <sup>1,†</sup>, Talita M. Fernandes <sup>2,3,†</sup>, Diana M. Toro <sup>4,5</sup>, Pedro V. da Silva-Neto <sup>4,5</sup>, Vinícius E. Pimentel <sup>4,6</sup>, Malena M. Pérez <sup>4</sup>, Jonatan C. S. de Carvalho <sup>4,7</sup>, Thais F. C. Fraga-Silva <sup>6</sup>, Camilla N. S. Oliveira <sup>4,6</sup>, Jamille G. M. Argolo <sup>1</sup>, Augusto M. Degiovani <sup>8</sup>, Fátima M. Ostini <sup>8</sup>, Enrico F. Puginna <sup>2,9</sup>, João S. da Silva <sup>3,6</sup>, Isabel K. F. M. Santos <sup>6</sup>, Vânia L. D. Bonato <sup>6</sup>, Cristina R. B. Cardoso <sup>4</sup>, Marcelo Dias-Baruffi <sup>4</sup>, Lúcia H. Faccioli <sup>4,†</sup>, Eduardo A. Donadi <sup>10,†</sup>, Carlos A. Sorgi <sup>5,6,7,\*</sup>, Ana P. M. Fernandes <sup>1,\*</sup> and on behalf of the IMMUNOCVID Study Group <sup>§</sup>

**Artigo 9: Effects of Moderate-Intensity Training Under Cyclic Hypoxia on Cardiorespiratory Fitness and Hematological Parameters in People Recovered From COVID-19: The AEROBICOVID Study.**

DOI: <https://doi.org/10.1177/19417381221120639>

Randomized Controlled Trial > Sports Health. 2023 Jul-Aug;15(4):558-570.  
doi: 10.1177/19417381221120639. Epub 2022 Sep 25.

**Effects of Moderate-Intensity Training Under Cyclic Hypoxia on Cardiorespiratory Fitness and Hematological Parameters in People Recovered From COVID-19: The AEROBICOVID Study**

Carlos Dellavechia de Carvalho, Danilo Rodrigues Bertucci, Felipe Alves Ribeiro, Gabriel Peinado Costa, Diana Mota Toro, Marta Camacho-Cardenosa, Javier Brazo-Sayavera, Carlos Arterio Sorgi, Marcelo Papoti, Átila Alexandre Trapé

**Artigo 10: The turning point of COVID-19 severity is associated with a unique circulating neutrophil gene signature.**

DOI: <https://doi.org/10.1111/imm.13631>



ORIGINAL ARTICLE

**The turning point of COVID-19 severity is associated with a unique circulating neutrophil gene signature**

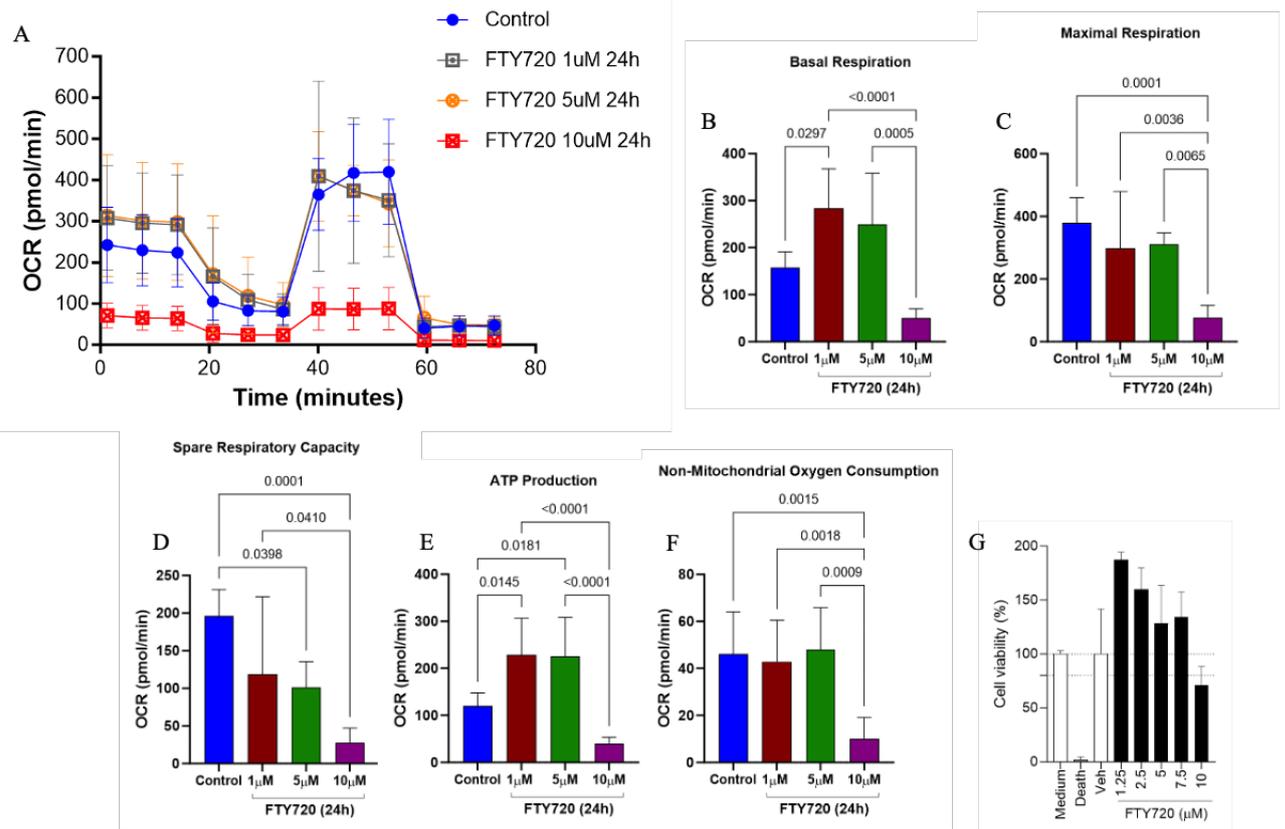
Carlos A. Fuzo, Thais F. C. Fraga-Silva, Sandra R. Maruyama, Víctor A. F. Bastos, Luana A. Rogerio, Nayore T. Takamiya, Pedro V. da Silva-Neto, Vinícius E. Pimentel, Diana M. Toro, Malena M. Pérez, Jonatan C. S. de Carvalho, Ingrid Carmona-Garcia, Camilla N. S. Oliveira, Augusto M. Degiovani, Fátima M. Ostini, Leticia F. Constant, Alessandro P. de Amorim, Fernando C. Vilar, Marley R. Feitosa, Rogerio S. Parra, José J. R. da Rocha, Omar Feres, Gilberto G. Gaspar, Angelina L. Viana, Ana P. M. Fernandes, Isabel K. F. M. Santos, Elisa M. S. Russo, Cristina R. B. Cardoso, Carlos A. Sorgi, Lúcia H. Faccioli, Vânia L. D. Bonato ✉, Marcelo Dias-Baruffi ✉  
in collaboration with the ImmunoCOVID study group ... See fewer authors ^

## 7.2 Resumo das atividades realizadas durante o período de Doutorado Sanduíche na *University of Nebraska*, EUA.

As atividades do Doutorado sanduíche foram realizadas entre setembro de 2022 e fevereiro de 2023, no laboratório liderado pela Professora Ruxana Sadikot, MD, MRCP(UK), na *University of Nebraska - Medical Center, Omaha, EUA*. Após minha chegada ao laboratório e uma reunião inicial com a Professora Dra. Ruxana Sadikot, delineamos os experimentos com o objetivo geral de avaliar a influência do receptor S1PR1 na ativação do fator de transcrição PGC-1 $\alpha$  e na função mitocondrial em células epiteliais estimuladas com *Pseudomonas aeruginosa*.

Durante o desenvolvimento do plano de estudo, tive a oportunidade de aprender com especialistas na área de metabolismo energético e ferramentas de análise que estão sendo integradas à nossa rotina de pesquisa aqui no Brasil. A experiência adquirida durante o estágio no exterior contribuiu para a expansão dos nossos projetos de pesquisa, ao introduzir novos conhecimentos em técnicas experimentais que exploram a Bioenergética mitocondrial. Este estágio foi realizado utilizando o analisador Seahorse XF (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), que permitiu mensurar a taxa de consumo de oxigênio (OCR) e a taxa de acidificação do meio extracelular (ECAR), indicando a respiração mitocondrial e a glicólise, respectivamente. Além disso, essas análises permitiram avaliar a flexibilidade, a dependência e a capacidade mitocondrial, além de determinar o fenótipo metabólico da população celular em estudo.

Um dos principais resultados que tivemos, demonstrou que o tratamento com o análogo de S1P (FTY720) foi capaz de modular o potencial metabólico e a respiração mitocondrial em células epiteliais primárias (BEAS-2b) (**Figura 17A**). Também, observamos que após 24 horas de tratamento com FTY720, nas concentrações de 1 $\mu$ M e 5 $\mu$ M, ocorreu aumento na taxa de respiração basal (**Figura 17B**) e na produção de ATP (**Figura 17E**). Por outro lado, na concentração de 10 $\mu$ M, a viabilidade celular foi prejudicada (**Figura 17G**), resultando em redução da respiração mitocondrial. Esses resultados sugeriram que a via de S1P/S1PR1 tem um efeito positivo na regulação da respiração mitocondrial nas células epiteliais.



**Figura 17. Tratamento com FTY720 estimula a respiração mitocondrial em células epiteliais.**

As células BEAS-2b foram tratadas com 1µM, 5µM e 10µM de FTY720 por 24 horas e em seguida analisadas pelo ensaio Seahorse XF Mito Stress Test. (A) OCR foi medido em tempo real na linha de base e, em seguida, em resposta a uma série de injeções para avaliar diferentes pontos da cadeia de transporte de elétrons. (B) FTY720 1µM aumentou a respiração basal (C) a respiração máxima (D) capacidade respiratória sobressalente (E) e respiração ligada ao ATP (F) Consumo de Oxigênio não mitocondrial (G) Análise de Viabilidade Celular do Tratamento com FTY720 pelo Ensaio MTT. Resultados expressos em média ± SD. A análise estatística utilizada foi *Two-Way ANOVA*, seguido do pós teste de *Tukey*.

## REFERÊNCIAS

1. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270–273.
2. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 2020;
3. WHO WHO. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. 2024. p. <https://covid19.who.int/>.
4. Dan Xu M, Fuling Zhou M, Wenbo Sun M, Liangjun Chen M, Lan Lan M, Huan Li M, et al. Relationship Between serum SARS-CoV-2 nucleic acid(RNAemia) and Organ Damage in COVID-19 Patients: A Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;
5. Becker RC. COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. *J Thromb Thrombolysis* [Internet]. 2020;50(1):54–67. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02134-3>
6. Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*. 2020;135(23):2033–40.
7. Dupont V, Kanagaratnam L, Goury A, Poitevin G, Bard M, Julien G, et al. Excess soluble fms-like tyrosine kinase 1 correlates with endothelial dysfunction and organ failure in critically ill COVID-19 patients. *Clin Infect Dis*. 2020;
8. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*. 2020;395(10223):497–506.
9. Zaim S, Chong JH, Sankaranarayanan V, Harky A. COVID-19 and Multiorgan Response. Vol. 45, *Current Problems in Cardiology*. 2020.
10. Pan F, Ye T, Sun P, Gui S, Liang B, Li L, et al. Time course of lung changes at chest CT during recovery from Coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Radiology*. 2020;295(3).

11. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*. 2020;395(10223).
12. Cox RJ, Brokstad KA. Not just antibodies: B cells and T cells mediate immunity to COVID-19. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020;1–2. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41577-020-00436-4>
13. MacEyka M, Spiegel S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*. 2014;510(7503):58–67.
14. Mendelson K, Evans T, Hla T. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development*. 1º de janeiro de 2014;141(1):5–9.
15. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(2):139–50.
16. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2017;2(1):17023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
17. Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2008;8(10):753–63. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri2400>
18. Fettel J, Kühn B, Guillen NA, Sürün D, Peters M, Bauer R, et al. Sphingosine-1-phosphate (S1P) induces potent anti-inflammatory effects in vitro and in vivo by S1P receptor 4-mediated suppression of 5-lipoxygenase activity. *The FASEB Journal* [Internet]. 1º de fevereiro de 2019;33(2):1711–26. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.201800221R>
19. WHO WHO. WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. 2020. p. <https://covid19.who.int/>.
20. Brasil M da S. Painel Coronavírus. Coronavírus Brasil. [Internet]. 2020. p. <https://covid.saude.gov.br/>. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br/>
21. VIRALZONE. SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2) proteome. 2020. p. <https://viralzone.expasy.org/8996> SARS coronavirus 2 (SARS-CoV-2) proteome.

22. Li X, Geng M, Peng Y, Meng L, Lu S. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J Pharm Anal* [Internet]. 2020;19(xxxx):1–7. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>
23. Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, Holmes EC, Garry RF. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*. 2020;26(April):450–2.
24. Nishiga M, Wang DW, Han Y, Lewis DB, Wu JC. COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17:543–558.
25. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;
26. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181:271–280.
27. Sevajol M, Subissi L, Decroly E, Canard B, Imbert I. Insights into RNA synthesis, capping, and proofreading mechanisms of SARS-coronavirus. *Virus Res*. 2014;194(90):9.
28. Ministério da Saúde. Protocolo de Manejo Clínico para o Novo Coronavírus (2019-nCoV). 2020. p. 1 ed.
29. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun* [Internet]. 2020/02/26. maio de 2020;109:102433. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32113704>
30. Matheson BNJ, Lehner PJ. How does SARS-CoV-2 cause COVID-19? *Science* (1979). 2020;369(6503):510–2.
31. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*. 2020;382(18):1708–20.
32. Zhang J jin, Dong X, Cao Y yuan, Yuan Y dong, Yang Y bin, Yan Y qin, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020;

33. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med* [Internet]. 2020;46(5):846–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05991-x>
34. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med* [Internet]. 2020/01/29. 26 de março de 2020;382(13):1199–207. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31995857>
35. Grasselli G, Zangrillo A, Zanella A, Antonelli M, Cabrini L, Castelli A, et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. *JAMA* [Internet]. 28 de abril de 2020;323(16):1574–81. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.5394>
36. Lee C, Choi WJ. Overview of COVID-19 inflammatory pathogenesis from the therapeutic perspective. *Arch Pharm Res* [Internet]. 2021;44(1):99–116. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01301-7>
37. Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol* [Internet]. 2020/10/14. dezembro de 2020;41(12):1100–15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33132005>
38. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(1):36–49.
39. Li G, Fan Y, Lai Y, Han T, Li Z, Zhou P, et al. Coronavirus infections and immune responses. *J Med Virol*. 2020;92(4):424–32.
40. Gabriella di M, Cristina S, Concetta R, Francesco R, Annalisa C. SARS-Cov-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2020;84(March):106519. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106519>
41. Pedersen SF, Ho YC. SARS-CoV-2: A Storm is Raging. *Journal of Clinical Investigation*. 2020;
42. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;71(15):762–768.

43. Chen L, Liu HG, Liu W, Liu J, Liu K, Shang J, et al. [Analysis of clinical features of 29 patients with 2019 novel coronavirus pneumonia]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2020;
44. Wang F, Nie J, Wang H, Zhao Q, Xiong Y, Deng L, et al. Characteristics of peripheral lymphocyte subset alteration in COVID-19 pneumonia. *J Infect Dis*. 2020;
45. Wan S, Yi Q, Fan S, Lv J, Zhang X, Guo L, et al. Characteristics of lymphocyte subsets and cytokines in peripheral blood of 123 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus pneumonia (NCP). *medRxiv*. 2020;
46. Hadjadj J, Yatim N, Barnabei L, Corneau A, Boussier J, Smith N, et al. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science* [Internet]. 2020/07/13. 7 de agosto de 2020;369(6504):718–24. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32661059>
47. Archambault AS, Zaid Y, Rakotoarivelo V, Doré É, Dubuc I, Martin C, et al. Lipid storm within the lungs of severe COVID-19 patients: Extensive levels of cyclooxygenase and lipoxygenase-derived inflammatory metabolites. *medRxiv* [Internet]. 1º de janeiro de 2020;2020.12.04.20242115. Disponível em: <http://medrxiv.org/content/early/2020/12/07/2020.12.04.20242115.abstract>
48. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020;26:1200–1204.
49. Wang D, Hu B, Hu C, Zhu F, Liu X, Zhang J, et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2020;
50. Xiong Y, Liu Y, Cao L, Wang D, Guo M, Jiang A, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):761–70.
51. Spiegel S, Milstien S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(6):403–15.
52. Hannun YA, Obeid LM. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: Stress encounters of the lipid kind. *Journal of Biological Chemistry*. 2002.

53. Linn SC, Kim HS, Keane EM, Andras LM, Wang E, Merrill, Jr AH. Regulation of de novo sphingolipid biosynthesis and the toxic consequences of its disruption. *Biochem Soc Trans.* 2001;29(6):831–5.
54. Liu B, Obeid LM, Hannun YA. Sphingomyelinases in cell regulation. *Cell and Developmental Biology.* 1997;8(3):311–22.
55. Xu R, Sun W, Jin J, Obeid LM, Mao C. Role of alkaline ceramidases in the generation of sphingosine and its phosphate in erythrocytes. *The FASEB Journal.* 2010;24(7):2507–15.
56. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal.* 2008;20(6):1010–1018.
57. Sugiura M, Kono K, Liu H, Shimizugawa T, Minekura H, Spiegel S, et al. Ceramide kinase, a novel lipid kinase: Molecular cloning and functional characterization. *Journal of Biological Chemistry.* 2002;277(26):23294–300.
58. Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, et al. Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1. *Science (1979).* 1998;279:1552–1555.
59. Chalfant CE, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: Expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci.* 2005;118(20):4605–12.
60. Simon J, Ouro A, Ala-Ibanibo L, Presa N, Delgado TC, Martínez-Chantar ML. Sphingolipids in non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: Ceramide turnover. *Int J Mol Sci.* 2020;21(1):40.
61. Nixon GF. Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *Br J Pharmacol [Internet].* 1º de outubro de 2009;158(4):982–93. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00281.x>
62. Hannun YA, Obeid LM. The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: Stress encounters of the lipid kind. *Journal of Biological Chemistry.* 2002;277(29):25847–50.
63. Seitz AP, Edwards MJ, Pewzner-jung Y, Gulbins E. Ceramide and sphingosine in pulmonary infections. *Biol Chem.* 2015;396:611–20.

64. Petrache I, Petrusca DN, Bowler RP, Kamocki K. Involvement of Ceramide in Cell Death Responses in the Pulmonary Circulation. *Proc Am Thorac Soc* Vol. 2011;8:492–6.
65. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. “Inside-out” signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev*. 2008;60(2):181–95.
66. Hammad SM, Al Gadban MM, Semler AJ, Klein RL. Sphingosine 1-Phosphate Distribution in Human Plasma: Associations with Lipid Profiles. Wertz PW, organizador. *J Lipids* [Internet]. 2012;2012:180705. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/180705>
67. Schwab SR, Pereira JP, Mehrdad M, Ying X, Yong H, G. CJ. Lymphocyte Sequestration Through S1P Lyase Inhibition and Disruption of S1P Gradients. *Science* (1979) [Internet]. 9 de setembro de 2005;309(5741):1735–9. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1113640>
68. Christoffersen C, Obinata H, Kumaraswamy SB, Galvani S, Ahnström J, Sevvana M, et al. Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 7 de junho de 2011;108(23):9613 LP – 9618. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/108/23/9613.abstract>
69. Argraves KM, Argraves WS. HDL serves as a S1P signaling platform mediating a multitude of cardiovascular effects. *J Lipid Res* [Internet]. 2007;48(11):2325–33. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022227520424320>
70. Proia RL, Hla T, Proia RL, Hla T. Emerging biology of sphingosine-1-phosphate: its role in pathogenesis and therapy. *J Clin Invest*. 2015;125(4):1379–87.
71. Książek M, Chacińska M, Chabowski A, Baranowski M. Sources, metabolism, and regulation of circulating sphingosine-1-phosphate. *J Lipid Res* [Internet]. 2015;56(7):1271–81. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022227520355474>
72. Rajita P, R. SS, Ivo C, P. PJ, B. RJ, Ying X, et al. Promotion of Lymphocyte Egress into Blood and Lymph by Distinct Sources of Sphingosine-1-Phosphate. *Science* (1979) [Internet]. 13 de abril de 2007;316(5822):295–8. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1139221>

73. Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY, et al. Sphingosine-1-phosphate is a missing cofactor for the E3 ubiquitin ligase TRAF2. *Nature* [Internet]. 24 de junho de 2010;465(7301):1084–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20577214>
74. Mandala SM. Sphingosine-1-phosphate phosphatases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2001;64:143–156.
75. Johnson KR, Johnson KY, Becker KP, Bielawski J, Mao C, Obeid LM. Role of Human Sphingosine-1-phosphate Phosphatase 1 in the Regulation of Intra- and Extracellular Sphingosine-1-phosphate Levels and Cell Viability. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278:34541–34547.
76. Taha TA, Hannun YA, Obeid LM. Sphingosine kinase: Biochemical and cellular regulation and role in disease. *J Biochem Mol Biol.* 2006;39:113–131.
77. Spiegel S, Milstien S. Functions of the Multifaceted Family of Sphingosine Kinases and Some Close Relatives. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2007;282(4):2125–9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925820720806>
78. Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, Spiegel S. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol.* 2011;688:141–155.
79. Goetzl EJ, Wang W, McGiffert C, Huang MC, Gräler MH. Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system. *J Cell Biochem.* 2004;92:1104–1114.
80. Vestri A, Pierucci F, Frati A, Monaco L, Meacci E. Sphingosine 1-phosphate receptors: Do they have a therapeutic potential in cardiac fibrosis? *Front Pharmacol.* 2017;9:296.
81. Rosen H, Goetzl EJ. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(July):560–70.
82. Walzer T, Chiossone L, Chaix J, Calver A, Carozzo C, Garrigue-Antar L, et al. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol* [Internet]. 2007;8(12):1337–44. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni1523>
83. Gomez-Muñoz A, Presa N, Gomez-Larrauri A, Rivera IG, Trueba M, Ordoñez M. Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and

- ceramide 1-phosphate. *Prog Lipid Res* [Internet]. 2016;61:51–62. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163782715300102>
84. Blaho VA, Galvani S, Engelbrecht E, Liu C, Swendeman SL, Kono M, et al. HDL-bound sphingosine-1-phosphate restrains lymphopoiesis and neuroinflammation. *Nature* [Internet]. 2015;523(7560):342–6. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature14462>
85. Thaker SK, Ch'ng J, Christofk HR. Viral hijacking of cellular metabolism. *BMC Biol* [Internet]. 18 de julho de 2019;17(1):59. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31319842>
86. Moreno-Altamirano MMB, Kolstoe SE, Sánchez-García FJ. Virus Control of Cell Metabolism for Replication and Evasion of Host Immune Responses. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 18 de abril de 2019;9:95. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31058096>
87. Thai M, Graham NA, Braas D, Nehil M, Komisopoulou E, Kurdistani SK, et al. Adenovirus E4ORF1-induced MYC activation promotes host cell anabolic glucose metabolism and virus replication. *Cell Metab* [Internet]. 1º de abril de 2014;19(4):694–701. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24703700>
88. Vastag L, Koyuncu E, Grady SL, Shenk TE, Rabinowitz JD. Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. *PLoS Pathog* [Internet]. 2011/07/14. julho de 2011;7(7):e1002124–e1002124. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21779165>
89. Heaton NS, Randall G. Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* [Internet]. 18 de novembro de 2010;8(5):422–32. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21075353>
90. Ehrlich A, Uhl S, Ioannidis K, Hofree M, TenOever BR, Nahmias Y. The SARS-CoV-2 Transcriptional Metabolic Signature in Lung Epithelium. *Cell Metab*. 2020;
91. Bruzzone C, Bizkarguenaga M, Gil-Redondo R, Diercks T, Arana E, García de Vicuña A, et al. SARS-CoV-2 Infection Dysregulates the Metabolomic and Lipidomic Profiles of Serum. *iScience* [Internet]. 2020/10/05. 23 de outubro de 2020;23(10):101645. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33043283>

92. Wu D, Shu T, Yang X, Song JX, Zhang M, Yao C, et al. Plasma metabolomic and lipidomic alterations associated with COVID-19. *Natl Sci Rev* [Internet]. 1º de julho de 2020;7(7):1157–68. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa086>
93. Dias SSG, Soares VC, Ferreira AC, Sacramento CQ, Fintelman-Rodrigues N, Temerozo JR, et al. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. *PLoS Pathog* [Internet]. 16 de dezembro de 2020;16(12):e1009127–e1009127. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33326472>
94. WHO Infection WWG on the CC and M of C 19. A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2020/06/12. agosto de 2020;20(8):e192–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32539990>
95. Xu XW, Wu XX, Jiang XG, Xu KJ, Ying LJ, Ma CL, et al. Clinical findings in a group of patients infected with the 2019 novel coronavirus (SARS-Cov-2) outside of Wuhan, China: retrospective case series. *BMJ* [Internet]. 19 de fevereiro de 2020;368:m606–m606. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32075786>
96. Ye G, Pan Z, Pan Y, Deng Q, Chen L, Li J, et al. Clinical characteristics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 reactivation. *J Infect* [Internet]. 2020/03/20. maio de 2020;80(5):e14–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32171867>
97. Reimann CM, Gräler MH. Extraction and Quantification of Sphingosine 1-Phosphate (S1P). *Bio Protoc* [Internet]. 2016;6(10):e1817. Disponível em: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1817>
98. Andréani P, Gräler MH. Comparative quantification of sphingolipids and analogs in biological samples by high-performance liquid chromatography after chloroform extraction. *Anal Biochem* [Internet]. 2006;358(2):239–46. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269706006270>
99. Shaner RL, Allegood JC, Park H, Wang E, Kelly S, Haynes CA, et al. Quantitative analysis of sphingolipids for lipidomics using triple quadrupole and quadrupole linear ion trap mass spectrometers[S]. *J Lipid Res* [Internet]. 2009;50(8):1692–707. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002227520307707>

100. Brangança RMJ, Jorge D, Paula Souza J, Dias M, Cassiano MHA, Arruda E. Stock Lineage Confirmation - Viral Pathogenesis Lab [Internet]. 2022 [citado 31 de janeiro de 2024]. Disponível em: <https://indigo-gorilla-409.notion.site/Stock-Lineage-Confirmation-Viral-Pathogenesis-Lab-76f36debcf174fcb8a1eea41c9814f7e>
101. Lu X, Wang L, Sakthivel SK, Whitaker B, Murray J, Kamili S, et al. US CDC Real-Time Reverse Transcription PCR Panel for Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(8):1654–1665.
102. Szymańska E, Saccenti E, Smilde AK, Westerhuis JA. Double-check: validation of diagnostic statistics for PLS-DA models in metabolomics studies. *Metabolomics* [Internet]. 2011/07/08. junho de 2012;8(Suppl 1):3–16. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22593721>
103. Bhadwal P, Dahiya D, Shinde D, Vaiphei K, Math RGH, Randhawa V, et al. LC-HRMS based approach to identify novel sphingolipid biomarkers in breast cancer patients. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–15.
104. Mandrekar JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *Journal of Thoracic Oncology*. 2010;5(9):1315–6.
105. Vettorazzi S, Bode C, Dejager L, Frappart L, Shelest E, Klaffen C, et al. Glucocorticoids limit acute lung inflammation in concert with inflammatory stimuli by induction of SphK1. *Nat Commun*. 17 de julho de 2015;6(1):7796.
106. Hsu SC, Huang WC, Liu CT, Hsu YP, Chang JH, Huang SK, et al. Sphingosine-1-phosphate as an indicator for deciding the use of adjuvant corticosteroids therapy in community-acquired pneumonia (sphingosine-1-phosphate and pneumonia trial). *Medicine*. setembro de 2019;98(38):e17278.
107. Tiper I V., East JE, Subrahmanyam PB, Webb TJ. Sphingosine 1-phosphate signaling impacts lymphocyte migration, inflammation and infection. *Pathog Dis*. agosto de 2016;74(6):ftw063.
108. Sun G, Wang B, Wu X, Cheng J, Ye J, Wang C, et al. How do sphingosine-1-phosphate affect immune cells to resolve inflammation? *Front Immunol*. 28 de fevereiro de 2024;15.

109. Drouillard A, Neyra A, Mathieu AL, Marçais A, Wencker M, Marvel J, et al. Human Naive and Memory T Cells Display Opposite Migratory Responses to Sphingosine-1 Phosphate. *The Journal of Immunology*. 15 de janeiro de 2018;200(2):551–7.
110. Eken A, Duhren R, Singh AK, Fry M, Buckner JH, Kita M, et al. S1P1 deletion differentially affects TH17 and Regulatory T cells. *Sci Rep*. 10 de outubro de 2017;7(1):12905.
111. Dixit D, Hallisey VM, Zhu EYS, Okuniewska M, Cadwell K, Chipuk JE, et al. S1PR1 inhibition induces proapoptotic signaling in T cells and limits humoral responses within lymph nodes. *Journal of Clinical Investigation*. 9 de janeiro de 2024;134(4).
112. Duarte-Silva M, Oliveira CNS, Fuzo C, Silva-Neto P V., Toro DM, Pimentel VE, et al. Divergent androgenic modulation of SARS-CoV-2 infection cooperates with dysregulated immune response to dictate worse COVID-19 outcomes in men. *Brain Behav Immun*. novembro de 2023;114:275–86.
113. Takahashi T, Ellingson MK, Wong P, Israelow B, Lucas C, Klein J, et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes. *Nature*. 10 de dezembro de 2020;588(7837):315–20.
114. Marfia G, Navone S, Guarnaccia L, Campanella R, Mondoni M, Locatelli M, et al. Decreased serum level of sphingosine-1-phosphate: a novel predictor of clinical severity in COVID-19. *EMBO Mol Med*. 11 de janeiro de 2021;13(1).
115. Takasaki T, Hagihara K, Satoh R, Sugiura R. More than just an immunosuppressant: The emerging role of FTY720 as a novel inducer of ROS and apoptosis. Vol. 2018, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018.
116. Bulua AC, Simon A, Maddipati R, Pelletier M, Park H, Kim KY, et al. Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS). *Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(3).
117. Liu J, Han X, Zhang T, Tian K, Li Z, Luo F. Reactive oxygen species (ROS) scavenging biomaterials for anti-inflammatory diseases: from mechanism to therapy. *J Hematol Oncol*. 30 de novembro de 2023;16(1):116.

118. Palacios-Rápalo SN, De Jesús-González LA, Cordero-Rivera CD, Farfan-Morales CN, Osuna-Ramos JF, Martínez-Mier G, et al. Cholesterol-Rich Lipid Rafts as Platforms for SARS-CoV-2 Entry. *Front Immunol.* 16 de dezembro de 2021;12.
119. Carpinteiro A, Gripp B, Hoffmann M, Pöhlmann S, Hoertel N, Edwards MJ, et al. Inhibition of acid sphingomyelinase by ambroxol prevents SARS-CoV-2 entry into epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry.* janeiro de 2021;296:100701.
120. Al-kuraishy HM, Batiha GES, Al-Gareeb AI, Al-Harcen NAH, Welson NN. Receptor-dependent effects of sphingosine-1-phosphate (S1P) in COVID-19: the black side of the moon. *Mol Cell Biochem.* 18 de outubro de 2023;478(10):2271–9.
121. Pan Y, Gao F, Zhao S, Han J, Chen F. Role of the SphK-S1P-S1PRs pathway in invasion of the nervous system by SARS-CoV-2 infection. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 22 de maio de 2021;48(5):637–50.
122. McGowan EM, Haddadi N, Nassif NT, Lin Y. Targeting the SphK-S1P-S1PR Pathway as a Potential Therapeutic Approach for COVID-19. *Int J Mol Sci.* 29 de setembro de 2020;21(19):7189.
123. Meacci E, Garcia-Gil M, Pierucci F. SARS-CoV-2 Infection: A Role for S1P/S1P Receptor Signaling in the Nervous System? *Int J Mol Sci.* 15 de setembro de 2020;21(18):6773.
124. Chen P, Wu M, He Y, Jiang B, He ML. Metabolic alterations upon SARS-CoV-2 infection and potential therapeutic targets against coronavirus infection. *Signal Transduct Target Ther.* 7 de junho de 2023;8(1):237.
125. Al-kuraishy HM, Al-Buhadily AK, Al-Gareeb AI, Alorabi M, Hadi Al-Harcen NA, El-Bouseary MM, et al. Citicoline and COVID-19: vis-à-vis conjectured. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 5 de dezembro de 2022;395(12):1463–75.
126. Prakash H, Upadhyay D, Bandapalli OR, Jain A, Kleuser B. Host sphingolipids: Perspective immune adjuvant for controlling SARS-CoV-2 infection for managing COVID-19 disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* fevereiro de 2021;152:106504.

## APÊNDICE

### Apêndice 1: Termo de aprovação do comitê de ética em Pesquisa (CEP- CAAE) IMUNOCOVID 30525920.7.0000.5403



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
Comitê de Ética em Pesquisa / Research Ethics Committee

Ribeirão Preto, January 3, 2021.

#### Subject: Approval by the Research Ethics Committee

To

Prof. Dr. Cristina Cardoso Ribeiro de Barros

School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FCFRP-USP)

Department of Clinical Analyses, Toxicology and Food Sciences

Dear Professor,

We inform that the research project entitled "**Prospective evaluation of gene expression and humoral response in severe COVID-19: search for potential biomarkers for disease evolution in patients infected with SARS-COV2**", was approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the FCFRP-USP and the National Research Ethics Commission (CONEP), which constitute the Brazilian body for ethical supervision in research involving human beings (CEP / CONEP system), according to Resolution No. 466/2012 of the National Health Council, Ministry of Health, Brazil. Resolution 466/2012 provides the guidelines and regulatory standards for research involving human beings in Brazil, which is based on the main documents that constitute the pillars of recognition and affirmation of the dignity, freedom and autonomy of human beings, such as Helsinki Declaration of 1964 and its updates; the 2004 Universal Declaration on Bioethics and Human Rights; and the Federal Constitution of the Federative Republic of Brazil, whose objectives are consistent with international documents on ethics, human rights and development.

The present research protocol is registered in the CEP / CONEP system under the number of Certificate of Presentation of Ethical Appreciation (CAAE) 30525920.7.0000.5403. The experimental design / current methods of this research protocol approved by the CEP / CONEP system are described below. Then, the history of the ethical analysis since the first submission of the research protocol and its respective amendments is presented.

*"Design/Methods: This study aims to investigate factors of susceptibility and resistance, as well as biomarkers of the disease caused by the SARS-COV2 virus, called COVID-19. For that, healthy participants from the USP community (Campus Ribeirão Preto), individuals with a positive molecular test for SARS-COV2 performed via Basic Health Units in the city of Ribeirão Preto and who are asymptomatic or have mild symptoms, as well as convalescents and patients will be selected from private hospitals (Hospital São Paulo and Hospital Unimed Ribeirão Preto) or another philanthropic hospital (Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto), in the same city, which will be evaluated clinically and laboratory, for the diagnosis of the disease, by the doctors responsible for the care. Men and women will be included, classified into control and sick groups, according to laboratory diagnosis and severity of COVID-19. After this categorization, the volunteers (100 per group) will be divided into healthy individuals with negative molecular*



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
 Comitê de Ética em Pesquisa / Research Ethics Committee

*diagnosis for SARS-COV2 (group 1 - G1), asymptomatic or oligosymptomatic with positive test for the virus (group 2 - G2), hospitalized with moderate symptoms, positive diagnosis (group 3 - G3) and severe hospitalized symptoms, also with positive molecular test for SARS-COV2 (group 4 - G4), severe hospitalized symptoms, with negative molecular test for SARS-COV2 (group 6 - G6). In addition to convalescents, previously tested and confirmed positive for the virus, however in the current absence of signs or symptoms of COVID-19 (group 5 - G5). After the consent and signature of the Informed Consent Form (ICF) by the patients or guardians themselves, samples of venous blood, saliva or pulmonary fluid aspirate will be collected for laboratory processing related to this research project (some control participants will also have collection nasopharyngeal swap for molecular diagnosis of virus infection). Samples from participants in groups G1, G2 and G5 will be collected only once, for research. Patients in groups G3 and G4, will have blood, saliva (only G3) and / or pulmonary fluid aspirate (G4 and G6) collected at the time of admission to the hospital and after 48 hours, repeating the collection once every 7 days, until the end of the hospitalization period. The blood samples will be centrifuged to obtain plasma and leukocytes (buffy coat). The obtained cells will be immediately frozen in Trizol, for subsequent RNA extraction and transcriptomic analysis of gene expression of receptors, transcription factors, steroidogenic enzymes, cytokines, and other mediators related to the immune response. In plasma, cytokines will be quantified by multiplex assay, in addition to eicosanoids, steroid hormones, sphingolipids and ceramides, by mass spectrometry. In addition, the profiles of N-glycans in the Fcs of IgGs and anti-carbohydrate antibodies will be evaluated, to ascertain their correlation with the clinical outcomes of SARS-COV2 infections. New biotechnological tools that allow the study of the relationships between the virus, its cellular targets and antibodies will be produced. With these results together, it is expected to understand more deeply the pathophysiology of COVID-19, as well as to establish markers of disease evolution and morbidity”.*

History of the approval ethical by CEP / CONEP system:

First approval: - CEP, April 6, 2020 - consubstanced opinion number 3,956,413; and CONEP, April 30, 2020 - consubstanced opinion number. 3,999,280;

Amendment 1 - approval: CEP, June, 8, 2020 - consubstanced opinion number 4,076,158; and CONEP, June 23, 2020 - consubstanced opinion number 4,104,192;

Amendment 2 - approval: CEP, July 7, 2020 - consubstanced opinion number 4,134,068; and CONEP, July 28, 2020 - 4,176,358;

Amendment 3 - approval: CEP, November 19, 2020 - consubstanced opinion number 4,409,566; and CONEP, December 02, 2020 - 4,432,873;

Amendment 4 - approval: CEP, December 10, 2020 - consubstanced opinion number 4,454,975; and CONEP, December 15, 2020 - consubstanced opinion number 4,465,002.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacéuticas de Ribeirão Preto  
Comitê de Ética em Pesquisa / Research Ethics Committee

The requirements for the ethical approval of this research protocol also included declarations of agreement from all health institutions (hospitals and basic health units), where the research participants will be recruited. The consultation of the patient's medical record is explained in the Informed Consent Form.

It is the responsibility of the researchers, according to Resolution 466/2012, item IV.5, letter d, to consider that the Informed Consent Form must be presented in two original documents, initialed in all its pages, and signed, at the end, by the research participant, or by his / her legal representative, as well as by the responsible researcher, or by the person (s) delegated by him / her, and the signature pages must be on the same sheet. The addresses and telephone or other contact, of those responsible for the research and of this Ethics Committee must be included.

The final report of the research must be sent to the CEP of the FCFRP-USP in its own form, as well as any changes, complications or interruptions, such as adverse events and eventual modifications to the protocol or team members, through the interposition of amendments on the Brazil Platform, which is the national and unified base of research records involving human beings for the entire CEP / CONEP system.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Cleni Marzocchi Machado'.

Prof. Dr. Cleni Mara Marzocchi Machado  
Coordinator of the Research Ethics Committee of FCFRP-USP



USP - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
DE RIBEIRÃO PRETO DA USP-  
FCFRP/USP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Avaliação prospectiva de expressão gênica e resposta humoral em COVID-19 grave: busca de potenciais biomarcadores para evolução da doença em pacientes infectados por SARS-COV2

**Pesquisador:** Cristina Ribeiro de Barros Cardoso

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 30525920.7.0000.5403

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.076.158

#### Apresentação do Projeto:

A presente apreciação trata de solicitação de emenda. Na carta de encaminhamento para justificativa da emenda, a pesquisadora responsável declara que devido a características inerentes à própria pandemia, como a evolução dos quadros graves e o crescente número de pacientes acometidos pela COVID-19 leve no município de Ribeirão Preto, o projeto original foi ampliado. Dentre as principais alterações, destacam-se:

- a inclusão de novos grupos de estudos (especialmente pacientes com sintomas leves ou convalescentes), que serão provenientes de testes realizados via Unidades Básicas de Saúde do município.
- a inclusão de novo centro hospitalar adicional, para coleta de amostras de pacientes com quadros moderados ou graves (Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto)
- a inclusão de novos tipos de amostras coletadas (saliva e aspirado de fluido pulmonar)
- a inclusão de novas metodologias para trabalho das novas amostras, incluindo exames laboratoriais de rotina (bioquímicos e hematológicos), dentre outras.
- a inclusão de novos pesquisadores, para atuarem no projeto, agora maior e ampliado.

**Endereço:** Avenida do Café s/nº

**Bairro:** Monte Alegre

**CEP:** 14.040-903

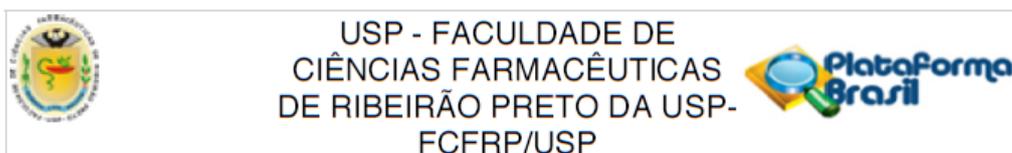
**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3315-4213

**Fax:** (16)3315-4892

**E-mail:** cep@fcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.076.158

**Objetivo da Pesquisa:**

De acordo com a pesquisadora:

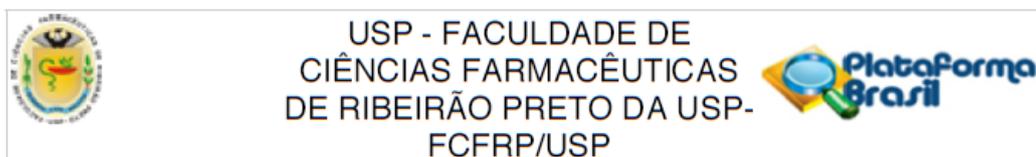
**OBJETIVO PRIMÁRIO:**

Determinar, por meio da avaliação da resposta imunológica de pacientes infectados por SARS-COV2, potenciais biomarcadores para a evolução grave da COVID-19 e novos alvos terapêuticos.

**OBJETIVO SECUNDÁRIO:**

- Investigar os perfis de N-glicanas de imunoglobulinas e citocinas pró ou anti-inflamatórias, nos indivíduos infectados com SARS-COV2, nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, em comparação a indivíduos saudáveis.
- Caracterizar as imunoglobulinas plasmáticas e presentes na saliva, das classes IgM, IgG e IgA anti-carboidratos, para determinação da relação entre os padrões de anticorpos anti-carboidratos com o diagnóstico e prognóstico para as diferentes formas clínicas da doença.
- Avaliar perfil e expressão gênica de macrófagos alveolares obtidos de aspirado de fluido pulmonar de pacientes intubados, assim como avaliar perfis lipídicos e proteico do líquido surfactante pulmonar.
- Avaliar, por análise transcriptômica, a expressão gênica de receptores, fatores de transcrição, enzimas esteroidogênicas, enzimas do metabolismo de mediadores lipídicos, citocinas e outros mediadores relacionados à resposta imunológica dos indivíduos infectados com SARS-COV2, nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, em comparação a indivíduos saudáveis.
- Determinar, por espectrometria de massas de alta resolução (LC-MS/MS), o perfil de produção de eicosanoides, hormônios esteroides, endocanabinoides, esfingolipídios/ceramidas e seus derivados metabólitos ativos, como também metabólitos do metabolismo energético celular em plasma de indivíduos infectados nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, em comparação a indivíduos saudáveis.
- Associar os perfis de resposta imunológica e inflamatória determinados com os desfechos clínicos documentados da COVID-19.
- Sequenciar o exoma de indivíduos infectados com SARS-COV2, nas diferentes apresentações clínicas da COVID-19, para identificação de polimorfismos genéticos que predispõem ao desenvolvimento da forma grave da doença e mudanças epigenéticas elencando fatores genéticos de baixo e alto risco à doença.
- Quantificar os níveis plasmáticos de HLA-G solúvel em diferentes condições clínicas de pacientes com Covid-19.
- Produzir ferramentas biotecnológicas que permitam o estudo das relações entre o vírus, seus

**Endereço:** Avenida do Café s/nº  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-903  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** oep@fcrp.usp.br

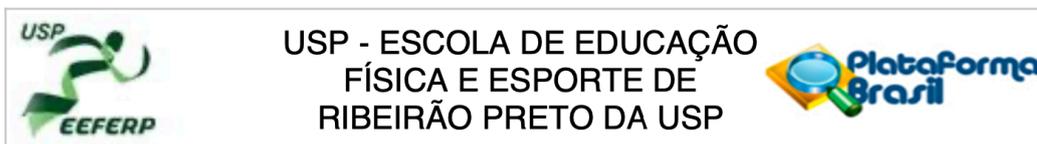


Continuação do Parecer: 4.076.158

alvos celulares e anticorpos.

- Analisar as experiências positivas e negativas de atendimento à Covid-19 nos serviços de saúde público do município de Ribeirão Preto-SP.
- Relacionar as variáveis sócio-demográficas, clínicas, antropométricas, comportamentais e de risco com os parâmetros imunológicos, bioquímicos, genéticos e metabólicos analisados.

**Apêndice 2: Termo de aprovação do comitê de ética em Pesquisa do estudo AEROBICOVID  
(CAAE: 33783620.6.0000.5659 e CAAE: 33783620.6.3001.5403)**



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Efeito do Treinamento de Moderada Intensidade associado à hipóxia normobárica sobre a função pulmonar, parâmetros hematológicos, imunológicos, autonômicos e relacionados à aptidão física em pessoas convalescentes da COVID-19 (AEROBI - COVID)

**Pesquisador:** Atila Alexandre Trapé

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 33783620.6.0000.5659

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.157.569

**Apresentação do Projeto:**

Vide parecer anterior.

**Objetivo da Pesquisa:**

Vide parecer anterior.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Vide parecer anterior.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Vide parecer anterior

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide parecer anterior.

**Recomendações:**

Vide parecer anterior.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Conforme trecho da carta resposta transcrita abaixo, as pendências foram resolvidas:

"1. Explicar no TCLE termos de difícil entendimento para leigos: hipóxia normobárica intermitente;

**Endereço:** Avenida Bandeirantes, 3900

**Bairro:** VILA MONTE ALEGRE

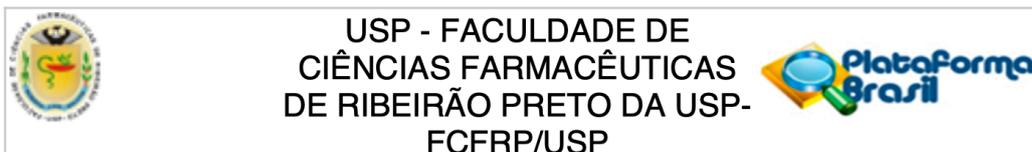
**CEP:** 14.040-907

**UF:** SP

**Município:** RIBEIRAO PRETO

**Telefone:** (16)3315-0494

**E-mail:** cep90@usp.br



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito do Treinamento de Moderada Intensidade associado à hipóxia normobárica sobre a função pulmonar, parâmetros hematológicos, imunológicos, autonômicos e relacionados à aptidão física em pessoas convalescentes da COVID-19 (AEROBI - COVID)

**Pesquisador:** Atila Alexandre Trapé

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 33783620.6.3001.5403

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.214.175

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta ao parecer nº 4.212.955.

#### Objetivo da Pesquisa:

sem modificações em relação a versão anterior.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

sem modificações em relação a versão anterior.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

sem modificações em relação a versão anterior.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentação de carta resposta do pesquisador para as pendências emitidas no parecer nº 4.212.955.

#### Recomendações:

ver item Conclusões ou Pendências.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador principal, Prof. Dr. Átila Alexandre Trapé, apresentou justificativa que não consegue alterar as pendências listadas no parecer nº 4.212.955, por se tratarem de alterações em campos

**Endereço:** Avenida do Café s/nº  
**Bairro:** Monte Alegre **CEP:** 14.040-903  
**UF:** SP **Município:** RIBEIRAO PRETO  
**Telefone:** (16)3315-4213 **Fax:** (16)3315-4892 **E-mail:** cep@fcfrp.usp.br

**Apêndice 3: Razão m/z do íon precursor e íon fragmento das subclasses e espécies lipídicas identificadas por LC/MS-MS**

Canal	Íon Precursor (m/z)	Análito identificados em verde	Padrão interno	íon Fragmento (m/z)
1	100-2000	TOF-MS - Período 1	-	-
2	552,5	C17:0_Ceramida	IS	534.5237-534.5297
3	647,5	SM(d18:1/12:0)	IS Mix II (Avanti)	184.0703-184.0753
4	286,2	Sphingosina C17:0	IS Mix II (Avanti)	268.2623-268.2663
5	288,2	Sphinganine C17:0	IS Mix II (Avanti)	270.2750-270.2810
6	366,2	Sphingosina-1-P C17:0	IS Mix II (Avanti)	250.2509-250.2569
7	368,2	Sphinganine-1-P C17:0	IS Mix II (Avanti)	270.2750-270.2830
8	482,4	C12:0_Ceramida	IS Mix II (Avanti)	264.2653-264.2703
9	562,4	CerIP (12:0)	IS Mix II (Avanti)	264.2652-264.2699
10	644,5	C12_Glucosyl_Ceramide	IS Mix II (Avanti)	264.2652-264.26702
11	806,5	LacCER(d18:1/12:0)	IS Mix II (Avanti)	264.2652-264.26702
12	380,2	Sphingosina-1-P C18:1	Sphingosina-1-P C17:0	264.2655 - 264.2695
13	538,5	C16:0-Ceramida	C12:0_Ceramida	264.2652 - 264.26710
14	566,5	C18:0-Ceramida	C12:0_Ceramida	264.2652 - 264.26704
15	648,6	C24:1-Ceramida	C12:0_Ceramida	264.2652 - 264.26802
16	650,6	C24:0-Ceramida	C12:0_Ceramida	264.2652 - 264.26702
17	664,4	C25:0-Ceramida	C12:0_Ceramida	264.2652 - 264.26702
18	700,5	C16_Glc_Ceramide (HexCer)	C12_Glucosyl (Glc)_Ceramide	264.2652 - 264.26702
19	728,6	C18_Glc_Ceramide (HexCer)	C12_Glucosyl (Glc)_Ceramide	264.2652 - 264.26702
20	810,6	C24:1_Glc_Ceramide (HexCer)	C12_Glucosyl (Glc)_Ceramide	264.2652 - 264.26702
21	731,6	SM 18:0	SM(d18:1/12:0)	184.0703 - 184.0753
22	815,7	SM 24:0	SM(d18:1/12:0)	184.0703 - 184.0753
23	618,4	CerIP (16:0)..	CerIP (12:0)	264.2652 - 264.26702
24	730,6	CerIP (24:0)	CerIP (12:0)	264.2652 - 264.26702
25	862,6	LacCER(16:0)	LacCER(d18:1/12:0)	264.2652 - 264.26702
26	974,7	LacCER(24:0)	LacCER(d18:1/12:0)	264.2652 - 264.26702
27	300,3	Sphingosina C18:0 (Sph)	Sphingosina C17:0	282.2480 - 282.2530
28	272,2	Sphingosina C16:0 (Sph)	Sphingosina C17:0	254.2164 - 254.2214
29	244,2	Sphingosina C14:0 (Sph)	Sphingosina C17:0	226.1765 - 226.1815
30	302,2	Sphinganine C18:0	Sphinganine C17:0	284.2912 - 284.2952
31	274,2	Sphinganine C16:0	Sphinganine C17:0	256.2612 - 256.2652
32	382,2	Sphinganine-1-P C18:0	Sphinganine-1-P C17:0	364.2120 - 364.2160
33	354,2	Sphinganine-1-P C16:0	Sphinganine-1-P C17:0	336.2298 - 336.2338
34	352,2	Sphingosina-1-P C16:0	Sphingosina-1-P C17:0	264.2655 - 264.2695
35	356,35	C22:1 Sph	C17 Sph	338.3500 - 338.3540
36	328,3	C20:1 Sph	C17 Sph	310.3000 - 310.3040
37	330,3	C20 Sphinganine	C17 Sphinganine	214.3000 - 214.3040
38	410,3	C20 SphinganineIP	C17 Sphinganine	392.3000 - 392.3040
39	464,4	C18:1 Cer	C12:0_Ceramida	264.2694 - 264.2714
40	594,6	C20 Cer	C12:0_Ceramida	264.2671 - 264.2701
41	622,7	C22 Cer	C12:0_Ceramida	264,2
42	634,7	C23:1 Cer	C12:0_Ceramida	264,2
43	636,7	C23 Cer	C12:0_Ceramida	264,2641
44	662,8	C25:1 Cer	C12:0_Ceramida	264,2
45	676,8	C26:1 Cer	C12:0_Ceramida	264,2
46	678,8	C26 Cer	C12:0_Ceramida	264,2
47	675,5	C14_SM	C12:0_SM	183.9758 - 184.0758
48	701,600	C16:1 SM	C12:0_SM	183.9758 - 184.0758
49	703,57	C16_SM	C12:0_SM	183.9758 - 184.0758
50	729,6	C18:1 SM	C12:0_SM	183.9758 - 184.0758
51	757,6	C20:1 SM	C12:0_SM	183.9758 - 184.0758
52	759,6	C20_SM	C12:0_SM	183.9758 - 184.0758

53	785,591	C22:1 SM	C12:0 SM	183.9758 - 184.0758
54	787,6	C22 SM	C12:0 SM	183.9758 - 184.0758
55	799,6	C23:1 SM	C12:0 SM	183.9758 - 184.0758
56	801,6	C23 SM	C12:0 SM	183.9758 - 184.0758
57	813,7	C24:1 SM	C12:0 SM	183.9758 - 184.0758
58	827,7	C25:1 SM	C12:0 SM	183.9758 - 184.0758
59	829,7	C25 SM	C12:0 SM	183.9758 - 184.0758
60	841,7	C26:1 SM	C12:0 SM	183.9758 - 184.0758
61	843,7	C26 SM	C12:0 SM	183.9758 - 184.0758
62	726,58	C18:1 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26702
63	754,7	C20:1 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26703
64	756,7	C20 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26704
65	782,7	C22:1 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26705
66	784,66	C22 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26706
67	796,7	C23:1 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26707
68	798,7	C23 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26708
69	808,6	C24:2 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26709
70	812,7	C24 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26710
71	824,6	C25:1 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26711
72	826,8	C25 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26712
73	836,6	C26:2 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26713
74	838,8	C26:1 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26714
75	840,8	C26 HexCer	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26715
76	716,7	C16 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26716
77	744,7	C18 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26717
78	772,7	C20 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26718
79	798,7	C22:1 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26719
80	800,7	C22 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26720
81	812,7	C23:1 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26721
82	814,7	C23 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26722
83	826,8	C24:1 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26723
84	828,8	C24 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26724
85	840,8	C25:1 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26725
86	842,8	C25 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26726
87	854,8	C26:1 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26727
88	856,8	C26 HexCer OH	C12:0 GlcCer	264.2652 - 264.26728
89	974,7502	LacCER(d18:0/24:1)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2727
90	972,7346	LacCER(d18:1/24:1(15Z))	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2728
91	1002,7815	LacCER(d18:0/26:1)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2729
92	1000,7659	LacCER(d18:1/26:1(17Z))	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2730
93	886,6407	LacCER(d18:1/18:1(9Z))	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2731
94	889,6563	LacCER(d18:0/18:1)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2732
95	948,7346	LacCER(d18:0/22:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2733
96	946,7189	LacCER(d18:1/22:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2734
97	920,7033	LacCER(d18:0/20:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2735
98	918,6876	LacCER(d18:1/20:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2736
99	1004,7972	LacCER(d18:0/26:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2737
100	1002,7815	LacCER(d18:1/26:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2738
101	864,6407	LacCER(d18:0/16:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2739
102	806,5624	LacCER(d14:1/16:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2740
103	892,672	LacCER(d18:0/18:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2741
104	836,6094	LacCER(d14:0/18:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2742
105	890,6563	LacCER(d18:1/18:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2743
106	976,7659	LacCER(d18:0/24:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2744
107	974,7502	LacCER(d18:1/24:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2745
108	836,6094	LacCER(d18:0/14:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2746
109	834,5937	LacCER(d18:1/14:0)	C12:0 LacCER	264.2687 - 264.2747
110	484,465	dHCer(d18:0/12:0)		264.2687 - 264.2747
111	540,535	dHCer(d18:0/16:0)	C12:0 dHCer	284.3

112	568,563	dHCer(d18:0/18:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
113	596,5976	dHCer(d18:0/20:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
114	624,6289	dHCer(d18:0/22:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
115	650,6446	dHCer(d18:0/24:1(15Z))	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
116	652,6602	dHCer(d18:0/24:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
117	678,6759	dHCer(d18:0/26:1(17Z))	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
118	680,6915	dHCer(d18:0/26:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
119	566,5507	dHCer(d18:0/18:1)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
120	512,5037	dHCer(d18:0/14:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
121	668,6551	dHCer(d18:0/h24:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
122	696,6864	dHCer(d18:0/h26:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
123	570,5456	dHCer(d18:0/h17:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
124	498,4881	dHCer(d18:0/13:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
125	526,5194	dHCer(d18:0/15:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
126	554,5507	dHCer(d18:0/17:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
127	568,3566	dHCer(d20:0/16:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
128	596,5976	dHCer(d20:0/18:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2983
129	624,6289	dHCer(d20:0/20:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2984
130	652,6602	dHCer(d20:0/22:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2985
131	680,6915	dHCer(d20:0/24:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2986
132	708,7228	dHCer(d20:0/26:0)	C12:0 dHCer	284.2943 - 284.2987