



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TRANSLACIONAL

HILDA TAHIM DE SOUZA

PERFIS IMUNOGENÉTICOS E SUA REAÇÃO COM AS SUSCETIBILIDADES
À SÍNDROME PÓS-AGUDA DA COVID-19: ESTUDO EXPERIMENTAL COM A
PROTEÍNA SPIKE EM MODELOS MURINOS TH1 E TH2

FORTALEZA

2025

HILDA TAHIM DE SOUZA

**PERFIS IMUNOGENÉTICOS E SUA REAÇÃO COM AS SUSCETIBILIDADES
À SÍNDROME PÓS-AGUDA DA COVID-19: ESTUDO EXPERIMENTAL COM A
PROTEÍNA SPIKE EM MODELOS MURINOS TH1 E TH2**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Translacional
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
mestre em Medicina Translacional, na linha
de pesquisa em doenças neuropsiquiátricas.

Orientadora: Dra. Danielle Macêdo Gaspar
Coorientadora: Dra. Maria Francilene Souza Silva

FORTALEZA

2025

HILDA TAHIM DE SOUZA

**PERFIS IMUNOGENÉTICOS E SUA REAÇÃO COM AS SUSCETIBILIDADES
À SÍNDROME PÓS-AGUDA DA COVID-19: ESTUDO EXPERIMENTAL COM A
PROTEÍNA SPIKE EM MODELOS MURINOS TH1 E TH2**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Translacional
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
mestre em Medicina Translacional, na linha
de pesquisa em doenças neuropsiquiátricas.

Aprovada em: __/__/__.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr^a. Danielle Macêdo Gaspar
Universidade Federal do Ceará – UFC (Orientadora)

Prof. Dr. Manoel Alves Sobreira Neto
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

D32 de Souza, Hilda Tahim.

Perfis Imunogenéticos e sua Reação com as Suscetibilidade à Síndrome Pós Aguda da Covid-19: Estudo Experimental com a Proteína Spike em Modelos Murinos Th1 e Th2. / Hilda Tahim de Souza. – 2025.

126 f.: il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós Graduação em Medicina Translacional, Fortaleza, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Danielle Macêdo Gaspar.

Coorientação: Profa. Dra. Maria Francilene Souza Silva.

1. COVID longa. 2. doenças neuroinflamatórias. 3. tempestade de citocina. 4. proteína S1 da espícula de coronavírus. 5. resposta imune. I. Título.

CDD 610

AGRADECIMENTOS

A Deus, agradeço por me sustentar nos momentos mais difíceis desse percurso, por guiar todos os meus passos, por me auxiliar junto com os intercessores e por me presentear com anjos aqui na Terra.

À minha orientadora, Danielle Macêdo, minha imensa gratidão pela sua vida e pelo impacto que teve em minha trajetória. Obrigada por me acolher há dois anos e por confiar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma confiava. Sou profundamente grata pelo incentivo constante, pelos feedbacks construtivos, pela atenção dedicada e, sobretudo, pela sua sensibilidade, que me inspira e faz de você uma profissional tão especial.

A minha coorientadora, Francilene Silva meu mais profundo agradecimento por ter sido uma inspiração constante ao longo dessa jornada. Sua paciência, empatia e capacidade de me incentivar nos momentos certos foram fundamentais para que eu me mantivesse firme, especialmente na pesquisa. Compreensiva e generosa, você me ajudou a enxergar com mais clareza o caminho científico, a entender além dos dados e a acreditar no meu próprio potencial. Sinto que Deus colocou você na minha vida exatamente quando eu mais precisava, e sou imensamente grata por isso.

Ao meu esposo e amigo, Evandir Moreira, por seu constante incentivo, apoio incondicional e por sempre acreditar em mim e em minhas escolhas profissionais. Sou imensamente grata, em especial, pelo suporte financeiro, que tornou este caminho possível.

Aos meus pais, Cleide Fontenele e Barbosa de Souza (*in memoriam*), por sua resiliência, coragem e pelo exemplo de força que sempre me inspirou.

Às minhas tias, Elda Fontenele e Nágila Fontenele, que sempre me deram o exemplo de que, com estudo, podemos alcançar nossos objetivos

Em especial, aos tios Maria Fontenele e Elias Fontenele, que acreditaram em mim, pagando meu colégio e sempre fazendo o possível para garantir minha educação.

À minha irmã, Raquel Tahim, pela ajuda e disponibilidade em cuidar dos meus filhos *pets* e pelas comidinhas nos finais de semana.

À minha co-coorientadora, Cássia Oliveira, expresso minha profunda gratidão pela dedicação e pelas contribuições indispensáveis a este trabalho. Sou imensamente grata pelo apoio nos momentos mais desafiadores, pela escuta atenta e pela presença constante, que foram essenciais ao longo desta jornada.

Aos pós-docs Natalia Fiorenza, Annyta Frota, Isabelle Gois, Jéssica Rabelo e Eduardo Ribeiro obrigada pela disponibilidade, parceria e generosidade em ajudar nos experimentos quando mais precisei.

Ao Stefâncio Barreto, a quem sou grata pelo apoio no início do meu mestrado e pelas contribuições valiosas durante a escrita desta dissertação.

Aos amigos que fiz na Neuro: Dino Clemente, Débora Marreiros, Sérgio André (Jorge), Nayana Soares, Sérgio Filho, Larissa Cristino, Amílcar Dornelas, Michelle Verde, Raica das Candeias, Hoanna Castro e Suellem Monike obrigada pelos risos e por todo o aprendizado compartilhado.

Aos alunos de iniciação científica, Vivian Bezerra, Caio Andrade e João Paulo, obrigada pelo comprometimento, pela dedicação em aprender e pela disponibilidade em ajudar.

A amiga Isabelle de Fátima que fiz no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA): obrigada por prontamente disponibilizar seu tempo para me ensinar e ajudar no que fosse necessário. Ao meu amigo, Orleando Coelho, pelas conversas sinceras, pela paciência em me ouvir durante meus dias intensos e pela confiança que sempre demonstrou.

A todos que contribuíram diretamente para a execução dos experimentos, incluindo os funcionários do biotério: A veterinária Gabriela Farias, Yara Lima, Alyssom Chaves e Dayvson Andrade. Obrigada por facilitarem esse processo tão desafiador de trabalhar com animais.

Aos camundongos, cuja contribuição foi indispensável para a realização deste trabalho, sou profundamente grata.

À Universidade Federal do Ceará, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional (PPGMT) e à FUNCAP, por proporcionarem os meios para a realização desta jornada.

Por fim, sou grata pela vida e por todas as experiências que tive a oportunidade de vivenciar.

Dedico a Deus, por me guiar e por colocar pessoas incríveis em meu caminho. A mim mesma, pela coragem de superar tantos desafios, e ao meu esposo, Evandir Moreira, meu maior incentivador, pelo apoio incondicional em cada etapa desta jornada.

*“Ninguém é suficientemente
perfeito, que não possa
aprender com o outro e,
ninguém é totalmente estruído
de valores que não possa
ensinar algo ao seu irmão”.*

São Francisco de Assis

RESUMO

A COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, tem sido associada a manifestações extrapulmonares persistentes, incluindo sintomas neuropsiquiátricos, caracterizando a Síndrome Pós-Aguda da COVID-19 (SPAC). A proteína Spike, principal componente estrutural do vírus, pode atravessar a barreira hematoencefálica e induzir neuroinflamação. Considerando os perfis imunológicos distintos das linhagens BALB/c (Th2) e C57BL/6 (Th1), este estudo investigou os efeitos da proteína Spike nessas linhagens, com foco em alterações imunes e comportamentais persistentes associadas à SPAC. Objetivou-se avaliar alterações comportamentais, neuroquímicas e imunológicas induzidas pela exposição à proteína Spike em camundongos BALB/c e C57BL/6, examinando a influência das respostas imunes Th1 e Th2 na persistência de sintomas da SPAC. No modelo *in vitro*, astrócitos murinos e macrófagos (células RAW 264.7) foram expostos à proteína Spike (10 µg) para análise de citotoxicidade (MTT), morfologia e produção de óxido nítrico. No modelo *in vivo*, camundongos machos BALB/c e C57BL/6 receberam salina (controle) ou Spike (10 µg/animal, intraperitonal, exposição única) e foram avaliados em duas fases: (i) aguda- FA (até 7 dias após exposição); (ii) pós-aguda – FPA (40–45 dias após exposição). Os testes comportamentais incluíram avaliação da atividade locomotora (teste de campo aberto), aprendizado espacial (teste de labirinto em T), memória declarativa não espacial (teste de reconhecimento de objeto), comportamento ansioso-símile (teste de zero maze) e comportamento depressivo (teste do nado forçado). Foram analisadas citocinas no hipocampo (*Mouse XL Cytokine Array*) e dopamina e seu metabólito DOPAC no corpo estriado (HPLC). Nos testes *in vitro*, a proteína apresentou efeito citotóxico mais acentuado sobre macrófagos RAW 264.7 (81,70%) do que sobre astrócitos (39,28%). A exposição à Spike induziu alterações comportamentais marcantes em BALB/c. No modelo *in vivo*, camundongos BALB/c expostos à Spike na FA exibiram comportamento ansioso-depressivo, com aumento do tempo de imobilidade no teste do nado forçado ($P<0.0001$), diminuição da distância percorrida ($P<0.0001$), maior tempo no seguimento aberto (Zero Maze, $P<0.0001$). Observou-se redução do número de *rearings* na fase pós-aguda ($P=0,0299$), aumento na atividade locomotora e aumento significativo no tempo na zona central do campo aberto ($P=0,0001$), e prejuízo na memória de trabalho (teste do labirinto em T). Neuroquimicamente, houve elevação dos níveis de DOPAC, indicando maior turnover dopaminérgico. A análise de citocinas revelou baixa expressão de IL-1ra, IL-15 e

BDNF no hipocampo. Em contraste, os C57BL/6 demonstraram resiliência comportamental e neuroquímica, com resposta inflamatória mais robusta (média de expressão de citocinas: $12,33 \pm 2,33$ vs. $3,15 \pm 1,81$ nos BALB/c; $P < 0,0001$), com aumento de IL-6, IL-22, IL-23, MIP-3 β , IL-1ra e BDNF, compatível com perfil Th1. Na FA teve tempo reduzido na parte locomotora ($P=0.0362$), maior número de *grooming* ($P=0.0191$), já na FPA teve déficit cognitivo no reconhecimento de objetos. Animais BALB/c apresentaram maior susceptibilidade à SPAC, com alterações comportamentais, disfunção dopaminérgica e resposta imune deficiente. Em contraste, C57BL/6 mostraram maior resiliência comportamental e resposta imune mais eficiente. Os dados reforçam o papel do perfil imunogenético na vulnerabilidade à COVID longa e a utilidade translacional do modelo BALB/c.

Palavras-chave: COVID longa; doenças neuroinflamatórias; tempestade de citocina; proteína S1 da espícula de coronavírus; resposta imune.

ABSTRACT

COVID-19, caused by SARS-CoV-2, has been associated with persistent extrapulmonary manifestations, including neuropsychiatric symptoms, characterizing Post-Acute COVID-19 Syndrome (PACS). The Spike protein, the main structural component of the virus, can cross the blood-brain barrier and induce neuroinflammation. Considering the distinct immunological profiles of BALB/c (Th2) and C57BL/6 (Th1) mouse strains, this study investigated the effects of Spike protein in these strains, focusing on persistent immune and behavioral alterations associated with PACS. We aimed to evaluate behavioral, neurochemical, and immunological alterations induced by exposure to Spike protein in BALB/c and C57BL/6 mice, examining the influence of Th1 and Th2 immune responses on the persistence of PACS symptoms. In the *in vitro* model, murine astrocytes and macrophages (RAW 264.7 cells) were exposed to Spike protein (10 µg) for analysis of cytotoxicity (MTT), morphology and nitric oxide production. In the *in vivo* model, male BALB/c and C57BL/6 mice received saline (control) or Spike (10 µg/animal, intraperitoneal, single exposure) and were evaluated in two phases: (i) acute-AF (up to 7 days after exposure); (ii) post-acute-FPA (40–45 days after exposure). Behavioral tests included assessment of locomotor activity (open field test), spatial learning (T-maze test), non-spatial declarative memory (object recognition test), anxiety-like behavior (zero maze test) and depressive-like behavior (forced swim test). Cytokines were analyzed in the hippocampus (Mouse XL Cytokine Array) and dopamine and its metabolite DOPAC in the striatum (HPLC). In *in vitro* tests, the protein showed a more pronounced cytotoxic effect on RAW 264.7 macrophages (81.70%) than on astrocytes (39.28%). Exposure to Spike induced marked behavioral changes in BALB/c mice. In the *in vivo* model, BALB/c mice exposed to Spike in the AF exhibited anxious-depressive behavior, with increased immobility time in the forced swim test ($P < 0.0001$), decreased distance traveled ($P < 0.0001$), and longer time in the open follow-up (Zero Maze, $P < 0.0001$). There was a reduction in the number of rearings in the post-acute phase ($P = 0.0299$), an increase in locomotor activity and a significant increase in the time spent in the central zone of the open field ($P = 0.0001$), and impairment in working memory (T-maze test). Neurochemically, there was an increase in DOPAC levels, indicating greater dopaminergic turnover. Cytokine analysis revealed low expression of IL-1ra, IL-15 and BDNF in the hippocampus. In contrast, C57BL/6 demonstrated behavioral and neurochemical resilience,

with a more robust inflammatory response (mean cytokine expression: 12.33 ± 2.33 vs. 3.15 ± 1.81 in BALB/c; $P < 0.0001$), with increased IL-6, IL-22, IL-23, MIP-3 β , IL-1ra and BDNF, consistent with a Th1 profile. In FA, there was reduced time in the locomotor part ($P=0.0362$), greater number of grooming ($P=0.0191$), while in FPA there was cognitive deficit in object recognition. BALB/c animals showed greater susceptibility to SPAC, with behavioral changes, dopaminergic dysfunction and deficient immune response. In contrast, C57BL/6 showed greater behavioral resilience and more efficient immune response. The data reinforces the role of the immunogenetic profile in vulnerability to long COVID and the translational utility of the BALB/c model.

Keywords: long COVID; neuroinflammatory diseases; cytokine storm; coronavirus spike protein S1; immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura do SARS-CoV-2 destacando as principais proteínas estruturais.....	25
Figura 2- Principais processos de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) em camundongos e humanos.....	28
Figura 3 - Manifestações extrapulmonares causadas pelo o SARS- CoV- 2: Principais implicações clínicas e sistêmicas da SPAC.	29
Figura 4- Propagação Viral pela via cribriforme e rota transsináptica.	31
Figura 5- Via hematogênica, o transporte do SARS-CoV-2 através do sistema sanguíneo, onde o vírus é levado pelos leucócitos. Estes atravessam o endotélio vascular e entram BHE, permitindo a disseminação do vírus para o SNC.....	32
Figura 6- Representação de Receptores ACE2 no Sistema Nervoso Central e Ligação do SARS-CoV-2 a Neurônios.	35
Figura 7- A imagem destaca a ativação do sistema imune inato e adaptativo, bem como a possibilidade de evolução para uma resposta exacerbada.	37
Figura 8 - Condições de Alojamento para os Camundongos BALB/c e C57BL/6 do NPDM-UFC.....	49
Figura 9- Organização experimental de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6.	50
Figura 10- Representação do protocolo experimental.....	52
Figura 11- Representação do Teste Campo Aberto.	55
Figura 12- Representação ilustrativa da metodologia do teste do reconhecimento de objeto novo.	56
Figura 13- Representação do protocolo do teste T Maze.	60
Figura 14- Representação do Teste Nado Forçado.	61
Figura 15 - Representação das etapas da dissecação das Áreas Cerebrais A) Encéfalo B) Córtex pré frontal, C) Hipocampo e D) Corpo Estriado.....	63
Figura 16- Desenho representativo da dissecação do intestino nas suas devidas porções (Jejuno, Duodeno e Íleo)	64
Figura 17- Esquema representativo da descrição das etapas para a realização das análises de citocinas.	68
Figura 18- Efeitos da proteína Spike do SARS-CoV-2 (10 µg/mL) de sobrenadantes sobre a inibição de crescimento em Astrócitos e Macrófagos RAW 264.7 por Ensaio MTT. ...	70
Figura 19 - Efeitos da Proteína Spike do SARS-CoV-2 (10 µg/mL) de sobrenadantes sobre	

as alterações morfológicas induzidas pela proteína Spike (10 µg/mL) do SARS-CoV-2 em astrócitos e células RAW 264.7 após 72 horas de tratamento.	71
Figura 20- Efeitos da proteína Spike do SARS-CoV-2 (10 µg/mL) de sobrenadantes sobre a curvas de inibição do crescimento em Astrócitos e Macrófagos RAW 264.7 por após 72 horas de tratamento.....	72
Figura 21 - Efeitos da Proteína Spike do SARS-CoV-2 (10 µg/mL) na dosagem de nitrito/nitrato de sobrenadantes de células RAW 264.7 e sobrenadantes de Astrócitos expostas a proteína Spike após 72 horas.	73
Figura 22- Efeito da proteína Spike (10µg/animal/dia) sobre a memória de reconhecimento em camundongos submetidos ao modelo de SPAC.....	78
Figura 23- Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) sobre a ansiedade em camundongos submetidos ao modelo de SPAC entre as linhagens BALB/c e C57BL/6..	79
Figura 24 - Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) sobre memória de trabalho em camundongos submetidos ao modelo de SPAC entre as linhagens BALB/c e C57BL/6..	81
Figura 25- Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) sobre o tempo de imobilidade em	83
Figura 26 - Medida de peso ponderal em gramas dos camundongos das linhagens BALB/c (A) e C57BL/6 (B). Os pesos foram registrados nas FA e FPA.....	84
Figura 27 - Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) na determinação dos níveis de Dopamina (DA) e seu metabólito (DOPAC) (A) e determinação das taxas de metabolização (B) em corpo estriado de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 induzidos ao modelo de SPAC.....	87
Figura 28 - Membranas representando de expressão das citocinas obtidas por meio do kit Mouse XL Cytokine Array, utilizando lisados de hipocampo das linhagens BALB/c e C57BL/6.	88
Figura 29 - A expressão diferencial de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e outras proteínas solúveis analisadas em sobrenadantes de tecido hipocampal de animais do grupo Salina, BALB/c e C57BL/6, utilizando o kit Mouse XL Cytokine Array.....	89
Figura 30 - A expressão diferencial de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e outras proteínas solúveis foi analisada em sobrenadantes de tecido hipocampal de animais BALB/c e C57BL/6 do grupo Spike, utilizando o kit Mouse XL Cytokine Array.....	Erro!
Indicador não definido.	
Figura 31 - Distribuição da densidade média de citocinas expressas nos sobrenadantes de	

tecido hipocampal de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, analisada pelo kit Mouse XL Cytokine Array.....	92
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diferenças Funcionais, Moleculares e Citocinas/Interleucinas Associadas aos Subtipos de Células T Helper (Th1, Th2) e neutrófilos.....	39
Tabela 2 - Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) com erro da média (EM) e (SD) desvio padrão, das amostras na concentração única de 10 µg/mL. ...	70
Tabela 3 - Representação esquemática dos testes comportamentais em camundongos submetidos ao modelo de SPAC e expostos a proteína Spike do SARS-CoV-2: comparação entre grupos expostos Spike e salina em BALB/c e C57BL/6, e entre linhagens no grupo tratado.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAALAC	<i>Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care</i>
ACE2	<i>Angiotensin-Converting Enzyme 2</i>
ANOVA	Análise Unidirecional de Variância
BALB/C	Linhagem de camundongos
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CA	Campo Aberto
BHE	Barreira Hematoencefálica
CE	Corpo Estriado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CI50	Concentração Inibitória Média
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COVID-19	Doença do Coronavírus 2019
CPF	Córtex Pré-Frontal
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPIs	Equipamentos de Proteção Individual
EPM	Erro Padrão da Média
FA	Fase aguda
FPA	Fase pós aguda
HP	Hipocampo
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IC%	Percentual de Inibição do Crescimento Celular
Icv	Intracerebroventricular
ID	Índice de Discriminação
Ip	Intraperitoneal
M	Proteína de Membrana
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
NF	Nado Forçado
NO	Óxido Nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito

NO ₃ ⁻	Nitrato
NPDM	Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PMMA	Polimetilmetacrilato
RAW	Modelo <i>in vitro</i> de macrófagos
RBD	Domínio De Ligação Ao Receptor
RNA	Ácido Ribonucleico
RON	Reconhecimento do Objeto Novo
S1	Subunidade 1
S2	Subunidade 2
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2
SDS-PAGE	Gel de Eletroforese
SNC	Sistema Nervoso Central
SPAC	Sequelas pós aguda da COVID -19
TM	T-maze
UFC	Universidade Federal do Ceará
UTIs	Unidades de Terapia Intensiva
ZM	Zero Maze

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramas
μL	Microlitros
μM	Micrometro
mg	Miligramas
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ms	Milissegundo
rpm	Revoluções por Minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1. 1 Pandemia de COVID-19 e seu impacto global	23
1. 2 SARS-CoV-2 e sua proteína Spike	24
1.3 Vias de transmissão e sintomatologia da COVID-19	26
1.4 Sequelas Pós-Agudas da COVID-19 (SPAC) em Humanos e Modelos <i>In Vivo</i>	27
1. 6 Neuroinvasão no Sistema Nervoso Central pelo SARS-CoV-2	30
1.7 Neuroinflamação causada pela proteína Spike do SARS – CoV - 2	33
1. 8 Sistema imunológico, SARS CoV-2 e SPAC	35
1.9 Modelos animais em estudos translacionais da SPAC	39
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	42
3. OBJETIVOS	44
3. 1 Objetivo geral	44
3. 2 Objetivos específicos	44
4. MATERIAL E MÉTODOS	45
4. 1 Obtenção da proteína Spike	45
4. 1. 1 Cultivo e Manutenção de Linhagens Celulares Murinas de Astrócitos e RAW 264.7	45
4. 1.2 Ensaios <i>in vitro</i>	46
4. 1. 3 Avaliação da atividade citotóxica - MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium em sobrenadantes celulares de astrócitos e RAW 264.7.	46
4. 1. 4 Determinação da concentração de nitrito/nitrato em sobrenadante celulares de astrócitos RAW 264.7.	47
4. 1. 5 Ensaios <i>in vivo</i>	48
4. 1. 6 Considerações éticas	48
4. 2 Animais	48
4. 2. 1 Delineamento experimental	49
4. 2. 2 Considerações sobre biossegurança	53
4. 2. 3 Testes comportamentais	53
4. 2. 4 Avaliação da atividade locomotora e comportamento ansioso - Teste do Campo Aberto	54
4. 2. 5 Avaliação da memória de reconhecimento- Teste do Reconhecimento do Objeto	

Novo	56
4. 2. 6 Avaliação da ansiedade - Teste Elevado Zero Maze	57
4.3 Avaliação da memória de trabalho - Teste do T Maze.....	58
4. 3. 1 Avaliação do comportamento depressivo - Teste do Nado Forçado	60
4. 3. 2 Método de Indução de Morte (Eutanásia).....	62
4. 3. 3 Dissecção das Áreas Cerebrais	62
4. 3. 4 Dissecção do intestino delgado.....	63
4. 3.5 Testes neuroquímicos.....	65
4. 4 Dosagem dos níveis de dopamina (DA) e ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) por (cromatografia líquida de alta performance) HPLC no lisado de tecido do corpo estriado de camundongos.....	65
4. 4. 1 Dosagem de Citocinas por <i>Kit Mouse XL Cytokine Array</i> (R&D Systems/ARY028) Plataforma para Detecção Multiplexada de Citocinas em lisado de tecido do hipocampo de camundongos	66
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	69
6. RESULTADOS.....	70
6.1 Ensaios <i>in vitro</i>	70
6.1.1 Avaliação da Viabilidade Celular e Citotoxicidade da Proteína Spike do SARS-CoV-2 (10 µg/mL) de sobrenadantes em Astrócitos e Macrófagos RAW 264.7 por Ensaio MTT.....	70
6. 1. 2 Avaliação dos níveis de nitrito pela exposição à proteína Spike do SARS-CoV-2 (10 µg/mL) de sobrenadantes em Astrócitos e Macrófagos RAW 264.7 por dosagem de Nitrito/ Nitrato.....	73
6. 1.3 Ensaios <i>in vivo</i>	74
6.1.4 Testes Comportamentais	74
6. 1. 5 Efeitos da proteína Spike do SARS -CoV-2 sobre a atividade locomotora e comportamento ansioso no Teste do Campo Aberto em camundongos, na FA e FPA, submetidos ao modelo da SPAC.....	74
6. 1. 6 Efeitos da proteína Spike do SARS - CoV -2 sobre a memória de reconhecimento no Teste de Reconhecimento do Objeto Novo em camundongos nas fases, FA e FPA, submetidos ao modelo da SPAC.	78
6. 2 Efeitos da proteína Spike do SARS - CoV -2 sobre avaliação da ansiedade - Teste Elevado Zero Maze em camundongoso	78

6. 2.1 Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) sobre o déficit na memória de trabalho e capacidade de aprendizagem espacial por alternância espontânea - Teste T Maze em camundongos na FPA submetidos ao modelo de SPAC.....	80
6. 2. 2 Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) avaliação do tempo de imobilidade sobre o comportamento depressivo no teste do nado forçado em camundongos, FA e FPA, submetidos ao modelo da SPAC.	82
6. 2. 3 Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) avaliação dos pesos (em gramas) nos camundongos, na FA FPA, submetidos ao modelo da SPAC.....	83
6.2. 4 Testes neuroquímicos.....	86
6. 2. 5 Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) na determinação dos níveis de Dopamina (DA) e seu metabólito (DOPAC) e da taxa de metabolização em corpo estriado de camundongos das linhagem BALB/c e C57BL/6 induzidos ao modelo de SPAC.	86
6. 2. 5 Dosagem de citocinas no lisado de tecido do hipocampo de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 expostos salina ou proteína Spike (10µg/animal/dia) induzidos ao modelo de SPAC.	88
7. DISCUSSÃO	93
8. CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS.....	103
APÊNDICE 1 – Representação do registro diário dos efeitos comportamentais e fisiológicos observados nos camundongos ao longo do período experimental.....	125
ANEXO 1 – Termo de aprovação pelo comitê de ética e uso de animais (CEUA)	126
ANEXO 2 - Especificações técnicas da proteína Spike do SARS-CoV-2.....	127

1. INTRODUÇÃO

1. 1 Pandemia de COVID-19 e seu impacto global

Em 31 de dezembro de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi informada sobre um surto de casos de pneumonia de origem desconhecida na cidade de Wuhan, localizada na província de Hubei, na China (Wu *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020). Devido à elevada taxa de disseminação do vírus, a OMS declarou, em 30 de janeiro de 2020, uma emergência de saúde pública de importância internacional, o nível mais elevado de alerta previsto no Regulamento Sanitário Internacional, com o propósito de intensificar a coordenação, a colaboração e a solidariedade global para conter a transmissão entre as nações.

Em fevereiro de 2020, a OMS denominou oficialmente a doença como COVID-19, marcando o início de uma crise de saúde pública sem precedentes nos últimos 50 anos. A COVID-19 é uma doença infecciosa de rápida disseminação global, sendo caracterizada como uma pandemia devido ao seu impacto global. Além das consequências biomédicas e epidemiológicas, a pandemia também gerou impactos significativos nas esferas política, cultural, social e psicológica (Ketwa; Kang'ethe, 2024).

Desde o início do surto até 28 de dezembro de 2024, foram confirmados globalmente 155.330.000 casos de infecção por COVID-19, com 7.010.681 óbitos e 13,64 bilhões de doses de vacinas administradas. No Brasil, registraram-se 37.511.921 casos de COVID-19, com 702.116 óbitos (OMS, 2025). No Estado do Ceará, conforme o boletim epidemiológico da Secretaria de Saúde, entre janeiro de 2024 e 02 de janeiro de 2025, foram confirmados 29.831 casos de Covid-19, além de 41 óbitos no mesmo intervalo de tempo no estado do Ceará (Cenário epidemiológico da Covid-19, 2025)

A COVID-19 é uma infecção respiratória aguda grave, causada pelo vírus SARS-CoV-2. Inicialmente denominado novo coronavírus (OMS, 2025), o vírus foi posteriormente renomeado como Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2) pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, com base em análises filogenéticas e em sua relação genética e evolutiva com outros coronavírus (Flores-Vega *et al.*, 2022).

1. 2 SARS-CoV-2 e sua proteína Spike

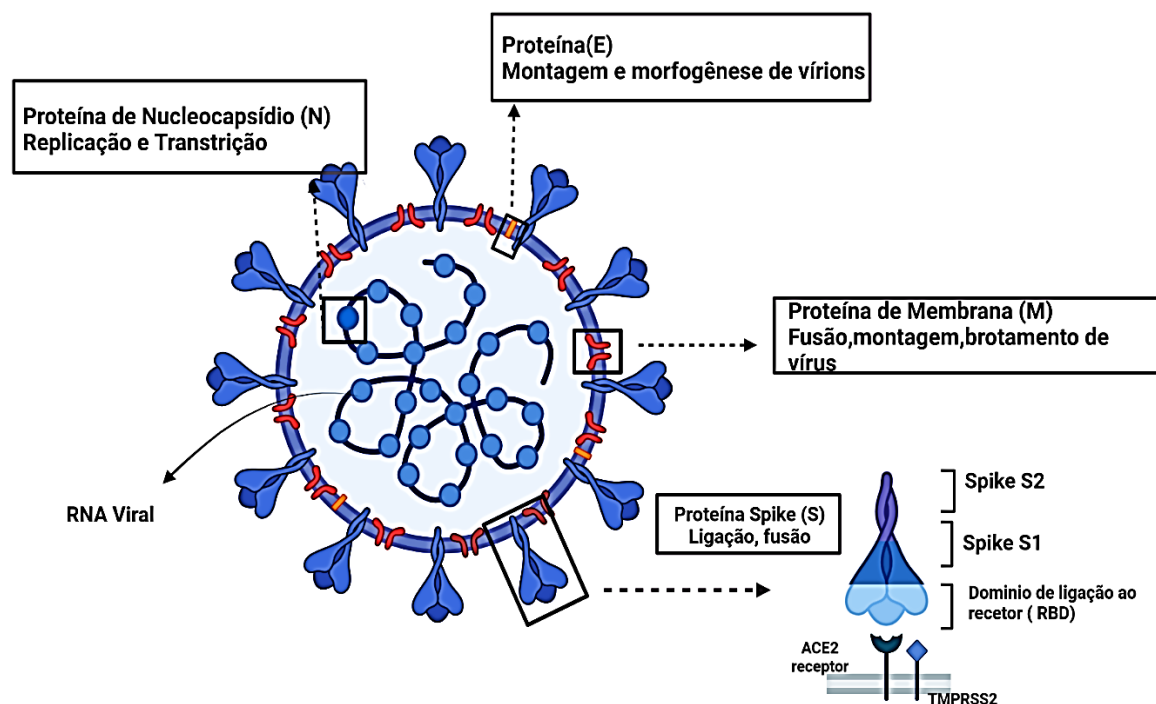
O SARS-CoV-2 é um vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples positivo, envelopado, pertencente ao gênero Betacoronavirus e ao subgênero Sarbecovirus (Uzunian, 2020). O seu genoma atua diretamente como RNA mensageiro, sendo traduzido pelos ribossomos celulares para a síntese de proteínas virais (Dwyer, 2023; Uzunian, 2020).

O SARS-CoV-2 é classificado dentro da espécie responsável pela Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) (Raghavan; Kenchappa; Leo, 2021). Estudos indicam que o vírus possivelmente teve origem em morcegos (Gorbalenya *et al.*, 2020). O genoma do vírus possui aproximadamente 30.000 nucleotídeos, compostos por uma molécula de açúcar (ribose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada (adenina, citosina, guanina e uracila) (Dwyer, 2023).

Esse genoma codifica cerca de 29 proteínas virais, incluindo proteínas estruturais essenciais, esquematizadas na Figura 1:

- Nucleocapsídeo (N): protege o RNA viral e desempenha um papel na modulação da resposta imune do hospedeiro (Lu *et al.*, 2021).
- Envelope (E): está envolvida na montagem e na liberação de novas partículas virais (Boson *et al.*, 2021).
- Membrana (M): é a proteína mais abundante no envelope viral e atua na montagem do vírus (Schoeman; Fielding, 2019; Wong; Saier Jr, 2021).
- Spike (S): responsável pelo reconhecimento do receptor celular primário, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), com o qual interage. Essa proteína trimérica é composta por duas subunidades principais: a S1, que contém o domínio de ligação ao receptor (RBD), responsável pela interação com o ACE2, e a S2, que possui uma âncora transmembrana responsável por mediar a fusão entre as membranas virais e da célula hospedeira (Tai *et al.*, 2020).

Figura 1- Estrutura do SARS-CoV-2 destacando as principais proteínas estruturais.



Fonte: Criado pela autora em software BioRender e adaptado de Lee et al., 2020.

A proteína Spike (S) é apresentada em configuração trimérica na forma de pré-fusão, com destaque para os domínios S1, responsável pela ligação ao receptor ACE2, e S2, que medeia a fusão com a membrana celular. Proteínas estruturais do SARS-CoV-2: Proteína de Membrana (M), Proteína de Nucleocapsídeo (N), Proteína de Envelope (E), Proteína S (Spike), Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2), *Transmembrane Serine Protease 2* (TMPRSS2), os domínios imunologicamente significativos da proteína Spike, especificamente S1, S2, RNA Viral e o domínio de ligação ao receptor (RBD).

A infecção pelo SARS-CoV-2 tem início com a interação entre a proteína Spike (S) do vírus e o receptor ACE2 expresso na superfície das células hospedeiras, desencadeando uma série de eventos críticos que culminam na entrada viral.

Esse processo ocorre por meio de três etapas principais: Reconhecimento do receptor: A subunidade S1 da proteína Spike se liga ao receptor ACE2 na superfície da célula hospedeira (Tai *et al.*, 2020), quando a proteína Spike se liga ao receptor TM protease serina 2 (TMPRSS2) localizado na membrana da célula hospedeira, ocorre a entrada do vírus na célula, ativando a proteína Spike (Figura 1) (Peacock *et al.*, 2021), assim que o vírus entra na célula, o RNA viral é liberado, as poliproteínas são traduzidas do genoma do RNA e a replicação e transcrição do genoma do RNA viral ocorrem por meio da clivagem da proteína e montagem do complexo

replicase-transcriptase.

O RNA viral é replicado e as proteínas estruturais são sintetizadas, montadas e empacotadas na célula hospedeira, após o que as partículas virais são liberadas (Huang, Y. *et al.*, 2020).

1.3 Vias de transmissão e sintomatologia da COVID-19

A principal forma de transmissão da COVID-19 ocorre por via aérea, principalmente por meio de gotículas respiratórias expelidas por pessoas infectadas ao falar, tossir ou espirrar. Também pode ocorrer por aerossóis em ambientes mal ventilados e com aglomeração de pessoas. O período de incubação da doença geralmente varia entre 2 e 14 dias, com média de 5 a 6 dias após a exposição ao vírus (Song *et al.*, 2021). Nesse intervalo, os indivíduos podem permanecer assintomáticos ou desenvolver manifestações clínicas que variam de leves a moderadas, graves ou críticas (Marks; Gulick, 2023).

A maioria dos pacientes com COVID-19 apresenta sintomas leves, como coriza, febre, tosse seca e diarreia. Em casos mais graves, entretanto, a doença pode evoluir para insuficiência respiratória aguda, falência de múltiplos órgãos e lesão cardíaca. Nos quadros críticos, há risco de rápida progressão para síndrome da insuficiência respiratória aguda (SIRA), acidose metabólica, choque séptico, disfunção dos mecanismos de coagulação e falência orgânica múltipla (Huang, C. *et al.*, 2020). Grupos populacionais específicos, como gestantes, idosos e indivíduos com comorbidades pré-existentes incluindo hipertensão, obesidade, tuberculose e diabetes apresentam maior risco de desenvolver formas graves e críticas da doença (Chen *et al.*, 2020; Marks; Gulick, 2023).

Embora a COVID-19 afete principalmente o sistema respiratório, com predileção por células epiteliais pulmonares, evidências apontam que a infecção pode desencadear efeitos sistêmicos já na primeira semana. Entre as manifestações extrapulmonares descritas estão lesões hepáticas, distúrbios gastrointestinais, mialgia, hiposmia, disfunções tireoidianas, plaquetopenia, síndrome de liberação de citocinas e até uma resposta inflamatória exacerbada (Estrada, 2020; Gupta *et al.*, 2020; Hess; Eldahshan; Rutkowski, 2020; Pannone *et al.*, 2021; Raveendran; Misra, 2021).

Mesmo após a recuperação da infecção aguda inicial a COVID-19 pode deixar sequelas que persistem por semanas, meses ou até mais de um ano, estas manifestações são denominadas Sequelas Pós Aguda da COVID 19 (SPAC). Entre os sintomas, estão os neurológicos, sendo

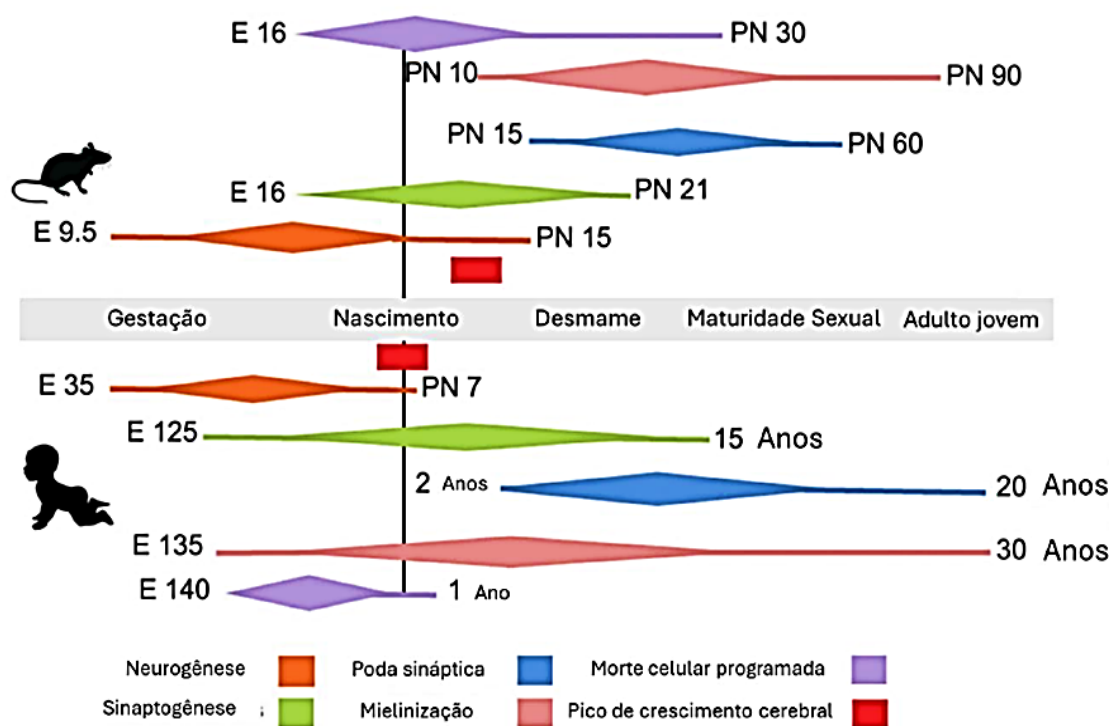
esses os mais relatados na literatura como, fadiga, confusão mental, dificuldades de memória e cefaleia. Além disso, são relatadas complicações neuropsiquiátricas (Augustin *et al.*, 2021; Premraj *et al.*, 2022; Simani *et al.*, 2021; Theofilis *et al.*, 2024).

1.4 Sequelas Pós-Agudas da COVID-19 (SPAC) em Humanos e Murino

Após a infecção aguda inicial, uma variedade de sintomas persistentes tem sido relatado, podendo se manifestar e até três meses após a infecção em humanos (Davis *et al.*, 2021; Rutjanawech; Sritipsukho; Sritipsukho, 2024). Em modelos *in vivo*, no entanto, a duração desses sintomas varia conforme o modelo animal utilizado e o delineamento experimental. Por exemplo, em modelos de camundongos infectados pelo SARS-CoV-2, foram observadas alterações pulmonares e neuro inflamatórias após 24 horas, 15 e 30 dias da infecção (Saenkhamsing *et al.*, 2024), bem como aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , além de ativação de macrófagos (Nascimento *et al.*, 2024). Essas alterações podem persistir por várias semanas após a infecção inicial. Esses períodos podem não corresponder exatamente aos observados em humanos devido a diferenças fisiológicas entre as espécies (Figura 2).

No estudo de Dantas *et al.* (2023), camundongos jovens adultos de cerca de 3 meses de idade, equivalentes a jovens adultos humanos com aproximadamente 30 anos, foram submetidos a testes comportamentais relacionados à ansiedade, cognição e depressão, em diferentes momentos após a administração da proteína Spike (15, 30, 45 e 60 dias), simulando a progressão temporal das sequelas pós-aguda da COVID-19 (SPAC).

Figura 2- Principais processos de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) em camundongos e humanos.



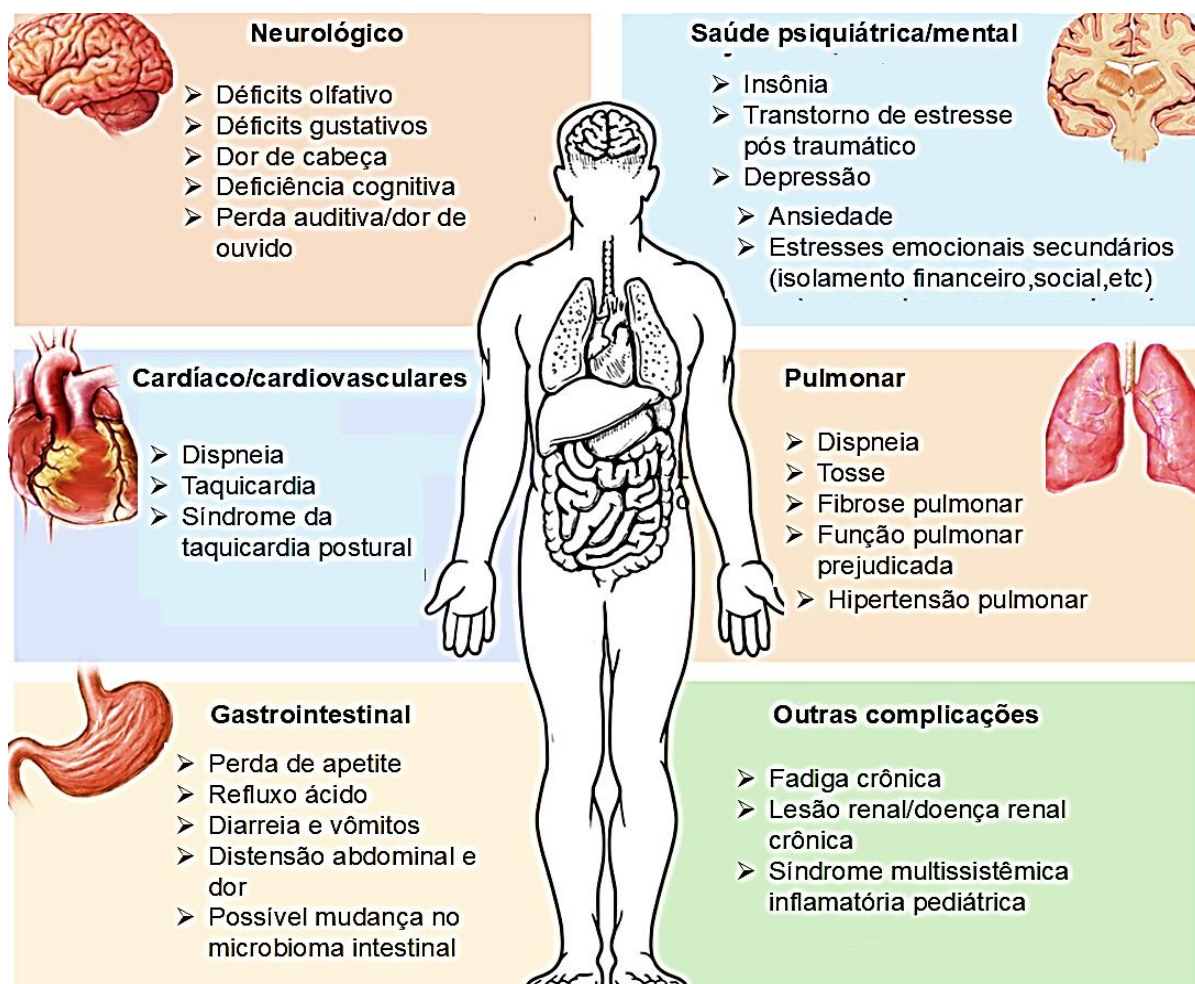
Fonte: Adaptado de Zeiss (2021)

Linhas de tempo aproximadas desses processos são mostradas em relação aos eventos âncora de nascimento, desmame, maturidade sexual e idade adulta. Os surtos de crescimento cerebral são mostrados em vermelho. Os processos individuais são codificados por cores, com pico de atividade indicado pela porção mais larga do diamante. E (Embryonic Day - Dia Embrionário): Representa os dias de desenvolvimento embrionário antes do nascimento. PN (Postnatal Day - Dia Pós-Natal): Indica os dias após o nascimento.

A SPAC ocorre independentemente da variante viral (Canas *et al.*, 2023), e foi formalmente reconhecida como condição pós-COVID-19 (OMS, 2021). Desde então, passou a constar na Classificação Internacional de Doenças (CID) sob o código U09.9, em resposta ao aumento de relatos de manifestações sistêmicas e neuropsiquiátricas inexplicáveis após a fase aguda da infecção (Rocha *et al.*, 2024)

Entre os sintomas mais prevalentes da SPAC, destacam-se manifestações neuropsiquiátricas, como depressão, ansiedade, alterações cognitivas na interação social e outros, conforme observado na Figura 3 (Jiang *et al.*, 2021).

Figura 3 - Manifestações extrapulmonares causadas pelo o SARS- CoV- 2: Principais implicações clínicas e sistêmicas da SPAC.



Fonte: Adaptado de (Jiang *et al.*, 2021).

A SPAC pode variar conforme a variante viral (Premraj *et al.*, 2022), que causou a infecção, como as variantes Alfa (B.1.1.7), Delta (B.1.617.2) e Ômicron (B.1.1.529/BA.1). A variante Alfa foi associada a uma maior diversidade de sintomas (Fernández-de-Las-Peñas *et al.*, 2022). Além de afetar a qualidade de vida, pode resultar em absenteísmo, a queda na produtividade ao retomar as atividades cotidianas e à dificuldade de reinserção no mercado de trabalho. Segundo Huang e colaboradores (2022), muitos pacientes internados devido à a infecção por SARS-CoV-2 relataram não conseguir retomar suas funções profissionais mesmo após dois anos (Huang *et al.*, 2022).

Em humanos, evidências recentes revelam que sintomas neurocognitivos — como “*brain fog*” (nevoeiro mental), déficit de memória e diminuição da capacidade de concentração — podem persistir por até cinco anos após a infecção inicial por SARS-CoV-2. Um estudo

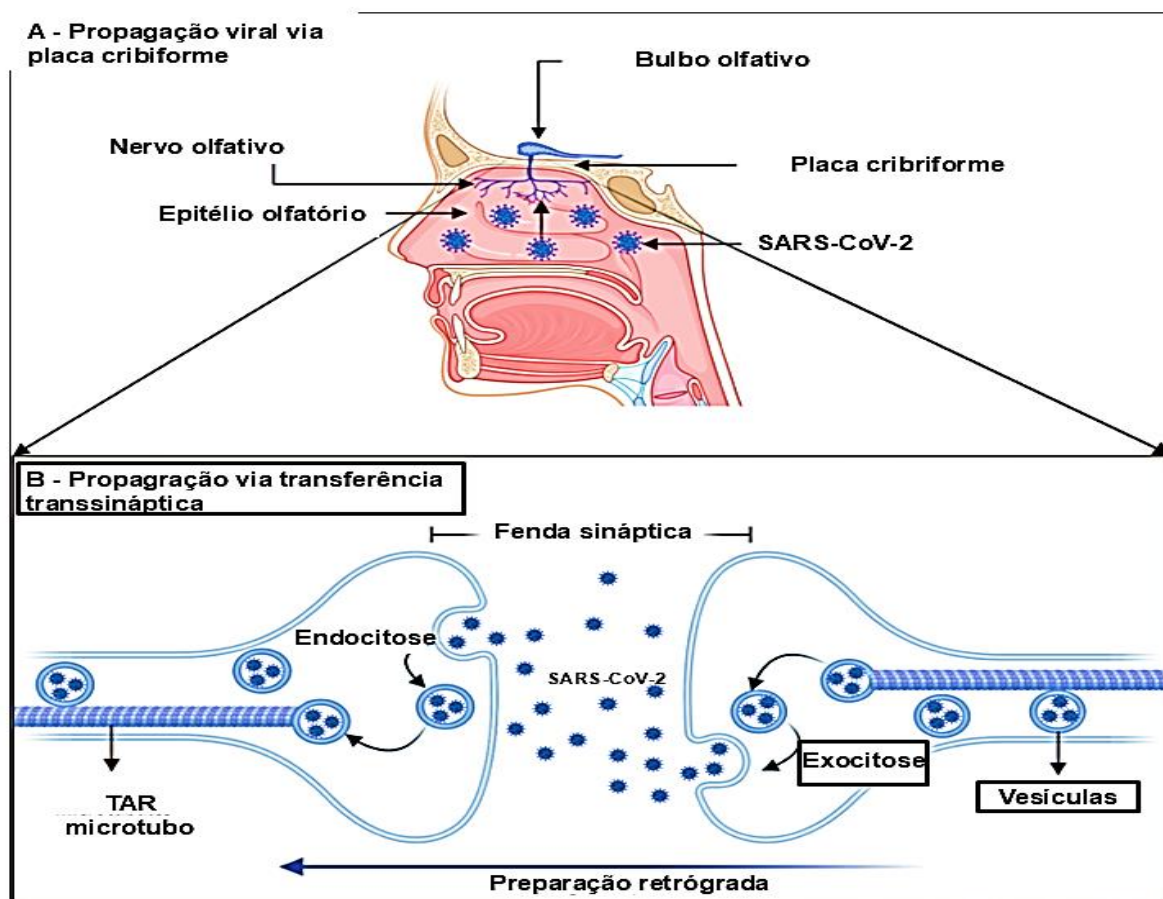
multicêntrico com sobreviventes hospitalizados mostrou que a prevalência de sintomas como “*brain fog*” e perda de memória manteve-se estável em até cinco anos, embora com tendência de redução gradual ao longo do tempo, segundo curvas exponenciais de recuperação (Fernández-de-Las-Peñas *et al.*, 2024).

A duração das SPAC ainda não é completamente esclarecida, mas estudos recentes sugerem que dois fatores principais podem influenciar sua persistência: a presença do antígeno viral no organismo e a manutenção de respostas imunes específicas ao SARS-CoV-2. Isso significa que, em algumas pessoas, mesmo após a resolução da infecção aguda, vestígios virais ou a ativação imunológica contínua podem contribuir para a permanência dos sintomas, dificultando a recuperação completa. Esses processos inflamatórios crônicos podem afetar o sistema nervoso, levando a sintomas neurológicos persistentes (Files *et al.*, 2021; McCormick; Khapersky, 2017; Song *et al.*, 2021).

1. 6 Neuroinvasão no Sistema Nervoso Central pelo SARS-CoV-2

Entre os possíveis mecanismos de neuroinvasão do SARS-CoV-2, destaca-se a via de propagação transsináptica (Figura 4), como uma das hipóteses mais discutidas (Li *et al.*, 2013). Nessa rota, o vírus inicialmente entra no organismo pela cavidade oro-nasal, infectando a mucosa nasal e, em seguida o nervo olfatório. Através das sinapses, o vírus migra entre os neurônios, utilizando tanto vias endocíticas como ectocíticas, que são mediadas pela membrana plasmática. Este transporte ocorre em um sentido reverso, permitindo a disseminação viral até os neurônios medulares e, subsequentemente, o cérebro. Para a propagação intracelular, o SARS-CoV-2 utiliza os microtúbulos axonais facilitando sua disseminação dentro dos neurônios e sua chegada a diferentes regiões do sistema nervoso central (Li *et al.*, 2013).

Figura 4- Propagação Viral pela via cribriforme e rota transsináptica.



Fonte adaptado: (Zubair *et al.*, 2020).

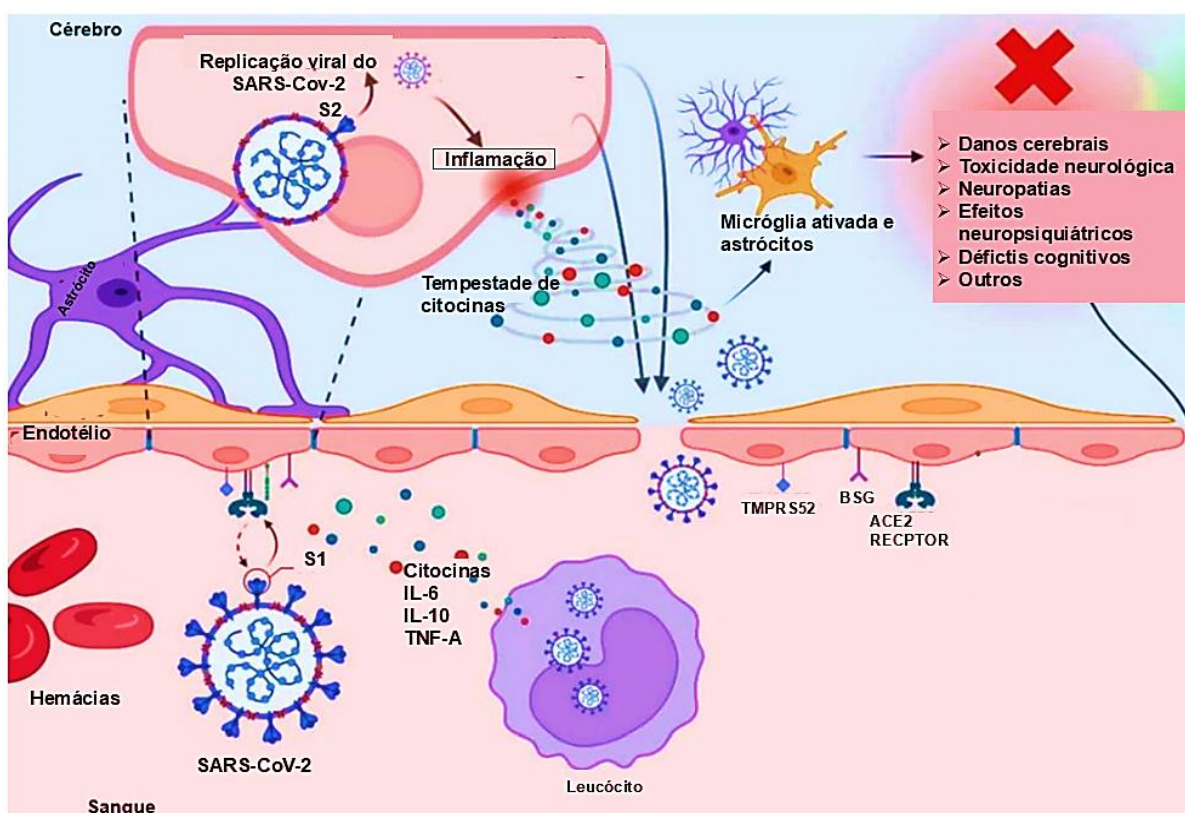
A) As células infectadas atravessam a placa cribriforme do osso etmoide craniano, alcançando o bulbo olfativo, e de lá, invadem o sistema nervoso central. (B) O SARS-CoV-2 propaga-se de forma retrógrada através da transferência do transporte axonal rápido (TAR), utilizando processos de endocitose e exocitose, além do transporte axonal mediado por vesículas, o que facilita o movimento do vírus ao longo dos microtúbulos até os corpos celulares neuronais.

Além da rota neuronal, a via hematogênica também representa uma importante possibilidade de acesso viral ao sistema nervoso central. O vírus é transportado pelos leucócitos através do endotélio vascular, ultrapassando a BHE e alcançando o sistema nervoso central (SNC) (De Melo *et al.*, 2021; Hernández-Parra *et al.*, 2023). Como o SARS-CoV-2 é um vírus neurotrópico (Paniz-Mondolfi *et al.*, 2020 (Paniz-Mondolfi *et al.*, 2020), ele apresenta a capacidade de invadir diretamente o SNC. Essa infecção é facilitada pela modulação da resposta imunológica do hospedeiro, a qual contribui para a disseminação viral no cérebro e gera uma inflamação neurogênica (De Melo *et al.*, 2021; Hernández-Parra *et al.*, 2023; Bajinka *et al.*,

2022).

A infecção viral direta de células cerebrais ainda não está completamente estabelecida (Fullard *et al.*, 2021; Krasemann *et al.*, 2022; Meinhardt *et al.*, 2024). Sabe-se que a infecção periférica e a subsequente resposta imunológica desempenham um papel crucial no desenvolvimento da neuroinflamação. O aumento de citocinas e quimiocinas circulantes no sangue pode comprometer a integridade da barreira hemato encefálica (BHE), facilitando a entrada de células imunes e de moléculas inflamatórias no SNC, o que agrava o processo inflamatório no cérebro (Figura 5) (Meinhardt *et al.*, 2024; Poloni *et al.*, 2021; Schulte-Schrepping *et al.*, 2020; Wenzel *et al.*, 2021).

Figura 5- Via hematogênica, o transporte do SARS-CoV-2 através do sistema sanguíneo, onde o vírus é levado pelos leucócitos. Estes atravessam o endotélio vascular e entram BHE, permitindo a disseminação do vírus para o SNC.



Fonte: adaptado de (Hernández-Parra *et al.*, 2023).

A figura mostra o vírus SARS-CoV-2 interagir com células endoteliais por meio da sua proteína Spike, cujas subunidades S1 e S2 mediam a ligação e a fusão com a célula hospedeira. A subunidade S1 reconhece e se liga a receptores específicos na superfície endotelial, como a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), a proteína Basigin (BSG) e a serina protease transmembranar 2 (TMPRSS2), facilitando a entrada viral. Essa interação, juntamente com a liberação de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-10 e TNF- α por leucócitos circulantes,

contribui para a disfunção da barreira hematoencefálica (BHE), favorecendo sua permeabilidade. Como consequência, tanto o vírus quanto as citocinas atravessam o endotélio e alcançam o tecido cerebral. No SNC, o vírus pode infectar astrócitos, nos quais ocorre replicação viral mediada pela subunidade S2, promovendo inflamação local. Além disso, observa-se a ativação de micróglia e astrócitos, intensificando a liberação de citocinas e caracterizando uma tempestade de citocinas no ambiente cerebral. Esses eventos desencadeiam efeitos deletérios como danos cerebrais, toxicidade neurológica, neuropatias periféricas e centrais, alterações neuropsiquiátricas e déficits cognitivos, os quais estão destacados na área em vermelho na parte superior direita da imagem.

Uma vez no cérebro, o vírus pode causar inflamação, ativando células da glia como, micróglia e astrócitos, o que contribui para a resposta inflamatória e a tempestade de citocinas associada a danos nos tecidos neuronais (Hernández-Parra *et al.*, 2023).

O impacto da SPAC sobre o SNC pode ser explicado pela interação direta do vírus com o cérebro, resultando na liberação de citocinas pró-inflamatórias e em uma resposta imune alterada que pode levar a danos cerebrais a longo prazo (Zhou *et al.*, 2020). Portanto, a neuroinflamação induzida pelo SARS-CoV-2 tem um papel central nas complicações neurológicas associadas à infecção, e as respostas imunes decorrentes da infecção podem continuar a afetar o cérebro por um período prolongado após a infecção inicial (Zhou *et al.*, 2020).

1.7 Neuroinflamação causada pela proteína Spike do SARS –CoV-2

Há presença do receptor ACE2 em diversos tecidos do corpo humano, expressos nas superfícies das células do pulmão, fígado, coração, intestino, endotélio vascular, rim e testículo, (YAN *et al.*, 2020; WAN *et al.*, 2020). Além disso esse receptor também é expresso em várias regiões do cérebro (Zubair *et al.*, 2020), como em neurônios e células gliais, astrócitos e oligodendrócitos (Chen *et al.*, 2021) (Figura 6). O receptor da ACE2 está localizado na membrana celular (Xiao; Haack; Zucker, 2013), além de ser detectada em células da glia e nas vias simpáticas do tronco cerebral (Xia; Lazartigues, 2008; Doobay *et al.*, 2007), como também identificada em outras regiões cerebrais como, a substância negra, ventrículos, giro temporal médio, córtex singular posterior e bulbo olfatório (Chen *et al.*, 2021).

A proteína Spike pode gerar danos adicionais por meio da ativação de receptores do tipo toll (TLRs), TLR3, TLR7 e TLR8, que reconhecem RNA viral, o que leva à secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- α e IFN tipo I de forma independente da entrada viral (Onofrio *et al.*, 2020) e essa ativação parece estar relacionada à hiperinflamação (Zhao *et*

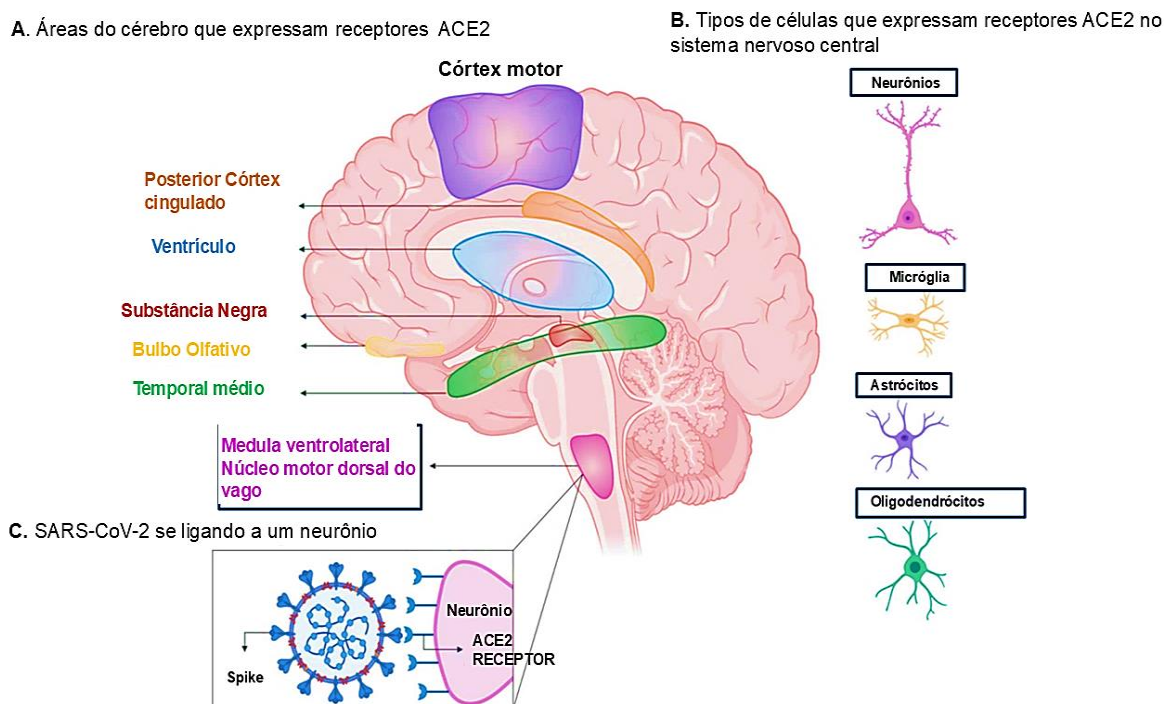
al., 2021).

Um estudo recente demonstrou que a subunidade S1 da proteína Spike do SARS-CoV-2 é capaz de atravessar a BHE em camundongos (Rhea *et al.*, 2021). Em modelos *in vitro*, a introdução dessa proteína resultou na perda de integridade da BHE, sugerindo que componentes virais podem comprometer sua função. Evidências adicionais indicam que proteínas do SARS-CoV-2 desencadeiam uma resposta pró-inflamatória em células endoteliais cerebrais, o que pode contribuir para a disfunção da BHE (Buzhdygan *et al.*, 2020).

Outro achado relevante refere-se à associação entre a presença do alelo E4 da apolipoproteína E (APOE4) uma variante genética fortemente relacionada ao risco de demência e a maior gravidade da COVID-19 (Kuo *et al.*, 2020). Esses dados podem ajudar a esclarecer o surgimento de manifestações neurológicas durante ou após a infecção pelo SARS-CoV-2.

Apesar de o vírus ter sido detectado no SNC de pacientes humanos e em modelos animais (Moriguchi *et al.*, 2020), ainda são pouco compreendidos os fatores de risco associados às complicações neurológicas, os mecanismos de neuroinvasão e a capacidade do vírus de infectar diretamente células neurais.

Figura 6- Representação de Receptores ACE2 no Sistema Nervoso Central e Ligação do SARS-CoV-2 a Neurônios.



Fonte: adaptado: (Zubair *et al.*, 2020).

Receptores ACE2 são expressos em várias regiões do cérebro, incluindo o córtex motor, córtex cingulado posterior, ventrículos, substância negra, bulbo olfativo, giro temporal médio, medula ventrolateral e núcleo motor dorsal do nervo vago (A). Além disso, esses receptores estão presentes em tipos celulares-chave do sistema nervoso central, como neurônios, micróglia, astrócitos e oligodendrócitos (B). O painel (C) ilustra a interação dos receptores ACE2 na membrana de um neurônio com a proteína Spike do SARS CoV-2.

1. 8 Sistema imunológico, SARS CoV-2 e SPAC

A resposta imune ao SARS-CoV-2 desempenha um papel central no desenvolvimento da SPAC, caracterizada pela persistência de sintomas além da fase inicial da infecção. Esta condição tem sido associada a uma disfunção imune prolongada, na qual a inflamação sistêmica e a resposta imunológica desregulada contribuem para manifestações clínicas que afetam múltiplos sistemas do corpo, incluindo o sistema nervoso central (Raghavan; Kenchappa; Leo, 2021).

A tempestade de citocinas na COVID-19 é uma resposta exacerbada do sistema imune, mediada principalmente pela ativação da resposta Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α)

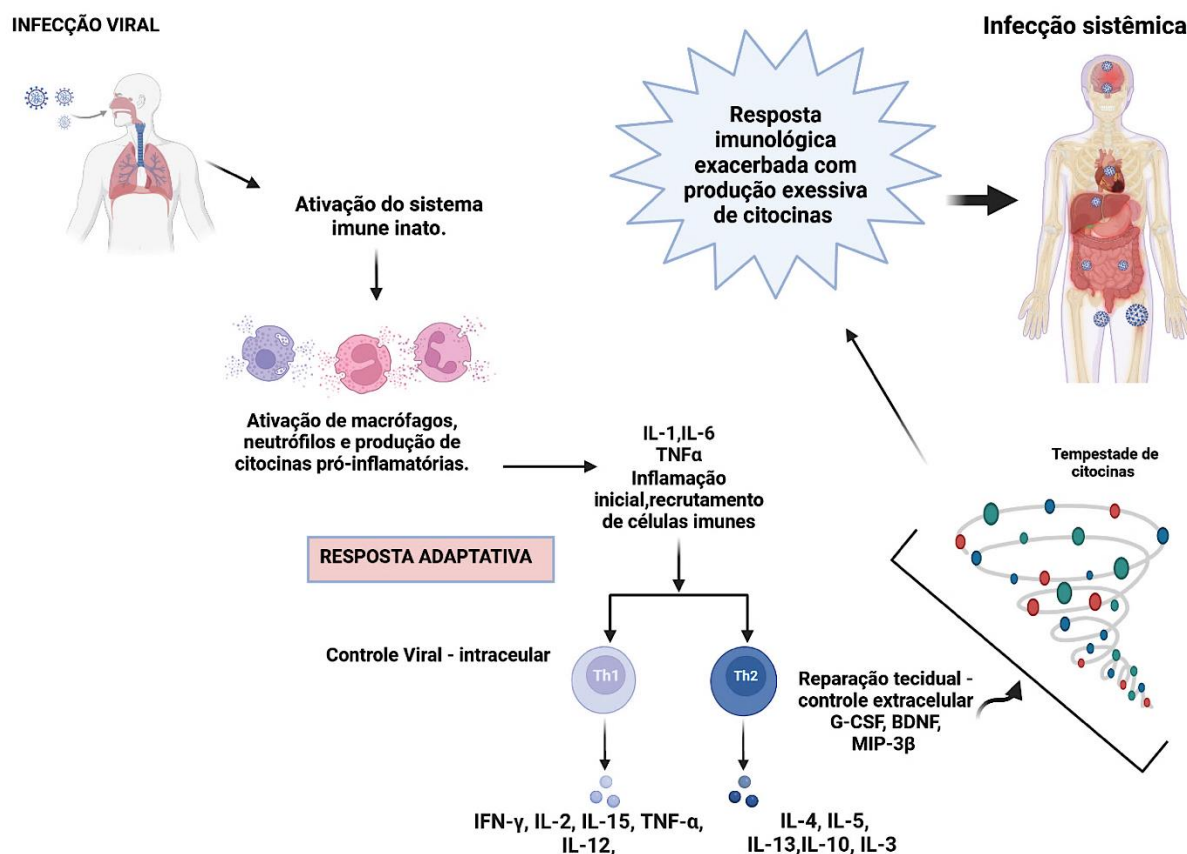
e interleucina-2 (IL-2), que auxiliam no controle inicial da infecção, mas também contribuem para inflamação tecidual e danos sistêmicos. Embora a resposta Th2, associada a interleucinas (IL-4, IL-5 e IL-13), seja mais voltada para a produção de anticorpos e reparação tecidual, sua ativação desregulada pode ocorrer em fases tardias da doença, favorecendo fibrose pulmonar e sequelas pós-agudas. Assim, o desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 pode amplificar os impactos da COVID-19, tanto na fase inicial quanto em suas complicações de longo prazo (Behrens, 2019; Coperchini *et al.*, 2021).

Essa infecção sistêmica resulta em um aumento expressivo de fatores pró-inflamatórios na circulação sanguínea, caracterizado como uma tempestade de citocinas. Esse processo envolve o acúmulo do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e da interleucina-6 (IL-6), além da ativação de receptores *toll-like* (TLRs) no cérebro, levando à disfunção da barreira hematoencefálica, ao comprometimento da microvascularização cerebral e à neuroinflamação (Silva *et al.*, 2022), estudos evidenciam que a doença pode predispor a ativação de vias relacionadas a doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer e parkinsonismo pós-encefálico (Silva *et al.*, 2022).

Em indivíduos com SPAC, observa-se um desequilíbrio imunológico persistente. A hiperativação da resposta Th1 durante a FA, pode ser seguida por uma resposta Th2 desregulada, favorecendo a manutenção de um estado inflamatório crônico. Essa condição está associada a sintomas prolongados como fadiga, dificuldades cognitivas e manifestações neuropsiquiátricas (Coperchini *et al.*, 2021). Além disso, estudos indicam que pacientes infectados apresentam níveis elevados de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-6, IL-15 e IP-10, bem como citocinas reguladoras como IL-10 e IL-13, em comparação com indivíduos não infectados. Esse perfil inflamatório e imunológico está associado tanto à gravidade da infecção aguda quanto ao risco de desenvolvimento de complicações de longo prazo (Gil-Etayo *et al.*, 2021) (Figura 7).

Modelos murinos têm demonstrado efeitos similares aos observados em humanos, com ativação de células gliais, aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e resposta neuroinflamatória, mesmo sem infecção viral direta no cérebro. Estudos como os de Rhea *et al.* (2021) e Buzhdygan *et al.* (2020) demonstraram que a subunidade S1 da proteína Spike é capaz de atravessar a BHE em camundongos e induzir inflamação em células endoteliais cerebrais.

Figura 7- A imagem destaca a ativação do sistema imune inato e adaptativo, bem como a possibilidade de evolução para uma resposta exacerbada.



Fonte: Criado pela autora em software BioRender.

O esquema mostra a ativação inicial de macrófagos e neutrófilos, levando à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α . Em seguida, a resposta adaptativa se desenvolve, com a diferenciação de linfócitos Th1, envolvidos no controle viral intracelular, e Th2, responsáveis pela reparação tecidual e controle extracelular. No entanto, uma resposta imunológica desregulada pode levar à produção excessiva de citocinas, resultando em uma "tempestade de citocinas" e infecção sistêmica.

A resposta imunológica adaptativa na COVID-19, envolvendo principalmente as vias Th1, Th2 e respostas associadas a neutrófilo (Tabela 1), apresenta variações significativas de acordo com a gravidade da infecção (Machado *et al.*, 2004). Indivíduos assintomáticos frequentemente exibem uma imunidade predominantemente Th1, caracterizada pela produção de IFN- γ , essencial no controle viral (Lyadova; Panteleev, 2015). Em contrapartida, foi observado com mais frequências pacientes graves apresentam redução da resposta Th1 e aumento da atividade Th17, que pode levar à inflamação excessiva e dano tecidual (Gil-Etayo *et al.*, 2022; Lyadova; Panteleev, 2015). Pacientes que evoluem para óbito frequentemente exibem alterações na resposta imunológica, com alguns estudos sugerindo um envolvimento da resposta Th2, marcada por níveis elevados de IL-15, o que destaca o impacto de diferentes perfis imunológicos nos desfechos da infecção (Gil-Etayo *et al.*, 2021).

No contexto da SPAC, ainda há lacunas no entendimento de quais respostas imunológicas, como Th1 ou Th2, determinam o prolongamento dos sintomas, para guiar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas. Evidências sugerem que a persistência de uma inflamação de baixo grau, possivelmente mediada por desregulação das vias Th1 e Th2, pode contribuir para os sintomas prolongados, como fadiga crônica, alterações cognitivas, dor muscular, disfunções respiratórias e distúrbios do sono (Coperchini *et al.*, 2021). No entanto, os mecanismos exatos que sustentam essa inflamação crônica e o papel de cada perfil imunológico ainda não foram completamente esclarecidos. Embora a vacinação contra o SARS-CoV-2 promova a produção de anticorpos contra o vírus, a eficácia da vacina pode ser reduzida diante de variantes emergentes do vírus (Carrillo *et al.*, 2021). Contribuindo para o desafio contínuo da SPAC, a persistência de sintomas.

Tabela 1- Diferenças Funcionais, Moleculares e Citocinas/Interleucinas Associadas aos Subtipos de Células T Helper (Th1, Th2) e neutrófilos.

Célula T Helper	Citocinas/Interleucinas e Moléculas Associadas	Funções	Referências
Th1	IFN- γ , IL-2, IL-15, TNF- α , IL-12	Defesa contra patógenos intracelulares (vírus, bactérias como <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , protozoários como <i>Leishmania</i>), ativação de macrófagos, imunidade celular	(Abbas et al., 2021; Cunningham, 2002; Seder e Ahmed, 2003; Trinchieri, 2003)
Th2	IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-3	Defesa contra patógenos extracelulares (helmintos, alérgenos, parasitas extracelulares como <i>Trypanosoma</i>), ativação de células B, produção de anticorpos	(Abbas et al., 2021; Dudakov; Hanash; van den Brink, 2015; Finkelman et al., 2004; Murphy; Weaver, 2016)
Neutrófilo	G-CSF, MMP-9, PDGF, FGF, Angiopoietin-1, BDNF, C-Reactive Protein, EGF, MIP-3 α , MIP-3 β , Thrombospondin-1	Fagocitose de patógenos, reparação tecidual, angiogênese, regulação metabólica, modulação da inflamação	(Abbas; Lichtman; Pillai, 2021; Gerhardt; Betsholtz, 2003; Yancopoulos et al., 2000)

Fonte: Criado pela autora.

1.9 Modelos animais em estudos translacionais da SPAC

Os modelos animais desempenham um papel essencial no desenvolvimento de novos medicamentos, no entanto, para serem eficazes, devem ser preditivos, ou seja, capazes de replicar características centrais da doença em humanos. Isso implica apresentar semelhança com os sintomas clínicos, responder aos tratamentos esperados e reproduzir os mecanismos

fisiopatológicos descritos para a enfermidade (Willner; Mitchell, 2002).

O genoma dos camundongos é aproximadamente 99% idêntico ao dos seres humanos, e há semelhanças fisiológicas significativas entre as duas espécies. Além disso, os camundongos apresentam vantagens como pequeno porte, alta taxa reprodutiva, facilidade de acesso e possibilidade de modificação genética com baixo custo. Por esses motivos, os modelos murinos tornaram-se uma base essencial da pesquisa biomédica. Desde o final do século XVIII, os camundongos vêm sendo os animais experimentais mais utilizados, representando cerca de 59% do total de animais empregados em estudos científicos (Liu; Kitajima; Morimoto, 2005).

No caso do SARS-CoV-2, já foi demonstrada sua capacidade de alcançar o cérebro tanto em pacientes quanto em modelos animais (Moriguchi *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2021) além de infectar diretamente células do sistema nervoso (Wang *et al.*, 2021) e células neurais humanas *in vitro* (Pellegrini *et al.*, 2020).

A comparação entre o desenvolvimento cerebral de roedores e humanos possui relevância translacional significativa no estudo de doenças neurológicas e transtornos do neurodesenvolvimento, ratos e camundongos são amplamente utilizados por compartilharem diversos processos neurobiológicos fundamentais com os humanos (Zeiss, 2021).

Esses modelos permitem investigar as complexas interações entre o vírus e o sistema imunológico do hospedeiro, bem como os danos causados em diferentes órgãos, incluindo o SNC (Muñoz-Fontela *et al.*, 2020; Sia *et al.*, 2020). Assim, são fundamentais para compreender a replicação viral, a ativação de vias imunológicas e a eficácia de estratégias terapêuticas por meio de experimentos controlados (Zhao *et al.*, 2020; Imai *et al.*, 2021).

O perfil de resposta imune do hospedeiro tem sido apontado como fator preditor para o desenvolvimento da SPAC. As citocinas produzidas por células T *helper* tipo 1 (Th1) são mais eficazes contra infecções virais, enquanto as respostas Th2 estão associadas ao combate de patógenos extracelulares, são mais eficazes contra infecções virais, enquanto as respostas das células T *helper* tipo 2 (Th2) são mais voltadas ao combate de patógenos extracelulares (Abbas; Lichtman; Pillai, 2021).

Ciente disso, animais de laboratório são escolhidos com base em seus perfis imunológicos específicos para o estudo da fisiopatologia das doenças. Nesse contexto, camundongos da linhagem BALB/c são frequentemente utilizados como modelo em pesquisas relacionadas com patógenos virais e modelo de neuroinflamação, devido as várias características comportamentais como, déficit cognitivo, comportamentos de desorganização, resposta alterada a estímulos, alterações neurobiológicas, como desequilíbrios nos sistemas

dopaminérgico, que são relevantes na patogênese da SPAC. Esses camundongos mostram uma resposta emocional elevada ao estresse e comportamentos de ansiedade, tornando-os adequados para estudos que investigam os mecanismos neurobiológicos e os efeitos de intervenções terapêuticas (Chen *et al.*, 2023).

Os camundongos BALB/c, conhecidos por sua predisposição a reações alérgicas e respostas imunes do tipo Th2, têm sido utilizados em modelos experimentais para investigar os mecanismos subjacentes à SPAC e outras condições neuropsiquiátricas (Wang *et al.*, 2020). Enquanto os camundongos da linhagem C57BL/6, é frequentemente utilizado em estudos sobre diabetes, obesidade e doenças neurodegenerativas devido à sua robusta resposta imunológica e facilidade de manipulação genética apresentam resposta predominantemente Th1.

Em camundongos C57BL/6, a exposição à proteína Spike induziu forte resposta inflamatória, com elevação de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α , ativação de macrófagos e piora da inflamação intestinal (Nascimento *et al.*, 2024). A Spike mimetizou a resposta imunológica observada na SPAC, com ativação combinada das respostas Th1, Th2, características da inflamação crônica pós-infecciosa (Gil-Etayo *et al.*, 2021; Wenzel *et al.*, 2021). Camundongos jovens são mais adequados para investigar a progressão da infecção e os efeitos cerebrais do vírus (Subbarao *et al.*, 2004).

O sexo influencia a resposta imune: fêmeas tendem a apresentar respostas mais intensas, enquanto machos mostram respostas imunológicas mais moderadas (Zhao *et al.*, 2020). Essas descobertas reforçam a importância de compreender como diferentes vias imunológicas, como as respostas Th1 e Th2, contribuem para a persistência dos sintomas e os danos neurológicos observados na SPAC. Dessa forma, considerando o impacto da SPAC na saúde mental, o presente estudo busca fornecer novas perspectivas sobre os mecanismos envolvidos na síndrome.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A pandemia de COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, marcou um dos maiores desafios de saúde pública da história recente. Diversas estratégias farmacológicas foram sugeridas para o manejo da doença, incluindo o uso de corticosteroides (Valkov; Argirova; Dimitrov, 2024), agentes antivirais (Obomanu *et al.*, 2024), imunomoduladores, imunoglobulinas e terapia antiplaquetária com plasma convalescente, que apresentaram resultados satisfatórios a curto prazo e controle da coagulação (Florescu *et al.*, 2023). Com o avanço das pesquisas, as vacinas têm atuado de forma preventiva, contribuindo para a redução da mortalidade (Kricorian; Civen; Equils, 2022). A relação entre a proteína Spike do SARS-CoV-2 e o SNC tem despertado crescente interesse entre cientistas e médicos. Estudos epidemiológicos mostram que o vírus pode infectar pessoas de todas as idades, causando uma ampla gama de complicações neurológicas. Embora diversos estudos tenham investigado os efeitos da Spike no organismo humano, a compreensão dos mecanismos específicos pelos quais a proteína Spike influencia o SNC e desencadeia alterações imunológicas prolongadas levando a sintomas neuropsiquiátricos ainda é limitada.

A proteína Spike desempenha um papel fundamental na interação do vírus com o organismo, sendo diretamente responsável pela entrada do patógeno nas células hospedeiras e pelos processos inflamatórios subsequentes (Hoffmann *et al.*, 2020). No entanto, os mecanismos detalhados que relacionam essa proteína à neuroinflamação e às alterações comportamentais características da SPAC permanecem em grande parte desconhecidos, o papel das respostas imunológicas Th1 e Th2, e como essas vias podem contribuir para os sintomas neurológicos e psiquiátricos persistentes, ainda não foi amplamente explorado. A persistência dos sintomas da SPAC sugere a existência de um estado inflamatório crônico que, se não controlado, pode impactar significativamente a qualidade de vida dos pacientes e a saúde pública global.

Este trabalho é relevante, pois busca correlacionar respostas imunológicas específicas com alterações neurocomportamentais agudas e persistentes em um modelo pré-clínico ao explorar os mecanismos subjacentes à interação entre a proteína Spike e o SNC, com foco nos processos neuro inflamatórios, espera-se identificar alvos terapêuticos potenciais e estratégias que possam mitigar os efeitos debilitantes dessa condição. Para abordar essas lacunas, o presente estudo utilizou camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 como modelos experimentais. Essas linhagens são amplamente empregadas em pesquisas biomédicas devido

às suas características imunológicas distintas, que permitem uma investigação detalhada da relação entre inflamação sistêmica e neuroinflamação. A utilização de modelos animais possibilita a reprodução de condições experimentais controladas, permitindo a avaliação de alterações comportamentais, neuroquímicas e imunológicas de forma que não seria viável em estudos clínicos. Além disso, a escolha de investigar as respostas imunológicas Th1 e Th2 juntamente com análises comportamentais oferece uma abordagem inovadora, proporcionando uma visão abrangente dos mecanismos envolvidos na SPAC.

Neste estudo, investigamos a interação sistêmica da proteína Spike do SARS-CoV-2 por meio da inoculação intraperitoneal em camundongos, analisando seus efeitos no sistema nervoso central, além de suas implicações imunológicas e funcionais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a influência dos perfis imunogenéticos Th1 e Th2 na susceptibilidade à Síndrome Pós-Aguda da COVID-19 (SPAC), por meio da avaliação dos efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunológicos induzidos pela exposição à proteína Spike do SARS-CoV-2 em modelos murinos C57BL/6 (Th1) e BALB/c (Th2).

3.2 Objetivos específicos

Estudos *in vitro*:

- Avaliar a viabilidade da utilização da proteína Spike em estudos experimentais, verificando sua estabilidade, interação com células e efeitos citotóxicos em astrócitos murinos e células RAW 264.7.
- Analisar a produção de óxido nítrico por astrócitos e células RAW 264.7 após exposição à proteína Spike, como indicador de ativação celular e resposta inflamatória *in vitro*.

Estudos *in vivo*:

- Comparar as respostas induzidas pela exposição à proteína Spike em camundongos BALB/c (perfil Th2) e C57BL/6 (perfil Th1), avaliando:
 - Comportamentos tipo ansioso, depressivo e déficits cognitivos.
 - Alterações nos níveis de dopamina (DA) e seu metabólito DOPAC no corpo estriado, como indicativo de disfunção dopaminérgica.
 - Perfil de citocinas no hipocampo, correlacionando marcadores pró-inflamatórios/neuroinflamatórios e neuroprotetores por meio de análise proteômica multiplex.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. 1 Obtenção da proteína Spike

A proteína Spike do SARS-CoV-2 utilizada no presente estudo foi adquirida da empresa Biolinker (Lote Spike-120923, Anexo 2). A sequência da proteína recombinante corresponde aos aminoácidos 16-1213 do ectodomínio, seguidos de uma cauda, sendo idêntica à sequência publicada por Wrapp *et al.*, (2020) para a variante Alfa (B.1.1.7) do SARS-CoV-2 isolada em Wuhan. A proteína foi produzida em células HEK 293 (*Human Embryonic Kidney 293*), conforme descrito por (Alvim *et al.*, 2021), garantindo densidade estável na conformação trimérica de pré-fusão. Essa conformação inclui os domínios S1, que contém o domínio de ligação ao receptor (RBD) (Wrapp *et al.*, 2020), responsável pela interação com o ACE2, e a S2, que possui uma âncora transmembrana responsável por mediar a fusão entre as membranas viral e da célula hospedeira (Tai *et al.*, 2020). A purificação foi realizada por cromatografia, resultando em uma pureza superior a 90%, validada por análise em gel de eletroforese (SDS-PAGE). O peso molecular estimado foi de aproximadamente 141 kDa. A proteína foi fornecida em solução líquida, utilizando um tampão de fosfato de 50mM, contendo 300mM de NaCl, 10% de glicerol e aproximadamente 175mM de imidazol, ajustado para pH 7,8. A concentração da solução era de 100µg/mL, sendo acondicionada em microtubos de 1mL. O material foi armazenado a -80°C até o momento de sua utilização nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.

4. 1. 1 Cultivo e Manutenção de Linhagens Celulares Murinas de Astrócitos e RAW 264.7

As linhagens utilizadas para os testes foram células murinas de astrócitos e da linhagem de macrófagos RAW 264.7 [ATCC 0212]. Os astrócitos foram previamente isolados, cedidos pelo Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, conforme descrito por (Erustes *et al.*, 2018).

A manutenção e plaqueamento das células foi realizada em ambiente estéril, na câmara de fluxo laminar vertical (ESCO, modelo Biosafe 12, classe II). As culturas foram mantidas em uma incubadora de CO₂ (Panasonic, modelo COM-18ACL-PA) a 37 °C, com atmosfera controlada de 5% de CO₂.

O cultivo celular foi realizado em frascos de cultura com área de 25 cm², contendo 10

mL de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco®), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco®) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco®). O plaqueamento foi realizado quando as células atingiram até 80% de confluência, garantindo condições ótimas de crescimento e viabilidade. O acompanhamento a cada 24 horas do crescimento celular utilizando um microscópio de inversão (Nikon Eclipse Ti).

Para o plaqueamento de células aderentes, o meio de cultura foi removido e o frasco foi lavado duas vezes com PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) estéril para a remoção de restos celulares. Em seguida, foi adicionada tripsina-EDTA a 0,5% (Gibco®), previamente diluída 1:10 em PBS (1x) para desprendimento das células e posteriormente, foi adicionado meio de cultura suplementado com SFB para inativar a ação da tripsina. As células foram então contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em novas garrafas de cultura para continuidade do cultivo.

4. 1.2 Ensaios *in vitro*

Os testes *in vitro*, incluindo o ensaio de MTT para avaliação da atividade citotóxica e a quantificação de nitrito/nitrato pelo método de Griess, foram realizados para verificar a viabilidade da proteína Spike no estudo com astrócitos e células RAW 264.7. Esses experimentos avaliaram sua estabilidade, interação celular, morfologia, citotoxicidade e a produção de nitrito e nitrato.

Além disso, os ensaios *in vitro* foram conduzidos como uma etapa de validação interna prévia à aplicação da proteína nos testes *in vivo*. Os ensaios foram conduzidos utilizando o tempo de 72 horas, permitindo a análise da viabilidade celular após a exposição à proteína Spike nessas linhagens celulares.

4. 1. 3 Avaliação da atividade citotóxica - MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium em sobrenadantes celulares de astrócitos e RAW 264.7.

Análise de citotoxicidade pelo método do MTT foi realizada seguindo o método de Mosmann (1983), para verificar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação, sendo sua quantificação realizada por absorbância em espectrofotômetro (Berridge *et al.*, 1996).

As células RAW 264.7 (2×10^5 células/mL) e os astrócitos (5×10^4 células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubados com a proteína Spike (10 µg/mL, mesma concentração utilizada nos testes *in vivo* por 72 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Ao término da incubação, o sobrenadante removido. Em seguida, 100 µL da solução de MTT (sal de tetrazólio) foram adicionados, e as placas foram incubadas por 3 horas. Após esse período, o MTT foi removido e adicionou-se 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) puro para dissolução do precipitado de formazan e absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro de placa modelo Eon (BioTek) a 595 nm.

As análises morfológicas foram realizadas no microscópio invertido, na objetiva 10x, tanto para os astrócitos quanto RAW 264.7, após 72 horas de tratamento com a proteína Spike, com o intuito de correlacionar com os resultados do teste de citotoxicidade pelo MTT e avaliar as alterações celulares induzidas pela exposição à proteína, como alterações na forma, aderência e proliferatividade das células, além de validar que a proteína estava funcional.

A atividade de ensaios de resposta imune e inflamatória foi realizada no Laboratório de Neuropsicofarmacologia (LNF) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC) por meio de protocolos estabelecidos para as referidas atividades.

4. 1. 4 Determinação da concentração de nitrito/nitrato em sobrenadante celulares de astrócitos RAW 264.7.

Nesse ensaio o reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em água destilada, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%, na proporção 1:1) revela a presença de nitrito/nitrato (NO₂/NO₃) em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo (Green *et al.*, 1982).

Neste estudo, o método foi aplicado para avaliar a produção de NO em sobrenadantes de astrócitos e macrófagos expostos a proteína Spike do SARS-CoV-2. O teste é reconhecido por sua rápida execução, alta sensibilidade e baixo custo. Alterações nos níveis de nitrito/nitrato podem refletir respostas inflamatórias ou processos de apoptose celular quando em concentrações elevadas. (Popescu et al., 2013).

Para a dosagem de nitrito/nitrato (NO₂/NO₃), 100 µL do sobrenadante da cultura foi misturado com 100 µL do reagente de Griess (ácido fosfórico 5%, sulfanilamida 1% e N-(1-naftil)etilenodiamina [NED] 0,1%) e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos (Green

et al., 1982). A curva padrão foi obtida mediante leitura de várias concentrações de nitrito padrão (10; 5; 2,5; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16; 0,08 μM) e os resultados foram expressos em concentração em micromolar (μM).

As leituras da absorbância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentração de cada padrão (x), então foi feita a determinação da equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de nitrito em cada amostra. Os controles brancos consistiram na adição de 100 μL do reagente de Griess a 100 μL do meio de cultura utilizado no experimento. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 540 nm, e os resultados foram expressos como μmol de nitrito por mililitro de sobrenadante.

4. 1. 5 Ensaios *in vivo*

4. 1. 6 Considerações éticas

Este estudo seguiu rigorosamente as recomendações éticas para pesquisas com animais, em conformidade com a legislação brasileira e diretrizes internacionais. Foi conduzido segundo a Lei nº 11.794/08 (Lei Arouca), que regulamenta o uso de animais em experimentação científica, e as resoluções do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), notadamente as Resoluções Normativas nº 55/2022, referente à aplicação dos princípios dos 3Rs (Redução, Refinamento e Substituição), e nº 57/2022, que dispõe sobre práticas de bem-estar animal durante os procedimentos experimentais.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (CEUA-NPDM, protocolo nº 66080523-0) (Anexo 1).

Além disso, os experimentos seguiram as diretrizes internacionais estabelecidas no *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH, 2011) (Percie du Sert et al., 2020).

4. 2 Animais

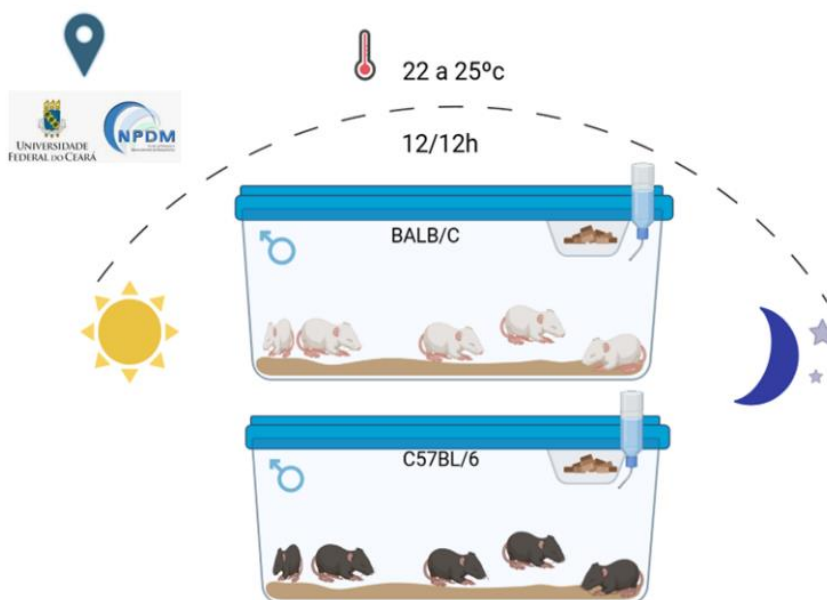
Foram utilizados camundongos isogênicos da espécie *Mus musculus*, das linhagens C57BL/6 e BALB/c, machos adultos, com 90 dias de idade e peso entre 20 e 27 g. Os animais foram obtidos do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), certificado pela *Association for Assessment and*

Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC), garantindo a padronização e qualidade no manejo dos animais.

Os camundongos foram alojados em microisoladores (Micro-Isolator® Systems, Lab Products) com dimensões de 46 cm x 20 cm x 19 cm, totalizando 920 cm² de área útil. Cada microisolador abrigou no máximo cinco animais, com maravalha irradiada como substrato. As condições ambientais foram rigorosamente controladas, mantendo-se temperatura entre 22 °C e 25 °C e ciclo claro/escuro de 12 horas (Figura 8).

Os animais receberam ração industrializada e água estéreis com livre acesso. Para promover o bem-estar, os microisoladores foram enriquecidos com materiais como rolos e cones de papelão, oferecendo estímulos ambientais que favorecem comportamentos naturais e reduzem o estresse (Arraes *et al.*, 2024). Os camundongos permaneceram nessas condições controladas durante todo o período do protocolo experimental.

Figura 8 - Condições de Alojamento para os Camundongos BALB/c e C57BL/6 do NPDM-UFC.



Fonte: Criado pela autora no software BioRender.

4. 2. 1 Delineamento experimental

Foram utilizados um total de 40 animais. Estes foram divididos em C57BL/6 e BALB/c, onde em cada linhagem foi utilizado 20 animais por linhagem. Destes, 10 animais fizeram parte do grupo salina e os demais 10 fizeram parte do grupo exposto com a proteína Spike. Em todos

os grupos, foi utilizado animais machos (6 a 8 semanas), pesando entre 20 e 27 g gramas (Figura 9).

Figura 9- Organização experimental de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6.



Fonte: Criado pela autora no software BioRender.

Distribuídos em dois grupos principais: Salina (controle) e proteína Spike do SARS-CoV-2 (tratado), onde, salina: representa o grupo controle (CX1Sal, CX2Sal para BALB/c e CX3S, CX4S) para o grupo da proteína Spike do SARS-CoV-2(S). Representa o grupo experimental do C57BL/6 (CX5Sal, CX6Sal para grupo salina e CX7S e caixa CX8S para grupo da proteína Spike do SARS-CoV-2 (S)). Cada grupo possui 20 animais (05 por caixa), totalizando 20 animais por linhagem e 40 animais no experimento. Cada caixa possui um identificador único exemplo: (CX1Sal, CX2Sal)

Cada camundongo do grupo tratado foi exposto à proteína Spike do SARS-CoV-2 na concentração de 10 µg/animal/dia e o grupo salina foi tratado com 0,02 mL (20 µL) de solução salina estéril, administrada por via intraperitoneal (ip). Após a exposição, os animais foram monitorados diariamente para sinais clínicos de infecção, incluindo letargia, perda de peso, dificuldade respiratória e alterações comportamentais (Apêndice 1). A temperatura corporal foi medida 30 minutos após a administração com um termômetro infravermelho digital. Na aferição dos pesos, os animais foram pesados a cada sete dias, sendo os dias 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, e 56 após administração das proteínas Spike. A verificação ocorria em horários fixo

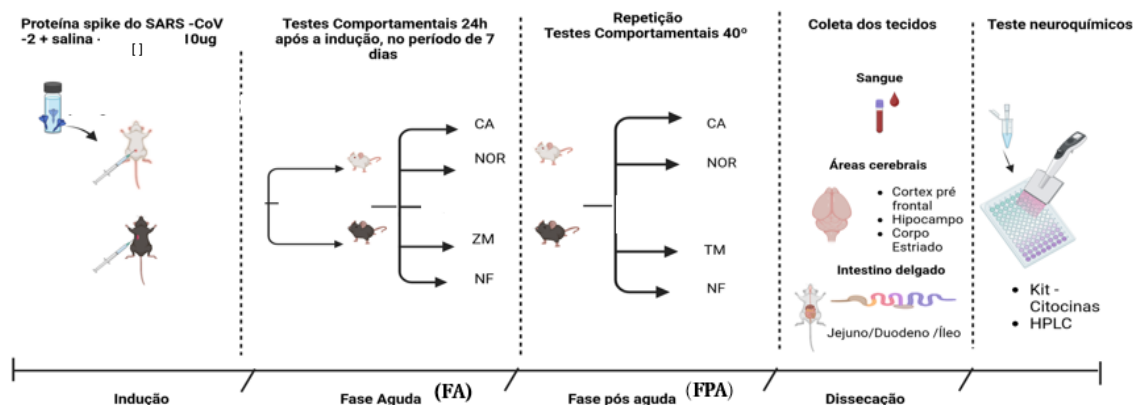
de 10:00 horas para acompanhar o estado de saúde dos animais e evitar influências do ciclo circadiano.

Neste estudo, o modelo experimental seguiu o protocolo com adaptações de Dantas et al. (2023), que investigou o comprometimento cognitivo tardio induzido pela infecção por pela a proteína Spike do SARS-CoV-2 em camundongos. Os ensaios foram conduzidos em duas fases experimentais: (i) fase aguda (FA) até uma semana, com avaliações realizadas nos primeiros sete dias; (ii) fase pós-aguda (FPA), realizada (entre 40 a 45 dias) após administração da proteína viral.

Após 24 horas da administração da proteína Spike, dentro de um período de sete dias para simular FA da infecção, foram submetidos a testes comportamentais para avaliar déficits na atividade locomotora e comportamento ansioso no teste do campo aberto (CA), cognição, memória de curto prazo no teste de reconhecimento do objeto novo (RON), comportamento ansioso no teste do elevado *zero maze* (ZM) e comportamento depressivo no teste do nado forçado (NF). No 40º dia, após o tratamento, foram realizados a repetição dos testes comportamentais da fase aguda, com exceção do teste do *T-maze* (TM) que foi incluído nessa fase final para avaliar a memória de trabalho (Figura 10).

Após a conclusão dos testes da FPA, os animais foram eutanasiados, e seus cérebros foram dissecados para a coleta das áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado), além disso, foram coletadas amostras do intestino delgado (jejuno, duodeno e íleo) e do sangue, obtido por extravasamento do pescoço (região cervical) no momento da guilhotina. Todos os tecidos foram armazenados a -80°C para análises neuroquímicas que foram realizadas para quantificação de monoaminas no corpo estriado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), e alterações nos níveis de citocinas no hipocampo por meio do *Kit Mouse XL Cytokine Array* (R&D Systems/ARY028, (Figura 10).

Figura 10- Representação do protocolo experimental.



Fonte: Criado pela autora no software BioRender.

Camundongos receberam 10 µg da proteína Spike do SARS-CoV-2 (ou salina estéril, 20 µL, i.p.) e foram submetidos a duas fases experimentais: fase aguda (FA, até 7 dias) e fase pós-aguda (FPA, aos 40 dias). Foram realizados testes comportamentais para avaliação da locomoção, no teste de campo aberto (CA), cognição no teste reconhecimento do objeto novo (RON), comportamento ansioso no teste *zero maze* (ZM), memória espacial no teste T maze (TM) e depressivo no teste nado forçado (NF). Após os testes, foram coletados sangue, regiões cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado) e segmentos do intestino delgado (jejuno, duodeno, íleo). As análises neuroquímicas incluíram dosagem de monoaminas por HPLC e quantificação de citocinas por *array* de citocinas (Mouse XL Cytokine Array Kit, R&D Systems).

Para determinar o tamanho amostral utilizado ($n = 10$ camundongos por grupo), baseamo-nos em estudos prévios como o de Dantas et al. (2023), que demonstrou que esse número amostral foi adequado para detectar diferenças significativas em testes comportamentais e moleculares, com poder estatístico suficiente (geralmente $\geq 80\%$) para identificar os efeitos de interesse.

No estudo de Dantas et al. (2023) as análises estatísticas, incluindo testes *t de Student* e ANOVA, revelaram diferenças significativas entre os grupos expostos a Spike e controles (valores de $P < 0,05$), sugerindo que o número de animais foi suficiente para capturar variações significativas na resposta experimental. Além disso, a escolha do número de camundongos foi alinhada com os princípios éticos do 3Rs, visando reduzir o número de animais utilizados enquanto ainda se garantia a robustez dos resultados.

A escolha da dose de 10 µg da proteína Spike foi fundamentada em estudos prévios que utilizaram concentrações inferiores, geralmente associadas a modelos geneticamente modificados ou a vias de administração mais invasivas, como a intracraniana (Buzhdygan et al., 2020; Rhea et al., 2021).

No presente estudo, o objetivo central foi investigar se a exposição periférica à proteína Spike, por via intraperitoneal, seria suficiente para induzir alterações comportamentais, neuroquímicas e imunológicas em camundongos imunocompetentes, sem a necessidade de manipulação genética. Essa abordagem buscou simular, de forma mais translacional, a infecção periférica pelo SARS-CoV-2, avaliando a capacidade da proteína Spike de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e desencadear neuroinflamação por mecanismos fisiológicos, principalmente mediados pela resposta imune periférica.

A adoção da via intraperitoneal (i.p.) está alinhada com a proposta de investigar uma infecção sistêmica, evitando os vieses introduzidos por intervenções diretas no sistema nervoso central.

4. 2. 2 Considerações sobre biossegurança

Para simular a infecção pelo SARS-CoV-2 nos roedores, foi utilizado o modelo de inoculação via intraperitoneal com a proteína Spike do SARS-CoV-2. Neste modelo, não foram utilizados microrganismos vivos, organismos geneticamente modificados ou materiais genéticos isolados. Em nossa investigação, empregamos exclusivamente a S-glicoproteína recombinante do SARS-CoV-2, adquirida da Biolinker®, que, conforme as recomendações do fabricante (Anexo 2), assegura que a substância está isenta de riscos de contaminação e não gera resíduos perigosos para a saúde humana. Além disso, a proteína foi manipulada com o uso adequado de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) e em cabine de biossegurança (Pachane®), garantindo a segurança necessária para o manuseio dos materiais e os procedimentos de inoculação nas linhagens de camundongos utilizadas neste estudo (BALB/c e C57BL/6).

4. 2. 3 Testes comportamentais

Todos os testes comportamentais foram feitos em condições de luz vermelha de baixa intensidade, com temperatura e umidade controladas. Os aparelhos foram limpos com etanol 70% entre cada animal. Os testes comportamentais foram captados em vídeo através de uma câmera USB e analisado em tempo real, ou posteriormente, com o software *ANYmaze* versão

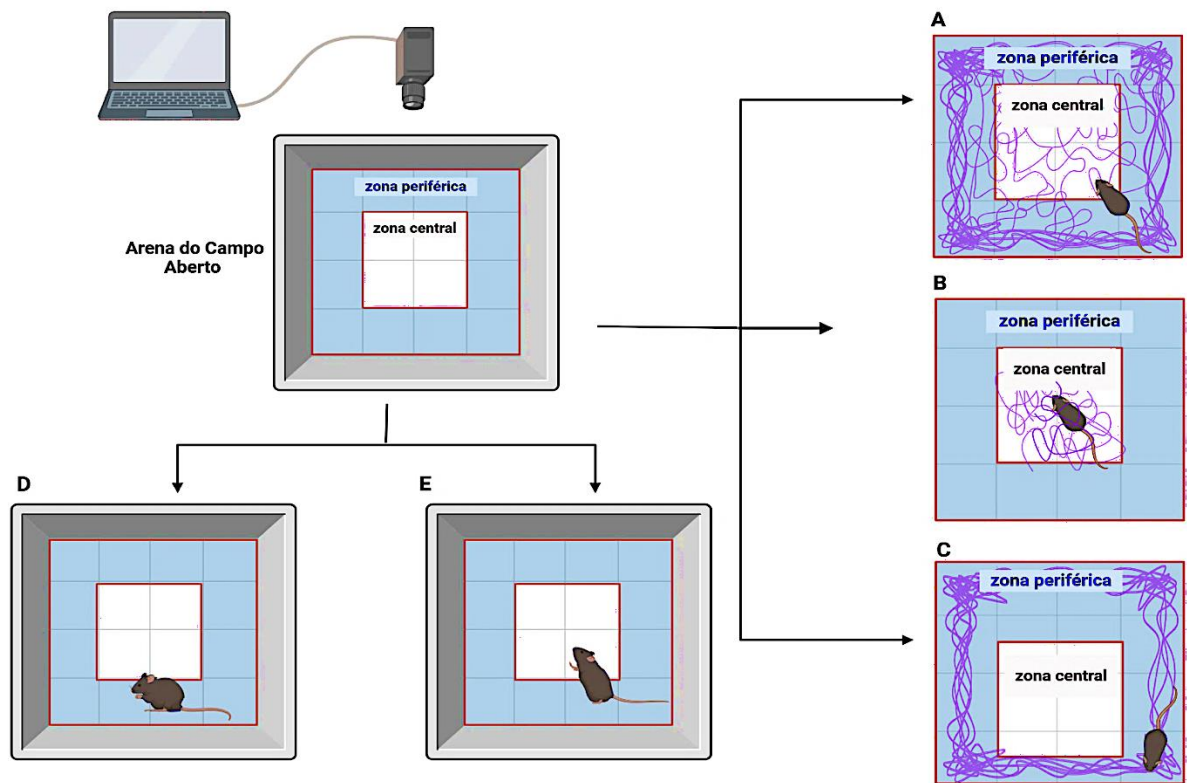
7.48. Os animais expostos a Spike (10 µg por via i.p) e os animais controle, receberam o mesmo volume de salina. Os testes foram realizados em diferentes intervalos de tempo após a administração, correspondendo às fases de atividade aguda (FA), com avaliações até uma semana, e à fase pós-aguda (FPA), com avaliações entre 40 e 45 dias.

4. 2. 4 Avaliação da atividade locomotora e comportamento ansioso - Teste do Campo Aberto

O teste do Campo Aberto (CA) baseia-se na exposição do animal a um ambiente fechado e desconhecido, estimulando comportamentos naturais, como exploração, busca por rotas de fuga e respostas à aversão a áreas abertas (Archer, 1973). O teste foi realizado em uma arena de acrílico preto (30 x 30 cm, paredes de 15 cm) dividida em nove quadrantes iguais. Os animais foram adaptados ao ambiente por 30 minutos em uma sala com luz vermelha.

Após serem colocados no centro da arena, os animais exploraram livremente por 1 minuto (fase de habituação) seguido de 5 minutos de teste (Archer, 1973). Os parâmetros avaliados incluíram tempo total da distância percorrida (Figura 11A), tempo de permanência nas zonas central, (Figura 11B) e periférica (Figura 11C), número de autolimpeza (*grooming*) (Figura 11D), exploração vertical (*rearing*) (Figura 11E) como também a contagem do número de pelotas fecais (Figura 11). O último parâmetro (contagem do número de pelotas fecais) reflete a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e tem sido utilizado como um índice complementar em avaliações de ansiedade em modelos animais e marcador de estresse emocional e ativação autonômica (Kalueff; Tuohimaa, 2004; Rodgers; Dalvi, 1997)

Figura 11- Representação do Teste Campo Aberto.



Fonte: Criado pela autora no software BioRender.

4. 2. 5 Avaliação da memória de reconhecimento- Teste do Reconhecimento do Objeto Novo

O teste do Reconhecimento do Objeto Novo (RON) avalia a memória de curto prazo de reconhecimento em roedores, estimando sua capacidade de diferenciar entre objetos familiares e novos. A tarefa de reconhecimento de objeto está diretamente associada ao adequado funcionamento do hipocampo, além de desempenhar um papel essencial na codificação, consolidação e recuperação da memória. Esse processo, por sua vez, envolve o córtex perirrinal, responsável por integrar informações provenientes de áreas corticais visuais, olfatórias e somatossensoriais, fundamentais para a interpretação de estímulos (Win-Shwe *et al.*, 2013).

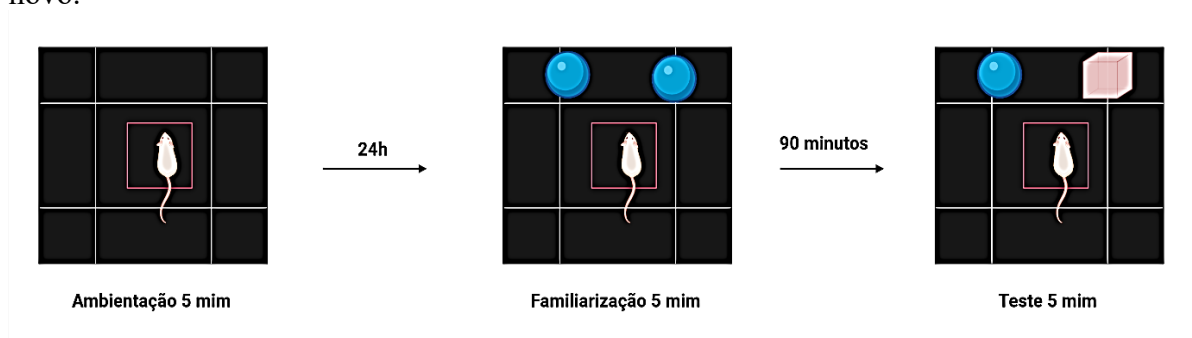
Seguindo protocolo adaptado de Léger *et al.* (2013), o teste foi realizado em uma arena de acrílico (30 x 30 cm, paredes de 15 cm de altura), com os animais adaptados ao ambiente por 30 minutos em sala de luz vermelha. A sessão de habituação na arena vazia durou 5 minutos e ocorreu 24 horas antes do teste.

O teste foi feito em duas sessões: na primeira sessão, o animal foi deixado na arena do campo aberto, contendo dois objetos idênticos para livre exploração por 5 minutos; na segunda sessão, realizada uma hora e trinta minutos depois, o objeto situado à esquerda (bola e bola) foi substituído por um novo (bola e cubo) (Figura 12).

O índice de reconhecimento ou de discriminação foi calculado como o (tempo de exploração do objeto novo), menos o (tempo de exploração no objeto familiar) sobre o (tempo total de exploração dos dois objetos). Valores menores que zero (< 0) indicam falha no reconhecimento do objeto novo.

Os seguintes comportamentos foram considerados como exploração dos objetos: farejar, lambe ou tocar o objeto com o nariz ou com as patas da frente ou direcionando o nariz para o objeto a uma distância ≤ 1 cm (Dantas *et al.*, 2023; Leger *et al.*, 2013).

Figura 12- Representação ilustrativa da metodologia do teste do reconhecimento de objeto novo.



Fonte: Criado pela autora no software BioRender.

4. 2. 6 Avaliação da ansiedade - Teste Elevado Zero Maze

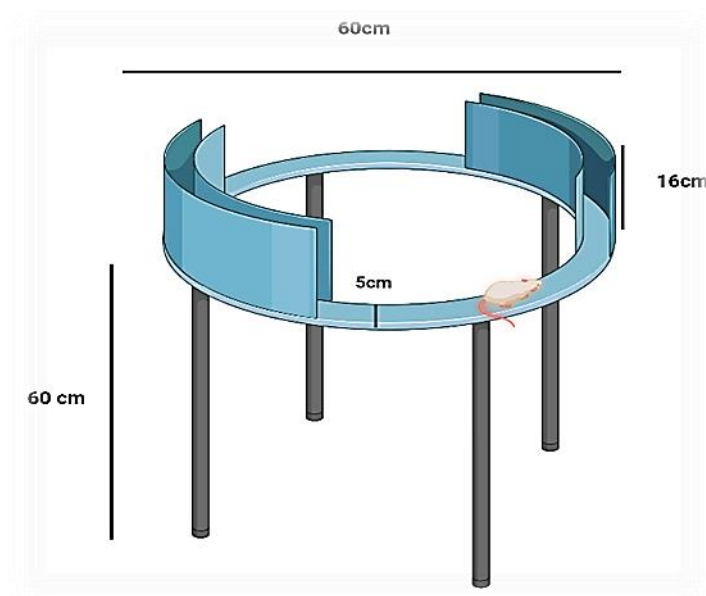
O teste de Elevado Zero Maze (ZM) realizado na FA do protocolo, tem como objetivo avaliar o comportamento ansioso – símile, seguindo a metodologia do teste do labirinto em cruz elevado, esse experimento avalia o conflito característico de “aproximação e esquiva” (*approach-avoid conflict*) do camundongo em um ambiente desconhecido (Cook; Crounse; Flaherty, 2002), contrastando sua curiosidade natural com a tendência instintiva de evitar espaços abertos, que representam um potencial risco. Esse comportamento está diretamente ligado à atividade neurosensorial, principalmente à visão, considerada o sentido mais relevante para essa resposta, além do mecanismo de tigmotaxia, no qual o animal busca manter contato parcial ou total com superfícies sólidas, como os braços fechados do labirinto. A avaliação consiste na medição do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o protocolo composto por um 1 minuto de habituação seguido de 5 minutos de teste (Morato, 2006; Tucker; McCabe, 2017).

O teste foi realizado em um aparato circular com um diâmetro total de 60cm, corredor circular de 5cm de largura e paredes de 16 cm de altura, com uma altura do chão de 60cm. O aparato é suportado por 4 pernas, o que torna o dispositivo estável (Figura 13). Os animais foram previamente adaptados ao ambiente experimental por 30 minutos em uma sala com iluminação vermelha, que reduz estímulos externos.

Para a análise estatística dos parâmetros, calculou-se a porcentagem do tempo que o animal permaneceu nos segmentos (abertos e fechados). $\text{Tempo no segmento aberto (\%)} = (\text{Tempo nos abertos} / \text{Tempo total do teste}) \times 100$. $\text{Tempo no segmento fechado (\%)} = (\text{Tempo nos segmentos fechados} / \text{Tempo total do teste}) \times 100$.

A interpretação dos resultados indica que, se o animal passar aproximadamente 30% do tempo nos segmentos abertos, isso sugere um nível moderado de ansiedade. Percentagens mais altas de tempo em áreas abertas indicam menor ansiedade, enquanto percentagens mais baixas (entre 10% e 20%) estão associadas a níveis mais elevados de ansiedade (Tucker; McCabe, 2017).

Figura 13 - Representação do aparato do Teste do Elevado Zero Maze. O teste consiste em uma arena circular elevada com dois braços abertos e dois braços fechados, utilizada para avaliar comportamentos de ansiedade em roedores.



Fonte: Criado pela autora em software BioRender.

4.3 Avaliação da memória de trabalho - Teste do T Maze.

O teste T-maze (TM) realizado na FPA do protocolo experimental, esse teste é amplamente utilizado para investigar a memória de trabalho e a capacidade de aprendizagem espacial em camundongos e ratos. Ele se baseia no comportamento natural desses animais de explorar novos ambientes e alternar espontaneamente entre os braços do labirinto em forma de T. Essa alternância é um reflexo da habilidade de lembrar áreas previamente visitadas, sendo um marcador sensível da memória de aprendizagem.

O aparato experimental foi construído em polimetilmetacrilato, com um design ajustado para roedores: o tronco central possui 35 cm de comprimento, enquanto os braços laterais medem 30 cm de comprimento, 5 cm de largura e 15 cm de altura. O piso cinza foi escolhido para minimizar reflexos que pudessem influenciar o comportamento dos animais. Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a um período de adaptação de 30 minutos em uma sala com luz vermelha, antes do início do teste.

O protocolo experimental adaptado seguiu as diretrizes estabelecidas por D'Isa, Comi e Leocani (2021), garantindo reprodutibilidade e confiabilidade. O teste não exige tempo de

ambientação com o aparato, foi dividido em duas etapas principais. Na primeira etapa, denominada tempo de amostra (T0), os animais foram colocados no braço de partida (start). Na segunda etapa, composta por seis testes subsequentes (T1 a T6), os animais realizaram uma sequência de escolhas nos braços do labirinto, totalizando sete tentativas. A duração máxima do experimento foi de 3 minutos.

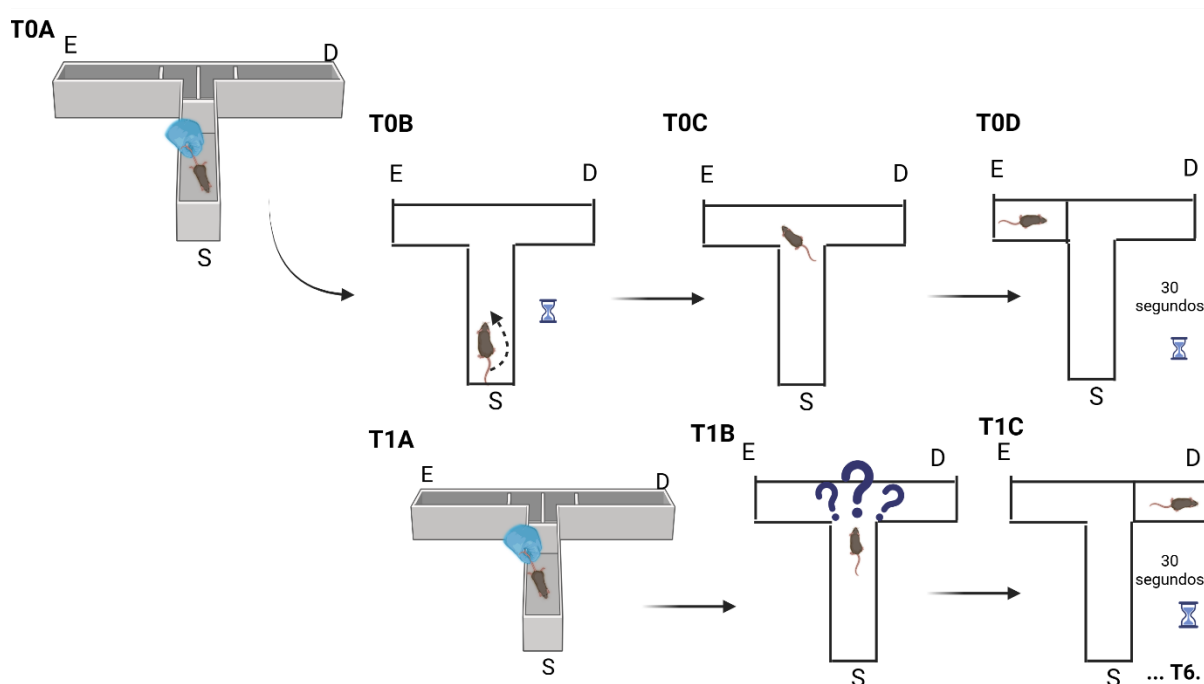
O principal parâmetro avaliado foi a taxa de alternância espontânea, ou seja, a frequência com que os animais escolhiam braços diferentes em tentativas consecutivas. Esse parâmetro reflete diretamente a memória de trabalho dos indivíduos.

Para análise estatística dos parâmetros calculou-se a porcentagem de alternância como índice de memória de trabalho: $[(\text{número total de alternâncias corretas} / 6) \times 100]$. A interpretação dos resultados da tarefa de alternância espontânea no labirinto em T considera que, por acaso, os animais tendem a alternar entre os braços em aproximadamente 50% das tentativas.

Dessa forma, valores próximos a 50% indicam um padrão de escolha aleatório, sem o uso de memória espacial. Percentuais significativamente acima de 50% sugerem que o animal está utilizando memória espacial para lembrar dos braços já visitados e alternar de forma deliberada, enquanto valores inferiores a 50% podem refletir prejuízos na memória ou alterações comportamentais, como ansiedade ou desatenção.

Além disso, foram analisados os tempos de latência (em segundos) nos diferentes momentos experimentais (T0, T1, T2, T3, T4, T5 e T6), os quais permitem avaliar possíveis mudanças no comportamento exploratório ao longo do tempo, fornecendo indícios adicionais sobre a integridade da memória e do estado emocional dos animais (d'Isa; Comi; Leocani, 2021).

Figura 13- Representação do protocolo do teste *T Maze*.



Fonte: Criado pela autora em software BioRender.

No Treino inicial (T0A), o camundongo é posicionado na extremidade sul (braço "S"), com a cabeça contrária para o centro do labirinto, permitindo que ele explore livremente o ambiente. No (T0B), o cronômetro é iniciado quando o camundongo se vira e se direciona para um dos braços. O (TOC), o camundongo escolhe entre o braço esquerdo e/ou direito. No (T0D), o braço escolhido é fechado com uma guilhotina, e o tempo de permanência do camundongo é registrado por 30 segundos. No Treino 1 (T1A), o camundongo é reposicionado na extremidade sul (braço "S"). No (T1B), o camundongo faz sua escolha entre o braço esquerdo e/ou direito novamente... cont, até o Treino 6 e finalizando no (T6). S – Sart, E – esquerdo, D – direito, T- teste.

4. 3. 1 Avaliação do comportamento depressivo - Teste do Nado Forçado

O teste do Nado Forçado (NF) é amplamente utilizado em investigações científicas para avaliar comportamentos associados ao estresse e à condição depressivo-símile em roedores, particularmente em ratos e camundongos. Desenvolvido por Roger Porsolt na década de 1970, este teste tornou-se uma ferramenta comum em estudos nas áreas de neurociência e psicofarmacologia. O princípio subjacente ao teste é que o tempo gasto em imobilidade, ou seja, a ausência de movimento ativo, pode ser indicativo de um estado de "desesperança comportamental", um reflexo de sintomas depressivos observados em humanos.

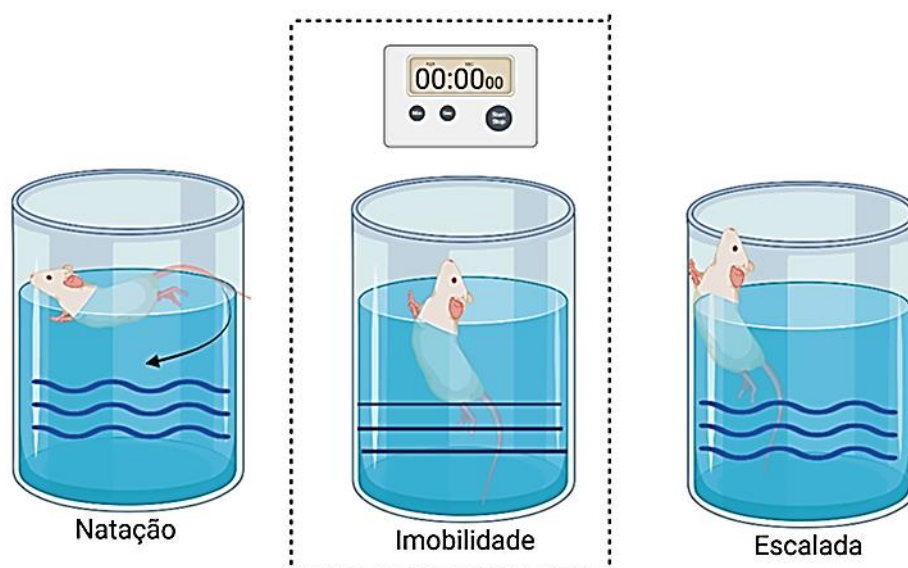
Na configuração experimental, o roedor é colocado em um cilindro de acrílico de 25 cm de altura e 10 cm de diâmetro, que é preenchido com água em temperatura ambiente até uma altura de aproximadamente 15 cm, essa profundidade impede que o animal toque o fundo do

cilindro ou escape, forçando-o a nadar para se manter à tona. O teste teve duração de 6 minutos no total com 1 minuto de habituação no cilindro seguindo de 5 minutos de teste (Figura 14).

Durante a avaliação, o comportamento do roedor é monitorado e registrado, com destaque para o tempo em que o animal permanece imerso em um estado de imobilidade. A imobilidade é caracterizada por um comportamento passivo, no qual o roedor flutua na água sem fazer esforços significativos para nadar ou escapar, mantendo apenas a cabeça acima da superfície. Esse comportamento é frequentemente interpretado como um indicativo de angústia ou desamparo, sendo comparado aos sintomas de depressão em humanos.

Após o teste, o animal foi retirado da água, cuidadosamente enxugado com uma toalha seca e colocado em uma gaiola para recuperação térmica. A água do cilindro foi trocada entre os testes para evitar a interferência de odores ou dejetos de outros animais.

Figura 14- Representação do Teste Nado Forçado.



Fonte: Criado pela autora em software BioRender.

4. 3. 2 Método de Indução de Morte (Eutanásia)

O procedimento foi realizado por decapitação, utilizando uma guilhotina ajustada especificamente para a espécie, de acordo com as diretrizes éticas e regulamentações vigentes. Imediatamente após a decapitação, o sangue extravasado da região cervical foi coletado em tubos de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) de 0,5 ml para posterior análise laboratorial. Em seguida, o encéfalo e o intestino delgado foram cuidadosamente dissecados dentro do biotério para as análises experimentais subsequentes.

Todos os procedimentos foram conduzidos por profissionais devidamente treinados e certificados, garantindo a execução precisa e ética de cada etapa. A morte dos animais foi confirmada pela observação da separação completa da cabeça e do corpo (Shomer *et al.*, 2020), bem como pela ausência de movimentos respiratórios (apneia) (Close *et al.*, 1997), ausência de batimentos cardíacos (assistolia), ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal, além de outros reflexos apropriados para a espécie (Close *et al.*, 1996).

4. 3. 3 Dissecação das Áreas Cerebrais

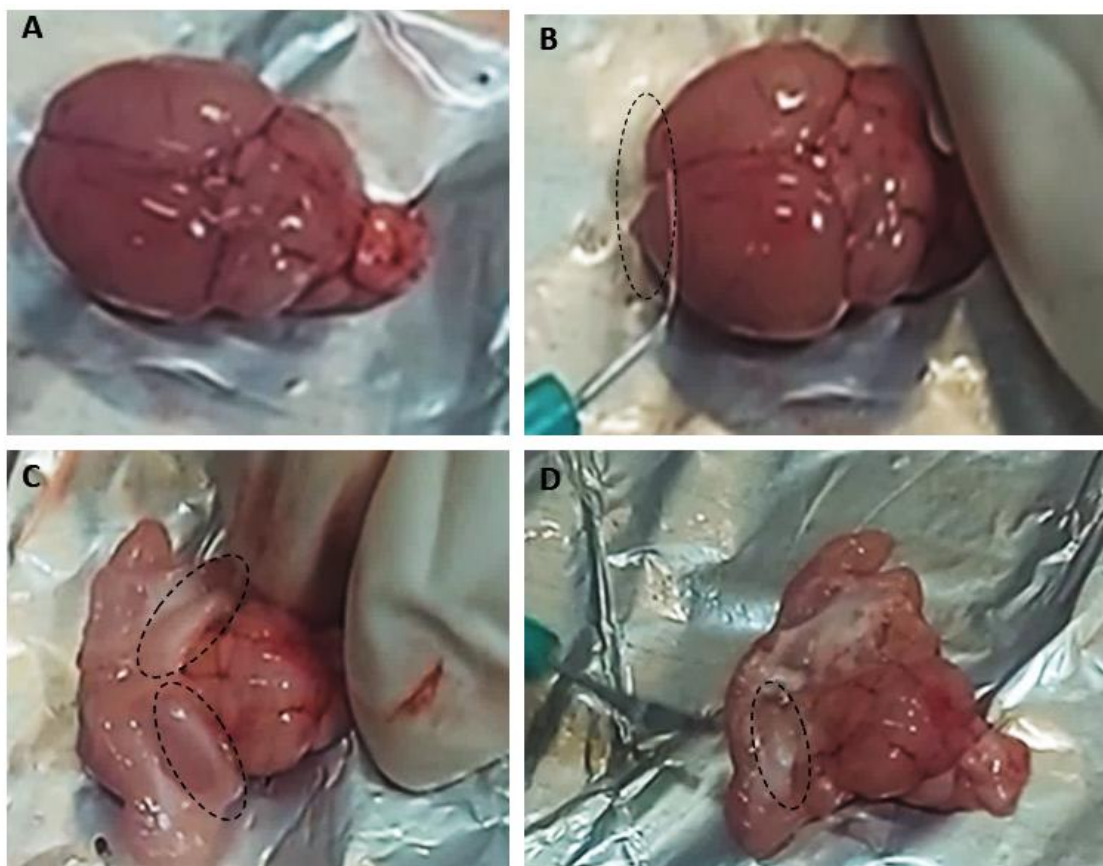
Os encéfalos foram rapidamente removidos e posicionados sobre uma placa resfriada com gelo para preservação (Figura 15A).

Para a retirada do córtex pré- frontal (CPF), a porção anterior dos lobos frontais (em torno de 1,5 mm a partir do bulbo olfatório) foi removida e feita uma secção bilateral com o auxílio de uma tesoura de microdissecação (Machado, 1985) (Figura 15B).

O córtex, uma vez separado, foi rebatido para os lados, expondo parcialmente o hipocampo(HP), para isolar o HP, as estruturas circundantes foram cuidadosamente dissociadas com o auxílio de uma tesoura de microdissecação (Meyerhoff *et al.*, 2021). O HP foi identificado como uma estrutura em forma de "C", localizada na região ventromedial do encéfalo (Jaszczyk; Stankiewicz; Juszczak, 2022). (Figura 15C).

O próximo passo envolveu a remoção do corpo estriado (CE), uma região subcortical, situada abaixo do córtex, visível como uma área arredondada e pálida na face medial do hemisfério cerebral (Aboghazleh *et al.*, 2024) (Figura 15D).

Figura 15 - Representação das etapas da dissecação das Áreas Cerebrais A) Encéfalo B) Córtex pré frontal, C) Hipocampo e D) Corpo Estriado.



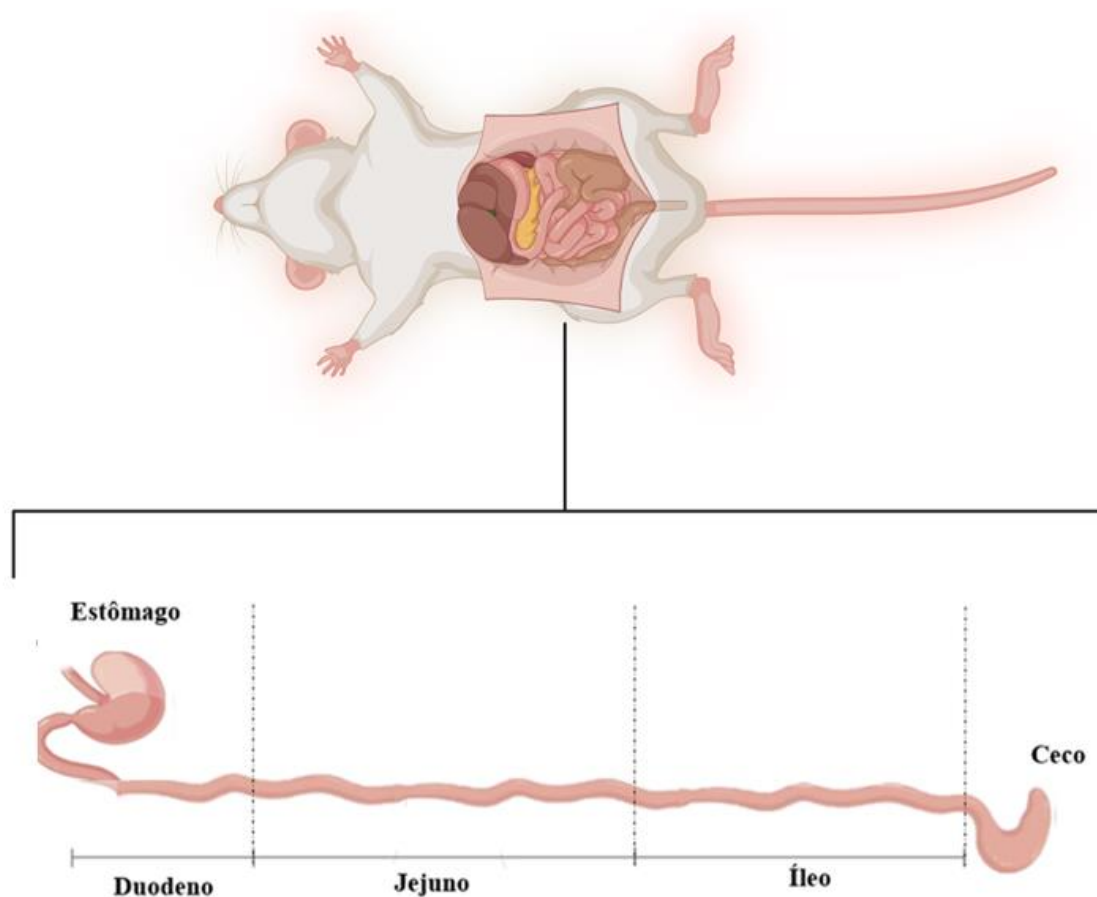
Fonte: Laboratório de Neupsicofarmacologia – UFC/NPDM

4. 3. 4 Dissecação do intestino delgado

A dissecação do intestino delgado foi realizada através da separação de suas três porções anatômicas: duodeno, jejuno e íleo. Inicialmente, o intestino delgado foi exposto, e o duodeno, porção inicial do intestino próximo ao estômago, foi identificado pela sua curta extensão e posição retroperitoneal (Lopez; Gogna; Khorasani-Zadeh, 2018; Wijaya; Juliantara; Utama, 2024). A seguir, foi delimitado o jejuno, segmento intermediário mais longo, caracterizado por pregas circulares mais espessas e numerosas (Rubin; Shaker, 2015). Por fim, foi identificado o íleo, a última porção do intestino delgado, que possui um calibre menor e se conecta ao ceco do intestino grosso por meio da válvula ileocecal (Mahadevan, 2020). (Figura 16). Cada segmento foi cuidadosamente seccionado e separado para análise, assegurando a preservação de sua integridade estrutural. A integridade e funcionalidade do trato gastrointestinal são fundamentais para a homeostase sistêmica e neurológica. Foi retirado para empregar a técnica de PCR quantitativa para avaliar a expressão de genes relacionados à absorção intestinal e à

resposta inflamatória.

Figura 16- Desenho representativo da dissecação do intestino nas suas devidas porções (Jejuno, Duodeno e Íleo)



Fonte: Criado pela autora em software BioRender.

Ao final da dissecação, todas as amostras foram transferidas para tubos do tipo *Eppendorf* e devidamente identificados. As amostras foram pesadas e armazenadas a -80°C para utilização nas análises subsequentes.

4. 3.5 Testes neuroquímicos

4. 4 Dosagem dos níveis de dopamina (DA) e ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) por (cromatografia líquida de alta performance) HPLC no lisado de tecido do corpo estriado de camundongos.

Para a determinação dos níveis de monoaminas, foi utilizando cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com detecção eletroquímica com um tempo de 25 minutos para a leitura do pico das monoaminas. O equipamento utilizado foi o modelo Alliance-Waters®. A detecção foi realizada por meio de um detector amperométrico, que mede a corrente gerada pela oxidação dos grupos hidroxila presentes nas monoaminas permitindo a quantificação precisa dessas substâncias. A técnica é altamente sensível, sendo ideal para medir pequenas quantidades de monoaminas, que são cruciais na regulação de processos fisiológicos como o estresse, humor e respostas inflamatórias (Silva; Menezes; Kempinas, 2007).

Método baseado nos estudos de (Nissbrandt *et al.*, 1989). O CE foi processado para preparo de um homogenato a 10%, utilizando sonicação por 30 segundos em solução de ácido perclórico a 1%. Esse procedimento visou a extração eficiente dos analitos de interesse. Após a sonicação, a mistura foi centrifugada a 4 °C por 10 minutos a uma velocidade de 12.000 rpm. O sobrenadante resultante foi cuidadosamente coletado e filtrado por meio de um filtro Millex-HA (0,45 µm, 13 mm), assegurando a remoção de partículas em suspensão.

Um volume de 20 µL do sobrenadante filtrado foi injetado no HPLC equipado com uma coluna Symmetry® C18 (, partícula de 5 µm, Waters). A separação cromatográfica foi realizada em condições de fluxo isocrático, utilizando como fase móvel uma solução tamponada composta por ácido cítrico (50 mM), ácido heptasulfônico sódico (1,2 mM), EDTA (0,1 mM), KCl (2 mM), acetonitrila (2,1% v/v) e metanol (9,4% v/v), ajustada para pH 3,0. Os dados gerados foram registrados como cromatogramas, nos quais cada pico corresponde a um composto presente na amostra. A identificação dos analitos foi baseada no tempo de retenção de cada pico, comparado a padrões analíticos previamente analisados nas mesmas condições experimentais.

Para realizar a quantificação, as áreas dos picos foram integradas com a ajuda de um software de HPLC. Em seguida, foi construída uma curva de calibração com padrões de concentrações conhecidas, permitindo determinar as concentrações dos analitos nas amostras por interpolação. Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng/20 µL de

solução contendo DA e DOPAC, (Sigma, MO, EUA). A partir das áreas dos picos desses padrões, as concentrações das amostras foram calculadas no Microsoft Excel, e os resultados foram expressos em ng/g de tecido.

O CE foi escolhido para análise por ser uma região cerebral chave no controle de funções motoras e comportamentais, além de apresentar intensa inervação por neurotransmissores como dopamina, noradrenalina e serotonina. Esses mensageiros químicos exercem papel central na regulação do movimento, motivação, controle emocional e nas atividades cognitivas (Freitas *et al.*, 2003; Macêdo, 2005; Vizi; Lajtha, 2008).

A dopamina (DA), presente tanto no sistema nervoso central quanto no periférico, está diretamente envolvida em processos como recompensa, modulação emocional, coordenação motora e função cognitiva (Klein *et al.*, 2019). Sua atividade pode ser avaliada por meio da quantificação do ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), seu principal metabólito, amplamente utilizado como marcador de degradação dopaminérgica (Liu *et al.*, 1996).

A análise desses componentes permite investigar alterações na neurotransmissão, sendo especialmente relevante em estudos sobre doenças neurodegenerativas, transtornos psiquiátricos e respostas a estímulos fisiológicos ou farmacológicos (Freitas *et al.*, 2003; Macêdo, 2005; Vizi; Lajtha, 2008). A dopamina, em especial, é essencial para a modulação de movimentos voluntários e da resposta a estímulos recompensadores (Howe; Dombeck, 2016; Jung; Shim, 2011). Dessa forma, a avaliação desse neurotransmissor e seu metabólito oferece uma medida sensível de possíveis alterações neuroquímicas ligadas a disfunções motoras, cognitivas e emocionais (Jokinen; Nordström; Nordström, 2009; Sher, 2007).

4. 4. 1 Dosagem de Citocinas por *Kit Mouse XL Cytokine Array* (R&D Systems/ARY028) Plataforma para Detecção Multiplexada de Citocinas em lisado de tecido do hipocampo de camundongos

A quantificação de citocinas foi realizada, seguindo o *datasheet* do *Kit Mouse XL Cytokine Array* (R&D Systems/ARY028) que permite a análise simultânea de até 111 citocinas e quimiocinas em uma única amostra biológica, como tecido, soro ou outros fluidos de camundongos. O método baseia-se em uma membrana revestida com anticorpos específicos, que capturam as proteínas de interesse presentes na amostra, fornecendo um perfil detalhado do estado imunológico e/ou inflamatório.

O tecido da região do hipocampo foi homogeneizado em solução salina tamponada com

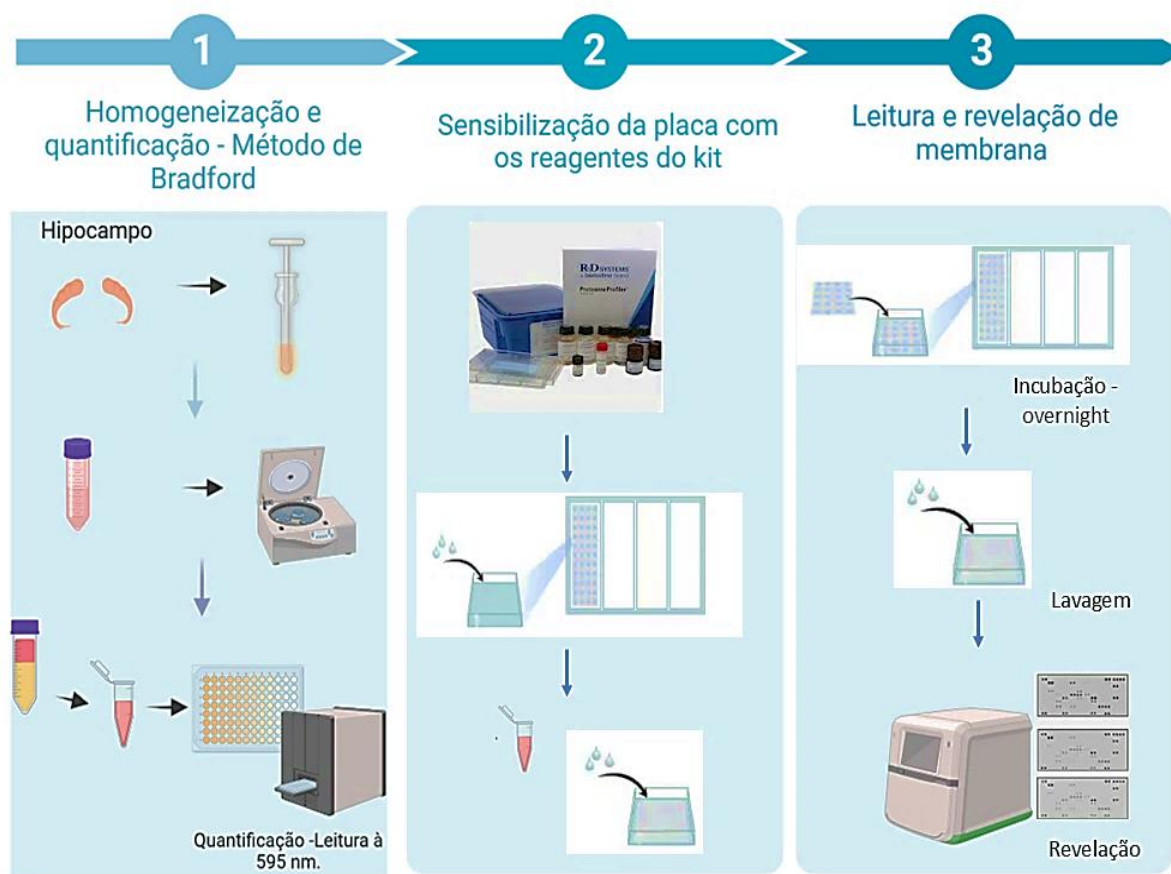
fosfato (PBS, pH 7,4) até atingir uma concentração final de 10%, e a quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford (Kielkopf; Bauer; Urbatsch, 2020).

As membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio por 1 h, incubadas com cada *pool* de amostra (200 µg) durante a noite a 4 °C e, em seguida, pré-incubadas por 1 h com um coquetel de anticorpos de detecção biotinilados. As membranas foram posteriormente incubadas com estreptavidina-HRP por 30 min e lavadas com tampão de lavagem. Os níveis de citocinas/quimiocinas foram medidos pela determinação da intensidade do ponto usando o software *GelAnalyzer* (versão 23.1.1), que determinou a densidade média de pixels de cada par de pontos duplicados representando os analitos. A identificação dos sinais positivos foi feita alinhando a imagem ao modelo de sobreposição transparente fornecido pelo kit (Figura 17). A emissão de luz gerada pela reação foi registrada em filme de raios X, revelado no fotodocumentador iBright 1500 (Invitrogen).

Os valores de densidade foram exportados para uma planilha, e o sinal médio de cada analito foi calculado, subtraindo-se o sinal de fundo obtido a partir de áreas claras da membrana ou controles negativos. Por fim, os sinais obtidos em diferentes *arrays* (membranas individuais usadas para as diferentes amostras) foram comparados para determinar mudanças relativas nos níveis dos analitos entre as amostras, permitindo uma avaliação precisa dos perfis de citocinas.

O HP foi escolhido para análise por ser uma região cerebral frequentemente associada a sintomas como apatia, perda de interesse, alterações no sono e no apetite, além de déficits de memória, comuns em muitos pacientes com quadros depressivos (Jayaweera *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017). Além disso, estudos recentes têm investigado a relação entre interleucinas envolvidas na resposta inflamatória na função hipocampal, Reverchon e colaboradores (2020) demonstraram a relação da interleucina 33 (IL-33) no hipocampo e sua associação com déficits cognitivos induzidos por neuroinflamação, como também foi visto que, a interleucina 1β (IL-1β) expressa no Hp, tem sido implicada na mediação de prejuízos de memória e em comportamentos semelhantes à ansiedade e depressão em modelos animais (Li *et al.*, 2017)

Figura 17- Esquema representativo da descrição das etapas para a realização das análises de citocinas.



Fonte: Criado pela autora em software BioRender.

O tecido do hipocampo é homogeneizado para a extração de proteínas, seguido de centrifugação para separar o sobrenadante, no qual as proteínas são concentradas. A concentração proteica é quantificada pelo método de Bradford, com leitura a 595 nm para determinação precisa dos níveis de proteínas presentes (1). A membrana da placa é sensibilizada/bloqueada com os reagentes fornecidos pelo kit, juntamente com o homogeneizado do tecido, para permitir a captura específica das proteínas de interesse (2) Após incubação *overnight*, a placa é lavada para remover os resíduos não ligados, e a detecção das proteínas é realizada por meio da leitura e revelação da membrana utilizando um fotodocumentador, permitindo a visualização clara dos sinais gerados. (4)

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo *Software GraphPad Prism 10* (GraphPad Software, Inc.) e todos os dados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão médio). Inicialmente, para os testes comportamentais, foi realizado o teste de normalidade *D'Agostino e Pearson* e teste de normalidade *Shapiro Wilk* para verificar se dados apresentam distribuição normal, sendo determinado o uso de testes paramétricos ou não paramétricos para a avaliação estatística dos resultados. Como todos os resultados apresentaram uma distribuição normal, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) de três vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Os fatores considerados foram “Exposição à Spike” (Salina e Spike), “Tempo pós-exposição” (FA e FPA) e “Linhagem” (BALB/c e C57BL/6). Em todos os testes o critério de significância utilizado foi de $P < 0,05$. Nos experimentos celulares, nas análises de concentração única, os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular. A Concentração Inibitória média (CI₅₀) foi determinada por regressão não linear. Todas as análises foram realizadas em quadruplicada.

Para o teste de determinação de monoaminas e dosagem de nitrito/nitrato foi realizado o teste de normalidade *D'Agostino e Pearson* e teste de normalidade *Shapiro Wilk* para verificar se dados apresentam distribuição normal, sendo determinado o uso de testes paramétricos ou não paramétricos para a avaliação estatística dos resultados. Como todos os resultados apresentaram uma distribuição normal, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de *Bonferroni* como teste *post-hoc*, para comparações dentro dos grupos. Em todos os testes o critério de significância utilizado foi de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Ensaios *in vitro*

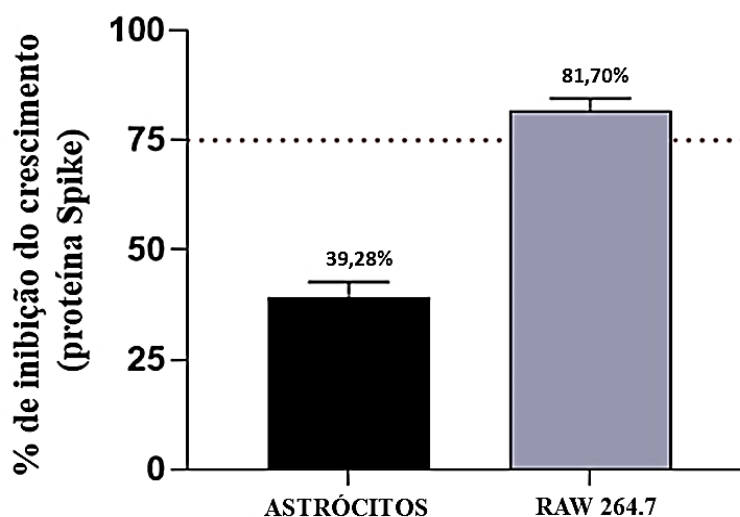
6.1.1 Avaliação da Viabilidade Celular e Citotoxicidade da Proteína Spike do SARS-CoV-2 (10 µg/mL) de sobrenadantes em Astrócitos e Macrófagos RAW 264.7 por Ensaio MTT.

No *screening* inicial da atividade, foram avaliadas a estabilidade, a interação celular, os efeitos na morfologia e a citotoxicidade da proteína Spike do SARS-CoV-2. A proteína Spike apresentou um efeito citotóxico de inibição de crescimento mais acentuado sobre a linhagem RAW 264.7 (81,70%) em comparação aos astrócitos (39,28%). Os dados detalhados da atividade citotóxica das amostras testadas estão representados na Tabela 02 e esquematizados graficamente na (Figura 18).

Tabela 2 - Média do percentual de inibição do crescimento celular (IC%) com erro da média (EM) e (SD) desvio padrão, das amostras na concentração única de 10 µg/mL.

	ASTRÓCITO		RAW 264.7	
Amostra	IC%	SD	IC%	SD
S-SPIKE	39.28	3.43	81.70	2.81

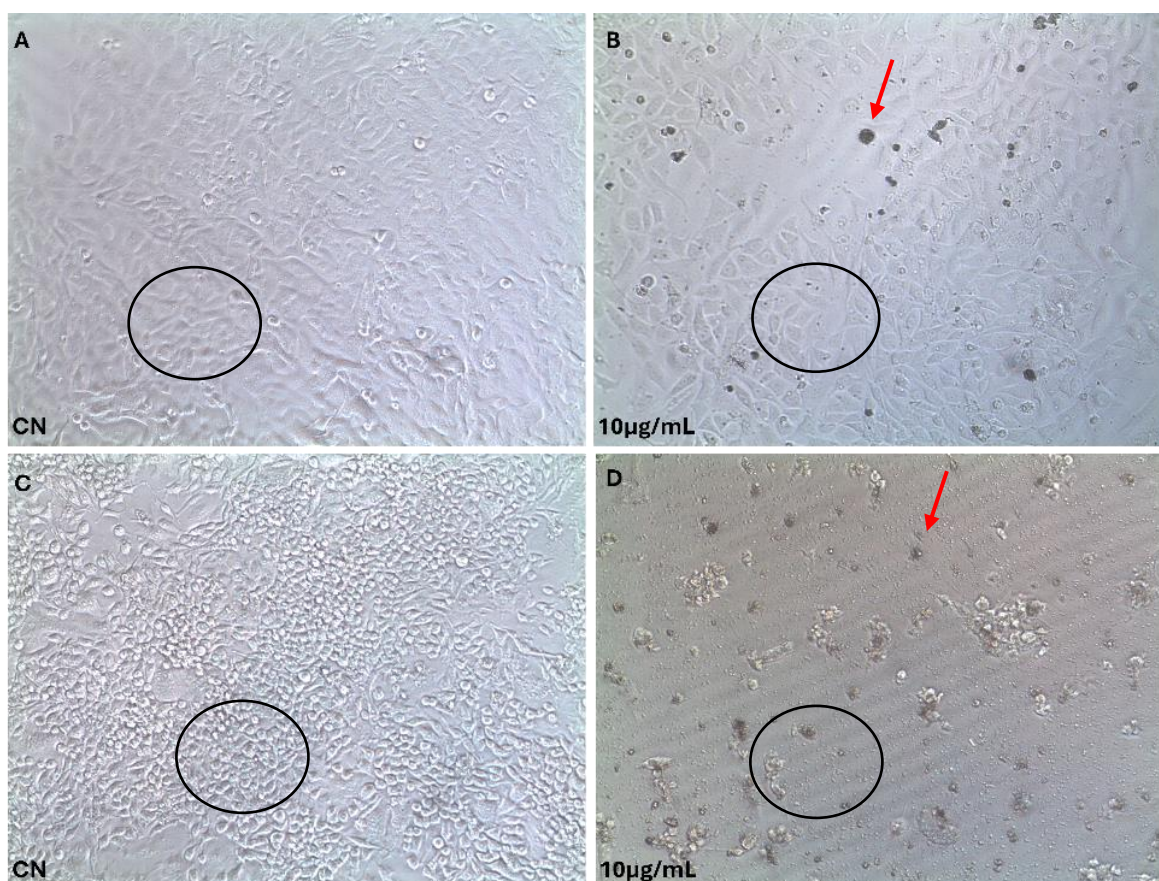
Figura 18- Efeitos da proteína Spike do SARS-CoV-2 (10 µg/mL) de sobrenadantes sobre a inibição de crescimento em Astrócitos e Macrófagos RAW 264.7 por Ensaio MTT.



As análises morfológicas na figura 19 no Astrócitos foram evidentes após tratamento com a proteína Spike com relação ao controle negativo (Figura 19A). Dentre as alterações, pode-se destacar sinais de condensação celular e irregularidade na forma. A distribuição celular está menos uniforme, com áreas de densidade reduzida. Essas mudanças sugerem estresse celular e início de morte celular induzidos pela ação da proteína Spike (Figura 19B).

Na linhagem RAW 264.7 na figura 19C e 19D, exibem alterações, como redução significativa de densidade celular, irregularidades no formato celular e fragmentações. Ainda, são visíveis diferenças na textura, com regiões indicando condensação de cromatina e formação de corpos apoptóticos, confirmando a atividade da proteína Spike

Figura 19 - Efeitos da Proteína Spike do SARS-CoV-2 (10 µg/mL) de sobrenadantes sobre as alterações morfológicas induzidas pela proteína Spike (10 µg/mL) do SARS-CoV-2 em astrócitos e células RAW 264.7 após 72 horas de tratamento.

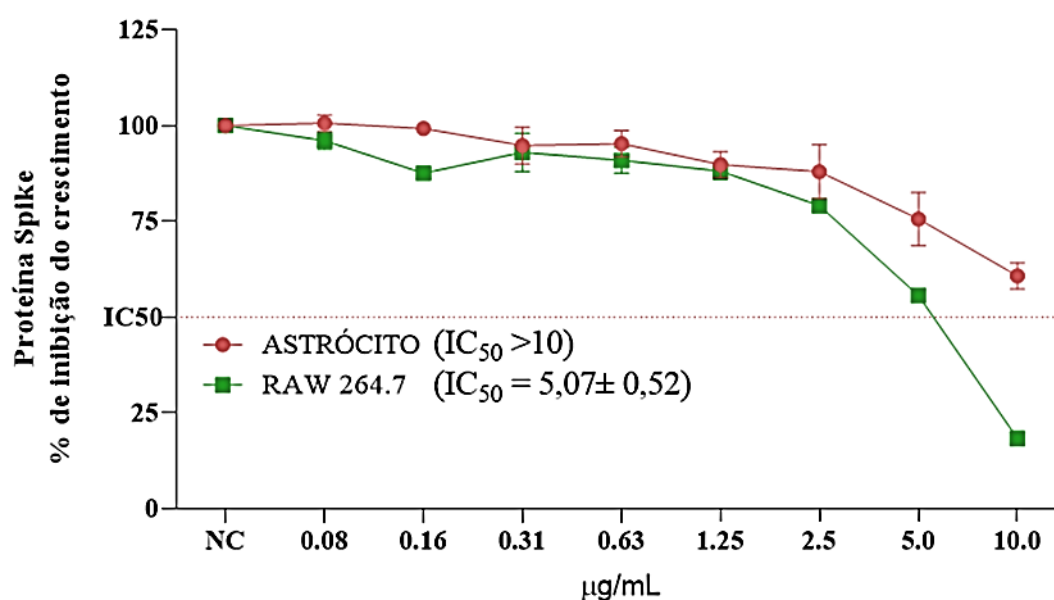


Objetiva 10x. CN – controle negativo.

(A) Astrócitos controle negativo com morfologia regular; (B) Astrócitos expostos proteína Spike, apresentando alterações morfológicas; (C) Células RAW 264.7 do grupo controle negativo com morfologia preservada; (D) Células RAW 264.7 tratadas com proteína Spike, exibindo irregularidades (círculos) e sinais de morte celular, (setas vermelhas).

A concentração inibitória média (CI_{50}) foi determinada para as linhagens celulares testadas. A proteína Spike do SARS-CoV-2 apresentou uma atividade inibitória média superior à maior concentração testada ($>10 \mu\text{g/mL}$) na linhagem de astrócitos, indicando baixa atividade citotóxica nesse tipo celular. Por outro lado, na linhagem RAW 264.7, a proteína apresentou uma CI_{50} de $5,07 \mu\text{g/mL}$, indicando uma atividade inibitória considerável (Figura 20).

Figura 20- Efeitos da proteína Spike do SARS-CoV-2 ($10 \mu\text{g/mL}$) de sobrenadantes sobre a curvas de inibição do crescimento em Astrócitos e Macrófagos RAW 264.7 por após 72 horas de tratamento.

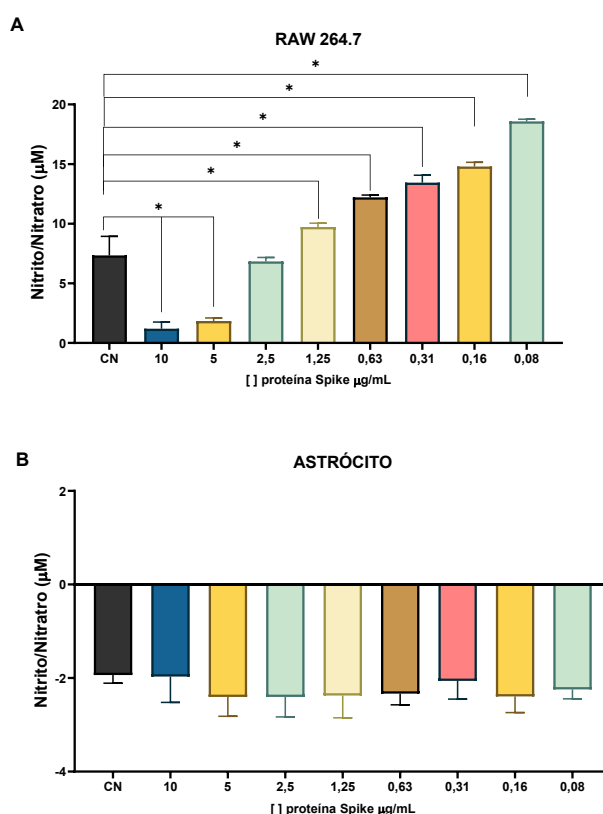


Avaliação da inibição do crescimento celular em culturas de astrócitos e RAW 264.7 expostas à proteína Spike em diferentes concentrações. (0.8/0.16/0.31/0.63/1.25/0.63/1.25/2.5/0 /10.0). A curva de inibição mostra que os astrócitos apresentam $IC_{50} > 10 \mu\text{g/mL}$, enquanto a linha RAW 264.7 apresenta $IC_{50} = 5,07 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$. NC indica o controle negativo.

6. 1. 2 Avaliação dos níveis de nitrito pela exposição à proteína Spike do SARS-CoV-2 (10 µg/mL) de sobrenadantes em Astrócitos e Macrófagos RAW 264.7 por dosagem de Nitrito/ Nitrato.

Verificou-se uma diferença significativa entre as concentrações de proteína Spike do SARS-CoV-2 e o controle negativo (ANOVA de uma via ($F(8, 27) = 142,7$, $P < 0.0001$)). nas concentrações mais baixas (1,25, 0,63, 0,31, 0,16 e 0,08 µg/mL), houve um aumento significativo na produção de NO ($P < 0.0001$) em relação ao controle. Na medida que a concentração [1,25, 0,63, 0,31, 0,16 e 0,08] µg/mL da proteína Spike diminuiu, aumentou a concentração [0,5,10,15 e 20] µM de nitrato/nitrito. (Figura 21A). No entanto, nas células de astrócitos, não foram observadas alterações significativas nos níveis de nitrito entre o grupo tratado com a proteína Spike e o controle, indicando que a resposta inflamatória nas células astrocíticas pode ser menos pronunciada ou afetada por outros fatores experimentais (Figura 21B).

Figura 21 - Efeitos da Proteína Spike do SARS-CoV-2 (10 µg/mL) na dosagem de nitrito/nitrato de sobrenadantes de células RAW 264.7 e sobrenadantes de Astrócitos expostas a proteína Spike após 72 horas.



A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Na figura o valor está representado como média $\pm$ EPM. * $P < 0,0001$. CN: Controle negativo. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$ em relação ao controle negativo.

6. 1.3 Ensaios *in vivo*

6.1.4 Testes Comportamentais

6. 1. 5 Efeitos da proteína Spike do SARS -CoV-2 sobre a atividade locomotora e comportamento ansioso no Teste do Campo Aberto em camundongos, na FA e FPA, submetidos ao modelo da SPAC.

Para a variável "Tempo em atividade locomotora" (Fig. 22A), os dados foram analisados por meio de um modelo de efeitos mistos (REML), com pareamento pelo fator "Tempo", considerando a presença de valores ausentes. O modelo revelou um efeito significativo para a interação Linhagem x Tempo x Spike ($F(1,29) = 6,431$; $P = 0,0169$), sugerindo uma modulação dependente da linhagem e da exposição à proteína Spike ao longo do tempo. Na linhagem BALB/c, os animais expostos à Spike na fase aguda (SFA) apresentaram uma redução significativa no tempo de atividade locomotora em comparação ao grupo controle Salina FA ($P < 0,0001$), indicando um efeito agudo da proteína sobre o comportamento exploratório. Além disso, os animais BALB/c SFA também diferiram significativamente do grupo SFPA ($P = 0,0184$), sugerindo uma recuperação parcial do desempenho locomotor na fase pós-aguda. Na linhagem C57BL/6, foi observada uma diferença significativa entre os grupos Salina FA e SFA ($P = 0,0362$), demonstrando um efeito semelhante ao observado em BALB/c, porém de menor magnitude. Esses dados indicam que a exposição à proteína Spike compromete significativamente a atividade locomotora de forma aguda, sendo esse efeito mais acentuado nos animais da linhagem BALB/c.

A análise estatística do número de *rearings* (Fig. 22B) foi conduzida por meio de um modelo de efeitos mistos (REML), com pareamento pelo fator Tempo, devido à presença de valores ausentes nos dados. A análise revelou um efeito principal significativo para o fator Linhagem ($F(1,36) = 128$; $P < 0,0001$), indicando que o perfil comportamental de *rearings* difere substancialmente entre as linhagens de camundongos. O fator Tempo também apresentou efeito significativo ($F(1,33) = 8,91$; $P = 0,0053$), sugerindo modulação temporal da atividade exploratória. Além disso, foi observada uma interação significativa entre os fatores Linhagem x Tempo ($F(1,33) = 5,66$; $P = 0,0233$), indicando que a variação ao longo do tempo depende da linhagem testada. O teste post hoc revelou, na linhagem BALB/c, uma redução significativa no número de *rearings* no grupo SFPA em comparação ao grupo Salina FPA ($p = 0,0299$). Esse resultado indica que a exposição à proteína Spike resultou em diminuição da atividade

exploratória vertical na fase pós-aguda.

Nos demais grupos e na linhagem C57BL/6, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas visíveis, reforçando que o efeito da Spike sobre o comportamento exploratório é mais pronunciado em animais BALB/c durante a fase tardia do experimento.

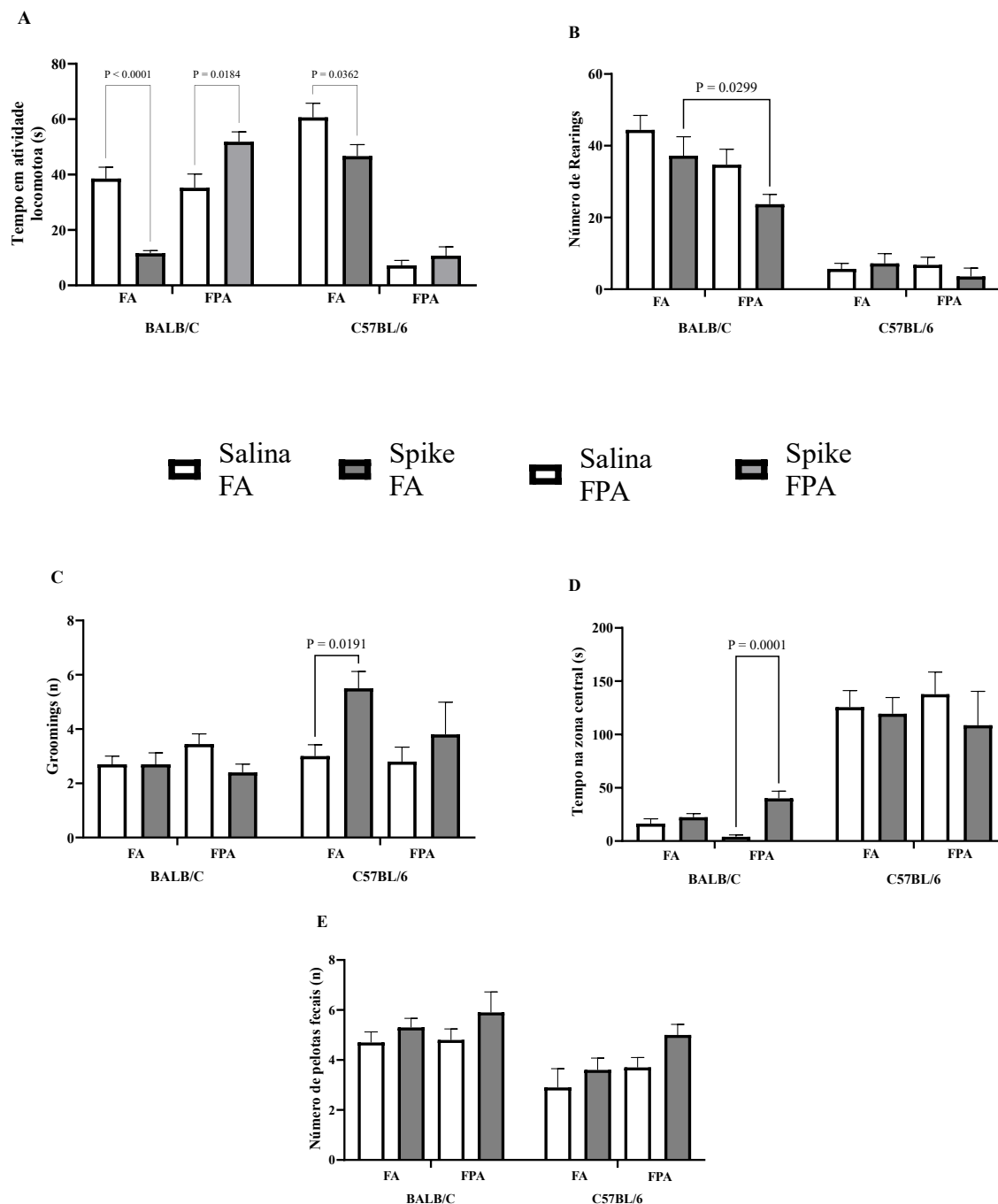
A análise estatística do número de *gromings* (Fig. 22C), com pareamento pelo fator Tempo, devido à presença de dados ausentes. O modelo revelou um efeito principal significativo para o fator Linhagem ($F(1,36) = 4,44$; $P = 0,0421$), indicando que o número de episódios de *groming* difere entre as linhagens de camundongos. Além disso, foi observada uma interação significativa entre os fatores Linhagem x Spike ($F(1,36) = 6,20$; $P = 0,0175$), sugerindo que o efeito da exposição à proteína Spike sobre o comportamento de *groming* é dependente da linhagem. Na linhagem C57BL/6, os animais expostos à proteína Spike na fase aguda (SFA) apresentaram um aumento significativo no número de episódios de *grooming* em comparação aos animais do grupo controle Salina FA ($P = 0,0191$). Este resultado indica que a exposição à Spike promoveu um aumento na atividade autoestimuladora logo após a administração, sugerindo um possível efeito ansiogênico agudo neste contexto. Na linhagem BALB/c, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, embora os valores absolutos tenham se mantido relativamente estáveis entre os grupos.

A análise por modelo de efeitos mistos (REML), com pareamento pelo fator Tempo, indicou um efeito principal altamente significativo para o fator Linhagem ($F(1,36) = 90,3$; $P < 0,0001$), evidenciando que o tempo gasto na zona central do campo aberto difere substancialmente entre as linhagens de camundongos (Fig. 22D). Na linhagem BALB/c, foi observada uma diferença altamente significativa entre os grupos Salina FPA e SFPA no tempo total gasto na zona central do campo aberto ($P = 0,0001$). Os animais expostos à proteína Spike quando na fase pós-aguda (SFPA) apresentaram um aumento expressivo nesse parâmetro em comparação ao grupo Salina (Média: 40,08 s vs. 3,944 s), com uma diferença de 36,14 segundos. Esse achado indica um aumento na exploração da zona central após a exposição à Spike, possivelmente refletindo redução do comportamento ansioso (podendo também ser interpretado como aumento do tempo de risco na linhagem BALB/c. Na linhagem C57BL/6, a comparação entre os grupos Salina FPA e SFPA não revelou diferença estatisticamente significativa ($P = 0,4597$), com médias de 137,7 s e 108,6 s, respectivamente. Isso sugere que, nesta linhagem, a exposição à Spike na fase pós-aguda não modulou significativamente o tempo gasto na zona

central.

A análise de variância trifatorial (três vias ANOVAM), com pareamento pelo fator Tempo, indicou efeitos principais significativos para os fatores Linhagem e Spike. O fator Linhagem respondeu por 13,6% da variação total e apresentou significância estatística robusta ($F(1,36) = 14,89$; $P = 0,0005$), indicando que o número de pelotas fecais difere de forma consistente entre as linhagens de camundongos avaliadas. O fator Spike, responsável por 6,16% da variação, também foi estatisticamente significativo ($P = 0,0136$), demonstrando que a exposição à proteína Spike influenciou esse marcador comportamental relacionado à ansiedade. Apesar disso não foi vista alteração significativa no teste de post hoc (Fig. 22E).

Figura 22 - Efeito da Spike (10µg/animal/dia) com o teste campo aberto: (A) tempo de atividade locomotora, (B) número de *rearings*, (C) número de *groomings*, (D) Tempo na zona central (E) número de pelotas fecais.

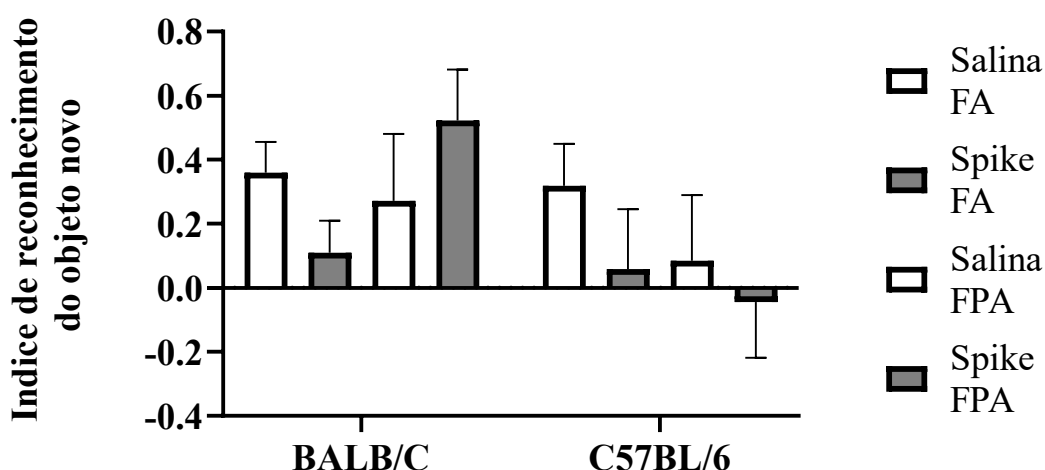


Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM (n = 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por ANOVA de três vias, seguido pelo teste de *Tukey*. Modelo de SPAC induzido por Spike, aplicação de dose única. Abreviaturas: FA -Fase aguda; FPA – Fase pós aguda.

6. 1. 6 Efeitos da proteína Spike do SARS - CoV -2 sobre a memória de reconhecimento no Teste de Reconhecimento do Objeto Novo em camundongos nas fases, FA e FPA, submetidos ao modelo da SPAC.

A análise por modelo de efeitos mistos (REML), com pareamento pelo fator Tempo, revelou que nenhum dos fatores principais nem suas interações afetaram significativamente o índice de reconhecimento dos animais. O fator Linhagem apresentou um valor de p limítrofe, mas não significativo ($F(1,59) = 3,242$; $P = 0,0769$), sugerindo uma possível tendência de diferença entre as linhagens, embora sem significância estatística robusta.

Figura 22- Efeito da proteína Spike ($10\mu\text{g}/\text{animal}/\text{dia}$) sobre a memória de reconhecimento em camundongos submetidos ao modelo de SPAC.



Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 8-10$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por ANOVA de três vias, seguido pelo teste de Bonferroni. Modelo de SPAC induzido por Spike, aplicação de dose única de $10\mu\text{g}$. (Abreviaturas: FA -Fase aguda; FPA – Fase pós aguda).

6. 2 Efeitos da proteína Spike do SARS - CoV -2 sobre avaliação da ansiedade - Teste Elevado Zero Maze em camundongos

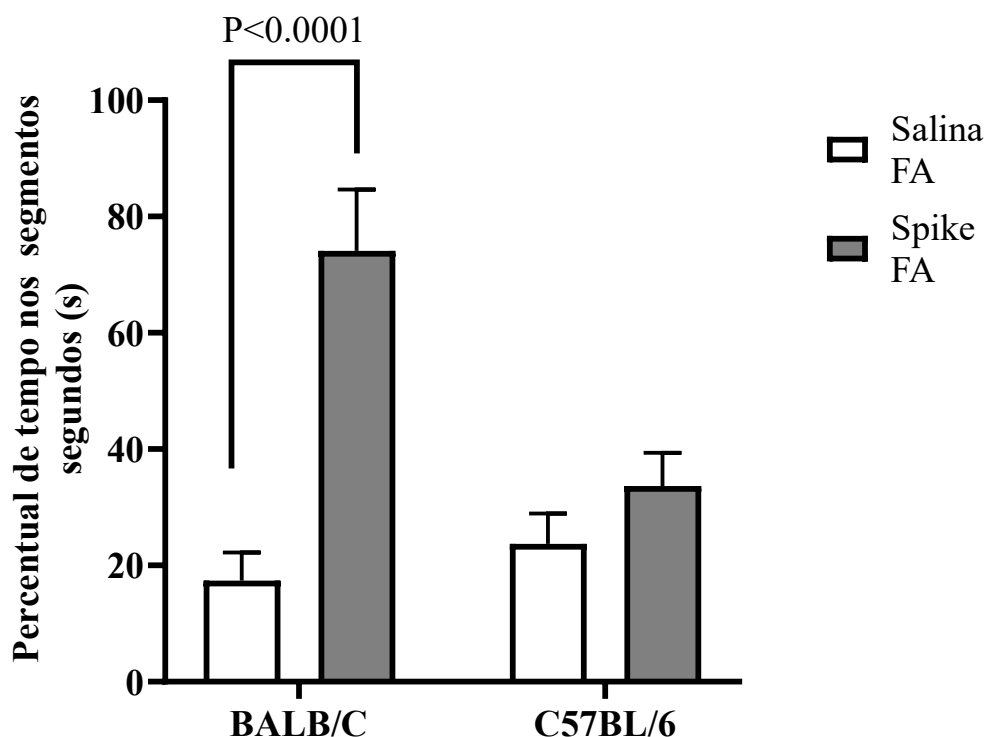
A análise estatística do desempenho dos animais no teste do Zero Maze, realizada por modelo de efeitos mistos (REML) com pareamento pelo fator Tempo, revelou que o tempo experimental ($P = 0,0276$) e a exposição à proteína Spike ($P = 0,0088$) influenciaram significativamente o comportamento ansioso dos animais. Embora o fator Linhagem isoladamente não tenha alcançado significância estatística ($P = 0,0772$), observou-se uma tendência sugestiva de efeito.

Além dos efeitos principais, foram identificadas interações significativas entre os fatores.

A interação Linhagem $\times$ Tempo foi altamente significativa ($P < 0,0001$), indicando que o efeito do tempo experimental no comportamento depende da linhagem genética. Também foram observadas interações significativas entre Linhagem $\times$ Spike ($P = 0,0120$) e entre Tempo $\times$ Spike ($P = 0,0016$), sugerindo que a modulação do comportamento ansioso pela exposição inflamatória depende tanto do tempo de avaliação quanto da linhagem dos animais. A interação tripla Linhagem $\times$ Tempo $\times$ Spike não foi significativa ($P = 0,1089$), o que indica que os efeitos combinados são majoritariamente explicados pelas interações duplas.

Na linhagem BALB/c, observou-se que os animais expostos à proteína Spike na fase aguda (SFA) apresentaram um aumento significativo no tempo no segmento aberto em comparação ao grupo controle Salina FA (diferença média = $-56,68$; $P < 0,0001$), indicando um aumento no comportamento tipo ansioso logo após a exposição (Fig. 24). Na linhagem C57BL/6, nenhuma diferença significativa foi observada.

Figura 23- Efeitos da proteína Spike ($10\mu\text{g}/\text{animal}/\text{dia}$) sobre a ansiedade no teste Zero Maze em camundongos submetidos ao modelo de SPAC entre as linhagens BALB/c e C57BL/6.



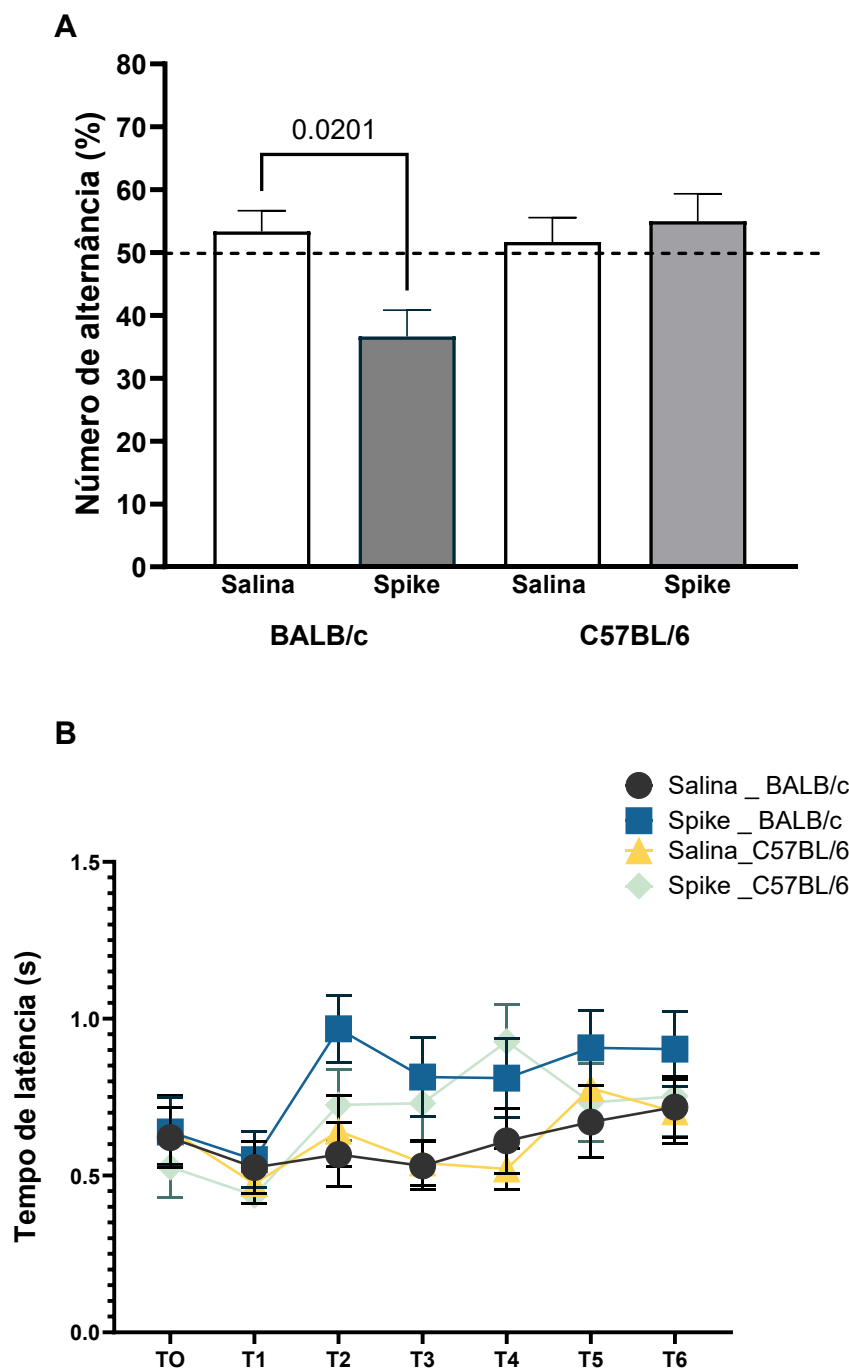
Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM ($n = 8-10$ animais/grupo). A análise estatística foi determinada por ANOVA de três vias, seguido pelo teste de *Bonferroni*. Modelo de SPAC induzido por Spike, aplicação de dose única de $10\mu\text{g}$. Abreviaturas: FA -Fase aguda.

6. 2.1 Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) sobre o déficit na memória de trabalho e capacidade de aprendizagem espacial por alternância espontânea - Teste T Maze em camundongos na FPA submetidos ao modelo de SPAC.

A avaliação do desempenho dos animais no teste de *T maze* foi realizado através da análise de dois fatores (ANOVA), em FPA a linhagem BALB/c e C57BL/6, considerando como variáveis o número de alternâncias e o tempo de latência. Os resultados revelaram uma interação significativa envolvendo o fator Linhagem [$F(3, 36) = 4,574$; $P = 0,0082$], sem interação significativa entre os quatro fatores experimentais: Spike, Salina, FA e FPA. Na linhagem BALB/c, os animais expostos a proteína Spike apresentaram uma redução significativa nas alternâncias espontâneas em comparação ao grupo controle tratado com salina ($P = 0,0201$) (Figura 25A).

No que se refere ao tempo de latência para a realização da tarefa, mensurado nos diferentes pontos temporais (T0 a T6), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos expostos salina e aqueles expostos à proteína Spike. No entanto, através da análise de duas vias (ANOVA) identificou-se uma interação significativa entre os fatores experimentais Spike, Salina, FA e FPA [$F(3, 252) = 5,202$; $P = 0,0017$], sem evidência de interação com o fator Linhagem (Figura 25B). Assim, pode-se inferir que a exposição à proteína Spike não comprometeu o tempo de latência, associado ao processo de tomada de decisão. Entretanto, no parâmetro de alternância espontânea, verificou-se que a linhagem BALB/c apresentou prejuízos na função executiva, evidenciando um comprometimento da memória de trabalho no desempenho dessa tarefa na fase pós-aguda.

Figura 24 - Efeitos da proteína Spike (10 μ g/animal/dia) sobre memória de trabalho em camundongos submetidos ao modelo de SPAC entre as linhagens BALB/c e C57BL/6.

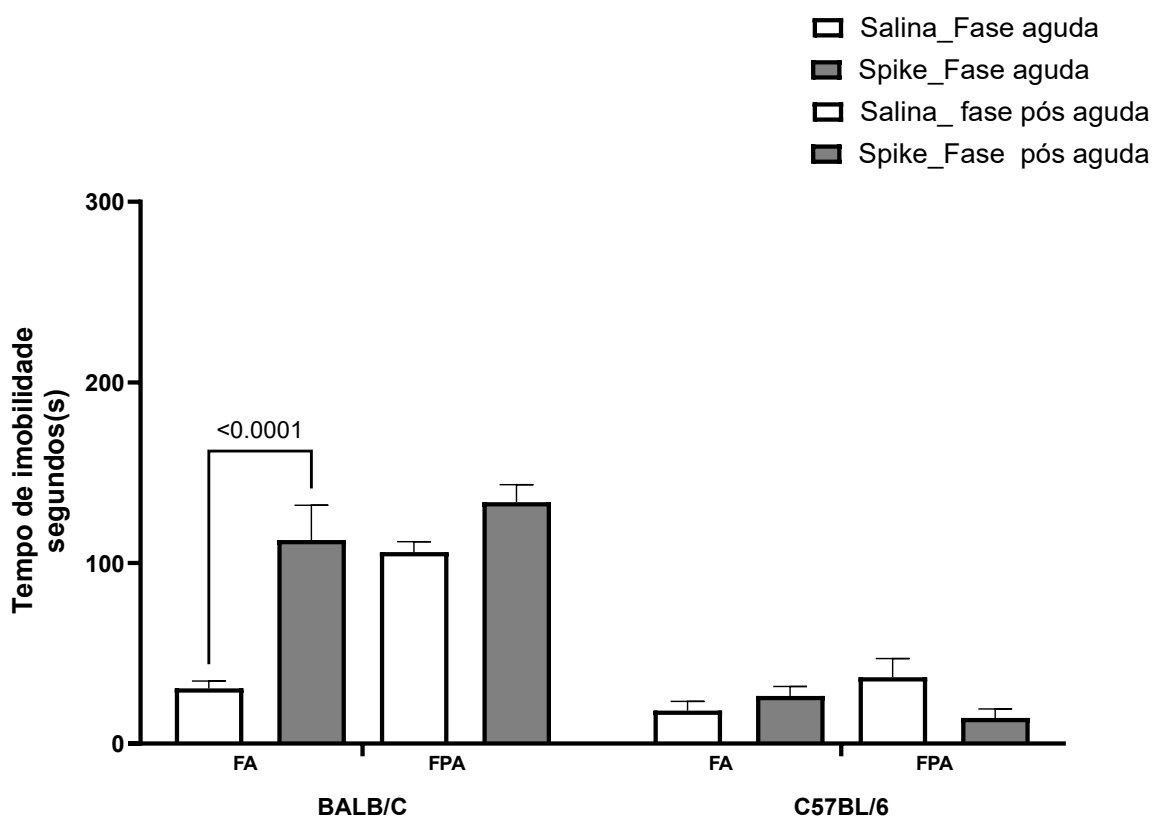


Os resultados são expressos como a média $\pm$ EPM (n = 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por duas vias ANOVA, seguido pelo teste de *Bonferroni*. Modelo de SPAC induzido por Spike, aplicação de dose única de 10 μ g. Animais na fase adulta. Teste na fase pós aguda (FPA)

6.2.2 Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) avaliação do tempo de imobilidade sobre o comportamento depressivo no teste do nado forçado em camundongos, FA e FPA, submetidos ao modelo da SPAC.

A análise estatística foi conduzida por meio de ANOVA de dois fatores, revelou interações estatisticamente significativas envolvendo o fator Linhagem [$F(3, 54) = 11,90$; $P < 0,0001$], bem como uma interação significativa entre os quatro fatores experimentais: Spike, Salina, FA e FPA [$F(3, 54) = 13,09$; $P < 0,0001$]. Na linhagem BALB/c, o grupo exposto a proteína Spike apresentou maior tempo de imobilidade em comparação ao grupo Salina na FA ($P < 0,0001$), enquanto na FPA não houve diferença significativa entre os grupos. Na linhagem C57BL/6, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos Salina e Spike em nenhuma das fases experimentais (Figura 26). Os camundongos BALB/c mostraram-se mais sensíveis após a exposição à proteína Spike, apresentando aumento do tempo de imobilidade, um indicativo de comportamento ansioso. Em contraste, os camundongos C57BL/6 exibiram níveis globalmente mais baixos de imobilidade, sugerindo um perfil comportamental intrinsecamente mais ativo e menos susceptível aos efeitos da exposição.

Figura 25- Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) sobre o tempo de imobilidade em camundongos submetidos ao modelo de SPAC.



Os resultados são expressos como a média±EPM (n = 8-10 animais/grupo). A análise estatística foi determinada por duas vias ANOVA, seguido pelo teste de *Bonferroni*. Modelo de SPAC induzido por Spike, aplicação de dose única de 10µg. (Abreviaturas: FA -Fase aguda; FPA – Fase pós aguda).

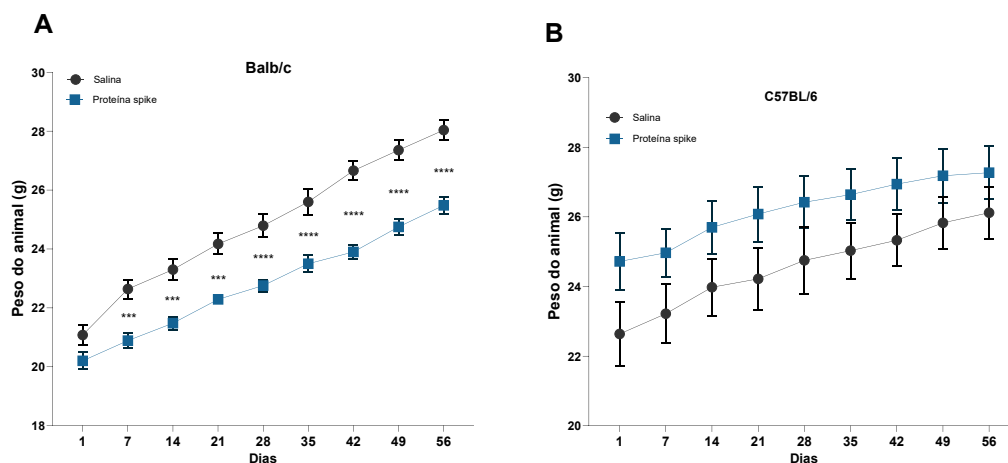
6. 2. 3 Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) avaliação dos pesos (em gramas) nos camundongos, na FA FPA, submetidos ao modelo da SPAC.

No grupo BALB/c, observou-se que os camundongos expostos salina apresentaram um aumento progressivo e consistente no peso ao longo do tempo. Em contraste, os camundongos expostos proteína Spike também ganharam peso, mas de forma significativamente reduzida em comparação ao grupo tratado com salina. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas a partir do 7º dia e se mantiveram até o final do experimento, com níveis de significância de ($P < 0,0001$). Isso sugere um impacto negativo do tratamento com proteína Spike sobre o ganho de peso nessa linhagem (Figura 27A).

A média de peso no grupo salina foi de 24,85 g ($\pm 0,76$), enquanto no grupo tratado com a proteína Spike foi de 22,81 g ($\pm 0,59$). Os dados da linhagem C57BL/6, o aumento de peso foi mais gradual e apresentou variação igual entre os indivíduos, conforme indicado pelos desvios

padrão maiores. No entanto, diferentemente do observado na linhagem BALB/c. A média de peso no grupo salina foi de 24,57 g ($\pm 0,38$), enquanto no grupo tratado com a proteína Spike foi de 26,21 g ($\pm 0,30$) (Figura 27B).

Figura 26 - Medida de peso ponderal em gramas dos camundongos das linhagens BALB/c (A) e C57BL/6 (B). Os pesos foram registrados nas FA e FPA.



Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), e as comparações foram realizadas por ANOVA de duas vias com teste de *Bonferroni* múltiplas comparações test. $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. ***($P < 0,0001$).

A Tabela 3 apresenta um compilado das análises comportamentais realizadas entre as linhagens BALB/c e C57BL/6 tratadas com salina e expostas a proteína Spike.

Tabela 3 – Compilado dos resultados dos testes comportamentais das Linhagens BALB/c e C57BL/6.

Comportamento Avaliado	Comparação	Fase	Resultado	Interpretação
Tempo em atividade locomotora (Campo Aberto)	BALB/c Spike	FA	↓	percorreu menor distância
Tempo em atividade locomotora (Campo Aberto)	BALB/c Spike	FPA	↑	percorreu maior distância
Tempo em atividade locomotora (Campo Aberto)	C57BL/6 Spike	FA	↓	percorreu menor distância
Número de Rearings (Campo Aberto)	BALB/c vs. BALB/c (Spike)	FA e FPA	↓	BALB/c, FPA apresentou menos <i>rearing</i> s
Número de <i>Grooming</i> (Campo Aberto)	C57BL/6 Spike	FA	↑	Maiores números de <i>grooming</i>
Permanência na Zona Central (Campo Aberto)	BALB/c Spike	FPA	↑	BALB/c passou mais tempo na zona central na FPA
Reconhecimento de Objeto Novo (NOR)	C57BL/6 Spike	FPA valor de referência (< 0)	↓	Déficit cognitivo expostos Spike
Tempo no Segmento Aberto (Zero Maze)	BALB/c Spike.	FA valor de referência (< 30%)	↑	BALB/c explorou mais o segmento aberto, possível desorientação
Alternância Espontânea (Labirinto em T)	BALB/c Spike.	FPA valor de referência (>50%)	↓	Déficit de memória espacial nos BALB/c expostos Spike
Tempo de Imobilidade (Teste Nado Forçado)	BALB/c Spike	FA	↑	Aumento do tempo de imobilidade (comportamento ansioso)

Fonte: Elaborado pela autora

FA: Fase aguda; ↑ Aumento; ↓ Redução; /S: Versus

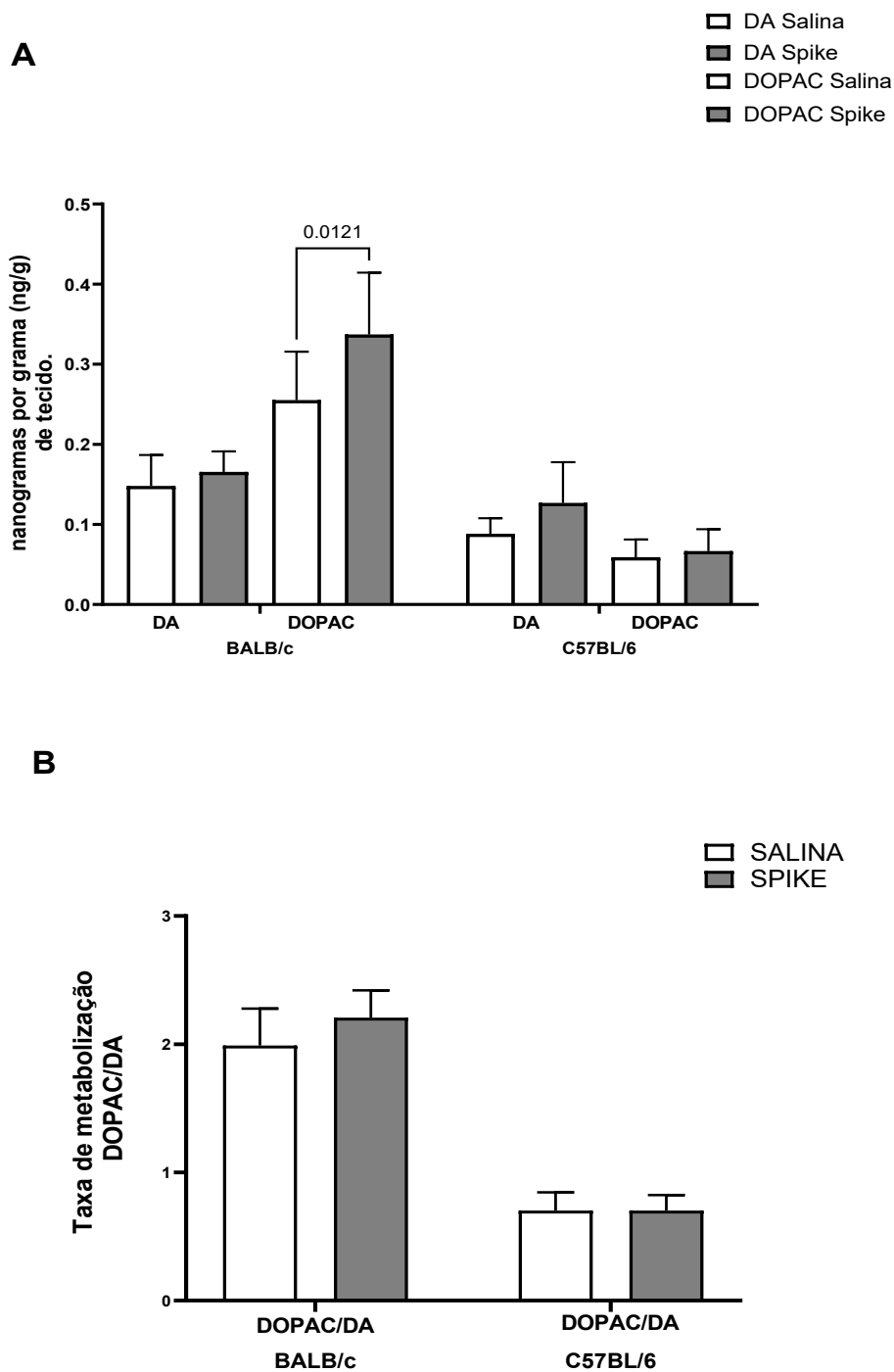
6.2. 4 Testes neuroquímicos

6. 2. 5 Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) na determinação dos níveis de Dopamina (DA) e seu metabólito (DOPAC) e da taxa de metabolização em corpo estriado de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 induzidos ao modelo de SPAC.

Os níveis de dopamina (DA) e de ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), metabólito da dopamina, foram determinados no lisado do tecido de corpo estriado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Na linhagem BALB/c, não houve diferença significativa nos níveis de DA entre os grupos expostos salina e proteína Spike. No entanto, os níveis de DOPAC foram significativamente mais elevados no grupo tratado com a proteína Spike em comparação com o grupo salina ($P = 0,0121$), sugerindo um aumento no metabolismo da dopamina nesses animais. Na linhagem C57BL/6, os níveis de DA e DOPAC não apresentaram diferenças significativas entre os grupos expostos salina ou proteína Spike. Os níveis de ambos os compostos foram significativamente mais baixos nessa linhagem em comparação com os níveis observados na linhagem BALB/c, com diferença significativa para o DOPAC ($P < 0,0001$) (Figura 27A). Os dados indicam uma resposta distinta ao tratamento com a proteína Spike entre as linhagens BALB/c e C57BL/6, com a linhagem BALB/c apresentando um metabolismo aumentado de DA, evidenciado pelos níveis mais elevados de DOPAC no grupo tratado. Em contrapartida, a linhagem C57BL/6 não demonstrou alterações significativas, sugerindo possíveis diferenças genéticas ou metabólicas que modulam a resposta ao tratamento.

A análise da taxa de metabolização (relação DOPAC/DA) nas linhagens BALB/c e C57BL/6, não mostrou diferenças entre os grupos expostos salina e proteína Spike. No entanto, na linhagem BALB/c, os níveis da taxa de metabolização foram significativamente mais elevados tanto no grupo tratado com a proteína Spike ($P < 0,0001$) quanto no grupo tratado com salina ($P = 0,0006$), em comparação com os respectivos grupos da linhagem C57BL/6 (Figura 27B).

Figura 27 - Efeitos da proteína Spike (10µg/animal/dia) na determinação dos níveis de Dopamina (DA) e seu metabólito (DOPAC) (A) e determinação das taxas de metabolização (B) em corpo estriado de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 após a eutanásia na fase pós aguda, induzidos ao modelo de SPAC.

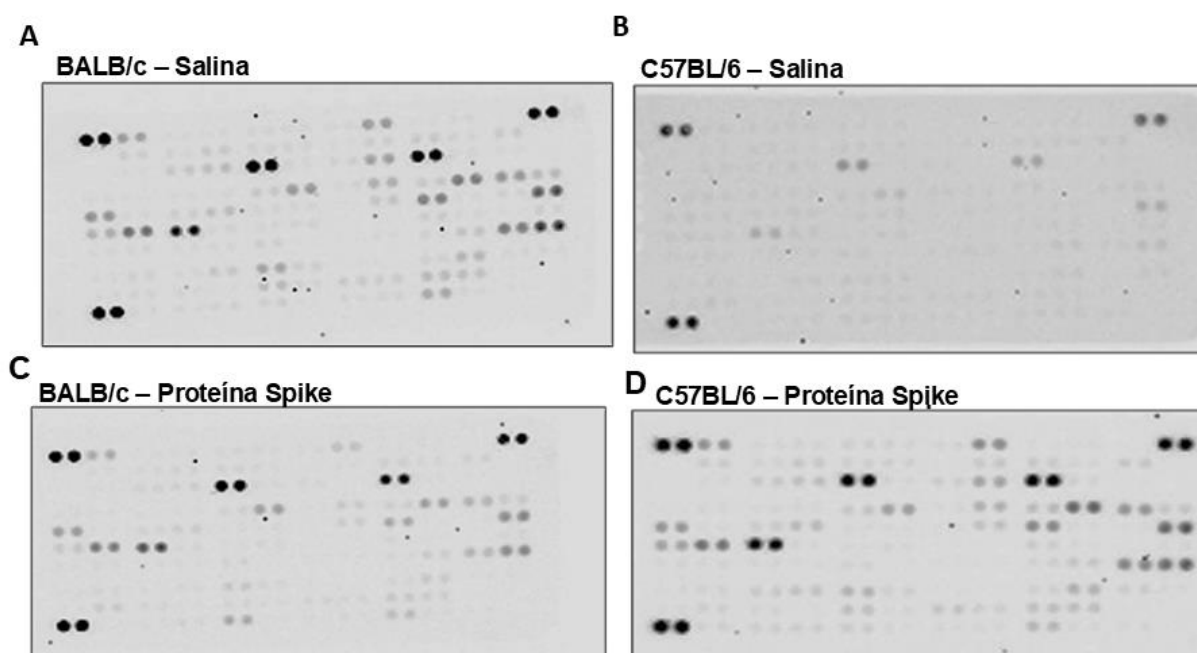


Níveis de dopamina (DA) e seu metabólito DOPAC (em ng/g de tecido) em duas linhagens de camundongos: BALB/c e C57BL/6, expostos a dois tratamentos diferentes: salina e proteína Spike no corpo estriado.

6. 2. 5 Dosagem de citocinas no lisado de tecido do hipocampo de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 expostos controle salina ou proteína Spike (10µg/animal/dia), após a eutanásia na fase pós aguda induzidos ao modelo de SPAC.

A dosagem das citocinas foi determinada seguindo os dados do *datasheet* do *Kit Proteome Profiler Mouse Cytokine Array*. Um arranjo de anticorpos baseado em membrana para a determinação paralela dos níveis relativos de citocinas e quimiocinas (*Mean pixel*). Este método permitiu identificar principais citocinas com regulação diferencial entre os grupos BALB/c e C57BL/6 (Figura 28 A - D). Foram identificadas citocinas com expressão aumentada (regulação positiva) e diminuída (regulação negativa) em ambos os grupos, destacando as diferenças no perfil inflamatório e imunológico entre as linhagens.

Figura 28 - Membranas representando de expressão das citocinas obtidas por meio do kit Mouse XL Cytokine Array, utilizando lisados de hipocampo das linhagens BALB/c e C57BL/6.



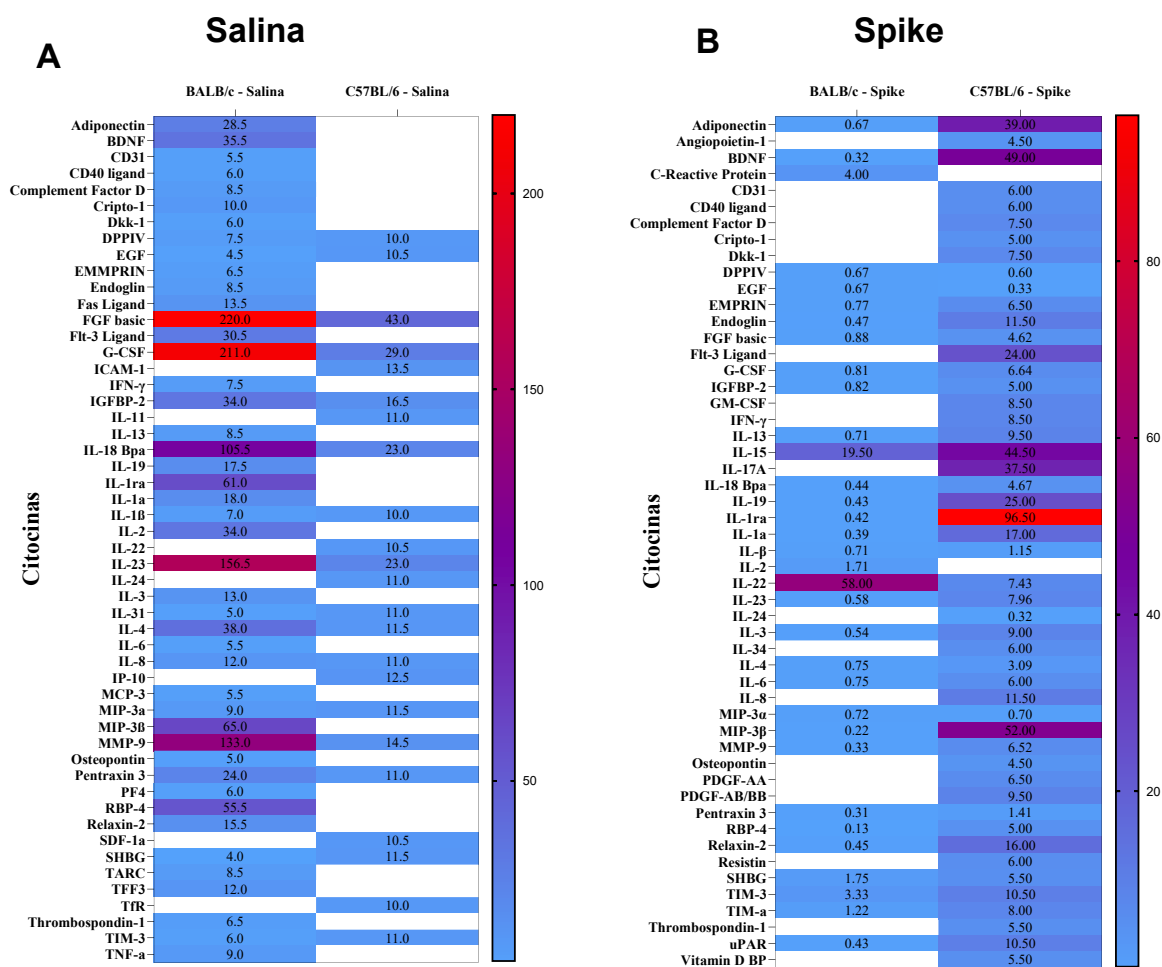
A. Padrão de expressão das citocinas no grupo BALB/c tratado com salina; **B.** Padrão de expressão das citocinas no grupo C57BL/6 tratado com salina. **C.** Padrão de expressão das citocinas no grupo BALB/c tratado com a proteína Spike; **D.** Padrão de expressão das citocinas no grupo C57BL/6 tratado com a proteína Spike.

Nos controles (Salina) das linhagens BALB/c e C57BL/6, sem o tratamento com a proteína Spike do SARS-CoV-2, foram bloqueadas várias citocinas, destacando-se a presença de adiponectina, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), CD31, CD40 ligante, fator complementar D, Cripto-1, Dkk-1, DPPIV, EGF, EMMPRIN, endoglina, ligante Fas, FGF básico, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IGFBP-2, IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6,

IL-8, IL-10, IL-13, IL-18 bpa, IL-23, IL-31, MIP-1 α , MIP-3 α , MMP-9, osteopontina, pentraxina 3, PF4, RBP-4, SHBG, trombospondina-1, TNF- α e uPAR (Figura 29A).

As citocinas encontradas no grupo controle (Salina), desempenham papéis fundamentais em processos inflamatórios e imunológicos, regulando desde uma resposta imune inata até mecanismos adaptativos. A presença dessas moléculas em ambos os grupos indica uma linha basal de atividade imunológica e inflamatória que pode ser comparada para avaliar os efeitos específicos do tratamento com a proteína Spike.

Figura 29 - A expressão diferencial de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e outras proteínas solúveis analisadas em sobrenadantes de tecido hipocampal de animais do grupo Salina (figura 29A) e Spike (Figura 29B), BALB/c e C57BL/6, após a eutanásia na fase pós aguda utilizando o kit Mouse XL Cytokine Array.



Os níveis relativos de expressão foram representados por um gradiente de cores: azul indica baixa expressão, passando por roxo (níveis intermediários), até vermelho (alta expressão). Áreas em branco indicam ausência de detecção ou dados indisponíveis.

Após análise de comparação dos sinais em relação ao grupo Salina, pode-se verificar que para linhagem C57BL/6 tratada com Proteína Spike, foi identificada uma expressiva supra regulação de citocinas relacionadas a processos inflamatórios e neuroprotetores. O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) apresentou níveis notavelmente elevados (49,00), indicando a ativação de mecanismos associados à plasticidade neuronal e à neuroproteção. De maneira similar, o antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1ra) exibiu a maior densidade entre todas as citocinas analisadas (96,50), sugerindo um importante papel regulador na contenção de respostas inflamatórias exacerbadas (Figura 29B).

A interleucina-15 (IL-15), reconhecida por sua participação na ativação de células T e nas respostas imunológicas inatas, também demonstrou níveis elevados (44,50), reforçando o perfil pró-inflamatório característico deste grupo. Além disso, a quimiocina MIP-3 β apresentou uma densidade média de 52,00, apontando para sua provável contribuição na migração celular e organização tecidual, processos essenciais em respostas inflamatórias e na regeneração tecidual (Figura 30). Por outro lado, algumas citocinas apresentaram baixa expressão (infra regulação) na linhagem C57BL/6 após tratamento com a Proteína Spike.

A interleucina-24 (IL-24) exibiu uma densidade de apenas 0,32, refletindo uma expressão reduzida dessa citocina, que está tipicamente envolvida na regulação da resposta inflamatória e apoptose. De forma semelhante, a IL-34 e a IL-2 apresentaram níveis limitados ou indetectáveis, sugerindo uma menor ativação de vias relacionadas à imunidade adaptativa neste grupo (Figura 29B).

Na linhagem BALB/c, observou-se uma expressão marcadamente elevada da interleucina-22 (IL-22), com uma densidade de 58,00, destacando-se como a citocina mais expressa neste grupo. A IL-22 é amplamente reconhecida por seu papel protetor em tecidos epiteliais e na resposta imune contra infecções, sugerindo um perfil anti-inflamatório e reparador característico deste grupo. Outras citocinas com níveis elevados incluem a globulina de ligação ao hormônio sexual (SHBG), com uma densidade de 1,75, envolvida no metabolismo hormonal, e a IL-2, com densidade de 1,71, que exerce um papel crucial na ativação de linfócitos T (Figura 30).

Por outro lado, algumas citocinas apresentaram baixa expressão no grupo BALB/c. A proteína de ligação ao retinol 4 (RBP-4), associada ao metabolismo da vitamina A, apresentou uma densidade muito baixa (0,13), assim como a Pentraxina 3 (PTX3), uma proteína envolvida na imunidade inata, com densidade de 0,31. Notavelmente, a BDNF, altamente expressa na linhagem C57BL/6, apresentou uma expressão substancialmente reduzida no grupo BALB/c

(0,32), destacando uma regulação diferencial significativa entre os grupos. De maneira similar, a IL-1ra, que alcançou os maiores níveis na linhagem C57BL/6, apresentou valores consideravelmente mais baixos no grupo BALB/c (0,42) (Figura 31). As análises evidenciaram um perfil imunológico distinto entre as linhagens C57BL/6 Proteína Spike e BALB/c Proteína Spike, refletindo diferenças nas respostas inflamatórias, adaptativas e protetoras.

Comparando as linhagens BALB/c e C57BL/6, observou-se diferenças no perfil de expressão de citocinas. A linhagem C57BL/6 expostos a Spike apresentou uma expressão marcadamente elevada de BDNF (49,00), IL-1ra (96,50) e IL-15 (44,50), destacando uma predominância de vias relacionadas à neuroproteção, inflamação e ativação da imunidade inata. Adicionalmente, a citocina MIP-3 β foi mais expressa nesse grupo (52,00), reforçando sua participação na migração celular e no recrutamento imunológico.

Por outro lado, a linhagem BALB/c demonstrou uma maior expressão de IL-22 (58,00), a citocina mais expressa nesta linhagem, indicando um perfil mais associado à proteção epitelial e respostas anti-inflamatórias. A IL-2 (1,71) também apresentou maior expressão no BALB/c, evidenciando a ativação de linfócitos T e a modulação da imunidade adaptativa. Outras citocinas com expressão moderada incluem o SHBG (1,75), envolvido no metabolismo hormonal.

Diferenças adicionais foram observadas em citocinas com baixa expressão, em Balb/c, citocinas como RBP-4 (0,13) e Pentraxina 3 (0,31), ambas relacionadas à imunidade inata, apresentaram níveis reduzidos. Já na linhagem C57BL/6, a IL-24 (0,32) mostrou baixa expressão, e a IL-2 foi ausente, sugerindo uma menor ativação de vias adaptativas. Por fim, os resultados destacaram uma regulação diferencial marcante entre os grupos. Enquanto o C57BL/6 apresentou um perfil pró-inflamatório e neuroprotetor mais robusto, o BALB/c evidenciou uma maior associação com citocinas que modulam a imunidade adaptativa e a reparação tecidual. Essas diferenças refletem particularidades fundamentais nas respostas inflamatórias e imunológicas dos grupos, oferecendo insights valiosos sobre os mecanismos experimentais em estudo.

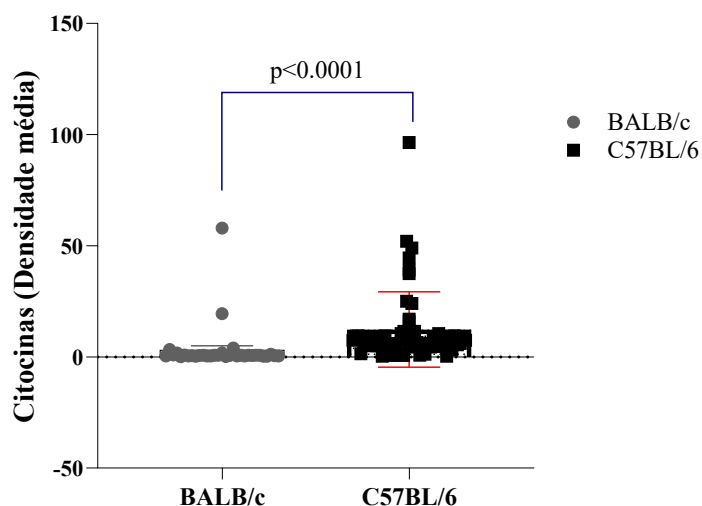
A linhagem BALB/c tratado com salina apresenta um perfil de vigilância imune e regeneração tecidual, caracterizado por um baixo grau de inflamação ativa. Esse cenário sugere um estado de homeostase imunológica, mantendo a capacidade de responder rapidamente a estímulos sem apresentar sinais de ativação inflamatória exacerbada. Já a linhagem C57BL/6 tratado com salina exibe um perfil de ativação basal da inflamação, evidenciado pela expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18. No entanto, essa ativação é

contrabalançada por mecanismos regulatórios, como a presença de IL-1ra, indicando uma imunidade inata mais vigilante e controlada mesmo em condições basais. Nas linhagens C57BL/6, as citocinas apresentam um perfil predominantemente pró-inflamatório, associado a uma resposta neuroprotetora. Em contrapartida, na linhagem BALB/c, observa-se um perfil direcionado para a imunidade adaptativa e a reparação tecidual.

Para comparar as distribuições das citocinas entre os grupos de forma não paramétrica, foi realizado o Teste de *Mann-Whitney* (não paramétrico), pode-se verificar um aumento significativo ($P < 0.0001$) entre as médias de expressão de citocinas para o C57BL/6 (média 12.33 ± 2.33) em comparação com BALB/c (média 3.15 ± 1.81) (Figura 31).

De forma geral, nos resultados obtidos, observou-se uma diferença significativa na expressão de citocinas entre os grupos BALB/c e C57BL/6. A análise revelou uma maior densidade média de citocinas no grupo C57BL/6 ($P < 0,0001$), evidenciando uma ativação mais robusta de vias inflamatórias e imunológicas nesta linhagem, em comparação ao grupo BALB/c. O grupo BALB/c apresentou valores mais baixos de expressão, sugerindo uma ativação imunológica menos pronunciada, com um perfil de expressão citocínica mais moderado.

Figura 30 - Distribuição da densidade média de citocinas expressas nos sobrenadantes de tecido hipocampal de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, na fase pós aguda analisada pelo kit Mouse XL Cytokine Array.



Os pontos representam os valores individuais, e as linhas vermelhas indicam a mediana para cada grupo. A análise estatística pelo Teste de *Mann-Whitney* (não paramétrico) com diferença significativa entre os grupos ($P < 0,0001$), com maior densidade no grupo C57BL/6.

7. DISCUSSÃO

Nossos achados demonstraram os efeitos da proteína Spike do SARS-CoV-2 na modulação das respostas imunológicas Th1 e Th2, bem como em comportamentos associados à ansiedade, depressão e cognição, características persistentes na SPAC. Por meio de estudos *in vitro* e *in vivo*, utilizando camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, foi possível compreender os eventos imunológicos e os déficits de memória de curto prazo induzidos pela proteína Spike. Esses efeitos foram relacionados às alterações inflamatórias, bem como nos níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de seu impacto nas citocinas em áreas cerebrais como hipocampo e corpo estriado.

Nos experimentos *in vitro*, especificamente no teste de MTT, a proteína Spike demonstrou capacidade de inibição mais pronunciada frente a linhagem RAW 264.7 e astrócitos, reforçando o papel da proteína Spike na indução de respostas inflamatórias e no comprometimento celular, fundamentais para o entendimento das complicações neuroimunológicas associadas à COVID-19 (Alves, 2023).

Na análise morfológica, os astrócitos expostos a proteína Spike apresentaram sinais de condensação celular, irregularidade na forma e distribuição menos uniforme, estresse celular e início de morte celular. O SARS-CoV-2 pode infectar astrócitos, levando a alterações no metabolismo energético dessas células. O vírus aumenta o gasto energético dos astrócitos para se replicar, o que compromete a função neuronal e contribui para sintomas neurológicos observados em pacientes com COVID-19 (Crunfli *et al.*, 2022). Nas células RAW 264.7, a redução na densidade celular, irregularidades na forma e fragmentações podem indicar uma indução de apoptose, direcionando um impacto direto na funcionalidade imunológica através dos macrófagos.

Embora os astrócitos possam ser menos suscetíveis à morte celular direta, a infecção pelo SARS-CoV-2 pode levar a alterações específicas, incluindo mudanças no metabolismo energético e na produção de citocinas pró-inflamatórias. Essas alterações afetam os neurônios, já que os astrócitos desempenham um papel crucial no suporte e manutenção do ambiente neuronal (Crunfli *et al.*, 2022).

Os achados do presente estudo demonstram que SARS-CoV-2 induz citotoxicidade e alterações funcionais em diferentes tipos celulares. A maior sensibilidade dos macrófagos RAW 264.7 à citotoxicidade direta destaca a importância de investigar os efeitos imunomoduladores do vírus. Por outro lado, as alterações observadas nos astrócitos sugerem que, mesmo sem

citotoxicidade direta, um podem comprometer a homeostase do sistema nervoso central, contribuindo para manifestações neurológicas associadas à SPAC (Chaves Filho *et al.*, 2023).

A diminuição de NO em altas concentrações podem estar relacionada à indução de apoptose ou disfunção mitocondrial. Lei et al. (2021) relataram que a Spike pode desencadear apoptose através de vias dependentes de caspases, corroborando os resultados de morte celular observados neste estudo. Além disso, os mesmos autores demonstraram que a Spike ativa os receptores TLR4, resultando na ativação de vias pró-inflamatórias, como a de NF- κ B. Essa ativação explica o aumento de NO em concentrações subletais, refletindo uma resposta inflamatória exacerbada. A produção excessiva e prolongada de NO pode gerar estresse oxidativo e contribuir para a disfunção imunológica, como observada em casos graves de COVID-19 (Zhao *et al.*, 2021). Esses dados reforçam que há um modulador-chave da resposta imunológica e inflamatória, promovendo efeitos dose-dependentes que influenciam a SPAC.

Por outro lado, a ausência de alterações na produção de NO nos astrócitos pode estar relacionada a mecanismos compensatórios ou diferenças na expressão de receptores e vias inflamatórias. Estudos sugerem que a ativação crônica de astrócitos pode estar associada a condições neuroinflamatórias e disfunções neurológicas a longo prazo (Dos Reis; Selvam; Ayyavoo, 2024; Puentes-Orozco; Albarracin; Velásquez, 2024).

O teste do campo aberto é uma ferramenta consagrada para avaliar tanto atividade locomotora quanto comportamentos associados à ansiedade de roedores. Na avaliação dos parâmetros comportamentais do teste do campo aberto observou-se efeitos distintos da proteína Spike entre as linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6, especialmente na fase aguda. Nos BALB/c, observou-se uma resposta compatível com maior ansiedade e apatia, evidenciada por redução na distância percorrida e um menor número de *groomings*, que frequentemente está relacionado ao estado emocional, ao enfrentamento do estresse e a um perfil do tipo depressivo em roedores, conforme descrito por Kalueff et al. (2016), que indicam que a frequência de *grooming* tende a se manter inalterada ou diminuir em contextos de comportamento depressivo.

Adicionalmente, o fato de os animais BALB/c apresentarem alterações semelhantes mesmo no grupo controle (Salina) sugere uma maior vulnerabilidade basal dessa linhagem ao estresse, conforme relatado em outros estudos que indicam diferenças genéticas no perfil ansioso entre linhagens (Stojanović; Randjelović; Radulović, 2017).

Já os C57BL/6 demonstraram, na fase aguda, redução na atividade locomotora e um menor número de *rearings*. Na fase pós-aguda, também observou-se uma queda na distância percorrida, como também um maior tempo na zona central, esses parâmetros estão relacionados

com menor índice de ansiedade, enquanto na FA o aumento no *grooming* demonstra a hipótese de que nessa fase os animais estão menos ansiosos. Por fim, a redução da distância percorrida na fase pós-aguda, nos C57BL/6, pode refletir um efeito cumulativo ou adaptativo da exposição à proteína, compatível com modificações tardias na atividade motora ou nos estados emocionais.

Além disso, a variabilidade entre as linhagens reflete diferenças genéticas e imunológicas que modulam a resposta ao SARS-CoV-2, como já demonstrado em modelos murinos (Verma *et al.*, 2024). A resposta específica do camundongo BALB/c ao tratamento com a proteína Spike na fase pós-aguda sugere uma possível modulação tardia do comportamento, mediada por alterações neuroinflamatórias ou pelo impacto direto da proteína Spike no sistema nervoso central.

Esses resultados indicam que a exposição à proteína Spike afeta o comportamento exploratório e a atividade locomotora ao longo do tempo, sendo esse impacto mais evidente na fase tardia e mais pronunciado nos animais da linhagem BALB/c. Ressalta-se que, por natureza, os roedores apresentam curiosidade em ambientes novos, e a redução do tempo explorando a área central é interpretada como um indicativo de comportamento ansioso (Golani et al., 2009; Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2019).

Uma possível explicação para essa mudança de padrão está relacionada à evolução do quadro neuroinflamatório e à modulação de sistemas neurotransmissores, como o dopaminérgico. É possível que, com o passar do tempo, ocorra uma redução na disponibilidade de dopamina ou alterações na taxa de turnover dopaminérgico em regiões como o córtex pré-frontal e o estriado estruturas envolvidas no controle da motivação e do comportamento, o que pode indicar um comprometimento neurológico progressivo (Prut; Belzung, 2003; Stojanović; Randjelović; Radulović, 2017). Vale destacar ainda que o *grooming* possui forte relação com a atividade da via dopaminérgica cerebral, estando associado a diversas funções, como a coordenação motora e a motivação (Salvatore, 2024).

No teste de reconhecimento do objeto novo na linhagem BALB/c exposta com a proteína Spike, em ambas as fases não houve comprometimento da memória sendo capaz de reconhecer o objeto novo. Entretanto, na linhagem C57BL/6 exposta com a proteína Spike, ocorreu uma disfunção cognitiva na fase pós-aguda, nossos achados corroboram com as observações descritas por Dantas et al. (2023), que relataram prejuízos cognitivos tardios em camundongos expostos a proteína Spike. No estudo, camundongos adultos das linhagens C57BL/6 e *Swiss* receberam 6,5 µg da proteína por via intracerebroventricular (ICV), utilizando a mesma dosagem. Os resultados revelaram que, sete dias após a administração, os animais

ainda foram capazes de diferenciar o objeto novo do objeto familiar no teste de reconhecimento de objetos. No entanto, após 45 dias, os camundongos tratados não conseguiram realizar essa distinção, indicando um comprometimento cognitivo. Esses dados reforçam que a proteína Spike, independentemente da via de administração (central ou sistêmica), exerce efeitos neurotóxicos de longo prazo, afetando negativamente a cognição, associados à neuroinflamação hipocampal.

De forma complementar, Oh et al. (2022) demonstraram que camundongos da linhagem C57BL/6, submetidos à administração da subunidade S1 da proteína Spike por injeção estereotáxica no hipocampo dorsal, apresentaram déficits cognitivos evidenciados no teste de reconhecimento de objetos.

O estudo conduzido por Rhea et al. (2020) respondeu a questões relevantes ao demonstrar que a subunidade S1 da proteína Spike, marcada com iodo radioativo e administrada por via intravenosa, foi capaz de atravessar rapidamente a barreira hematoencefálica (BHE) em camundongos machos heterogênicos. A proteína foi absorvida por diferentes regiões do cérebro, alcançando o espaço parenquimatoso. Dentre essas regiões, o hipocampo apresentou captação significativa da S1 radio iodado (contraste), o que é especialmente relevante por se tratar de uma área diretamente envolvida em funções cognitivas. Alterações como prejuízo cognitivo tardio, microgliose e perda sináptica são características frequentemente observadas em síndromes demenciais e na fisiopatologia da Doença de Alzheimer. Assim, os nossos achados, em consonância com os resultados de Rhea et al. (2020), fortalecem a hipótese de que a proteína Spike, isoladamente, é capaz de ultrapassar a BHE e induzir comprometimento cognitivo tardio em camundongos.

A ansiedade, embora constitua uma resposta natural e essencial do organismo diante de situações de risco, torna-se uma comorbidade preocupante quando associada ao transtorno depressivo maior (TDM), pois pode resultar na incapacidade de realizar atividades cotidianas. Um dos modelos utilizados para avaliar comportamentos ansiosos em camundongos é o teste conhecido como *zero maze* (LaPlaca *et al.*, 2021; Tucker; McCabe, 2021).

No teste Zero Maze aplicado na fase aguda, os camundongos BALB/c expostos a proteína Spike apresentaram exploração significativa nos segmentos abertos, ultrapassando 30% de permanência, esse percentual está classicamente associado à redução da ansiedade, podendo refletir desorientação ou prejuízo na percepção de risco. Em contraste, os C57BL/6 mantiveram comportamento basal, independentemente do tratamento.

No teste T Maze, aplicado na fase tardia, os animais BALB/c expostos com Spike

exibiram redução significativa nas alternâncias espontâneas, com desempenho inferior a 50%, sugerindo um déficit na memória de trabalho de curto prazo. No mesmo teste foi avaliado o tempo de latência, um parâmetro importante para a análise de aspectos comportamentais como motivação para explorar, tomada de decisão, possíveis sinais de apatia ou indecisão, bem como ansiedade ou hesitação diante de um novo ambiente (d'Isa; Comi; Leocani, 2021; Deacon; Rawlins, 2006).

De modo geral, as linhagens não apresentaram diferenças significativas na latência, mesmo diante da redução na taxa de alternância previamente observada, o que reforça que o déficit de memória de trabalho nos BALB/c não está associado à hesitação ou apatia motora, mas sim a alterações funcionais mais diretas nos circuitos de memória e aprendizagem. A dopamina (DA), neurotransmissor central nesses processos, exerce um papel modulador na flexibilidade comportamental e na avaliação de recompensas.

Alterações nos níveis de DA, bem como em seu principal metabólito, a DOPAC, podem impactar a funcionalidade desses circuitos. Uma redução na razão DOPAC/DA pode indicar uma menor taxa de turnover dopaminérgico, (taxa de renovação ou metabolismo da DA) no cérebro frequentemente associada a respostas mais lentas, hesitação ou apatia comportamental sem necessariamente implicar prejuízos motores.

No teste do nado forçado, os camundongos BALB/c expostos com a proteína Spike apresentaram um aumento significativo no tempo de imobilidade na FA do experimento, indicando comportamento semelhante ao depressivo. Em contraste, os C57BL/6 permaneceram mais ativos, demonstrando menor tempo de imobilidade e maior resistência ao efeito comportamental da proteína. Esses resultados reforçam a hipótese de que os efeitos neurocomportamentais da proteína Spike são modulados por características genéticas das linhagens. A ausência de efeitos significativos nos C57BL/6 pode refletir uma resiliência imunológica e comportamental intrínseca, conforme relatado por Matsuo et al. (2021), que descreveram menor susceptibilidade dessa linhagem a modelos de inflamação neurocomportamental. Por outro lado, a maior sensibilidade dos BALB/c a alterações emocionais induzidas por alterações inflamatórias, como infecções virais ou exposição a proteínas virais, corrobora os achados de Gauvin et al. (2017).

A análise neuroquímica, na determinação dos níveis de DA e DOPAC no corpo estriado, na linhagem BALB/c revelou um aumento nos níveis de DOPAC, sugerindo intensificação no metabolismo dopaminérgico (Liu *et al.*, 1996). Esse efeito não foi observado nos camundongos C57BL/6, que mantiveram níveis basais baixos de DA e DOPAC. Esses dados indicam uma

susceptibilidade neuroquímica dos animais BALB/c, possivelmente associada a uma resposta neuroinflamatória mais acentuada, enquanto os C57BL/6 apresentaram maior estabilidade dopaminérgica frente ao mesmo estímulo. Tais diferenças podem estar relacionadas aos fenótipos Th2 e Th1 predominantes em BALB/c e C57BL/6, respectivamente, e reforçam a importância da linhagem na interpretação de alterações neurometabólicas em modelos experimentais da SPAC.

Adicionalmente, a análise da razão DOPAC/DA evidenciou que os BALB/c apresentam uma taxa de metabolização dopaminérgica mais elevada já em condições basais, que se intensifica ainda mais após a exposição à proteína Spike. Esse aumento pode refletir uma tentativa compensatória do sistema dopaminérgico em responder a uma condição de estresse ou disfunção, mas também pode indicar uma diminuição da disponibilidade de dopamina funcional para atuação sináptica, o que pode comprometer a modulação adequada de comportamentos motivacionais, afetivos e motores (Kalueff *et al.*, 2016).

Nos C57BL/6, a razão DOPAC/DA permaneceu baixa e inalterada entre os grupos, demonstrando menor impacto da Spike sobre o metabolismo da dopamina. Essa interpretação é sustentada pelos resultados comportamentais, os BALB/c expostos Spike apresentaram tanto sinais de ansiedade aumentada quanto indicadores compatíveis com comportamento do tipo depressivo (como a redução do *grooming*), além da diminuição no tempo na zona central.

Esses efeitos podem estar associados ao desequilíbrio dopaminérgico induzido pela Spike, que afeta tanto o estriado quanto outras regiões do cérebro envolvidas na regulação emocional e comportamental (Sher, 2007). Já nos animais C57BL/6, a ausência de alterações neuroquímicas significativas (sem aumento de DOPAC ou da razão DOPAC/DA) coincide com um padrão comportamental mais estável, sugerindo uma menor vulnerabilidade à ação da proteína Spike ou uma resposta neurobiológica mais eficiente frente ao estressor (Jokinen; Nordström; Nordström, 2009).

A expressão diferencial de citocinas entre as linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 após a exposição à proteína Spike do SARS-CoV-2 destaca variações imunológicas significativas que podem ser atribuídas a diferenças genéticas e fenotípicas. A linhagem BALB/c apresentou aumento significativo de citocinas IL-2 e IL-22 são citocinas com funções imunomodulatórias. A IL-2 é classicamente descrita como uma citocina pró-inflamatória, associada à resposta Th1, enquanto a IL-22 pode ter efeitos pró-inflamatórios ou regenerativos associadas às respostas inflamatórias exacerbadas, podem desencadear reações de fase aguda que incluem a liberação de peptídeos quimiotáticos, febre e ativação de células endoteliais,

resultando em permeabilidade vascular, como observado em estudos anteriores sobre a patogênese da dengue (Anderson *et al.*, 1997). Esse perfil inflamatório pode estar correlacionado com o aumento de comportamento ansioso, evidenciado pelo maior tempo na zona periférica e pela redução na exploração, como indicado pela diminuição de *rearing* no teste do campo aberto.

Na linhagem BALB/c, observou-se uma maior expressão de IL-15, associada ao aumento nos níveis do metabólito da dopamina (DOPAC) no corpo estriado, sugerindo uma possível ativação imune associada a comportamentos do tipo ansioso e depressivo. Esse quadro se reflete no maior tempo de imobilidade no teste do nado forçado, uma característica de comportamento depressivo. A IL-15 está relacionada à ativação de células NK e T citotóxicas, podendo participar da modulação de respostas inflamatórias prolongadas induzidas por estressores. O corpo estriado, por sua vez, é particularmente sensível a alterações neuroimunes (Broome *et al.*, 2020) como observado no presente trabalho.

A ativação da micróglia ou liberação de citocinas pode impactar a função dopaminérgica, aumentando a degradação da dopamina e, consequentemente, os níveis de DOPAC (Honke *et al.*, 2022; Platzer *et al.*, 2000). Alterações nos níveis de DOPAC no corpo estriado podem estar associadas a déficits motores ou comportamentos relacionados ao sistema de recompensa, visto que o corpo estriado é central na regulação desses processos. Por outro lado, a linhagem C57BL/6 exibiu níveis elevados de Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), IL-1ra e IL-15, proporcionando uma ativação robusta de vias neuroprotetoras e pró-inflamatórias. Nossos achados corroboram com estudos anteriores que mostram a propensão dos camundongos C57BL/6 a níveis de produção mais altos de citocinas pró-inflamatórias em resposta a estímulos variados (Fornes *et al.*, 2018; Howes *et al.*, 2016).

A regulação preferencial de IL-1ra nos C57BL/6 sugere um mecanismo protetor contra a inflamação sistêmica descontrolada (MOURA *et al.*, 2016; Tahtinen *et al.*, 2022). A expressão aumentada de MIP-3β também ressalta seu papel no recrutamento e migração de células imunes, fundamental durante respostas inflamatórias (Agenes *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2010). Isso é consistente com descobertas que mostram que camundongos C57BL/6 exibem uma resposta imune inata mais pronunciada, caracterizada por níveis elevados de quimiocina que facilitam o recrutamento de células imunes para locais de infecção ou lesão (Alice Freitas Queiroz *et al.*, 2022; Jovicic *et al.*, 2015).

A linhagem BALB/c, por sua vez, mostrou maior expressão de IL-22, associada a uma resposta protetora epitelial importante para a integridade da mucosa e combate a infecções

epiteliais (Ahn *et al.*, 2010). A presença de IL-2 enfatiza ainda mais a ativação de vias imunes adaptativas, crucial para a imunidade de longo prazo (Alba-Fierro *et al.*, 2016). Em contraste, a menor expressão de IL-2 nos C57BL/6 pode indicar uma estratégia adaptativa para mitigar danos teciduais durante estados inflamatórios agudos (Milhomem *et al.*, 2018).

As diferenças observadas na expressão de citocinas, como RBP-4 e Pentraxina 3, nos camundongos BALB/c, indicam uma resposta imune inata diminuída em comparação com os camundongos C57BL/6, devido aos níveis significativamente mais baixos dessas moléculas. A literatura apoia essa observação, indicando que os BALB/c frequentemente exibem respostas inflamatórias reduzidas e um perfil imune do tipo Th2 mais equilibrado, resultando em níveis mais baixos de citocinas pró-inflamatórias (Alves *et al.*, 2016; Van averbeke *et al.*, 2022). Em contraste, a linhagem C57BL/6 apresentou um perfil pró-inflamatório mais pronunciado, com aumento de TNF- α , sugerindo uma predominância da resposta Th1. Embora esses animais exibissem letargia e um perfil inflamatório elevado, os comportamentos ansiosos e exploratórios não foram tão marcadamente afetados quanto nos BALB/c.

Os resultados indicaram que citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α , IL-1 β , IL-13, IL-17A e TNF- α , assim como as anti-inflamatórias IL-10 e IL-13, foram reguladas positivamente no soro dos pacientes com COVID-19 leve/moderada. Esse perfil sugere o potencial dessas moléculas como biomarcadores para diagnóstico e prognóstico da doença ((Majeed; Zulkafli; Ad'hiah, 2023). Além disso, a associação dessas citocinas e quimiocinas com o risco de COVID-19 fornece informações adicionais sobre as respostas imunológicas em pacientes não hospitalizados.

Os achados do presente estudo em modelo murino, que evidenciam alterações comportamentais associadas à exposição à proteína Spike do SARS-CoV-2, podem refletir desfechos neuropsiquiátricos semelhantes aos observados em humanos expostos ao vírus durante a gestação. Corroborando essa hipótese, Kehdi et al. (2025) identificaram que crianças expostas intraútero à infecção materna por SARS-CoV-2 apresentaram elevações de citocinas inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-17A e IL-1 β , associadas a atrasos cognitivos, motores e de linguagem aos 24 meses de idade. No presente estudo, foram observadas alterações nos níveis de citocinas cerebrais IL-6 e TNF- α e de comportamentos tipo ansioso e depressivo, especialmente em animais da linhagem BALB/c, sugerindo que a neuroinflamação induzida pela proteína Spike pode apresentar aspectos centrais da SPAC, incluindo prejuízos ao neurodesenvolvimento.

Os achados em camundongos BALB/c e C57BL/6 corroboram observações clínicas em

humanos, reforçando a relevância translacional do modelo murino. Estudos com pacientes que desenvolveram COVID longa demonstraram disfunção da barreira hematoencefálica e inflamação crônica no hipocampo, com aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e IL-15. Esses biomarcadores estão associados a sintomas neuropsiquiátricos persistentes, incluindo “brain fog”, alterações de memória e humor, mesmo meses após a infecção (Fernández-de-Las-Peñas *et al.*, 2023; Soung *et al.*, 2022). De forma semelhante, neste estudo observou-se que os animais expostos à proteína Spike apresentaram alterações no perfil de citocinas no hipocampo e diminuição de BDNF, compatíveis com uma resposta neuroinflamatória persistente e alterações comportamentais do tipo ansioso e depressivo.

Além disso, camundongos com cerca de 3 meses de idade são equivalentes a humanos jovens adultos, entre aproximadamente 20 e 30 anos de idade (Dutta; Sengupta, 2016). Isso reforça que os efeitos neurocomportamentais e inflamatórios observados nos animais deste estudo podem simular manifestações semelhantes às descritas em adultos jovens com síndrome pós-aguda da COVID-19 (SPAC), especialmente em relação a déficits cognitivos, fadiga e alterações emocionais relatadas mesmo após infecções leves.

Portanto, os dados obtidos sugerem que a exposição periférica à proteína Spike em camundongos BALB/c e C57BL/6 é capaz de mimetizar, em escala e mecanismo, os efeitos neuroinflamatórios e comportamentais observados em pacientes humanos com SPAC, reforçando a validade desses modelos para investigações translacionais sobre os efeitos persistentes da COVID-19 no sistema nervoso central.

Os resultados do presente estudo fortalecem a hipótese de que a suscetibilidade às alterações emocionais desencadeadas por desafios imunológicos no SNC está intrinsecamente relacionada ao perfil genético e imunológico de cada linhagem. Em especial, os camundongos BALB/c demonstraram maior vulnerabilidade à inflamação hipocampal, refletida em disregulações no sistema dopaminérgico e em comportamentos do tipo ansioso e depressivo. Esse padrão pode estar associado à menor ativação de vias anti-inflamatórias e neuroprotetoras, com baixa expressão de citocinas do perfil Th2 e de citocinas reguladoras.

8. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados demonstraram que a exposição à proteína Spike, induz alterações comportamentais e neuroquímicas em camundongos, semelhantes aos sintomas observados em humanos na SPAC, como ansiedade, depressão e déficit cognitivo. A linhagem BALB/c apresentou maior vulnerabilidade, com comportamentos ansioso-depressivos, e prejuízo na memória de trabalho, aumento do metabólito dopaminérgico DOPAC e expressão mais elevada de citocinas associadas ao perfil Th2, mas com baixa ativação de vias reguladoras e neuroprotetoras. Já os C57BL/6 exibiram uma resposta inflamatória mais robusta, com predominância de citocinas do tipo Th1, além de reguladores como IL-1ra e fatores neurotróficos como o BDNF, o que pode ter contribuído para menor impacto emocional, embora tenham apresentado prejuízo cognitivo na fase tardia. Assim, conclui-se que a linhagem BALB/c se destaca como modelo mais sensível para o estudo dos efeitos neuropsiquiátricos da SPAC, enquanto os C57BL/6 oferecem dados importantes para a investigação das alterações cognitivas relacionadas à resposta inflamatória prolongada.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Chapter 5: Antibodies and antigens. **Cellular and molecular immunology**, [s. l.], 2021.
- ABOGHAZLEH, R. *et al.* Rodent brain extraction and dissection: A comprehensive approach. **MethodsX**, [s. l.], v. 12, p. 102516, 2024.
- AGENES, F. *et al.* Differential expression of regulator of G-protein signalling transcripts and in vivo migration of CD4⁺ naive and regulatory T cells. **Immunology**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 179–188, 2005.
- AHN, S.-H. *et al.* Two Genes on A/J Chromosome 18 Are Associated with Susceptibility to Staphylococcus aureus Infection by Combined Microarray and QTL Analyses. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. e1001088, 2010.
- ALBA-FIERRO, C. A. *et al.* Immune Response Induced by an Immunodominant 60 kDa Glycoprotein of the Cell Wall of *Sporothrix schenckii* in Two Mice Strains with Experimental Sporotrichosis. **Journal of Immunology Research**, [s. l.], v. 2016, p. 1–15, 2016.
- ALICE FREITAS QUEIROZ, M. *et al.* Cytokine Profiles Associated With Acute COVID-19 and Long COVID-19 Syndrome. [s. l.], v. 12, p. 1, 2022. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 8 jan. 2025.
- ALVES, C. C. *et al.* Parasitological, Pathological, and Immunological Parameters Associated with *Schistosoma mansoni* Infection and Reinfection in BALB/c AND C57BL/6 Mice. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 102, n. 3, p. 336, 2016.
- ALVIM, R. G. F. *et al.* Development and large-scale validation of a highly accurate SARS-COV-2 serological test using regular test strips for autonomous and affordable finger-prick sample collection , transportation , and storage. **medRxiv**, [s. l.], p. 1–27, 2021.
- ANDERSON, R. *et al.* Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 4226–4232, 1997.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.
- ARRAES, G. C. *et al.* Long-term environmental enrichment normalizes schizophrenia-like abnormalities and promotes hippocampal Slc6a4 promoter demethylation in mice submitted to a two-hit model. **Neuroscience**, [s. l.], 2024.
- AUGUSTIN, M. *et al.* Post-COVID syndrome in non-hospitalised patients with COVID-19: a longitudinal prospective cohort study. **The Lancet Regional Health–Europe**, [s. l.], v. 6, 2021.
- BEHRENS, E. M. Cytokines in cytokine storm syndrome. **Cytokine Storm Syndrome**, [s. l.], p. 197–207, 2019.

BERRIDGE, M. V *et al.* The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 14–19, 1996.

BOSON, B. *et al.* The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 296, 2021.

BROOME, S. T. *et al.* Dopamine: an immune transmitter. **Neural regeneration research**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 2173–2185, 2020.

BUZHDYGAN, T. P. *et al.* The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood–brain barrier. **Neurobiology of disease**, [s. l.], v. 146, p. 105131, 2020.

CANAS, L. S. *et al.* Profiling post-COVID-19 condition across different variants of SARS-CoV-2: a prospective longitudinal study in unvaccinated wild-type, unvaccinated alpha-variant, and vaccinated delta-variant populations. **The Lancet Digital Health**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. e421–e434, 2023.

CARRILLO, J. *et al.* Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 538, p. 187–191, 2021.

CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO DA COVID-19. v. 01, p.08, 2025. Disponível em: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2020/02/INFORME-No-01_2025-Cenario-epidemiologico-da-covid-19-2024-1.pdf.

CHAVES FILHO, A. J. M. *et al.* In vitro immunogenic profile of recombinant SARS-CoV2 S1-RBD peptide in murine macrophage and microglial cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 118, p. e220144, 2023.

CHEN, W.-C. *et al.* Age, Dose, and Locomotion: Decoding Vulnerability to Ketamine in C57BL/6J and BALB/c Mice. **Biomedicines**, Switzerland, v. 11, n. 7, 2023.

CHEN, N. *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.

CLOSE, B. *et al.* Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. **Laboratory animals**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 293–316, 1996.

CLOSE, B. *et al.* Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. **Laboratory animals**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 1–32, 1997.

COPERCHINI, F. *et al.* The cytokine storm in COVID-19: Further advances in our understanding the role of specific chemokines involved. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 58, p. 82–91, 2021.

CRUNFLI, F. *et al.* Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 119, n. 35, p. e2200960119, 2022.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and molecular pathology**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 132–141, 2002.

D'ISA, R.; COMI, G.; LEOCANI, L. Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze. **Scientific Reports** **2021** **11:1**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-00402-7>. Acesso em: 1 jan. 2025.

DANTAS, F. L. F. *et al.* SARS-CoV-2 Spike protein induces TLR4-mediated long-term cognitive dysfunction recapitulating post-COVID-19 syndrome in mice. [s. l.], 2023.

DAVIS, H. E. *et al.* Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. **EClinicalMedicine**, [s. l.], v. 38, 2021.

DE MELO, G. D. *et al.* COVID-19–related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. **Science translational medicine**, [s. l.], v. 13, n. 596, p. eabf8396, 2021.

DEACON, R. M. J.; RAWLINS, J. N. P. T-maze alternation in the rodent. **Nature protocols**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 7–12, 2006.

DOS REIS, R. S.; SELVAM, S.; AYYAVOO, V. Neuroinflammation in Post COVID-19 Sequelae: Neuroinvasion and Neuroimmune Crosstalk. **Reviews in Medical Virology**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. e70009, 2024.

DUDAKOV, J. A.; HANASH, A. M.; VAN DEN BRINK, M. R. M. Interleukin-22: immunobiology and pathology. **Annual review of immunology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 747–785, 2015.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: relating their ages. **Life sciences**, [s. l.], v. 152, p. 244–248, 2016.

DWYER, D. E. The origins of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2. *In*: , 2023. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. [S. l.]: Thieme Medical Publishers, Inc., 2023. p. 3–7.

E SILVA, N. M. L. *et al.* Inflammation at the crossroads of COVID-19, cognitive deficits and depression. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 209, p. 109023, 2022.

ERUSTES, A. G. *et al.* Overexpression of α -synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis. **Journal of neuroscience research**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 160–171, 2018.

ESTRADA, E. Protein-driven mechanism of multiorgan damage in COVID-19. **Medicine in Drug Discovery**, [s. l.], v. 8, p. 100069, 2020.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C. *et al.* Long-COVID symptoms in individuals infected with different SARS-CoV-2 variants of concern: a systematic review of the literature. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 2629, 2022.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C. *et al.* Trajectory of anxiety/depressive symptoms and

sleep quality in individuals who had been hospitalized by COVID-19: The LONG-COVID-EXP multicenter study. **Journal of Psychosomatic Research**, [s. l.], v. 179, p. 111635, 2024.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PENAS, C. *et al.* Trajectory of post-COVID brain fog, memory loss, and concentration loss in previously hospitalized COVID-19 survivors: the LONG-COVID-EXP multicenter study. **Frontiers in Human Neuroscience**, [s. l.], v. 17, p. 1259660, 2023.

FILES, J. K. *et al.* Duration of post-COVID-19 symptoms are associated with sustained SARS-CoV-2 specific immune responses. **JCI Insight**, [s. l.], 2021.

FINKELMAN, F. D. *et al.* Interleukin-4-and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunological reviews**, [s. l.], v. 201, n. 1, p. 139–155, 2004.

FLORES-VEGA, V. R. *et al.* SARS-CoV-2: evolution and emergence of new viral variants. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 653, 2022.

FLORESCU, S. *et al.* Long-term (180-day) outcomes in critically ill patients with COVID-19 in the REMAP-CAP randomized clinical trial. **Jama**, [s. l.], v. 329, n. 1, p. 39–51, 2023.

FORNEFETT, J. *et al.* Comparative analysis of humoral immune responses and pathologies of BALB/c and C57BL/6 wildtype mice experimentally infected with a highly virulent *Rodentibacter pneumotropicus* (*Pasteurella pneumotropica*) strain. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 45, 2018.

FREITAS, R. M. de *et al.* Alterações agudas dos níveis de neurotransmissores em corpo estriado de ratos jovens após estado epiléptico induzido por pilocarpina. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 61, p. 430–433, 2003.

FULLARD, J. F. *et al.* Single-nucleus transcriptome analysis of human brain immune response in patients with severe COVID-19. **Genome medicine**, [s. l.], v. 13, p. 1–13, 2021.

GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. **Cell and tissue research**, [s. l.], v. 314, p. 15–23, 2003.

GIL-ETAYO, F. J. *et al.* An early Th1 response is a key factor for a favorable COVID-19 evolution. **Biomedicines**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 296, 2022.

GIL-ETAYO, F. J. *et al.* T-helper cell subset response is a determining factor in COVID-19 progression. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 624483, 2021.

GORBALENYA, A. *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.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GUPTA, A. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature medicine**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1017–1032, 2020.

HERNÁNDEZ-PARRA, H. *et al.* Alteration of the blood-brain barrier by COVID-19 and its implication in the permeation of drugs into the brain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.],

l.], v. 17, p. 1125109, 2023.

HESS, D. C.; ELDAHSHAN, W.; RUTKOWSKI, E. COVID-19-related stroke. **Translational stroke research**, [*s. l.*], v. 11, p. 322–325, 2020.

HONKE, N. *et al.* Endogenously produced catecholamines improve the regulatory function of TLR9-activated B cells. **PLOS Biology**, [*s. l.*], v. 20, n. 1, p. e3001513, 2022.

HOWE, M. W.; DOMBECK, D. A. Rapid signalling in distinct dopaminergic axons during locomotion and reward. **Nature**, [*s. l.*], v. 535, n. 7613, p. 505–510, 2016.

HOWES, A. *et al.* Differential Production of Type I IFN Determines the Reciprocal Levels of IL-10 and Proinflammatory Cytokines Produced by C57BL/6 and BALB/c Macrophages. **The Journal of Immunology**, [*s. l.*], v. 197, n. 7, p. 2838–2853, 2016.

HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The lancet**, [*s. l.*], v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.

HUANG, L. *et al.* Health outcomes in people 2 years after surviving hospitalisation with COVID-19: a longitudinal cohort study. **The Lancet Respiratory Medicine**, [*s. l.*], v. 10, n. 9, p. 863–876, 2022.

HUANG, Y. *et al.* Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, [*s. l.*], v. 41, n. 9, p. 1141–1149, 2020.

JASZCZYK, A.; STANKIEWICZ, A. M.; JUSZCZAK, G. R. Dissection of mouse hippocampus with its dorsal, intermediate and ventral subdivisions combined with molecular validation. **Brain sciences**, [*s. l.*], v. 12, n. 6, p. 799, 2022.

JAYAWEERA, H. K. *et al.* Mild cognitive impairment subtypes in older people with depressive symptoms: relationship with clinical variables and hippocampal change. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, [*s. l.*], v. 28, n. 3, p. 174–183, 2015.

JIANG, X. *et al.* Differences in innate immune responses correlate with differences in murine susceptibility to Chlamydia muridarum pulmonary infection. **Immunology**, [*s. l.*], v. 129, n. 4, p. 556–566, 2010.

JIANG, D. H. *et al.* Postacute sequelae of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection: a state-of-the-art review. **Basic to Translational Science**, [*s. l.*], v. 6, n. 9–10, p. 796–811, 2021.

JOKINEN, J.; NORDSTRÖM, A.-L.; NORDSTRÖM, P. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicide. **Nordic journal of psychiatry**, [*s. l.*], v. 63, n. 4, p. 276–279, 2009.

JOVICIC, N. *et al.* Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. **PLOS ONE**, [*s. l.*], v. 10, n. 7, p. e0134089, 2015.

JUNG, E.-Y.; SHIM, I. Differential DAergic control of D1 and D2 receptor agonist over locomotor activity and GABA level in the striatum. **Experimental Neurobiology**, [*s. l.*], v.

20, n. 3, p. 153, 2011.

KALUEFF, A. V *et al.* Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 45–59, 2016.

KETWA, A.; KANG'ETHE, S. M. Manifestation of the Socio-Psychological Impact of COVID-19 in Selected Contexts around the Globe. **Perspectives on Global Development and Technology**, [s. l.], v. 23, n. 1–2, p. 68–80, 2024.

KLEIN, M. O. *et al.* Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. **Cellular and molecular neurobiology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 31–59, 2019.

KRASEMANN, S. *et al.* Assessing and improving the validity of COVID-19 autopsy studies- A multicentre approach to establish essential standards for immunohistochemical and ultrastructural analyses. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 83, 2022.

KRICORIAN, K.; CIVEN, R.; EQUILS, O. COVID-19 vaccine hesitancy: misinformation and perceptions of vaccine safety. **Human vaccines & immunotherapeutics**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1950504, 2022.

LAPLACA, M. C. *et al.* Pre-clinical common data elements for traumatic brain injury research: progress and use cases. **Journal of neurotrauma**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 1399–1410, 2021.

LEGER, M. *et al.* Object recognition test in mice. **Nature protocols**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 2013.

LI, M. *et al.* Lentivirus-mediated interleukin-1 β (IL-1 β) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety-and depression-like behaviors in mice. **Journal of neuroinflammation**, [s. l.], v. 14, p. 1–12, 2017.

LI, Y. *et al.* Neurotropic virus tracing suggests a membranous-coating-mediated mechanism for transsynaptic communication. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 521, n. 1, p. 203–212, 2013.

LIU, Y.-P. *et al.* Serotonergic serotonin2 receptor modulation on DOPAC and 5-HIAA levels in rat striatum and nucleus accumbens: Microdialysis studies of freely moving rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 307–322, 1996.

LIU, W. *et al.* The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex. **Neural plasticity**, [s. l.], v. 2017, n. 1, p. 6871089, 2017.

LIU, E.-Q.; KITAJIMA, S.; MORIMOTO, M. Application and recent advances of laboratory mouse in human cancer research. **Ai Zheng= Aizheng= Chinese Journal of Cancer**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 249–254, 2005.

LOPEZ, P. P.; GOGNA, S.; KHORASANI-ZADEH, A. Anatomy, abdomen and pelvis, duodenum. [s. l.], 2018.

LU, S. *et al.* The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive

condensates with RNA and the membrane-associated M protein. **Nature communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 502, 2021.

LYADOVA, I. V.; PANTELEEV, A. V. Th1 and Th17 cells in tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers. **Mediators of inflammation**, [s. l.], v. 2015, n. 1, p. 854507, 2015.

MACÊDO, D. S. Estudo farmacológico e de alterações neuroquímicas em córtex pré-frontal e corpo estriado de camundongos após convulsões e morte induzidas por overdose de cocaína. [s. l.], 2005.

MACHADO, P. R. L. *et al.* Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 79, p. 647–662, 2004.

MACHADO, A. B. M. Neuroanatomia funcional. *In*: **NEUROANATOMIA FUNCIONAL**. [S. l.: s. n.], 1985. p. 292.

MAHADEVAN, V. Anatomy of the small intestine. **Surgery (Oxford)**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 283–288, 2020.

MAJEED, A. Y.; ZULKAFI, N. E. S.; AD'HIAH, A. H. Serum profiles of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in non-hospitalized patients with mild/moderate COVID-19 infection. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 260, p. 24–34, 2023.

MARKS, K. M.; GULICK, R. M. COVID-19. **Annals of Internal Medicine**, [s. l.], v. 176, n. 10, p. ITC145–ITC160, 2023.

MCCORMICK, C.; KHAPERSKYY, D. A. Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 647–660, 2017.

MEINHARDT, J. *et al.* The neurobiology of SARS-CoV-2 infection. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 30–42, 2024.

MEYERHOFF, J. *et al.* Microdissection of mouse brain into functionally and anatomically different regions. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, [s. l.], n. 168, p. e61941, 2021.

MILHOMEM, A. C. *et al.* Histopathologic aspects of experimental cysticercosis and in situ cytokines profile in C57BL/6 mice. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 339–345, 2018.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia Usp**, [s. l.], v. 17, p. 159–174, 2006.

MORIGUCHI, T. *et al.* A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. **International journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 94, p. 55–58, 2020.

MOURA, V. B. L. *et al.* Cellular immune response in intraventricular experimental neurocysticercosis. **Parasitology**, [s. l.], v. 143, n. 3, p. 334–342, 2016.

MURPHY, K.; WEAVER, C. **Janeway's immunobiology**. [S. l.]: Garland science, 2016.

NASCIMENTO, R. R. *et al.* SARS-CoV-2 Spike protein triggers gut impairment since mucosal barrier to innermost layers: From basic science to clinical relevance. **Mucosal Immunology**, [s. l.], 2024.

NISSBRANDT, H. *et al.* Synthesis and release of dopamine in rat brain: comparison between substantia nigra pars compacta, pars reticulata, and striatum. **Journal of neurochemistry**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 1170–1182, 1989.

OBOMANU, F. *et al.* Exploring the Intricacies of Neuroinvasive Infections: A Comprehensive Analysis of SARS-CoV-2's Impact on the Nervous System. **Berkeley Pharma Tech Journal of Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 107–121, 2024.

OMS. Painel da OMS COVID-19. 2025. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/vaccines?n=o&m49=076>.

ONOFRIO, L. *et al.* Toll-Like Receptors and COVID-19: A Two-Faced Story with an Exciting Ending. **Future Science OA**, [s. l.], v. 6, n. 8, 2020.

PANIZ-MONDOLFI, A. *et al.* Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). **Journal of medical virology**, [s. l.], v. 92, n. 7, p. 699–702, 2020.

PANNONE, G. *et al.* Lung histopathological findings in COVID-19 disease—a systematic review. **Infectious Agents and Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 34, 2021.

PEACOCK, T. P. *et al.* The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. **Nature microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 899–909, 2021.

PELLEGRINI, L. *et al.* SARS-CoV-2 infects the brain choroid plexus and disrupts the blood-CSF barrier in human brain organoids. **Cell stem cell**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 951–961, 2020.

PLATZER, C. *et al.* Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 31–38, 2000.

POLONI, T. E. *et al.* COVID-19-related neuropathology and microglial activation in elderly with and without dementia. **Brain Pathology**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. e12997, 2021.

PREMRAJ, L. *et al.* Mid and long-term neurological and neuropsychiatric manifestations of post-COVID-19 syndrome: A meta-analysis. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 434, n. November 2021, p. 120162, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2022.120162>.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

PUENTES-OROZCO, M.; ALBARRACIN, S. L.; VELÁSQUEZ, M. M. Neuroinflammation and major depressive disorder: astrocytes at the crossroads. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 18, p. 1504555, 2024.

RAGHAVAN, S.; KENCHAPPA, D. B.; LEO, M. D. SARS-CoV-2 Spike Protein Induces Degradation of Junctional Proteins That Maintain Endothelial Barrier Integrity. **Frontiers in cardiovascular medicine**, [s. l.], v. 8, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34179146/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

RAVEENDRAN, A. V; MISRA, A. Post COVID-19 syndrome (“Long COVID”) and diabetes: challenges in diagnosis and management. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 102235, 2021.

RHEA, E. M. *et al.* The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood–brain barrier in mice. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 368–378, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-020-00771-8>.

ROCHA, R. P. S. *et al.* Post-COVID-19 syndrome among hospitalized COVID-19 patients: a cohort study assessing patients 6 and 12 months after hospital discharge. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 40, p. e00027423, 2024.

RUBIN, D. C.; SHAKER, A. Small intestine: anatomy and structural anomalies. **Yamada’s Textbook of Gastroenterology**, [s. l.], p. 73–92, 2015.

RUTJANAWECH, S.; SRITIPSUKHO, P.; SRITIPSUKHO, S. Long COVID at 3 and 6 months after covid-19 infection in Thailand. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 23441, 2024.

SAENKHAM-HUNTSINGER, P. *et al.* BALB/c mice challenged with SARS-CoV-2 B. 1.351 β variant cause pathophysiological and neurological changes within the lungs and brains. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 105, n. 10, p. 2039, 2024.

SALVATORE, M. F. Dopamine signaling in substantia nigra and its impact on locomotor function—Not a new concept, but neglected reality. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 1131, 2024.

SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology journal**, [s. l.], v. 16, p. 1–22, 2019.

SCHULTE-SCHREPPING, J. *et al.* Severe COVID-19 is marked by a dysregulated myeloid cell compartment. **Cell**, [s. l.], v. 182, n. 6, p. 1419–1440, 2020.

SEDER, R. A.; AHMED, R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. **Nature immunology**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 835–842, 2003.

SHER, L. **Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicide**. [S. l.]: Taylor & Francis, 2007.

SHOMER, N. H. *et al.* Review of rodent euthanasia methods. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 242–253, 2020.

SILVA, D. A. F.; MENEZES, M. L.; KEMPINAS, W. G. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de catecolaminas em órgãos reprodutores de ratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica. **Eclética Química**, [s. l.], v. 32, p. 35–42, 2007.

SIMANI, L. *et al.* Prevalence and correlates of chronic fatigue syndrome and post-traumatic stress disorder after the outbreak of the COVID-19. **Journal of neurovirology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 154–159, 2021.

SONG, E. *et al.* Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 218, n. 3, p. e20202135, 2021.

SOUNG, A. L. *et al.* COVID-19 induces CNS cytokine expression and loss of hippocampal neurogenesis. **Brain**, [s. l.], v. 145, n. 12, p. 4193–4201, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/brain/awac270>.

STOJANOVIĆ, N. M.; RANDJELOVIĆ, P. J.; RADULOVIĆ, N. S. Correlation between two parameters of mice behaviour in the open field test. **Acta facultatis medicae Naissensis**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 321, 2017.

TAHTINEN, S. *et al.* IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 532–542, 2022.

TAI, W. *et al.* Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. **Cellular & Molecular Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 613–620, 2020.

THEOFILIS, P. *et al.* A Narrative Review on Prolonged Neuropsychiatric Consequences of COVID-19: A Serious Concern. **Heart and Mind**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 177–183, 2024.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 133–146, 2003.

TUCKER, L. B.; MCCABE, J. T. Behavior of male and female C57Bl/6J mice is more consistent with repeated trials in the elevated zero maze than in the elevated plus maze. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 11, n. January, p. 1–8, 2017.

TUCKER, L. B.; MCCABE, J. T. Measuring anxiety-like behaviors in rodent models of traumatic brain injury. **Frontiers in behavioral neuroscience**, [s. l.], v. 15, p. 682935, 2021.

UZUNIAN, A. **Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19**. [S. l.]: SciELO Brasil, 2020.

VALKOV, T.; ARGIROVA, R.; DIMITROV, G. SARS-CoV-2 Infection of the Central Nervous System: A Case Report. **Viruses**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 1962, 2024.

VAN AVERBEKE, V. *et al.* Host Immunity Influences the Composition of Murine Gut Microbiota. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, 2022.

VERMA, S. K. *et al.* Influence of Th1 versus Th2 immune bias on viral, pathological, and immunological dynamics in SARS-CoV-2 variant-infected human ACE2 knock-in mice. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 108, 2024.

VIZI, E. S.; LAJTHA, A. **Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Neurotransmitter systems**. [S. l.]: Springer Science & Business Media, 2008.

WANG, L. *et al.* A human three-dimensional neural-perivascular ‘assembloid’ promotes astrocytic development and enables modeling of SARS-CoV-2 neuropathology. **Nature**

medicine, [s. l.], v. 27, n. 9, p. 1600–1606, 2021.

WANG, Y. *et al.* Altered structural connectivity and cytokine levels in Schizophrenia and Genetic high-risk individuals: Associations with disease states and vulnerability.

Schizophrenia research, [s. l.], v. 223, p. 158–165, 2020.

WENZEL, J. *et al.* The SARS-CoV-2 main protease Mpro causes microvascular brain pathology by cleaving NEMO in brain endothelial cells. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 1522–1533, 2021.

WIJAYA, A. P.; JULIANTARA, I. P. E.; UTAMA, I. M. Penatalaksanaan Radioterapi Kanker Duodenum Di Instalasi Cancer Center Santosa Hospital Bandung Kopo. **Jurnal Ilmu Kesehatan dan Gizi**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 124–137, 2024.

WILLNER, P.; MITCHELL, P. J. The validity of animal models of predisposition to depression. **Behavioural pharmacology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 169–188, 2002.

WIN-SHWE, T.-T. *et al.* Impairment of novel object recognition in adulthood after neonatal exposure to diazinon. **Archives of toxicology**, [s. l.], v. 87, p. 753–762, 2013.

WONG, N. A.; SAIER JR, M. H. The SARS-coronavirus infection cycle: a survey of viral membrane proteins, their functional interactions and pathogenesis. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 1308, 2021.

WRAPP, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, [s. l.], v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 2020.

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

YANCOPOULOS, G. D. *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **nature**, [s. l.], v. 407, n. 6801, p. 242–248, 2000.

ZEISS, C. J. Comparative milestones in rodent and human postnatal central nervous system development. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 1368–1373, 2021.

ZHAO, Y. *et al.* SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. **Cell research**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 818–820, 2021.

ZHOU, F. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 2020.

ZUBAIR, A. S. *et al.* Neuropathogenesis and neurologic manifestations of the coronaviruses in the age of coronavirus disease 2019: a review. **JAMA neurology**, [s. l.], v. 77, n. 8, p. 1018–1027, 2020.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Chapter 5: Antibodies and antigens. **Cellular and molecular immunology**, [s. l.], 2021.

ABOGHAZLEH, R. *et al.* Rodent brain extraction and dissection: A comprehensive approach. **MethodsX**, [s. l.], v. 12, p. 102516, 2024.

AGENES, F. *et al.* Differential expression of regulator of G-protein signalling transcripts and in vivo migration of CD4⁺ naive and regulatory T cells. **Immunology**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 179–188, 2005.

AHN, S.-H. *et al.* Two Genes on A/J Chromosome 18 Are Associated with Susceptibility to Staphylococcus aureus Infection by Combined Microarray and QTL Analyses. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. e1001088, 2010.

ALBA-FIERRO, C. A. *et al.* Immune Response Induced by an Immunodominant 60 kDa Glycoprotein of the Cell Wall of *Sporothrix schenckii* in Two Mice Strains with Experimental Sporotrichosis. **Journal of Immunology Research**, [s. l.], v. 2016, p. 1–15, 2016.

ALICE FREITAS QUEIROZ, M. *et al.* Cytokine Profiles Associated With Acute COVID-19 and Long COVID-19 Syndrome. [s. l.], v. 12, p. 1, 2022. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 8 jan. 2025.

ALVES, C. C. *et al.* Parasitological, Pathological, and Immunological Parameters Associated with *Schistosoma mansoni* Infection and Reinfection in BALB/c AND C57BL/6 Mice. **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 102, n. 3, p. 336, 2016.

ALVIM, R. G. F. *et al.* Development and large-scale validation of a highly accurate SARS-CoV-2 serological test using regular test strips for autonomous and affordable finger-prick sample collection , transportation , and storage. **medRxiv**, [s. l.], p. 1–27, 2021.

ANDERSON, R. *et al.* Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 4226–4232, 1997.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal behaviour**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 205–235, 1973.

ARRAES, G. C. *et al.* Long-term environmental enrichment normalizes schizophrenia-like abnormalities and promotes hippocampal Slc6a4 promoter demethylation in mice submitted to a two-hit model. **Neuroscience**, [s. l.], 2024.

AUGUSTIN, M. *et al.* Post-COVID syndrome in non-hospitalised patients with COVID-19: a longitudinal prospective cohort study. **The Lancet Regional Health–Europe**, [s. l.], v. 6, 2021.

BEHRENS, E. M. Cytokines in cytokine storm syndrome. **Cytokine Storm Syndrome**, [s. l.], p. 197–207, 2019.

BERRIDGE, M. V *et al.* The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 14–19, 1996.

BOSON, B. *et al.* The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 296, 2021.

BROOME, S. T. *et al.* Dopamine: an immune transmitter. **Neural regeneration research**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 2173–2185, 2020.

BUZHDYGAN, T. P. *et al.* The SARS-CoV-2 spike protein alters barrier function in 2D static and 3D microfluidic in-vitro models of the human blood–brain barrier. **Neurobiology of disease**, [s. l.], v. 146, p. 105131, 2020.

CANAS, L. S. *et al.* Profiling post-COVID-19 condition across different variants of SARS-CoV-2: a prospective longitudinal study in unvaccinated wild-type, unvaccinated alpha-variant, and vaccinated delta-variant populations. **The Lancet Digital Health**, [s. l.], v. 5, n. 7, p. e421–e434, 2023.

CARRILLO, J. *et al.* Humoral immune responses and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2; implications in pathogenesis and protective immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 538, p. 187–191, 2021.

CENÁRIO EPIDEMIOLÓGICO DA COVID-19. v. 01, p.08, 2025. Disponível em: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2020/02/INFORME-No-01_2025-Cenario-epidemiologico-da-covid-19-2024-1.pdf.

CHAVES FILHO, A. J. M. *et al.* In vitro immunogenic profile of recombinant SARS-CoV2 S1-RBD peptide in murine macrophage and microglial cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 118, p. e220144, 2023.

CHEN, W.-C. *et al.* Age, Dose, and Locomotion: Decoding Vulnerability to Ketamine in C57BL/6J and BALB/c Mice. **Biomedicines**, Switzerland, v. 11, n. 7, 2023.

CHEN, N. *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.

CLOSE, B. *et al.* Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. **Laboratory animals**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 293–316, 1996.

CLOSE, B. *et al.* Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. **Laboratory animals**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 1–32, 1997.

COPERCHINI, F. *et al.* The cytokine storm in COVID-19: Further advances in our understanding the role of specific chemokines involved. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 58, p. 82–91, 2021.

CRUNFLI, F. *et al.* Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 119, n. 35, p. e2200960119, 2022.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and molecular pathology**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 132–141, 2002.

D'ISA, R.; COMI, G.; LEOCANI, L. Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze. **Scientific Reports 2021 11:1**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–13, 2021. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s41598-021-00402-7>. Acesso em: 1 jan. 2025.

DANTAS, F. L. F. *et al.* SARS-CoV-2 Spike protein induces TLR4-mediated long-term cognitive dysfunction recapitulating post-COVID-19 syndrome in mice. [s. l.], 2023.

DAVIS, H. E. *et al.* Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. **EClinicalMedicine**, [s. l.], v. 38, 2021.

DE MELO, G. D. *et al.* COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. **Science translational medicine**, [s. l.], v. 13, n. 596, p. eabf8396, 2021.

DEACON, R. M. J.; RAWLINS, J. N. P. T-maze alternation in the rodent. **Nature protocols**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 7–12, 2006.

DOS REIS, R. S.; SELVAM, S.; AYYAVOO, V. Neuroinflammation in Post COVID-19 Sequelae: Neuroinvasion and Neuroimmune Crosstalk. **Reviews in Medical Virology**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. e70009, 2024.

DUDAKOV, J. A.; HANASH, A. M.; VAN DEN BRINK, M. R. M. Interleukin-22: immunobiology and pathology. **Annual review of immunology**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 747–785, 2015.

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: relating their ages. **Life sciences**, [s. l.], v. 152, p. 244–248, 2016.

DWYER, D. E. The origins of severe acute respiratory syndrome-coronavirus-2. *In*: , 2023. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. [S. l.]: Thieme Medical Publishers, Inc., 2023. p. 3–7.

E SILVA, N. M. L. *et al.* Inflammation at the crossroads of COVID-19, cognitive deficits and depression. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 209, p. 109023, 2022.

ERUSTES, A. G. *et al.* Overexpression of α -synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis. **Journal of neuroscience research**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 160–171, 2018.

ESTRADA, E. Protein-driven mechanism of multiorgan damage in COVID-19. **Medicine in Drug Discovery**, [s. l.], v. 8, p. 100069, 2020.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C. *et al.* Long-COVID symptoms in individuals infected with different SARS-CoV-2 variants of concern: a systematic review of the literature. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 2629, 2022.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C. *et al.* Trajectory of anxiety/depressive symptoms and sleep quality in individuals who had been hospitalized by COVID-19: The LONG-COVID-EXP multicenter study. **Journal of Psychosomatic Research**, [s. l.], v. 179, p. 111635, 2024.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C. *et al.* Trajectory of post-COVID brain fog, memory loss, and concentration loss in previously hospitalized COVID-19 survivors: the LONG-COVID-EXP multicenter study. **Frontiers in Human Neuroscience**, [s. l.], v. 17, p. 1259660, 2023.

- FILES, J. K. *et al.* Duration of post-COVID-19 symptoms are associated with sustained SARS-CoV-2 specific immune responses. **JCI Insight**, [s. l.], 2021.
- FINKELMAN, F. D. *et al.* Interleukin-4-and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. **Immunological reviews**, [s. l.], v. 201, n. 1, p. 139–155, 2004.
- FLORES-VEGA, V. R. *et al.* SARS-CoV-2: evolution and emergence of new viral variants. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 653, 2022.
- FLORESCU, S. *et al.* Long-term (180-day) outcomes in critically ill patients with COVID-19 in the REMAP-CAP randomized clinical trial. **Jama**, [s. l.], v. 329, n. 1, p. 39–51, 2023.
- FORNEFETT, J. *et al.* Comparative analysis of humoral immune responses and pathologies of BALB/c and C57BL/6 wildtype mice experimentally infected with a highly virulent *Rodentibacter pneumotropicus* (*Pasteurella pneumotropica*) strain. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 45, 2018.
- FREITAS, R. M. de *et al.* Alterações agudas dos níveis de neurotransmissores em corpo estriado de ratos jovens após estado epiléptico induzido por pilocarpina. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 61, p. 430–433, 2003.
- FULLARD, J. F. *et al.* Single-nucleus transcriptome analysis of human brain immune response in patients with severe COVID-19. **Genome medicine**, [s. l.], v. 13, p. 1–13, 2021.
- GERHARDT, H.; BETSHOLTZ, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. **Cell and tissue research**, [s. l.], v. 314, p. 15–23, 2003.
- GIL-ETAYO, F. J. *et al.* An early Th1 response is a key factor for a favorable COVID-19 evolution. **Biomedicines**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 296, 2022.
- GIL-ETAYO, F. J. *et al.* T-helper cell subset response is a determining factor in COVID-19 progression. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, [s. l.], v. 11, p. 624483, 2021.
- GORBALENYA, A. *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.
- GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.
- GUPTA, A. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature medicine**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1017–1032, 2020.
- HERNÁNDEZ-PARRA, H. *et al.* Alteration of the blood-brain barrier by COVID-19 and its implication in the permeation of drugs into the brain. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 17, p. 1125109, 2023.
- HESS, D. C.; ELDAHSHAN, W.; RUTKOWSKI, E. COVID-19-related stroke. **Translational stroke research**, [s. l.], v. 11, p. 322–325, 2020.
- HONKE, N. *et al.* Endogenously produced catecholamines improve the regulatory function of TLR9-activated B cells. **PLOS Biology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. e3001513, 2022.

- HOWE, M. W.; DOMBECK, D. A. Rapid signalling in distinct dopaminergic axons during locomotion and reward. **Nature**, [s. l.], v. 535, n. 7613, p. 505–510, 2016.
- HOWES, A. *et al.* Differential Production of Type I IFN Determines the Reciprocal Levels of IL-10 and Proinflammatory Cytokines Produced by C57BL/6 and BALB/c Macrophages. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 197, n. 7, p. 2838–2853, 2016.
- HUANG, C. *et al.* Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.
- HUANG, L. *et al.* Health outcomes in people 2 years after surviving hospitalisation with COVID-19: a longitudinal cohort study. **The Lancet Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 863–876, 2022.
- HUANG, Y. *et al.* Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], v. 41, n. 9, p. 1141–1149, 2020.
- JASZCZYK, A.; STANKIEWICZ, A. M.; JUSZCZAK, G. R. Dissection of mouse hippocampus with its dorsal, intermediate and ventral subdivisions combined with molecular validation. **Brain sciences**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 799, 2022.
- JAYAWEERA, H. K. *et al.* Mild cognitive impairment subtypes in older people with depressive symptoms: relationship with clinical variables and hippocampal change. **Journal of geriatric psychiatry and neurology**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 174–183, 2015.
- JIANG, X. *et al.* Differences in innate immune responses correlate with differences in murine susceptibility to Chlamydia muridarum pulmonary infection. **Immunology**, [s. l.], v. 129, n. 4, p. 556–566, 2010.
- JIANG, D. H. *et al.* Postacute sequelae of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection: a state-of-the-art review. **Basic to Translational Science**, [s. l.], v. 6, n. 9–10, p. 796–811, 2021.
- JOKINEN, J.; NORDSTRÖM, A.-L.; NORDSTRÖM, P. Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicide. **Nordic journal of psychiatry**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 276–279, 2009.
- JOVICIC, N. *et al.* Differential Immunometabolic Phenotype in Th1 and Th2 Dominant Mouse Strains in Response to High-Fat Feeding. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. e0134089, 2015.
- JUNG, E.-Y.; SHIM, I. Differential DAergic control of D1 and D2 receptor agonist over locomotor activity and GABA level in the striatum. **Experimental Neurobiology**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 153, 2011.
- KALUEFF, A. V *et al.* Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 45–59, 2016.
- KETWA, A.; KANG'ETHE, S. M. Manifestation of the Socio-Psychological Impact of COVID-19 in Selected Contexts around the Globe. **Perspectives on Global Development and Technology**, [s. l.], v. 23, n. 1–2, p. 68–80, 2024.

KLEIN, M. O. *et al.* Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. **Cellular and molecular neurobiology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 31–59, 2019.

KRASEMANN, S. *et al.* Assessing and improving the validity of COVID-19 autopsy studies- A multicentre approach to establish essential standards for immunohistochemical and ultrastructural analyses. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 83, 2022.

KRICORIAN, K.; CIVEN, R.; EQUILS, O. COVID-19 vaccine hesitancy: misinformation and perceptions of vaccine safety. **Human vaccines & immunotherapeutics**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1950504, 2022.

LAPLACA, M. C. *et al.* Pre-clinical common data elements for traumatic brain injury research: progress and use cases. **Journal of neurotrauma**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 1399–1410, 2021.

LEGER, M. *et al.* Object recognition test in mice. **Nature protocols**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 2531–2537, 2013.

LI, M. *et al.* Lentivirus-mediated interleukin-1 β (IL-1 β) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety-and depression-like behaviors in mice. **Journal of neuroinflammation**, [s. l.], v. 14, p. 1–12, 2017.

LI, Y. *et al.* Neurotropic virus tracing suggests a membranous-coating-mediated mechanism for transsynaptic communication. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 521, n. 1, p. 203–212, 2013.

LIU, Y.-P. *et al.* Serotonergic serotonin2 receptor modulation on DOPAC and 5-HIAA levels in rat striatum and nucleus accumbens: Microdialysis studies of freely moving rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 307–322, 1996.

LIU, W. *et al.* The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex. **Neural plasticity**, [s. l.], v. 2017, n. 1, p. 6871089, 2017.

LIU, E.-Q.; KITAJIMA, S.; MORIMOTO, M. Application and recent advances of laboratory mouse in human cancer research. **Ai Zheng= Aizheng= Chinese Journal of Cancer**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 249–254, 2005.

LOPEZ, P. P.; GOGNA, S.; KHORASANI-ZADEH, A. Anatomy, abdomen and pelvis, duodenum. [s. l.], 2018.

LU, S. *et al.* The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. **Nature communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 502, 2021.

LYADOVA, I. V; PANTELEEV, A. V. Th1 and Th17 cells in tuberculosis: protection, pathology, and biomarkers. **Mediators of inflammation**, [s. l.], v. 2015, n. 1, p. 854507, 2015.

MACÊDO, D. S. Estudo farmacológico e de alterações neuroquímicas em córtex pré-frontal e corpo estriado de camundongos após convulsões e morte induzidas por overdose de cocaína.

[s. l.], 2005.

MACHADO, P. R. L. *et al.* Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 79, p. 647–662, 2004.

MACHADO, A. B. M. Neuroanatomia funcional. *In: NEUROANATOMIA FUNCIONAL*. [S. l.: s. n.], 1985. p. 292.

MAHADEVAN, V. Anatomy of the small intestine. **Surgery (Oxford)**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 283–288, 2020.

MAJEED, A. Y.; ZULKAFI, N. E. S.; AD'HIAH, A. H. Serum profiles of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in non-hospitalized patients with mild/moderate COVID-19 infection. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 260, p. 24–34, 2023.

MARKS, K. M.; GULICK, R. M. COVID-19. **Annals of Internal Medicine**, [s. l.], v. 176, n. 10, p. ITC145–ITC160, 2023.

MCCORMICK, C.; KHAPERSKYY, D. A. Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 647–660, 2017.

MEINHARDT, J. *et al.* The neurobiology of SARS-CoV-2 infection. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 30–42, 2024.

MEYERHOFF, J. *et al.* Microdissection of mouse brain into functionally and anatomically different regions. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, [s. l.], n. 168, p. e61941, 2021.

MILHOMEM, A. C. *et al.* Histopathologic aspects of experimental cysticercosis and in situ cytokines profile in C57BL/6 mice. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [s. l.], v. 76, n. 5, p. 339–345, 2018.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia Usp**, [s. l.], v. 17, p. 159–174, 2006.

MORIGUCHI, T. *et al.* A first case of meningitis/encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. **International journal of infectious diseases**, [s. l.], v. 94, p. 55–58, 2020.

MOURA, V. B. L. *et al.* Cellular immune response in intraventricular experimental neurocysticercosis. **Parasitology**, [s. l.], v. 143, n. 3, p. 334–342, 2016.

MURPHY, K.; WEAVER, C. **Janeway's immunobiology**. [S. l.]: Garland science, 2016.

NASCIMENTO, R. R. *et al.* SARS-CoV-2 Spike protein triggers gut impairment since mucosal barrier to innermost layers: From basic science to clinical relevance. **Mucosal Immunology**, [s. l.], 2024.

NISSBRANDT, H. *et al.* Synthesis and release of dopamine in rat brain: comparison between substantia nigra pars compacta, pars reticulata, and striatum. **Journal of neurochemistry**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 1170–1182, 1989.

OBOMANU, F. *et al.* Exploring the Intricacies of Neuroinvasive Infections: A Comprehensive Analysis of SARS-CoV-2's Impact on the Nervous System. **Berkeley Pharma Tech Journal of Medicine**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 107–121, 2024.

OMS. Painel da OMS COVID-19. 2025. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/vaccines?n=o&m49=076>.

ONOFRIO, L. *et al.* Toll-Like Receptors and COVID-19: A Two-Faced Story with an Exciting Ending. **Future Science OA**, [s. l.], v. 6, n. 8, 2020.

PANIZ-MONDOLFI, A. *et al.* Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). **Journal of medical virology**, [s. l.], v. 92, n. 7, p. 699–702, 2020.

PANNONE, G. *et al.* Lung histopathological findings in COVID-19 disease—a systematic review. **Infectious Agents and Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 34, 2021.

PEACOCK, T. P. *et al.* The furin cleavage site in the SARS-CoV-2 spike protein is required for transmission in ferrets. **Nature microbiology**, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 899–909, 2021.

PELLEGRINI, L. *et al.* SARS-CoV-2 infects the brain choroid plexus and disrupts the blood-CSF barrier in human brain organoids. **Cell stem cell**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 951–961, 2020.

PLATZER, C. *et al.* Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 31–38, 2000.

POLONI, T. E. *et al.* COVID-19-related neuropathology and microglial activation in elderly with and without dementia. **Brain Pathology**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. e12997, 2021.

PREMRAJ, L. *et al.* Mid and long-term neurological and neuropsychiatric manifestations of post-COVID-19 syndrome: A meta-analysis. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 434, n. November 2021, p. 120162, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2022.120162>.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

PUNTES-OROZCO, M.; ALBARRACIN, S. L.; VELÁSQUEZ, M. M. Neuroinflammation and major depressive disorder: astrocytes at the crossroads. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 18, p. 1504555, 2024.

RAGHAVAN, S.; KENCHAPPA, D. B.; LEO, M. D. SARS-CoV-2 Spike Protein Induces Degradation of Junctional Proteins That Maintain Endothelial Barrier Integrity. **Frontiers in cardiovascular medicine**, [s. l.], v. 8, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34179146/>. Acesso em: 8 jan. 2025.

RAVEENDRAN, A. V; MISRA, A. Post COVID-19 syndrome (“Long COVID”) and diabetes: challenges in diagnosis and management. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 102235, 2021.

RHEA, E. M. *et al.* The S1 protein of SARS-CoV-2 crosses the blood–brain barrier in mice. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 368–378, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-020-00771-8>.

ROCHA, R. P. S. *et al.* Post-COVID-19 syndrome among hospitalized COVID-19 patients: a cohort study assessing patients 6 and 12 months after hospital discharge. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 40, p. e00027423, 2024.

RUBIN, D. C.; SHAKER, A. Small intestine: anatomy and structural anomalies. **Yamada's Textbook of Gastroenterology**, [s. l.], p. 73–92, 2015.

RUTJANAWECH, S.; SRITIPSUKHO, P.; SRITIPSUKHO, S. Long COVID at 3 and 6 months after covid-19 infection in Thailand. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 23441, 2024.

SAENKHAM-HUNTSINGER, P. *et al.* BALB/c mice challenged with SARS-CoV-2 B. 1.351 β variant cause pathophysiological and neurological changes within the lungs and brains. **Journal of General Virology**, [s. l.], v. 105, n. 10, p. 2039, 2024.

SALVATORE, M. F. Dopamine signaling in substantia nigra and its impact on locomotor function—Not a new concept, but neglected reality. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 1131, 2024.

SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology journal**, [s. l.], v. 16, p. 1–22, 2019.

SCHULTE-SCHREPPING, J. *et al.* Severe COVID-19 is marked by a dysregulated myeloid cell compartment. **Cell**, [s. l.], v. 182, n. 6, p. 1419–1440, 2020.

SEDER, R. A.; AHMED, R. Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation. **Nature immunology**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 835–842, 2003.

SHER, L. **Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicide**. [S. l.]: Taylor & Francis, 2007.

SHOMER, N. H. *et al.* Review of rodent euthanasia methods. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 242–253, 2020.

SILVA, D. A. F.; MENEZES, M. L.; KEMPINAS, W. G. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação simultânea de catecolaminas em órgãos reprodutores de ratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção eletroquímica. **Eclética Química**, [s. l.], v. 32, p. 35–42, 2007.

SIMANI, L. *et al.* Prevalence and correlates of chronic fatigue syndrome and post-traumatic stress disorder after the outbreak of the COVID-19. **Journal of neurovirology**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 154–159, 2021.

SONG, E. *et al.* Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 218, n. 3, p. e20202135, 2021.

SOUNG, A. L. *et al.* COVID-19 induces CNS cytokine expression and loss of hippocampal

neurogenesis. **Brain**, [s. l.], v. 145, n. 12, p. 4193–4201, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/brain/awac270>.

STOJANOVIĆ, N. M.; RANDJELOVIĆ, P. J.; RADULOVIĆ, N. S. Correlation between two parameters of mice behaviour in the open field test. **Acta facultatis medicae Naissensis**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 321, 2017.

TAHTINEN, S. *et al.* IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 532–542, 2022.

TAI, W. *et al.* Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. **Cellular & Molecular Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 613–620, 2020.

THEOFILIS, P. *et al.* A Narrative Review on Prolonged Neuropsychiatric Consequences of COVID-19: A Serious Concern. **Heart and Mind**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 177–183, 2024.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 133–146, 2003.

TUCKER, L. B.; MCCABE, J. T. Behavior of male and female C57Bl/6J mice is more consistent with repeated trials in the elevated zero maze than in the elevated plus maze. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 11, n. January, p. 1–8, 2017.

TUCKER, L. B.; MCCABE, J. T. Measuring anxiety-like behaviors in rodent models of traumatic brain injury. **Frontiers in behavioral neuroscience**, [s. l.], v. 15, p. 682935, 2021.

UZUNIAN, A. **Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19**. [S. l.]: SciELO Brasil, 2020.

VALKOV, T.; ARGIROVA, R.; DIMITROV, G. SARS-CoV-2 Infection of the Central Nervous System: A Case Report. **Viruses**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 1962, 2024.

VAN AVERBEKE, V. *et al.* Host Immunity Influences the Composition of Murine Gut Microbiota. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, 2022.

VERMA, S. K. *et al.* Influence of Th1 versus Th2 immune bias on viral, pathological, and immunological dynamics in SARS-CoV-2 variant-infected human ACE2 knock-in mice. **EBioMedicine**, [s. l.], v. 108, 2024.

VIZI, E. S.; LAJTHA, A. **Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Neurotransmitter systems**. [S. l.]: Springer Science & Business Media, 2008.

WANG, L. *et al.* A human three-dimensional neural-perivascular ‘assembloid’ promotes astrocytic development and enables modeling of SARS-CoV-2 neuropathology. **Nature medicine**, [s. l.], v. 27, n. 9, p. 1600–1606, 2021.

WANG, Y. *et al.* Altered structural connectivity and cytokine levels in Schizophrenia and Genetic high-risk individuals: Associations with disease states and vulnerability. **Schizophrenia research**, [s. l.], v. 223, p. 158–165, 2020.

WENZEL, J. *et al.* The SARS-CoV-2 main protease Mpro causes microvascular brain pathology by cleaving NEMO in brain endothelial cells. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 24, n.

11, p. 1522–1533, 2021.

WIJAYA, A. P.; JULIANTARA, I. P. E.; UTAMA, I. M. Penatalaksanaan Radioterapi Kanker Duodenum Di Instalasi Cancer Center Santosa Hospital Bandung Kopo. **Jurnal Ilmu Kesehatan dan Gizi**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 124–137, 2024.

WILLNER, P.; MITCHELL, P. J. The validity of animal models of predisposition to depression. **Behavioural pharmacology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 169–188, 2002.

WIN-SHWE, T.-T. *et al.* Impairment of novel object recognition in adulthood after neonatal exposure to diazinon. **Archives of toxicology**, [s. l.], v. 87, p. 753–762, 2013.

WONG, N. A.; SAIER JR, M. H. The SARS-coronavirus infection cycle: a survey of viral membrane proteins, their functional interactions and pathogenesis. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 1308, 2021.

WRAPP, D. *et al.* Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. **Science**, [s. l.], v. 367, n. 6483, p. 1260–1263, 2020.

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

YANCOPOULOS, G. D. *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. **nature**, [s. l.], v. 407, n. 6801, p. 242–248, 2000.

ZEISS, C. J. Comparative milestones in rodent and human postnatal central nervous system development. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 1368–1373, 2021.

ZHAO, Y. *et al.* SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. **Cell research**, [s. l.], v. 31, n. 7, p. 818–820, 2021.

ZHOU, F. *et al.* Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The lancet**, [s. l.], v. 395, n. 10229, p. 1054–1062, 2020.

ZUBAIR, A. S. *et al.* Neuropathogenesis and neurologic manifestations of the coronaviruses in the age of coronavirus disease 2019: a review. **JAMA neurology**, [s. l.], v. 77, n. 8, p. 1018–1027, 2020.

ZEISS, Caroline J. Comparative milestones in rodent and human postnatal central nervous system development. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 1368–1373, 2021.

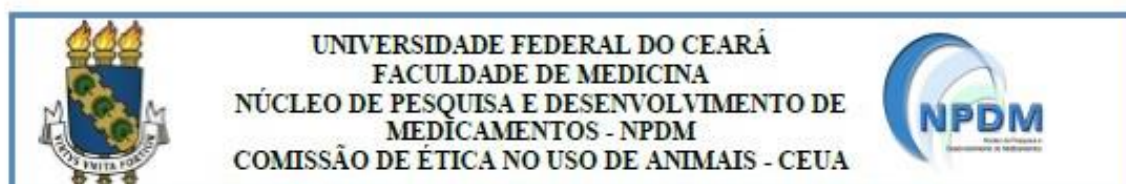
ABELAIRA, Helena M; RÉUS, Gislaine Z; QUEVEDO, Joao. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Brazilian Journal of Psychiatry**, [s. l.], v. 35, p. S112–S120, 2013.

YAN R, ZHANG Y, LI Y, XIA L, GUO Y, ZHOU Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. **Science**. 2020 Mar 27;367(6485):1444- 1448. doi: 10.1126/science.abb2762. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32132184; PMCID: PMC7164635.

APÊNDICE 1 – Representação do registro diário dos efeitos comportamentais e fisiológicos observados nos camundongos ao longo do período experimental.

Animal 01	QUANTIFICAÇÕES DOS EFEITOS					
	(1) SEM EFEITO			(-)EFEITO DIMINUÍDO		
	(+) EFEITO PRESENTE			(++) EFEITO INTENSO		
	FASE AGUDA (FA)			FASE PÓS AGUDA (FPA)		
Hiperatividade						
Agressividade						
Tremores						
Temperatura						
Lentidão						
Autolimpeza (<i>grooming</i>)						
Levantar sobre as patas traseiras (<i>rearing</i>)						
Nº de Pelotas fecais						
Respiração forçada						
Ansiedade (brigas e ou sem pelos)						
Micção						
Morte						

ANEXO 1 – Termo de aprovação pelo comitê de ética e uso de animais (CEUA)



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada **Validação de um modelo animal para estudo de alterações neuropsiquiátricas da síndrome pós aguda da COVID – 19** registrada com o protocolo 66080523-0, sob a responsabilidade de **DANIELLE MACEDO GASPAR** e **HILDA TAHIM DE SOUZA** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da Universidade Federal do Ceará, na reunião extraordinária de 29/06/2023.

We hereby certify that the project entitled **Validation of an animal model for the study of neuropsychiatric changes in the post-acute syndrome of COVID – 19** by the protocol number 66080523-0, and conducted by responsibility **DANIELLE MACEDO GASPAR** and **HILDA TAHIM DE SOUZA** which involves the production, maintenance or use of animals belonging to the filo *Chordata*, sub-vertebrate *Vertebrata* (except humans), for the purpose of scientific research - is in accordance with the provisions of the Law number 11,794, from October 8th, 2008, of Decree number 6,899, from July 15th, 2009, and with the regulations issued by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA), was **APPROVED** by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) from the Center for Research and Development of Medicines (NPDM) of the Federal University of Ceará, in the extraordinary meeting of 29/06/2023.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 03/08/2023 Fim: 30/06/2025
Espécie	Camundongo isogênico
Linhagem	Balb/C e C57Bl/6
Nº de animais autorizados	192 + 192 = 384
Peso	22 g
Idade	6 a 8 semanas
Sexo	Macho
Origem (fornecedor)	Biotério do NPDM
Local do experimento	Biotério do NPDM

Documento assinado digitalmente
MARISA JADNA SILVA FREDERICO CANUTO
Data: 03/08/2023 14:09:22-0300
Verifique em: <https://validar.dl.gov.br>

Fortaleza, 03 de agosto de 2023

Coordenação da Comissão de Ética e Uso de Animais
Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos
Universidade Federal do Ceará

ANEXO 2 - Especificações técnicas da proteína Spike do SARS-CoV-2.

FOR-PRO-020 - Especificações Técnicas de produtos e serviços
 Biolinker Biologia Sintética / Rua San Jose, 396 - 2º andar / Cotia - SP / 06715-862 / Brasil
 info@biolinker.tech / www.biolinker.tech



Nome da proteína: Spike - SARS CoV 2

Lote de serviço: Spike-15-26-09-23

Temperatura de armazenamento: -80°C

Prazo de Validade: 3 meses

Descrição geral da proteína (uso, tamanho, especificações): Proteína recombinante
 Spike - SARS CoV 2

Embalagem: Micro tubo 1 mL

Avisos gerais: USO APENAS PARA PESQUISA

Formato: Solução Líquida

Método de purificação da proteína: Purificação por cromatografia.

Pureza: Acima 90%

Concentração: 100 µg/ml

Data de Fabricação: 12/09/2023

Quantidade final: 5 mL

Alterações no processo de fabricação: Não se aplica.

Controles de Qualidade: Aprovado

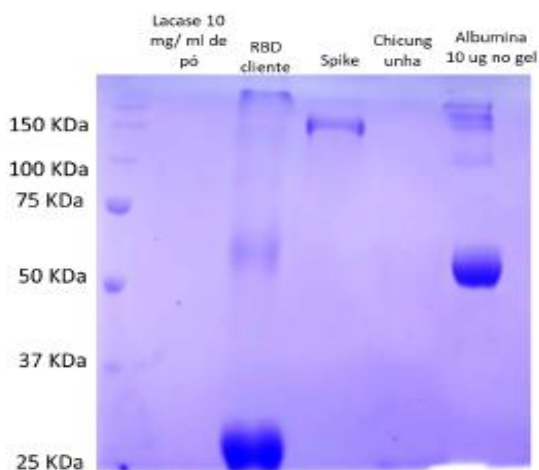


Figura 1 - Proteína Spike SARS CoV2 possui peso de 141 KDa.

Endereço Comercial: Rua San José, 396, 2º andar - Cotia -SP

Telefones: mob: +55 21 98235-4076 / tel: +55 11 4703 8588

Email: yourfriends@biolinker.tech