

TAMIRES GOMES MAGLIO

Avaliação da infecção de SARS-CoV-2 em astrócitos

SÃO PAULO
2022

TAMIRES GOMES MAGLIO

Avaliação da infecção de SARS-CoV-2 em astrócitos

Subtítulo: “Análise dos efeitos da infecção de SARS-CoV-2 em astrócitos derivados de células iPSC humanas”

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro

Beltrão-Braga

SÃO PAULO
2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4213 FMVZ	Maglio, Tamires Gomes Avaliação da infecção de SARS-CoV-2 em astrócitos / Tamires Gomes Maglio. – 2022. 56 f. : il. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2022. Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão-Braga. 1. SARS-CoV-2. 2. COVID-19. 3. Astrócitos. 4. iPSC. 5. SNC. I. Título.
-----------------	---

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB8-7070, da FMVZ/USP.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 13 de junho de 2022
CEUAX N 5222240920

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Área: 0

Equipe envolvida: Tamires Gomes Maglio - (executante);

Título do projeto: "AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM ASTRÓCITOS".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 22/03/2022, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 13th June 2022

CERTIFIED

We certify that the Research "EVALUATION OF SARS-CoV-2 INFECTION IN ASTROCYTES", protocol number CEUAX 5222240920 (ID 002113), under the responsibility Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day March 22, 2022.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM ASTRÓCITOS", protocolado sob o CEUAX nº 5222240920, sob a responsabilidade de Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 22 de março de 2022.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



USP - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - ICB/USP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO DO SARS-CoV-2 EM ASTRÓCITOS

Pesquisador: Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 37309420.0.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.280.995

Apresentação do Projeto:

A ideia do projeto é testar o efeito do SARS-CoV-2 em astrócitos utilizando um modelo in vitro já padronizado pelo laboratório que prevê o uso de polpa de dente (guardada em biorepositório previamente aprovado por essa comissão) para obtenção de células-tronco pluripotentes que serão diferenciadas em astrócitos. Os experimentos serão conduzidos de acordo com as normas de biossegurança no laboratório NB3 do prof Durigon.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a infecção do SARS-CoV-2 no sistema nervoso central, e em específico em astrócitos. Objetivo específico é estudar se o vírus afeta a biologia celular dos astrócitos em termos de estresse oxidativo, metabolismo de glutamato e expressão gênica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há, sendo utilizadas amostras já guardadas em biorepositório.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é original e importante na área, e vai complementar a literatura recente sobre a infecção de SARS-CoV-2.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Tem a autorização para o uso de amostras de biorepositório que está correta.

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415

Bairro: Cidade Universitária

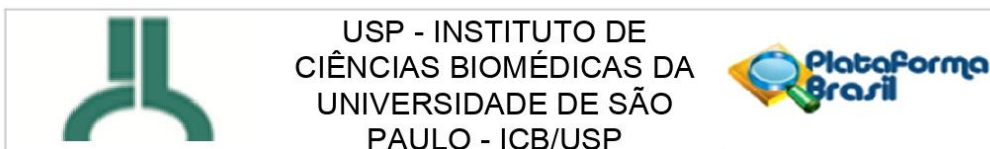
CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7733

E-mail: cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 4.280.995

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não vejo problemas no projeto, sendo que a pesquisadora proponente é também responsável do biorepositório

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o projeto. Cabe aos pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este comitê relatórios anuais (parciais ou final) de acordo com o item II, II.19 e II.20 da resolução 466/12 do Conselho Nacional da Saúde. Com relação às amostras biológicas, em não havendo ainda um biorepositório e se houver retenção de material deverá ser solicitado o devido cadastro conforme modelo constante no "site" do ICB. Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à plataforma Brasil quando do encerramento deste.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1619120.pdf	02/09/2020 14:30:23		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoSARS.pdf	02/09/2020 14:29:48	Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoBioetica.pdf	02/09/2020 14:28:16	Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga	Aceito
Outros	CartaAutorizacaoBiorrepositorio.pdf	27/08/2020 16:36:59	Patricia Cristina Baleeiro Beltrão Braga	Aceito

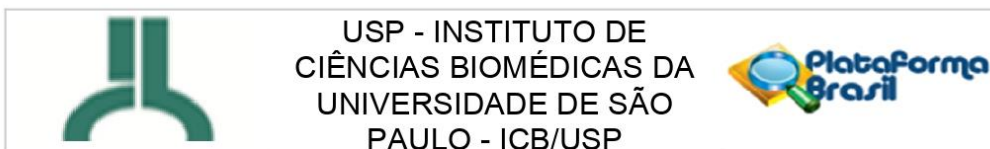
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 **E-mail:** cep@icb.usp.br



Continuação do Parecer: 4.280.995

SAO PAULO, 16 de Setembro de 2020

Assinado por:
Camila Squarzoni Dale
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Profª Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 **E-mail:** cep@icb.usp.br

FICHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MAGLIO, T. G.

Título: **Avaliação da Infecção de SARS-CoV-2 em Astrócitos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Data: 21 de Setembro de 2022.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga

Instituição: Universidade de São Paulo

Julgamento: _____

Prof. Dra. Telma Alves Monezi

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas II

Julgamento: _____

Prof. Dr. Marielton Passos Cunha

Instituição: Plataforma Científica Pasteur USP

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 88887.465179/2019-00.

Agradeço imensamente ao Laboratório de Modelagens de Doenças do Instituto de Ciências Biomédicas e a todos os membros que me acolheram e ajudaram na confecção deste projeto.

À Professora Patrícia ficam meus sinceros agradecimentos que, com paciência e dedicação, nos proporciona inspiração para que sejamos melhores cientistas.

Sou eternamente grata à Fabi por todo ensinamento, por toda ajuda para a realização desse projeto e pela amizade que desenvolvemos ao longo deste período.

Minha eterna gratidão à Lissa, que desde o início foi mais que uma parceira, uma eterna amiga que esteve presente me auxiliando em tudo.

À Plataforma Científica Pasteur USP e todos seus membros, que abriram suas portas para que este projeto fosse realizado.

À minha família, que sempre acreditou em mim, mesmo em vezes que nem eu mesma acreditava.

Ao Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres e à Faculdade de Medicina Veterinária pela oportunidade de ser aluna.

Por fim, mas com muita importância, ao Dr Ranhento que, apesar de não ter acompanhado desde o início, me deu forças nos momentos que mais precisei e não me deixou fraquejar.

RESUMO

MAGLIO, T. G. **Avaliação da infecção de SARS-CoV-2 em astrócitos**. 2022. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Descoberto no final de 2019 na cidade de Wuhan, Província de Hubei, China, o SARS-CoV-2 é um importante integrante da família *Coronaviridae*, sendo responsável por levar o mundo todo para um estado de alerta causando uma pandemia global. O vírus foi identificado como causador de um quadro clínico característico conhecido como “*Coronavirus disease 2019*” (COVID-19), causando uma Síndrome Respiratória Aguda. Por tratar-se de um vírus respiratório, transmitido por contato direto com pessoa infectada e ao tocar superfícies contaminadas, rapidamente o SARS-CoV-2 se espalhou por todo o mundo, causando uma pandemia, tendo hoje mais de 535 milhões de pessoas infectadas e causando mais de 6 milhões de mortes. Além do sistema respiratório, o vírus está presente em outras células do organismo. Achados mostram a presença do SARS-CoV-2 no líquido cefalorraquidiano associado com alterações na expressão de marcadores de inflamação neuronal, assim como uma expressão aumentada de citocinas liberadas pelos astrócitos, indicando uma alteração no Sistema Nervoso Central (SNC). Neste projeto, analisamos os efeitos da infecção do SARS-CoV-2 diretamente em astrócitos, células da glia extremamente importantes para a manutenção da homeostase e defesa do SNC. Para tanto, produzimos astrócitos a partir de três linhagens de iPSC humanas para verificar aspectos da morfologia e fisiologia celular, bem como na expressão gênica e proteica, após a infecção com o vírus. Verificamos que o SARS-CoV-2 é capaz de infectar os astrócitos, os quais sofrem modificações da sua morfologia e indução de apoptose. Além disso, verificamos que houve produção de citocinas nos astrócitos infectados pelo SARS-CoV-2, o que pode prejudicar a homeostase do SNC no caso do vírus atravessar a barreira-hemato-encefálica e chegar ao cérebro.

Palavras-chave: SARS-CoV-2, COVID-19, astrócitos, iPSC, SNC.

ABSTRACT

MAGLIO, T. G. **Assessment of SARS-CoV-2 infection in astrocytes**. 2022. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Discovered in late 2019 in a market in the city of Wuhan, Hubei Province, China, SARS-CoV-2 is an important member of the *Coronaviridae* family, responsible for bringing the whole world into a state of alert causing a global pandemic. The virus has been identified as causing a characteristic clinical condition known as “Corona-virus disease 2019” (COVID-19), causing an Acute Respiratory Syndrome. Being a respiratory virus, transmitted by direct contact with an infected person and by touching contaminated surfaces, SARS-CoV-2 quickly spread throughout the world, causing a pandemic, having today more than 535 million people infected and causing more than million deaths. In addition to the respiratory system, the virus is present in other cells in the body. Findings show the presence of SARS-CoV-2 in cerebrospinal fluid associated with changes in the expression of neuronal inflammation markers, as well as an increased expression of cytokines released by astrocytes, indicating an alteration in the Central Nervous System (CNS). In this project, we analyzed the effects of SARS-CoV-2 infection directly on astrocytes, glial cells that are extremely important for the maintenance of homeostasis and CNS defense. Therefore, we produced astrocytes from three human iPSC strains to verify aspects of cell morphology and physiology, as well as gene and protein expression, after infection with the virus. We verified that SARS-CoV-2 is capable of infecting astrocytes, which undergo changes in their morphology and induction of apoptosis. In addition, we verified that there was production of cytokines in astrocytes infected by SARS-CoV-2, which may impair CNS homeostasis in case the virus crosses the blood-brain barrier and reaches the brain.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, astrocytes, iPSC, CNS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência	31
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de conversão do glutamato em glutamina por astrócitos	21
Figura 2. SARS-CoV-2: representação estrutural e genômica	22
Figura 3. Papel dos astrócitos no estado estacionário e nas condições inflamatórias	25
Figura 4: Fotomicrografias das colônias de iPSCs	33
Figura 5: Fotomicrografias de células NPCs	35
Figura 6: Fotomicrografias de astroesferas	36
Figura 7: Fotomicrografias de astrócitos	36
Figura 8. Gráfico de PCR viral PD17	39
Figura 9. Gráfico de PCR viral PD7	40
Figura 10. Gráfico de PCR viral PD16	40
Figura 11. Fotomicrografia com imunofluorescência de astrócitos (PD16) não infectado com vírus (MOCK)	42
Figura 12. Fotomicrografia com imunofluorescência de astrócitos derivados de PD16 infectado com a cepa viral P1	43
Figura 13. Fotomicrografia com imunofluorescência de astrócitos (PD16) infectado com HIAE	44
Figura 14. Fotomicrografia com imunofluorescência de astrócitos (PD16) marcado com CASP3.	45
Figura 15. Quantificação de Caspase 3	46
Figura 16. Expressão e quantificação de Citocinas	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
µm	micrômetro
ACE2	do inglês " <i>Angiotensin Converting Enzyme 2</i> " = Enzima Conversora de Angiotensina 2
AGM	do inglês " <i>Astrocyte Growth Medium</i> " = meio de crescimento de astrócitos
bFGF-2	do inglês " <i>Basic Fibroblast Growth Factor</i> " = fator de crescimento de fibroblasto
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
BSA	do inglês " <i>Bovine Serum Albumin</i> " = albumina sérica bovina
cm ³	centímetro cúbico
cDNA	do inglês " <i>Complementary Desoxirribonucleic Acid</i> " = Ácido Desoxirribonucléico complementar
c-Myc	do inglês " <i>Myc proto-oncogene protein</i> " = proteína proto-oncogênica Myc
CO ₂	Dióxido de carbono
COVID-19	do inglês " <i>Coronavirus Disease 19</i> "
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DMEM	do inglês " <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> "
DPBS	do inglês " <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> " = Dulbecco tampão salina-fostato
EB	do inglês " <i>Embryonic Bodies</i> " = corpos embrióides
ECP	efeito citopático

GAPDH	do inglês "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase" = desidrogenase	"Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase" = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFAP	do inglês "Glial Fibrillary Acidic Protein" = proteína glial fibrilar ácida	
IL	Interleucina	
iPSC	do inglês "Induced Pluripotent Stem Cell" = células-troncopluripotentes induzidas	
Klf-4	do inglês "Kruppel-like factor 4"	
MAP2	do inglês "Microtubule-associated Protein 2" = proteína associada a microtúbulos	
MIA	do inglês "Maternal Immune Activation" = Ativação da Imunidade Materna	
mL	mililitro	
MOI	do inglês "Multiplicity of Infection" = multiplicidade de infecção	
nmol	nanomol	
NB	Meio de crescimento neural, suplementado com <u>N2</u> e <u>B27</u>	
NBF	Meio de crescimento neural, contendo os suplementos <u>N2</u> e <u>B27</u> e b- <u>EGF</u> -2	
NEAA	Non-Essential Amino Acids Solution	
ng	nanograma	
NPC	do inglês "Neural Progenitor Cells" = células progenitoras neurais	
Oct4	do inglês "Octamer 4"	
PBS	do inglês "Phosphate Buffered Saline" = tampão salina-fostato	

qPCR	do inglês " <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> " = reação em cadeia da polimerase
Ri	do inglês " <i>Rock inhibitor</i> " = inibidor de Rock
RNA	do inglês " <i>Ribonucleic Acid</i> " = Ácido Ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SARS-CoV-2	do inglês " <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> " = Síndrome Respiratória Aguda Severa
SFB	Soro Fetal Bovino
SHED	do inglês " <i>Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth</i> " = Células-tronco de dente decíduo esfoliado
SNC	Sistema Nervoso Central
SOX2	do inglês " <i>SYR (sex determining region Y) – box2</i> "

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1. O VÍRUS SARS-COV-2	22
2.2. O VÍRUS SARS-COV-2 E SUAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NO SNC	23
2.3. ASTRÓCITOS	24
2.4. MODELAGEM DE DOENÇAS DO SNC	26
3. JUSTIFICATIVA	27
4. OBJETIVOS	27
4.1. OBJETIVO GERAL	27
4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	277
5. MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1. ISOLAMENTO E AMPLIFICAÇÃO DO SARS-CoV-2	28
5.2. CULTURA CELULAR DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPSC)	28
5.3. PRODUÇÃO DE ASTRÓCITOS DERIVADOS DE IPSC	29
5.3.1. Produção de corpos embrióides	29
5.3.2. Produção de Rosetas e Células Progenitoras Neurais (NPC)	29
5.3.3. Geração de Astrócitos a partir de IPSC	30
5.4. PROCESSO DE INFECÇÃO COM SARS-CoV-2	31
5.5. ANÁLISE MOLECULAR DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS INFECTADAS POR SARS-COV-2 POR QPCR (PCR <i>REAL TIME</i>)	31
5.6. ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTÉICA DE CÉLULAS INFECTADAS POR SARS-COV-2 POR ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	322
5.7. TESTE PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS	33
6. RESULTADOS	33
6.1. MANUTENÇÃO DE IPSC PARA AMPLIFICAÇÃO	33

6.2. CULTURA CELULAR E DIFERENCIAÇÃO NEURAL	34
6.3. AMPLIFICAÇÃO DE ASTRÓCITOS PARA INFECÇÃO COM SARS-CoV-2	35
6.4. INFECÇÃO VIRAL DE ASTRÓCITOS POR SARS-CoV-2	37
6.5. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR	38
6.6. ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTÉICA DE CÉLULAS INFECTADAS POR SARS-CoV-2 POR ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA	411
6.7. QUANTIFICAÇÃO DE CASPASE	44
6.8. EXPRESSÃO DE CITOCINAS	45
7. DISCUSSÃO	48
8. CONCLUSÃO	49
9.REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

O vírus SARS-CoV-2, membro da família *Coronaviridae*, foi descoberto no final de 2019 na cidade de Wuhan, na China. É o vírus causador da COVID-19 (*Corona virus disease 2019*) em humanos, cujo quadro clínico envolve desde sintomas leves que se assemelham a um quadro gripal até uma síndrome respiratória aguda e doenças do trato respiratório que podem levar ao óbito (HUANG, et. al., 2020). Os sintomas mais comuns são febre, tosse e fadiga muscular (SUN, et. al., 2020).

A transmissão do SARS-CoV-2 se dá pela inalação de perdigotos contaminados, por contato direto por fômites e posterior inoculo nas mucosas, ou contato com a saliva ou mucosas contaminadas. Além disso, estudos sugerem que a infecção aérea, por pequenas partículas virais soltas no ar, não deve ser descartada (MORAWSKA; CAO, 2020).

Em relação a infecção do SNC, um relato de caso de um paciente que teve Encefalopatia Necrosante Aguda, durante a infecção por SARS-CoV-2 confirmada por PCR de *swab* nasofaríngeo, mostrou a presença de RNA viral no líquido cefalorraquidiano, elucidando um neurotropismo viral. O paciente também apresentou ruptura na barreira hemato-encefálica (BHE), e a presença aumentada de biomarcadores de neuroinflamação, como a proteína glial ácida fibrilar (GFAP) e Interleucina-6 (IL-6), confirmando a presença de inflamação (VIRHAMMAR, et. al., 2020). Outro estudo analisou 47 pacientes com COVID-19 e comparou com um grupo controle saudável. Foi observado um aumento na expressão de GFAP, proteína marcadora de astrócitos, nos pacientes graves e moderados, dando maior ênfase na hipótese de um neurotropismo viral e uma possível neuroinflamação ocasionada pelo vírus infectando células do Sistema Nervoso Central (SNC) (KANBERG, et. al., 2020).

Para se ter uma ideia mais abrangente do comprometimento dos astrócitos em infecções virais é preciso considerar a funcionalidade deste tipo celular, que promovem ainda suporte estrutural, metabólico e trófico aos neurônios, e também parecem estar envolvidos em mecanismos neuroprotetores, de neurogênese e de sinaptogênese durante o processo de maturação neuronal (BECERRA-CALIXTO; CARDONA-GÓMEZ, 2017; JOHNSON et al., 2007). Importante ressaltar a participação dos astrócitos na funcionalidade de neurônios, como é o caso da recaptação de glutamato da fenda

sináptica, cujo excesso pode levar à neurotoxicidade, conforme ilustrado na Figura 1. A reciclagem desse composto se inicia quando este é recaptado por transportadores de glutamato EAAT presentes na membrana de astrócitos. Dentro destas células, o glutamato é convertido à glutamina pela enzima glutamina-sintetase, que então é liberada para o meio extracelular e capturada pelos neurônios, onde é convertido em glutamato e o ciclo recomeça (ANDERSON; SWANSON, 2000). Além disso, a localização dos astrócitos no microambiente neural facilita a realização de suas funções: estas células são integrantes da unidade neurovascular da BHE, onde se encontram fisicamente ligados às células endoteliais, pericítos e neurônios, permitindo assim a comunicação celular e a mediação de agentes que podem chegar da periferia por meio da corrente sanguínea. Desta forma, os astrócitos são mediadores na resposta imune inata a patógenos capazes de infiltrar a BHE (RANSOHOFF; BROWN, 2012).

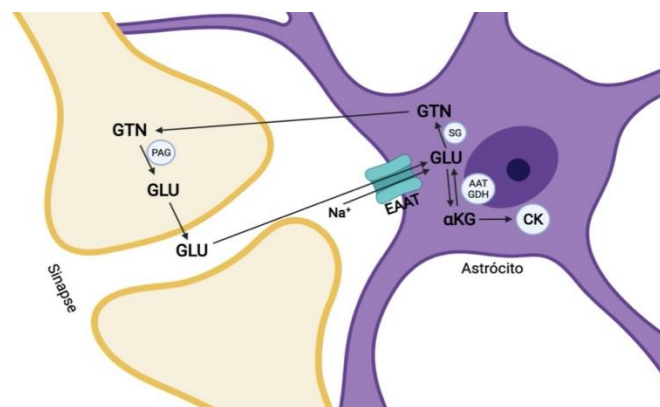


Figura 1. Ciclo de conversão do glutamato em glutamina por astrócitos. Nesta etapa ocorre o processo de receptação do glutamato na fenda sináptica e conversão de glutamina, no interior dos astrócitos, após a glutamina ser captada na fenda sináptica. **Fonte:** Benazzato, 2021.

Portanto, considerando a importância dos astrócitos para a homeostase do SNC e seu papel na regulação imune no cérebro, neste projeto iremos explorar os eventos biológicos e moleculares causados pela infecção de SARS-CoV-2 em astrócitos derivados de iPSC humanas, cujos resultados poderão auxiliar a estabelecer a relação dos astrócitos na fisiopatologia da doença no SNC.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O VÍRUS SARS-COV-2

Um novo vírus foi identificado a partir do surgimento de diversos casos de pneumonia na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China, em dezembro de 2019. Esse vírus foi considerado por essa epidemia e nomeado como Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (do inglês, Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS-CoV-2) (ZHU et al., 2020).

O SARS-CoV-2 é um beta-Coronavírus, pertencentes à mesma família assim como o Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-Cov) e o Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-Cov), porém apresentando maior capacidade de adaptação de replicação em humanos (CHU et al., 2020).

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado com genoma de RNA fita simples positiva com aproximadamente 29,9 Kb, semelhante há outros Coronavírus, porém difere ao ser o único que tem uma inserção de quatro aminoácidos na glicoproteína Spike (gpS), enquanto nos outros Coronavírus têm oito aminoácidos (DAVIDSON, et. al., 2020).

Para invadir as células humanas, o vírus usa a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) como receptor celular (YI, et. al., 2020) que se liga à gpS do vírus. Após entrar na célula, o RNA genômico é traduzido e proteínas não estruturais (nsps) são produzidas a partir de duas estruturas de leitura aberta (ORFs), ORF1a e ORF1b (Figura 1) (KIM, et. al., 2020).

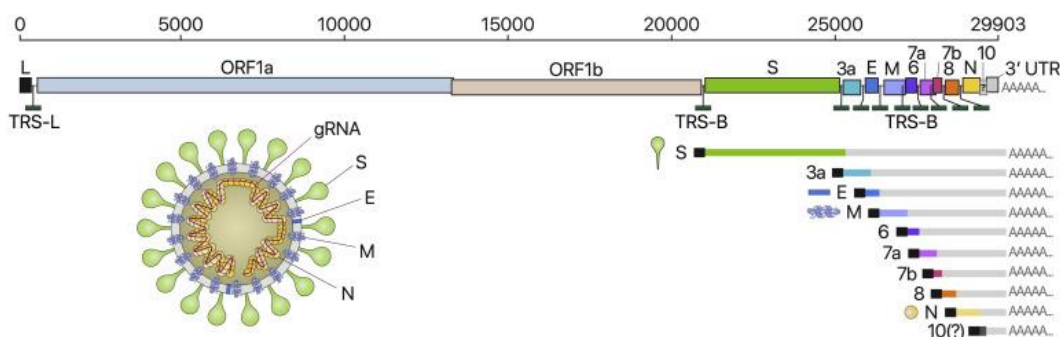


Figura 2. SARS-CoV-2: representação estrutural e genômica. Genoma do vírus, com as ORFs e os genes que codificam as proteínas estruturais Spike (S), o envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N). **Fonte:** KIM et al., 2020.

Inicialmente foi descoberto que o SARS-CoV-2 afetava em especial os pulmões, em virtude de conseguir ligar-se ao receptor ACE2. Contudo, também é capaz de infectar outros órgãos, desde que apresentem esse receptor, como por exemplo, o sistema gastrointestinal e os rins, e em menor proporção o coração, vasos sanguíneos e cérebro (LI, et al., 2020; MARTINEZ-ROJAS; VEJA-VEJA; BOBADILLA, 2020). Um estudo feito com 94 pacientes com COVID-19 em comparação com pessoas saudáveis mostrou que a função de coagulação de pacientes infectados é significativamente prejudicada (HAN, et. al., 2020). Também foi detectada a presença de RNA viral em placentas, e em algumas amostras houve o aumento da prevalência de arteriopatia decidual e alterações que poderiam influenciar a fisiologia placentária, como um estado hipercoagulável sistêmico ou inflamatório (PENFIELD, et. al., 2020; SHANES, et. al., 2020).

2.2. O VÍRUS SARS-COV-2 E SUAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS NO SNC

Apesar de ser menos relatado no cérebro, pacientes com COVID-19 tem apresentado diversos casos de confusão mental, encefalite (MORIGUSHI et al., 2020), ataxia e convulsão (PANIZ-MONDOLFI et al., 2020) indicando uma possível replicação viral em células neuronais, além de anosmia, hiposmia, ageusia, que se relacionam também com neurônios do Sistema Nervoso Periférico. Já foram feitos relatos da presença de partículas virais no lobo frontal em análise de cérebro *post-mortem* (PANIZ-MONDOLFI et al., 2020). Somado a isso, também foi visto a capacidade de replicação em células neuronais em cultura *in vitro* (CHU et al., 2020) corroborando com o neurotropismo do SARS-CoV-2. Micróglia e neurônios dopaminérgicos, derivados de células-tronco pluripotentes humanas (hPSCs) da linhagem celular H9 hESCs (Universidade de Harvard) também foram infectadas pelo SARS-CoV-2 (YANG, et. al., 2020).

Estudos realizados com produção de células pulmonares e neurais evidenciaram que o SARS-CoV-2 foi capaz de infectar esses tipos celulares. Além disso, houve a expressão de algumas citocinas, como IL-6, IL-8 e IFN, após a infecção, e a morte de neurônios a partir da expressão de caspase 3 (TIWARI et al., 2021). Outros estudos de casos clínicos observaram que há uma ativação na cascata de citocinas em pacientes com os casos graves de COVID 19 (YANG et al., 2021).

Tratamentos evidenciados como promissores em casos mais leves ou no início da doença foram obtidos através da utilização do plasma de paciente convalescente de COVID-19 (do inglês *convalescent plasm*, CCP), com a transfusão de CCP em pacientes com anticorpos neutralizantes circulantes anteriores (nAbs) da COVID-19 (YOKAYAMA, 2021) e a utilização de antivirais, tais como Remdesivir (GOLDMAN, 2020) e Lopinavir-ritonavir (HUNG et al., 2020).

Como medidas profiláticas vacinas passaram ser desenvolvidas a fim de diminuir a sintomatologia em casos de infecção pela COVID-19. Ao todo são 33 vacinas que já passaram pelos ensaios clínicos ou ainda estão em produção (SREEPADMANABH, 2020) e estão disponíveis ao público em bases de dados autorizadas (<https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidatevaccines>) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2020). As vacinas aplicadas no Brasil desde o início de 2021 foram CORONAVAC, ASTRAZENECA, JANSSEN e PFIZER (PNO, 2021). Os estudos da interação entre a aplicação dessas vacinas ainda estão em andamento.

2.3. ASTRÓCITOS

Os astrócitos representam células da neuroglia, junto com as microglias e, são as mais abundantes do SNC. São representados por dois tipos celulares: os astrócitos protoplasmáticos (predominante na substância cinzenta) e os astrócitos fibrosos (predominante na substância branca). São capazes de exercer muitas funções, tais como, controle da neurogênese, suporte na sinaptogêneses, manutenção das sinapses, participação na neurotransmissão no suporte, nutrição dos neurônios, desenvolvimento do sistema nervoso (ZHANG; BARRES, 2010; COLANGELO et al., 2014; PEKONY et al., 2014).

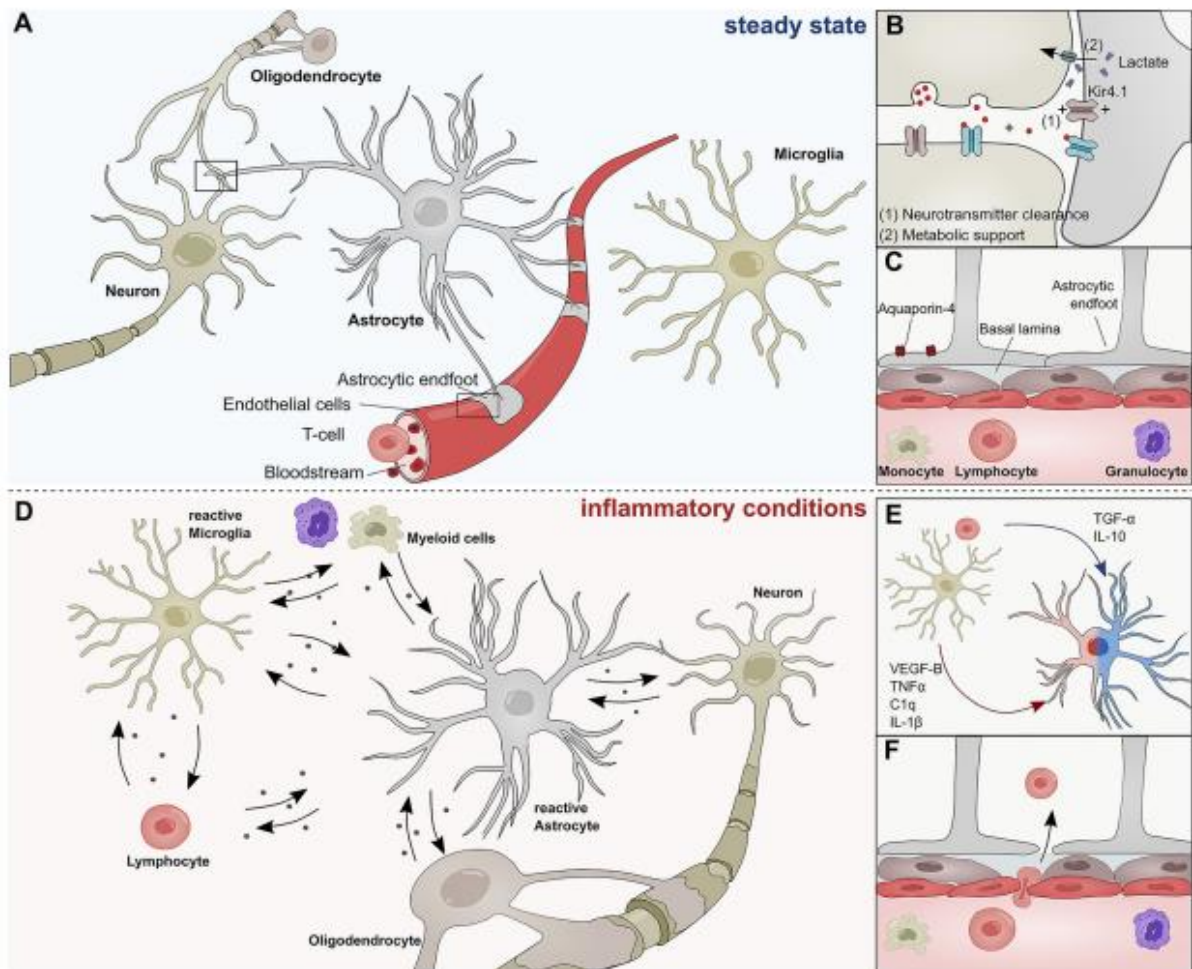


Figura 3. Papel dos astrócitos no estado estacionário e nas condições inflamatórias. **(A)** Os astrócitos interagem com neurônios, oligodendrócitos, microglia e células da Barreira Hematoencefálica (BHE) durante condições de estado estacionário. **(B)** Os astrócitos formam sinapses tripartidas com os neurônios e regulam sua transmissão sináptica através do suporte metabólico e da depuração de neurotransmissores. **(C)** Terminações astrocíticas revestem a vasculatura cerebral e são constituintes da BHE, limitando assim a infiltração de patógenos e células imunes periféricas no sistema nervoso central. Suas terminações expressam altos níveis de AQP-4 e formam uma interação próxima com pericitos e da lâmina basal do parênquima cerebral. **(D)** Durante condições inflamatórias, os astrócitos reativos secretam uma infinidade de mediadores inflamatórios que regulam as funções células mielóides, linfócitos, oligodendrócitos, neurônios e microglia. **(E)** Mediadores inflamatórios solúveis derivados de microglia e outras células imunes induzem diferencialmente funções astrócitos patogênicas (vermelhas) ou protetoras (azul). **(F)** Células imunes periféricas permeiam o BHE durante condições inflamatórias e transgredir para o SNC. C1q, componente do complemento 1q; IL-1b, Interleucina-1b; IL-10, Interleucina 10; TNF- α , fator de necrose tumoral α ; TGF- α , Fator de Crescimento Transformador α ; VEGF-B, Fator de Crescimento Endotelial Vascular B. **Fonte:** Adaptado de LINNERBAUER & ROTHHAMMER, 2020.

Os astrócitos executam importantes funções no SNC permitindo auxiliar os neurônios e demais células, além de estar diretamente ligada à processos inflamatórios e infecciosos. Portanto, o estudo dessa célula se faz necessário para ampliar os estudos da área da neurociência e compreender de que forma elas participam na efetivação dos processos inflamatórios e infecciosos.

2.4. MODELAGEM DE DOENÇAS DO SNC

A partir do desenvolvimento da técnica de reprogramação celular com a produção de células pluripotentes induzidas (iPSC) (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2016), a geração desses modelos celulares específicos se tornaram possíveis, e ainda permitem a manutenção da genética do indivíduo doador, o que pode ser interessante para entender a variedade da gravidade dos quadros clínicos, por exemplo. Essa estratégia, conhecida como “modelagem de doenças”, além de fornecer a possibilidade de estudar os mecanismos envolvidos nas doenças, inclui a possibilidade de testar medicamentos específico *in vitro* nas células-alvo da respectiva patologia (BELTRÃO-BRAGA et. al., 2011, 2013). Sendo assim, técnicas de reprogramação de células com sua posterior diferenciação em células-alvo tem beneficiado especialmente o estudo de doenças neurodegenerativas e do neurodesenvolvimento, uma vez que o acesso ao tecido cerebral vivo é eticamente inviável (EBERT et al., 2009; IMAIZUMI et al., 2012; KONDO et al., 2013; RUSSO et al., 2018; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; YU et al., 2014).

Em relação ao uso de iPSC para produção de células do SNC e posterior infecção com vírus, alguns trabalhos têm mostrado o potencial desta plataforma para estudar o papel de alguns vírus no SNC. Nosso grupo foi pioneiro em testar e comprovar a relação causal do Zika vírus e a microcefalia usando células do SNC derivadas de iPSC (CUGOLA et. al., 2016). Este trabalho revelou a relação do vírus com a Síndrome Congênita do Zika vírus, mas principalmente a eficácia da técnica e do uso desses modelos *in vitro* de células humanas derivadas de iPSC para a modelagem de infecções virais.

A partir destes achados do nosso grupo, nossa proposta neste trabalho foi verificar a ação do vírus SARS-CoV-2 em astrócitos derivados de iPSC humanas, a fim de

entender o potencial deste vírus como causador de alterações no SNC e seu papel como agente neurotrópico capaz de induzir alterações passageiras ou permanentes no SNC.

3. JUSTIFICATIVA

Muito pouco ainda se sabe sobre as manifestações do SARS-CoV-2 no SNC, considerando os sinais e sintomas observados nos pacientes com a COVID-19. Além disso, muitos pacientes referem sintomas como dores de cabeça, perda de memória e, mais raramente, confusão mental. Tais sinais e sintomas tem sido observados pela comunidade científica com especial interesse, porém sem que os mecanismos da patogênese do vírus no SNC tenham sido explicados ainda.

Considerando a importância dos astrócitos para a homeostase do SNC, seu papel na regulação imune no cérebro e visto que alguns trabalhos sugeriram uma relação entre infecções nessas células por SARS-CoV-2, neste trabalho nossa intenção foi explorar os eventos biológicos e moleculares causados pela infecção de SARS-CoV-2 em astrócitos derivados de iPSC humanas, trazendo benefícios para entendimento do papel dos astrócitos na fisiopatologia da COVID-19 no SNC.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Este projeto teve como objetivo geral analisar os efeitos biológicos da infecção pelo vírus SARS-CoV-2, em cultura celular de astrócitos humanos derivados de iPSC.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Analisar a morfologia dos astrócitos após a infecção com SARS-CoV-2, como parte dos efeitos citopáticos causados pelo vírus;
- Verificar se a presença do SARS-CoV-2 induz apoptose nos astrócitos;
- Verificar se os astrócitos alteram o perfil de expressão de citocinas após a infecção por SARS-CoV-2, o que poderia ser tóxico ou prejudicial aos neurônios do sistema nervoso.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ISOLAMENTO E AMPLIFICAÇÃO DO SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 utilizado neste projeto foram as linhagens B.1.1.28, e linhagem B. A primeira linhagem B.1.1.28, tem como número de acesso MW441768.1 (GENEBANK-OLIVEIRA et al., 2021), e foi isolada e expandida em células VERO CCL81 com Meio Mínimo Essencial (DMEM- Dulbecco) alta glicose e 10% de soro fetal bovino (SBF- Vitrocell Embriolife), com inoculações por 72h. A titulação da amostra foi realizada pelo ensaio da unidade formadora de placas (PFU), e disponibilizada com titulação de 6×10^5 TCID pela Plataforma Científica Pasteur-USP. Durante a realização deste projeto chamamos a linhagem B.1.1.28 de P1, e assim se vê escrito durante todo o texto a seguir.

A segunda linhagem, linhagem B, foi disponibilizada pelo grupo do Prof. Edison Luíz Durigon, do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade São Paulo. Conhecida por amostra HIAE02, foi chamada originalmente por SP02, pois foi isolada e amplificada de amostra de swab nasofaríngeo dos primeiros pacientes positivo para COVID-19 no estado de São Paulo, em Março de 2020 (ARAUJO et al., 2020). Após confirmação por teste de RT-qPCR (Allplex 2019-nCoV), o vírus foi isolado em células Vero E6 cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB e amplificado. Recebemos uma amostra com titulação de $2,11 \times 10^6$ TCID₅₀ / mL (ARAUJO et al., 2020). O isolamento viral e ensaios utilizando vírus foram realizados nos laboratórios de biossegurança de nível 3 localizados na Plataforma Científica Pasteur-USP e no Departamento de Microbiologia do ICB-USP.

5.2. CULTURA CELULAR DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSC)

A fim de obter astrócitos viáveis para este estudo, foram utilizadas iPSC derivadas das células de polpa de dente decíduo esfoliado (SHED) de 3 pacientes saudáveis (2 meninos e uma menina com faixa etária entre 5 e 11 anos, as linhagens celulares são denominadas de PD7, PD16 e PD17. Estas SHED pertencem a um biorrepositório, aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEP-ICB/USP) sob o número de protocolo 1001 (Biorrepositório: CAAE 58219416.0.0000.5467). Este projeto específico também foi submetido ao CEP-ICB/USP e foi aprovado sob o número 4.280.995.

A manutenção das células iPSC foi realizada diariamente com a troca do meio de cultura mTeSR (Stem Cell Technologies) e a expansão dessas células foi feita de acordo com a necessidade, para a realização dos experimentos. De modo geral, as células foram mantidas em placas tratadas com Matrigel (BD Biosciences) cuja função mantém em condições *feeder free*, seguindo o descrito em Russo e colaboradores (Russo et al., 2018).

5.3. PRODUÇÃO DE ASTRÓCITOS DERIVADOS DE iPSC

5.3.1. Produção de corpos embrióides (EB)

As colônias de iPSC foram plaqueadas no Matrigel (BD Biosciences) e mantidas por 5 dias no meio mTeSR (Stem Cell Technologies). No quinto dia, o meio foi substituído por meio N2 (DMEM/F12 suplementado com N2 1x (Invitrogen) contendo 1 μ M de dorsomorfina (Tocris, Ellisville, MO, USA) e 10 μ M de SB431542 (Stemgent, Massachusetts, USA) por 48 horas. Após dois dias nessas condições, as colônias foram removidas da placa e cultivadas em suspensão como EB (do inglês *embryoid bodies*, EB) por 5 dias em rotação constante de 90 rpm em meio N2, seguindo o descrito em Russo e colaboradores (Russo et al., 2018).

5.3.2. Produção de Rosetas e Células Progenitoras Neurais (NPC)

Para obtenção das rosetas, os EB obtidos foram coletados utilizando pipeta de grosso calibre e transferidos para uma nova placa tratada com Matrigel (BD Biosciences) para adesão. Mantidos com meio NGF (DMEM/F12 (Life Technologies) suplementado com 0,5x N2 (Life Technologies) 0,5x Gem21 (Gemini Bio-products, CA, USA), 20ng/mL de bFGF-2 (Life Technologies) e 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). Os EBs costumam aderir rapidamente ao Matrigel (BD Biosciences) e as rosetas se formam cerca de 48 horas após a adesão. As rosetas foram monitoradas diariamente para avaliar o momento adequado da coleta das células progenitoras neurais, que crescem no interior das rosetas. As rosetas foram coletadas manualmente utilizando ponteira, sendo visualizadas com microscópio EVOS (Life Technologies), dissociadas suavemente e plaqueadas em placas revestidas com 10 μ g/mL poliornitina (Sigma-Aldrich), e revestida com 2,5 μ g/mL de laminina (Life Technologies). A população de NPC foi expandida

usando o meio de cultura NGF como descrito acima e seguindo o descrito em Russo e colaboradores (Russo et al., 2018).

5.3.3. Geração de Astrócitos a partir de iPSC

As NPCs derivadas das iPSC foram cultivadas como descrito anteriormente em placas de 100mm de diâmetro. Após atingirem uma confluência de aproximadamente 90%, o protocolo de produção de astrócitos foi iniciado. Para isso, as células foram incubadas com dPBS (Life Technologies) a 37°C durante 5 minutos. Em seguida, as células foram raspadas para formar neuroesferas utilizando 9 mL de meio NGF. As células foram dissociadas por pipetagem suave e distribuídos em 3 mL por poço numa placa de seis poços e mantidas em agitação constante (90 rpm). O meio foi trocado no dia seguinte.

Após formação das neuroesferas, o FGF foi removido e o Inibidor de Rock (Ri) adicionado a uma concentração final de 5 mM por 48 horas. Após esse período de 48h, o meio NG sem FGF foi utilizado durante uma semana. Em seguida, o meio de crescimento de astrócitos AGM (do inglês *astrocyte growth medium* - Lonza, NJ, USA) foi adicionado às esferas durante duas semanas. Durante esse período, as células continuaram sob agitação constante a 90 rpm. Após 3 semanas de diferenciação no agitador a 90 rpm, as neuroesferas foram plaqueadas em placas com revestimento de poliornitina e laminina, como descrito anteriormente. Após as esferas serem plaqueadas, os astrócitos foram liberados e começaram a crescer e se espalhar sobre a placa. Após a primeira passagem, as células que cercarem as neuroesferas foram dissociadas enzimaticamente utilizando Accutase (Corning®cellgro®, Virginia, USA).

Em geral, as células obtidas por esse protocolo podem ser mantidas por apenas 4-5 passagens até chegarem a um estágio de senescência. Os astrócitos utilizados neste trabalho foram caracterizados e utilizados entre as passagens 2 a 4, conforme anteriormente descrito (Russo et al., 2018).

Após a passagem 2-3, ao atingirem uma confluência celular de aproximadamente de 90%, foi realizada a dissociação enzimática utilizando Accutase (Corning®cellgro®, Virginia, USA), as células foram contadas e 1×10^5 células por orifícios foram semeadas em placas de 24 orifícios, previamente tratadas com laminina e poliornitina para facilitar a

adesão dos astrócitos. Após aderidos e verificado que em cada orifício havia 1×10^5 células, os mesmos foram infectados.

5.4. PROCESSO DE INFECÇÃO COM SARS-CoV-2

Utilizando-se da tecnologia e segurança do Laboratório de Biossegurança Nível 3, da SPPU, as duas linhagens de vírus foram utilizadas para infecção em MOI 0,02.

No dia 0 da infecção, os meios de cultura são trocados e adicionados 1 ul de vírus por poço. Foram utilizadas duas placas de 24 orifícios, uma para cada linhagem viral. Neste mesmo dia, logo após a infecção, foi coletado meios de cultura infectado para se obter o tempo zero de infecção e posterior análises.

Após 24h de infecção, foi realizado a coleta de todo meio de cultura de 6 orifícios utilizando-se ponteira de 500 ul, os mesmos foram armazenados em tubos do tipo *ependorfs*. Os orifícios que continham lamina para imunofluorescência tiveram suas lamina cuidadosamente retiradas com auxílio de pinça e transferidas para uma nova placa, posteriormente foi seguido o procedimento descrito no item 5.6.

O mesmo processo realizado após 24h de infecção se repetiu após 48h, 72h e 96h a fim de se comparar e analisar o produto da infecção, todo este processo também foi realizado no MOCK, sendo placa com astrócitos não infectados, mas que seguiram o mesmo processo e tempo de observação, escusando-se apenas de receberem as linhagens celulares.

5.5. ANÁLISE MOLECULAR DE EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS INFECTADAS POR SARS-CoV-2 POR qPCR (PCR *REAL TIME*)

O RNA de cada amostra (sobrenadante de cultura celular ou células) foram extraídos usando o reagente TRIzol (Invitrogen). Todos os *pellets* de RNA foram ressuspensos em 30 uL de água destilada livre de RNase, quantificados em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies) e estocados a -80°C . O DNA complementar das células (cDNA) foi sintetizado a partir do RNA obtido através de superscript III reverse-transcription polimerase (Invitrogen). As reações de PCR foram preparadas com 50 ng de cDNA, 0.2 uM de primer, 1 unidade de Taq DNA Polimerase, 0.2 μM de dNTP's, 1.5 mM de cloreto de magnésio e tampão de Taq DNA Polimerase (Fermentas Life

Science) e realizadas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Além de sobrenadante de cultura pós-infecção com SARS-CoV-2 (para verificar a expressão de marcadores virais SARS-CoV-2), os astrócitos obtidos a partir das iPSC também foram caracterizados a nível molecular por PCR em tempo real (qPCR) para avaliar a infecção por SARS-CoV-2 e morte celular decorrente (Casp3). Para tanto, após os astrócitos atingirem confluência em torno de 100%, as células foram lavadas e submetidas a extração de RNA utilizando TRIzol. O cDNA obtido foi submetido a PCR quantitativo (qPCR) utilizando SYBR green Supermix (Bio-Rad - CA, USA). Para a detecção viral utilizou-se o kit completo Allplex SARS-CoV-2 Assay (Allplex 2019-nCoV).

5.6. ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTÉICA DE CÉLULAS INFECTADAS POR SARS-CoV-2 POR ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os astrócitos foram cultivados em placas de 24 orifícios sobre lamínula de vidro até atingirem a confluência desejada em torno de 80%. As células foram fixadas usando paraformaldeído, 4% em PBS, por 15 minutos em temperatura ambiente. Após lavar, as células foram permeabilizadas com 0.1% Triton X-100 (Promega) diluído em PBS por 15 minutos. Depois da etapa de bloqueio com 2% BSA (Sigma-Aldrich) por 4 horas, as células foram incubadas com anticorpos primários por 16 horas a 4°C. Passado o período de incubação dos anticorpos primários (listados na tabela 1), as células foram lavadas por três vezes com dPBS e submetidas a um novo bloqueio em dPBS contendo 2% BSA durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, os respectivos anticorpos secundários (Life Technologies) foram adicionados de acordo com os primários e incubados por 1 hora em temperatura ambiente. Ao final, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e DAPI (1µg/mL) adicionado por 5 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram montadas utilizando ProLong Gold (Life Technologies). A imunoreatividade foi avaliada em microscopia de fluorescência confocal.

Um teste prévio utilizando células Vero infectadas com SARS-CoV-2 foi realizado, a fim de descobrir a melhor diluição para o experimento de imunofluorescência.

Tabela 1: Anticorpos utilizados nos ensaios de imunofluorescência.

Antígeno	Fabricante	N ° Catálogo	Diluição
SARS-CoV-2	ICB-USP	Soro Humano	1:200
Caspase-3 clivada (CASP3)	Cell Signaling	9664S	1:200
GFAP	Abcam	Ab10062	1:500

Legenda: Tabela com a lista dos anticorpos utilizados na imunofluorescência.

5.7. TESTE PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS

Para a detecção da presença e quantificação de citocinas, foi utilizado 50 ul do sobrenadante da cultura MOCK e pós infecção das três linhagens celular PD7, PD16 e PD17, que foram coletados em 24h, 48h, 72h e 96h e analisados pelo kit *Luminex*. Foram analisados os sobrenadantes MOCK e infectado por SARS-CoV-2 em 96h pós infecção.

6. RESULTADOS

6.1. MANUTENÇÃO DE iPSC PARA AMPLIFICAÇÃO

As células iPSC de indivíduos foram descongeladas seguindo o protocolo descrito no item 5.2. Inicialmente, as linhagens de células iPD7 foram descongeladas em matrigel e mantidas em meio mTeSR, segundo protocolo descrito no item 3.3.1. Apesar do procedimento realizado para o descongelamento ter sido realizado como recomendado, com descongelamento rápido, mesmo após 15 dias, não foram observadas colônias de iPSC na placa, tendo sido descartada após 20 dias. Falhas neste processo podem ser devidas a fatores diversos, como variações nas condições ou temperatura de congelamento, sendo difícil identificar o problema. Por conta disso, o procedimento foi repetido outras vezes, utilizando células iPSC dos três indivíduos (iPD7, iPD16 e iPD17) e, após algumas tentativas, as células descongeladas aderiram a placa e cresceram, formando colônias com morfologia característica de células iPSC, como pode ser observado na figura 4.

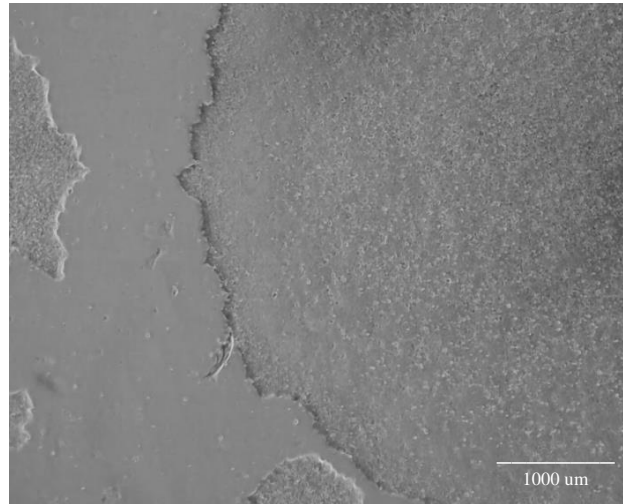


Figura. 4: Fotomicrografia representativa das colônias de iPSCs de controle (iPD16cl1) produzidas para a execução deste projeto. Em condições ideais as iPSCs crescem em colônias, observando-se o aspecto de bordas bem delimitadas. Observa-se ainda o aspecto celular, de uma célula pequena, com pouco citoplasma e um núcleo grande, novamente característico de células pluripotentes, que fazem pouco metabolismo e tem alta taxa de mitose. Microscópio óptico EVOS (Life Technologies, EUA). Aumento: 4X. Barra de escala: 1000 μm . **Fonte:** do próprio autor, 2021.

6.2. PRODUÇÃO DE NPC E DIFERENCIAÇÃO DE ASTROCITOS CULTURA CELULAR E DIFERENCIAÇÃO NEURAL

As neuroprogenitoras neurais (NPCs) dos indivíduos propostos foram produzidas conforme descrito no item 5.3.2 de Materiais e Métodos. As NPCs possuem uma morfologia fusiforme, unicelular e normalmente amplificam rapidamente, enchendo a placa em poucos dias. Esse processo também sofreu algumas intercorrências e foram necessárias algumas tentativas até que conseguimos obter as NPCs, conforme ilustrado na figura 5.

É importante ressaltar que apesar de termos o protocolo bem estabelecido em nosso laboratório, tivemos certa dificuldade em obter as NPCs levando em consideração que não apenas na etapa de amplificação das iPSCs mas também nas seguintes as células não responderam de acordo com o esperado tendo a necessidade de se adquirir novos reagentes para testarmos a fim de conseguirmos obter as células. A partir das NPCs previamente desenvolvidas por outros membros deste grupo, o protocolo de diferenciação em astrócitos foi seguido conforme descrito em Russo et al., 2018.

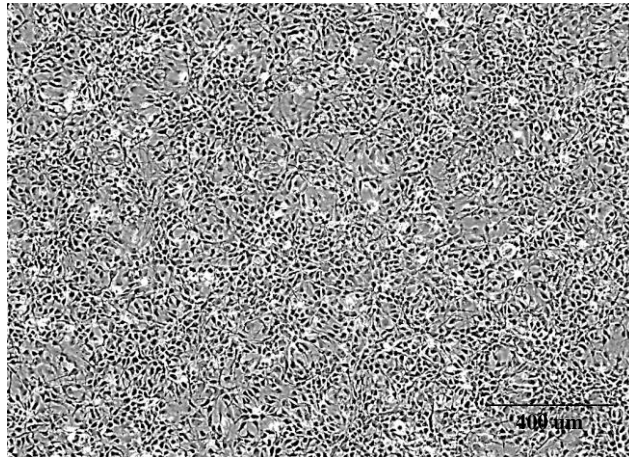


Figura. 5: Fotomicrografia representativa das células NPCs de controle (iPD16cl1p7) produzidas para a execução deste projeto. É possível notar a morfologia fusiforme das NPCs e observar que o crescimento das NPCs é em monocamada, mas de maneira aleatória, sem a formação de colônias das suas antecessoras, as iPSCs. Microscópio óptico EVOS (Life Technologies, EUA). Aumento: 10X. Barra de escala: 400 μ m. **Fonte:** do próprio autor, 2021.

6.3. AMPLIFICAÇÃO DE ASTRÓCITOS PARA INFECÇÃO COM SARS-CoV-2

Foram produzidos astrócitos das três linhagens celulares propostas (iPD7, iPD16 e iPD17), os mesmos foram amplificados conforme protocolo descrito no item 5.3.1 ao atingirem uma confluência celular de aproximadamente de 90%.

Para a produção de astrócitos, é necessário produzir as esferas de progenitores de astrócitos, como é possível observar na figura 6A. As neuroesferas crescem em suspensão e não se unem umas às outras, ou aderem à superfície da placa enquanto mantidas em suspensão sob agitação constante. Importante observar que o tamanho das esferas é relativamente constante, indicando um processo de diferenciação homogêneo da cultura de células (figura 6B).

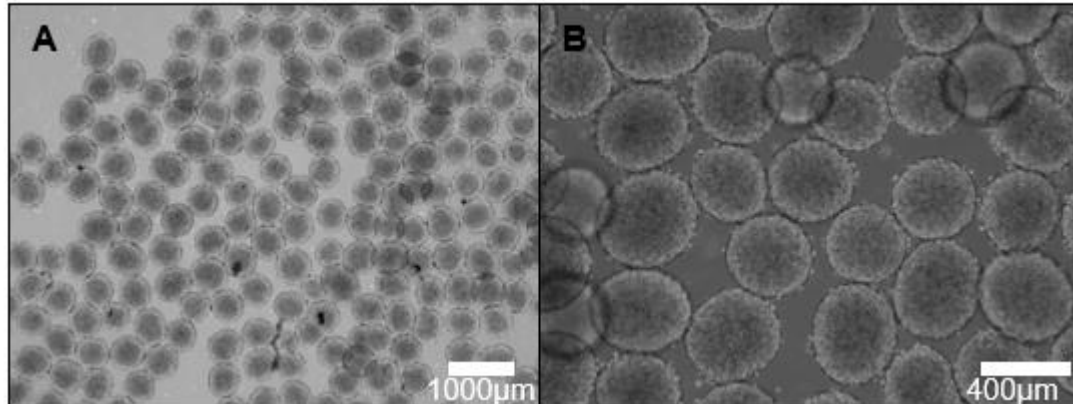


Figura. 6: Fotomicrografias representativas de neuroesferas (PD16 cl1) em processo de diferenciação inicial para a produção de astrócitos. **A:** Aumento de 4X. Barra de escala: 1000µm. **B:** Aumento de 10X. Barra de escala: 400µm. É possível observar as neuroesfera ainda em suspensão, mantida em agitação orbital a 90rpm. Microscópio óptico EVOS (Life Technologies, EUA). **Fonte:** do próprio autor, 2021.

Passado o processo de formação das neuroesferas, após o plaqueamento para formação dos astrócitos, as neuroesferas aderidas começam a liberar progenitores de astrócitos (células da glia radial) na placa, que se espalham produzindo uma monocamada celular (Figura 7A). É possível observar a morfologia dos astrócitos em cultura, com células esparsas e estreladas, característicos dessas células (figura 7).

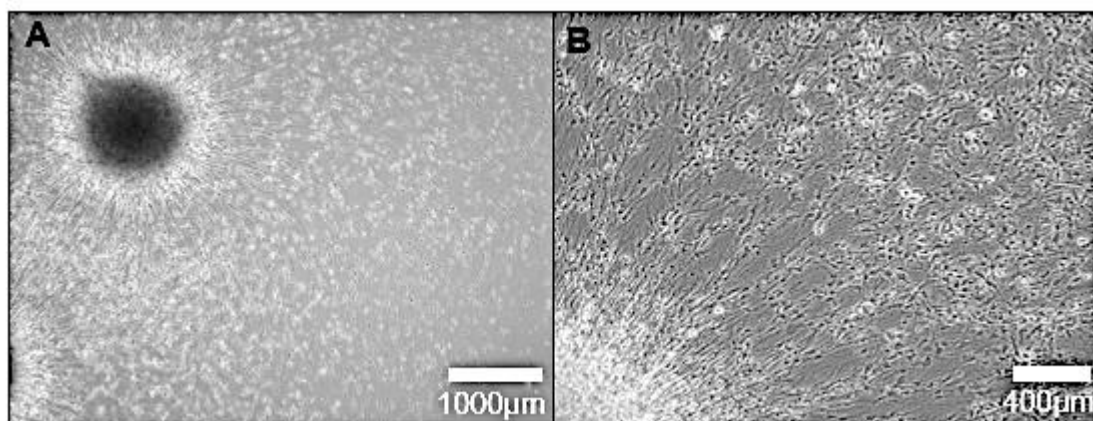


Figura. 7: Fotomicrografias de astrócitos (PD16 cl1 p0). **A:** Aumento de 4X. Barra de escala: 1000µm. **B:** Aumento de 10X. Barra de escala: 400µm. Nestas imagens é possível observar a fixação das neuroesferas à superfície da placa de cultura celular, iniciando a liberação das células da glia radial (progenitoras). Microscópio óptico EVOS (Life Technologies, EUA). **Fonte:** do próprio autor, 2021.

6.4. INFECÇÃO VIRAL DE ASTRÓCITOS POR SARS-CoV-2

A infecção viral foi realizada com as duas linhagens do SARS-CoV-2, HIAE e P1. Os astrócitos foram infectados com MOI 0,02 após atingirem uma confluência de 1×10^5 células por orifícios em placas de 24 orifícios. Imediatamente após a adição de vírus foi considerado o tempo zero da infecção. Os astrócitos foram monitorados quanto ao aparecimento de efeito citopático viral com observação diária em microscópio invertido com contraste de fase. Além disso, o sobrenadante de cultura celular foi coletado diariamente, seguindo os tempos de 0h, 24h, 48h, 72h e 96h após infecção (h.p.i), para análises moleculares da presença de vírus e produtos metabólicos produzidos em função da infecção.

Primeiramente realizamos o cultivo de astrócitos da linhagem celular PD17. Devido à baixa quantidade de células e considerando que este é um tipo celular que não podemos amplificar e cultivar por muito tempo, foi realizada a infecção dos astrócitos utilizando primeiramente a linhagem HIAE, cedida pelo laboratório do Professor Doutor Edison Durigon. Neste primeiro momento para a infecção foi utilizado um total de meio de cultura de 500 ul por poço, considerando os tempos propostos para análise observamos que alguns poços, principalmente os destinados para análise em 96h estavam perdendo líquido, comprometendo a integridade das células e chegando a causar o esgotamento do meio dos poços, sendo este o motivo da não realização de análises em 96h da linhagem celular PD17. Considerando o observado com o PD17, padronizamos que nos próximos experimentos seria utilizado um total de 1000 ul de meio de cultura por poço.

Sendo assim, os astrócitos do PD16 foram cultivados e plaqueados para infecção pelo SARS-CoV-2, dessa vez foi possível realizar a infecção pelas duas cepas propostas. Devido à padronização da quantidade de meio utilizada por poço tivemos o suficiente para manter a integridade celular dos astrócitos. As células foram infectadas e assim como nas demais foi realizado coleta de sobrenadante para posterior análise, assim como a obtenção de células em Trizol e das células aderidas em lamínulas para realização do ensaio de imunofluorescência.

Após algum período para obtenção dos astrócitos de PD7, apesar de morfológicamente não estarem de acordo com o que esperávamos, foi realizada a infecção com as duas cepas virais. As células foram plaqueadas em placa de 24 orifício

na passagem 2, mesmo após duas semanas nesta condição visualmente não havia uma uniformidade no crescimento, porém este seria um período crítico para a vida celular nesta placa, considerando a necessidade de infecção realizamos a contagem de um dos poços e verificando que neste havia a quantia esperada de 1×10^5 de célula, realizamos a infecção. Seguindo o mesmo procedimento que a linhagem celular anterior, foi realizada as infecções no dia 0, com as devidas coletas para análises sendo realizadas após 24, 48, 72, e 96h após infecção. Conforme as lâminas eram retiradas das placas em seus respectivos *time points* foi possível observar que uma parte da cultura celular se perdia durante essa remoção, apesar de empregado o protocolo conforme nos experimentos anteriores.

Devido as intercorrências durante as infecções das linhagens celulares controle PD7 e PD17, evidenciamos durante o processo de resultados imagens representativas da linhagem celular PD16. É válido esclarecer que até o processo de produção dos astrócitos e passagem para placa de 24 orifícios, as três linhagens celulares apresentavam células características conforme o esperado.

Nas primeiras horas de infecção foi possível observar que a morfologia dos astrócitos não se alterava, entretanto após 48h observou-se corpúsculos de inclusão junto aos astrócitos e uma diminuição do número de células. Infelizmente, o microscópio dentro do NB3 não viabilizou a produção de fotografias ilustrativas destes efeitos. Contudo, a seguir nos ensaios de PCR, dispostos no item 6.5, foi possível confirmar a infecção.

6.5. ANÁLISE MOLECULAR DA PRESENÇA DO VIRUS SARS-CoV-2 POR REAÇÃO DE PCR

Os sobrenadantes obtidos das células infectadas pelo SARS-CoV-2 das duas variantes e do MOCK (controle não infectado) foram submetidos à análise por qPCR (PCR Real Time) conforme protocolo descrito em 3.4 de materiais e métodos. Os resultados das análises de expressão dos genes E (envelope), N (nucleocapsídeo) e RdRp (gene da RNA polimerase dependente de RNA) são apresentados conforme figuras 8, 9 e 10.

Foram coletados apenas os sobrenadantes de 24h, 48h e 72h do PD17 infectado com a cepa HIAE, podendo-se observar uma constância na expressão viral nas primeiras 48h, havendo uma expressão mais aumentada da carga viral em 72h.

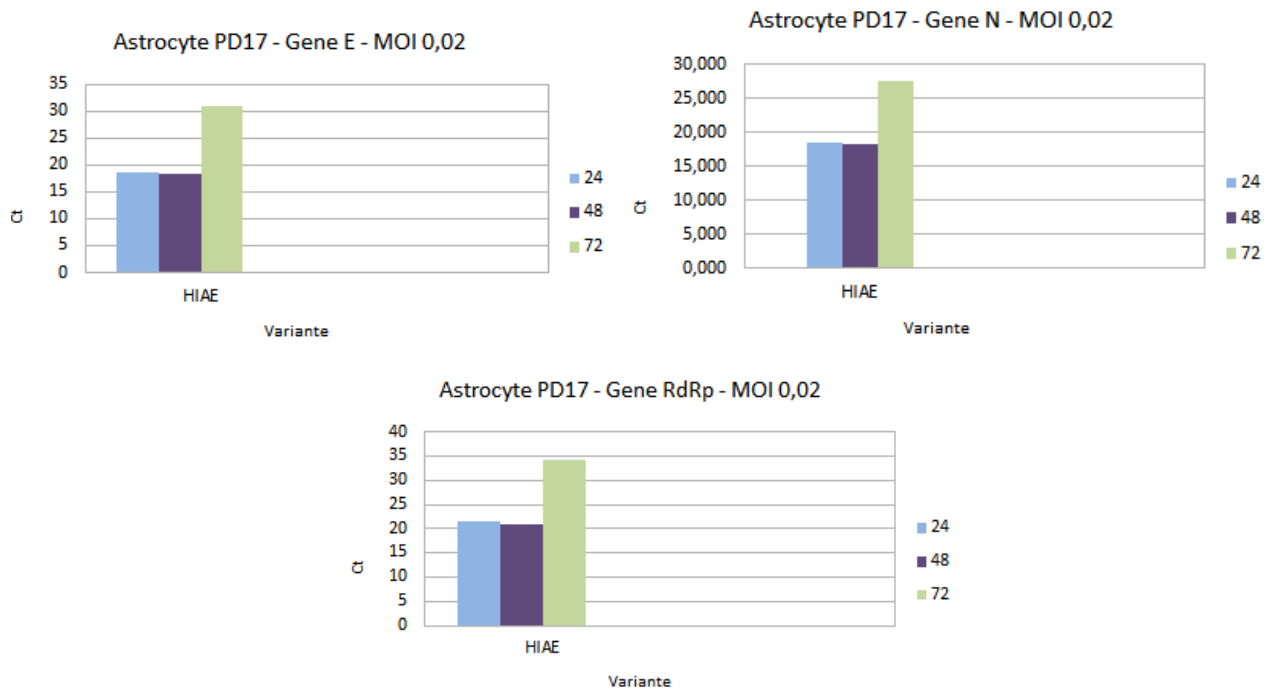


Figura 8. Gráfico de PCR viral PD17. Legenda: Gráfico de qPCR do sobrenadante dos astrócitos PD17 infectado pela cepa HIAE, de SARS-CoV-2 em MOI 0,02. Expressão dos genes de envelope (E), Nucleocapsídeo (N) e gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) nos períodos de 24h, 48h e 72h.

Ao observarmos a expressão da carga viral de ambas as linhagens, P1 e HIAE no paciente PD7, podemos observar que a carga viral de HIAE não se altera significativamente ao longo do tempo analisado pós infecção. Enquanto com a linhagem P1 há uma pequena variação principalmente ao observarmos o gene da RNA polimerase dependente de RNA.

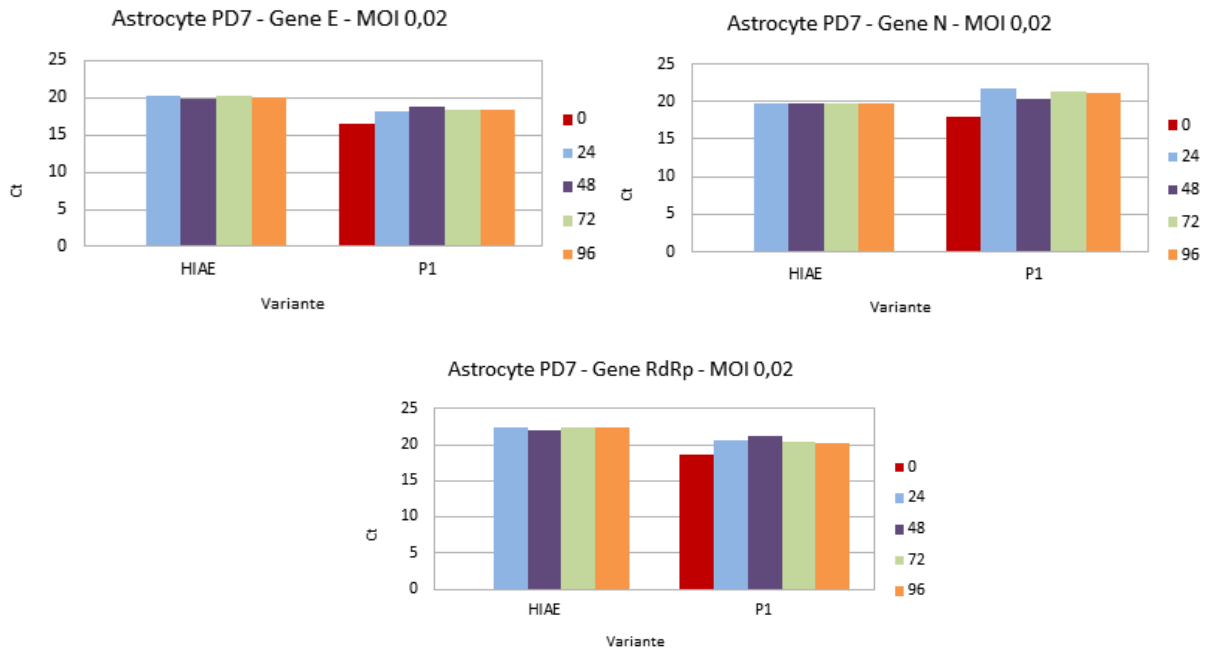


Figura 9. Gráfico de PCR viral PD7. Legenda: Gráfico de qPCR do sobrenadante dos astrócitos PD7 infectados pelas linhagens P1 e HIAE, de SARS-CoV-2 em MOI 0,02. Expressão dos genes de envelope (E), Nucleocapsídeo (N) e gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) nos períodos de 24h, 48h, 72h, e 96h, sendo 0h a expressão dos genes do vírus no meio de cultura puro.

Quanto a linhagem celular PD16, foi possível analisar os quatro *time points* propostos com as duas cepas, HIAE e P1, novamente podemos observar uma constância em HIAE e pequenas variações em P1.

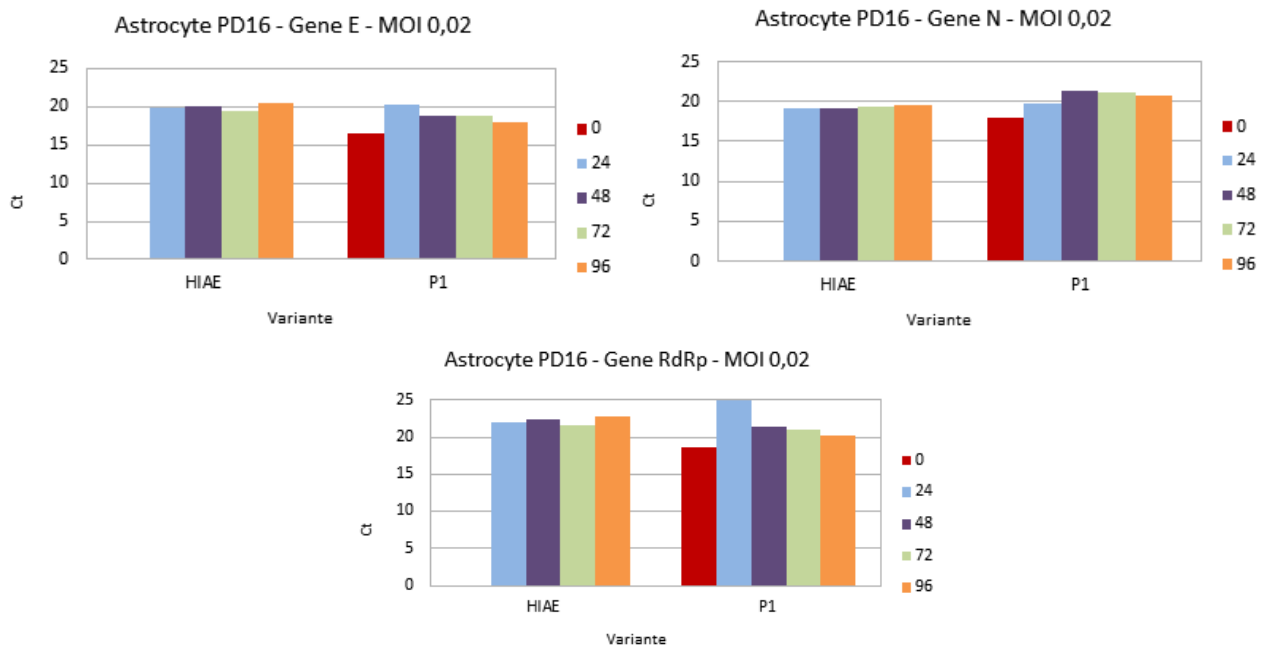


Figura 10. Gráfico de PCR viral PD16. Legenda: Gráfico de qPCR do sobrenadante dos astrócitos PD16 infectados pelas cepas P1 e HIAE, de SARS-CoV-2 em MOI 0,02. Expressão dos genes de envelope (E), Nucleocapsídeo (N) e gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) nos períodos de 24h, 48h, 72h, e 96h, sendo 0h a expressão dos genes do vírus no meio de cultura puro.

6.6. ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTÉICA DE CÉLULAS INFECTADAS POR SARS-CoV-2 POR ENSAIOS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Concluídas as infecções, realizamos ensaios de imunofluorescência nos astrócitos das linhagens utilizadas. Verificamos a marcação da SARS-CoV-2 para identificação viral e da proteína acida fibrilar (GFAP) para caracterização dos astrócitos, bem como o marcador característico de núcleo, o DAPI, conforme são apresentadas nas figuras 11, 12 e 13.

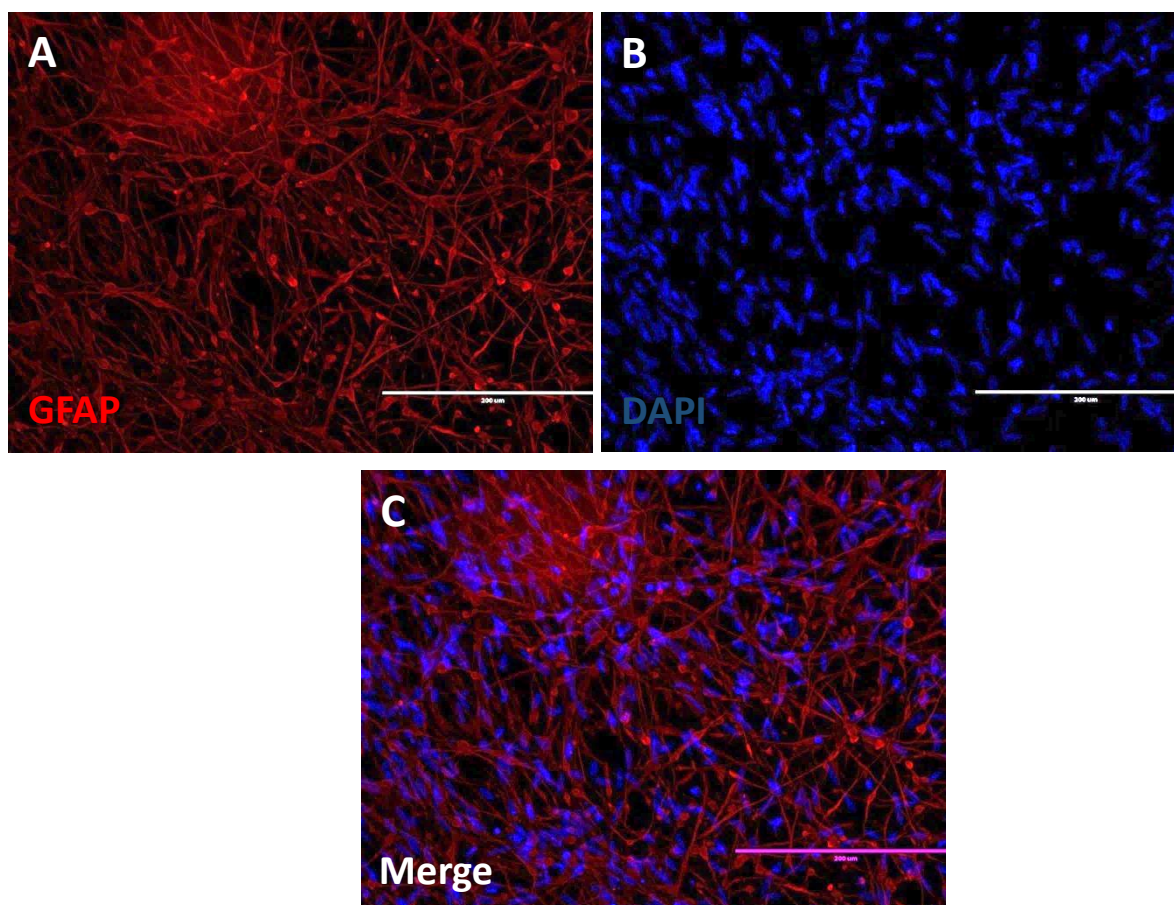


Figura 11. Fotomicrografia com imunofluorescência de astrócitos (PD16) não infectado com vírus (MOCK). **Fonte:** do próprio autor, 2022. Legenda: A) astrócitos derivados de PD16 não infectados com vírus (MOCK) marcados com GFAP. É possível observar a morfologia fusiforme e irradiada das células, tentando fazer contato umas com as outras. B) Núcleo celular dos astrócitos

marcados com DAPI. C) *MERGE*, sobreposição das imagens A e B. Imagem obtida através de microscopia de fluorescência confocal em aumento de. Barra de escala de 200 um.

A expressão proteica dos marcadores para caracterização de astrócitos, verificação de morte celular por apoptose em função ou não da infecção viral e presença viral foi avaliada utilizando a técnica de imunofluorescência. As reações foram feitas conforme protocolo descrito no item 3.5 de materiais e métodos, utilizando anticorpos primários específicos contra as proteínas alvo de interesse em diferentes tempos pós-infecção, assim como na técnica de qPCR (24, 48, 72 e 96 horas).

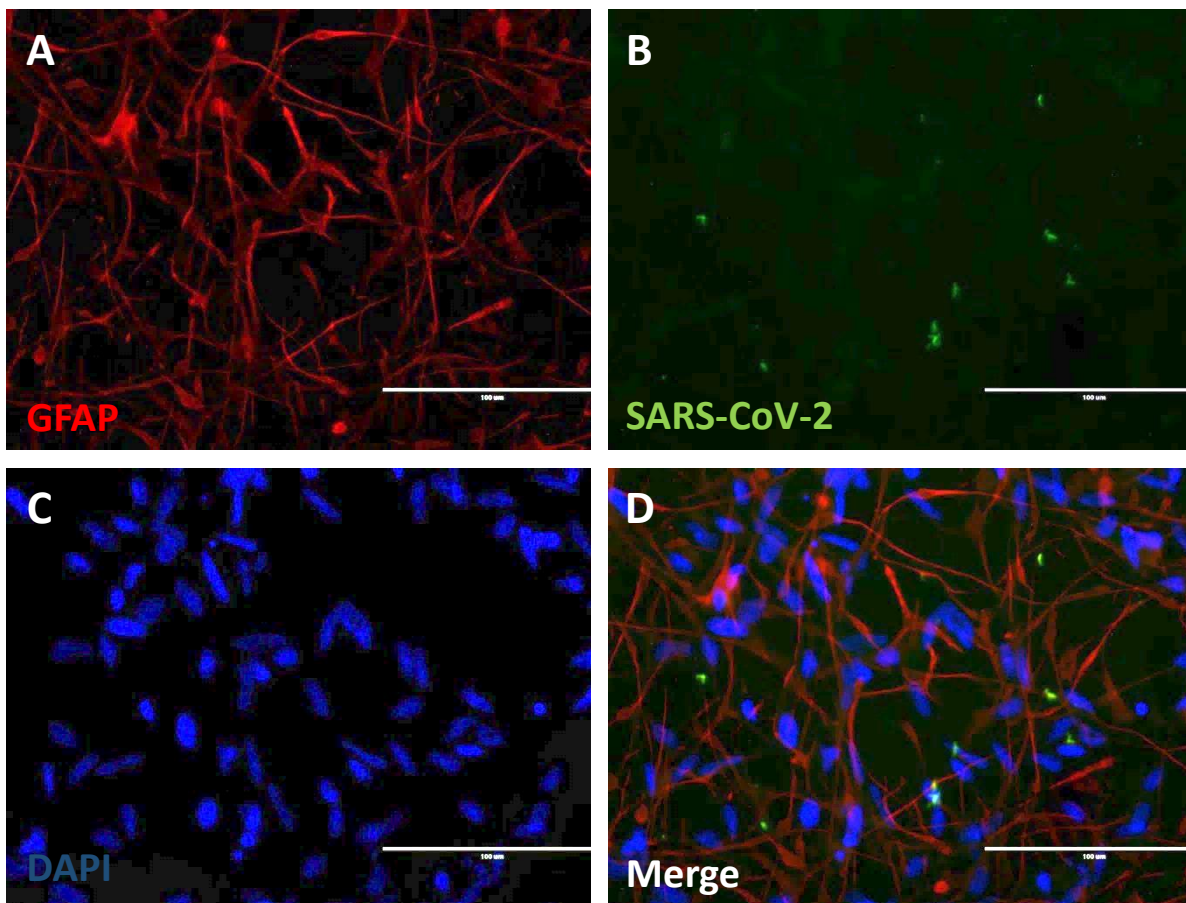


Figura 12. Fotomicrografia com imunofluorescência de astrócitos derivados de PD16 infectado com a cepa viral P1. **Fonte:** do próprio autor, 2022. Legenda: A) astrócitos infectados com a cepa P1 do SARS-CoV-2, marcados com GFAP. B) SARS-CoV-2 positivamente marcado no meio extracelular. C) Núcleo celular dos astrócitos marcados com DAPI. D) Merge, sobreposição das imagens evidenciando a localização do SARS-CoV-2 em relação a célula. Imagem obtida através de microscopia de fluorescência confocal em aumento de 40x. Barra de escala de 100 um.

É possível observar nas imagens a marcação positiva dos anticorpos utilizados na imunofluorescência, sendo o GFAP um marcador de astrócitos evidenciando os mesmos, o anticorpo de SARS-CoV-2 evidenciando a presença de partículas virais na amostra, conforme representado nas figuras 12 e 13 é possível observar que essas partículas estão presentes no meio extracelular.

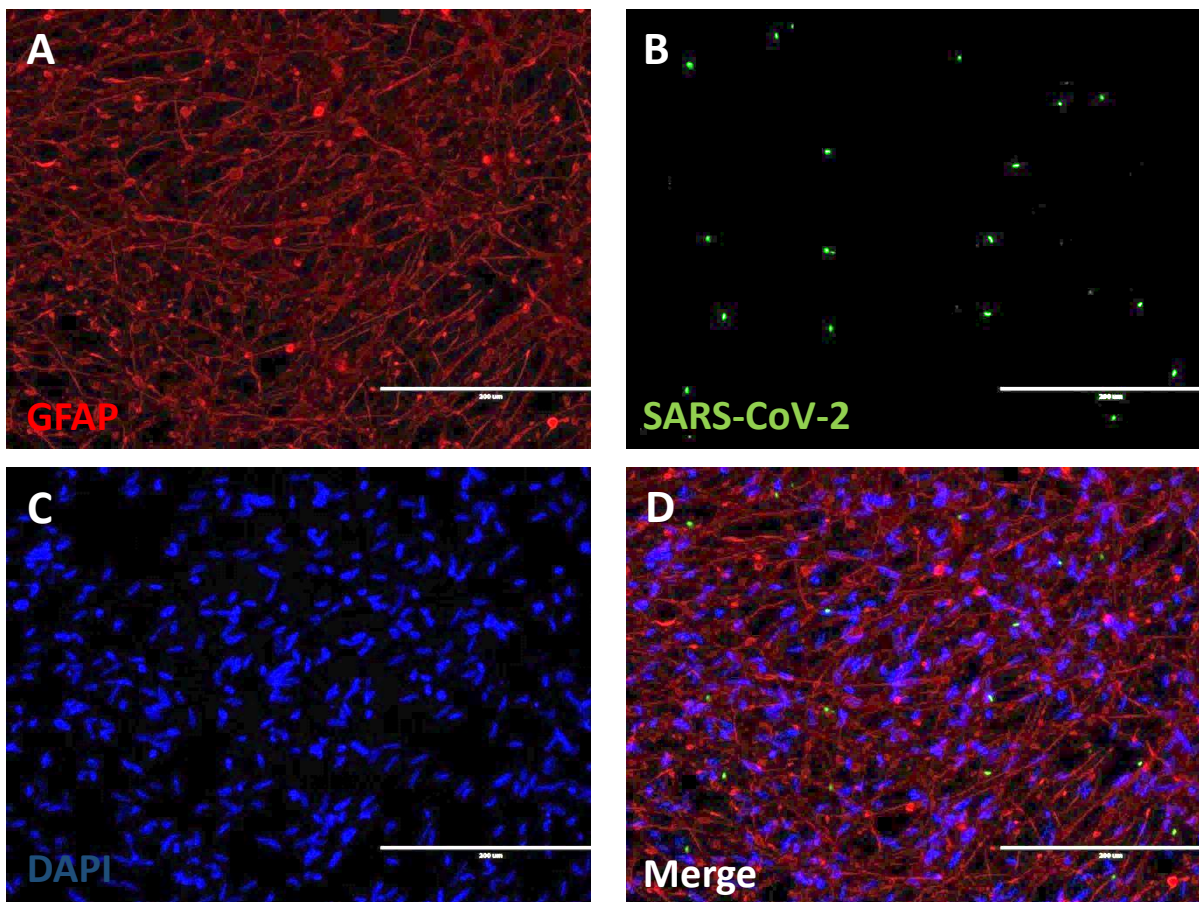


Figura 13. Fotomicrografia com imunofluorescência de astrócitos (PD16) infectado com HIAE. **Legenda:** **A)** astrócitos infectados com a cepa HIAE do SARS-CoV-2, marcados com GFAP. **B)** SARS-CoV-2 positivamente marcado no meio extracelular. **C)** Núcleo celular dos astrócitos marcados com DAPI. **D)** Merge, sobreposição das imagens evidenciando a localização do SARS-CoV-2 em relação a célula. Imagem obtida através de microscopia de fluorescência confocal em aumento de 20x. Barra de escala de 200 um. **Fonte:** do próprio autor, 2022.

A análise de imunorreatividade para marcadores de célula glial (GFAP), marcadores de morte celular (CASP3) e marcador do vírus SARS-CoV-2 foi realizada a partir do protocolo de imunofluorescência. Podemos observar a marcação de todos os anticorpos utilizados. Devido à baixa expressão do marcador de SARS-CoV-2 nas

amostras, consideramos que o MOI utilizado neste projeto foi relativamente baixo, considerado os resultados esperados, seria necessário a realização de novas infecções com MOIs mais altos para se obter melhores resultados.

6.7. QUANTIFICAÇÃO DE CASPASE

Para observarmos se havia morte celular, por causa da infecção de vírus ou morte natural, também utilizamos a técnica de imunofluorescência utilizando o marcador de CASP-3 ativada, responsável por identificar marcações de morte celular. É possível observar nas imagens a marcação por SARS-CoV-2, assim como a marcação por caspase.

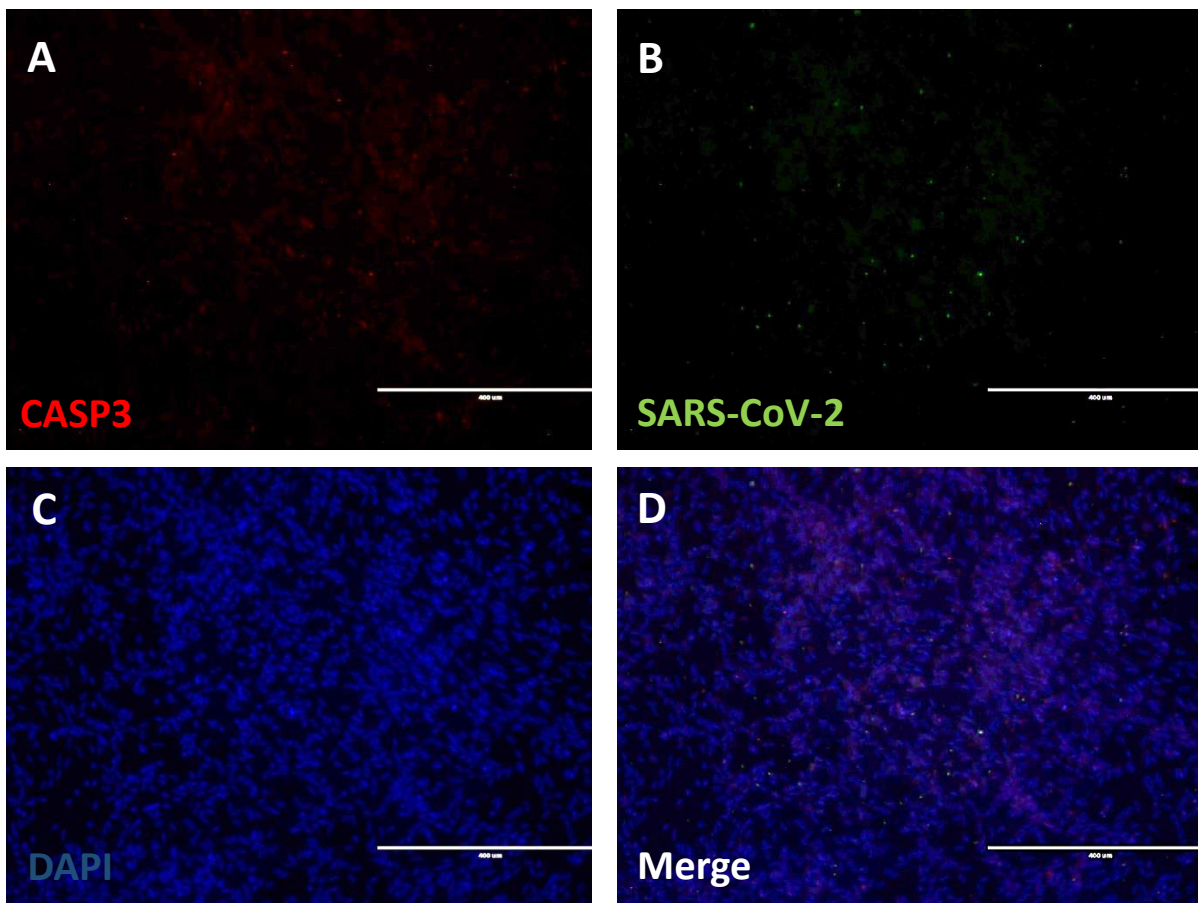


Figura 14. Fotomicrografia com imunofluorescência de astrócitos (PD16) marcado com CASP3. **Legenda:** **A)** astrócitos infectados com a cepa HIAE do SARS-CoV-2, marcados com CASP3. **B)** SARS-CoV-2 positivamente marcado no meio extracelular. **C)** Núcleo celular dos astrócitos marcados com DAPI. **D)** Merge, sobreposição das imagens evidenciando a localização de CASP3,

e de SARS-CoV-2 em relação a célula. Imagem obtida através de microscopia de fluorescência confocal em aumento de 10x. Barra de escala de 400 μ m. **Fonte:** do próprio autor, 2022.

Foram contados um total de 24 campos de diferentes lamina das linhagens celulares utilizadas. A quantificação é realizada no software ImageJ (64-bit Java 1.8.0_172(70MB), (Carolina do Norte, USA) através da contagem da quantidade de células marcadas por CASP-3 normalizado pela quantidade de células ativas (DAPI). Podemos observar no gráfico abaixo a variação na quantificação de morte celular das linhagens comparadas.

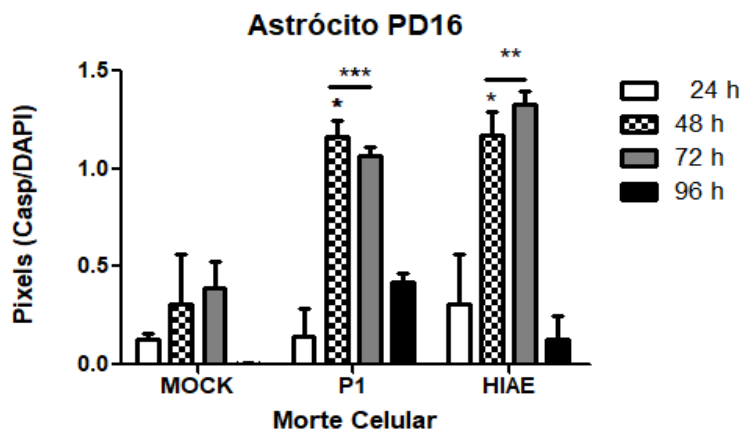


Figura 15. Quantificação de Caspase 3. Legenda: Gráfico ilustrativo da quantificação de morte celular dos Astrócitos PD16 em 24, 48, 72 e 96h, comparando MOCK, P1 e HIAE. O gráfico foi produzido no programa GraphPad Prism 9 (GraphPad, CA, USA) e estatística desenvolvida por teste de variância de uma ou duas vias (ANOVA).

Foi visto em 96h que houve uma redução significativa de morte celular observando-se a marcação com CASP-3, e mais morte celular em 48h e 72h.p.i. ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2, nas duas cepas utilizadas HIAE e P1.

6.8. CITOCINAS EXPRESSAS

A expressão de citocinas liberadas pelas células durante o período de infecção foi analisada segundo o ensaio de Luminex. Sendo analisados os sobrenadantes após 96h de infecção das células PD16, PD7 e PD17.

Após análise por Luminex dos sobrenadantes das amostras MOCK e infectadas pela cepa HIAE, foi possível identificar 17 tipos de citocinas presentes. As citocinas

presentes nas amostras de sobrenadante foram MIP-1b; IL-6; IFN γ ; IL-5; GM-CSF; IL-1b; bFGF; VEGF; PDGF-BB; IP-10; MCP-1; IL-8; IL-10; IL-15; IL-7; TNF α e RANTES.

Podemos observar entre as três linhagens celulares analisadas que algumas citocinas não foram detectadas em todas as amostras, não sendo possível estabelecer uma relação precisa entre MOCK e infectado, uma vez que essa ausência varia entre alguns tipos de sobrenadantes e linhagem celular, como visto na IL-7 e RANTES.

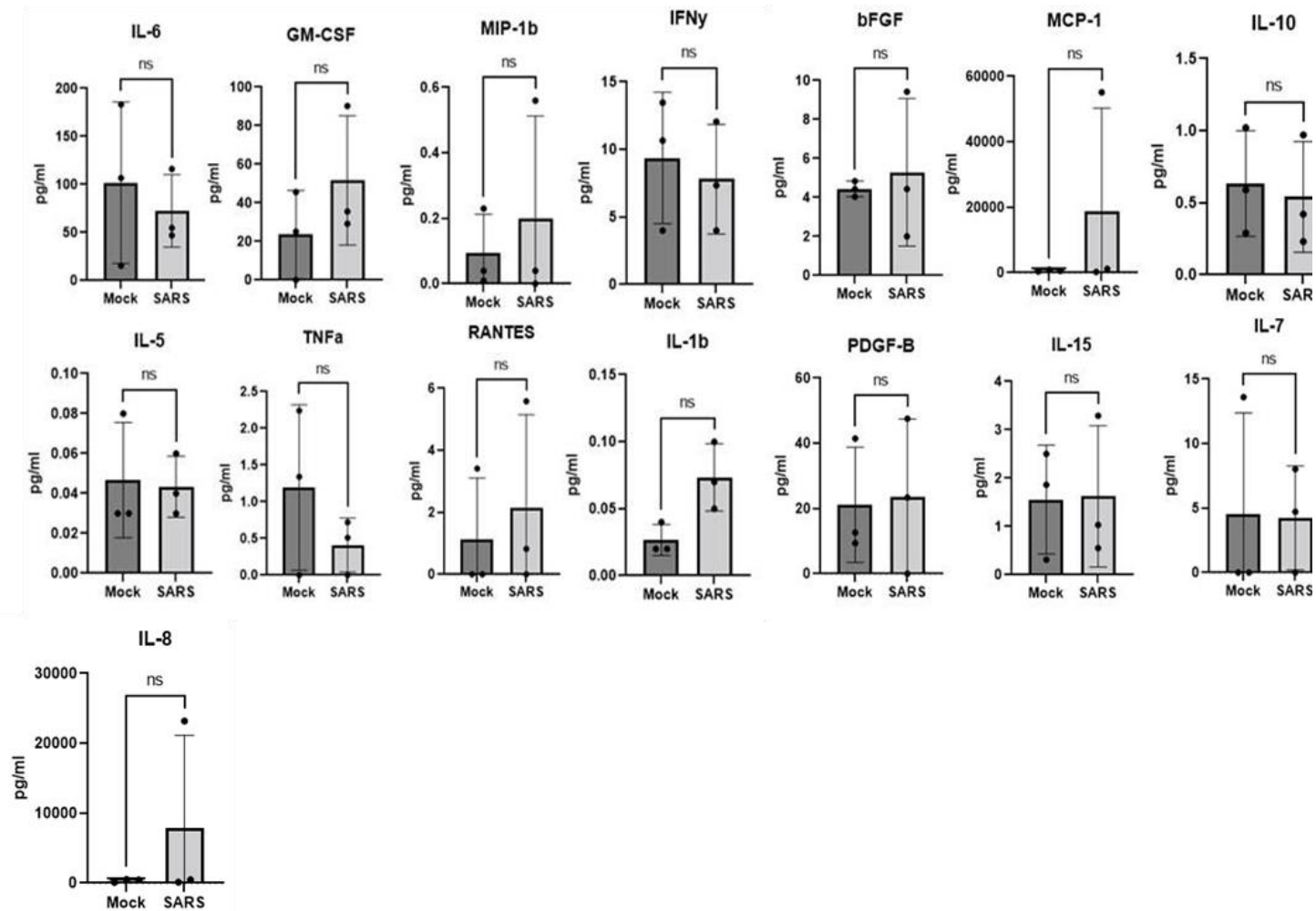


Figura 16. Expressão e quantificação de Citocinas. Legenda: Gráfico ilustrativo da quantificação de expressão de citocinas comparando MOCK e infectado de SARS-CoV-2 da cepa HIAE. Análise de sobrenadante de 96h dos PD7, PD16 e PD17. O gráfico foi produzido no programa GraphPad Prism 9 (GraphPad, CA, USA).

7. DISCUSSÃO

Uma nova linhagem Coronavírus, conhecido como SARS-CoV-2 surgiu no final de 2019 (HUANG, et. al., 2020). A partir deste momento, o vírus foi se espalhando pelo globo, causando uma pandemia que já infectou mais de 600 milhões de pessoas no mundo e levou cerca de 6 milhões de pessoas a mortes (WHO, 2022).

Considerando o exposto, e a literatura ainda escassa sobre os mecanismos do SARS-CoV-2 no SNC, este projeto teve como objetivo estudar os mecanismos do vírus nos astrócitos, que são células da glia responsáveis por promover sustentação e nutrição aos neurônios. Com este trabalho, seria possível verificar as perturbações que a infecção do SAR-CoV-2 causa no cérebro e eventualmente, a depender dos resultados, explicar as possíveis sequelas a curto e longo prazo.

Os astrócitos consistem de células importantes no SNC, responsáveis por nutrir e manter a homeostase do neurônio (FARMER et al., 2016) e contribuem na captação de glutamato (ANDERSON & SWANSON, 2000). Além disso, estão envolvidos na produção de citocinas pró-inflamatórias quando em estado reativo (FLESHNER & CRANE, 2017).

O modelo utilizado neste trabalho são astrócitos derivados de células iPSC. As iPSC utilizadas neste projeto foram reprogramadas a partir do dente decíduo de crianças neurotípicas, conforme protocolo estabelecido por Takahashi & Yamanaka (2016). Seu cultivo foi seguido conforme protocolo já estabelecido em nosso laboratório (BELTRÃO-BRAGA et. al., 2011, 2013; RUSSO et al., 2018; CUGOLA et. al., 2016) e descrito na metodologia.

Uma vez que sabemos que pode haver uma interferência do desfecho da infecção de acordo com o *background* genético do indivíduo, cujos dados podem ser observados nas diferenças clínicas dos pacientes, principalmente os sem comorbidades pré-existentes que acabam tendo desfechos graves e fatais (LEVIN, 2020), foram utilizados três linhagens de iPSC provenientes de indivíduos diferentes, outrora citados como PD7, PD16 e PD17.

O vírus SARS-CoV-2 pode afetar através da invasão direta de células neurais, e também, a unidade neurovascular e o SNC através de inflamação. A principal característica da infecção sistêmica na COVID-19 é devido ao aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias no sangue circulante, já descritos como “tempestade de

citocinas” (COPERCHINI et al., 2020). É visto que o dano do SNC em pacientes com COVID-19 é indicado por níveis plasmáticos elevados de GFAP (KANBERG et al., 2020) fato que sugere que a ativação de astrócitos e seu envolvimento na neuropatogênese do SARS-CoV-2. Portanto, o estado pró-inflamatório pode ser induzido por uma infecção viral direta, e também, devido à presença de citocinas e outros mediadores inflamatórios (MURTA et al., 2020).

Sendo assim, com a expressão de 17 citocinas observou-se aumento nas células infectadas com HIAE quando comparadas com o Mock para a maioria das citocinas testadas (figura 16), mostrando assim que a infecção por SARS-CoV-2 é capaz de induzir uma ativação da cascata de citocinas conforme descrito em Yang et al., 2021.

Em análises do material genético viral, realizamos ensaios para verificar a presença de proteínas virais nas células, utilizando a imunomarcagem com anticorpos contra o vírus e contra proteínas dos astrócitos, para caracterização celular. Foi possível observar a marcação para proteínas GFAP, característico de astrócitos (RUSSO et al., 2018), entretanto não observamos a marcação com anticorpos contra o vírus. Possivelmente como a caracterização molecular por PCR evidenciou a presença de vírus, é provável que o anticorpo que usamos contra o vírus não tenha sido diluído corretamente ou algum outro problema técnico pode ter ocorrido, sendo necessário repetir o experimento.

Além disso com a marcação com o anticorpo CASP-3 na imunofluorescência, observou-se a marcação de caspase para verificar a morte celular. As lâminas marcadas foram quantificadas com o auxílio dos programas ImageJ e GraphPad. Também foi possível verificar um aumento da expressão de Caspase 3 em 48h e 72h após infecção com SARS-CoV-2 quando comparado entre as cepas e MOCK, assim como também foi observado por TAWARI (TAWARI et al., 2021), reforçando assim a hipótese do vírus causar morte celular.

8. CONCLUSÕES

Com a confecção deste projeto e análise dos resultados obtidos durante a realização do mesmo, podemos concluir que o vírus SARS-CoV-2 é capaz de infectar as células glias, como os astrócitos. Uma vez infectados, os astrócitos sofrem modificações da sua morfologia e induzem apoptose provavelmente provocada pela presença do vírus.

Além disso, podemos concluir também que há produção de citocinas pelos astrócitos infectados pelo SARS-CoV-2, o que provavelmente também ocorre se houver infecção direta do vírus no SNC, prejudicando a homeostase do organismo.

9. REFERÊNCIAS

ANDERSON, C. M.; SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: Review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, v. 32, n. 1, p. 1–14, 2000.

ARAUJO, D. B. et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in Brazil and establishment of a coordinated task network. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2020 Oct 23;115:e200342. doi: 10.1590/0074-02760200342.

BECERRA-CALIXTO, A.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 10, n. April, p. 1–12, 2017.

BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. et al. Feeder-Free Derivation of Induced Pluripotent Stem Cells From Human Immature Dental Pulp Stem Cells. *Cell Transplantation*, v. 20, n. 11, p. 1707–1719, 2011.

BELTRÃO-BRAGA, P. C. B. et al. In-a-dish: induced pluripotent stem cells as a novel model for human diseases. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, v. 83, n. 1, p. 11–17, jan. 2013.

BRAHMACHARI, S. Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide. *Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 18, p. 4930–4939, 2006.

COPERCHINI, F., CHIOVATO, L., CROCE, L., MAGRI, F., AND ROTONDI, M. The cytokine storm in COVID-19: an overview of the involvement of the chemokine/chemokine-receptor system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 53, 25–32, 2020. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.05.003.

CHU, H.; CHAN, J. F. W.; YUEN, T. T. T.; SHUAI, H.; YUAN, S.; WANG, Y.; CHAI, Y. Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19: an observational study. *The Lancet Microbe*. 2020.

COLANGELO, A. M.; ALBERGHINA, L.; PAPA, M. Astroglialosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neuroscience Letters*, v. 565, p. 59-64, 2014.

DAVIDSON, A. D et al. Characterisation of the transcriptome and proteome of SARS-CoV-2 using direct RNA sequencing and tandem mass spectrometry reveals evidence for a cell passage induced in-frame deletion in the spike glycoprotein that removes the furin-like cleavage site. *bioRxiv*, 24 mar 2020.

EBERT, A. D. et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, v. 457, n. 7227, p. 277–80, 15 jan. 2009.

FARMER WT et al. Neurons diversify astrocytes in the adult brain through sonic hedgehog signaling. *Science* 351, 849–854, 2016.

FLESHNER, M., CRANE, C. R. Exosomes, DAMPs and miRNA: features of stress physiology and immune homeostasis. *Trends Immunol.* 38, 768–776, 2017. doi: 10.1016/j.it.2017.08.002.

FRIEDMAN, H. M.; KOROPCHAK, C. Comparison of WI-38, MRC-5, and IMR-90 Cell Strains for Isolation of Viruses from Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 7, n. 4, p. 368-371, 1978.

GOLDMAN JD, LYE DCB, HUI DS et al. Remdesivir for 5 or 10 days in patients with severe Covid-19. *N Engl J Med.* 2020;NEJMoa2015301

HAN, H. et al. Prominent changes in blood coagulation of patients with SARS-CoV-2 infection. *Clin Chem Lab Med*, v. 58, n. 7, p. 1116-1120, mar 2020.

HILL, M. Characteristics of a Human Diploid Cell Designated M RC-5. *Nature*, v. 227, p. 168-170, jul 1970.

HU, S. et al. Cytokine effects on glutamate uptake by human astrocytes. *NeuroImmunoModulation*, v. 7, n. 3, p. 153–159, 2000.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*, v. 395, p. 497-506, 2020.

HUNG IF, LUNG KC, TSO EY, et al. Triple combination of interferon beta-1b, Lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet.* 2020;395:1695–704

IMAIZUMI, Y. et al. Mitochondrial dysfunction associated with increased oxidative stress and alpha-synuclein accumulation in PARK2 iPSC-derived neurons and postmortem brain tissue. *Molecular Brain*, v. 5, n. 1, p. 35, 2012.

JOHNSON, M. A. et al. Functional Neural Development from Human Embryonic Stem Cells: Accelerated Synaptic Activity via Astrocyte Coculture. *J Neurosci*, v. 27, n. 12, p. 3069–3077, 2007.

KANBERG, N. Neurochemical evidence of astrocytic and neuronal injury commonly found

in COVID-19. *Neurology*, 2020.

KANBERG, N., ASHTON, N., ANDERSSON, L.-M., YILMAZ, A., LINDH, M., NILSSON, S., et al. Neurochemical evidence of astrocytic and neuronal injury commonly found in COVID-19. *Neurology* 95, e1754–e1759, 2020. doi: 10.1212/WNL.0000000000010111.

KIM, D.; et. al. The architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*, v. 181, p. 914-921, 2020.

KONDO, T. et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*, v. 12, n. 4, p. 487–496, 2013.

LEVIN, A. T.; et. al. Assessing the age specificity of infection fatality rates for COVID-19: systematic review, meta-analysis, and public policy implications. *Eur . J. Epidemiol*, v. 35, v. 12, p. 1123-1138, 2020

LI, M-Y. et al. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infections Diseases of Poverty*, v. 9, p. 45, 2020.

LINNERBAUER M, ROTHHAMMER V. Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. *Front Immunol*. 2020 Sep 30;11:573256. doi: 10.3389/fimmu.2020.573256.

MARTINEZ-ROJAS, M. A.; VEGA-VEGA, O.; BOBADILLA, N. A. Is the kidney a target of SARS-CoV-2?. *American Journal of Physiology*, v. 318, n. 6, p. 1454-1462, jun 2020.

MORAWSKA, L; CAO, J. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. *Environment International*, jun 2020. doi: 10.1016/j.envint.2020.105730

MORIGUCHI, T.; HARII, N.; GOTO, J.; HARADA, D.; SUGAWARA, H.; TAKAMINO, J.; NAKAO, A. A first Case of Meningitis/Encephalitis associated with SARS-Coronavirus-2. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020.

MURTA, V., VILLARREAL, A., AND RAMOS, A. J. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Impact on the Central Nervous System: are Astrocytes and Microglia Main Players or Merely Bystanders? *ASN Neuro* 12:1759091420954960, 2020.

PANIZ-MONDOLFI, A.; BRYCE, C.; GRIMES, Z.; GORDON, R. E.; REIDY, J.; LEDNICKY, J.; FOWKES, M. Central Nervous System Involvement by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Journal of Medical Virology*. 2020.

PENFIELD, C. A. et al. Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in placental and fetal membrane samples. *Am J Obstet Gynecol MFM*, May 2020. doi: 10.1016/j.ajogmf.2020.100133

PEKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience Letters*, v.565, p.30- 38, 2014.

PNO- Plano Nacional de Operacionalização da Vacinação contra a Covid-19. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/vacinas/plano-nacional-de-operacionalizacao-da-vacina-contra-a-covid-19>. Acesso em: 10 Jun 2022.

OLIVEIRA, L. G. et al. SARS-CoV-2 Infection Impacts Carbon Metabolism and Depends on Glutamine for Replication in Syrian Hamster Astrocytes. *bioRxiv*, Oct 2021. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.10.23.465567>.

RANSOHOFF, R. M.; BROWN, M. A. Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 122, n. 4, p. 1164–1171, 2012.

RUSSO, F. B. et al. Modeling the Interplay Between Neurons and Astrocytes in Autism Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biological Psychiatry*, v. 83, n. 7, p. 569–578, 2018.

SHANES, E. D. et al. Placental Pathology in COVID-19. *Am J Clin Pathol*, v. 154, p. 23-32, Jul. 2020.

SREEPADMANABH M, SAHU AK, CHANDE A. COVID-19: Advances in diagnostic tools, treatment strategies, and vaccine development. *J Biosci*. 2020;45(1):148. doi: 10.1007/s12038-020-00114-6.

SUN, P. et al., Clinical characteristics of hospitalized patients with SARS-CoV-2 infection: A single arm meta-analysis. *Journal of Medical Virology*, v. 92, n. 6, p. 612-617, jun 2020.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 663–676, 25 ago. 2006.

TIWARI, S. K.; WANG, S.; SMITH, D.; CARLIN, A. F.; RANA, T. M. Revealing Tissue-Specific SARS-CoV-2 Infection and Host Responses using Human Stem Cell-Derived Lung and Cerebral Organoids. *Stem Cell Reports*, v. 16, n. 3, p. 437-445, Mar. 2021. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.02.005. Epub 2021 Feb 12. PMID: 33631122; PMCID:

PMC7879814.

UPHOFF, C. C.; DREXLER, H. G. Detection of mycoplasma contamination in cell cultures. *Curr. Protoc. Mol. Biol*, v. 106, p. 28.4.1-28.4.14, 2014.

VERMA, S.; KUMAR, M.; NERURKAR, V. R. Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks the production of West Nile virus-induced neuroinflammatory markers in astrocytes. *Journal of General Virology*, v. 92, n. 3, p. 507–515, 2011.

VIRHAMMAR, J. et al. Acute necrotizing encephalopathy with SARS-CoV-2 RNA confirmed in cerebrospinal fluid. *Neurology*, Jun 2020, 10.1212/WNL.0000000000010250; DOI: 10.1212/WNL.0000000000010250

WHO 2020 WHO R&D Blueprint COVID-19 Animal Models. Disponível em: [https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-animal-models—summary-of-progress-madeby-the-who-covid-19-modelling-\(march-04-june-2020\)](https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-animal-models—summary-of-progress-madeby-the-who-covid-19-modelling-(march-04-june-2020)). Acesso em: 10 Jun 2022.

WHO 2022. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Disponível em: <https://covid19.who.int/> . Acesso em 18 de Set 2022.

YANG, L. et al. A Human Pluripotent Stem Cell-based Platform to Study SARS-CoV-2 Tropism and Model Virus Infection in Human Cells and Organoids. *Cell Stem Cell*, v. 27. n. 1, p. 125-136, 2020.

Yang, L.; et al. The signal pathways and treatment of cytokine storm in COVID-19. *Sig Transduct Target Ther* 6, 255 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00679-0>

YI, C. et al. Key residues of the receptor binding motif in the spike protein of SARS-CoV-2 that interact with ACE2 and neutralizing antibodies. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 17, p. 621-630, 2020.

YOKOYAMA APH, WENDEL S, BONET-BUB C, et al. COVID-19 convalescent plasma cohort study: Evaluation of the association between both donor and recipient neutralizing antibody titers and patient outcomes. *Transfusion*. 2021 Aug;61(8):2295-2306. doi: 10.1111/trf.16573.

YU, D. X. et al. Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, v. 2, n. 3, p. 295–310, 2014.

ZHANG, Y.; BARRES, B. A. Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Current Opinion in Neurobiology*, v.20, n.5, p.588-594, 2010.

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; LI, X.; YANG, B.; SONG, J.; NIU, P. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*. 2020.