

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

ANDREWS OLIVEIRA BORGES

**Vesículas extracelulares enriquecidas com ácidos graxos na modulação imunológica:
impacto na atividade de macrófagos estimulados por partículas virais do SARS-CoV-2**

MANAUS - AM

2025

ANDREWS OLIVEIRA BORGES

**Vesículas extracelulares enriquecidas com ácidos graxos na modulação imunológica:
impacto na atividade de macrófagos estimulados por partículas virais do SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Linha de pesquisa: Imunoquímica e Imunometabolismo.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi

MANAUS - AM

2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B732v

Borges, Andrews Oliveira

Vesículas extracelulares enriquecidas com ácidos graxos na modulação imunológica: impacto na atividade de macrófagos estimulados por partículas virais do SARS-CoV-2 / Andrews Oliveira Borges. - 2025.

85 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Carlos Arterio Sorgi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Manaus, 2025.

1. vesículas extracelulares. 2. ácidos graxos. 3. inflamação. 4. macrófagos. 5. COVID-19. I. Sorgi, Carlos Arterio. II. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. III. Título

ANDREWS OLIVEIRA BORGES

**Vesículas extracelulares enriquecidas com ácidos graxos na modulação imunológica:
impacto na atividade de macrófagos estimulados por partículas virais do SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Aprovada em: 27 de junho de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi

Presidente da Banca

Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria

Membro Titular – PPGIBA (UFAM)

Profa. Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado

Membro Titular Externo – PPG-BBio (USP)

Dedicatória

A meus sábios pais, por me ensinar a valorizar o tempo e as oportunidades que conduzem ao conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiro, quero agradecer ao **Deus criador**, sem a Tua mão poderosa, amor imensurável e sabedoria, não conseguiria me aventurar nessa jornada da maneira extraordinária que vivenciei. Por meio da ciência, conseguimos ter vislumbres de como a vida é cheia de mistérios e complexa, sendo possível enxergar uma mente projetista por trás dos mecanismos.

Aos meus pais, **Euler Vilaça Batista Borges** e **Marcilene Oliveira Borges**, por acreditarem em mim, mesmo nas contínuas vezes que não acreditava em mim, por me ensinarem a importância do estudo, por me ensinarem a ser uma pessoa abnegada e como isso pode ajudar a formar vínculos, respeito e confiança, especialmente no mundo acadêmico. E acima disso, por me amarem de formas transformadoras.

Aos meus irmãos, **Ândrocles Oliveira Borges** e **Adonai Oliveira Borges**, por estarem presentes em momentos de necessidade. Ao mais velho, agradeço-te pelas conversas científicas, aulas de estatística e jogatinas.

A minha namorada, **Isabelly Ferreira Fernandes**, pelo apoio, companheirismo, conforto e amor durante toda essa jornada, e por aguentar meus episódios de cientista maluco.

Agradeço ao meu orientador, **Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi**, pela oportunidade de desenvolver esse projeto em que criei muito interesse, pela sua paciência em me ensinar e sanar várias dúvidas dos experimentos e conhecimento teórico, por abrir outras oportunidades de colaborações, por me incentivar a sempre me aprimorar e por me fazer mudar minha percepção a respeito dos lipídios. Admiro, sua competência, esforço, mente científica em elaborar ideias e perguntas, coragem e sua vontade de alcançar seus sonhos.

Aos membros do GEBIL, eu vivi experiências conjuntas e individuais com cada um de vocês, todas foram significativas para mim como indivíduo e profissional. De maneira específica, **Pedro Nobre, Adriana Vilela, Miguel Rocha, Thiago Felipe** e **Patrick Arruda** agradeço a vocês por todos os vários ensinamentos, ajuda no mundo da lipidômica e a entender que concentração é diferente de quantidade células. **Jonathan Carvalho, Pedro Vieira, Diana Mota e Lais Souza**, agradeço a vocês pelos ensinamentos no mundo da cultura celular, sem vocês meus experimentos não seriam eficientes. Agradeço a **Kamilla Vecchia**, pelo suporte com meu projeto e permitir contribuir nesse início da sua carreira acadêmica.

Agradeço as colaboradoras **Letícia, Mariana, Guilherme e Pedro**, pelas ajudas emergenciais durante meus experimentos e trabalhos em conjunto.

RESUMO

Título: “Vesículas extracelulares enriquecidas com ácidos graxos na modulação imunológica: impacto na atividade de macrófagos estimulados por partículas virais do SARS-CoV-2”

A COVID-19, doença causada pelo agente etiológico SARS-CoV-2, pode evoluir para quadros clínicos caracterizados por uma resposta imunológica desregulada, resultando em um ambiente hiperinflamatório. Nesse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas ao controle dos eventos inflamatórios. As vesículas extracelulares (VEs) são nanoestruturas de membranas que atuam como mensageiras intercelulares, sendo produzidas por diversas células, incluindo por macrófagos. Essas vesículas carregam diferentes biomoléculas e possuem a capacidade de modular respostas imunológicas. Os ácidos graxos (AGs) fazem parte da estrutura de lipídios estruturais de membranas plasmáticas e desempenham papéis relevantes na regulação da resposta imune. O objetivo do presente estudo foi desenvolver VEs enriquecidas com diferentes classes de ácidos graxos, com potencial imunomodulador em contextos inflamatórios. Para isso, monócitos da linhagem THP-1 foram diferenciados em macrófagos M0 e posteriormente polarizados para os fenótipos M1 (LPS + IFN- γ) e M2 (IL-4 + IL-13). As VEs foram isoladas dos macrófagos incubados com diferentes classes de AG exógenos (saturados, insaturados e de cadeia longa). A caracterização das VEs isoladas de macrófagos (naturais e enriquecidas com AGs) foi realizada por Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) (tamanho, concentração e distribuição), Potencial Zeta (estabilidade coloidal e carga superficial) e Citometria de Fluxo (proteínas marcadoras). Macrófagos M0 foram tratados profilaticamente com VEs (naturais ou enriquecidas com AG) e desafiados com estímulos inflamatórios (LPS ou partículas virais inativadas de SARS-CoV-2), sendo então avaliado o perfil de citocinas inflamatórias. Nossos resultados demonstraram que diferentes classes de AG exógenos promovem alterações no perfil de expressão lipídica de membranas dos macrófagos polarizados. As VEs enriquecidas com AG aumentaram a atividade mitocondrial; aquelas enriquecidas com AG saturados induziram a produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto as enriquecidas com AG poli-insaturados (PUFAs) reduziram essa produção. Este estudo evidencia que a incorporação de AG exógenos influencia o remodelamento de membrana, impactando no perfil lipídico e nas funções imunológicas das VEs obtidas de macrófagos, modulando o contexto inflamatório.

Palavras-chave: vesículas extracelulares, ácidos graxos, inflamação, macrófagos, COVID-19

ABSTRACT

Title: “Bioengineering fatty acid-extracellular vesicles for immune modulation: impact on macrophages activity stimulated by SARS-CoV-2 viral particles”

COVID-19, a disease caused by the etiological agent SARS-CoV-2, can progress to clinical conditions characterized by dysregulated immune responses, resulting in a hyperinflammatory environment. Therefore, developing therapeutic strategies to control inflammation is essential. Extracellular vesicles (EVs) are membrane nanostructures that act as intercellular messengers and are produced by various cells, including macrophages. These vesicles carry different biomolecules and can modulate immune responses. Fatty acids (FAs) are components of structural lipids in plasma membranes and play a relevant role in regulating the immune response. The objective of the present study was to develop EVs enriched with different classes of fatty acids possessing immunomodulatory potential in inflammatory contexts. To this end, monocytes from the THP-1 lineage were differentiated into M0 macrophages and subsequently polarized into M1 (LPS + IFN- γ) and M2 (IL-4 + IL-13) phenotypes. Extracellular vesicles (EVs) were isolated from macrophages incubated with different classes of exogenous FAs (saturated, unsaturated, and long-chain). The isolated macrophage EVs (natural and FA-enriched) were characterized using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) (size, concentration, and distribution), Zeta Potential (colloidal stability and surface charge), and Flow Cytometry (marker proteins). M0 macrophages were prophylactically treated with EVs (natural or FA-enriched) and challenged with inflammatory stimuli (LPS or inactivated SARS-CoV-2 viral particles), followed by assessment of the inflammatory cytokine profile. Our results demonstrate that different classes of exogenous FAs promote changes in the lipid expression profile of polarized macrophage membranes. FA-enriched EVs increased mitochondrial activity; those enriched with saturated FAs induced the production of pro-inflammatory cytokines, whereas those enriched with polyunsaturated fatty acids (PUFAs) reduced this production. This study demonstrates that the incorporation of exogenous FAs influences membrane remodeling, impacting the lipid profile and immunological functions of macrophage-derived EVs, thereby modulating the inflammatory context.

Keywords: extracellular vesicles, fatty acids, inflammation, macrophages, COVID-19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características estruturais e ciclo de replicação do SARS-CoV-2.....	16
Figura 2. Ativação dos mecanismos da imunidade inata contra o SARS-CoV-2.....	18
Figura 3. Biogênese dos exossomos e ectossomos	20
Figura 4. Visão geral do metabolismo do ácido araquidônico e formação de eicosanoides.....	22
Figura 5. Esquema da metodologia utilizada nesta dissertação	27
Figura 6. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M0 tratados com diferentes classes de ácidos graxos.....	34
Figura 7. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M1 tratados com diferentes classes de ácidos graxos.	36
Figura 8. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M2 tratados com diferentes classes de ácidos graxos	38
Figura 9. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M0 tratados com AA conjugado com CoA e AA não conjugado.....	40
Figura 10. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M1 tratados com AA conjugado com CoA e AA não conjugado.	41
Figura 11. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M2 tratados com AA conjugado com CoA e AA não conjugado.	42
Figura 12. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M0 tratados com EPA.	44
Figura 13. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M1 tratados com EPA.	45
Figura 14. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M2 tratados com EPA.	46
Figura 15. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) concentração e tamanho de vesículas extracelulares basais e enriquecidas com ácidos graxos de macrófagos M0.	48

Figura 16. Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) concentração e tamanho de vesículas extracelulares basais e enriquecidas com ácidos graxos de macrófagos M2.	49
Figura 17. Potencial Zeta de Vesículas Extracelulares derivadas de macrófagos.	50
Figura 18. Detecção de marcador ALIX em vesículas extracelulares (VEs) basais e enriquecidas de macrófagos M0 e M2 por citometria de fluxo.	52
Figura 19. Detecção de marcador CD9 em vesículas extracelulares (VEs) basais e enriquecidas de macrófagos M0 e M2 por citometria de fluxo.	53
Figura 20. Detecção de marcador CD63 em vesículas extracelulares (VEs) basais e enriquecidas de macrófagos M0 e M2 por citometria de fluxo.	54
Figura 21. Detecção de marcador CD81 em vesículas extracelulares (VEs) basais e enriquecidas de macrófagos M0 e M2 por citometria de fluxo.	55
Figura 22. Detecção de marcador Calnexina em vesículas extracelulares (VEs) basais e enriquecidas de macrófagos M0 e M2 por citometria de fluxo.	56
Figura 23. Viabilidade celular de macrófagos M0 (THP-1) submetidos a diferentes condições basais.	58
Figura 24. Viabilidade celular de macrófagos M0 (THP-1) estimulados com LPS (1 µg/mL) submetidos a diferentes condições.	59
Figura 25. Viabilidade celular de macrófagos M0 (THP-1) estimulados com partículas virais inativadas de SARS-CoV-2 (M.O.I 2) submetidos a diferentes condições.	60
Figura 26. Dosagem de IL-1β de macrófagos previamente tratados com VEs basais e enriquecidas e estimulados com LPS ou partículas virais de SARS-CoV-2.	62
Figura 27. Dosagem de TNF-α de macrófagos previamente tratados com VEs basais e enriquecidas e estimulados com LPS ou partículas virais de SARS-CoV-2.	64
Figura 26. Dosagem de IL-6 de macrófagos previamente tratados com VEs basais e enriquecidas e estimulados com LPS ou partículas virais de SARS-CoV-2.	65

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
AGPAT	1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferases
AGs	Ácidos graxos
CEQUIL	Centro de Excelência em Quantificação e Identificação de Lipídeos
CDCD	Do inglês, <i>Chinese for Disease Control and Prevention</i>
COVID-19	Do inglês, <i>Coronavirus Disease 2019</i>
COVs	Do inglês, <i>Conoravirus</i>
DAMPs	Do inglês, <i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
DCs	Do inglês, <i>Dendritic cells</i>
DMEM	Do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FFCLRP-USP	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letra de Ribeirão Preto
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
GeBIL	Grupo de Estudos em Biotecnologia Imunoquímica de Lipídeos
HETE	Ácido 5-hidroxieicosatetraenoico
LC-MS/MS	Do inglês, <i>Liquid chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>
LTs	Leucotrienos
LPAAT	Ácido Lisofosfatidico aciltransferase
LPCAT	Lisofosfatidilcolina aciltransferase
LXs	Lipoxinas
MERS	Do inglês, <i>Middle East Respiratory Syndrome</i>
M0	Macrófago
M1	Macrófago tipo 1 - Inflamatório

M2	Macrófago tipo 2 – Anti-inflamatório
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MLs	Mediadores Lipídicos
ORFs	Do inglês, <i>Open Reading Frames</i>
PAMPs	Do inglês, <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PC	Do inglês, <i>Phosphatidylcholine</i>
PE	Do inglês, <i>Phosphatidylethanolamine</i>
PG	Do inglês, <i>Phosphatidylglycerol</i>
PGs	Prostaglandinas
PI	Do inglês, <i>Phosphatidylinositol</i>
PLS-DA	Do inglês, <i>Partial Least Squares-discriminant analysis</i>
PRRs	Do inglês, <i>Pattern Recognition Receptor</i>
PS	Do inglês, <i>Phosphatidylserine</i>
PUFAs	Do inglês, <i>Polinsaturated Fatty Acids</i>
SARS-CoV	Do inglês, <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus</i>
SARS-CoV-2	Do inglês, <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
SM	Do inglês, <i>Sphingomyelin</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TGs	Triacilgliceróis
TLM	Terapia de Lipídeos de Membrana
TLRs	Do inglês, <i>Toll-Like Receptors</i>
TXs	Tromboxanos
USP	Universidade de São Paulo
VEs	Vesículas Extracelulares

Sumário

1. Introdução.....	13
2. Revisão Bibliográfica	14
2.1. SARS-CoV-2.....	14
2.1.1. Emergência e Epidemiologia de SARS-CoV-2.....	14
2.1.2. Características do SARS-CoV-2.	15
2.1.3. Respostas Imunológica contra SARS-CoV-2.....	17
2.2. Vesículas Extracelulares.....	19
2.2.1. Biologia e Biogênese de Vesículas Extracelulares.	19
2.2.2. Ácidos Graxos Poliinsaturados e Mediadores Lipídicos.	21
2.2.3. Sistema Imunológica e Vesículas Extracelulares.	23
2.2.4. Bioengenharia de vesículas extracelulares e suas aplicações terapêuticas	25
3. Objetivos.	26
3.1. Objetivo Geral.....	26
3.2. Objetivos Específicos.	26
4. Materiais e Métodos	27
5. Resultados.	33
5.1. Ácido graxos exógenos promovem diferentes perfis lipídicos em macrófagos polarizados.....	33
5.2. Efeito da conjugação de ácidos graxos com coenzima A na remodelagem dos lipídios de membrana em macrófagos polarizados	39
5.3. Efeito da incubação de ácido graxo ômega-3 na remodelagem dos lipídios de membrana em macrófagos polarizados	43
5.4. Caracterização biofísica de vesículas extracelulares produzidas por macrófagos polarizados e enriquecidos com ácidos graxos exógenos.....	47
5.5. Caracterização dos marcadores de superfície de vesículas extracelulares produzidas por macrófagos polarizados e enriquecidos com ácidos graxos exógenos.....	51
5.6. Atividade metabólica de macrófagos proliferativamente tratados com VEs enriquecidas com ácidos graxos e estimulados com partículas virais de SARS-CoV-2.....	57
5.7. Atividade inflamatória de macrófagos proliferativamente tratados com VEs enriquecidas com ácidos graxos e estimulados com partículas virais de SARS-CoV-2.....	61
6. Discussão.....	66

7. Conclusão.....	72
8. Equipe do Projeto.....	73
9. Referências Bibliográficas.....	74

1. INTRODUÇÃO

No final de dezembro de 2019, Wuhan, China, tornou-se o epicentro dos primeiros casos de infecção pelo novo coronavírus *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2), agente etiológico da COVID-19 (*Coronavirus disease 19*) (WU et al., 2020). A acelerada propagação viral levou as autoridades mundiais de saúde a declarar uma crise sanitária e humanitária global (MURALIDAR et al., 2020).

O quadro clínico da COVID-19 varia desde casos assintomáticos até graves, em que os últimos, desenvolvem a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (BHARDWAJ et al., 2022). Esse sintoma é caracterizado pela exacerbada resposta das células do sistema imune inato e adaptativo, ambos, produzem mediadores inflamatórios em resposta à persistência do patógeno (ZANZA et al., 2022). Como consequência, a tempestade de citocinas, caracterizada pela produção elevada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-2, CXCL1, CXCL8, CXCL11), gera danos teciduais sistêmicos aos pacientes, estando associada a um pior prognóstico do paciente, culminando no óbito do paciente (MONTAZERSAHEB et al., 2022; BHARDWAJ et al., 2022).

A disponibilidade emergencial das vacinas mostrou-se eficaz e segura no combate ao vírus, reduzindo a sua dispersão, taxa de mortalidade e as admissões em unidades de tratamento intensivo (UTIs) (BERNARDEAU-SERRA et al., 2021; DANTA; D'ÁVILA; SILVA., 2023); permitindo a contenção da pandemia. Apesar do positivo cenário atual, a circulação persistente associada com o surgimento de novas variantes de SARS-CoV-2, propicia a ascensão de novos casos de infecção (BRASIL, 2025). A preocupação com esses fatores conduz os pesquisadores a desenvolverem novas estratégias terapêuticas que reforcem o arsenal contra os agentes virais e os eventos inflamatórios.

As vesículas extracelulares (VEs), definidas como nanoestruturas membranares secretadas naturalmente por todos os tipos celulares, destacam-se por seu papel crucial na modulação de respostas imunológicas (BUZAS, 2023). Particularmente, as VEs derivadas de macrófagos carregam uma gama de biomoléculas ativas que influenciam os contextos patológicos e fisiopatológicos (WANG et al., 2020). A capacidade de regular respostas imunológicas as tornam potenciais alvos em quadros clínicos (WANG et al., 2020).

A estrutura molecular das VEs é constituída por uma bicamada lipídica que separa os meios extra e intracelulares, composta por fosfolipídios, esfingolipídios, colesterol, ceramidas e ácidos graxos (AG) (GHADAMI & DELLINGER., 2023). Essa composição lipídica proporciona aspectos biofísicos, como fluidez e capacidade de fusão, além disso, reflete o perfil lipídico da célula parental (GHADAMI & DELLINGER., 2023). Ademais, as membranas

plasmáticas atuam como plataformas sinalizadoras, regulando mecanismos celulares nos quais a composição lipídica está associada com atividades específicas (SUNHSINE & IRUELA-ARISPE., 2017). Os AGs organizados em pares nos fosfolipídios, são componentes essenciais da membrana plasmática e capazes de atuarem em respostas imunológicas e homeostase celular (RADZIKOWSKA et al., 2019).

Os AG poli-insaturados (PUFAs) destacam-se por suas atividades reguladoras em eventos inflamatórios, especialmente como agentes anti-inflamatórios (OPPEDISANO, 2020). Após a liberação, por ação das fosfolipases, as PUFAS são metabolizadas e formam os mediadores lipídicos conhecidos como eicosanoides, tais como, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (KHANAPURE et al., 2007).

Considerando o papel imunomodulatório das VEs de macrófagos e as propriedades anti-inflamatórias das PUFAs, este projeto tem como proposta o desenvolvimento de VEs bioengenhiradas derivadas de macrófagos enriquecidos com diferentes AGs e seu potencial uso em contextos inflamatórios.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SARS-CoV-2

2.1.1. Emergência e Epidemiologia do SARS-CoV-2

No final de 2019, os primeiros casos de COVID-19 (*Coronavirus Disease 19*) foram notificados na cidade de Wuhan, China, na qual, inicialmente um grupo de pacientes apresentaram sintomas semelhantes a pneumonia, causado por um agente etiológico desconhecido (DU TOIT, 2020; REN *et al.*, 2020). Neste contexto, o Centro Chinês de Controle e Prevenção de Doenças (CDCD) identificou um novo coronavírus nos pacientes hospitalizados, sendo oficialmente denominado de SARS-CoV-2 (do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) (GORBALENYA *et al.*, 2020). No início de janeiro de 2020, os comunicados de casos de infecção pelo agente viral chegaram aproximadamente a 10 mil casos distribuídos pela China, além disso, também foram mencionados casos distribuídos em outros países (NISHIURA *et al.*, 2020; WANG; TANG; WEI, 2020). Devido à crescente disseminação deste vírus, a OMS (Organização Mundial da Saúde) declarou estado de epidemia do SARS-CoV-2 em 11 de março de 2020, sendo considerado uma emergência de saúde pública mundial (MURALIDAR *et al.*, 2020).

Atualmente, o número de casos confirmados acumulados no mundo é de 774.771.942 e 7.035.337 óbitos (WHO, 2024), enquanto no Brasil temos o total de 38.452.504 casos confirmados e 709.963 óbitos (BRASIL, 2024). No entanto, à medida que os esforços de vacinação ganharam impulso, observamos uma transformação significativa no cenário pandêmico, marcando uma virada positiva na luta contra a doença. A estratégia de vacinação emergiu como uma ferramenta crucial no combate à disseminação do vírus, oferecendo proteção eficaz contra a infecção e reduzindo drasticamente os casos graves e as taxas de mortalidade. À medida que a cobertura vacinal aumentava em todo o mundo, os países observaram uma diminuição substancial no número de hospitalizações e mortes relacionadas à COVID-19 (BERNARDEAU-SERRA et al., 2021; DANTA; D'ÁVILA; SILVA., 2023).

2.1.2 Características do SARS-CoV-2

O vírus SARS-CoV-2 está alocado em uma diversa família de vírus envelopados de RNA de fita simples com senso positivo ((+) ssRNA). Sua classificação taxonômica está organizada na ordem *Nidovirales*, subordem *Coronavirinae*, família *Coronaviridae* e subfamília *Orthocoronavirinae*, por sua vez, consiste em 4 gêneros: *alphacoronavirus*, *betacoronavirus*, *gammacoronavirus* e *deltacoronavirus* (V'KOVSKI et al., 2021). Dentre esses gêneros, o SARS-CoV-2 está inserido nos *betacoronavirus*, esses que, juntamente com os *alphacoronavirus*, infectam exclusivamente mamíferos, enquanto os *gammacoronavirus* e *deltacoronavirus* infectam preferencialmente as aves (CORMAN et al., 2018; LU et al., 2020). Apesar dessa distinção, são geralmente chamados de Coronavírus (CoVs) tendo como sítios primários de infecção o trato respiratório e digestório (GORBALENYA et al., 2020).

Em humanos, os principais coronavírus são conhecidos pelas infecções sazonais que causam sintomas leves associados aos resfriados comuns, dentre eles, temos descritos o HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 e HCoV-HKU1 (V'KOVSKI et al., 2021). Por outro lado, temos o *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus* (SARS-CoV) e *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus* (MERS-CoV) que são caracterizados por desenvolverem estados clínicos graves com forte potencial de gerar danos teciduais pulmonares (SONG et al., 2022). Estes patógenos foram responsáveis por gerar epidemias no início do século 21, no caso, SARS-CoV ocorreu em 2002, na província de Guangdong, China; enquanto MERS, ocorreu em 2012, na Arábia Saudita (AL HAJJAR; MEMISH; MCINTOSH, 2013; LEDUC; BARRY, 2004).

O SARS-CoV-2 é composto por 4 proteínas estruturais: o nucleocapsídeo (N), membrana (M), envelope proteico (E) e a proteína *Spike* (S), além disso, apresenta 16 proteínas não estruturais. A proteína transmembrana *S* é reconhecida por ter alta afinidade pelo receptor humano Enzima Conversora de Angiotensina 2 (do inglês, ACE2), por meio desse, infecta as células-alvo (WALLS *et al.*, 2020). Esse evento é traçado especificamente por meio das duas subunidades estruturais, S1 e S2, que compõem a proteína S, e demonstram funcionalidades distintas, sendo elas, respectivamente, a ancoragem no receptor ACE2 e a fusão do vírus à membrana da célula-alvo (TORTORICI; VEESLER, 2019) (Figura 1).

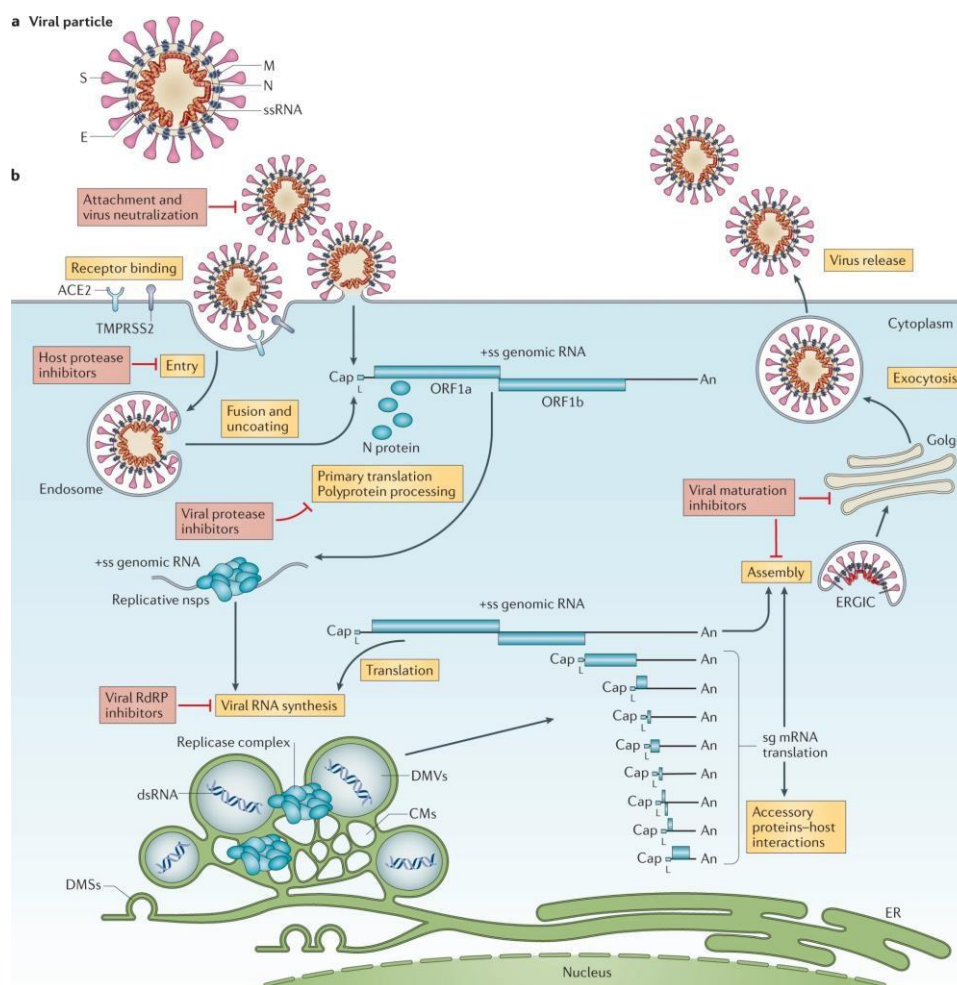


Figura 1. Características estruturais e ciclo de replicação do SARS-CoV-2. O SARS-CoV-2 apresenta em sua estrutura a proteína *Spike* (S), envelope (E), nucleocapsídeo (N), membrana (M) e o RNA de fita simples senso positivo (+ssRNA). O mecanismo de entrada na célula hospedeira inicia com a ligação da proteína S viral com o receptor de membrana ACE2, em seguida, a TMPRSS2 cliva a proteína S permitindo a internalização do vírus. Uma vez no interior da célula hospedeira ocorre a montagem das novas partículas virais que vão para o fora da célula. Fonte: V'kovski *et al.*, 2021.

Uma vez que se ancora ao receptor ACE2, o vírus pode adentrar a célula-alvo por meio de duas rotas: a internalização ou fusão de membranas. Dependendo da via de entrada, a subunidade S2 passa por um processo de clivagem mediada por duas proteases que facilitam o processo, sendo elas, a proteínas transmembrana serina 2 (TMPRSS2) ou catepsina L (FRASER *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2021). Na internalização, o vírus infecta por meio de endocitose mediada por clatrina nos endossomos, no qual, a subunidade S2 será clivada pela catepsina L (BAYATI *et al.*, 2021). Por outro lado, na via de fusão de membranas, a subunidade S2 é clivada pela TMPRSS2 na membrana celular. O resultado de ambas as vias é a fusão de membranas do vírus com a membrana celular ou com o endossomos, levando assim a liberação do RNA no interior da célula (JACKSON *et al.*, 2022). A partir da extremidade 5' do material genético, as ORFs (*Open Reading Frames*), regiões do RNA viral, dão origem as poliproteínas pp1a e pp1b que são clivadas pelas proteases virais PLpro e 3CLpro formando as 16 proteínas não estruturais (NSPs). Essas NSPs participam da montagem de novas partículas virais, principalmente pela formação do complexo replicase-transcriptase (RTC) que atua na replicação do genoma viral para as novas partículas virais (ARYA *et al.*, 2021; MAISON; DENG; GERSCHENSON, 2023; V'KOVSKI *et al.*, 2021) (Figura 1).

2.1.3. Resposta imunológica contra o SARS-CoV-2

A imunidade inata é conhecida por ser a primeira linha de defesa do hospedeiro contra agentes patológicos e lesões teciduais. A efetividade da imunidade inata se deve, em parte, por apresentar mecanismos evolutivos altamente conservados presentes nas células imunes que as tornam capazes de lidar contra microrganismos, células cancerosas e toxinas (MARSHALL *et al.*, 2018; MARTINS; RIBEIRO-GOMES; DANIEL-RIBEIRO, 2023).

As células imunes que compõem a imunidade inata, sendo elas os macrófagos, neutrófilos, natural killers (NK), células linfóides inatas e células dendríticas, expressam em suas membranas uma família de receptores inatos chamados de Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs) (GASTEIGER *et al.*, 2017; KANNEGANTI, 2020). Os principais PRRs envolvidos no reconhecimento de vírus são os Receptores do Tipo NOD (NLRs), Receptores do tipo RIG (RLRs), sensores de DNA citosólico e, especialmente, os Receptores do tipo *Toll* (TLRs) (THOMPSON *et al.*, 2011). Por sua vez, reconhecem específicas moléculas chamadas de Padrões Moleculares Associados Patógenos (PAMPs), presentes em microrganismos patogênicos, ou Padrões Moleculares Associados a Dano (DAMPs), moléculas liberadas quando há lise celular. Após o reconhecimento dos PAMPs, cascatas de sinalização intracelular são ativadas que conduzem a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, essas, por sua

parte, atuam como moduladores do ambiente recrutando mais células imunes para o sítio infeccioso contra o agente viral (LI; WU, 2021).

Os TLRs vêm sendo descritos como participantes na resposta imunológica contra o SARS-CoV-2 (Figura 2). TLRs realizam a transdução de sinais através de duas moléculas adaptadoras, MyD88 e TRIF. Através dos TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6, MyD88 ocorre a ativação das vias de sinalização de fator de transcrição NF- κ B e MAPK induzindo a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022). Por outro lado, TLR3 e TLR4 sinalizam através de TRIF ativando IRF3 que induz a produção de Interferon I e III (DIAMOND; KANNEGANTI, 2022). ZHENG *et al* (2021) demonstraram que o TLR2 é um dos principais receptores no reconhecimento do envelope proteico de SARS-CoV2, com a ativação da via do inflamassoma levando a produção de IL-1 β e desencadeia a produção das citocinas antivirais TNF e Interferon-gama (IFN- γ). Assim, o papel da imunidade inata contra o SARS-CoV-2 está em impedir a entrada do vírus e limitar a replicação viral nas células infectadas, por meio dos IFN (diminuindo o surgimento de novas partículas virais) (SIEVERS *et al.*, 2023) (Figura 2).

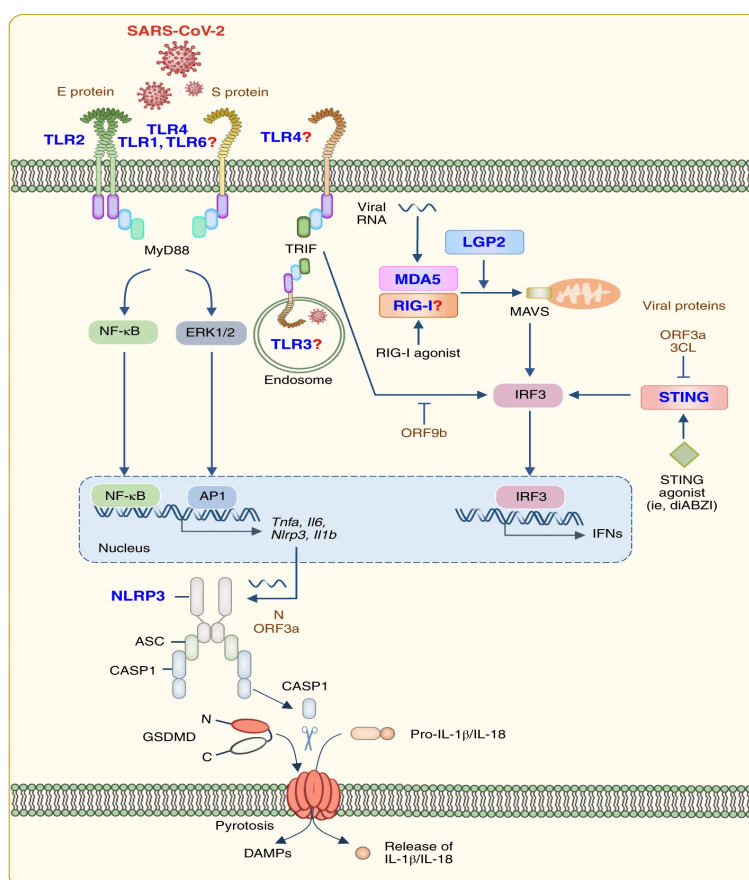


Figura 2. Ativação dos mecanismos da imunidade inata contra o SARS-CoV-2. A resposta imune inata contra o agente viral SARS-CoV-2 se deve pelo reconhecimento de PAMPs pelos PRRs que desencadeiam a ativação de vias de sinalização intracelulares que resultam na expressão gênica de

moléculas pró-inflamatórias que atuaram na eliminação do patógeno. Fonte: Diamond & Kannegati, 2022.

Entretanto, vários pacientes com COVID-19 foram admitidos em unidades de terapia intensiva (UTI) exibindo síndromes respiratórias agudas associadas a uma hiperinflamação tecidual pulmonar que poderia conduzir ao óbito (HASANVAND, 2022). Essa inflamação era resultado de uma resposta imune desregulada, em que há presença da produção elevada de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, como G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP1 α , IL-10, IL-6, TNF, IL-1 β , CCL7, CXCL8, CXCL1, CXCL12a, CXCL11, IFN (HAN *et al.*, 2020; KHALIL; ELEMAM; MAGHAZACHI, 2021; MAHMUDPOUR *et al.*, 2020; MONTAZERSAHEB *et al.*, 2022; ZAID *et al.*, 2021). Este montante de moléculas inflamatórias e quimiotáticas é denominado de “Tempestade de Citocinas”, em que consiste em uma tentativa do sistema imune em combater o vírus, porém, este evento pode estar associado à mortalidade dos pacientes.

2.2. Vesículas Extracelulares

2.2.1 Biologia e Biogênese das Vesículas Extracelulares

As VEs são definidas como nanopartículas delimitadas por uma bicamada lipídica liberadas por todos os tipos celulares (arqueas, procariontes e eucariontes) incapazes de se replicarem, desprovidas de um núcleo funcional e presentes em vários fluidos corporais (WELSH *et al.*, 2024; YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). VEs são consideradas como novas participantes do processo de comunicação célula-célula, na qual, desempenham um mecanismo específico de comunicação intercelular interagindo com as células receptoras (GININI *et al.*, 2022). Ademais, outra característica das VEs é a sua capacidade de atuar como carreadoras de diversas biomoléculas (proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e metabólitos) vindas das células parentais (ZHENG *et al.*, 2022). Essas partículas possuem uma ampla heterogeneidade ao que se refere ao tamanho, composição e compartimento de origem. Neste sentido, as VEs são classificadas em dois principais grupos: exossomos e ectossomos, de acordo com suas distintas biogêneses (WELSH *et al.*, 2024) (Figura 3).

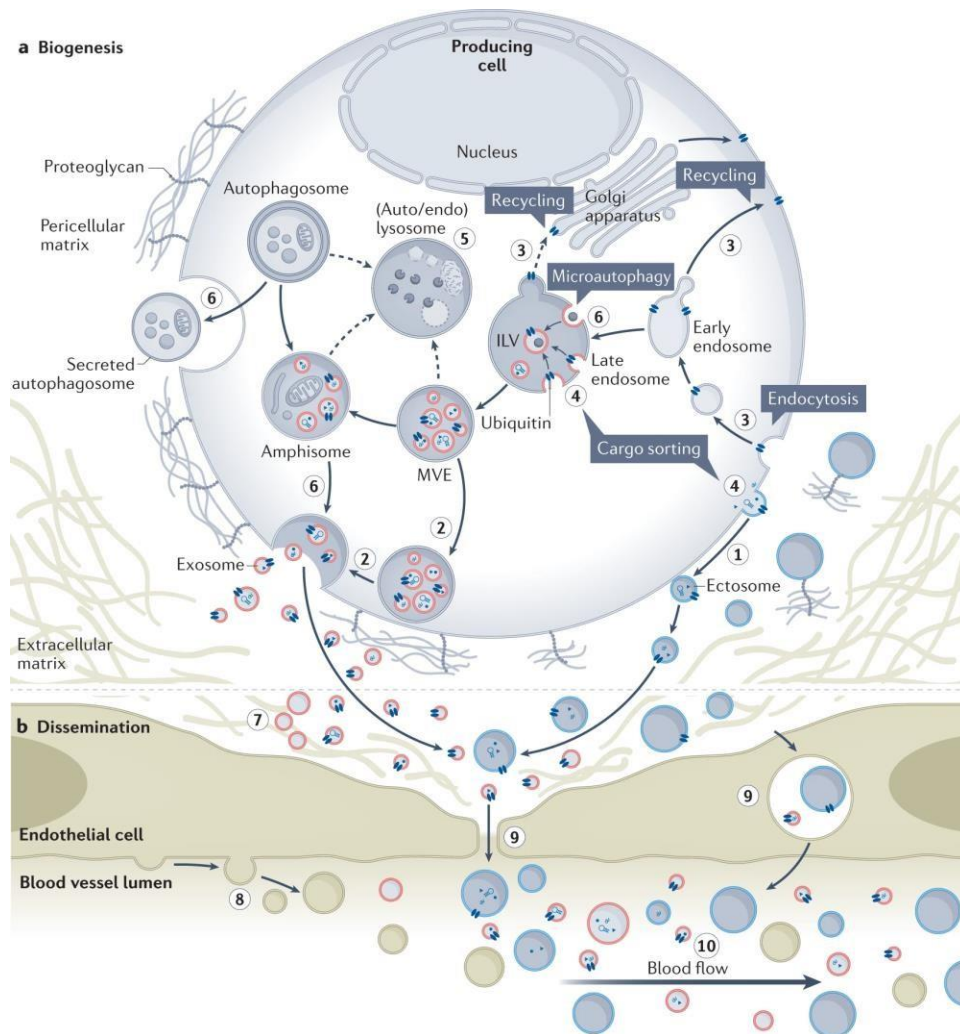


Figura 3. Biogênese de vesículas extracelulares. A biogênese dos dois subtipos de VEs: exossomos e ectossomos, apresentam mecanismos distintos. Exossomos são originados a partir da via endocítica sendo direcionados para os endossomos iniciais, em seguida, para os endossomos tardios formando os corpos multivesiculares (MVBs) e são levados para a membrana plasmática sendo liberados por exocitose. Os ectossomos são originados por brotamentos da membrana plasmática. Fonte: Van Niel, 2022.

Os exossomos (30-100 nm) apresentam uma biogênese de tráfego endossomal, no qual, inicia-se com a via endocítica, em que há formação de brotamentos internos da membrana plasmática, contendo uma variedade de biomoléculas (chamadas de *cargo*), sendo direcionados para as membranas endossomais dos endossomos iniciais. O *cargo* pode passar por um processo chamado de reciclagem, no qual, são levados para o complexo de Golgi (KRYLOVA; FENG, 2023; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018; VAN NIEL *et al.*, 2022). Caso contrário, o *cargo* passará pela etapa de maturação, na qual, será incorporado por vacúolos intraluminais (ILVs) dentro dos endossomos tardios, formando os denominados corpos multivesiculares

(MVBs) (KRYLOVA; FENG, 2023). Neste momento, tais estruturas são consideradas pré-exossomos. Por fim, duas rotas distintas podem ocorrer: fusionadas aos lisossomos, ou redirecionados para a membrana plasmática em que são liberadas no meio extracelular por exocitose (KRYLOVA; FENG, 2023; VAN NIEL *et al.*, 2022).

Por outro lado, os ectossomos (100-500 nm), grupo do qual as microvesículas pertencem, apresentam a sua biogênese por meio do brotamento da membrana plasmática. O surgimento dos ectossomos é acompanhado por modificações específicas e localizadas nas proteínas e nos elementos lipídicos da membrana celular, influenciando as propriedades físico-químicas da membrana, como por exemplo, mudanças na curvatura e rigidez. Essas modificações nos componentes da membrana são aprimoradas por uma redistribuição vertical dos elementos que compõem o *cargo*, que são enriquecidos de maneira seletiva dentro das próprias microvesículas (TRICARICO; CLANCY; D'SOUZA-SCHOREY, 2017).

2.2.2. Ácidos Graxos Poli-insaturados e Mediadores Lipídicos

A membrana plasmática é uma estrutura física que separa as células vivas do seu microambiente. Por muitos anos, estas estruturas não foram consideradas como um domínio importante para eventos de regulação celular. Porém, um importante avanço na biologia celular foi alcançado em 1979, com a descoberta do primeiro fosfolípido biologicamente ativo, o Fator de Ativação Plaquetária (PAF) (DEMOPOULOS; PINCKARD; HANAHAN, 1979). Desde então, verificou-se que os lipídios além de possuir função como fonte de energia ou como simples blocos de construção de membranas, também possuem papéis biológicos únicos como mediadores de ativação celular, controladores do tráfego de componentes celulares, e reguladores da atividade de proteínas de membrana (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008) além de mediar respostas imunológicas (FINKELSTEIN *et al.*, 2014).

Dessa forma, ficou postulado que as moléculas lipídicas também funcionam como moléculas de sinalização intracelular, principalmente relacionadas ao sistema imunológico e na manutenção da homeostase (SHIMIZU; WOLFE, 1990). As prostaglandinas (PGs), os leucotrienos (LTs), as lipoxinas (LXs), os ácidos graxos hidroxilados (eicosanoides), o Fator de Ativação Plaquetária (PAF), o ácido lisofosfatídico (LPA), o fosfato-1 de esfingosina (S1P) e o 2-araquidonoilglicerol (2-AG), assim como outros, são coletivamente referidos como Mediadores Lipídicos (ML) (SHIMIZU, 2009).

Em conjunto com outros tipos de moléculas de sinalização, tais como neurotransmissores, hormônios e citocinas, os ML desempenham funções importantes na

diferenciação e proliferação celular, bem como nos sistemas reprodutivo, gastrointestinal e cardiovascular [5] (INSERIR BIBLIOGRAFIA). Os ML possuem várias características que os distinguem de outras moléculas sinalizadoras, como exemplo, são sintetizados sob demanda de forma dependente de cálcio e a partir de precursores lipídicos da membrana [3] (INSERIR BIBLIOGRAFIA).

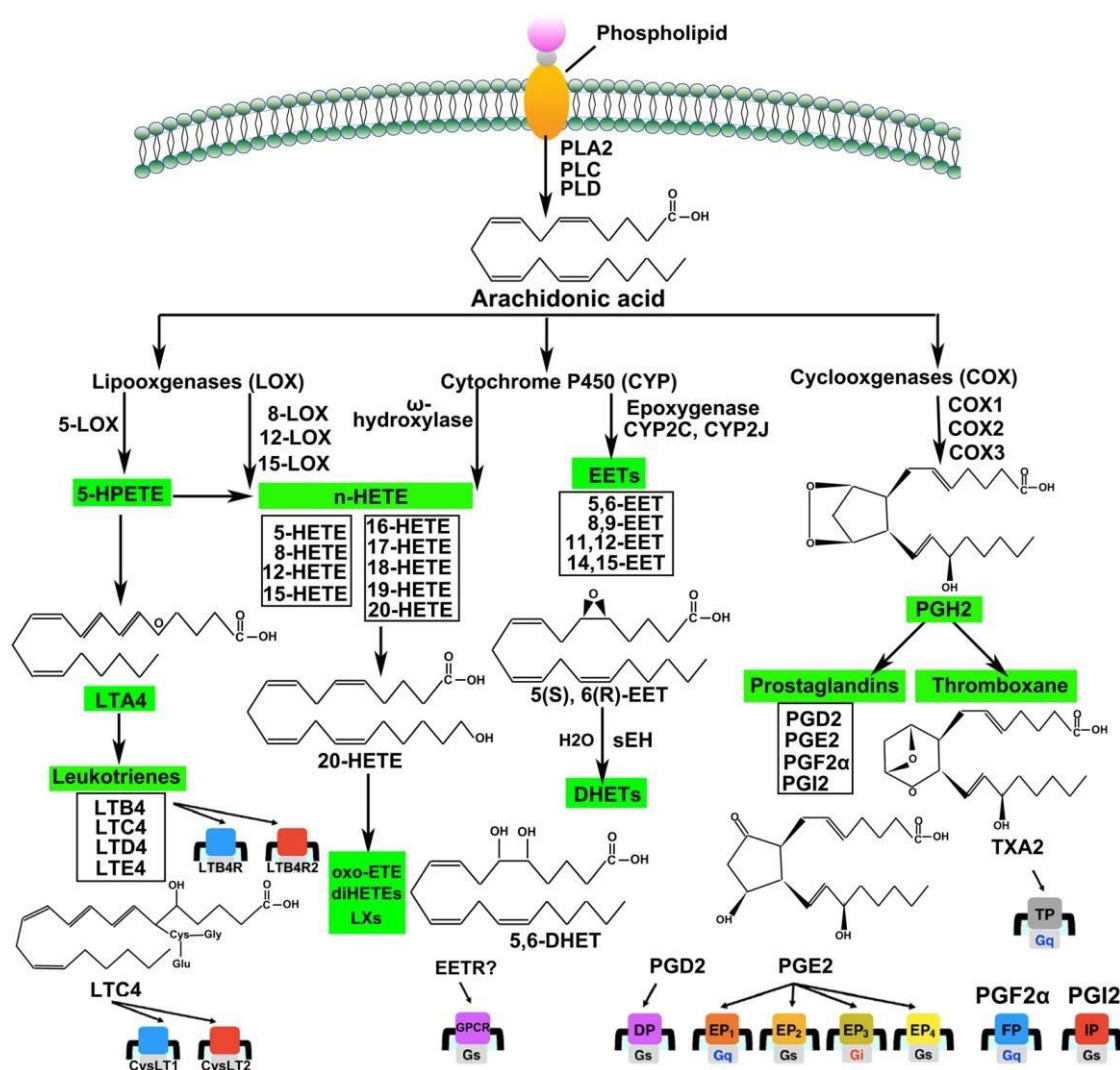


Figura 4. Visão geral do metabolismo do ácido araquidônico e formação de eicosanoides. O ácido araquidônico (AA) presente nas membranas celulares é liberado no citosol por um grupo de enzimas chamadas de fosfolipases, em seguida, AA pode ser conduzido a diferentes vias metabólicas: COX, LOX e CYP. A via metabólica COX produz as prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs), enquanto a via metabólica LOX forma os leucotrienos (LTs) Fonte: WANG *et al*, 2021

Os ML são amplamente reconhecidos pelas suas funções inflamatórias, importantes na iniciação do tráfego de leucócitos e necessário na defesa do organismo (RICCIOTTI,

FITZGERALD, 2011). Estes incluem os eicosanoides (EICs) clássicos, como as PGs, LTs e TXs, que estimulam alterações do fluxo sanguíneo, edema e influxo de neutrófilos para os tecidos; enquanto as LXs, são importantes mediadores anti-inflamatórios que sinalizam o fim fase inflamatória aguda (CALDER, 2020). O processo de biossíntese dos EICs depende de PUFA's como substratos, por exemplo o Ácido Araquidônico (AA), que é liberado após a ação das fosfolipase A2 (cPLA2) nos glicerofosfolipídeos de membrana (CALDER, 2020; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011) (Figura 4).

Estudos recentes do nosso grupo demonstraram a importância dos MLs, principalmente os EICs, na fisiopatologia da COVID-19. Em amostras de plasma de pacientes graves com COVID-19 foi observado o aumento de AA, ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico (HETE) e 11-HETE (PÉREZ et al., 2021); enquanto nos lavados broncoalveolares (LBAs) destes pacientes graves foi descrito o aumento das quantidades de PUFA's e outros MLs inflamatórios, com o predomínio de TXs, PGs e LTs nestas amostras biológicas. Dessa forma, a inflamação pulmonar e o pior prognóstico do quadro clínico na COVID-19 podem estar associados ao aumento dos EICs ou PUFA's (PÉREZ et al., 2021).

2.2.3. Vesículas Extracelulares e Sistema Imunológico

Na imunidade inata, as VEs são descritas por desempenharem um duplo papel, tanto em respostas pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias (BUZAS, Edit I., 2023). As células que participam de processos inflamatórios são capazes de liberar VEs que estimulam e acentuam a inflamação, por exemplo, VEs advindas de neutrófilos podem conter EICs, como também, macrófagos podem gerar VEs contendo as enzimas responsáveis pela formação de LTs, atuando como sinais quimiotáticos de leucócitos no microambiente infectado (BOILARD, 2018; ESSER *et al.*, 2010). Neste sentido, foi demonstrado que as VEs derivadas de neutrófilos possuem AA, que são transferidas para as plaquetas, nas quais, são por sua vez metabolizadas esse ácido graxo pela enzima COX-1 para formar o TXA₂ (DUCHEZ, 2015).

Na sepse, observaram que determinados componentes associados às VEs, tais como citocinas, histonas, *High Mobility Group Box 1*, *Heat Shock Proteins* e DAMPs mitocondriais, induziram a polarização de macrófagos para um perfil fenotípico M1 (pró-inflamatório) e produção de fatores quimiotáticos (BURGELMAN; VANDENDRIESSCHE; VANDENBROUCKE, 2021). Por

outro lado, também demonstraram outro cenário, no qual as VEs induziram respostas anti-

inflamatórias, com a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de adesão no endotélio (BURGELMAN; VANDENDRIESSCHE; VANDENBROUCKE, 2021).

Na imunidade adaptativa, é descrito que as VEs derivadas das células do timo estão ligadas ao desenvolvimento e maturação dos linfócitos T. Isso se deve a essas vesículas carregarem antígenos restritos ao tecido, em seguida, apresentaram para as células dendríticas do timo (SKOGBERG *et al.*, 2015). Além disso, foi observado que a maturação dos timócitos para a expressão dos marcadores de superfície (CD4⁺ ou CD8⁺) tiveram como fator de influência as VEs derivadas das células endoteliais do timo, que apresentam proteínas relacionadas a sua maturação, como PAK2, DOCK2, GDIR1 e SGPL1 (LUNDBERG *et al.*, 2016). Ao que se refere aos linfócitos B, as células B imaturas presentes na medula óssea liberaram ectossomos apresentando CD24⁺ mediada por anticorpos de CD24, além disso, sugere que as VEs podem participar do processo de seleção de células B (AYRE, 2015). Quando o receptor da célula B (BCR) ou o CD24 são estimulados, as VEs produzidas transportaram BCRs ou CD24 para outras células B receptoras, desenvolvendo reconhecimento ao antígeno (PHAN, 2021).

Em paralelo, VEs derivadas de várias fontes celulares podem apresentar também funções inibitórias do sistema imune, como inibição da ativação de células T, de células NK e CD8⁺ (DINI *et al.*, 2020; THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009). Neste contexto, as células do sistema imunológico que vem ganhando destaque por suas VEs são os macrófagos, especialmente em circunstâncias patológicas, tendo em vista as suas várias funções (WANG *et al.*, 2020).

No microambiente tumoral, temos os macrófagos associados ao tumor (TAMs) que desempenham atividades imunossupressoras permitindo o desenvolvimento e avanço da progressão tumoral (MANTOVANI *et al.*, 2022). As TAMs secretam diversos fatores de crescimento que inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias no microambiente tumoral (DALLAVALASA *et al.*, 2021; PAN *et al.*, 2020). Desta forma, as VEs advindas de TAMs apresentam propriedades semelhantes às de suas células de origem, contribuindo para a comunicação entre TAMs e outras células do sistema imunológico, como células T. Assim, exossomos enriquecidos com miR-21-5p e miR-29a-3p inibiram a via STAT3 e causaram desequilíbrio entre as células Treg/Th17, criando um ambiente imunossupressor que favoreceu a progressão e a disseminação do câncer ovariano epitelial (ZHOU *et al.*, 2018).

Na COVID-19, os macrófagos alveolares são descritos como uma das principais fontes de VEs nos fluídos dos lavados broncoalveolares uma vez que são infectados com o vírus SARS-CoV-2 (LEE *et al.*, 2018; MOON *et al.* 2015; TAHYRA; CALADO; ALMEIDA, 2022). Estudos recentes demonstraram que células THP-1 submetidas à estimulação

inflamatória são capazes de produzir alto conteúdo de VEs (BARHOUMI *et al.*, 2021; BAXTER *et al.*, 2019; REINICKE *et al.*, 2022). É importante citar que os vírus e as VEs compartilham determinadas semelhanças nos mecanismos de biogênese e transmissão (CRENSHAW *et al.*, 2018; KAWAMURA *et al.*, 2017) bem como, características físicas, por exemplo, o tamanho, levando a evasão do sistema imune (HASSANPOUR *et al.*, 2020; MACHHI *et al.*, 2021; PATTERS; KUMAR, 2018). Foram descritos que VEs podem carregar elementos virais que permitem a propagação, transmissão e proliferação viral, no caso da COVID-19, a proteína ACE-2 foi encontrada em VEs (WANG; CHEN; BIHL, 2020).

2.2.4. Bioengenharia de vesículas extracelulares e suas aplicações terapêuticas

Existem duas formas principais de inserir substâncias terapêuticas em VEs: carregamento exógeno, com técnicas como choque elétrico, ultrassom, congelamento repetido ou uso de substâncias que abrem poros na membrana; e carregamento endógeno, onde as células produtoras são geneticamente alteradas para incluir a proteína de interesse diretamente nas VEs durante sua produção (ARMSTRONG; HOLME; STEVENS, 2017). Vários estudos demonstraram metodologias para tornar o carregamento endógeno mais eficiente, garantindo maior quantidade da substância alvo dentro das vesículas (WALKER, 2019).

Uma estratégia comum para direcionar produtos terapêuticos para dentro de VEs é combiná-las com outras proteínas que já são naturalmente carregadas nessas vesículas. Por exemplo, ao fundir o produto desejado com CD63, uma tetraspanina presente na superfície de VEs, sua presença na membrana das vesículas aumenta (ESCOLA *et al.*, 1998). Outras proteínas, como PTGFRN, relacionada a receptores de prostaglandina, e BASP1, associada a sinalização celular, são altamente presentes em VEs e podem ser usadas como “âncoras” para carregar outras moléculas de forma eficiente. Estudos mostraram que, quando a GFP, uma proteína fluorescente, foi ligada a PTGFRN ou BASP1, sua quantidade dentro das VEs foi muito maior do que quando inserida sozinha (ESCOLA *et al.*, 1998).

Neste sentido, DAR *et. al.*, (2021) relataram que a enzima GAPDH pode se ligar à superfície de VEs por uma região chamada peptídeo G58, que interage com fosfatidilserina. Os pesquisadores criaram uma proteína híbrida, G58T, combinando esse peptídeo com uma parte da proteína TARBP2 que se liga a RNA. Essa estratégia permitiu carregar siRNA em VEs de forma muito eficiente. Assim, diversos estudos pré-clínicos de VEs investigaram diversas estratégias de engenharia para aumentar o carregamento de compostos em vesículas, incluindo proteínas, mRNAs, miRNAs e siRNAs. Porém, não houve grandes avanços para modificar a constituição de VEs com outros metabólitos celulares, incluindo os lipídios.

Desta forma, a bioengenharia da composição lipídica em VEs representa uma abordagem estratégica para compreender e manipular suas funções biológicas. Essas estruturas nanométricas, liberadas por praticamente todos os tipos celulares, são envoltas por uma bicamada lipídica cuja composição não é aleatória, mas sim altamente organizada e seletiva. Fosfolipídios, esfingolipídios, colesterol e outros lipídios bioativos contribuem não apenas para a estabilidade estrutural das VEs, mas também para suas propriedades de fusão, reconhecimento celular e entrega de conteúdo molecular. Alterações na composição lipídica podem modular significativamente a biodistribuição, a capacidade de internalização e até mesmo a função imunológica ou inflamatória das vesículas. Assim, o estudo de bioengenharia de lipídios abre novas possibilidades para o uso terapêutico e diagnóstico das VEs, especialmente no contexto de doenças inflamatórias, neurodegenerativas e câncer.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar o papel das VEs, derivadas de membranas celulares enriquecidas com diversos ácidos graxos exógenos, na modulação da resposta imunológica de macrófagos estimulados com partículas virais do SARS-CoV-2 *in vitro*.

3.2. Específicos:

- a) Caracterizar o perfil lipídico de membranas de macrófagos (M0, M1 e M2) enriquecidos com diferentes AGs;
- b) Obtenção e determinação das características biofísicas das VEs derivadas de macrófagos (M0, M1 e M2) enriquecidos com diferentes AGs;
- c) Determinar os marcadores proteicos específicos de VEs derivadas de células enriquecidas com diferentes AGs;
- d) Avaliar a atividade celular e o efeito imunomodulatório das VEs, derivadas de células enriquecidas, nos macrófagos estimulados com partículas virais inativadas de SARS-CoV-2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

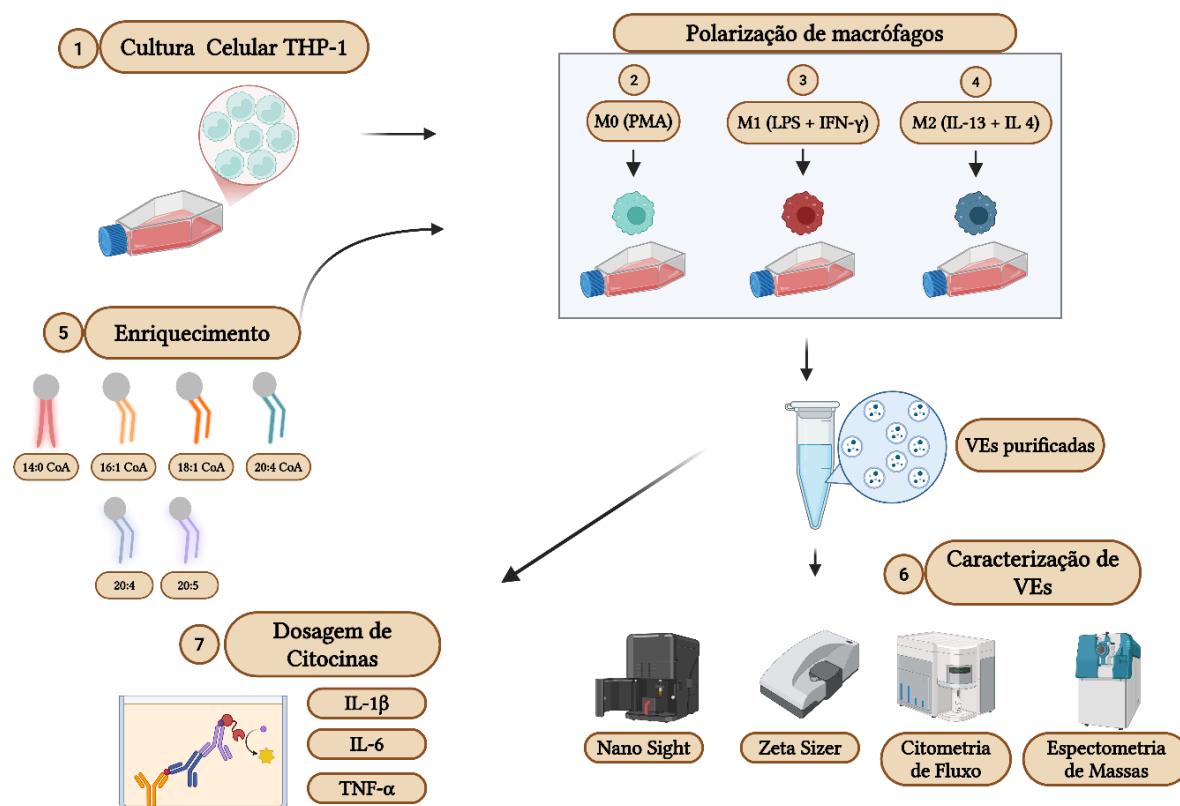


Figura 5. Esquema da metodologia utilizada nesta dissertação. Plaqueamento da linhagem celular THP-1 (1) sendo diferenciada em diferentes perfis fenotípicos (2;3 e 4), em seguida, tratadas com diferentes classes de lipídios (5). Após isso, VEs foram obtidas, purificadas e caracterizadas por *NanoSight*, *ZetaSizer Nano zs*, Citometria de Fluxo (6). Além disso, o lipidoma das membranas celulares foi determinado por Espectrometria de Massas. Macrófagos foram tratados com as VEs, estimulados com LPS ou partículas virais de SARS-CoV-2, em seguida, dosadas as citocinas no sobrenadante de cultura. Ilustração feita no Biorender. Fonte: Próprio Autor

4.1. Obtenção de partículas virais inativadas de SARS-CoV-2. A obtenção das partículas virais de SARS-CoV-2 inativas por radiação UV foi realizada em uma câmara de segurança de risco biológico nível 3 (NB-3) no Departamento de Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram cultivadas células Vero CCL81 em meio essencial mínimo Dulbecco (DMEM) suplementado com Soro Fetal Bovino inativado por calor (SFB - 10%) e antibiótico/antimicótico (Penicilina 10.000 U/mL; Estreptomicina 10.000 µg/mL).

Inóculo viral (MOI: 1) foi adicionado às células seguido de incubação (48 h à 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂) em meio DMEM, sem soro bovino fetal (SBF), adicionando antibiótico/antimicótico (Penicilina 10.000 U/mL; Estreptomicina 10.000 µg/mL), e tratamento de células hospedeiras com tripsina-TPCK (1µg/µL) para otimizar a adsorção do vírus às células. Após confirmação dos efeitos citopáticos da preparação viral em microscópio invertido (Olympus), os sobrenadantes das células VERO infectadas foram submetidos à etapa de centrifugação (200 g, 10 min. à 4°C) e os sobrenadantes armazenados à -80°C até o uso. Finalmente, a titulação do vírus foi realizada em células Vero CCL81 usando diluição limite padrão para determinar a dose infecciosa de 50% (50% tissue culture infectious dose - TCID₅₀] do inóculo viral na cultura celular.

4.2. Cultura de células THP-1 e diferenciação em macrófagos. As células foram cultivadas em meio líquido DMEM-c (suplementado com glutamina, NaHCO₃ (2,0 g/L), 10% de SFB, 500 Ui de penicilina, 500 µg de estreptomicina e 1,25 µg Anfotericina B (Gibco, Grand Island, EUA) em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂. Para diferenciação em macrófagos, as células THP-1 foram semeadas a 2×10⁵/mL em frascos T175 mm³ e tratados com 25 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma Aldrich) por 24h para diferenciar em um estado semelhante ao macrófago M0. As culturas de células diferenciadas foram lavadas uma vez com meio incompleto. Em seguida, as células aderidas foram tratadas com meio DMEM-c suplementado com 20 ng/mL de IFN-γ (R&D Systems, Minnesota, EUA) e 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) (R&D Systems, Minnesota, EUA) por 24 h (polarização em M1) ou 20 ng/mL de IL-4 e IL-13 por 24 h (polarização em M2).

4.3. Enriquecimento de macrófagos com diferentes AGs. Para o protocolo de enriquecimento de membranas de macrófagos (THP-1) foi utilizado a metodologia proposta por HUNG *et al* (2023). Os ácidos graxos conjugados com CoA: AA (20:4 CoA, 870721, Avanti Polar Lipids), ácido oleico (18:1 CoA n=9, 870719, Avanti Polar Lipids), ácido palmítico (16:1 CoA n=7, 870743, Avanti Polar Lipids) e ácido mirístico (14:0 CoA, 870714, Avanti Polar Lipids) foram diluídos em metanol obtendo soluções de trabalho nas respectivas concentrações: 4,53 mM; 4,62 mM, 4,74 mM e 4,86 mM. Os lipídios não conjugados: AA (20:4, 90010, Cayman Chemical) e ácido eicosapentaenoico (EPA) (20:5, 90110, Cayman Chemical) foram diluídos em etanol em 10mM. Em seguida, soluções dos AGs (1 mM) foram feitas em DMEM 0% SFB acrescidas de 1% de BSA e incubadas à 55°C em banho maria por 1h, para ocorrer a conjugação dos lipídios com as proteínas e facilitar a disposição e solubilidade no tratamento das células. Em uma placa de 12 poços,

células THP-1 foram semeadas a 1×10^6 /mL, tratados com 25 nM de PMA por 24h para diferenciar em um perfil semelhante ao macrófago M0 (n=3). Alternativamente, os macrófagos também foram polarizados para M1 ou M2, como demonstrado no item anterior. Após isso, foi retirado o sobrenadante e tratados com os AGs na concentração de 100 μ M, em 2 mL de DMEM 0% SFB, por 24 horas. Por fim, o sobrenadante foi descartado, adicionado 1 mL de metanol puro e raspado para desaderir as células, coletando a solução e guardada em -20°C para extração de lipídios.

4.4. Obtenção de Soro Bovino Fetal (SBF) depletado de VEs. A depleção de VEs do SBF (livre-VEs) foi realizada com o auxílio do Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, no qual utilizamos o método de ultrafiltração, sendo esse mais eficaz que o protocolo de ultracentrifugação (KORNILOV *et al.*, 2018). Nesta metodologia, SBF (15 mL) foram colocados em tubos com ultrafiltros com exclusão de 100 kDa (Amicon Ultra-15, Millipore), seguido de centrifugação a 3.000 g por 55 min. (KORNILOV *et al.*, 2018).

4.5. Isolamento e purificação de VEs. Para purificação de VEs de macrófagos polarizados e/ou enriquecidos com AGs, foi utilizado 40 mL de sobrenadante de cultura de células (M0, M1 e M2), em que os restos celulares ou detritos foram removidos por centrifugação sequencial à 5000 g por 15 min, e posteriormente à 15.000 g por 15 min. Os sobrenadantes obtidos foram concentrados em um sistema de Amicon com exclusão molecular de 100 kDa (Millipore, Billerica, MA, EUA). Na sequência, o sobrenadante resultante foi filtrado em membrana de 0,45 μ m e o precipitado retido foi descartado. O sobrenadante concentrado foi ultracentrifugado à 100.000 g, à 4°C por 1 h. Os *pellets* (contendo as VEs purificadas) foram coletados e ressuspensos em 1 mL de PBS 1X estéril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e armazenados à -80°C.

4.6. Caracterização de VEs por NTA, Zeta Sizer e Citometria de Fluxo. Para determinar a distribuição de tamanho e a quantidade de VEs nas preparações derivadas dos macrófagos (M0, M1 e M2 – naturais ou enriquecidas), foram realizadas análises utilizando o equipamento *Nanosight NS300* (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) com NTA 3.0. Para isso, as amostras foram inseridas no equipamento 3 vezes com intervalo de 30s, a partir dessas medidas os gráficos de dispersão e tamanho foram obtidos. Estes experimentos foram realizados em parceria com o laboratório do Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida, FMRP – USP. Além disso, determinamos o potencial ζ

utilizando um *ZetaSizer Malvern* (Nano ZS - Malvern Instruments) do Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Colóides – Departamento de Química (DQ) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP) - USP em parceria com a Profa. Dra. Ana Paula Ramos. Para essa análise, 100 uL das amostras de VEs controles ou enriquecidas purificadas de macrófagos M0 e M2 (todas na concentração de 10^9 /mL) foram diluídas com 1mL de água e realizada a leitura no equipamento.

A detecção dos marcadores proteicos de VEs foi realizada no laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - USP. Foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados com os específicos fluoróforos: CD81 (FITC, clone JS-81; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), CD9 (PerCP-CyTM5.5, clone M-L13; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), CD63 (PE, clone H5C6; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), Alix (1A12, PE; sc-53540, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), Calnexin (AF18, Alexa Fluor[®] 488; sc-23954 AF488, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). A preparação das amostras foi realizada na proporção 1:10 uL (anticorpo: vesícula), sendo incubadas por duas horas em ambiente escuro e temperatura ambiente. Ao fim das duas horas, adicionamos 200 µL de água ultrapura, realizando a leitura no equipamento *CytoFLEX V3-B3-R0 flow cytometer* (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), com fluxo de aquisição em 10µL/min durante 5 min. O controle negativo utilizado foi água ultrapura (Milliq) com anticorpo específico conjugado com fluoróforo.

4.7. Análise da composição de lipídios de macrófagos enriquecidos com AGs por espectrometria de massa (LC-MS/MS).

4.7.1. Reagente e Padrões Internos. Os reagentes utilizados em todo o processo de extração, diluição de padrão e fases móveis para o sistema cromatográfico, todos em grau MS, foram: Metanol (MeOH), Cloroformio (CHCl₃), Metil-terc-butil éter (MTBE), Acetonitrila (ACN), Isopropanol (ISO) e água ultra-purificada via sistema Milli-Q (Millipore), todos os reagentes foram obtidos via Sigma-Aldrich. Em relação aos padrões moleculares internos, uma solução a 25 uM foi composta pelos seguintes lipídios: Colesterol Ester (CE) 15:0 D7; Triglicerídeo (TG) 15:0/18:1/15:0 D5; Lisofosfatidiletanolamina (LPE) 13:0; Lisofosfatidilcolina (LPC) 13:0; Fosfatidilcolina (PC) (17:0/17:0), Fosfatidiletanolamina (PE) (17:0/17:0), Fosfatidilglicerol (PG) (17:0/17:0), Fosfatidilserina (PS) (17:0/17:0), Esfingomielina (SM) (18:1/12:0) e Ceramida (Cer) (d18:1/17:0), todos os padrões foram obtidos da empresa Avanti - Polar Lipids (Alabaster, USA).

4.7.2.Extração Líquido-Líquido de Lipídios em lisados celulares. A extração dos lipídios foi realizada segundo o método descrito por Matyash et. al. (2009). Para isso, 200 µL da amostra de lisado celular foi homogeneizado, seguido da adição de 40 µL da mistura de padrões internos. Após essa etapa, o sobrenadante foi homogeneizado e transferido para eppendorfs, onde foram normalizados com as seguintes proporções de solvente MTBE/MeOH/H₂O (10:3:2,5 v/v/v). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas novamente em vórtex e incubadas por 1 h sob agitação branda à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram mantidas em repouso por 10 min em gelo. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min à 4° C. Uma separação de fases foi observada e a fase orgânica, corresponde com a fração lipídica, foi coletada e seca sob atmosfera de vácuo à 45°C (*Savant SpeedVac SPD1030 Integrated Vacuum Concentrator* - Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA)

4.7.3.Análise do lipidoma por LC-MS/MS. Após a extração, o precipitado foi ressuspenso em 40 uL de solução ISO/ACN/H₂O (2:1:1v/v/v) e a obtenção de dados de lipidoma foi realizada através de um sistema LC-MS/MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa), utilizando o equipamento UHPLC Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, HO, JP) com sistema de bomba binária e injetor automático acoplado ao espectrômetro de massas Triple-TOF 5600⁺ com sistema de ionização por ESI Turbo V (Sciex, Foster, Ca, USA), situado no laboratório multiusuário CEQIL (Centro de Excelência em Quantificação e Identificação de Lipídeos) da FCFRP/FFCLRP. Foi utilizada a coluna cromatográfica de fase estacionária ACQUITY UPLC R CSHTM C18 (Waters – Milford, Massachusetts, EUA) de dimensões 2.1 x 100mm, 1.7µm. Um volume de 5 uL de cada amostra foi injetado ao sistema com uso do auto injetor e a eluição da mesma foi realizada utilizando sistema de gradiente binário, constituído pelas fases móveis (A) acetonitrila:H₂O (10 mM Formiato de Amônio) 6:4 (v/v) + 0.1% Ác. fórmico e fase (B) Isopropanol:Acetonitrila 9:1 (v/v) + 0.1% Ác. fórmico de acordo com o seguinte gradiente de início: 40% de B; 2 minutos: 43% de B, 2-2,1 minutos: 50% de B, 2,1-12,0 minutos: 70% de B, 12-14,0 minutos: 99% de B, 14-14,1 minutos: 40% de B e, por fim, 14,1-17,0 minutos a 40% de B, mantendo o fluxo a 0,4 mL por minuto.

4.7.4. Processamento e análise de dados. O processamento de dados foi realizado utilizando o Software *MS-DIAL*TM v5.1.230912 (RIKEN, Yokohama, Kanagawa, Japan). Os parâmetros utilizados para o processamento dos dados brutos foram; *data type* (MS1) e (MS/MS) *centroid* com *tolerance MS1* e *MS2* em 0.05 Da, *minimum peak height* 50 *amplitude*, *mass slice width* 0.1 Da, *Linear weighted moving average*, *smoothing level* 5 *scan*, *minimum peak width* 3 *scan*, *sigma window value* 0.5 e *MS/MS abundance cut off* 0 *amplitude*. A análise da notação dos analitos de lipidômica *untarget* (abordagem abrangente de espécies lipídica sem viés prévio), foi feita aplicando o banco de dados *TandemMassSpectralAtlas-VS69*, disponibilizado pela Prime Riken (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html#MSP>), com as seguintes especificações; *Accurate mass tolerance* (MS1) e (MS2) de 0.05 Da, *Dot product score* 600, *weighted dot product score* 600, *reverse dot product score* 800, *Matched spectrum percentage* 70%, *minimum number of matched specrun* 3.

4.8. Dosagem de citocinas. As quantidades de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram determinadas no sobrenadante de cultura celular utilizando kit ELISA (DuoSet-Human, R&D System, Minneapolis, EUA) de acordo com as especificações do fabricante.

4.9. Análises estatísticas. Para as análises estatísticas, os dados foram analisados inicialmente pelo teste de normalidade, *Shapiro-Wilk*, com o objetivo de determinar se os dados eram paramétricos. No caso de ser paramétricos, foi utilizado o teste *t* para análises realizadas com 2 grupos, ou com mais grupos foram feitas por ANOVA, seguido do teste de *Tukey*. Os dados não-paramétricos, utilizamos teste de *Mann-Whitney*. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas com o software *GraphPadPrism*TM (versão 9.0.0) (San Diego, CA, EUA). As análises discriminantes de mínimos quadrados parciais, relevância dos ácidos graxos usando escore de importância da variável na projeção (VIP-Score), Volcano plot e Heatmap foram feitas no software online *Metaboanalyst* 6.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/home.xhtml>).

5. RESULTADOS

5.1. Ácidos graxos exógenos promovem diferentes perfis lipídicos em macrófagos polarizados

Os AGs são componentes estruturais das membranas plasmáticas integrando parte da composição lipídica celular. Nesse sentido, investigamos o perfil lipídico de macrófagos M0, M1 e M2 incubados com diferentes AGs-CoA exógenos, verificando o efeito na composição lipídica das membranas. Os resultados das análises exploratórias dos diferentes lipidomas de macrófagos M0, M1 e M2 estão demonstrados nas Figuras 6, 7 e 8, respectivamente.

Assim, demonstramos que macrófagos M0 incubados com os diferentes AGs formaram agrupamentos (*clusters*) distintos em relação ao grupo basal (M0), indicando modificações pertinentes no perfil lipídico entre os grupos (Figura 6a). Dentre os 80 analitos identificados, destacaram-se, com valores mais elevados de importância para a discriminação entre os grupos ($VIP > 2,5$) os seguintes: PC 14:0/14:0, PE P-16:0/20:4, PC 14:0/16:1, PE P-16:0/18:1 e FA 16:0 (Figura 6b). Os tratamentos com os AGs induziram modificações significativas no perfil lipídico, especialmente nos grupos tratados com 14:0 e 20:4, nos quais a abundância de espécies lipídicas do tipo glicerofosfolipídico (PC, PI e PE) foi consideravelmente aumentada em comparação ao controle M0 (Figura 6c). Ressalta-se, ainda, a composição das cadeias graxas dos fosfolipídios destacados, nos quais o ácido graxo 14:0 está incorporado na posição sn-1, enquanto o ácido graxo 20:4 encontra-se na posição sn-2 (Figura 6b;6c).

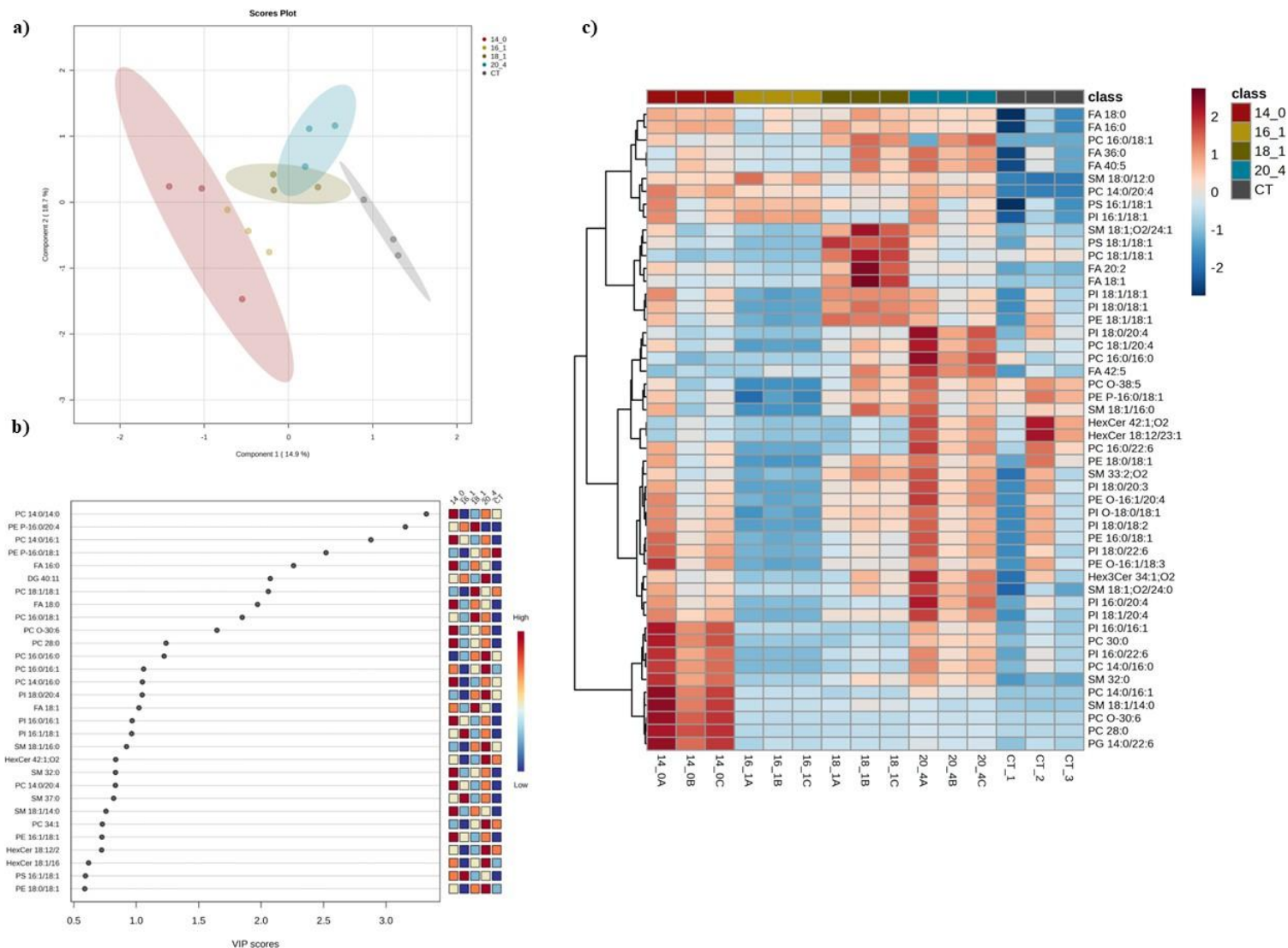


Figura 6. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M0 incubados com diferentes AGs exógenos. a) PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) discriminando grupamentos de macrófagos submetidos a diferentes protocolos de incubação de AGs; **b)** *VIP Score* dos principais analitos com valor de importância na discriminação entre grupos; **c)** *Heatmap* com a intensidade de espécies lipídicas entre os grupos. Dados obtidos em triplicata e analisados na plataforma *Metaboanalyst 6.0*.

Em macrófagos M1, observamos a separação dos grupos em relação ao controle (M1), evidenciando perfis lipídicos distintos (Figura 7a). Dentre os 110 analitos identificados,

destacaram-se com maior valor de importância para a discriminação entre os grupos (VIP > 2,5) os seguintes compostos: PC 14:0/14:0; PC 16:0/18:1; PC 14:0/16:0; FA 16:0 e PC 14:0/16:1 (Figura 7b). Assim como em macrófagos M0, o grupo 14:0 demonstrou padrão lipídico semelhante, exibindo fosfolipídios contendo 14:0 incorporados em suas cadeias. No entanto, observou-se também a presença e abundância de triacilglicerídeos com cadeias graxas contendo 14:0 nas posições sn-1 e sn-2 (Figura 7c). Destaca-se o contraste entre o perfil lipídico do grupo 20:4 nos macrófagos M0 e M1, uma vez que, nos macrófagos M1, a composição lipídica do grupo 20:4 se assemelhou à do controle M. Esse resultado indica que, em macrófagos M1, o AA não é incorporado às cadeias graxas de fosfolipídios nem de lipídios neutros (diacilglicerídeos ou triacilglicerídeos). Diferentemente dos macrófagos M0, o grupo 16:1 apresentou elevada expressão de espécies lipídicas em fosfolipídios de membrana (PC, PG, PI e PE), além de triacilglicerídeos (TGs). Esses achados sugerem que, em macrófagos M1, o grupo 16:1 promove maior incorporação lipídica e remodelamento de membrana, quando comparado ao controle (M0).

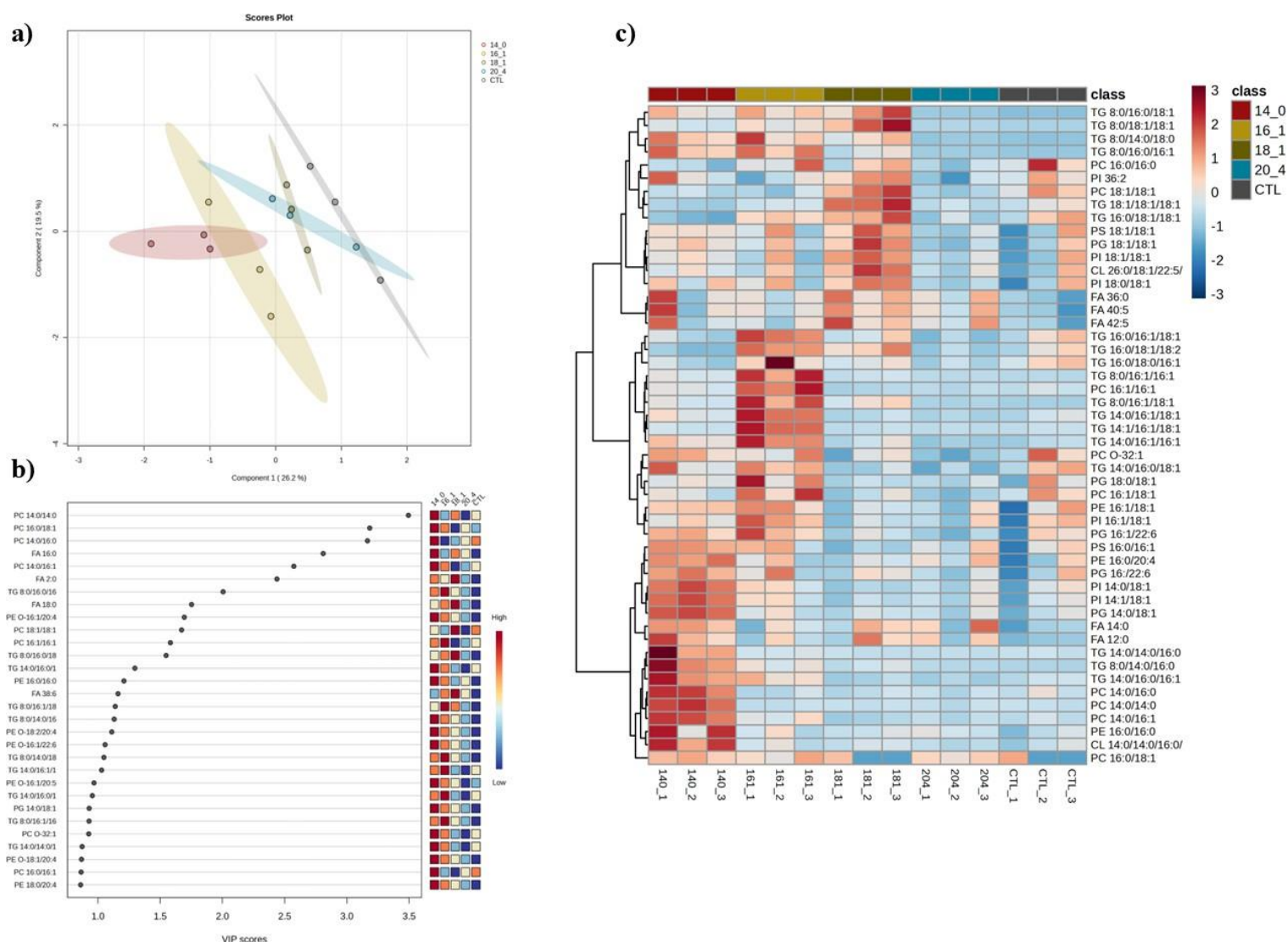


Figura 7. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M1 incubados com diferentes AGs. a) PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) discriminando grupamentos de macrófagos submetidos a diferentes protocolos de incubação de AGs; **b)** *VIP Score* dos principais analitos com valor de importância na discriminação entre grupos; **c)** *Heatmap* com a intensidade de espécies lipídicas entre os grupos. Dados obtidos em triplicata e analisados na plataforma *Metaboanalyst 6.0*.

Em macrófagos M2, observamos discriminação entre o grupo controle e o grupo tratado com 14:0, enquanto os grupos 16:1, 18:1 e 20:4 apresentaram perfis lipídicos semelhantes, não formando agrupamentos (clusters) específicos (Figura 8a). Foram identificados 163 analitos, dentre os quais os principais, com maior valor de importância para a discriminação entre os grupos ($VIP > 2$) foram: FA 16:0, 18:0 e 18:1 (Figura 8b). O padrão de expressão das espécies lipídicas no grupo 14:0 foi semelhante ao observado nos macrófagos M1 e M0, apresentando alta intensidade de lipídios de membrana (PC, PE e PI), lipídios neutros (TGs) com 14:0 incorporado nas cadeias, além de ácidos graxos livres. Em contraste, os grupos 16:1, 18:1 e 20:4 apresentaram padrões de expressão lipídica semelhantes ao controle, indicando baixa capacidade de promover remodelamento de membrana em macrófagos M2 (Figura 8c).

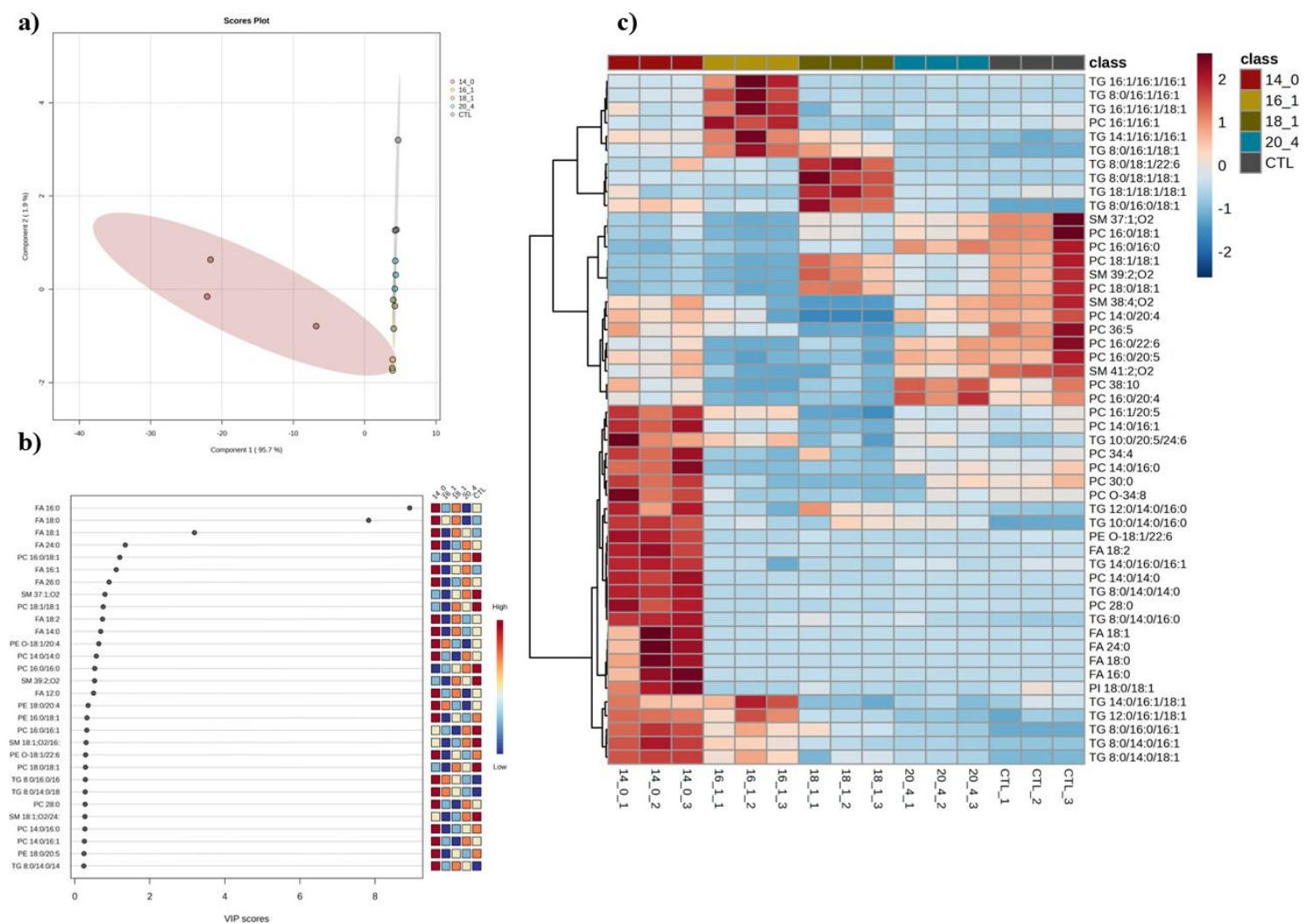


Figura 8. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M2 incubados com diferentes AGs. a) PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) discriminando grupamentos de macrófagos submetidos a diferentes protocolos de incubação de AGs; **b)** *VIP Score* dos principais analitos com valor de importância na discriminação entre grupos; **c)** *Heatmap* com a intensidade de espécies lipídicas entre os grupos. Dados obtidos em triplicata e analisados na plataforma *Metaboanalyst 6.0*.

5.2.Efeito da conjugação de ácidos graxos com coenzima A na remodelagem dos lipídios de membrana em macrófagos polarizados

O remodelamento de membrana é mediado pelo Ciclo de Lands, o qual envolve ações enzimáticas que liberam cadeias graxas de fosfolipídios e as substituem por AGs conjugados com CoA. Neste sentido, investigamos se AGs não conjugados com CoA poderiam induzir remodelamento das membranas dos macrófagos. Nestes lipidomas, identificamos 186 analitos e os resultados das análises exploratórias discriminatórias estão representados nas Figuras 9, 10 e 11, correspondente aos macrófagos M0, M1 e M2.

Em macrófagos M0, observamos a formação de agrupamentos (*clusters*) distintos entre os três grupos analisados, indicando que a presença ou ausência de CoA induz a formação de perfis lipídicos diferenciados (Figura 9a). Dentre os analitos com maior valor de importância para discriminação entre os grupos ($VIP > 2$), destacaram-se: FA 16:0, FA 18:0, SM 37:0;O2 e PE-O 18:1/20:4 (Figura 9b). Interessante notar os padrões lipídicos observados entre os grupos com e sem CoA, sendo que o grupo sem CoA apresentou maior abundância de diferentes espécies lipídicas, incluindo fosfolipídios, esfingomielinas, AGs livres e triacilglicerídeos, em comparação ao grupo com CoA. De forma semelhante ao observado nos experimentos anteriores com diferentes espécies de AGs, o AA foi incorporado em fosfolipídios de membrana (PC e PE) e em triacilglicerídeos, localizando-se, respectivamente, nas posições sn-2 e sn-3 (Figura 9c).

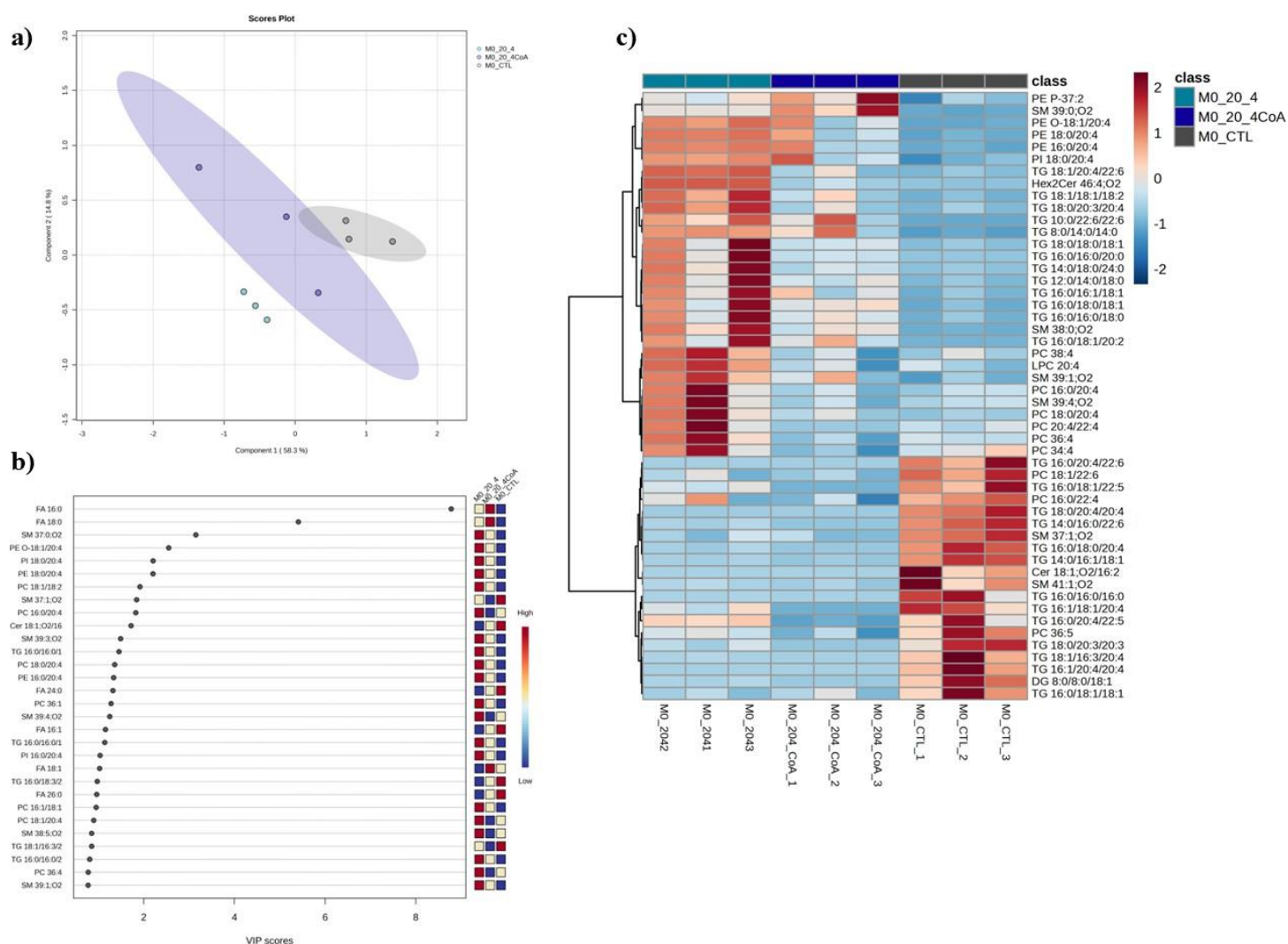


Figura 9. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M0 tratados com AA conjugado ou não com CoA. a) PLS-DA discriminando grupamentos de macrófagos submetidos a diferentes AGs exógenos; **b)** *VIP Score* total dos 30 principais analitos com valor de importância na discriminação entre grupos; **c)** *Heatmap* demonstrando a intensidade de espécies lipídicas entre os grupos. Dados obtidos em triplicata e analisados na plataforma *Metaboanalyst 6.0*

Em macrófagos M1, observamos a separação entre os grupos controle e tratados com AA não conjugado com CoA, evidenciando perfis lipídicos distintos. Por outro lado, os grupos tratados com AA conjugado com CoA apresentaram perfis semelhantes ao grupo controle (Figura 10a). Dentre os analitos com maior valor de importância para discriminação entre os grupos ($VIP > 2$), destacaram-se: FA 16:0, FA 18:0 e FA 18:1 (Figura 10b). De forma semelhante ao observado em macrófagos M0, os grupos tratados com AA não conjugado apresentaram maior abundância e intensidade de espécies lipídicas quando comparados ao

controle e ao grupo tratado com AA conjugado com CoA. O padrão lipídico das espécies expressas foi semelhante ao dos macrófagos M0, com destaque para fosfolípidios de membrana e triacilglicerídeos (Figura 10c).

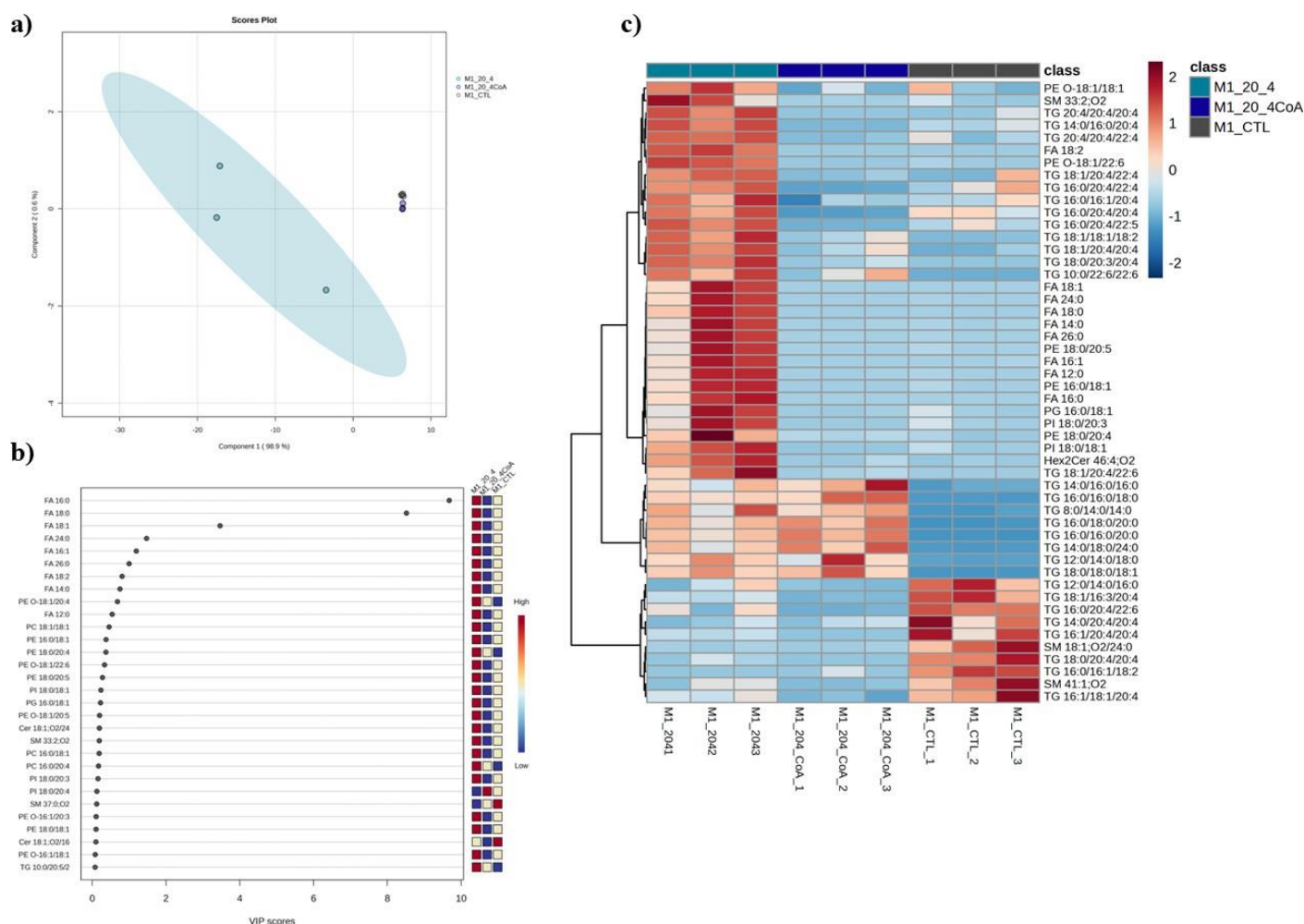


Figura 10. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M1 tratados com AA conjugado ou não com CoA. a) PLS-DA discriminando grupamentos de macrófagos submetidos a diferentes AGs exógenos; b) *VIP Score* total dos 30 principais analitos com valor de importância na discriminação entre grupos; c) *Heatmap* demonstrando a intensidade de espécies lipídicas entre os grupos. Dados obtidos em triplicata e analisados na plataforma *Metaboanalyst 6.0*

Em macrófagos M2, observamos a separação entre os três grupos experimentais, evidenciando diferenças na composição lipídica (Figura 11a). Os analitos de maior relevância para discriminação das amostras ($VIP > 1,50$) foram: DG 8:0/8:0 e TG 20:3/20:4/20:4 (Figura 11b). De maneira semelhante ao observado em macrófagos M0 e M1, a maior expressão de espécies lipídicas responsáveis pela separação dos grupos ocorreu nos macrófagos tratados com

AA não conjugado. Esses resultados indicam que o AA não conjugado é incorporado em fosfolipídios e lipídios neutros, promovendo remodelamento de membrana (Figura 11c).

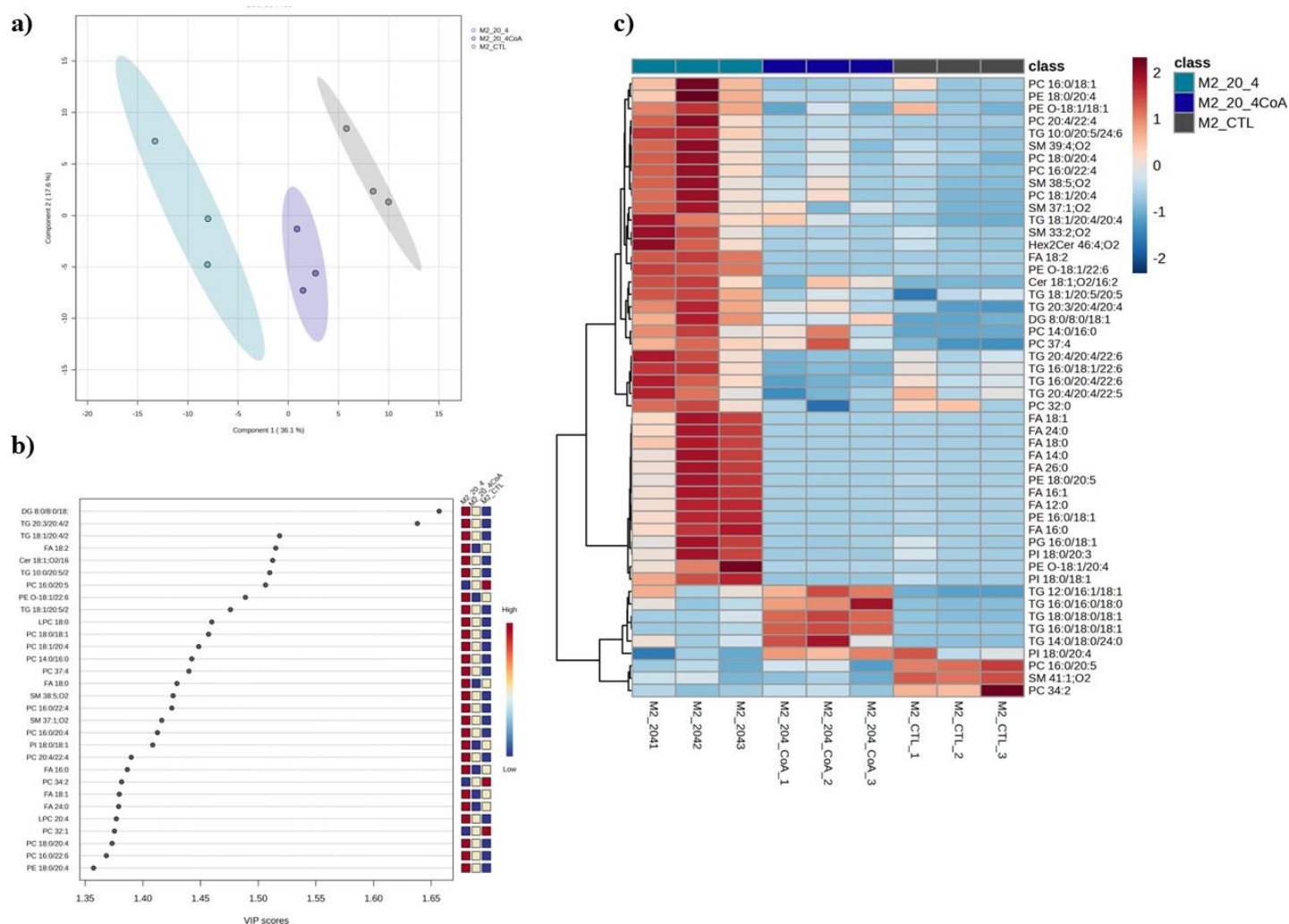


Figura 11. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M2 tratados com AA conjugado com CoA e AA não conjugado. a) PLS-DA (*Partial Least Squares Discriminant Analysis*) discriminando cluster de macrófagos submetidos a diferentes ácidos graxos exógenos; **b)** VIP Score total ranqueamento de 30 principais analitos com valor de importância na discriminação entre grupos; **c)** *Heatmap* total exibindo a intensidade de espécies lipídicas entre os grupos. Dados obtidos em triplicata e analisados na plataforma *Metaboanalyst 6.0*

5.3. Efeito da incubação de ácido graxo ômega-3 na remodelagem dos lipídios de membrana em macrófagos polarizados

Seguindo os experimentos anteriores, investigamos se o ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5), um AGs da família ômega-3 é capaz de mudar o perfil lipídico e ser incorporado em lipídios de membrana dos macrófagos. Neste sentido, os resultados de lipidoma identificaram 160 analitos e os resultados das análises exploratórias discriminantes foram demonstrados nas Figuras 12, 13, 14, respectivamente para os macrófagos M0, M1 e M2.

Em macrófagos M0, observamos a separação dos grupos, evidenciando perfis lipídicos distintos (Figura 12a). As espécies lipídicas com maior valor de importância para a formação dos agrupamentos ($VIP > 1,5$) foram: PC 20:5/20:5, PC 14:0/20:5, PE O-18:1/22:6, FA 18:2, TG 8:0/18:5/24:0 e PC 14:0/20:5 (Figura 12b). A expressão de espécies lipídicas contendo 20:5 incorporado em suas cadeias foi superior à observada no grupo controle. Ademais, verificou-se maior abundância de TGs no grupo tratado com o EPA (Figura 12c).

Em macrófagos M1, foram identificados agrupamentos diferenciados entre os grupos, indicando perfis lipídicos distintos (Figura 13a). As espécies lipídicas com maior valor de importância para a discriminação entre os grupos ($VIP > 1,5$) foram: PC 16:0/20:5, PE O-18:1/22:6, FA 18:2, PC 14:0/20:5 e PC 20:5/20:5 (Figura 13b). Observamos um padrão de abundância lipídica semelhante ao encontrado nos macrófagos M0, especialmente para espécies contendo o 20:5 em suas cadeias (Figura 13c).

Em macrófagos M2, também foi observada separação entre os grupos, evidenciando perfis lipídicos distintos (Figura 14a). As espécies lipídicas com maior valor de importância ($VIP > 1,55$) foram: TG 14:0/16:0/18:1, TG 20:4/20:5/22:5, TG 16:0/20:4/20:5 e PC O-36:10 (Figura 14b). De maneira semelhante ao observado nos macrófagos M0 e M1, a expressão de espécies lipídicas neutras (TGs) foi mais abundante nos macrófagos tratados com EPA, os quais apresentaram cadeias graxas contendo 20:5 (Figura 14c). Esses resultados indicam que o tratamento com EPA promove o remodelamento da membrana celular, evidenciado pela incorporação do ácido graxo em fosfolipídios de membrana e pelo aumento da abundância de espécies lipídicas neutras em todos os perfis de polarização de macrófagos.

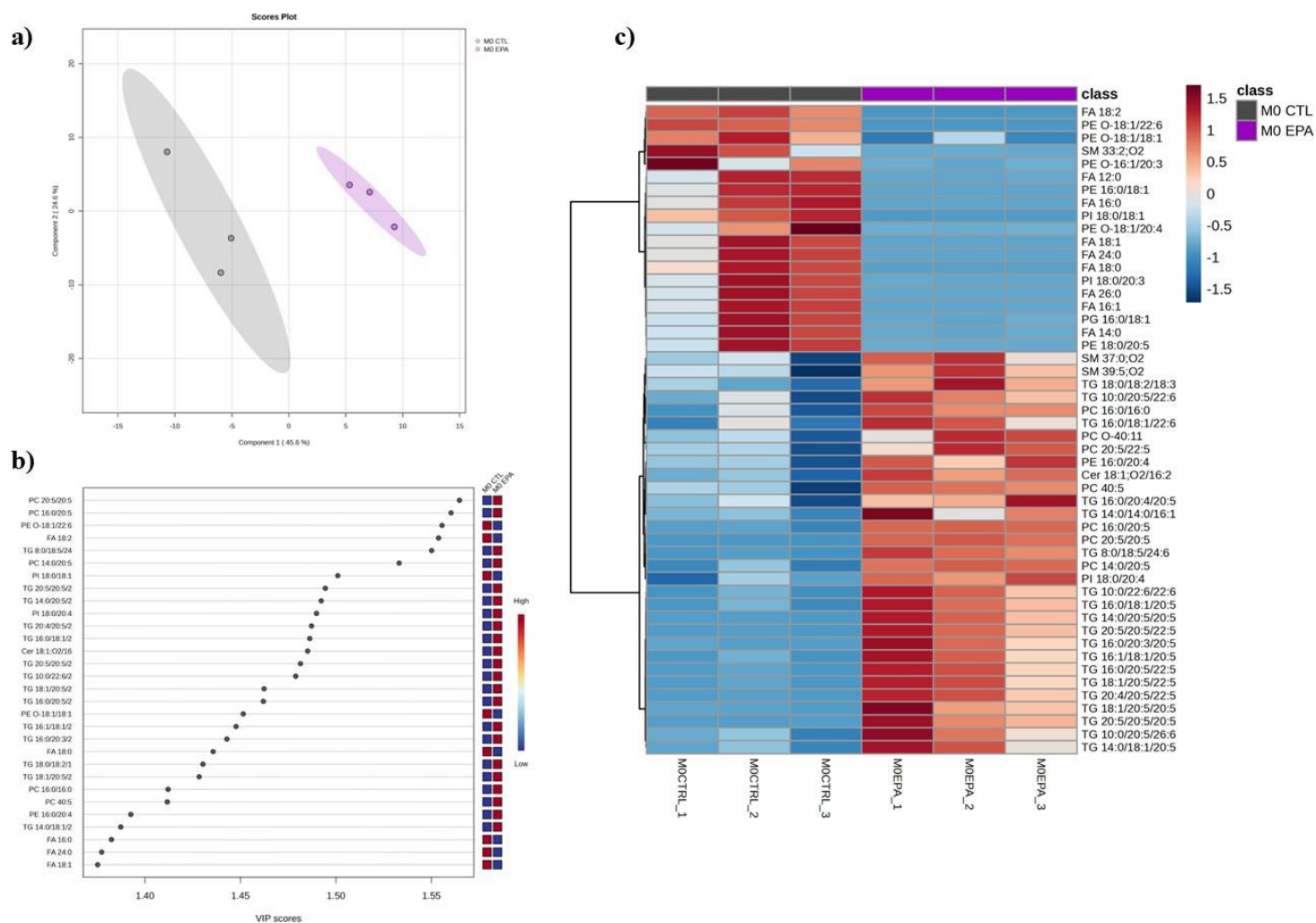


Figura 12. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M0 tratados com EPA. a) PLS-DA discriminando grupamentos de macrófagos submetidos a incubação com EPA; b) *VIP Score* total dos 30 principais analitos com valor de importância na discriminação entre grupos; c) *Heatmap* total exibindo a intensidade de espécies lipídicas entre os grupos. Dados obtidos em triplicata e analisados na plataforma *Metaboanalyst 6.0*

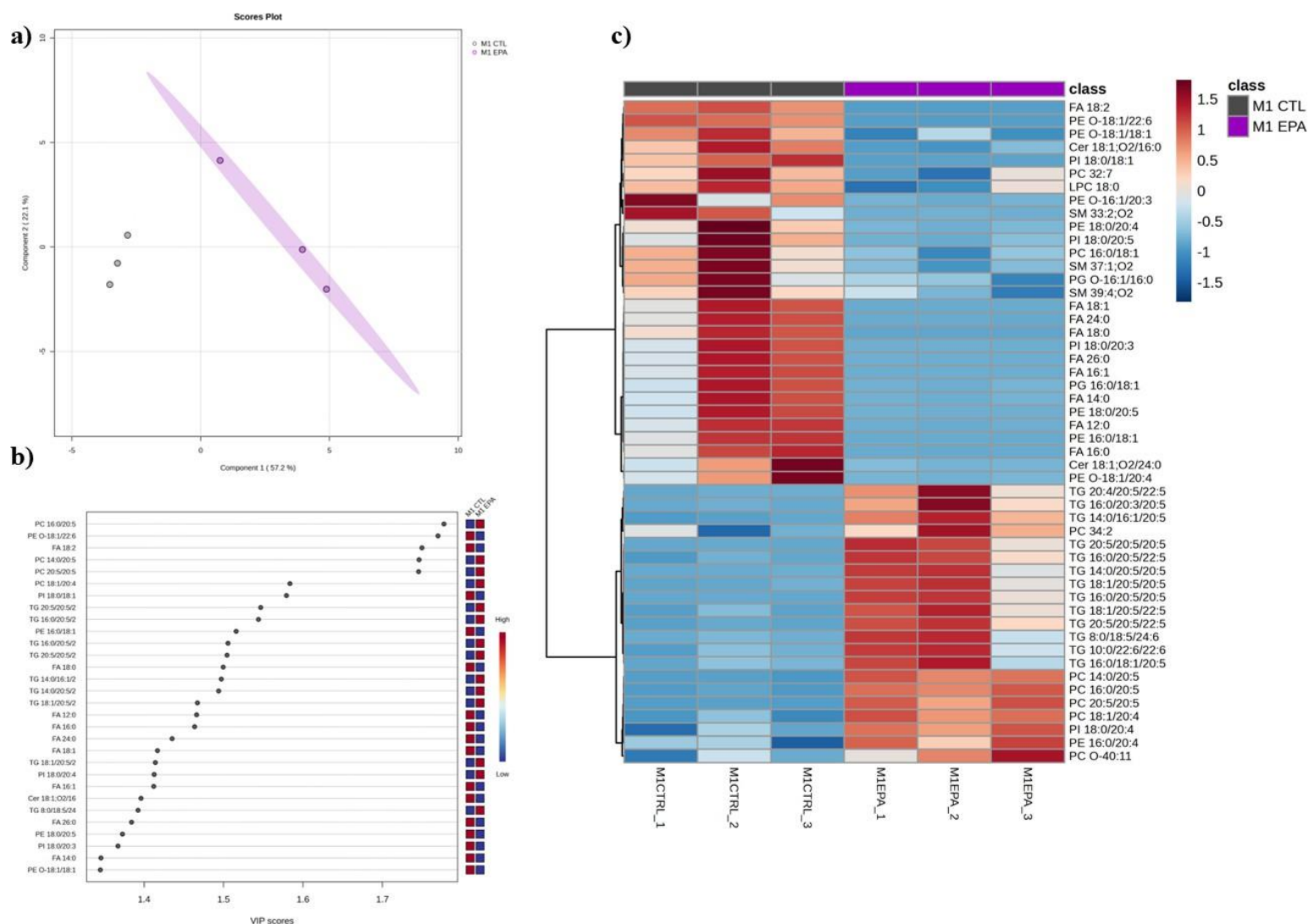


Figura 13. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M1 tratados com EPA. a) PLS-DA discriminando grupamentos de macrófagos submetidos a incubação com EPA; b) *VIP Score* total dos 30 principais analitos com valor de importância na discriminação entre grupos; c) *Heatmap* total exibindo a intensidade de espécies lipídicas entre os grupos. Dados obtidos em triplicata e analisados na plataforma *Metaboanalyst 6.0*

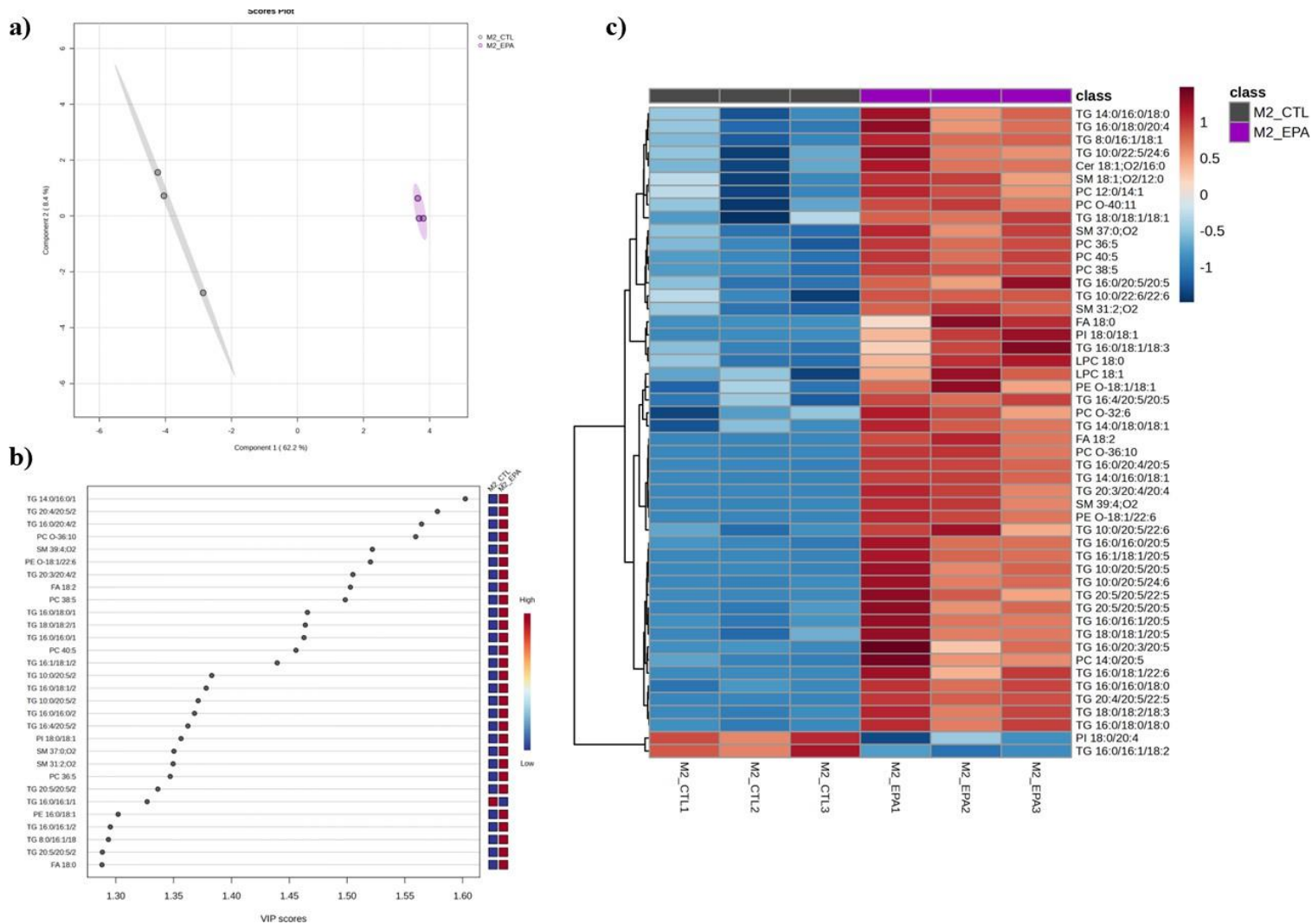


Figura 14. Análise multivariada e padrões lipídicos de macrófagos M2 tratados com EPA. **a)** PLS-DA discriminando grupamentos de macrófagos submetidos a incubação com EPA; **b)** *VIP Score* total dos 30 principais analitos com valor de importância na discriminação entre grupos; **c)** *Heatmap* total exibindo a intensidade de espécies lipídicas entre os grupos. Dados obtidos em triplicata e analisados na plataforma *Metaboanalyst 6.0*

5.4. Caracterização biofísica de vesículas extracelulares produzidas por macrófagos polarizados e enriquecidos com ácidos graxos exógenos

Considerando nossos resultados anteriores, o critério adotado para o isolamento de VEs de macrófagos enriquecidos com AGs baseou-se na elevada abundância desses lipídios incorporados nos fosfolipídios de membrana. Assim, fundamentamos no mecanismo de biogênese das VEs, que é mediado, majoritariamente, pela membrana plasmática, refletindo assim, a composição lipídica da célula de origem (LIM et al., 2021). Adicionalmente, optamos por não isolar VEs provenientes de macrófagos M1, por consequência de sua reconhecida capacidade de induzir e amplificar eventos inflamatórios (QIAN et al., 2024), além disso, tem-se para o isolamento, um risco potencial de contaminação com LPS, que foi utilizado no processo de polarização na cultura celular de M1. Dessa forma, foram isoladas VEs de macrófagos M0 nas condições: i) basal; ii) tratados com 14:0-CoA e iii) 20:5. Como também, VEs de macrófagos M2 nas condições: i) basal; ii) tratados com 14:0-CoA, iii) 20:4 e iv) 20:5.

Após o isolamento das VEs basais ou enriquecidas, foram realizadas as caracterizações biofísicas e moleculares. Os resultados representativos da concentração e do tamanho das VEs estão demonstrados nas Figuras **15** e **16**. De modo geral, as VEs derivadas de macrófagos M0 e M2, apresentaram concentrações médias de 10^9 partículas/mL. Em relação ao tamanho, observamos valores de moda variando entre 99 e 117 nm de diâmetro, sendo que a população de maior tamanho foi identificada nas VEs isoladas de macrófagos M2, com valor modal de 130 nm.

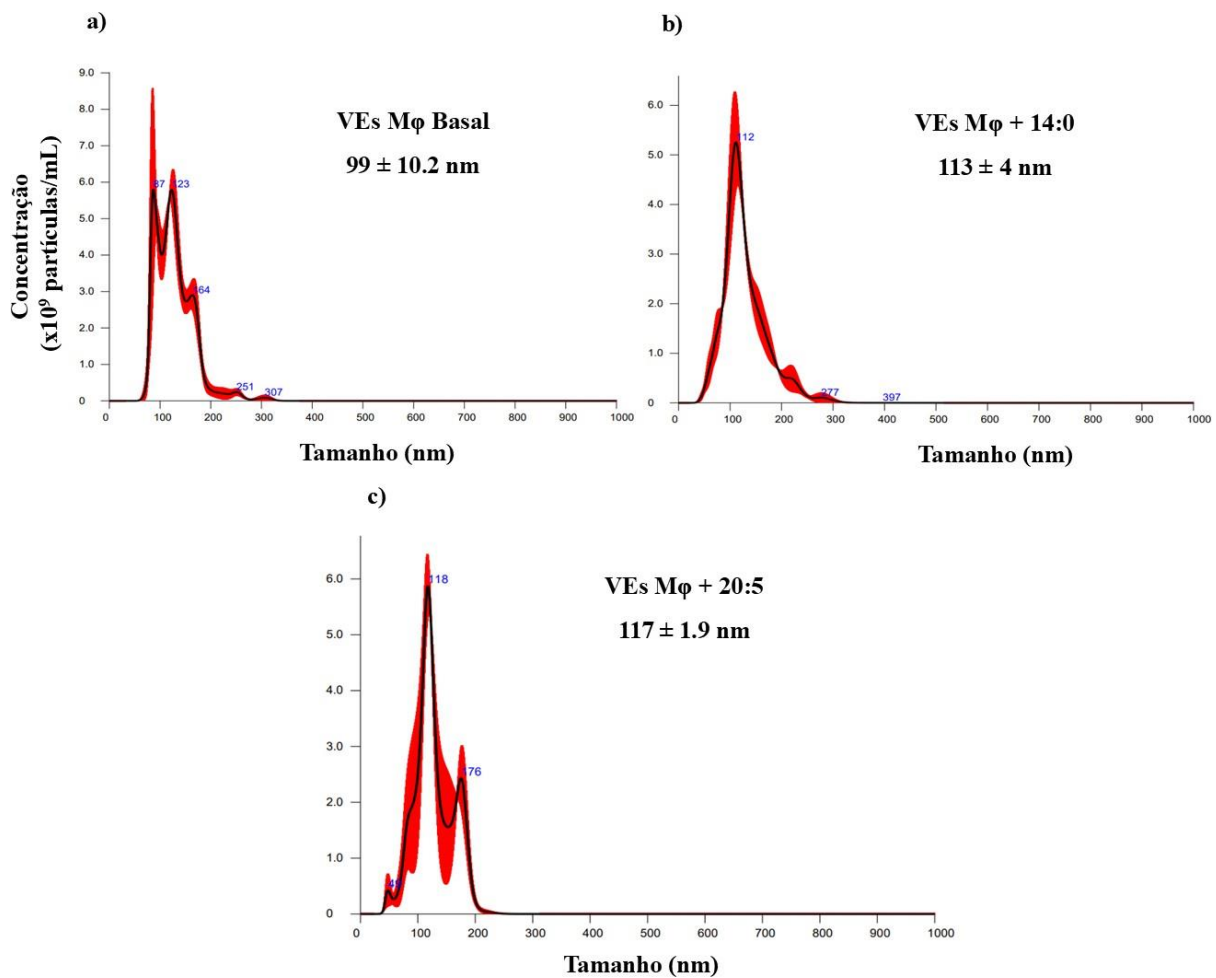


Figura 15. Análise da concentração e tamanho de vesículas extracelulares basais ou enriquecidas com ácidos graxos derivadas de macrófagos M0. a) VEs de macrófagos M0 no estado basal; b) VEs de M0 enriquecidas com 14:0; c) VEs de M0 enriquecidas com 20:5. Tamanho das VEs expresso em moda $\pm$ SEM; Concentração de VEs em x10⁹ partículas/mL.

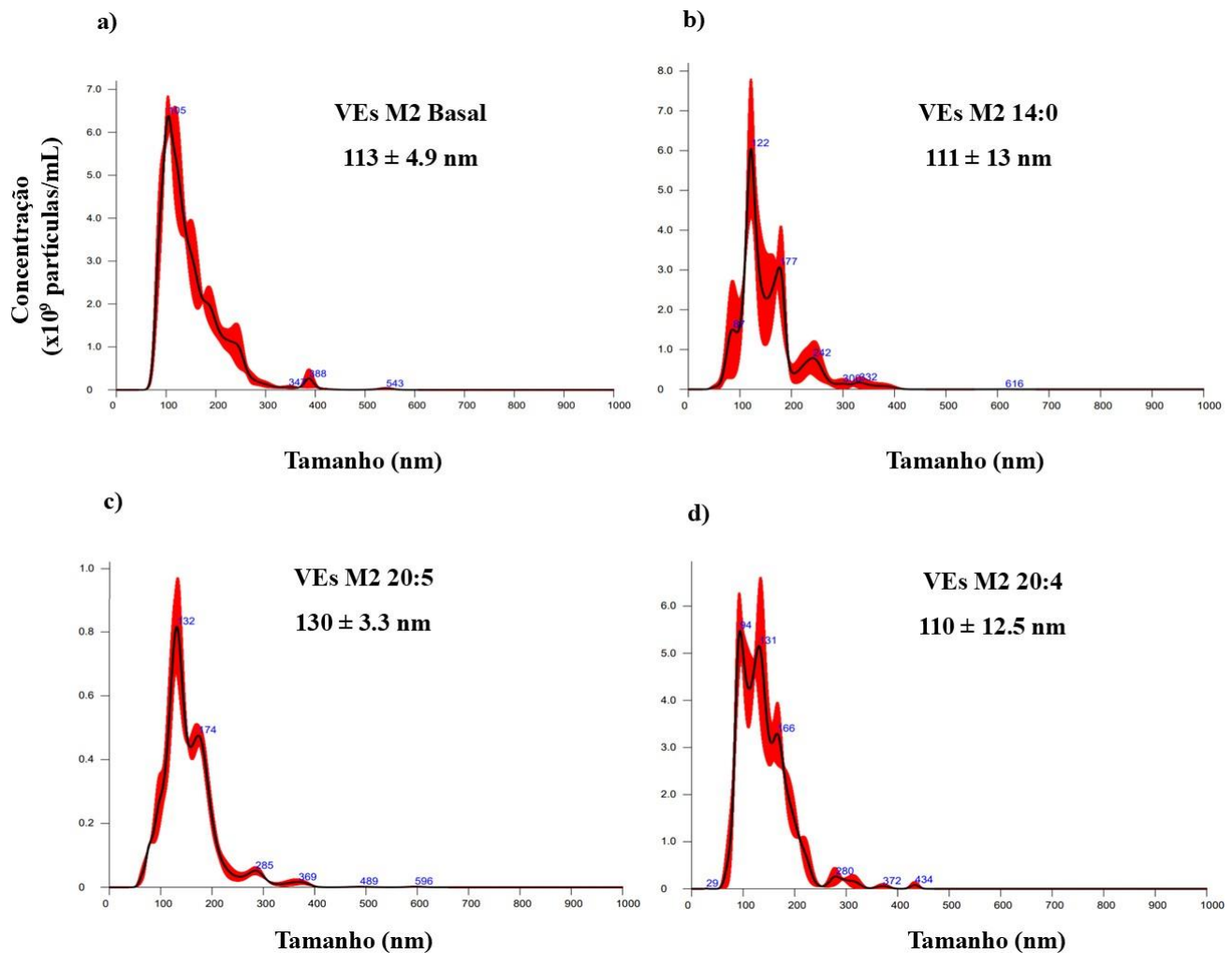


Figura 16. Análise da concentração e tamanho de vesículas extracelulares basais ou enriquecidas com ácidos graxos derivadas de macrófagos M2. a) VEs de macrófagos polarizados para M2 no estado basal de cultura celular; b) VEs de M2 enriquecidas com 14:0; c) VEs de M2 enriquecidas com 20:5; d) VEs de M2 enriquecidas com 20:4. Tamanho de VEs expresso em moda $\pm$ SEM; Concentração de VEs em $\times 10^9$ partículas/mL.

Ademais, na caracterização eletrostática das membranas das VEs dos macrófagos M0 e M2 no estado de cultura basal, o potencial zeta apresentou valores entre -12 e -10 mV (Figura 17a). Interessante observar que, ao comparar com as VEs M0 basais, as VEs enriquecidas com 14:0 e 20:5 apresentaram redução do potencial zeta, com valores de -21 mV e -20 mV, respectivamente. De forma semelhante, as VEs derivadas de macrófagos M2 e enriquecidas com 14:0 e 20:4 também apresentaram diminuição do potencial zeta, com valores de -17 mV e -15 mV, respectivamente.

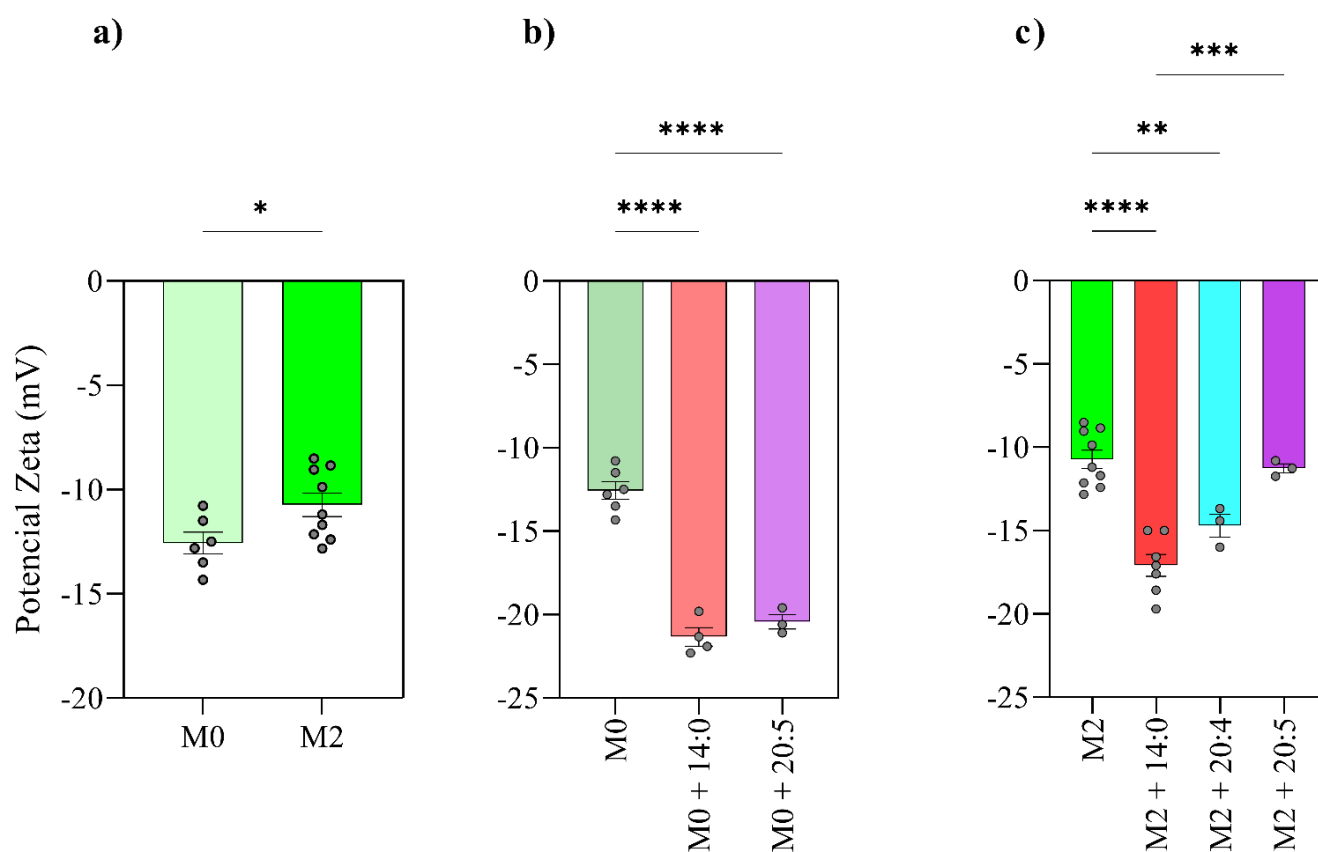


Figura 17. Potencial Zeta de Vesículas Extracelulares derivadas de macrófagos. a) VEs de M0 e M2 no estado basal de cultura; b) VEs M0 basal e enriquecidas com 14:0 e 20:5; c) VEs M2 basal e enriquecidas com 14:0, 20:4 e 20:5. Análise realizada com concentração de 1.10^8 partículas/mL em H_2O

ultra-pura. Dados expressos em Média $\pm$ SEM. As análises estatísticas utilizadas foram test *t* e *One-Way* ANOVA, seguido do pós teste de *Tukey*. Valores considerados significativos $p < 0,05$.

5.5. Caracterização dos marcadores de superfície de vesículas extracelulares produzidas por macrófagos polarizados e enriquecidos com ácidos graxos exógenos

Através da citometria de fluxo, investigamos marcadores de superfície determinantes para caracterização biológica de VEs. Os resultados estão demonstrados nas figuras **18, 19, 20, 21 e 22**. Nossas análises demonstram que as VEs, no estado basal de cultura e enriquecidas com AGs, coletados dos sobrenadantes de macrófagos M0 e M2 expressaram positivamente os marcadores ALIX, CD9, CD63 e CD81. Interessante observar, que a maior expressão de CD9 foi detectado em VEs derivadas de macrófagos M2 basais e enriquecidas. Além disso, o marcador Calnexina teve baixa expressão nas VEs de ambas as populações, indicando que as preparações de vesículas não apresentavam restos celulares ou corpos apoptóticos, como contaminantes que possam afetar suas propriedades e função.

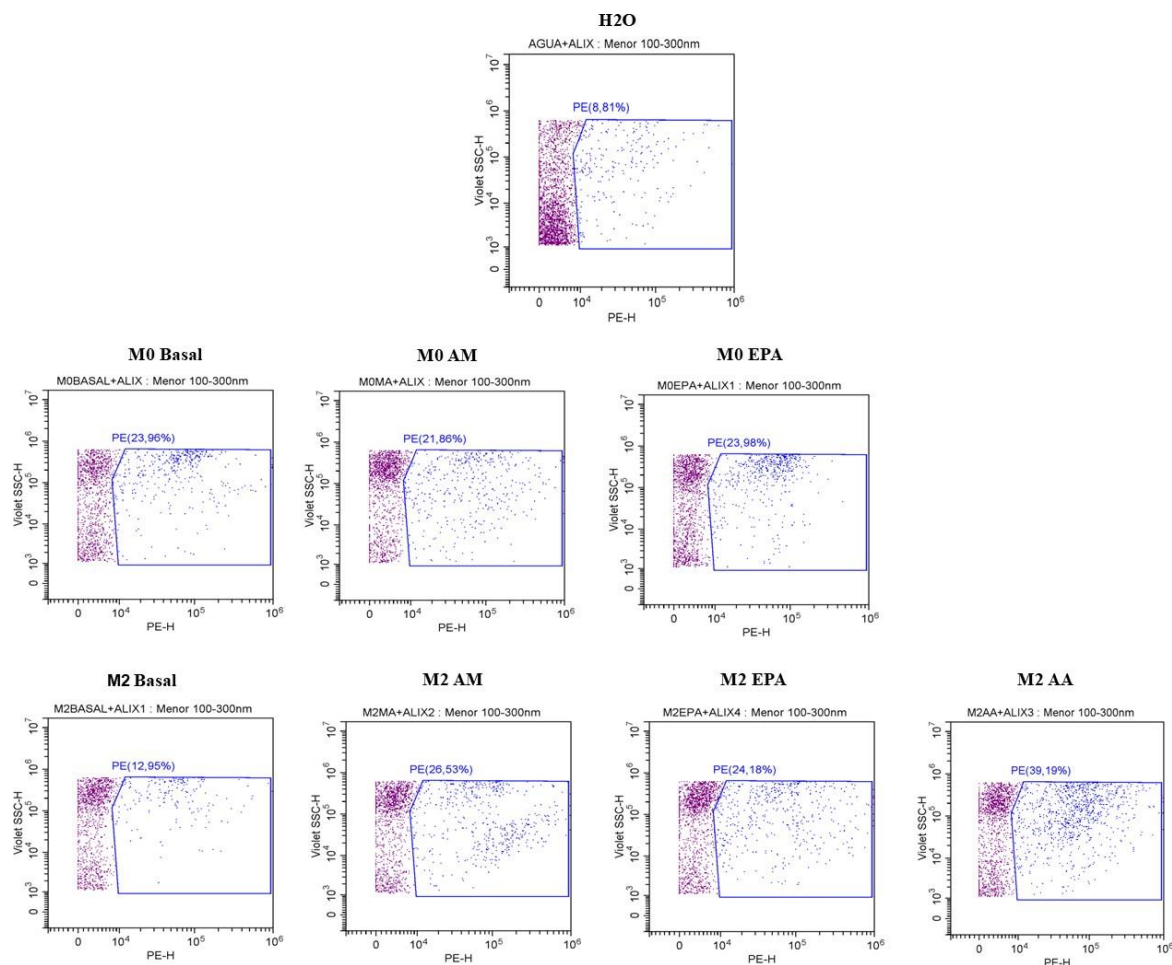


Figura 18. Detecção do marcador ALIX em vesículas extracelulares basais e enriquecidas com AGs em macrófagos M0 e M2 por nanocitometria de fluxo. VEs marcadas com anticorpo anti-ALIX e conjugado com fluorescência PE-H. Concentração de VEs utilizadas em 10^7 partículas/mL. H₂O ultrapura foi utilizada como controle negativo para obtenção das gates de análise.

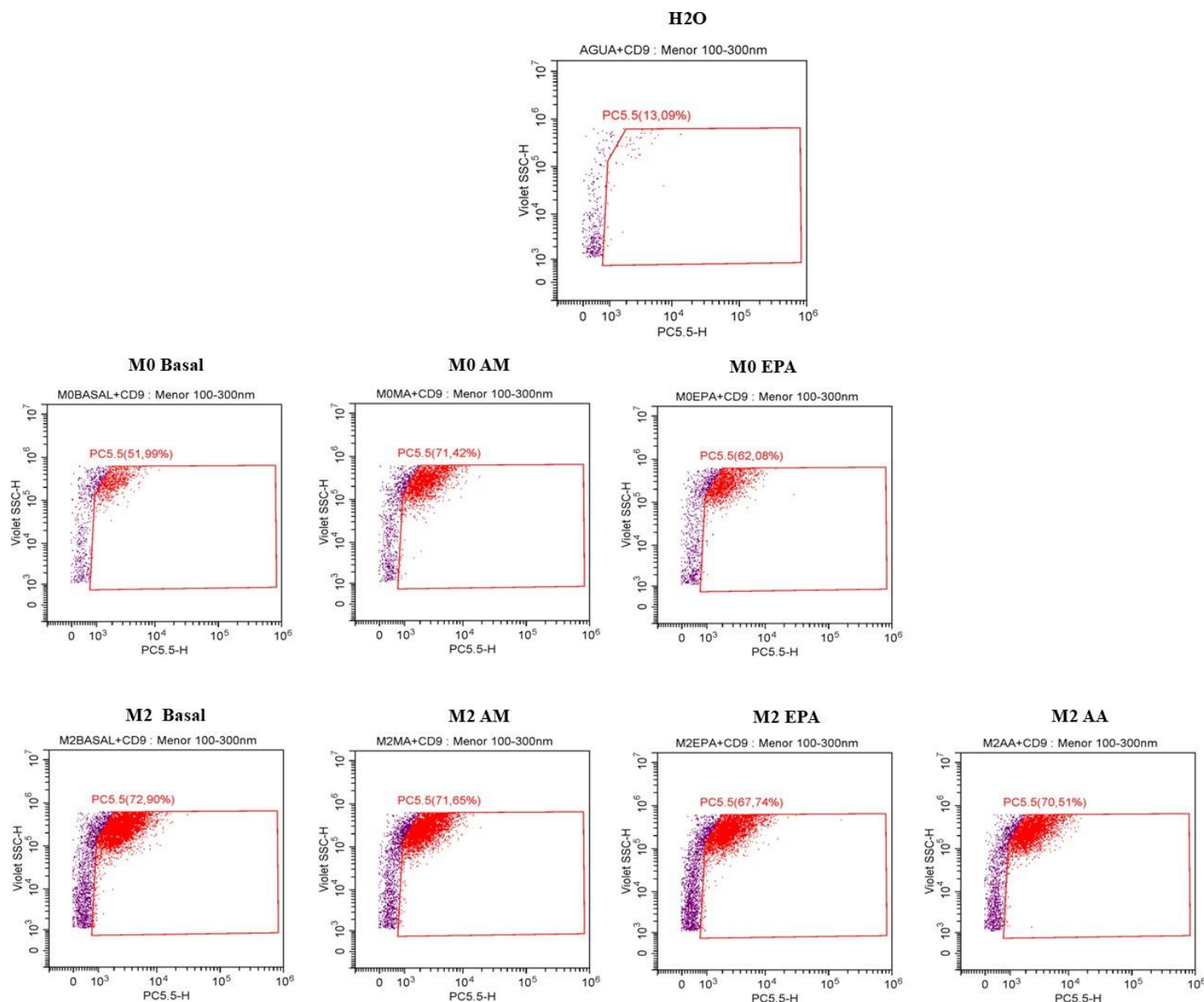


Figura 19. Detecção de marcador CD9 em vesículas extracelulares basais e enriquecidas de macrófagos M0 e M2 por nanocitometria de fluxo. VEs marcadas com anticorpos anti-CD9 e conjugado com fluorescência PC 5-H. Concentração de VEs utilizadas em 10^7 partículas/mL. H₂O ultrapura foi utilizada como controle negativo para obtenção das gates de análise.

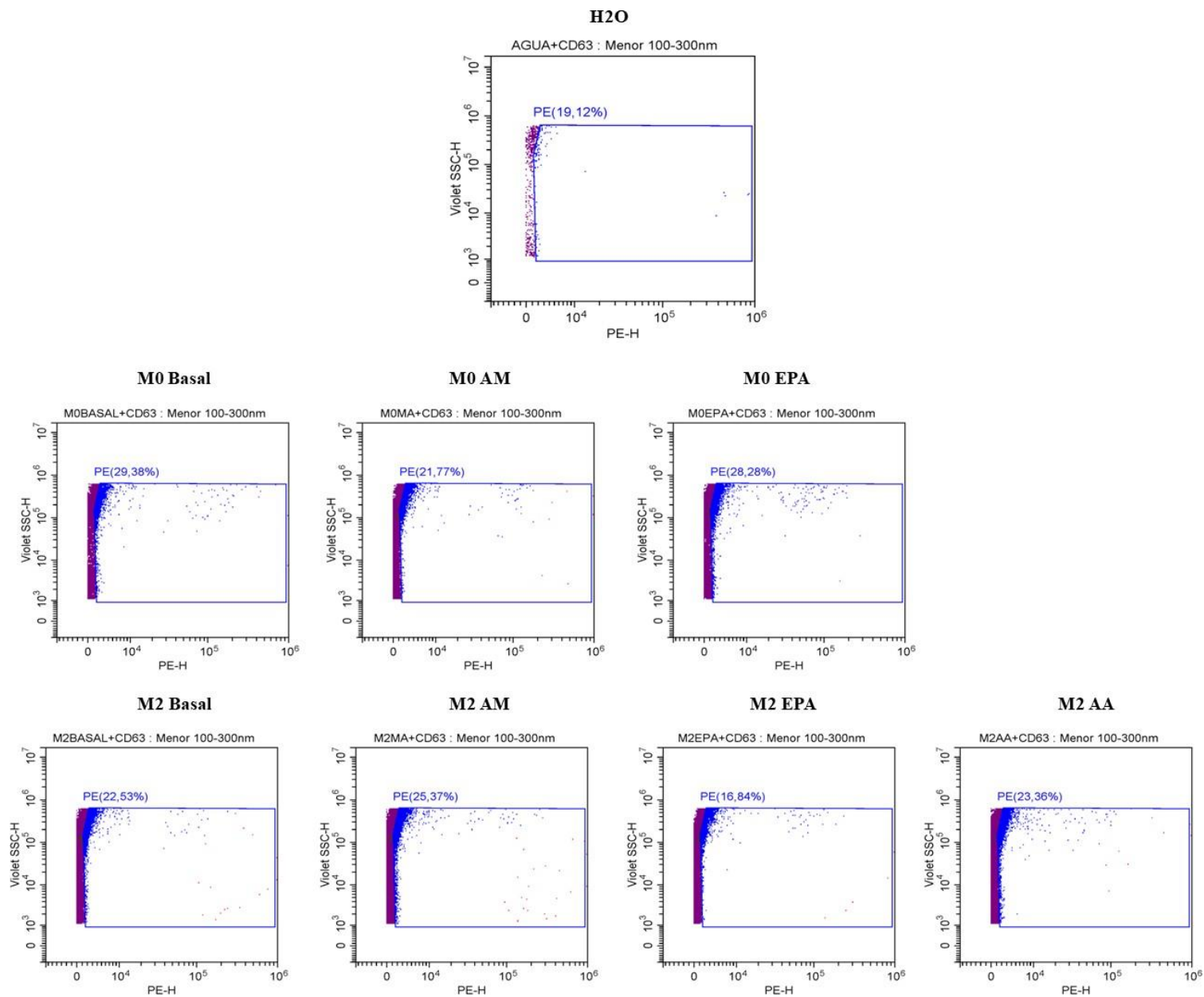


Figura 20. Detecção de marcador CD63 em vesículas extracelulares basais e enriquecidas de macrófagos M0 e M2 por nanocitometria de fluxo. VEs marcadas com anticorpo anti-CD63 conjugados com fluorescência PE-H. Concentração de VEs utilizadas em 10^7 partículas/mL. H₂O ultrapura foi utilizada como controle negativo para obtenção das gates de análise.

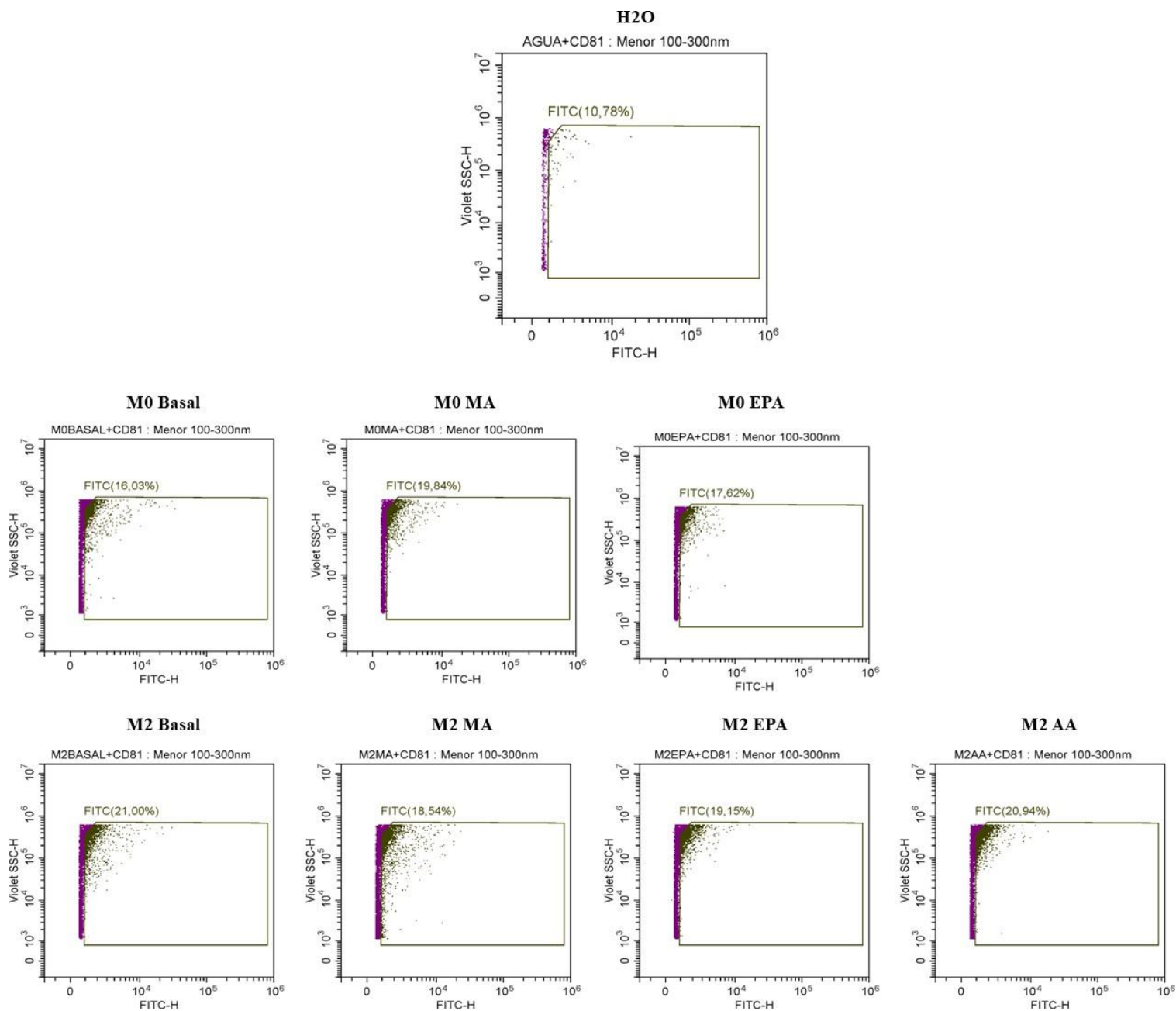


Figura 21. Detecção de marcador CD81 em vesículas extracelulares basais e enriquecidas de macrófagos M0 e M2 por nanocitometria de fluxo. VEs marcadas com anticorpo anti-CD81 e conjugadas com fluorescência FITC-H. Concentração de VEs utilizadas em 10^7 partículas/mL. H₂O ultrapura foi utilizada como controle negativo para obtenção das gates de análise.

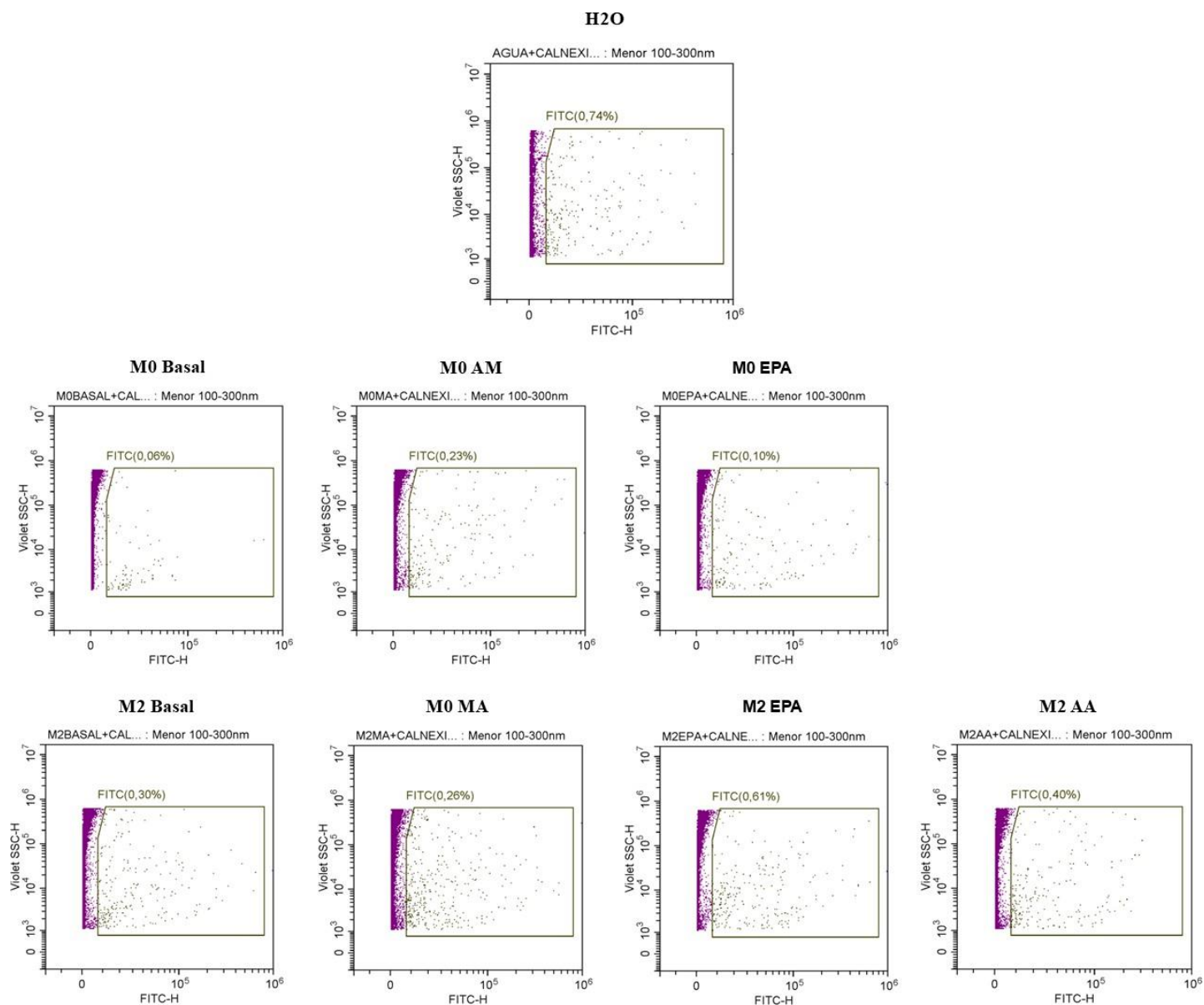


Figura 22. Detecção de marcador Calnexina em vesículas extracelulares basais e enriquecidas de macrófagos M0 e M2 por nanocitometria de fluxo. VEs marcadas com anticorpo anti-calnexina e conjugadas com fluorescência FITC-H. Concentração de VEs utilizadas em 10^7 partículas/mL. H₂O ultrapura foi utilizada como controle negativo para obtenção das gates de análise.

5.6. Atividade metabólica de macrófagos pré-incubadas com VEs enriquecidas com ácidos graxos e estimulados com partículas virais de SARS-CoV-2

Após a caracterização das VEs derivadas de macrófagos, produzidas sob diferentes protocolos de enriquecimento lipídico, avaliamos seu potencial *in vitro*. Para isso, utilizamos as VEs em um tratamento profilático de macrófagos submetidos a estímulos inflamatórios induzidos por partícula viral inativada de SARS-CoV-2 ou por lipopolissacarídeo (LPS), utilizado como controle positivo. A seguir, investigamos a ativação metabólica dessas células em tratamento com VEs enriquecidas com AGs. Os resultados dessas análises estão apresentados nas Figuras 23, 24 e 25.

Em condições basais dos macrófagos (M0), observamos que comparado ao controle (DMEM 0% SFB), o tratamento das células com AGs livres, diretamente adicionados no meio de cultura, aumentou a atividade metabólica ou a viabilidade celular, através do ensaio de conversão do MTT a formazan pelas mitocôndrias, sem estimulação com LPS (Figura 23a). Como também, o tratamento com as VEs derivadas de M0 e M2, sem enriquecimento com AGs, induziu aumento da atividade metabólica dos macrófagos, comparado com as células controles em cultivo em DMEM 0% SBF (Figura 23b). Em relação ao estado metabólico dos macrófagos tratados com VEs derivadas de M0, o tratamento com VEs derivadas de M0 enriquecidos com 14:0 e 20:5 aumentaram significativamente a metabolização do MTT, sendo o tratamento com VEs M0 + 14:0 com maior potencial (Figura 23c). Igualmente, o tratamento com VEs de macrófagos M2 enriquecidos com 14:0, 20:4 e 20:5, também induziram aumento significativo da metabolização do MTT pelas células em cultura comparados com o controle de VEs de M2 basal, sem enriquecimento (Figura 23d).

Nas condições inflamatórias, pós-estimulados com LPS ou SARS-COV-2, tivemos resultados divergentes, em que o pré-tratamento com os AGs livres induziram aumento da atividade celular no pós-estímulo com LPS (Figura 24a), mas diminuição com SARS-CoV-2 (Figura 25a). Neste sentido, o tratamento com VEs derivadas de M0 e M2 em condições basais, também aumentaram a atividade celular no estímulo com LPS (Figura 24b) e diminuíram com SARS-CoV-2 (Figura 25), quando comparados com o controle (DMEM 0% SBF). Entretanto, o pré-tratamento com as VEs derivadas dos macrófagos M0 enriquecidas com 14:0 e 20:5 aumentaram a atividade celular após ambos estímulos inflamatórios, LPS (Figura 24c) e SARS-CoV-2 (Figura 25C), comparados com o controle tratado com VEs de M0 não enriquecida. O mesmo fenômeno foi observado quando os macrófagos foram tratados com VEs derivadas de

M2 enriquecidas com 14:0, 20:4 e 20:5 e pós-estimulados com LPS ou SARS-CoV-2 (Figura 24d e 25d).

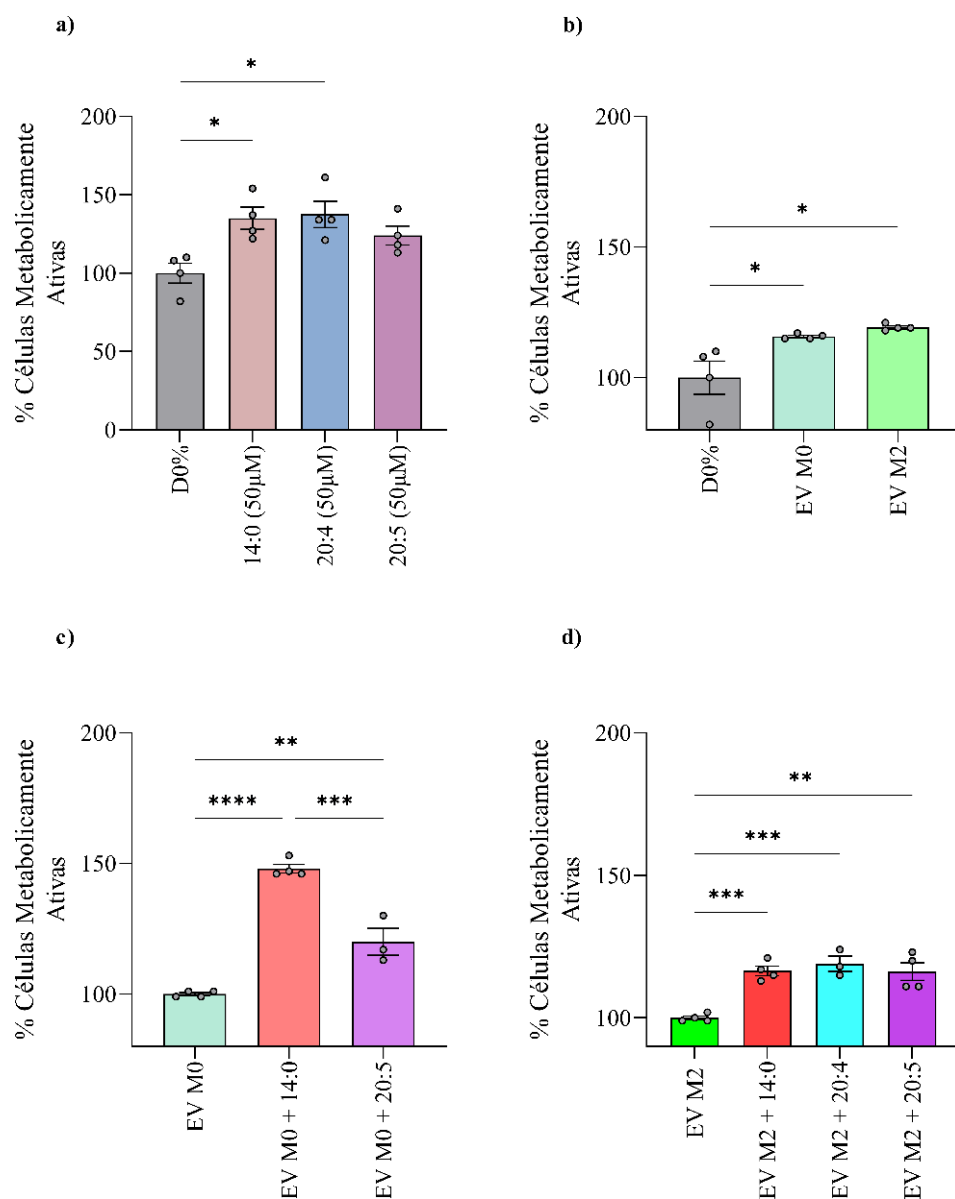


Figura 23. Atividade metabólica de macrófagos M0 submetidos a tratamentos com diferentes AGs ou VEs. Células tratadas com a) AGs livres 14:0, 20:4 e 20:5 (concentração de 50 µM) no meio de cultura DMEM 0% SBF; b) VEs derivadas de macrófagos M0 e M2 em condições basal de cultura; c) VEs de M0 basal ou enriquecidas com AGs 14:0 e 20:5; d) VEs de M2 basal ou enriquecidas com AGs 14:0, 20:4 e 20:5. Experimentos realizados em duplicata com n = 4. Dados expressos em Média ± SEM. Análises estatísticas com One-Way ANOVA, seguido do pós teste de Tukey. Valores considerados significativos p < 0,05.

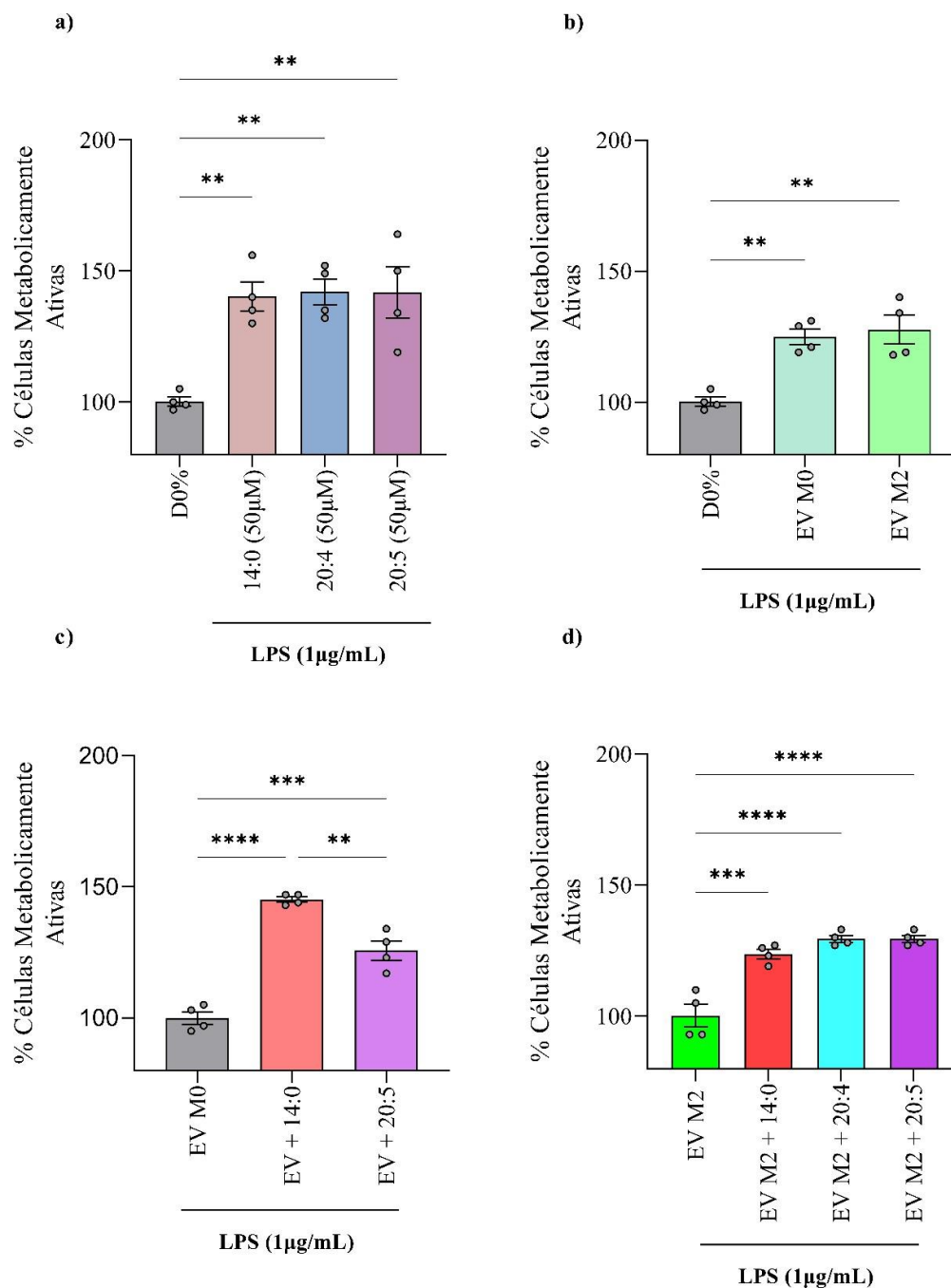


Figura 24. Atividade metabólica de macrófagos M0 submetidos a tratamentos profiláticos com diferentes AGs ou VEs e pós-estimulado com LPS. Células tratadas com a) AGs livres 14:0, 20:4 e 20:5 (concentração de 50 μM) no meio de cultura DMEM 0% SBF; b) VEs derivadas de macrófagos M0 e M2 em condições basal de cultura; c) VEs de M0 basal ou enriquecidas com AGs 14:0 e 20:5; d) VEs de M2 basal ou enriquecidas com AGs 14:0, 20:4 e 20:5. Após os tratamentos, os macrófagos foram estimulados com LPS (1 μg/mL) durante 24 h em estufa à 37°C e 5% CO₂. Experimentos realizados em duplicata com n = 4. Dados expressos em Média ± SEM. Análises estatísticas com One-Way ANOVA, seguido do pós teste de Tukey. Valores considerados significativos p < 0,05.

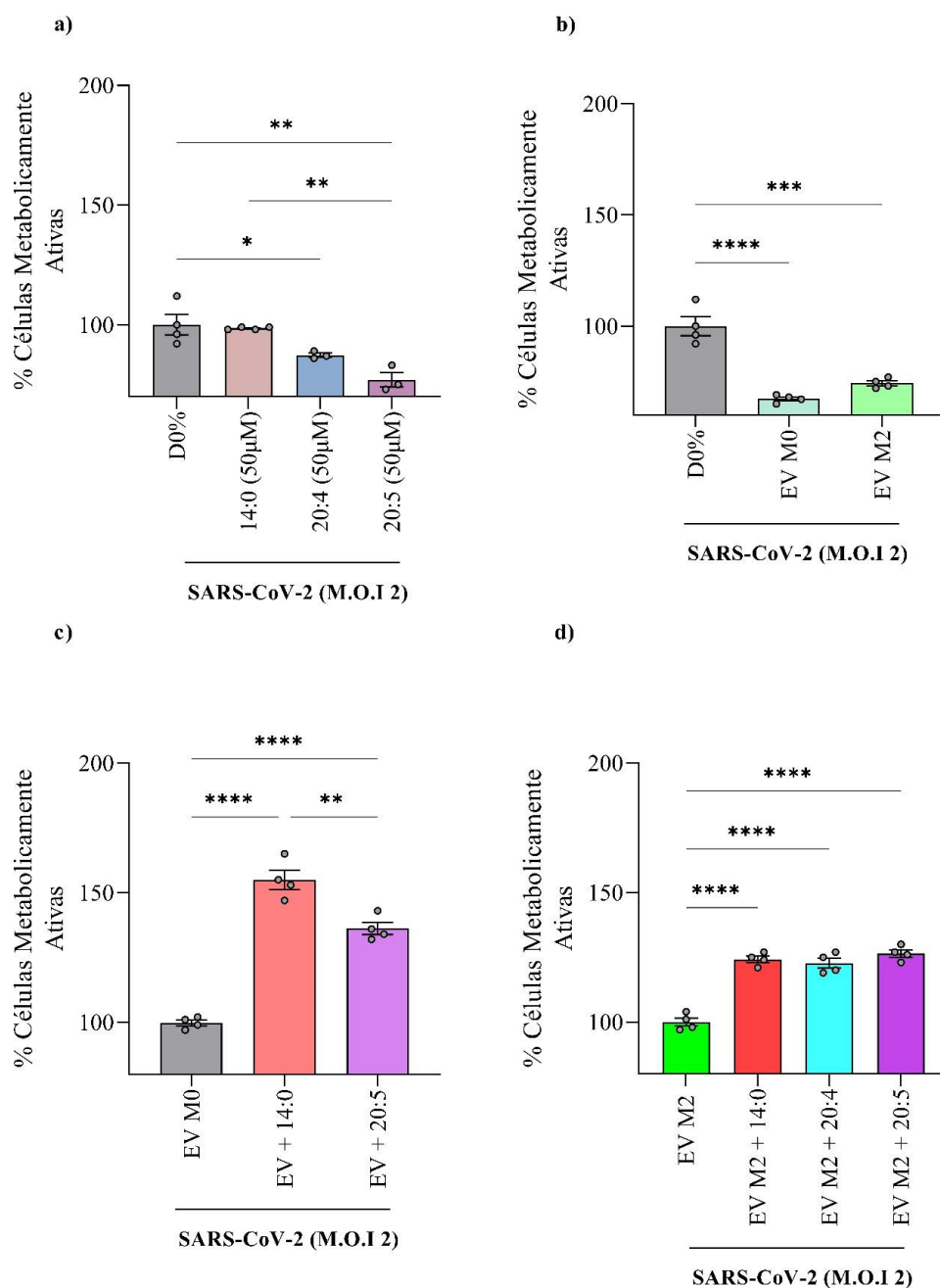


Figura 25. Atividade metabólica de macrófagos M0 submetidos a tratamentos profiláticos com diferentes AGs ou VEs e pós-estimulado com SARS-CoV-2. Células tratadas com a) AGs livres 14:0, 20:4 e 20:5 (concentração de 50 μM) no meio de cultura DMEM 0% SBF; b) VEs derivadas de macrófagos M0 e M2 em condições basal de cultura; c) VEs de M0 basal ou enriquecidas com AGs 14:0 e 20:5; d) VEs de M2 basal ou enriquecidas com AGs 14:0, 20:4 e 20:5. Após os tratamentos, os macrófagos foram estimulados com partícula inativada de SARS-COV-2 (MOI : 2) durante 24 h em estufa à 37°C e 5% CO₂. Experimentos realizados em duplicata com n = 4. Dados expressos em Média ± SEM. Análises estatísticas com One-Way ANOVA, seguido do pós teste de Tukey. Valores considerados significativos p < 0,05.

5.7. Atividade inflamatória de macrófagos profilaticamente tratados com VEs enriquecidas com ácidos graxos e estimulados com partículas virais de SARS-CoV-2

Após avaliar as condições metabólicas e viabilidade celular dos macrófagos em cultura sob os diversos tratamentos, avaliamos o potencial imunomodulador das VEs derivadas de macrófagos em cultura basal ou enriquecido com AGs *in vitro*. Para isso, utilizamos as VEs em um tratamento profilático de macrófagos submetidos a estímulos inflamatórios induzidos por partícula viral inativada de SARS-CoV-2 ou por lipopolissacarídeo (LPS), utilizado como controle positivo. A seguir, investigamos a modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF e IL-6. Os resultados dessas análises estão apresentados nas Figuras 26, 27 e 28.

Na Figura 26, demonstramos o aumento da produção de IL-1 β em culturas de macrófagos M0 estimulados com LPS ou partículas virais inativadas de SARS-CoV-2, comparado com o controle negativo (DMEM). Em relação aos grupos que foram tratados com seus respectivos AGs livres e pós-estimulados, observamos maior produção desta citocina em células pré-incubadas com EPA e estimuladas com LPS. O tratamento profilático com VEs de M0 expostas às partículas virais também apresentou aumento significativo. Além disso, observamos aumento significativo na produção de IL-1 β em macrófagos tratados com VEs enriquecidas com 14:0 e pós-estimulados com LPS e SARS-CoV-2. Nos tratamentos com VEs enriquecidas com 20:5, notamos aumento de IL-1 β na presença de LPS. Entretanto, nos grupos estimulados com LPS e tratados com AGs livre ou VEs de M0 + 20:5, a produção de IL-1 β reduziu significativamente. Por outro lado, os tratamentos com VEs derivadas de macrófagos M2 basais não alteraram a produção desta citocina, mas as VEs M2 enriquecidas com 20:5 e estimuladas com partículas virais inativadas de SARS-CoV-2 mostraram um aumento acentuado na concentração de IL-1 β (Figura 26c).

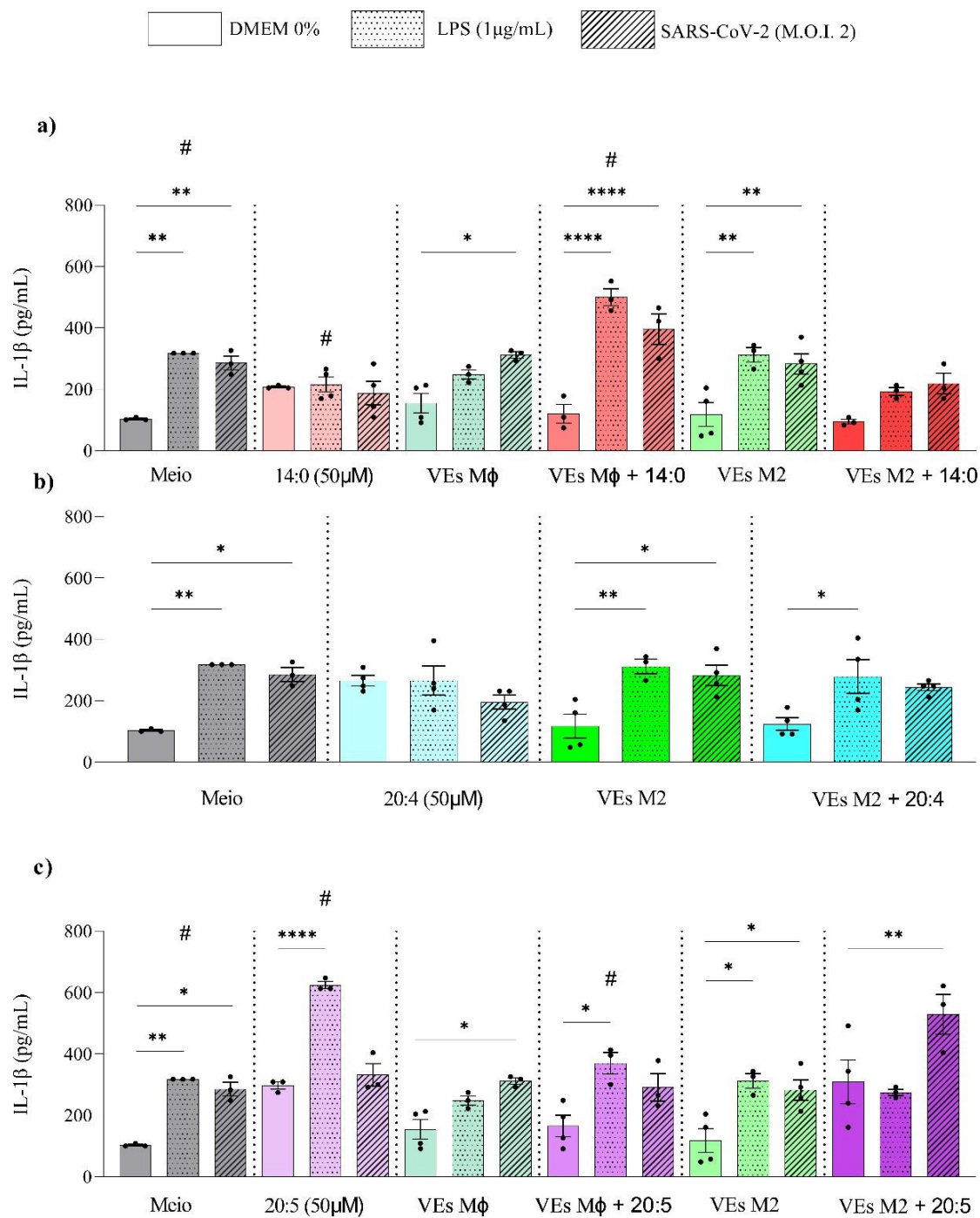


Figura 26. Produção de IL-1β por macrófagos tratados profilaticamente com AGs livres ou VEs e pós-estimulados com LPS ou partículas virais de SARS-CoV-2. Tratamentos das culturas celulares com a) AGs ou VEs derivadas de macrófagos enriquecidos com 14:0 ; b) AGs ou VEs derivadas de macrófagos enriquecidos com 20:4 e c) AGs ou VEs derivadas de macrófagos enriquecidos com 20:5. Dados expressos em Média ± SEM. Análises estatísticas por One-Way ANOVA, seguido do pós teste de Tukey. #Comparação entre o estímulo com LPS em relação aos tratamentos. *Comparação entre os grupos tratados e o controle negativo (DMEM). Valores considerados significativos $p < 0,05$.

Na Figura 27, observamos aumento na produção da citocina TNF em macrófagos estimulados com LPS e partículas virais inativadas de SARS-CoV-2. Os macrófagos tratados com os ácidos graxos 20:4 (AA) e 20:5 (EPA), quando pós-estimulados com LPS, apresentaram redução significativa na produção de TNF (Figura 27b e 27c). O tratamento profilático com VEs derivadas de macrófagos M0 e M2, nas condições basal de cultura celular, também induziu diminuição na concentração de TNF. Em contraste, as VEs de M0 e M2 enriquecidas com AGs exibiram efeito oposto, induzindo aumento da produção e liberação desta citocina após incubação com LPS (Figura 27a, b e c). Interessante, também observamos aumento da produção de TNF quando as células foram tratadas com VEs de M0 e M2 enriquecidas com 20:5 e estimuladas com partículas de SARS-CoV-2.

Em relação à citocina IL-6 (Figura 28), observamos aumento na produção em culturas de macrófagos M0 estimulados com LPS e partículas virais inativadas de SARS-CoV-2. Os macrófagos tratados com os AGs 20:4 (AA) e 20:5 (EPA), quando estimulados com LPS, apresentaram redução nas concentrações de IL-6 (Figura 28b e 28c). De modo semelhante ao observado para IL-1 β e TNF- α , o tratamento com VEs de M0 basais promoveu diminuição na produção de IL-6 (Figura 28a e 28c). No entanto, no tratamento com VEs M0 enriquecidas com 14:0, verificamos aumento da produção de IL-6 quando estimuladas com LPS, enquanto na presença de partículas virais, as concentrações desta citocina foram reduzidas (Figura 28a). Por outro lado, os tratamentos com VEs de M0 enriquecidas com EPA demonstraram capacidade de reduzir os níveis de IL-6 em resposta a ambos os estímulos inflamatórios (Figura 28c). No tratamento com VEs de M2 enriquecidas com 14:0, 20:4 e 20:5, observamos redução na produção de IL-6 em comparação com os controles. O único efeito anti-inflamatório, em potencial, observado na modulação da estimulação com SARS-CoV-2 foi na produção de IL-6, destacando o tratamento com as VEs derivadas do enriquecimento com 20:5, um lipídio da família ômega-3, considerado com efeitos anti-inflamatório.

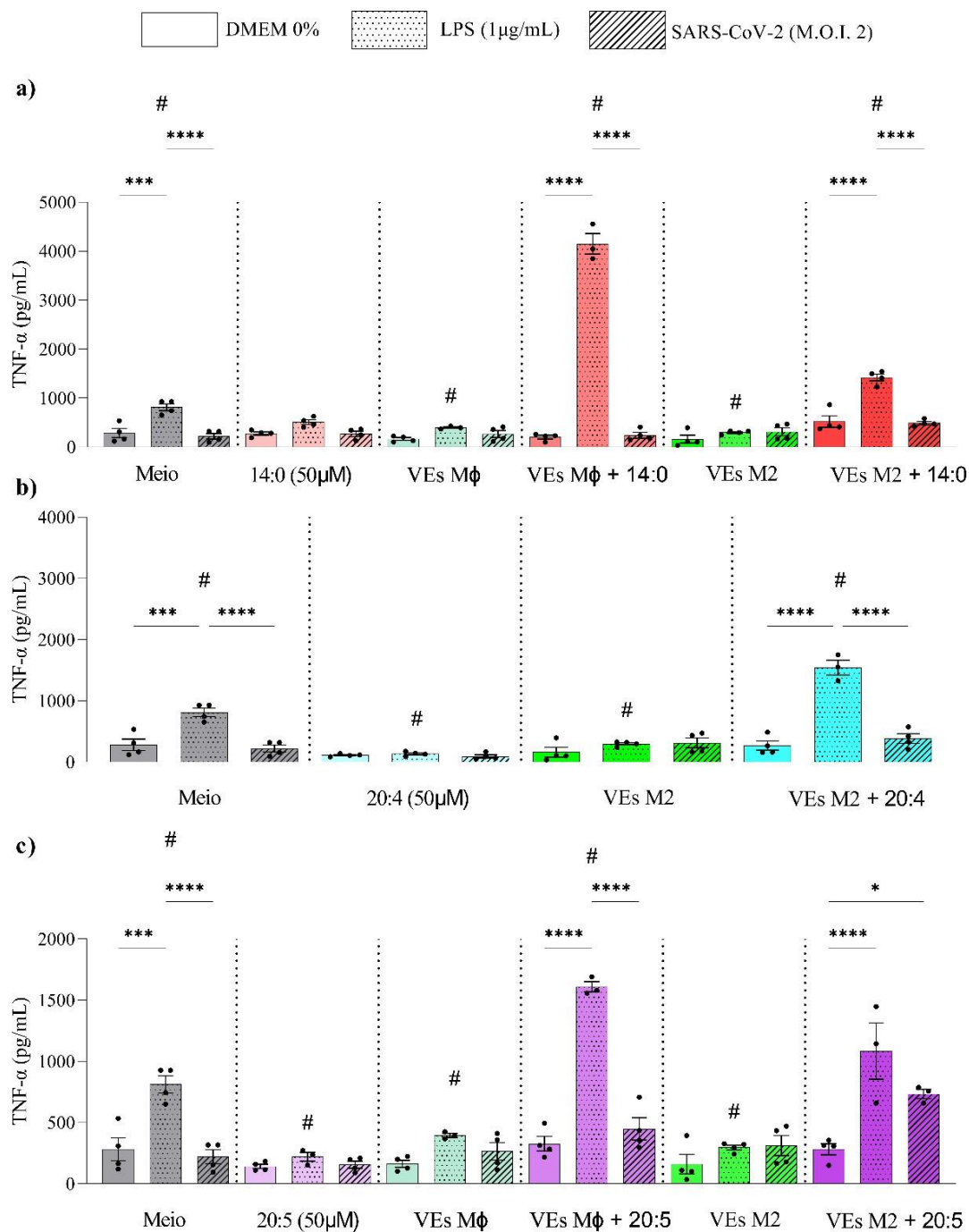


Figura 27. Produção de TNF por macrófagos tratados profilaticamente com AGs livres ou VEs e pós-estimulados com LPS ou partículas virais de SARS-CoV-2. Tratamentos das culturas celulares com a) AGs ou VEs derivadas de macrófagos enriquecidos com 14:0 ; b) AGs ou VEs derivadas de macrófagos enriquecidos com 20:4 e c) AGs ou VEs derivadas de macrófagos enriquecidos com 20:5. Dados expressos em Média $\pm$ SEM. Análises estatísticas por One-Way ANOVA, seguido do pós teste de Tukey. #Comparação entre o estímulo com LPS em relação aos tratamentos. *Comparação entre os grupos tratados e o controle negativo (DMEM). Valores considerados significativos $p < 0,05$.

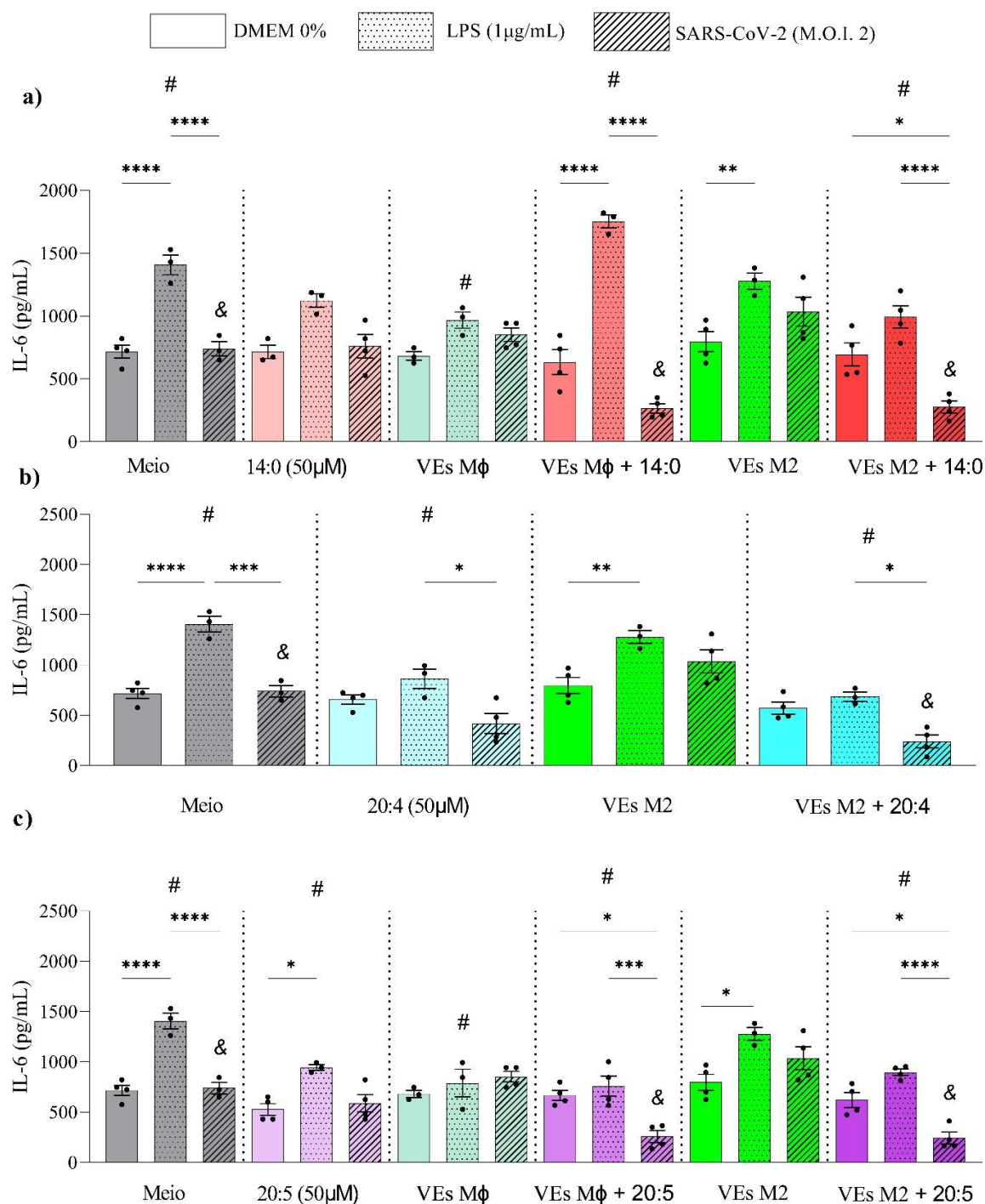


Figura 28. Produção de IL-6 por macrófagos tratados profilaticamente com AGs livres ou VEs e pós-estimulados com LPS ou partículas virais de SARS-CoV-2. Tratamentos das culturas celulares com a) AGs ou VEs derivadas de macrófagos enriquecidos com 14:0 ; b) AGs ou VEs derivadas de macrófagos enriquecidos com 20:4 e c) AGs ou VEs derivadas de macrófagos enriquecidos com 20:5. Dados expressos em Média $\pm$ SEM. Análises estatísticas por One-Way ANOVA, seguido do pós teste de Tukey. #Comparação entre o estímulo com LPS em relação aos tratamentos. *Comparação entre os grupos tratados e o controle negativo (DMEM). Valores considerados significativos $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo consistiu no desenvolvimento *in vitro* de VEs derivadas de macrófagos (M0 e M2) enriquecidos com AGs específicos, investigando seus efeitos de ativação metabólica e de imunomodulação em células receptoras (M0) derivadas da linhagem THP-1, através da pós-estimulação com partículas virais inativadas de SARS-CoV-2 ou LPS. Diante disso, a realização deste estudo abrangeu as seguintes etapas: (I) investigamos se os AGs exógenos foram incorporados aos fosfolipídios de membrana dos macrófagos, promovendo o remodelamento e modificação da composição lipídica; (II) isolamos e caracterizamos as VEs derivadas destes macrófagos, que tiveram as membranas enriquecidas com AGs exógenos; (III) avaliamos o potencial imunomodulador destas VEs enriquecidas no tratamento profilático de células em condições de estimulação inflamatória *in vitro*.

As membranas celulares são estruturas complexas, cujas propriedades biofísicas são fortemente influenciadas pela composição lipídica (HARAYAMA & RIEZMAN, 2018). Os AGs desempenham papel fundamental nessa composição, estando presentes tanto em fosfolipídios de membrana quanto em lipídios neutros (ALI & SZABÓ, 2023). A incorporação de AGs às membranas pode ocorrer por dois mecanismos principais: (i) a via de Kennedy, na qual ocorre a acilação do glicerol-3-fosfato por AGs, resultando na formação de ácido fosfatídico (PA), que posteriormente origina fosfatidiletanolamina (PE) ou fosfatidilcolina (PC); e (ii) o Ciclo de Lands, caracterizado pela remoção de um AGs por fosfolipases, seguida da reacilação com um novo AGs mediada por aciltransferases (GIBELLINI & SMITH, 2010; O'Donnell, 2022).

Nossos resultados demonstraram que as diferentes polarizações de macrófagos (M0, M1 e M2) apresentaram perfis distintos de expressão lipídica quando expostos a diversas classes de AGs exógenos. Dentre esses, o ácido mirístico (14:0), caracterizado por uma cadeia carbônica longa e saturada, destacou-se por promover padrões lipídicos semelhantes, independentemente do estado de polarização dos macrófagos. Além disso, evidenciamos sua capacidade de originar distintas espécies lipídicas com alta abundância, especialmente no contexto da incorporação em fosfolipídios de membrana, como a fosfatidilcolina (PC). Ainda, observamos que o ácido mirístico apresentou maior prevalência de incorporação na posição *sn*-1 dos fosfolipídios. Segundo SHINDOU *et. al.* (2009), a família de enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferases (GPATs) está envolvida na síntese de fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE), bem como na incorporação preferencial de AGs saturados e monoinsaturados na posição *sn*-1. Por

outro lado, as enzimas fosfolipases (PLAs), lisofosfatidilaciltransferases (LPLATs) e lisofosfatidilcolina aciltransferases (LPCATs) são responsáveis pela reacilação de AGs poli-insaturados na posição *sn*-2. Em estudo realizado por JIANG *et. al.* (2018), utilizando macrófagos derivados de medula óssea deficientes para a enzima LPCAT3, demonstraram uma redução significativa de PUFA's em espécies lipídicas de membrana, o que reforça a importância dessa enzima no remodelamento lipídico da membrana plasmática. Podemos inferir que o ácido mirístico pode estar induzindo a Via de Kennedy, no entanto, para confirmar essa hipótese teremos que determinar a expressão gênica das famílias de enzimas GPATs/LPAAT e LPCAT.

O ácido araquidônico (AA; 20:4), um AG de cadeia longa com quatro insaturações da família ômega-6, apresentou capacidade de incorporação na membrana plasmática e de modificação da composição lipídica, sendo essa atividade modulada pela polarização dos macrófagos e pela conjugação com coenzima A (CoA). Os resultados obtidos indicaram que o AA livre promoveu alterações mais pronunciadas no perfil lipídico das membranas dos macrófagos, quando comparado à sua forma conjugada (AA-CoA). Notamos que cada estado de polarização dos macrófagos originou perfis lipídicos distintos, influenciando significativamente a separação entre os grupos experimentais. Além disso, os padrões de expressão das espécies lipídicas variaram de acordo com a polarização. Macrófagos M0 e M2 incorporaram preferencialmente fosfolípidos de membrana, como PC e PE, bem como esfingomielinas (SM). Em contraste, os macrófagos M1 apresentaram acúmulo predominante de lipídios neutros, notoriamente triacilglicéridos (TGs). Adicionalmente, mostramos que o AA foi incorporado majoritariamente na posição *sn*-2 dos fosfolípidos, enquanto nos TGs sua incorporação ocorre preferencialmente nas posições *sn*-2 e *sn*-3. Esses achados reforçam a possível participação de enzimas envolvidas no Ciclo de Lands no remodelamento destas espécies lipídicas, particularmente em resposta à modulação por PUFA's como o AA.

Neste sentido, observamos um contraste marcante no perfil lipídico de macrófagos M0 e M1 tratados com AA conjugado à coenzima A (20:4-CoA). Em macrófagos M1, a baixa expressão de espécies lipídicas contendo o AA na posição *sn*-2 pode estar relacionada ao seu estado de ativação inflamatória. Essa subpopulação é caracterizada por um fenótipo pró-inflamatório, associado à produção de citocinas e eicosanoides (CUI *et al.*, 2022). Os eicosanoides constituem uma classe de mediadores lipídicos derivados do AA, com importante participação em processos inflamatórios. Entre os principais representantes dessa classe estão as prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs) e tromboxanos (TXs) (Calder, 2020). Dessa

forma, inferimos que a baixa abundância de AA esterificado nas membranas de macrófagos M1 pode ser consequência da mobilização desse AG por fosfolipases A₂ (PLA₂), seguida da sua conversão em eicosanoides por meio das vias enzimáticas da ciclooxygenase (COX) ou da lipoxigenase (LOX). Para confirmar essa hipótese, a quantificação de eicosanoides através da espectrometria de massas poderia ser uma possível estratégia.

Em relação ao ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5), os resultados obtidos indicam sua elevada capacidade de modular a composição lipídica de macrófagos, independentemente do estado de polarização celular (M0, M1 ou M2). Esse comportamento sugere que o EPA possui uma ação mais abrangente na remodelação de membrana, não restrita ao fenótipo imunológico do macrófago. Observamos um contraste expressivo nos perfis lipídicos entre os grupos controle e tratados com EPA, especialmente em relação à expressão de espécies de TGs. Em particular, o EPA promoveu um aumento na abundância de TGs contendo múltiplas cadeias graxas de EPA, o que indica sua eficiente incorporação nos lipídios neutros celulares. Esse padrão sugere que, além de sua integração em fosfolipídios de membrana, o EPA pode ser armazenado em forma de reserva energética ou tamponamento metabólico nos TGs, em resposta a um excedente intracelular. A presença de EPA em TGs pode representar uma estratégia celular para controlar sua disponibilidade imediata, já que esse PUFA está diretamente envolvido na biossíntese de resolvinas e outros mediadores lipídicos com propriedades anti-inflamatórias. Além disso, a incorporação eficiente do EPA pode estar associada à ação coordenada de enzimas como acil-CoA sintetases específicas para ácidos graxos poli-insaturados (PUFA-ACS), aciltransferases e enzimas do Ciclo de Lands, favorecendo sua esterificação em lipídios complexos. A manutenção dos níveis elevados de EPA nos compartimentos lipídicos pode influenciar diretamente a fluidez e a organização das membranas, contribuindo para a modulação de respostas inflamatórias, sinalização intracelular e plasticidade funcional dos macrófagos (SHERRATT *et al.*, 2021; ALABDULJADER *et al.*, 2025).

Nossos dados podem indicar também que o EPA pode estimular a síntese de lipídios neutros, sendo nesses, incorporados. KIM *et al.* (2020), usando a linhagem celular hMGEC (células epiteliais meibomiana humana imortalizada), descreveram que EPA induz a expressão de genes relacionados à síntese de lipídios através da sinalização por PPAR γ , levando ao acúmulo de lipídios em gotículas lipídicas e desencadeando autofagia. Para melhor confirmação destes nossos dados, uma estratégia de experimento seria a detecção de gotas lipídicas (LDs - *Lipid droplets*) através de coloração específica e observação por microscopia, por exemplo, utilizando o corante fluorescente BODIPY, caracterizado por marcar especificamente LDs.

A caracterização das VEs obtidas a partir de macrófagos M0 revelou um diâmetro médio variando entre 99 e 117 nm, enquanto as VEs derivadas de macrófagos M2 apresentaram tamanhos entre 110 e 130 nm. Ambas as populações vesiculares foram obtidas em concentrações da ordem de 10^9 partículas/mL. Esses dados indicam uma homogeneidade relativa quanto ao tamanho das vesículas entre os diferentes fenótipos celulares analisados, embora se observem variações sutis associadas ao tipo de polarização. Em comparação, o estudo conduzido por REINICKE et al. (2022) relatou a obtenção de VEs em concentrações mais elevadas, na ordem de 10^{10} partículas/mL, com diâmetros que variaram de 35 a 165 nm. Embora os tamanhos observados estejam parcialmente sobrepostos aos nossos dados, há divergência expressiva quanto à concentração das partículas isoladas. Tal diferença pode ser atribuída, em parte, às distintas metodologias de cultivo celular empregadas. Contudo, a utilização de meio com SBF depletado de VEs, pode impactar o metabolismo e a atividade secretora das células, interferindo potencialmente na biogênese e liberação de VEs. Assim, é plausível que a menor concentração de VEs observada em nossos experimentos reflita uma condição fisiológica diferente da realidade, favorecendo um microambiente mais estável, que exige maior controle na interpretação dos dados.

As VEs derivadas de macrófagos M0 e M2, enriquecidas com ácidos graxos (14:0 e 20:5; 14:0 e 20:4), apresentaram valores de potencial zeta mais negativos em comparação ao grupo controle. Esses dados sugerem que tais VEs possuem, em suas membranas externas, uma maior quantidade de moléculas com carga negativa, conforme descrito por SATHAPPA & ALDER (2016). As diferenças observadas entre os grupos indicam que a composição lipídica, modulada pela incorporação de AGs exógenos, influenciaram diretamente nas propriedades eletrostáticas das membranas vesiculares. Adicionalmente, a carga superficial elevada pode impactar o comportamento físico-químico das vesículas. Estruturas com potencial zeta altamente negativo tendem a se repelir devido à repulsão eletrostática, promovendo maior estabilidade coloidal. Por outro lado, valores mais próximos da neutralidade favorecem a fusão vesicular, o que pode ter implicações funcionais relevantes, como na entrega de conteúdo intracelular ou na interação com membranas celulares (MIDEKESSA et al., 2020). Com base nesses achados, é plausível inferir que os AGs utilizados no enriquecimento das VEs estão contribuindo para a modulação de sua carga superficial. A confirmação dessa hipótese poderá ser obtida por meio das análises de lipidômica que estão em andamento. A identificação de fosfolipídios com grupos funcionais carregados negativamente, como fosfatidilserinas ou fosfatidilgliceróis, poderá esclarecer os mecanismos subjacentes às alterações no potencial zeta

observadas.

De modo geral, as VEs produzidas e analisadas expressaram os marcadores ALIX, CD9, CD63 e CD81, os quais confirmam a presença de tetraspaninas, que são proteínas de membrana comumente associadas a exossomos e microvesículas, estando estas presentes em alta abundância nesses tipos de vesículas (ANDREU & YÁÑEZ-MÓ, 2014). O marcador ALIX, por sua vez, está relacionado à maquinaria ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), desempenhando papel fundamental na biogênese de exossomos e no tráfego intracelular de proteínas (JANKOVIČOVÁ et al., 2020). Adicionalmente, demonstramos baixa expressão de calnexina nas amostras analisadas. A calnexina é uma proteína residente do retículo endoplasmático e, por isso, sua ausência ou baixa detecção em preparações de VEs indica um baixo nível de contaminação por fragmentos celulares ou organelas internas, reforçando a qualidade do protocolo de isolamento empregado (PASKEVICIUS et al., 2023).

Os resultados da avaliação da atividade metabólica e viabilidade celular, realizada pelo ensaio MTT, demonstraram que, em condições basais, tanto os tratamentos com AGs-livres ou quanto as VEs derivadas de macrófagos, obtidas tanto nas condições basais quanto enriquecidas de AGs, promoveram aumento significativo na atividade mitocondrial dos macrófagos receptores. No protocolo com pós-estimulação com LPS, todos os tratamentos resultaram em incremento na atividade celular. Em contraste, a exposição a partículas virais inativadas de SARS-CoV-2, na presença de AGs e VEs derivadas de macrófagos M0 e M2, foi associada à redução da viabilidade celular. Entretanto, as VEs enriquecidas, provenientes de ambos os fenótipos celulares, mantiveram elevada atividade mitocondrial, sugerindo um potencial efeito modulador dessas nanoestruturas sobre a função mitocondrial mesmo em condições de estresse viral.

As VEs derivadas de macrófagos têm sido descritas como potenciais alvos terapêuticos em contextos inflamatórios (TANG et al., 2022). Nossos resultados demonstraram que as VEs basais derivadas de macrófagos M0 e M2 são capazes de reduzir a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-6 em macrófagos estimulados com LPS. Por outro lado, as VEs enriquecidas apresentaram um comportamento ambíguo na modulação da resposta inflamatória. Observamos que as VEs de M0 enriquecidas com ácido mirístico (14:0) e as VEs de M2 com 14:0 induziram maior produção das citocinas pró-inflamatórias na presença de LPS. Em contrapartida, as VEs de M2 enriquecidas com ácido araquidônico (20:4) reduziram a produção de TNF na estimulação com partículas virais, mas promoveram aumento dessa citocina sob estímulo com LPS. Essas mesmas VEs foram capazes de reduzir as quantidades de

IL-6 em ambos os estímulos. Adicionalmente, as VEs de M0 com enriquecimento de 20:5 e M2 com 20:5 (ácido eicosapentaenoico – EPA) demonstraram capacidade de diminuir as quantidades das citocinas IL-1 β e IL-6. No entanto, o tratamento isolado com EPA resultou em aumento significativo das concentrações de IL-1 β . Curiosamente, observamos um efeito oposto para TNF, cuja produção e liberação foram elevadas nas condições em que os tratamentos com VEs estavam enriquecidas com EPA.

Os AGs saturados são descritos como estimuladores da produção de mediadores inflamatórios, atuando como moléculas agonistas dos receptores *Toll-like* 4 (TLR4) (DAVANSO et al., 2020). Essa interação promove a ativação de vias inflamatórias, como a via NF- κ B, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (ROCHA et al., 2016). O estudo de GARCIA-MARTÍNEZ et al. (2023) evidenciou que VEs enriquecidas com AG-saturados, ao serem internalizadas por macrófagos via endossomal, induziram a expressão de fatores de transcrição relacionados à produção de citocinas pró-inflamatórias. A partir desses dados, é possível inferir que tal mecanismo possa corroborar com nossos achados. De forma semelhante aos nossos resultados, MULLEN, LOSCHER E ROCHE (2010), utilizando a linhagem celular THP-1, relataram a atividade anti-inflamatória do EPA, que promoveu a redução da expressão gênica e da liberação de TNF, IL-6 e IL-1 β . Em consonância, XIE et al. (2024), ao induzirem aterosclerose em camundongos C57BL/6J e tratarem esses animais com VEs derivadas de macrófagos RAW 264.7 polarizados para M2, observaram que as concentrações de IL-6 não sofreram modificações após o tratamento. Esses resultados também corroboram com nossos achados referentes às VEs de M2 no estado basal de cultura celular.

Por fim, alguns experimentos adicionais se mostram fundamentais para aprofundar a compreensão dos mecanismos pelos quais as VEs enriquecidas impactam a fisiologia dos macrófagos. Primeiramente, seria importante investigar os receptores envolvidos na captação de AGs exógenos pelas diferentes polarizações de macrófagos (M0, M1 e M2), com ênfase no receptor CD36, conhecido por sua função no transporte e internalização de lipídios. Essa análise permitirá esclarecer diferenças na capacidade de captação e resposta celular entre os perfis funcionais. Em segundo lugar, a avaliação da produção de eicosanoides por macrófagos tratados com as VEs enriquecidas será essencial para entender o impacto desses lipídios na modulação da resposta inflamatória e na sinalização celular. A quantificação e perfil desses mediadores lipídicos fornecerá evidências sobre como as VEs influenciam processos bioquímicos relacionados à inflamação e à resolução. Por fim, a análise do perfil lipídico de VEs enriquecidas pode revelar se essas vesículas promovem remodelamento da membrana

plasmática, possivelmente por meio da fusão membranar. Esse fenômeno poderia alterar a composição e fluidez da membrana, afetando funções celulares como sinalização, fagocitose e comunicação intercelular. A implementação dessas abordagens experimentais contribuirá significativamente para elucidar os mecanismos moleculares e celulares subjacentes à ação das VEs enriquecidas, ampliando o conhecimento sobre o potencial de sua aplicação terapêutica em doenças inflamatórias. Dessa forma, este estudo abriu novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias baseadas em bioengenharia lipídica de VEs, promovendo avanços na compreensão da modulação da resposta imune e no tratamento de patologias associadas.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que a exposição de macrófagos THP-1 a diferentes AGs exógenos promove alterações significativas nos perfis lipídicos celulares, os quais variam de acordo com o estado de polarização dos macrófagos (M0, M1 e M2). Essas modificações refletem a plasticidade metabólica dos macrófagos diante de estímulos lipídicos e destacam a relevância da composição lipídica na regulação funcional dessas células do sistema imune inato. Adicionalmente, demonstramos que as VEs derivadas de macrófagos enriquecidos com diferentes AGs apresentam propriedades biofísicas distintas em comparação às vesículas basais. Essas alterações se refletem, por exemplo, no potencial zeta, indicando modificação na carga superficial, possivelmente relacionada à incorporação de fosfolipídios com grupos funcionais negativamente carregados. Apesar dessas modificações biofísicas, observamos que os AGs exógenos não promoveram alterações expressivas nos aspectos estruturais das vesículas, tais como tamanho médio e concentração de partículas, mantendo, portanto, características físicas compatíveis com o perfil de VEs descrito na literatura. Do ponto de vista funcional, as VEs enriquecidas demonstraram capacidade de modular a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, de forma dependente do tipo de AG incorporado e do estímulo inflamatório aplicado (LPS ou partículas virais inativadas de SARS-CoV-2). Tal modulação incluiu tanto efeitos anti-inflamatórios, como observados com o EPA, quanto efeitos pró-inflamatórios, associados ao ácido mirístico. Assim, este estudo reforça a relevância das VEs como potenciais moduladores da resposta imune, destacando que a sua composição lipídica pode ser estrategicamente manipulada para fins terapêuticos.

8. EQUIPE DO PROJETO

Nome	Instituição	Formação Acadêmica	Função
Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP)	Químico	Orientador
Andrews Oliveira Borges	Universidade Federal do Amazonas	Biólogo	Mestrando
Dra. Adriana Vilela	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP (FFCLRP-USP)	Química	Pós-doutorado (Colaboradora)
Jonatan Constança Silva Carvalho	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP	Farmacêutico	Doutorando (Colaborador)
Pedro Viera da Silva Neto	Universidade de São Paulo	Biomédico	Pós-doutorado (Colaborador)
Pedro Nobre Azevedo	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP	Químico	Doutorando (Colaborador)
Miguel Rocha	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP	Químico	Mestrando (Colaborador)
Kamilla Marques Della Vecchia	Faculdade de Filosofia, Ciência e Letras de Ribeirão Preto - USP	Química	Iniciação Científica (Colaboradora)
Prof. Dr. Fausto Bruno dos Reis Almeida	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (FMRP)	Biólogo	Pesquisador Colaborador
Bianca Teixeira Morais de Oliveira	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (FMRP)	Biotecnologia	Mestranda (Colaboradora)
Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (FMRP)	Médico	Pesquisador Colaborador
Dr. Ronaldo Bragança Martins Júnior	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP (FMRP)	Farmacêutico e Bioquímico	Pesquisador Colaborador
Prof. Dr. Pietro Ciancaglini	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP (FFCLRP-USP)	Químico	Pesquisador Colaborador
Profa. Dra. Ana Paula Ramos	Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP (FFCLRP-USP)	Química	Pesquisadora Colaboradora

Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP)	Biólogo	Pesquisador Colaborador
Maria Alice de Almeida	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP)	Médica Veterinária	Doutoranda (Colaboradora)

9. REFERÊNCIAS

- ALABDULJADDER, H. et al. Eicosapentaenoic Acid (EPA) alleviates LPS-induced oxidative stress via the PPAR α -NF- κ B Axis. **Oxidative medicine and Cellular Longevity**, v. 2025, n. 1, jan. 2025.
- ALI, O.; SZABÓ, A. Review of eukaryote cellular membrane lipid composition, with special attention to the fatty acids. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 21, 2023.
- AL HAJJAR, Sami; MEMISH, Ziad A.; MCINTOSH, Kenneth. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): A Perpetual Challenge. **Annals of Saudi Medicine**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 427–436, 2013. Disponível em:
- ARMSTRONG, J. P. K.; HOLME, M. N.; STEVENS, M. M. Re-engineering extracellular vesicles as smart nanoscale therapeutics. **ACS nano**, v. 11, n. 1, p. 69–83, 2017.
- ANDREU, Z.; YÁÑEZ-MÓ, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 442, 2014.
- ARYA, Rimanshee *et al.* Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. **Journal of Molecular Biology**, [s. l.], v. 433, n. 2, p. 166725, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0273044>.
- BANERJEE, Arinjay *et al.* Isolation, Sequence, Infectivity, and Replication Kinetics of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 26, n. 9, p. 2054–2063, 2020. Disponível em: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/9/20-1495_article.htm.
- BARHOUMI, Tlili et al. SARS-CoV-2 Coronavirus Spike Protein-Induced Apoptosis, Inflammatory, and Oxidative Stress Responses in THP-1-Like-Macrophages: Potential Role of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor (Perindopril). **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. September, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.728896/full>.
- BAYATI, Armin *et al.* SARS-CoV-2 infects cells after viral entry via clathrin-mediated endocytosis. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 296, p. 100306, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100306>.
- BERNARDEAU-SERRA, L. et al. The COVID-19 vaccination strategy in Brazil-A case

study. **Epidemiologia (Basel, Switzerland)**, v. 2, n. 3, p. 338–359, 2021.

BHARDWAJ, A. et al. COVID-19: Immunology, immunopathogenesis and potential therapies. **International reviews of immunology**, v. 41, n. 2, p. 171–206, 2022.

BOILARD, Eric. Thematic Review Series: Exosomes and Microvesicles: Lipids as Key Components of their Biogenesis and Functions Extracellular vesicles and their content in bioactive lipid mediators: more than a sack of microRNA. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 59, n. 11, p. 2037–2046, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520309056>.

BURGELMAN, Marlies; VANDENDRIESSCHE, Charysse; VANDENBROUCKE, Roosmarijn E. Extracellular Vesicles: A Double-Edged Sword in Sepsis. **Pharmaceuticals**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 829, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/8/829>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde e Ambiente (SVSA). Coronavírus Brasil. 2024. Disponível em: <https://covid.saude.gov.br>

BUZAS, E. I. The roles of extracellular vesicles in the immune system. **Nature reviews. Immunology**, v. 23, n. 4, p. 236–250, 2023.

CALDER, P. C. Eicosanoids. **Essays in biochemistry**, v. 64, n. 3, p. 423–441, 2020.

CARABELLI, Alessandro M. *et al.* SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 162–177, 2023.

CHEN, Nanshan *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10223, p. 507–513, 2020. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7).

CHENG, Lesley; HILL, Andrew F. Therapeutically harnessing extracellular vesicles. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 379–399, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41573-022-00410-w>.

CORMAN, Victor M *et al.* Hosts and Sources of Endemic Human Coronaviruses. In: [S. l.: s. n.], 2018. p. 163–188. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352718300010>.

CRENSHAW, Brennetta J. *et al.* Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. **The Open Virology Journal**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 134–148, 2018.

CUI, Jing *et al.* Eicosanoid production by macrophages during inflammation depends on the M1/M2 phenotype. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, [s. l.], v. 160, n. September 2021, p. 106635, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2022.106635>.

DALLAVALASA, Siva *et al.* The Role of Tumor Associated Macrophages (TAMs) in Cancer Progression, Chemoresistance, Angiogenesis and Metastasis - Current Status. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 28, n. 39, p. 8203–8236, 2021. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/194938/article>.

DAR, G. H. et al. GAPDH controls extracellular vesicle biogenesis and enhances the therapeutic potential of EV mediated siRNA delivery to the brain. *Nature communications*, v. 12, n. 1, p. 6666, 2021.

DAVANZO, M. R. et al. Impact of dietary fatty acids on macrophage lipid metabolism, signaling and function. **Immunometabolism (Cobham (Surrey, England))**, v. 2, n. 1, p. e200008, 2020.

DEMOPOULOS, C. A.; PINCKARD, R. N.; HANAHAN, D. J. Platelet-activating factor. Evidence for 1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 254, n. 19, p. 9355–9358, 1979. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83523-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83523-8).

DIAMOND, Michael S.; KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Innate immunity: the first line of defense against SARS-CoV-2. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 165–176, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41590-021-01091-0>.

DINI, L. et al. Microvesicles and exosomes in metabolic diseases and inflammation. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 51, n. January, p. 27–39, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.12.008>.

DUCHEZ, Anne-Claire et al. Platelet microparticles are internalized in neutrophils via the concerted activity of 12-lipoxygenase and secreted phospholipase A 2 -IIA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 27, p. E3564–E3573, 2015. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1507905112>.

DU TOIT, Andrea. Outbreak of a novel coronavirus. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 123–123, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-020-0332-0>.

EL ANDALOUSSI, Samir *et al.* Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 347–357, 2013.

ESCOLA, J. M. et al. Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *The journal of biological chemistry*, v. 273, n. 32, p. 20121–20127, 1998.

ESCRIBÁ, Pablo V. et al. Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and

structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. **Progress in Lipid Research**, [s. l.], v. 59, p. 38–53, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163782715000247>.

ESSER, Julia et al. Exosomes from human macrophages and dendritic cells contain enzymes for leukotriene biosynthesis and promote granulocyte migration. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 126, n. 5, 2010.

FRASER, Bryan J. *et al.* Structure and activity of human TMPRSS2 protease implicated in SARS-CoV-2 activation. **Nature Chemical Biology**, [s. l.], v. 18, n. 9, p. 963–971, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41589-022-01059-7>.

FILHO, F. F.; D'ÁVILA, K. G.; SILVA, D. R. Effect of vaccination on COVID-19 hospitalizations and mortality. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisilogia**, v. 49, n. 4, p. e20230254, 2023.

FINKELSTEIN, Joshua et al. Lipids in health and disease. **Nature**, [s. l.], v. 510, n. 7503, p. 47–47, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/510047a>.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. **Science**, [s. l.], v. 294, n. 5548, p. 1871–1875, 2001.

GARCIA-MARTINEZ, I. et al. Saturated fatty acid-enriched small extracellular vesicles mediate a crosstalk inducing liver inflammation and hepatocyte insulin resistance. **JHEP reports: innovation in hepatology**, v. 5, n. 8, p. 100756, 2023.

GASTEIGER, Georg *et al.* Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. **Journal of Innate Immunity**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 111–125, 2017. Disponível em: <https://karger.com/doi/10.1159/000453397>.

GHADAMI, S.; DELLINGER, K. The lipid composition of extracellular vesicles: applications in diagnostics and therapeutic delivery. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 10, p. 1198044, 2023.

GIBELLINI, F.; SMITH, T. K. The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. **IUBMB life**, v. 62, n. 6, p. 414–428, 2010.

GORBALENYA, Alexander E. *et al.* The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z>.

GUAN, Wei-jie *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 2020. Disponível em:

<http://www.nature.com/articles/35103577>.

HAN, Huan *et al.* Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors. **Emerging Microbes & Infections**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1123–1130, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1770129>.

HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 19, n. 5, p. 281–296, 2018.

HASANVAND, Amin. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. **Inflammopharmacology**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 789–798, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10787-022-00992-2>.

HASSANPOUR, Mehdi *et al.* The role of extracellular vesicles in COVID-19 virus infection. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 85, n. January, p. 104422, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134820302537>.

HUNG, Hao-Chang *et al.* Dietary fatty acids differentially affect secretion of pro-inflammatory cytokines in human THP-1 monocytes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 5511, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32710-5>.

JIANG, H. et al. Macrophage lysophosphatidylcholine acyltransferase 3 deficiency-mediated inflammation is not sufficient to induce atherosclerosis in a mouse model. **Frontiers in cardiovascular medicine**, v. 5, p. 192, 2018.

JACKSON, Cody B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 3–20, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41580-021-00418-x>.

JANKOVIČOVÁ, J. et al. Tetraspanins, more than markers of extracellular vesicles in reproduction. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 20, p. 7568, 2020.

KANNEGANTI, Thirumala-Devi. Intracellular innate immune receptors: Life inside the cell. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 297, n. 1, p. 5–12, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.12912>.

KHANAPURE, S. P. et al. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 7, n. 3, p. 311–340, 2007.

KAWAMURA, Yumi *et al.* Extracellular vesicles as trans-genomic agents: Emerging roles in disease and evolution. **Cancer Science**, [s. l.], v. 108, n. 5, p. 824–830, 2017.

KENI, Raghuvir *et al.* COVID-19: Emergence, Spread, Possible Treatments, and Global Burden.

Frontiers in Public Health, [s. l.], v. 8, n. May, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpubh.2020.00216/full>.

KHALIL, Bariaa A.; ELEMAM, Noha Mousaad; MAGHAZACHI, Azzam A. Chemokines and chemokine receptors during COVID-19 infection. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 976–988, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037021000386>.

KIM, S. W. et al. Eicosapentaenoic acid (EPA) activates PPAR γ signaling leading to cell cycle exit, lipid accumulation, and autophagy in human meibomian gland epithelial cells (hMGEC). **The ocular surface**, v. 18, n. 3, p. 427–437, 2020.

KRYLOVA, Sofia V.; FENG, Daorong. The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 1337, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/2/1337>.

LAMERS, Mart M.; HAAGMANS, Bart L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 270–284, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41579-022-00713-0>.

LEDUC, James W.; BARRY, M. Anita. SARS, the First Pandemic of the 21st Century¹. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. e26–e26, 2004. Disponível em: www.catolicaonline.com.br/revistadacatolica.

LI, Danyang; WU, Minghua. Pattern recognition receptors in health and diseases. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 291, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0>.

LUNDBERG, Vanja *et al.* Thymic exosomes promote the final maturation of thymocytes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. March, p. 1–12, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep36479>.

LU, Roujian *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).

MACHHI, Jatin *et al.* A Role for Extracellular Vesicles in SARS-CoV-2 Therapeutics and Prevention. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 270–288, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11481-020-09981-0>.

MAHMUDPOUR, Mehdi *et al.* COVID-19 cytokine storm: The anger of inflammation. **Cytokine**, [s. l.], v. 133, n. January, p. 155151, 2020. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466620301678>.

MAISON, David P.; DENG, Youping; GERSCHENSON, Mariana. SARS-CoV-2 and the host-immune response. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 14, n. June, p. 1–9, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1195871/full>.

MARSHALL, Jean S. *et al.* An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, [s. l.], v. 14, n. S2, p. 49, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>.

MARSHALL, Jean S. *et al.* An introduction to immunology and immunopathology. **Allergy, Asthma & Clinical Immunology**, [s. l.], v. 14, n. S2, p. 49, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13223-018-0278-1>.

MARTINS, Yuri Chaves; RIBEIRO-GOMES, Flávia Lima; DANIEL-RIBEIRO, Cláudio Tadeu. A short history of innate immunity. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 118, 2023.

MANTOVANI, Alberto *et al.* Macrophages as tools and targets in cancer therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 799–820, 2022.

MATYASH, Vitali *et al.* Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 1137–1146, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S00222752042601X>.

MIDEKESSA, Getnet *et al.* Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. **ACS Omega**, [s. l.], v. 5, n. 27, p. 16701–16710, 2020. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.0c01582>.

MONTAZERSAHEB, Soheila *et al.* COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. **Virology Journal**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 92, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01814-1>.

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

MULLEN, A.; LOSCHER, C. E.; ROCHE, H. M. Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 21, n. 5, p. 444–450, 2010.

MURALIDAR, Shibi *et al.* The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. **Biochimie**, [s. l.], v. 179, n. January, p. 85–100, 2020. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908420302248>.

NARUMIYA, Shuh; SUGIMOTO, Yukihiro; USHIKUBI, Fumitaka. Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 79, n. 4, p. 1193–1226, 1999.

NISHIURA, Hiroshi *et al.* The Extent of Transmission of Novel Coronavirus in Wuhan, China, 2020. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 330, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/2/330>.

O'DONNELL, V. B. New appreciation for an old pathway: the Lands Cycle moves into new arenas in health and disease. **Biochemical Society transactions**, v. 50, n. 1, p. 1–11, 2022.

OPPEDISANO, F. *et al.* The anti-inflammatory and antioxidant properties of n-3 PUFAs: Their role in cardiovascular protection. **Biomedicines**, v. 8, n. 9, p. 306, 2020.

PAN, Yueyun *et al.* Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, n. December, 2020.

PASKEVICIUS, T. *et al.* Calnexin, more than just a molecular chaperone. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 3, p. 403, 2023.

PATEL, Rikin *et al.* A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 417–426, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276502005993>.

PATTERS, Benjamin J.; KUMAR, Santosh. The role of exosomal transport of viral agents in persistent HIV pathogenesis. **Retrovirology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0462-x>.

PHAN, Hong-Dien *et al.* CD24 and IgM Stimulation of B Cells Triggers Transfer of Functional B Cell Receptor to B Cell Recipients Via Extracellular Vesicles. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 207, n. 12, p. 3004–3015, 2021. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/207/12/3004/234566/CD24-and-IgM-Stimulation-of-B-Cells-Triggers>.

PÉREZ, Malena M. *et al.* Acetylcholine, Fatty Acids, and Lipid Mediators Are Linked to COVID-19 Severity. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 209, n. 2, p. 250–261, 2022. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/209/2/250/234139/Acetylcholine-Fatty-Acids-and-Lipid-Mediators-Are>.

RADZIKOWSKA, U. *et al.* The influence of dietary fatty acids on immune responses. **Nutrients**, v. 11, n. 12, p. 2990, 2019.

REN, Li-Li *et al.* Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. **Chinese Medical Journal**, [s. l.], v. 133, n. 9, p. 1015–1024, 2020. Disponível em: <https://journals.lww.com/10.1097/CM9.0000000000000722>.

REINICKE, Madlen *et al.* Targeted Lipidomics for Characterization of PUFAs and Eicosanoids in Extracellular Vesicles. **Nutrients**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 1319, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/14/7/1319>.

RENÉ, C. A.; PARKS, R. J. Bioengineering extracellular vesicle cargo for optimal therapeutic efficiency. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, v. 32, n. 2, p. 101259, 2024.

ROCHA, D. M. et al. Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response. **Atherosclerosis**, v. 244, p. 211–215, 2016.

RUSSO, Lucia; LUMENG, Carey N. Properties and functions of adipose tissue macrophages in obesity. **Immunology**, [s. l.], v. 155, n. 4, p. 407–417, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imm.13002>.

SATHAPPA, M.; ALDER, N. N. Ionization properties of phospholipids determined by zeta potential measurements. **Bio-protocol**, v. 6, n. 22, 2016.

SHERRATT, S.C.R. et al. EPA and DHA containing phospholipids have contrasting effects on membrane structure. *Journal of Lipid Research*, v. 62, p.1000106, 2021

SIEVERS, Benjamin L. *et al.* SARS-CoV-2 and innate immunity: the good, the bad, and the “goldilocks”. **Cellular & Molecular Immunology**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 171–183, 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41423-023-01104-y>.

SHIMIZU, Takao. Lipid Mediators in Health and Disease: Enzymes and Receptors as Therapeutic Targets for the Regulation of Immunity and Inflammation. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 123–150, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.024>.

SHIMIZU, Takao; WOLFE, Leonhard S. Arachidonic Acid Cascade and Signal Transduction. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 1–15, 1990. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.024>.

SKOGBERG, Gabriel *et al.* Human thymic epithelial primary cells produce exosomes carrying tissue-restricted antigens. **Immunology & Cell Biology**, [s. l.], v. 93, n. 8, p. 727–734, 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/icb.2015.33>.

SONG, Chang *et al.* SARS-CoV-2: The Monster Causes COVID-19. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. February, p. 1–7, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.835750/full>.

SU, Lian-Jiu *et al.* Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2019, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/5080843/>.

SUNSHINE, H.; IRUELA-ARISPE, M. L. Membrane lipids and cell signaling. **Current opinion in lipidology**, v. 28, n. 5, p. 408–413, 2017.

TAHYRA, Aline Seiko Carvalho; CALADO, Rodrigo T.; ALMEIDA, Fausto. The Role of Extracellular Vesicles in COVID-19 Pathology. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 16, p. 1–12, 2022.

TANG, D. et al. Extracellular vesicle/macrophage axis: Potential targets for inflammatory disease intervention. **Frontiers in immunology**, v. 13, p. 705472, 2022.

THÉRY, Clotilde *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2018.

THÉRY, Clotilde; OSTROWSKI, Matias; SEGURA, Elodie. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 581–593, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri256>

THOMPSON, Mikayla R. *et al.* Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. **Viruses**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 920–940, 2011. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1999-4915/3/6/920/>.

TORTORICI, M. Alejandra; VEESLER, David. Structural insights into coronavirus entry. *In*: **ADVANCES IN VIRUS RESEARCH**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. v. 105, p. 93–116. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.08.002>.

TOUSSI, Sima S. *et al.* Therapeutics for COVID-19. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 771–786, 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41564-023-01356-4>.

TRICARICO, Christopher; CLANCY, James; D’SOUZA-SCHOREY, Crislyn. Biology and biogenesis of shed microvesicles. **Small GTPases**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 220–232, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1215283>.

TSURUTA, Mitsudai et al. Metabolic Endotoxemia-Activated Macrophages Promote Pancreatic β Cell Death via IFN β -Xaf1 Pathway. **Hormone and Metabolic Research**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 160–167, 2018.

URABE, Fumihiko *et al.* Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, [s. l.], v. 318, n. 1, p. C29–C39, 2020.

VAN NIEL, Guillaume; D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 213–228, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.

VAN NIEL, Guillaume *et al.* Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 369–382, 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41580-022-00460-3>.

V'KOVSKI, Philip *et al.* Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 155–170, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.

WALKER, S. *et al.* Extracellular vesicle-based drug delivery systems for cancer treatment. **Theranostics**, v. 9, n. 26, p. 8001–8017, 2019.

WALLS, Alexandra C. *et al.* Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, [s. l.], v. 181, n. 2, p. 281–292.e6, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.

WANG, Weier; TANG, Jianming; WEI, Fangqiang. Updated understanding of the outbreak of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in Wuhan, China. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 92, n. 4, p. 441–447, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.25689>.

WANG, Yizhuo *et al.* Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. **Cell Death and Disease**, [s. l.], v. 11, n. 10, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-03127-z>.

WHO. WHO COVID-19 dashboard, 2024. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c>

WU, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 265–269, 2020.

YÁÑEZ-MÓ, María *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, [s. l.], v. 4, n. 2015, p. 1–60, 2015.

YE, Q.; WANG, B.; MAO, J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. **The Journal of infection**, v. 80, n. 6, p. 607–613, 2020.

XIE, L. *et al.* Engineered M2 macrophage-derived extracellular vesicles with platelet membrane fusion for targeted therapy of atherosclerosis. **Bioactive materials**, v. 35, p. 447–460, 2024.

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

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

ZENG, Ye *et al.* Biological Features of Extracellular Vesicles and Challenges. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 10, n. June, p. 1–13, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.816698/full>.

ZHAO, Miao-Miao *et al.* Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 134, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00558-8>.

ZHOU, Jieru *et al.* Exosomes released from tumor-associated macrophages transfer miRNAs that induce a Treg/Th17 cell imbalance in epithelial ovarian cancer. **Cancer Immunology Research**, [s. l.], v. 6, n. 12, p. 1578–1592, 2018.