# YAN DE SOUZA ANGELO

# Impactos da infecção por ZIKV e SARS-CoV-2 no funcionamento mitocondrial de astrócitos primários

São Paulo 2022

# YAN DE SOUZA ANGELO

# Impactos da infecção por ZIKV e SARS-CoV-2 no funcionamento mitocondrial de astrócitos primários

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Pós-Graduação em

Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

Versão original

São Paulo 2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Souza Angelo, Yan Impactos da infecção por ZIKV e SARS-CoV-2 no funcionamento mitocondrial de astrócitos primários / Yan de Souza Angelo; orientador Jean Pierre Schatzmann Peron. -- São Paulo, 2022. 124 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. ZIKV. 2. SARS-CoV-2. 3. Astrócitos. 4. Mitocôndria. I. Schatzmann Peron, Jean Pierre , orientador. II. Título.

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Yan de Souza Angelo

Titulo da Dissertação/Tese: Impactos da infecção por ZIKV e SARS-CoV-2 no funcionamento mitocondrial de astrócitos primários

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a ........................., considerou o(a) candidato(a):

# ( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



Universidade de São Paulo Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel da mitocôndria na infecção de astrócitos primários por ZIKV em modelo murino", protocolada sob o CEUA nº 7241160320, sob a responsabilidade de **Jean Pierre Schatzmann Peron** *e equipe; Yan de Souza Angelo* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 24/08/2020.

We certify that the proposal "The role of mitochondria in murine primary astrocytes in ZIKV infecction", utilizing 30 Isogenics mice (10 males and 20 females), 40 Genetically modified mice (GMO) (20 males and 20 females), protocol number CEUA 7241160320, under the responsibility of **Jean Pierre Schatzmann Peron** and team; Yan de Souza Angelo - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 08/24/2020.



Universidade de São Paulo Comissão de Ética no Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Imunopatogênese da COVID-19 em Modelos Experimentais Murinos", protocolada sob o CEUA nº 7971160320, sob a responsabilidade de **Jean Pierre Schatzmann Peron** *e equipe; Yan de Souza Angelo; Lilian Gomes de Oliveira ; Claudia Madalena Cabrera Mori* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 09/07/2020.

We certify that the proposal "COVID-19 pathogenesis in murine experimental models", utilizing 1080 Isogenics mice (1080 females), 720 Genetically modified mice (GMO) (720 females), 360 Hamsters (360 males), protocol number CEUA 7971160320, under the responsibility of **Jean Pierre Schatzmann Peron** and team; Yan de Souza Angelo; Lilian Gomes de Oliveira ; Claudia Madalena Cabrera Mori - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 07/09/2020.

#### AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de expressar toda gratidão e orgulho do mundo aos meus pais Ronaldo e Isabel, os quais sempre fizeram de tudo para que meu sonho se tornasse realidade. Espero que um dia eu possa lhes dar o mundo (em) que merecem. A eles, todo amor do mundo. Me desculpem por estar sempre tão longe.

Com exceção do primeiro parágrafo, todos agradecimentos aqui contidos não possuem nenhuma ordem. Pelo contrário, todas as pessoas aqui citadas detêm todo meu carinho e admiração.

Agradeço ao Professor Jean Pierre pela possibilidade de trabalhar ao seu lado no Laboratório de Interações Neuroimunes, pelas sinceras conversas, ótimas playlists e claramente, por ensinar a cada dia como é fazer ciência de qualidade. Espero que sua nova empreitada seja glorificante e espero um brilhante futuro para você e sua família. *Rock on!* 

Agradeço também a Carolina, minha segunda mãe, por sempre estar comigo desde meu primeiro dia me ajudando e ensinando o "*bê-á-bá*" da ciência. A Nágela, meu "*crush*", por dividir inúmeros momentos de descontração. A Marília e Chiquinho, por fazer com que o ambiente de trabalho se tornasse sempre ameno com seus ótimos comentários. Ao Patrick, pelas sempre confusas discussões científicas e aos bons drinks. Também agradeço a Laura, Tiago, Brendo, Pedrinho, Rafa, Bia e, claro, a Sandrinha e Jon, novíssimos companheiros de laboratório, o qual já compartilhamos diversos momentos de alegria e troca de conhecimento. A todos presentes e ex membros da família Neuroimune, muito obrigado por sempre estarem lá! A vida teria sido muito mais difícil sem vocês.

Se acharam que estava esquecendo da Lilian, acharam errado. As vezes a vida nos presenteia com pessoas incríveis, e ela é uma delas. Muito obrigado por todos momentos (e tiveram) vividos, pelas calorosas discussões, jornadas no "P3", experimentos falhos e piadinhas enfadonhas. Acredito que cresci muito cientificamente ao seu lado. A você, um futuro brilhante e com muito sucesso. Espero que nos cruzemos novamente nas estradas da vida.

Agradeço também ao pessoal da Plataforma Científica Pasteur-USP, onde realizei grande parte deste projeto. A Professora Paola pelas inestimáveis oportunidades dadas, ao Marielton pelas ótimas discussões e ensinamentos *bioinformáticos*, a Mari por me aguentar por todo esse tempo, a Raquel, Ravena e todos outros integrantes da plataforma pelos bons momentos de convivência. Muito obrigado.

Meus sinceros agradecimentos ao laboratório Virus and Immunity, dirigido pelo Professor Olivier Schwartz, pelo acolhimento e confiança. Agradeço também ao Julian, pelos ensinamentos de biologia molecular, a Nico pelas excepcionais conversas sobre ciência e a vida, além de me fazer sentir em casa mesmo longe. Agradeço também a Nell, Will, Ivanna, Ludvine, Donatella e todos do laboratório pela paciência, o fraterno acolhimento e as agradáveis conversas e momentos.

Pro fim, meus sinceros agradecimentos aos alunos e funcionários do ICB, dos laboratórios de Imunometabolismo, Vírus Emergentes, Desenvolvimento de Vacinas,

Imunologia de Mucosas, Patologia Animal, Neuroendocrinofarmacologia e Imunomodulação e a todos colaboradores aqui citados os quais viabilizaram a execução do presente trabalho. Porque ciência de qualidade nunca e feita só.

Este trabalho foi realizado com apoio das agências de fomento CAPES (2020, 88887.474625/2020-00), FAPESP (2017/26270-0 e 2020/06145-4) e Institut Pasteur (2021, Y-SU11007).

"Le mal qui est dans le monde vient presque toujours de l'ignorance..." — Albert Camus, La Peste

> "Hey! Ho! Let's go!" — Ramones

### RESUMO

ANGELO, Y. S. Impactos da infecção por ZIKV e SARS-CoV-2 no funcionamento mitocondrial de astrócitos primários. 2020. 125p. Dissertação de Mestrado em Imunologia – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo (2022)

A humanidade, infelizmente, sempre se viu assolada por pandemias. A peste negra, gripe espanhola, tuberculose, poliomielite e, recentemente, as pandemias de Zika vírus e de SARS-CoV-2. Se há algo com as quais aprendemos, é que a manutenção do conhecimento científico é crucial para a mitigação e controle dos danos por elas causados. Neste trabalho, focamos nas últimas duas pandemias, sendo que a de SARS-CoV-2 ainda se apresenta em curso. No Brasil, durante os anos de 2015 -2016, houve um grande aumento no número de bebês nascidos com microcefalia, posteriormente caracterizada como Síndrome Congênita do Zika (SCZ), assim como de adultos com Síndrome de Guillain-Barré. Já o SARS-CoV-2, um vírus que emergiu no final de 2019, e causador da COVID-19, se espalhou rapidamente por todo globo, causando até o momento mais de 500 milhões de mortes e um devastador impacto econômicos e social. Muito ainda se desconhece sobre seus mecanismos patogênicos e sua interação frente ao organismo hospedeiro, principalmente no que tange seu tropismo e capacidade de afetar o CNS. Os astrócitos, uma das mais abundantes populações celulares do sistema nervoso central (CNS), executam uma enorme miríade de funções, principalmente na manutenção e suporte metabólico neuronal, mas também na resposta imune local. Como grande parte de suas funções têm base metabólica, é essencial que suas mitocôndrias estejam íntegras e em pleno funcionamento. De forma interessante, nos últimos anos as mitocôndrias vêm sendo reconhecidas não somente como organelas metabólicas, mas também como peças críticas em diferentes processos celulares, incluindo a resposta imune inata. Desta maneira, considerando a habilidade de diversos vírus em sequestrar vias metabólicas para facilitar sua replicação, a compreensão de como a infecção pelo ZIKV e SARS-CoV-2 impactam nas funções mitocondriais astrocitárias, pode dar luz à novas abordagens terapêuticas, além de elucidar mecanismos celulares e moleculares. Com isso, neste trabalho, investigamos vários aspectos do perfil mitocondrial frente à infecção pelo ZIKV em astrócitos primários humanos e murinos. De maneira análoga, utilizando o modelo de Hamster Sírio, investigamos também se SARS-CoV-2 poderia infectar astrócitos e causar alterações significativas quanto ao metabolismo celular além de induzir processos inflamatórios no SNC in vitro e in vivo. Como esperado, observamos que a infecção por esses vírus foi capaz de alterar significativamente funções mitocondriais, impactando de forma relevante no funcionamento dos astrócitos. Ainda, demonstramos a dependência do substrato glutamina para replicação e subsequente indução de efeitos deletérios em astrócitos primários durante a infecção pelo SARS-CoV-2, evidenciando possíveis mecanismos e consequências da sequela pós COVID-19.

Palavras-chave: ZIKV. SARS-CoV-2. Astrócitos. Mitocôndria.

## ABSTRACT

ANGELO, Y. S. Impactos da infecção por ZIKV e SARS-CoV-2 no funcionamento mitocondrial de astrócitos primários. 2020. 125p. Dissertação de Mestrado em Imunologia – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo (2022)

Humanity, unfortunately, has always been plagued by pandemics. The Black Death, Spanish Flu, Tuberculosis, Polio, and recently, the Zika virus and SARS-CoV-2 pandemics. If there is one thing we have learned from, it is that maintaining scientific knowledge is crucial in mitigating and controlling the damage they cause. In this work, we focus on the last two pandemics, including the still ongoing SARS-CoV-2 one. In Brazil, during the years 2015 -2016, there was a large increase in the number of newborns with microcephaly, later characterized as Congenital Zika Syndrome (CZS), as well as adults with Guillain-Barré Syndrome. SARS-CoV-2, a virus that emerged in late 2019 and causes COVID-19, has spread rapidly across the globe, causing more than 500 million deaths to date and devastating economics and social impacts. Much is still unknown about its pathogenic mechanisms and its interaction with the host organism, especially regarding its tropism and ability to affect the SNC. Astrocytes, one of the most abundant cell populations in the central nervous system (SNC), perform a myriad of functions, mainly regarding neuronal maintenance and metabolic support, but also in the local immune response. Since most of your functions have a metabolic basis, it is essential that your mitochondria are healthy and fully functioning. Interestingly, in recent years mitochondria have been recognized not only as solely metabolic organelles, but also as critical players in different cellular processes, including the innate immune response. In this way, considering the ability of several viruses to hijack metabolic pathways to facilitate their replication, the understanding of how ZIKV and SARS-CoV-2 infection impact astrocytic mitochondrial functions may shed light on new therapeutic approaches, in addition to elucidating mechanisms. cellular and molecular. Therefore, in this work, we investigated several aspects of the mitochondrial activity against ZIKV infection in human and murine primary astrocytes. Similarly, using the Syrian Hamster model, we also investigated whether SARS-CoV-2 could infect astrocytes and cause significant changes in cellular metabolism, in addition to inducing inflammatory processes in the SNC in vitro and in vivo. As expected, we observed that infection by these viruses was able to significantly alter mitochondrial functions, significantly impacting the functioning of astrocytes. Furthermore, we demonstrate the dependence of the glutamine substrate for replication and subsequent induction of deleterious effects in primary astrocytes during SARS-CoV-2 infection, highlighting possible mechanisms and consequences of post-COVID-19 sequelae.

Keywords: ZIKV. SARS-CoV-2. Astrocytes. Mitochondria.

# LISTA DE FIGURAS

# Capítulo I

Figura 1. A Dinâmica Mitocondrial
Figura 2. A sinalização inata e a mitocondria
Figura 3. Caracterização da cultura primária de astrócitos
Figura 4. Caracterização da infecção por ZIKV em diferentes culturas de astrócitos primários
Figura 5. Dados de RNAseq humanos revelam alterações mitocondriais causadas pela infecção por ZIKV
Figura 6. A infecção por ZIKV leva a despolarização e a produção de EROS mitocondrial
Figura 7. A infecção pelo ZIKV causa alterações morfológicas mitocondriais divergentes em diferentes modelos astrocitários
Figura 8. A infecção por ZIKV leva a expressão diferencial de genes relacionados a dinâmica mitocondrial
Figura 9. A infecção por ZIKV impacta na respiração mitocondrial assim como no metabolismo glicolítico de astrócitos primários humanos
Figura 10. Panorama das alterações mitocondriais induzidas pela infecção por ZIKV 59
Figura 11. A resposta antiviral inata frente ao vírus depende de vias metabólicas relacionadas à função mitocondrial
Figura 12. Uso de ferramentas de biologia molecular para o estudo da interação ZIKV- mitocôndria
Figura 13. A infecção pelo ZIKV em astrócitos primários apresenta relação bilateral com a atividade mitocondrial
Capítulo II
Figura 1. SARS-CoV-2 infects and replicates in astrocyte cultures
Figura 2. SARS-CoV-2 induces pro-inflammatory cytokines, interferon stimulated genes expression and protein alterations in hamsters' primary astrocytes
Figura 3. SARS-CoV-2 infection alters mitochondrial morphology, reactive oxygen species production and cellular bioenergetics of hamsters's astrocytes cultures
Figura 4. SARS-CoV-2 impacts hamsters' astrocytes metabolic pathways 108
Figura 5. Blockade of glutaminolysis reduces SARS-CoV-2 replication and pro- inflammatory gene expression

Figura 6. SARS-CoV-2 infects Syrian hamsters' brains in vivo and elicit of	changes
comparable to the human disease	113
Figura 7. SARS-CoV-2 impacts metabolic and protein profile of brain and primary	y mixed
glial cells from Syrian hamsters: a glimpse for SARS-CoV-2 induced neuro	ological
disorders	117

# LISTA DE TABELAS

# Capítulo I

Tabela 1. Drogas e Inibidores	37
Tabela 2. Lista de sondas utilizadas nos ensaios citométricos	38
Tabela 3. Lista de Primers	40
Tabela 4. Cálculos do ensaio de estresse mitocondrial e glicolítico	43
Tabela 5. Descritores do plugin MiNA	52
Capítulo II	
Tabela 1. Primers table	95

# LISTA DE ABREVIAÇÕES

|--|

2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol	TRIS
2-deoxy-D-Glucose-6-phosphate	2-DG
2,2',2",2"'-(Ethane-1,2 diyldinitrilo)tetraacetic acid	EDTA
4-aminobutanoic acid	GABA
4',6'-diamidino-2-phenylindole	DAPI
6-diazo-5-oxo-L-nor-Leucine	DON
7-Aminoactinomycin D	7-AAD
Acetonitrile	ACN
Acetonitrile	CAN
Alvo da rapamicina em mamíferos	mTOR
Ammonium Hydroxide	NH4OH
Ammoniun acetate	NH4CHOO
Amyotrophic Lateral Sclerosis	ALS
Analise de Variância	ANOVA
Angiotensin Converting Enzyme-	ACE-2
Canal dependente de voltagem	VDAC
Capsídeo	С
Carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona	FCCP
carnitine palmitoyltransferase 1a	CPT-1a
Célula prercursora neuronal	NPC
Células da glia radial	CGR
Charge	Z
Chloroform	HCC1
Ciclo do ácido cítrico (Tricarboxílico)	ETC
Complementary Desoxy-Ribonucleic Acid	cDNA
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
Cycle Threshold	Ct
Cycle threshold	Ct
Cyclic GMP-AMP Synthase	cGAS
Cytomegalovirus	CMV
Danger Associated Molecular Pattern	DAMP
Data-independent acquisition	DIA
Days post infection	dpi
Days post partum	dpp

Desoxy-Ribonucleic Acid	DNA
Desvio padrão	DP
Differential expressed gene	DEG
Differentially expressed protein	DEP
DNA dupla fita	dsDNA
Dorso-lateral prefrontal cortex	DLPFC
Dulbecco Modified Eagle Medium	DMEM
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM
Encefalite autoimune experimental	EAE
Envelope	Е
Espaço intermembranar	EI
Espécies reativas de oxigênio	EROS
Etomoxir	ETO
Exact Mass Retention Time	EMRT
False Discovery Rate	FDR
False Discovery Rate	FDR
Fast Adaptative and Secure	FASP
Fetal Bovine Serum	FBS
Gene Onthology	GO
Hank's Balanced Salt Solution	HBSS
Herpes Simplex Virus	HSV
Hours post infection	hpi
Human Immunodeficiency Virus	HIV
Huntington Disease	HD
Hydrophobic Interaction Liquid Chromatography	HILIC
Institute of Biomedical Sciences	ICB
Instituto de Ciências Biomédicas	ICB
Interferon	IFN
Interferon	IFN
Interferon-Stimulated Gene	ISG
Interleukin	IL
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	KEGG
Liquid Chromatography	LC
Magnetic resonance imaging	MRI
Mass	М
Mass Spectrometry	MS
Median Tissue Culture Infectious Dose	TCID50
Melanoma differentiation-associated protein 5	MDA-5

Membrana externa	ME
Membrana externa mitocondrial	MEM
Membrana interna	MI
Membrana interna mitocondrial	MIM
Membrane	М
Methanol	MeOH
Mitochondrial Glutaminase	GLS
Mitocohndrial Antiviral-Signalling	MAVS
Mitocondrial	mt
Multiplicidade da infecção	MOI
Multiplicity of Infection	MOI
N-acetil cisteína	NAC
Nod-Like Receptor Pirimidine 3	NLRP3
Non-essential amino acids	NEAA
Nucleocapsid	Ν
Olfactory Sensory Neurons	OSN
Open Reading Frame	ORF
Paraformaldehyde	PFA
Paraformaldeído	PFA
Phosphate Saline Buffer	PBS
Plaque Forming Units	PFU
Polietilenoglicol	PEG
Post-Acute Sequelae of COVID-19	PASC
Pré-membrana	PrM
Principal Component	PC
Principal Component Analysis	PCA
Programmed Cell Death protein 1	PD-1
Proteína não estrutural	NSP
Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction	RT-qPCR
Região não codificante	NCR
Retículo endoplasmático	RE
Retinoic Acid-Inducible Gene I	RIG-I
Ribonucleic Acid	RNA
RNA dupla fita	dsRNA
RNA fita simples	ssRNA
Rotenona	ROT
Scientific Platform Pasteur-USP	SPPU
Selvagem	WT

Severe acute respiratory syndrome	SARS
Short hairpin RNA	shRNA
Síndrome congênita do Zika	SCZ
Single nuclei RNA sequencing	snRNA-seq
Sistema nervosa central	SNC
Soro Fetal Bovino	SFB
Spike	S
Spondweni vírus	SPOV
Stimulator of Interferon Genes	STING
Sub-genomic RNA	sgRNA
T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3	TIM-3
Tampão Fosfato Salina	PBS
Taxa de acidificação extracelular	ECAR
Taxa de consumo de oxigênio	OCR
Toll Like Receptor	TLR
Transmembrane Protease Serine 2	TMPRSS2
Transmission Electron Microscopy	TEM
Transporte de elétrons reverso	RET
Tricarboxylic Acid Cycle	TCA
Tumor Necrosis Factor alpha	TNF-a
Ultra-Performance Liquid Chromatography	UPLC
Unfolded Protein Response	UPR
Uniform Manifold Approximation and Projection	UMAP
Universidade de São Paulo	USP
Vesicular Glutamate Transporters	vGLUT
Vírus da Dengue	DENV
Vírus da Febre Amarela	YFV
Vírus do oeste do Nilo	WNV
Water	H2O
World Health Organization	WHO
Zika virus	ZIKV

# SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I - A INFECÇÃO POR ZIKV CAUSA DISFUNÇÃO	
MITOCONDRIAL EM ASTRÓCITOS PRIMÁRIOS	. 22
1.1 INTRODUÇÃO	. 22
1.1.1 Aspectos principais da infecção do vírus ZIKV	. 22
1.1.2 Astrócitos e a infecção por ZIKV	. 23
1.1.3 A mitocôndria como <i>link</i> na sinalização da imunidade inata	. 26
1.1.4 Modelos murinos no estudo da infecção pelo ZIKV	. 30
1.2. OBJETIVOS	. 33
1.2.1 Objetivos específicos	. 33
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS	. 34
1.3.1 Animais	. 34
1.3.2 Obtenção de astrócitos primários	. 34
1.3.3 Obtenção e manutenção do ZIKV	. 35
1.3.4 Titulação viral por ensaio de formação de placa (PFU)	. 36
1.3.5 Tratamento com inibidores e infecção in vitro	. 36
1.3.6 Análises de citometria de fluxo	. 37
1.3.7 Análises de microscopia de fluorescência	. 38
1.3.8 Extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR	. 39
1.3.13 Análises estatísticas e bioinformáticas	. 44
1.4. RESULTADOS	. 46
1.4.1 Caracterização da infecção por ZIKV em culturas primárias de astrócitos	. 46
1.4.2 A infecção por ZIKV induz alterações mitocondriais	. 48
1.4.2.1 Caracterização de alterações mitocondriais induzidos pelo ZIKV evidenciadas em dados de sequenciamento humano	s . 48
1.4.2.2 A infecção por ZIKV leva à perda da polarização mitocondrial e produção de	
ROSmt	. 49
1.4.2.3 A infecção por ZIKV causa alterações na morfologia mitocondrial	. 52
1.4.2.4 ZIKV causa alterações na respiração mitocondrial e na glicólise	56
1.4.2.5 Panorama das alterações mitocondriais causadas pelo ZIKV em diferentes modelos astrocitários	. 58
1.4.3 O status mitocondrial impacta na resposta imune frente à infecção por ZIKV	. 60
1.4.4 Instrumentalização para o estudo molecular da relação ZIKV-mitocôndria	. 62
1.5. DISCUSSÃO	. 63
1.6. CONCLUSÕES	. 73
1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	. 74

2.1 CAPÍTULO II - SARS-COV-2 INFECTION IMPACTS CARBON METABOLISM AND DEPENDS ON GLUTAMINE FOR REPLICATION IN SYRIAN HAMSTER	1
ASTROCYTES	b 0
2.2 ABSTRACT	8
2.3 INTRODUCTION	8
2.4 MATERIALS AND METHODS	1
2.4.1 Virus isolation and propagation	1
2.4.2 Primary astrocytes cultures of Golden Syrian Hamsters (Mesocricetus auratus). 92	2
2.4.3 <i>In vitro</i> infection with SARS-CoV-2	2
2.4.4 <i>In vivo</i> Infection of Golden Syrian Hamsters with SARS-CoV-2	3
2.4.5 Drugs and Inhibitors	4
2.4.6 Cytotoxicity assay	4
2.4.7 Plaque-forming unit assay	4
2.4.8 RNA extraction, viral load, and gene expression analysis	4
2.4.9 Proteomics	6
2.4.9.1 LC-MS/MS Analysis	6
2.4.9.2 Metabolomics of Hamsters astrocytes	7
2.4.10 Real-time metabolic assays	8
2.4.11 Electron microscopy	8
2.4.12 Mitochondrial analysis	8
2.4.13 Immunofluorescence	9
2.4.14 Hamster brain slice culture and SARS-CoV-2 infection	9
2.4.15 Single Nuclei Transcriptomic Profile Analysis	0
2.4.16 Statistical analysis	1
2.5 RESULTS	1
2.5.1 SARS-CoV-2 infects Syrian hamsters' astrocytes 10	1
2.5.2 SARS-CoV-2 astrocyte infection induces pro-inflammatory cytokines, interferon- stimulated genes and changes the expression of carbon metabolism related proteins <i>in</i> <i>vitro</i>	3
2.5.3 SARS-CoV-2 induces metabolic changes in astrocytes in vitro	5
2.5.4 SARS-CoV-2 changes the metabolic profile of hamsters' primary astrocytes 10	7
2.5.5 SARS-CoV-2 replication in astrocytes is dependent on glutamine	9
2.5.6 SARS-CoV-2 RNA is detected in the cortex, hippocampus, and olfactory bulb of	
hamsters <i>in vivo</i>	1
2.6 DISCUSSION	4
2.7 CONCLUSIONS	7

2.8 REFERENCES	. 118
2.9 FUNDING SUPPORT	. 121
2.10 ACKNOWLEDGEMENTS	. 121
2.11 AUTHOR'S CONTRIBUTION	. 122
3. REALIZAÇÕES NO PERÍODO (2020-22)	. 123
3.1 Publicações e submissões de artigos científicos em jornais indexados	. 123

# 1. CAPÍTULO I - A INFECÇÃO POR ZIKV CAUSA DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL EM ASTRÓCITOS PRIMÁRIOS.

# 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 Aspectos principais da infecção do vírus ZIKV

O Zika vírus (ZIKV) é um membro pertencente à família *Flaviviridae* (BAUD et al., 2017), o qual foi primeiramente isolado em 1947 a partir do soro de macacos *rhesus* sentinelas nas proximidades da floresta de Zika em Uganda, África (FAYE et al., 2014). Em 1969, o ZIKV foi também isolado de outras espécies de mosquitos, como o *Aedes albopictus* e, o mais importante, *Aedes aegypti* (BG, 1977). Como mencionado, o ZIKV está presente dentro do gênero dos Flavivírus, o qual abriga outros vírus de importância clínica, como o Dengue vírus (DENV), Febre Amarela (YFV), vírus do oeste do Nilo (WNV), Spondweni vírus (SPOV), entre outros. O ZIKV contém um genoma de RNA de fita simples senso positivo com duas regiões flanqueadas não codificantes (5' NCR e 3'NCR). Seu quadro de leitura transcreve para uma poli proteína composta por três proteínas estruturais; capsídeo (C), envelope (E) e pré-membrana (PrM); e sete proteínas não estruturais; NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (GAO et al., 2002; WHO, 2016). Tais proteínas exibem uma diversa gama de funções que contribuem para a patogênese viral variando desde a montagem de partículas virais, replicação de seu RNA, até a inibição de respostas imunes (KHALID et al., 2017).

Apesar de ser transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, o vírus se mostrou presente em fluidos corporais, como lágrimas, saliva, além de permanecer viável no sêmen, podendo ser transmitido por via sexual (HAMEL et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018). Desde seu descobrimento, ocorrências isoladas de infecções por ZIKV principalmente em países tropicais e subtropicais causaram pouco alarde, provavelmente pelo caráter subclínico e autolimitado da infecção em adultos, com sintomas brandos como conjuntivite e erupções cutâneas, mesmo apesar dos grandes surtos em 2003 na Ilha Yap na Micronésie e em 2007 na Polinésia Francesa, com mais de 38000 casos (AUBRY et al., 2017; HADDOW et al., 2012; KOOL et al., 2009; NUGENT et al., 2017). Mais tarde no Brasil, o ZIKV ganhou notoriedade no primeiro semestre de 2015, quando houve um grande aumento do número de casos de ZIKV na América Central e do Sul, sendo o nordeste do Brasil a região mais afetada (CARMO et al., 2018). Em relação aos aspectos clínicos da infecção pelo ZIKV em adultos, apenas

20% dos casos se apresentam com sintomas, sendo os mais comuns a presença de febre baixa (72%), artralgia e mialgia (65%), conjuntivite (63%) e *rashs* cutâneos em menor incidência (PIERSON; DIAMOND, 2018). Apesar da baixa letalidade, já foram confirmados casos de morte pela infecção do ZIKV em pacientes imunossuprimidos e associações com falência múltipla de órgãos e meningite (S et al., 2016). Em fevereiro de 2016 a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou estado de emergência global juntamente com o aumento no número de casos de grávidas infectadas apresentando recém-nascidos com complicações neurológicas, como microcefalia associada ou nãoà artogripose, além do aumento de casos da síndrome de Guillain-Barré em adultos (MAIA et al., 2016).

Dentre os achados clínicos da infecção pelo vírus em neonatos, destaca-se a Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ), a qual pode causar restrição de crescimento intrauterino (IUGR), lesões corticais, retinais e outros sintomas, dados que foram comprovados por estudos realizados em nosso, e outros laboratórios (CUGOLA et al., 2016; LI et al., 2016; MINER et al., 2016). De maneira interessante, a relação causal entre o ZIKV e a microcefalia foi evidenciada simultaneamente em diferentes modelos murinos (camundongos SJL e Ifnar<sup>-/-</sup>), os quais permanecem os principais modelos de estudo para a SCZ até o momento. Ainda, existem inúmeros dados na literatura acerca dos mecanismos pelos quais o vírus consegue causar a SCZ. Há um consenso em que a principal causa da patogenicidade do vírus é seu alto tropismo pelas células do CNS principalmente durante estágios menos diferenciados do desenvolvimento. A infecção das NPCs (do inglês, Neural progenitor cells) tem um impacto gigantesco no desenvolvimento, uma vez que o vírus juntamente com a resposta imune do hospedeiro, levam a altos níveis de morte celular e, com isso, os impactos evidenciados na SCZ. Além das NPCs, pesquisas também evidenciaram diferentes graus de tropismo para subpopulações gliais, sendo os astrócitos as células que apresentam o maior grau de infecção e que, curiosamente, também apresentam uma maior tolerância à infecção muito provavelmente devido aos mecanismos intrínsecos dessa população celular que ainda permanecem inexplorados (JORGAČEVSKI et al., 2019).

## 1.1.2 Astrócitos e a infecção por ZIKV

Os astrócitos fazem parte das células da glia e executam inúmeras funções fundamentais para o funcionamento do cérebro como manutenção da homeostase do pH,

fornecimento de substratos energéticos para neurônios, armazenamento de energia na forma de glicogênio, reparo tecidual, modulação da atividade sináptica, remoção de resíduos de neurotransmissores e outros metabólitos, além de serem uma das populações mais abundantes da glia, ultrapassando até mesmo a quantidade de neurônios em humanos (DOSSI; VASILE; ROUACH, 2018; PELVIG et al., 2008). A fim de executar os processos descritos, as astrócitos possuem uma alta atividade relacionada ao metabolismo energético, expressando altos níveis de enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA, do inglês tricarboxylic acid cycle), exibindo assim em linhas gerais, uma alta capacidade oxidativa (BITTNER, 2010; BOUZIER-SORE; PELLERIN, 2013). Todavia, aqui é importante frisar que a alta atividade metabólica mitocondrial não pode ser resumida na simples presença do elevado nível de enzimas participantes de tal processo. Estudos já indicam que em determinadas situações, a elevada expressão de componentes do TCA pode levar a sua quebra, induzindo a então chamada corrente de transporte reverso (RET, do inglês reverse electron transport) na cadeia transportadora de elétrons (ETC, do inglês Electron Transport Chain) (MARTÍNEZ-REYES; CHANDEL, 2020).

Fisiologicamente, o cérebro é o responsável por grande parte do consumo energético do corpo, chegando a consumir cerca de 20% de todo oxigênio e 25% da glicose disponível (SCHILDGE et al., 2013; VASILE; DOSSI; ROUACH, 2017). Devido essa alta demanda, as células presentes no SNC necessitam ser versáteis em sua capacidade de metabolizar também outros substratos energéticos, como o lactato, corpos cetônicos e glutamato (GLU) (BOUZIER-SORE; PELLERIN, 2013). Embora as células cerebrais no geral apresentem essa flexibilidade, cada uma possui suas peculiaridades, apresentando perfis metabólicos distintos em diferentes situações fisiológicas ou patológicas (HERTZ; PENG; DIENEL, 2007; STOBART; ANDERSON, 2013). Nesse sentido, é importante mencionar o papel crítico exercido pelos astrócitos no metabolismo neuronal, fundamentando e possibilitando a diversidade das vias metabólicas em cada uma dessas células (STOBART; ANDERSON, 2013).

O metabolismo e limpeza de neurotransmissores no microambiente é um grande exemplo da função astrocitária facilitada por sua alta capacidade metabólica (BOUZIER-SORE; PELLERIN, 2013; MURUGAN; LING; KAUR, 2013). Nesse contexto, a alta expressão de transportadores de GLU e de glutamina sintase em astrócitos, demonstram a importância dessas células na regulação das sinapses e no controle de excitabilidade neuronal (DZAMBA; HONSA; ANDEROVA, 2013). Em situações em que há um aumento das concentrações de GLU, por exemplo, há um aumento na atividade da via glicolítica devido ao consumo de NADPH induzido pelo aminoácido, o qual precisa ser regenerado pelo TCA. Esses processos são caracterizados pela mudança morfológica e fenotípica dos astrócitos, por exemplo com o aumento da expressão de GFAP (do inglês, *Glial Fibrilary Acidic Protein*), o que caracteriza sua ativação, além do aumento da expressão de genes que levam ao retorno da homeostase oxidativa, como FOXO e SOD2 (DONG; WANG; QIN, 2009; WANG; QIN, 2010).

Em situações inflamatórias ou de estresse, há uma predominância da glicólise anaeróbica para a subsequente produção de lactato (do inglês, *lactate shuttle*), mesmo na ausência de hipóxia (efeito de Warburg) (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011), a fim de prevenir a depleção de ATP neuronal e sua subsequente morte (BOUZIER-SORE; PELLERIN, 2013). Ainda, é importante frisar que os mecanismos descritos acerca do metabolismo e bioenergética celular representam recortes de situações e tipos celulares específicos. Assim, a dependência desses estados e sua ativação é amplamente determinada pelo seu contexto tempo e espacial, fazendo com que não possamos ser totalmente categóricos em determinar estados metabólicos. Porém, baseado em um grande corpo de evidência, os astrócitos são células que apresentam uma alta robustez metabólica, podendo tolerar altos níveis de estresse respiratório e metabólico, como evidenciado em modelos de isquemia e reperfusão (STOBART; ANDERSON, 2013).

Em casos de ativação astrocitária exacerbada, há um aumento significativo de morte celular, principalmente pelo desbalanço de íons previamente controlados pelos neurotransmissores (DONG; KALUEFF; SONG, 2017). Nesses casos, o Ca<sup>2+</sup> é o principal mediador da morte celular, sendo que o mesmo em alta concentração no citoplasma, pode lesar a membrana externa mitocondrial e levar extravasamento de diversos fatores pró-apoptóticos, como citocromo C por meio dos poros BAX/BAK (MALHOTRA; KAUFMAN, 2011; WANG; YOULE, 2009). Fica assim evidente a relação complexa entre glia e neurônio, sendo componente de suma importância para divisões e diferenciações celulares que ocorrem durante o desenvolvimento do CNS. Dessa maneira, distúrbios como a própria infecção pelo ZIKV, impactam diretamente nos processos de diferenciação e o estabelecimento (ALFANO et al., 2019).

É valido notar também que durante a infecção por ZIKV, os astrócitos são uma das primeiras populações celulares a serem infectadas, principalmente devido sua localização perivascular (STEFANIK et al., 2018). Além de iniciar a resposta imune local, gerando uma rápida produção de mediadores da imunidade inata como o IL-6, 8, 12 e quimiocinas como RANTES e CCL5 (POTOKAR; JORGAČEVSKI; ZOREC, 2019; VAN DEN POL et al., 2017). Além da intensa ativação da resposta imune, existe a ação direta dos componentes virais sobre suas vias intracelulares, como a interação entre proteínas não estruturais NS4a/b com o complexo mTOR (do inglês, *Mammalian Target of Rapamycin*) (LIANG et al., 2016) e a extensa ativação da UPR (do inglês, *Unfolded Protein Response*) levando à autofagia (CHIRAMEL; BEST, 2018a). Esses são alguns exemplos que evidenciam a importância desta população celular durante a infecção pelo vírus.

## 1.1.3 A mitocôndria como link na sinalização da imunidade inata

Com as características funcionais e moleculares dos astrócitos descritas anteriormente, podemos vislumbrar o peso dos processos metabólicos exercidos em processos de saúde e doença. Podemos assim inferir a importância crucial das mitocôndrias, conhecidas por muito tempo como *hubs* centrais para o metabolismo e bioenergética celular as quais fazem delas, um dos focos principais deste trabalho.

Foi somente nos últimos anos que as funções mitocondriais em situações além da respiração celular passaram a ser melhor apreciadas, apesar de ainda existirem inúmeras questões acerca de suas funções extra energéticas (MCBRIDE; NEUSPIEL; WASIAK, 2006). As mitocôndrias são organelas multifuncionais formadas por uma membrana externa (ME) e uma interna (MI) e entre elas, um espaço intermembranar (EI)(TILOKANI et al., 2018a). A MI se apresenta em uma conformação alongada denominada crista, a qual favorece a fixação e o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons. É importante notar que a integridade de ME e o subsequente gradiente de elétrons é mantido principalmente em estados fisiológicos (KAMER; MOOTHA, 2015; MALHOTRA; KAUFMAN, 2011; WANG; YOULE, 2009). Perturbações celulares como a exposição a radicais de oxigênio (ERO) ou infecções virais podem levar ao aumento da permeabilidade da ME mitocondrial e causar o extravasamento do conteúdo do EI para o citosol, em especial moléculas como citocromo C e até mesmo o próprio

material genético mitocondrial que atuam como sinais iniciadores da resposta imune (WANG; YOULE, 2009).

Em relação à sua estrutura, as mitocôndrias apresentam estados morfológicos diferentes quanto ao estado metabólico celular (Fig.1). É sabido que estados de privação nutricional indicados pela baixa ativação do Mammalian Target of Rapamicyn (mTOR), por exemplo, induzem o processo de fusão mitocondrial mediado principalmente pelas proteínas Optic Atrophy Type 1 (OPA1) e Mitofusin (MFN) 1/2, a fim de maximizarem o uso dos substratos disponíveis pela célula, compensando assim, a demanda energética além da promoverem a "diluição" de possíveis danos no mtDNA que podem levar a processos apoptóticos (RAMBOLD; PEARCE, 2018). De maneira antagônica, em situações de alta disponibilidade nutricional e alta ativação glicolítica, as mitocôndrias sofrem o processo de fissão mediado pela proteína Dynamin Related Protein 1 (DRP1), a qual induz a ação da Dynamin-2 (DNM2) para a constrição e subsequente fissão da membrana (KRAUS; RYAN, 2017). Estudos indicam que a fragmentação mitocondrial facilita processos reguladores de metabolismo, como em linfócitos ativados, nos quais a fragmentação mitocondrial favorece o influxo de Ca2+ mantendo por mais tempo os canais CRAC/ORAI abertos e consequentemente a efetiva transcrição de genes regulados pelo fator de transcrição NF-AT (BREDA et al., 2019; RAMBOLD; PEARCE, 2018). De maneira similar, a interação física com o retículo endoplasmático garante a homeostase do Ca<sup>2+</sup> celular, o qual garante a integridade da ME e a permanência dos fatores pró-apoptóticos dentro do EI (ELMORE, 2007). Com isso, as mitocôndrias se tornam ótimas ferramentas indicadoras do metabolismo global celular, principalmente de astrócitos.

Durante infecções por vírus como o DENV, a modulação direta do metabolismo celular é parte imprescindível para a replicação viral (ZHANG; RONG; LI, 2019). Essa modulação pode afetar diretamente o potencial da membrana mitocondrial, levando a fissão e fragmentação desta organela. Nestes casos, a autofagia seletiva das mitocôndrias é mediada por receptores PTEN Induced Kinase 1 (PINK1), os quais podem recrutar Parkin (PRKN) para a mobilização de moléculas que marcam a organela para degradação lisossomal, como Optineurin (OPTN) e NDP52, em um processo denominado mitofagia (MENG et al., 2014; ZHANG; QIN; CHEN, 2018). O processo de mitofagia é particularmente útil pois inibe o acúmulo de mitocôndrias disfuncionais, garantindo a

sobrevivência celular e controlando a sinalização inata aos componentes mitocondriais (HARRIS et al., 2018).



**Figura 1. A Dinâmica mitocondrial**. A imagem descreve visualmente como a morfologia mitocondrial está correlacionada com o estado fisiológico celular, assim como as proteínas envolvidas nos diferentes processos. Fonte: Adaptado de Zemirli *et. Al.* 2018.

Em situações de estresse mitocondrial, como em infecções virais onde há perda da integridade da ME, a mitocôndria pode gerar DAMPs (do inglês, *Danger Associated Molecular Patterns*) para a ativação do sistema imune inato. Como exemplo o DNA mitocondrial (mtDNA) liberado após morte celular pode servir como DAMP ao interagir com receptores TLR9, ativando a sinalização inata (CHEN; SUN; CHEN, 2016). (BREDA et al., 2019) (**Fig. 2**).

O adaptador estimulador de genes de interferon, STING (do inglês, *stimulator of interferon genes*), tem funções conhecidas na imunidade à patógenos intracelulares devido sua capacidade de reconhecer primariamente dsDNA citosólico. A sinalização do STING depende da enzima cGAS (do inglês, *cyclic GMP-AMP synthase*), a qual catalisa a produção de cGAMP (do inglês, *cyclic GMP-AMP*) na presença de dsDNA, funcionando como um segundo mensageiro para a ativação do STING e a subsequente expressão mediada pelos fatores de transcrição IRF3 e NF $\kappa$ B (MAEKAWA et al., 2019; MOTWANI; PESIRIDIS; FITZGERALD, 2019a). Nesse contexto, fatores estressores podem levar às disfunções nas membranas internas e externas das mitocôndrias,

aumentando o escape de DNA mitocondrial (mtDNA) para o citosol via canais dependentes de voltagem (VDAC) e poros BAX/BAK pró-apoptóticos (KIM et al., 2019; LEPELLEY; WAI; CROW, 2021). A presença do mtDNA no citosol facilita a interação com Cyclic GMP-AMP Synthase (cGAS), mediada principalmente pelo Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM). Interessantemente, por mais que o STING interaja primariamente com dsDNA citosólico, já foi demonstrada sua importância no controle de infecções por vírus de RNA como o JEV, WNV e DENV (COYNE, 2018; WUERTZ et al., 2019), indicando a importância de sua sinalização *downstream* frente a possíveis danos mitocondriais, assim como possíveis mecanismos de evasão da resposta imune induzida pela via do cGAS por estes vírus. De fato, tanto o ZIKV quanto o DENV, ambos vírus de ssRNA, têm como função de suas proteínas não estruturais a degradação de cGAS, devido à elevação do material genético mitocondrial, consequência do estresse induzido pela infecção (AGUIRRE et al., 2017; ZHENG et al., 2018).

Existem também nas mitocôndrias a presença de componentes downstream à sinalização de PAMPs intracelulares. Em sua ME, as proteínas Mitochondrial Antiviral Signaling (MAVS) estão envolvidas na ativação do inflamassoma NLR Family Pyrin Domain Containing 3 (NLRP3) e funcionando como adaptadores downstream de sensores de ssRNA citosólicos como Retinoic Acid-Inducible Gene I (RIG-I) e o Melanoma Differentiation-Associated Protein 5 (MDA5), indicando um papel crítico da mitocôndria na sinalização da resposta imune antiviral (REIKINE; NGUYEN; MODIS, 2014). Os sensores RIG-I e MDA5 detectam cópias de RNA viral não processados (metilação por cap1 e 2) presentes no citosol. Após a ativação dos acima mencionados receptores, seus domínios N-terminais de recrutamento de caspase (CARD) interagem com as MAVS e, assim, dar continuidade à sinalização, promovendo a translocação de fatores de transcrição como Interferon Regulatory Factor (IRF) 7, IRF3 e Signal Transducer and Activator of Translation (STAT) 1, levando à expressão de ISGs, além do próprio IFN-α e β. A sinalização via MAVS por RIG-I também pode levar à ativação do NF-κB pelas quinases TRADD e TRAF6, consolidando a importância da mitocôndria na resposta imune aos patógenos (REIKINE; NGUYEN; MODIS, 2014; ZHANG; QIN; CHEN, 2018).

Ainda no contexto de infecções virais, estudos já demonstraram a capacidade de diversos vírus em modular a capacidade funcional mitocondrial diretamente, como o DENV, HCV (ZHANG; RONG; LI, 2019) e Influenza A (MCNAB et al., 2015) e

indiretamente pela influência de citocinas oriundas da resposta aos IFNs e alterações mitocondriais. Como exemplo, a ativação das vias EIF2 $\alpha$  e JNK pela desencadeamento da UPR, levam à transcrição de diversos genes relacionados aos fatores AP-1 e NF- $\kappa$ B, modulando o estado metabólico celular e induzindo o alongamento mitocondrial a favor da replicação, como demonstrado em estudos utilizando o DENV (BARBIER et al., 2017; CHATEL-CHAIX et al., 2016; FONTAINE et al., 2015). Contudo, a maioria dos estudos aqui mencionados foram conduzidos em linhagens celulares transformadas, se fazendo necessário o estudo das interações mitocôndria-sistema imune em contextos mais próximos aos evidenciados em humanos.





### 1.1.4 Modelos murinos no estudo da infecção pelo ZIKV

O uso de modelos animais para o estudo de ZIKV é extremamente recente (LAZEAR et al., 2016). De maneira não surpreendente, diferenças significativas entre a infecção do ZIKV em modelos humanos e de outros animais se constituem como uma grande barreira na compreensão plena da patogênese viral e de diversas outras doenças (JULANDER; SIDDHARTHAN, 2017). De fato, 90% das drogas testadas em animais

falham em pesquisas translacionais envolvendo humanos (HAY et al., 2014). Embora muito do conhecimento adquirido da biologia viral tenha sido obtido de modelos murinos, estudos iniciais já demonstravam a baixa capacidade infectiva do ZIKV em camundongos *wild-type* (WT) C57BL/6 e BALB/c, principalmente relacionados à especificidade do ZIKV em antagonizar a resposta de IFN do tipo I humana, promovendo a degradação do fator de transcrição STAT2 (CHAN et al., 2016; GORMAN et al., 2018; JULANDER; SIDDHARTHAN, 2017). Desta maneira, diversos modelos deficientes na resposta de IFN foram desenvolvidos, como os animais transgênicos hSTAT2 (GORMAN et al., 2018) ou os animais deficientes para os receptores de IFNs tipo I (Ifnar<sup>-/-</sup>) (LAZEAR et al., 2016), os quais apresentavam perfis mais graves de doença, normalmente de maneira inversamente proporcional a sua idade, se assemelhando à infecção humana. Animais SJL são amplamente utilizados em modelos de encefalite autoimune experimental (EAE), não são imunocomprometidos *per se*, além de apresentarem uma fisiopatogenia frente ao ZIKV similar à humana (CUGOLA et al., 2016). Nesse sentido, camundongos SJL são modelos interessantes para o estudo principalmente da SCZ.

Todavia, em termos de neurodesenvolvimento, que são críticos para o entendimento da SCZ, camundongos e humanos apresentam diferenças significativas. Como exemplo, células da glia radial (CGR) importantes na geração de progenitores de diversas populações do CNS, apresentam cinética de migração e ciclo celular diferenciados (MARSHALL; MASON, 2019). Em suma, as diferenças relacionadas ao desenvolvimento são amplamente evidenciadas quando a maturidade astrocitária, subpopulações regionais, e perfis de expressão gênica humana são comparadas com camundongos (LAMONICA et al., 2012; ZHAO; BHATTACHARYYA, 2018).

Astrócitos humanos atingem a maturidade (determinada por expressão gênica e morfologia) por volta de 1 ano de idade, em comparação aos astrócitos de camundongos, que atingem a mesma maturidade por volta de 1 mês de vida (BUSHONG; MARTONE; ELLISMAN, 2004). Ainda, estudos já demonstraram diferenças críticas quanto a expressão e atividade astrocitária murina e humana principalmente frente aos distúrbios metabólicos e inflamatórios (LI et al., 2021b). Neste sentido, também já foi demonstrada uma menor capacidade de astrócitos humanos em lidarem com o estresse oxidativo, além de diferenças entre a respiração e utilização de substratos energéticos por suas respectivas mitocôndrias. Diferenças majoritárias frente a estímulos como poli I:C, um análogo a moléculas de dsRNA amplamente utilizadas no estudo da imunidade inata antiviral,

evidenciaram programas de expressão altamente diferenciais entre os modelos. Em suma, os dados obtidos entre modelos humanos e murinos demonstram certos graus de diferença, os quais representam barreiras na compreensão plena dos processos biológicos estudados (LI et al., 2021b). Neste sentido, o presente estudo pretende não somente elucidar mecanismos ainda desconhecidos sobre a interação ZIKV-mitocôndria, mas também revelar possíveis diferenças na biologia mitocondrial murina e humana, principalmente no que tange seu papel na bioenergética e imunidade inata celular.

Sendo assim, devido a enorme importância da saúde e estado mitocondrial para com a interface imunometabólica (BREDA et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 2021), a existência de lacunas importantes na literatura e a relevância destes fatores sobre a patogênese da microcefalia causada pelo ZIKV. Investigamos assim, neste trabalho, o impacto da infecção pelo vírus no funcionamento mitocondrial, mais especificadamente, em processos gerais relacionados a bioenergética e a interface mitocôndria-resposta inata utilizando não somente astrócitos humanos, mas de algumas linhagens de camundongos que são utilizados como modelos da infecção pelo ZIKV. Esperamos assim, adicionar dados fundamentais sobre as possíveis interações vírus-mitocôndria, as quais podem elucidar dados acerca da biologia, patogênese e até mesmo indicar novas abordagens terapêuticas frente ao ZIKV e outras possíveis desordens neurológicas que tem sua patogênese relacionada com distúrbios mitocondriais.

# **1.2. OBJETIVOS**

Investigar o impacto imunometabólico da infecção por ZIKV sobre o funcionamento mitocondrial de astrócitos primários humanos e de diferentes linhagens murinas (hSTAT2, SJL, IFNAR1<sup>-/-</sup> e C57BL/6).

# 1.2.1 Objetivos específicos

Utilizando os modelos propostos:

- Caracterizar a infecção quanto à morte celular e carga viral;
- Avaliar a saúde mitocondrial por meio da produção EROSmt, polarização da membrana mitocondrial e capacidade respiratória;
- Caracterizar o perfil morfológico mitocondrial frente a infecção assim como avaliar a expressão de genes e proteínas relacionados à sua dinâmica;
- Avaliar o perfil da infecção e expressão de genes antivirais frente ao uso de moduladores relacionados às vias mitocondriais e correlatas;
- Utilizar técnicas estatísticas para traçar padrões entre os resultados obtidos.

## **1.3. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 1.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos neonatos (1-3 dias) das linhagens C57BL/6, SJL, hSTAT2 e IFNAR1<sup>-/-</sup> mantidos no Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais foram mantidos em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas). Todos os protocolos foram submetidos e aprovados Comitê de Ética em Pesquisa Animal desta mesma instituição.

## 1.3.2 Obtenção de astrócitos primários

Astrócitos humanos primários foram adquiridos (GIBCO, N7805100) foram gentilmente doados pelo Prof. Daniel Martins de Souza (UNICAMP) e mantidos em nitrogênio líquido até o momento de uso. Para a obtenção de astrócitos murinos primários, camundongos recém-nascidos de 1 a 3 dias foram decapitados e tiveram seus cérebros removidos. Em seguida, foi realizada a remoção cuidadosa das meninges para o isolamento do córtex. Após a separação do córtex, o mesmo foi lavado em meio DMEM Ham's F12 o qual foi levemente triturado. O resultado da trituração foi transferido para tubos contendo meio DMEM Ham's F12 acrescido de tripsina a 0,25%, o qual é incubado por 10 minutos em banho maria à 37°C. Em seguida, o material pré-digerido é então macerado e levado a um cell strainer (70µM) o qual, após essa etapa, foi resuspendido em 1mL do meio de cultura para glia (DMEM Ham's F12 suplementado com 10% SBF, 1% de L-glutamina, 1% de Piruvato de sódio, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de vitaminas). Os astrócitos humanos foram similarmente mantidos no mesmo meio, porém com a adição do suplemento N2 (Invitrogen) a 1%. As células foram mantidas em garrafas para cultura de tecido na proporção de 2:1 cérebro/garrafa. Para o favorecimento do crescimento de astrócitos, o meio foi trocado em intervalos de 3 dias. No final de 7 dias, os astrócitos foram separados por agitação constante de 200 rpm por 3 horas em estufa à 37 °C para a remoção da micróglia restante. Após esse processo, as garrafas foram lavadas e o meio trocado, obtendo uma cultura de alta pureza astrocitária.

#### 1.3.3 Obtenção e manutenção do ZIKV

Células de mosquito de Aedes albopictus (células C6/36) foram previamente preparadas para cultura do vírus, e mantidas em meio L-15 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de piruvato de sódio, 1% de Penicilina/Estreptomicina, 0,05% de anfotericina B a 27 ° C na ausência de CO2. Após atingir uma monocamada confluente a aproximadamente 70%, inoculamos 50µL da amostra viral em C6/36 com uma hora de adsorção, com agitação suave a cada 10 min para permitir a adsorção homogénea dos vírus. No final do período de adsorção, adicionamos 5mL do meio de cultura L-15, mais 2% de SBF, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de piruvato de sódio. As culturas foram então incubadas sob as mesmas condições de adsorção. Na primeira subcultura (P1), as células infectadas foram menos confluentes em comparação com as células de controle, mas tiveram poucas alterações morfológicas visíveis. No quarto dia após a infecção, a segunda subcultura (P2) foi feita cegamente por transferência de 500µL do sobrenadante T1, seguido da terceira subcultura, que foi coletada no oitavo dia após a infecção (P3). Os sobrenadantes foram colhidos, titulados e T3 foi utilizada para a inoculação experimental. Passagem viral em células C6/36

Para as passagens em células de mosquito, células C6/36 foram mantidas a 26°C em meio L-15 suplementado com 10% SFB. Quando as células atingiram a confluência de 80%, o vírus em passagem 4 foi adicionado à cultura e mantido por 1h em estufa a 26°C. Após o período de infecção, foram adicionados a garrafa 45mL de meio L-15 suplementado com 2% SFB. As células foram então mantidas a 26°C até que efeitos citopáticos fossem observados (~5 dias). O sobrenadante da cultura foi então coletado e o qual foi adicionado PEG (polietilenoglicol) 50% na proporção de 1:4. Essa mistura foi incubada *overnight* a 4°C. No dia seguinte, o tubo contendo PEG + sobrenadante foi centrifugado (30min a 3200g, 4°C). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido na proporção de 1:10 em HEPES 25mM+DMEM - Low Glucose. O precipitado viral foi aliquotado, congelado e titulado em células Vero CCL81 conforme item 1.3.4.

## 1.3.4 Titulação viral por ensaio de formação de placa (PFU)

Células Vero CCL81 foram semeadas em placas de 24 poços  $(1x10^{5}/poço)$ . Após 24h, o sobrenadante de cada poço foi substituído com as amostras contendo o ZIKV em forma de diluição seriada  $(10^{-1}-10^{-5} \text{ ou } 10^{-1}-10^{-11} \text{ para a titulação de estoques virais})$  em meio DMEM – High Glucose por 1h a 37°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido e substituído por meio 1:1 2x DMEM – Low Glucose + 2% CMC (carboximetilcelulose, viscosidade média, SIGMA). As células foram mantidas em estufa a 37°C. Após 5 dias, o meio foi removido, as células fixadas em 3,7% Formol, lavadas e coradas com cristal violeta 1% em metanol. As placas de efeito citopático foram contadas e o título viral determinado a partir da fórmula abaixo:

$$^{PFU}/_{mL} = M\acute{e}dia \, placas/D \, x \, V$$

D = Diluição

V= Volume do inóculo

### 1.3.5 Tratamento com inibidores e infecção in vitro

Astrócitos primários foram semeadas em placas de 6  $(2x10^5/poço)$  ou placas escuras de 96 poços  $(1x10^3/poço)$  em meio de cultivo (Tópico 3.2). Após 24h, o meio foi removido e substituído pelos diferentes inibidores diluídos em meio DMEM Ham's F12 conforme a tabela de concentrações. Todas as drogas foram adicionadas à cultura 2h antes da infecção, com exceção do inibidor de dinamina Dynasore, capaz de bloquear a entrada do vírus por via endocítica, o qual foi adicionado imediatamente após o período de infecção. Para a infecção, o meio contendo os inibidores/veículos foram removidos e substituídos por meio DMEM Ham's F12 contendo 0,1 partículas virais/célula (MOI 0,1) por 1h a 37°C. Após a infecção, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x e o meio substituído para o de cultivo. Os experimentos foram realizados com alíquotas virais em passagem 5 nos *timepoints* indicados.
Inibidor	Concentração	Mecanismo	
	utilizada		
DON (6-diazo-5-oxo-L-	50µM	Análogo antagonista de glutamina.	
norleucina)			
ROT (Rotenona)	100µM	Inibidor do complexo I mitocondrial.	
ETO (Etomoxir)	3µM	Inibidor da carnitina	
		palmitoyltransferase.	
NAC (N-acetil cisteína)	1mM	Agente antioxidante.	
2-DG (2-Deoxi-Glicose)	5mM	Inibidor competitivo da glicose-6-	
		fosfato.	
MDIVI-1	25μΜ	Inibidor da fissão mitocondrial.	
Dynasore	10µM	Inibidor de dinamina.	

## Tabela 1. Drogas e inibidores

## 1.3.6 Análises de citometria de fluxo

Para as análises citométricas, as células foram previamente plaqueadas (3x10<sup>5</sup> células por poço, placa de 24 poços) e infectadas como previamente descrito. Após 72 h.p.i (horas pós infecção), o sobrenadante foi retirado e as células foram lavadas com HBSS 1x. Após a lavagem, as células foram descoladas utilizando tripsina a 0,25% ou Accutase (astrócitos humanos) (ThermoFisher) por 5 minutos e separadas em placas de fundo U de 96 poços. As células foram então incubadas com as sondas indicadas na tabela abaixo de acordo com o protocolo do fabricante. Após a incubação, as células foram novamente lavadas com HBSS por 1x e ressuspendidas em 200µL, sendo imediatamente adquiridas (100.000 eventos) no citômetro de fluxo Accuri C6 Plus (BD) as quais tiveram seus parâmetros lidos. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software FlowJo (Versão X).

Sonda	Concentração de	Finalidade	Excitação
	uso		/Emissão
MitoSox (Thermo Fisher, M7514)	2,5µM	Medida de radicais de oxigênio mitocondriais.	510/580 nm
JC-1 (Thermo Fisher, M34152)	2μΜ	Potencial de membrana mitocondrial.	514/529 nm e 514/590 nm
LIVE/DEAD Green (Thermo Fisher, L34970)	1:1000	Viabilidade celular.	488/520 nm
MitoTracker Red CMXRos (Thermo Fisher, M7512)	100 nM	Marcador mitocondrial.	579/599 nm
7-AAD (BioLegend)	5:1000	Viabilidade celular.	488/650 nm

Tabela 2. Lista de sondas utilizadas nos ensaios citométricos

#### 1.3.7 Análises de microscopia de fluorescência

Para a realização dos ensaios de imunofluorescência, as células foram previamente fixadas por 4% PFA (paraformaldeído), permeabilizadas com 0,1% Triton X-100 por 15 min e bloqueadas com PBS+2% ASB (albumina sérica bovina) por 40 min em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários monoclonais de coelho anti-GFAP (Thermo Fisher, PA5-16291. 1:500), lecitina de tomate (Thermo Fisher, L32482. 1:500) ou de camundongos pan-flavivirus 4G2 (NovusBio, 1:100). As células foram lavadas 2X com PBS 1X e posteriormente incubadas com anticorpos secundários conjugados com AlexaFluor 594 (Invitrogen. 1:200) ou AlexaFluor 488 (Invitrogen, 1:200) diluídos em PBS+1% saponina por 2h em temperatura ambiente protegido da luz de acordo com o organismo dos anticorpos primários. Para a marcação nuclear, as células foram incubadas com Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich, H3570. 1µg/mL) por 10 min em temperatura ambiente as quais foram mantidas sob abrigo de luz até o momento da aquisição de imagens.

Para a análise da morfologia mitocondrial, após 72h de infecção, os grupos de infectados e controles mantidos em placas escuras de 96 poços tiveram seu sobrenadante removido e submetidos a lavagem com HBSS 1x. Após a lavagem, as células foram incubadas com Hoescht (1µg/mL) e MitoTrackerRed CMXRos (M7512, Thermo Fisher.

100nM) por 15 minutos a 37°C. Subsequentemente à incubação, as células foram lavadas 2x com HBSS 1x e levados ao microscópio de fluorescência FLoid Cell Imaging Station (Thermo Fisher) ou o microscópio de disco giratório confocal Opera Phenix Plus (PerkinElmer) para a aquisição de imagens. As imagens geradas foram carregadas no *software* Fiji para análise morfológica. As imagens foram pré-processadas e filtradas a fim de se obter uma melhor definição das estruturas mitocondriais. Em seguida, a morfologia mitocondrial foi reconstruída utilizando o plugin MiNA (versão 3.0.1) (LJOSA; CARPENTER, 2009), sendo as regiões de interesse manualmente delimitadas (FLoid) ou atomaticamente (Opera). Os *outputs* do plugin foram compilados e submetidos às análises estatísticas.

#### 1.3.8 Extração de RNA, síntese de cDNA e qPCR

A extração de RNA foi realizada nos *timepoints* indicados utilizando o kit de extração baseado em beads magnéticas MagMAX Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher, A48383) do sobrenadante conteúdo celular de acordo com as instruções do fornecedor. Após a extração, as concentrações de RNA foram determinadas utilizando o equipamento NanoDrop 8000 (Thermo Fisher). As amostras foram submetidas a transcrição reversa (até 2µg) utilizando primers oligo(dT) para captura de mRNA juntamente com o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher, 4368814).

A detecção molecular do ZIKV foi realizada por TaqMan Gene Expression Assay (Thermo Fisher, 4331182) com os primers especificados. Os ensaios de qPCR foram conduzidos utilizando uma curva padrão produzida a partir da diluição seriada de RNA viral expressados em uma escala logarítmica Briggsiana de equivalentes genômicos por mL de sobrenadante.

A expressão gênica foi realizada utilizando o Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher, 4368577) a partir da lista de primers descrita neste tópico. A mediana do valor do *cycle treshold* (C<sub>t</sub>) e a metodologia do  $2^{-DDCt}$  foram utilizadas para a quantificação relativa após normalização pelo gene *housekeeping* da β-actina (B-actina ou GAPDH). Todos as reações de PCR foram realizadas em equipamentos QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher).

Tabela 3. Lista de primers

Gene Alvo	Sequência de primers (5'-3')	
ZIKV_1086_Env	CCGCTGCCCAACACAAG	
ZIKV_1162c_Env	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	
Actb_Fw	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	
Actb_Rv	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	
Mx1_Fw	GACCATAGGGGTCTTGACCAA	
Mx1_Rv	AGACTTGCTCTTTCTGAAAAGCC	
lfit1_Fw	CTGAGATGTCACTTCACATGGAA	
lfit1_Rv	GTGCATCCCCAATGGGTTCT	
Mfn1_Fw	AGACTTGCTCTTTCTGAAAAGCC	
Mfn1_Rv	TCTCCACTGCTCGGGTGTAG	
Mfn2_Fw	CAAGTGTCCGCTCCTGAAGG	
Mfn_2_Rv	GAACCTCCTTGGCAGACACG	
Opa1_Fw	CAAGCATTACAGGAAGGTGTCAGAC	
Opal_Rv	CATTCCGTCTCTAGGTTAAAGCG	
Drp1_Fw	TGGAAAATGGTTCGAGAGTCAG	
Drp1_Rv	CATTCCGTCTCTAGGTTAAAGCG	
Mt_Nd1_Fw	TGCACCTACCCTATCACTCA	
Mt_Nd1_Rv	GGCTCATCCTGATCATAGAATGG	
Mt_Sdhd_Fw	CTTGAATCCCTGCTCTGTGG	
Mt_Sdhd_Rv	AAAGCTGAGAGTGCCAAGAG	
Isg15_Fw	GGTGTCCGTGACTAACTCCAT	
Isg15_Rv	TGGAAAGGGTAAGACCGTCCT	
DRP1_Fw	GATGCCATAGTTGAAGTGGTGAC	
DRP1_Rv	CCACAAGCATCAGCAAAGTCTGG	
MFN1_Fw	GGTGAATGAGCGGCTTTCCAAG	
MFN1_Rv	TCCTCCACCAAGAAATGCAGGC	
MFN2_Fw	TGCAGGTGTAAGGGACGATT	
MFN2_Rv	GAGGCTCTGCAAATGGGATG	
OPA1_Fw	GCAATTGAAAACATGGTGGGT	
OPA1_Rv	CTGGGTGCTCCTCATTACAT	

FIS1_Fw	CCAAATCCTGAAGGAGACGC
FIS1_Rv	GCTGAAGGCCACAGAGGATA
GAPDH_Fw	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
GAPDH_Rv	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

#### 1.3.9 Construção, clonagem, amplificação e purificação de plasmídeos

Genes sintéticos transcrevendo as proteínas não estruturais do ZIKV (NS2a, NS3 e NS4a) foram desenhados, códon otimizados e separados antes de serem utilizados como insertos nos diferentes plasmídeos de expressão. Para as proteínas não estruturais, foram adicionados linkers em sua porção 3` seguido da sequência codificante para FLAG, de acordo com dados prévios da literatura relacionada a clonagem de proteínas do ZIKV. Para a clonagem foi utilizado protocolos de digestão enzimática (T4 ligase, NEB) e subsequente religação das pontas complementares formadas ou, de acordo com a compatibilidade plasmidial, utilizado o protocolo de Gateway cloning (Thermo Fisher).

Os *Backbones* plasmidiais pLV-EF1a-IRES-Puro (addgene, #85132), pCW57.1 (addgene, #41393), pLKO.1 (addgene, #10878) foram carinhosamente doados pelo laboratório Virus and Immunity (Institut Pasteur) e amplificados em células DH5α termocompotentes (Thermo Fisher, 18265017). A transformação bacteriana se deu através de sua incubação por 20 min em gelo juntamente com 100ng de cada plasmídeo seguido de um breve choque térmico de 40 seg em banho maria a 42 C, sendo as células assim recuperadas pela adição do meio S.O.C. (Thermo Fisher, 15544034). Após incubação no meio de recuperação por 45 min, as bactérias foram submetidas ao crescimento em meio LB suplementado com antibiótico (Kanamicina/Ampicilina) de acordo com o requerimento de cada plasmídeo. A subsequente purificação plasmídeal foi conduzida utilizando kits de Mini ou MidiPrep (Macherey-Nagel) de acordo com o protocolo do fabricante. As sequencias plasmidiais foram confirmadas por sequenciamento Sanger e digestão enzimática. Os plasmídeos purificados foram mantidos em freezer -20 até o momento de uso.

As sequências de shRNA para *knock-down* dos genes MFN2 e DRP1 foram selecionadas a partir de dados prévios da literatura (CHATEL-CHAIX et al., 2016) e desenhados a modo que fiquem compatíveis ao vetor alvo. Os oligos foram então inseridos em plasmídeos plKO.1, de acordo com o protocolo previamente estabelecido para este vetor (MOFFAT et al., 2006).

#### 1.3.10 Transfecção celular e produção de partículas lentivirais

Plasmídeos para a montagem de pseudopartículas lentivirais pVSVg e pGAG ou LentiPack (OriGene) foram ressuspendidos e armazenados em freezer -20°C até o momento de uso. Para a transfecção, os plasmídeos de empacotamento (250ng, pVSVg e 750ng, pGAG) foram incubados em tubos de polipropileno juntamente com 1µg dos plasmídeos pLKO.1 contendo os shRNAs em meio OPTI-MEM (Thermo Fisher) juntamente com 18µl de FuGENE 6 (Promega). Após 20 min de incubação em temperatura ambiente, o *cocktail* de transfecção foi adicionado nas células lentamente e de maneira homogênea, as quais foram mantidas *overnight* em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, o meio foi removido e trocado por meio de cultura suplementado com 10% SFB e 1% Penicilina/Estreptomicina o qual foi mantido até o próximo dia. No quarto e quinto dia de transfecção, o meio celular contendo as partículas lentivirais foram coletados, filtrados (0.45µm) e armazenados em freezer -80°C até o momento de uso.

Para os ensaios fenotípicos pós transfecção, o mesmo protocolo de transfecção foi utilizado, com alteração dos plasmídeos alvo. As células foram avaliadas nos *timepoints* indicados em cada figura.

Para a produção de partículas lentivirais, células HEK293t foram plaqueadas  $(3x10^5)$  em placas de 6 poços 24 horas antes da transfecção as quais foram mantidas em estufa a em meio RPMI suplementado com 10% SFB sem antibióticos.

Para os demais ensaios, astrócitos primários foram plaqueados  $(5x10^{-4})$  em placas de 96 poços e mantidos de acordo com a metodologia aqui previamente citada (1.3.2).

#### 1.3.11 Western blotting

As amostras foram armazenadas em tampão RIPA, com inibidores de proteases e fosfatases. Em seguida, submetidas à agitação e centrifugadas por 10 min a 3000rpm a 4°C. O sobrenadante foi congelado a -80°C até a dosagem de proteínas pelo ensaio de Bradford (Thermo Scientific, MA, USA). Foram diluídos 20µg de proteína em tampão de amostra as quais foram posteriormente submetidas a linearização e regulação da carga por incubação a 95°C por 5 min. Em seguida, foram aplicados em poços de gel de poliacrilamida 12%. O gel foi submetido a 80-115V por 1,5h. Após a corrida, foi realizado a transferência para a membrana de nitrocelulose sob amperagem controlada (450mA) por 1h. Ao final da corrida, a membrana foi bloqueada com solução de albumina 5% em tampão TBS-T por 1h. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (1:1000) dirigido para as proteínas MFN1, MFN2, DRP1 e B-Actina *overnight* a 4°C e com o secundário diluído 1:10000 por 1h em T.A. A membrana foi lavada com TBS-T por 3 vezes no final de cada incubação. Para a leitura das membranas, foi aplicado uma solução ECL (BioRad) sobre a membrana a qual as imagens foram registradas por meio do aparelho *ChemiDoc* (BioRad). A quantificação das bandas de proteínas foi realizada por densidade de pixels no *software* Fiji e comparadas com a intensidade da banda da proteína controle ( $\beta$ -Actina).

#### 1.3.12 Análises de fluxo metabólico e respirometria de alta resolução

Após 72h de infecção, os astrócitos primários foram submetidos a avaliação da taxa de consumo de oxigênio (OCR) a 37 °C num analisador de fluxo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience). As células  $(4 \times 10^4)$  foram sequencialmente desafiadas por oligomicina (1,5  $\mu$ M), FCCP (2  $\mu$ M), rotenona (100nM) e antimicina A (1  $\mu$ M) previamente titulados, onde foi medido a concentração de oxigênio no sobrenadante em três *timepoints* após cada desafio. De maneira análoga, para medir a taxa de acidificação extracelular (ECAR), fora introduzido em cada poço sequencialmente glicose (10mM), oligomicina (1,5 uM) e 2-DG (50 mM) a fim de mensurar a taxa de acidificação do meio extracelular. As taxas de OCR e ECAR foram automaticamente calculados e registradas pelo software Seahorse, seguida por análise estatística pelo *software* GraphPad Prism (versão 9). Os parâmetros específicos de OCR e ECAR foram calculados com os dados obtidos a partir da Tabela 3.

Parâmetro	Equação	
Consumo de oxigênio não mitocondrial	Medida mínima após injeção de rotenona	
	+ antimicina A	
Pospiroção hosal	(Última medida depois da primeira	
Kespiração basar	injeção) – (Respiração não mitocondrial)	
Recuiração máxima	(Medida máxima após injeção de FCCP)	
ixespiração maxima	- (Respiração não mitocondrial)	

Tabela 4. Cálculos do ensaio de estresse mitocondrial e glicolítico

	(Medida mínima após injeção de	
Vazão de prótons	oligomicina) – (Respiração não	
	mitocondrial)	
	(Última medida antes da injeção de	
Produção de ATP	Oligomicina) – (Medida mínima após	
	adição de oligomicina)	
Conocidado receivotório recorre	(Respiração máxima) – (Respiração	
Capacidade respiratoria reserva	basal)	
	(Medida máxima antes da injeção de	
Glicólise	oligomicina) – (Última medida antes da	
	injeção de glicose)	
	(Medida máxima após a injeção de	
Capacidade glicolítica	oligomicina) – (Última medida antes da	
	injeção de glicose)	
Reserva glicolítica	(Capacidade glicolítica) – (Glicólise)	
Acidificação não glicolítica	Última medida antes da injeção de	
	glicose	
	l	

## 1.3.13 Análises estatísticas e bioinformáticas

Os valores foram primeiramente submetidos a testes de normalidade e ao teste de Grubbs para a limpeza de outliers. As diferenças entre os resultados obtidos foram determinadas pelo teste *t* de Welch, Mann-Whitney ou por análise de variância (ANOVA) paramétrica ou não paramétrica dependendo dos grupos testados e a normalidade de seus resultados. Foi estabelecido o como nível mínimo de significância o p e  $\alpha < 0,05$ . Os valores quando representados por asteriscos indicam nível de significância de p (p < 0,05 = \*, p < 0,005 = \*\* e p < 0,0005 = \*\*\*).

Para a análise de componente principal (PCA), os dados foram tabulados, normalizados (0-100%) e submetidos ao pacote ggfortify (0.4.14) para análise. Para geração da matriz de correlação de dados, foi utilizado o pacote ggcorrmat (ggstatplot, 0.9.0) o qual foi utilizado para significância de 0.05 no teste de Spearman. O *heatmap* da expressão gênica humana foi obtido após filtragem de dados do dataset público

GSE125554 para genes relacionados a fissão, fusão e ciclo tricarboxílico (GOs: *mitochondrial fission, mitochondrial fusion* e *tricarboxylic acid cycle* respectivamente) em seu número de *gene counts*. Para as análises estatísticas e geração de gráficos foi utilizado o programa R (versão 4.1.2) e GraphPad Prism (versão 9).

#### **1.4. RESULTADOS**

#### 1.4.1 Caracterização da infecção por ZIKV em culturas primárias de astrócitos

Após a realização do protocolo para a geração da cultura glial mista, no qual se pode isolar astrócitos primários, a pureza da cultura foi verificada pela porcentagem de células positivas para o marcador astrocitário GFAP (GFAP<sup>+</sup>) e posteriormente confirmada por imunofluorescência da proteína GFAP e lectina de tomate, um marcador específico de micróglia (**Fig 3**. A-C). Foi observado uma alta proporção de astrócitos na cultura (média 75,78%; DP = 4,4), e baixas concentrações de micróglia e possivelmente fibroblastos residuais. De maneira imperativa, para as análises subsequentes, consideramos a cultura como enriquecida de astrócitos, ainda que o conhecimento de que possíveis alterações nos resultados sejam impactadas pelas outras populações celulares.



**Figura 3. Caracterização da cultura primária de astrócitos.** (a) Estratégia de *gating* utilizada para a fenotipagem da cultura astrocitária. (b) Porcentagem de células positivas para GFAP a partir dos dados de citometria. (c) Imunofluorescência da cultura utilizando marcadores para astrócitos (GFAP, vermelho) e micróglia (Lectina de tomate, verde) em (A) e (B) respectivamente. Para a análise, foram contadas 500 células em triplicata. Os dados apresentados foram conduzidos a partir de culturas oriundas de animais WT. Os resultados demonstrados são representativos de dois experimentos independentes. Barras de erro representam +/- DP.

Em seguida, a fim de confirmar e caracterizar a capacidade do ZIKV em infectar as diferentes culturas astrocitárias, as mesmas foram submetidas à infecção (MOI 0,1) e

sua carga viral quantificada após 72 h.p.i por PFU e qPCR (Fig 4. A e B). Como um método alternativo da confirmação da infecção, foram realizados ensaios de imunofluorescência demonstrando a presença de antígenos virais nos astrócitos desafiados (Fig. 4. C). Além disso, foi realizada a caracterização do impacto da infecção na viabilidade celular ao longo do tempo (24 -72 h.p.i) em astrócitos originados de diferentes linhagens de camundongos, assim como de humanos (Fig 4. D-G). Os resultados evidenciaram diferenças na capacidade replicativa do vírus nas diferentes linhagens. Astrócitos oriundos de animais SJL e humanos se assemelham quanto à quantidade de partículas infectantes produzidas 72 h.p.i, enquanto astrócitos hSTAT2 e Ifnar-/- apresentaram baixa replicação quando comparados com suas contrapartes pelo ensaio de formação de placas. Em relação ao impacto da viabilidade frente ao vírus, todos modelos apresentaram modesta morte celular em ambos timepoints. De nota, astrócitos oriundos de camundongos SJL demonstraram a maior porcentagem de células mortas (Fig. 4. F) corroborando a susceptibilidade desta linhagem. Portanto, foi possível determinar que os diferentes astrócitos primários utilizados neste estudo são permissivos à infecção por ZIKV.



**Figura 4. Caracterização da infecção por ZIKV em diferentes culturas de astrócitos primários.** Quantificação do número de partículas infecciosas (a), carga viral (b) e presença de antígeno viral em astrócitos humanos 72 h.p.i. por imunofluorescência (c). O painel esquerdo é representativo da infecção por MOI 0,1 e no direito, MOI 1. (d-g) Viabilidade celular de diferentes culturas de astrócitos primários infectados por ZIKV analisados 72 h.p.i. Resultados representativos de três experimentos independentes. Foi

realizado teste de *One-Way ANOVA* e foram considerados significantes os valores de p < 0.05. As barras de erro representam +/- DP.

## 1.4.2 A infecção por ZIKV induz alterações mitocondriais

## 1.4.2.1 Caracterização de alterações mitocondriais induzidos pelo ZIKV evidenciadas em dados de sequenciamento humano

A fim de elucidar possíveis alterações mitocondriais causadas pelo ZIKV em humanos, dados de sequenciamento públicos foram utilizados para a caracterização das possíveis alterações e, assim, criar uma base comparativa para os dados a serem obtidos. Dados de RNAseq de cérebros de recém-nascidos afetados pela SCZ foram selecionados (GSE125554) quanto a genes relacionados à fusão, fissão e ciclo tricarboxílico (Fig 5. A-C). Foram encontradas leves diferenças na expressão dos genes analisados, sendo os genes relacionados à fissão mitocondrial os mais divergentes (MAPT e OPA1, sublinhados em vermelho), os quais se relacionam com doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson e Atrofia Óptica, respectivamente. A partir das análises utilizando a database MitoCarta, a qual apresenta dados curados sobre os genes diretamente relacionados à mitocôndria, foi possível evidenciar o enriquecimento de vias relacionadas à homeostase redox celular além da expressão reduzida de diversos genes relacionados com a matriz e MIM (Fig. 5. D-E). Como evidenciado, os genes apresentados têm grande correlação com o equilíbrio redox celular (CAT, GPX1, HAGH, PRDX2). Após a análise por ontologia gênica e vias biológicas dos genes com maior diferença na expressão (Fig 5. F-G), foram encontrados enriquecimentos que indicam alterações importantes quanto à manutenção da morfologia mitocondrial, dado que a proteína OPA1 é um importante regulador da fusão e manutenção da estrutura da crista mitocondrial e, consequentemente, de sua capacidade respiratória. Deste modo, os dados evidenciam que possíveis alterações quanto ao funcionamento mitocondrial possam estar ocorrendo frente à infecção por ZIKV.



Figura 5. Dados de RNAseq humanos revelam alterações mitocondriais causadas pela infecção por ZIKV. *Heatmaps* comparando a expressão diferencial de genes relacionados a fissão (a), fusão (b) e ciclo tricarboxílico (c) de cérebros de neonatos afetados pelo ZIKV e grupos controle. As cores representam os valores de Log<sub>2</sub>FC originados dos números de *reads* de cada gene. (d-e) Análise dos DEGs utilizando a *database* MitoCarta 3.0. A fileira superior indica a localização do gene na mitocôndria e a inferior (azul) o *fold-change* de cada gene. (f-g) Análise de ontologia gênica e de vias biológicas dos genes significativos. Foi considerado para o FDR (*multiple t-tests*) um  $\alpha < 0,05$  para a seleção de genes significativos.

# 1.4.2.2 A infecção por ZIKV leva à perda da polarização mitocondrial e produção de ROSmt

A partir dos dados encontrados nos *datasets* previamente analisados representativos da infecção pelo ZIKV em humanos, avaliamos possíveis perdas do

potencial da membrana mitocondrial a fim de validar os dados encontrados nas análises bioinformáticas. De fato, foi possível evidenciar a perda da polarização (**Fig 6.** A-D) utilizando a sonda JC-1, que tem fluorescência modal entre vermelho, quando agregada dentro de mitocôndrias saudáveis, e verde, quando há a perda da polarização. A perda da polarização mitocondrial também pode ser pela marcação da sonda mitocondrial MitoTrackerCMX Ros durante as análises (**Fig. 6.** C), a qual apresenta um perfil difuso pelo citoplasma celular nas referidas situações (GARCÍA et al., 2020). Interessantemente, a perda de polarização mitocondrial parece ocorrer em uma cinética diferencial entre modelos astrocitários testados. É importante também notar que astrócitos humanos demonstraram as maiores taxas de despolarização mitocondrial (**Fig 6.** D), indicando uma menor tenacidade frente aos distúrbios causados pela infecção com o ZIKV.

Como a perda da polarização mitocondrial tem grande relação com a geração de EROs, conduzimos a quantificação da produção de EROs mitocondrial (EROsmt) por citometria de fluxo utilizando a sonda MitoSox. Foi evidenciado aumento da produção de EROsmt principalmente 48 h.p.i juntamente com uma tendência de aumento discreta nos outros *timepoints* nos grupos infectados (**Fig. 6.** E-G). Além disso, pode-se traçar um paralelo entre a produção de EROSmt e a resposta de IFN-I, uma vez que astrócitos oriundos de animais Ifnar-/- alcançaram os maiores valores de MFI comparados com sua contraparte (WT) (p<0.0001 no fator modelo experimental, *Two-Way* ANOVA) e até mesmo os outros modelos, os quais detêm a sinalização de IFNs íntegra. Inesperadamente, os picos de EROSmt não coincidiram com a maior despolarização mitocondrial. Com isso, os dados indicam que a infecção pelo ZIKV induz alterações na saúde mitocondrial de astrócitos primários, e que tal elevação pode ter relação causal com a resposta de IFN-1, ausente no grupo que obteve as maiores diferenças (Ifnar-/-). Porém, com os resultados obtidos, não se pode ignorar a possibilidade de que estas alterações possam estar ligadas às diferentes respostas e estados basais das células frente a infecção.



**Figura 6.** A infecção por ZIKV leva à despolarização e produção de EROS mitocondrial. (a) Esquemática simplificada do funcionamento da sonda JC-1. A perda da polarização mitocondrial leva ao *leakage* da sonda MitoTracker evidenciado em (b) no painel direito. Estratégia de *gating* utilizada para mensurar a razão da despolarização mitocondrial representado em (d) nos diferentes grupos. O ionóforo CCCP foi utilizado como controle positivo para despolarização. Estratégia de *gating* utilizado para quantificação do nível de EROSmt em células viáveis (e) e sua distribuição em cada grupo em 72 h.p.i (f). Os dados de (g) representam os valores de MFI de cada grupo nos diferentes *timepoints* testados. Os resultados do teste *Two-Way ANOVA* comparando cada

(continuado) modelo estão evidenciados em (d) e cada modelo em (g). Os resultados são representativos de três experimentos independentes. As barras representam +/- DP.

#### 1.4.2.3 A infecção por ZIKV causa alterações na morfologia mitocondrial

Como observamos que a infecção do ZIKV impacta diretamente aspectos da saúde mitocondrial, realizamos experimentos de microscopia de fluorescência para avaliar se as dadas alterações estariam afetando a morfologia mitocondrial. Como esquemática experimental, utilizamos o plugin MiNA, pelo software Fiji, para avaliar a morfologia mitocondrial astrocitária dos diferentes modelos animais após 72 h.p.i. Em cada cultura astrocitária, observamos um perfil morfológico diferencial (Fig. 7. A-C), seguindo os parâmetros da Tabela 4 baseados na publicação do plugin (VALENTE et al., 2017). Os astrócitos primários humanos apresentaram em 72 h.p.i. uma diminuição no sinal mitocondrial pela área da célula, o tamanho de guampos (*i.e.* ramos mitocondriais) assim como no tamanho de sua rede mitocondrial, indicando que a fissão mitocondrial é dominante durante a infecção (Fig. 7. A). Já os astrócitos oriundos de animais SJL apresentaram um aumento no sinal mitocondrial por célula assim como um maior tamanho dos guampos, sugerindo que processos relacionados à fusão mitocondrial se apresentam aumentados durante a infecção por ZIKV (Fig. 7. C), de maneira similar aos astrócitos de camundongos hSTAT2 (Fig. 7. D). As células originadas de camundongos Ifnar<sup>-/-</sup> todavia, não apresentaram alterações morfológicas significativas (Fig. 7. B). Em suma, nossos dados sugerem diferenças quanto à morfologia mitocondrial entre os diferentes modelos utilizados frente a infecção. É importante destacar que estudos mais refinados como microscopia confocal e análises de time-lapse podem complementar tais achados.

**Tabela 5. Descritores do plugin MiNA.** A tabela demonstra os descritores usuais na interpretação da morfologia mitocondrial gerados pelo *plugin* MiNA.

Estado morfológico	Área ocupada por	Média tamanho dos	Tamanho da rede mit.
	mit.	guampos mit.	
Fissão	Aumentado/Normal	Diminuído	Diminuído
Fusão	Diminuído/Normal	Aumentado	Aumentado/Diminuído



Figura 7. A infecção pelo ZIKV causa alterações morfológicas mitocondriais divergentes em diferentes modelos astrocitários. Avaliação da área celular ocupada por mitocôndrias, tamanho de guampos e número de conexões mitocondriais (rede) em diferentes modelos astrocitários (a-d). As imagens de fluorescência representam cada uma das condições. Cada ponto representa uma célula dentre 10-12 imagens analisadas de cada grupo onde n=80 com exceção do grupo hSTAT2. Foi utilizado a sonda mitocondrial MitoTracker CMXRos e o *software* Fiji para as análises. Representativo da infecção por ZIKV em 72h em MOI de 0,1. Foi utilizado *t-test* de *Welch* para significância estatística. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

A fim de entender melhor os processos de fissão/fusão que possam estar ocorrendo durante a infecção, avaliamos também a expressão de genes envolvidos na manutenção da dinâmica mitocondrial, assim como a quantidade proteica dos genes avaliados. Corroborando os dados morfológicos de astrócitos humanos, observamos o aumento da expressão do gene MFN2 (**Fig. 8.** A), que codifica para uma proteína fundamental envolvida na fusão mitocondrial durante a infecção. Em contrapartida, astrócitos oriundos de camundongos hSTAT2 tiveram os níveis de *Mfn2* diminuídos. Quanto ao nível de

expressão dos demais genes testados, FIS1 se mostrou diminuído somente em astrócitos SJL (Fig. 8. D) enquanto os níveis de DRP1 e OPA1 não apresentaram diferenças estatísticas (Fig. 8. B-D). É necessário notar que as proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial possuem alto nível de modificações pós-traducionais, e que a expressão de seus genes não necessariamente reflete sua atividade proteica. Neste sentido, foram quantificadas por *Western Blot* as proteínas MFN1, MFN2 e DRP1 em astrócitos primários humanos 72h.p.i. (FIG. 8. E-G). De maneira contrastante com os resultados de expressão gênica, a proteína MFN2, responsável pela fusão mitocondrial se encontrou diminuída nos grupos infectados por ZIKV (FIG. 8. E). Além disso, identificamos uma tendência quanto à fosforilação da proteína DRP1 no resíduo 616, a qual tem relação direta com a atividade da ciclina CDK5 (HAN et al., 2020) (FIG. 8. G).

Por fim, nos questionamos se a infecção pelo ZIKV estaria levando a uma diminuição na quantidade de mtDNA, haja vista que o mesmo reflete as alterações previamente encontradas. Para tentar responder tal questão, quantificamos por qPCR a expressão de mt-ND1 e SDHD, codificantes para uma subunidade da NAD desidrogenase e uma subunidade da succinato desidrogenase respectivamente em relação a um gene endógeno (beta actina). A quantificação dos genes mitocondriais não apresentou diferenças entre os grupos testados (**Fig. 8.** H-I). Aumentos na expressão de genes mitocondriais são considerados marcadores *bona fide* de estresse celular. Uma vez que a diminuição destes genes foi observada, indicando que a infecção por ZIKV esteja levando à inativação da resposta ao estresse celular, representada pela atividade de fatores de transcrição *Nr2*, *Pparg* e *Creb* de maneira dependente de IFN (GAK et al., 2015), ou, até mesmo, levando a alterações importantes nas vias de controle de qualidade mitocondrial



**Figura 8. A infecção por ZIKV leva a expressão diferencial de genes relacionados a dinâmica mitocondrial e a degradação de MFN2.** (a-d) Expressão relativa por qPCR de genes relacionados à dinâmica mitocondrial em diferentes modelos de astrócitos primários infectados por ZIKV (MOI 0,1). Quantificação por *Western Blot* de proteínas relacionadas ao controle da dinâmica mitocondrial em astrócitos primários humanos infectados ou não por ZIKV (MOI 0,1) (f). Quantificação por qPCR a expressão de genes nucleares (h) e codificados pelo mtDNA (i) indicativos da biogênese mitocondrial. Os experimentos foram conduzidos em 72 h.p.i. onde os resultados são representativos de dois experimentos independentes. Para as análises entre grupos, foi utilizado *multiple t-tests* onde o p ajustado é exibido. *t-test* de *Welch* utilizado nas demais comparações. A barra de erro representa +/- o DP.

#### 1.4.2.4 ZIKV causa alterações na respiração mitocondrial e na glicólise

Em seguida, investigamos o impacto da infecção pelo ZIKV quanto à respiração mitocondrial, além de possíveis alterações no metabolismo glicolítico, uma das principais vias de geração de energia e substratos para diversas vias celulares. Para tanto, utilizamos astrócitos primários humanos e de animais SJL (não apresentado) tratados ou não pelo inibidor de divisão mitocondrial MDIVI-1, tendo em vista a alta taxa de fragmentação mitocondrial durante a infecção (FIG. 7. A). O MDIVI-1 é um composto conhecido por inibir a ação da principal dinamina responsável pela fissão mitocondrial (DRP1), o qual já teve efeitos importantes na mitigação inflamatória de diversas doenças neurodegenerativas.

Os resultados obtidos a partir do ensaio de respirometria de alta resolução (MitoStress, SeaHorse) evidenciaram diminuições nas taxas de respiração basal e da vazão de elétrons nos grupos desafiados por ZIKV (FIG. 9. A). Interessantemente, o tratamento por MDIVI-1 impacta amplamente a respiração mitocondrial, haja vista o retorno dos parâmetros de respiração basal e vazão de elétrons similares ao grupo controle (FIG 9. B-E). Também pudemos observar maior semelhança entre o consumo de oxigênio dos grupos tratados e controle, em detrimento dos infectados pelo ZIKV (FIG 9. A). De maneira análoga, o tratamento por MDIVI-1 também se mostrou eficaz em favorecer a via glicolítica muito além do basal (FIG 9. F-J), além de aumentar significativamente sua capacidade de reserva (FIG 9. I). Esses dados reforçam a importância da via glicolítica e da atividade mitocondrial sob a atividade da imunidade inata, como já demonstrado (WEST; SHADEL; GHOSH, 2011).

Neste sentido, avaliamos o número de partículas virais infectantes e a expressão de genes reguladores da dinâmica mitocondrial em condições de inibição da via glicolítica por 2-DG e de inibição da fissão mitocondrial (MDIVI-1) em astrócitos humanos (FIG 9. L-P). Os grupos tratados por MDIVI-1 apresentaram diminuição acentuada de partículas virais produzidas ao passo que, curiosamente, não houve alteração nos grupos tratados por 2-DG (FIG 9. L). Quanto à quantificação dos genes reguladores da dinâmica, houve um aumento na expressão de MFN1/2, que muito provavelmente é resultante do teórico aumento das redes mitocondriais pelo MDIVI-1 (SMITH; GALLO, 2017) (FIG 9. M-O). O fator antiviral ISG15 que também foi quantificado, teve sua expressão diminuída no grupo infectado e tratado por MDIVI-1 (FIG 9. P).

Ao todo, os resultados acerca dos efeitos do ZIKV sobre a respiração mitocondrial, assim como o uso da glicose durante a infecção, podem sugerir que existe uma dependência da atividade mitocondrial, pelo menos quanto à sua respiração e replicação viral, em detrimento da atividade glicolítica. Além disso, foi evidenciado que os efeitos do inibidor de fissão mitocondrial MDIVI-1 não se limitam somente à perda da atividade da dinamina DRP1, levantando questionamentos acerca de sua especificidade e possíveis efeitos *off-target*.



Figura 9. A infecção por ZIKV impacta na respiração mitocondrial assim como no metabolismo glicolítico de astrócitos primários humanos. Perfil do consumo de oxigênio (a) e de acidificação celular (f) de astrócitos humanos primários tratados ou não por MDIVI-1 (25nM) e infectados ou não por ZIKV 72 h.p.i. em MOI 0,1. Os quais tiveram seus parâmetros calculados relativos ao estresse mitocondrial (b-e) e atividade glicolítica (g-j). Os perfis foram mensurados em equipamentos SeaHorse após titulação de inibidores e substratos. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (n=5 cada) o qual nos gráficos (a) e (f) são representados os valores medianos. Análise estatística por *One-Way* ANOVA. (k) Viabilidade celular de células tratadas por MDIVI-1 e veículo (DMSO) determinada por citometria de fluxo (7-AAD).

(l) Quantificação de vírions produzidos após 72 h.p.i. de tratamento por ensaio de formação de placa. Avaliação por qPCR de genes relacionados à dinâmica mitocondrial (m-o) e resposta imune (p) após tratamento por MDIVI-1 (25nM) em 72 h.p.i.. One-Way ANOVA foi realizado para as análises estatísticas e as barras de erro representam +/- DP.

## 1.4.2.5 Panorama das alterações mitocondriais causadas pelo ZIKV em diferentes modelos astrocitários

Para a obtenção de um panorama geral das alterações induzidas pelo ZIKV até o momento, foi realizada a redução dimensional dos dados utilizando a análise de componentes principais (PCA). A fim de adicionar um controle à análise, adicionamos dados obtidos em nosso laboratório com astrócitos primários de hamsters infectados por SARS-CoV-2 (OLIVEIRA et al., 2021) (Capítulo II deste trabalho), que apresentam diferenças contrastantes em relação a infecção pelo ZIKV e por utilizar um modelo diferente aos aqui estudados (*Mesocricetus auratus*, Hamster sírio).

A partir da geração do PCA foi possível observar com maior clareza os principais fatores contribuintes nas diferenças encontradas (**Fig. 9.** A). Neste sentido, a produção de EROS mitocondrial (PC1) e o tamanho de sua rede (PC2) foram os principais fatores segregadores no gráfico (**FIG 9.** B-C). Como comentado anteriormente, a segregação dos diferentes modelos espacialmente confirma diferenças quanto às características mitocondriais de cada um. De maneira interessante, os diferentes modelos analisados formaram três agrupamentos a partir da clusterização por *K-means* (não exibido), formados por astrócitos oriundos de animais WT/Ifnar<sup>-/-</sup>, SJL/humano e, por último, hamsters. Também, foram realizadas análises de correlação (**Fig. 9.** D) entre os fatores que alimentaram o PCA, as quais revelaram correlações significativas, principalmente entre o inverso da morte celular, com o grau de depolarização mitocondrial, além da correlação positiva entre a polarização mitocondrial e a extensão da rede mitocondrial.



Figura 10. Panorama das alterações mitocondriais induzidas pela infecção por ZIKV. (a) Análise de componente principal dos dados obtidos acerca da morfologia e dados acerca da saúde mitocondrial obtidos nos diferentes modelos estudados. (b) Matriz de correlação entre os dados utilizados em (a) sem separação entre modelos. Os dados foram previamente normalizados e fora realizado o teste de correlação não-paramétrico de Spearman os quais foram considerados significantemente estatísticos resultados com o p < 0.05.

Por fim, os dados obtidos acerca das alterações mitocondriais causadas pelo ZIKV em camundongos indicam que a influência do *background* de cada modelo astrocitário impacta diretamente as interações mitocondriais exercidas pelo vírus, haja vista a separação espacial entre os grupos mencionados. Ainda, de maneira interessante, houve um agrupamento espacial entre os modelos humano e de camundongos SJL, sugerindo possíveis similaridades enquanto atividade e alterações mitocondriais induzidas pela infecção do ZIKV. Entre outras questões, fica a de qual seria a influência de fatores da imunidade inata em astrócitos primários humanos, que são conhecidamente susceptíveis à infecção e aos mecanismos de evasão viral, indicando que o mesmo possui a capacidade de influenciar de alguma maneira a dinâmica mitocondrial, dado aos resultados contrastantes previamente obtidos.

#### 1.4.3 O status mitocondrial impacta na resposta imune frente à infecção por ZIKV

Os resultados obtidos até o momento sugerem que a infecção pelo ZIKV impacta na saúde e na morfologia mitocondrial, entretanto, não avaliamos a relação direta entre estes fatores e a replicação viral e a atividade da imunidade inata. Neste sentido, propomos um esquema de inibidores e drogas que visam manipular vias mitocondriais e metabólicas que já se mostraram importantes na promoção de infecções virais (Fig 10. A). Em relação ao efeito dos inibidores sobre a geração de partículas infectantes em astrócitos hSTAT2, houve diminuição significativa nos grupos tratados com rotenona, inibidor do complexo I mitocondrial e 2-DG, inibidor da glicólise, enquanto houve um aumento da progênie viral no grupo tratado com Dynasore, um inibidor de dinamina (Fig 10. B). Estes resultados indicam tanto uma dependência do complexo I, quanto da via glicolítica pelo menos neste modelo específico. De maneira interessante, astrócitos de SJL submetidos ao tratamento de 2-DG e DON, um inibidor da glutaminólise, apresentaram um aumento discreto quanto a replicação viral (Fig. 10. C). Entretanto, além da morte celular causada pela replicação viral, a indução da produção de citocinas antivirais como o IFN frente a infecção, pode levar a um estado de neuroinflamação altamente detrimental para o indivíduo. Contrastando com o aumento da carga viral apresentada pelo tratamento por DON, a expressão gênica de fatores antivirais como o Mx1, Ifit1, Isg15 além da expressão de Ifn- $\beta$  foi diminuída em astrócitos de animais SJL (Fig. 10. D-F). Em astrócitos humanos, a carga viral se manteve em todas condições testadas, enquanto houve um grande aumento da expressão de ISGs após a inibição da fusão mitocondrial pelo composto MDIVI-1 quando comparados com os demais (Fig. 10. H-J), o que não ocorreu em astrócitos murinos (Fig. 10. E-G). Estes resultados sugerem uma correlação da morfologia mitocondrial induzida pelo ZIKV em diferentes modelos (Fig. 7. A). Portanto, os resultados com os inibidores sugerem a existência de mecanismos

que suportam a resposta inata antiviral frente a infecção dependente da saúde mitocondrial, mais especificamente, seu estado morfológico. É interessante notar que a alta expressão de genes antivirais durante o tratamento por MDIVI-1 não afetaram a replicação do ZIKV. Neste ponto, também é importante mencionar que possíveis efeitos *off-target* devem ser considerados durante a interpretação dos resultados, dada a inespecificidade de cada composto.



**Figura 11. A resposta antiviral inata frente ao vírus depende de vias metabólicas relacionadas à função mitocondrial.** (a) Esquemática da estratégia de tratamentos. (b) Quantificação de partículas virais infecciosas em astrócitos de camundongos hSTAT2 submetidos aos diversos tratamentos. Número de cópias virais de astrócitos de animais SJL (c) e de humanos (g) por qPCR 72 h.p.i. Análise da expressão relativa de genes estimulados por IFN em astrócitos primários de camundongos SJL (d-f) e humanos (h-j). As análises foram realizadas após 72 h.p.i. infectadas em MOI de 0,1. Dados representativos de dois experimentos independentes. Foi utilizado *Two-Way ANOVA* como teste estatístico. As barras de erro representam +/- o DP.

#### 1.4.4 Instrumentalização para o estudo molecular da relação ZIKV-mitocôndria

A fim de elucidar os mecanismos que podem estar relacionados com as alterações mitocondriais previamente descritas, pensamos em utilizar algumas dessas ferramentas para tentar descrever com mais clareza os achados apresentados anteriormente neste trabalho. Para tanto, clonamos as proteínas não estruturais (NSP) do ZIKV NS2a, NS3 e NS4a (Figura 12. A) em vetores de expressão estável (pLV-EF1a-IRES-Puro) e induzido (pCW57.1). Essas NSPs acima mencionadas já foram descritas atuando diretamente (NS3) ou em vias relacionadas às alterações descritas como glicólise (NS4a) e a resposta de IFN-1 (NS2a). A fim de validarmos e confirmarmos a expressão das diferentes NSPs, submetemos cada plasmídeo contendo as diferentes NSPs a sequenciamento e imunofluorescência em células HEK293t transfectadas (Fig. 12. B), os quais tiveram uma média de 17% de células transfectadas com sucesso antes da seleção por antibióticos foi obtida. Tanto a expressão estável quanto a induzida das diferentes NSPs servem de referência para subsequentes investigações quanto a morfologia mitocondrial, produção de EROSmt e perda de polarização mitocondrial como exemplos.

Além da expressão das NSPs, idealizamos também o uso de shRNA a fim de reduzir a expressão das proteínas DRP1 e MFN2 (**Fig. 12.** C), sendo a última, a partir dos dados obtidos, um gene que aparenta ter papel importante na replicação e relação ZIKV-mitocôndria. De maneira análoga aos vetores de expressão das NSPs, os oligos complementares aos genes contendo a sequência de *hairpin* foram inseridos em plasmídeos pLKO.1 construídos especialmente para tarefa de *knock-down* gênico. Por fim, a disposição deste conjunto de ferramentas pode contribuir de maneira bilateral e ainda mais específica estudos envolvendo as relações entre vírus-mitocôndria, para além dos achados apresentados neste trabalho.



**Figura 12. Uso de ferramentas de biologia molecular para o estudo da interação ZIKV-mitocôndria.** (a) Esquema simplificado demonstrando um possível *pipeline* do uso dos vetores de expressão contendo diferentes NSPs do ZIKV. (b) Imunofluorescência por SDCM dos diferentes vetores de expressão 24h pós transfecção em células HEK293t. A expressão de IFIT2-Flag foi utilizada como controle positivo. (c) Esquema simplificado de uma possibilidade do uso de shRNA para o *knock-down* dos genes de MFN2 e DRP1.

## 1.5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos houve um aumento significativo no número de publicações que descrevem mecanismos demonstrando a participação da mitocôndria em processos biológicos nunca antes evidenciados. Sendo assim, estudos envolvendo a atuação desta organela em processos imunológicos, principalmente da imunidade inata antiviral, ainda contém lacunas de conhecimento importantes. A relação entre mitocôndria-vírus já se demonstrou crítica para o estabelecimento da infecção e sua subsequente patogenia. Se tratando de células que têm sua função primariamente ligada aos processos metabólicos, os astrócitos dependem de maneira vital da função plena de suas mitocôndrias. Indo ao encontro de resultados prévios que demonstram a influência do DENV e o próprio ZIKV quanto a estrutura e consequente função mitocondrial em hepatócitos e neurônios (CHATEL-CHAIX et al., 2016; YANG et al., 2020), os resultados aqui descritos sugerem que uma relação similar também parece ocorrer em astrócitos.

Utilizando culturas primárias de astrócitos humanos e de diferentes linhagens de camundongos, conseguimos vislumbrar diferentes graus de capacidade replicativa do vírus entre os modelos estudados, confirmando e evidenciando dados prévios na literatura. Com isso destacamos a importância da escolha correta de modelos experimentais, principalmente quando focados no estudo da patogenia do ZIKV em células do SNC e em especial quando existem questões acerca da influência do vírus sob o metabolismo e funcionamento mitocondrial celular. De nota, é importante ressaltar que as diferentes culturas celulares utilizadas no presente projeto, com exceção dos astrócitos humanos, apresentaram um nível baixo, porém não necessariamente negligenciável de micróglia e outras células "contaminantes" residuais, o que deve ser levado em consideração durante a interpretação dos dados obtidos, principalmente os que tangem a capacidade de elicitar robustas respostas inflamatórias.

Em sequência, foram encontradas alterações discretas quanto à expressão de genes envolvidos tanto em processos da dinâmica mitocondrial (fissão e fusão) quanto aos componentes do ciclo tricarboxílico em cérebros de neonatos afetados pela SCZ em dados públicos de sequenciamento. Entretanto, análises combinadas evidenciaram o enriquecimento de vias que indicam um certo grau de disfunção mitocondrial, em especial vias relacionadas com fosfolipídios e cardiolipina. A cardiolipina é um lipídio insaturado que tem grande importância para a manutenção da estrutura morfológica principalmente das cristas mitocondriais impactando diretamente no funcionamento da ETC (NAGASHIMA et al., 2019). De fato, um estudo recente que descreve a influência do ZIKV no metabolismo lipídico celular (LEIER et al., 2020) evidencia a diminuição principalmente de cardiolipina e esfingolipídios, os quais têm envolvimento em diversas patologias, principalmente relacionadas ao SNC, como em mutações do gene TAZ, envolvido na biogênese da cardiolipina que tem fenótipos diretamente ligados com a cognição (CHAO et al., 2018). O enriquecimento de vias relacionadas com o equilíbrio redox e iônico a partir das análises baseadas na database MitoCarta, podem em parte explicar tais alterações, visto que lipídios insaturados são, por exemplo, altamente sensíveis à oxidação por radicais livres (AITKEN et al., 2006; HINAREJOS et al., 2020; SNYDER-KELLER et al., 2020). Ainda, as análises levantam a possibilidade do envolvimento da morte celular por ferroptose (GAO et al., 2019) e, direta ou indiretamente, de processos autofágicos, que já foram demonstrados como importantes para a replicação viral (CHIRAMEL; BEST, 2018a).

Ainda de acordo com os dados encontrados nas análises bioinformáticas, os resultados obtidos nos experimentos conduzidos em astrócitos a fim de verificar o grau de despolarização mitocondrial e os níveis de radicais mitocondriais, confirmam os dados encontrados na análise de RNA-seq das amostras humanas. Foi observado de maneira interessante uma cinética diferencial quanto à despolarização mitocondrial nos diferentes modelos de astrócitos. Estudos prévios já destacaram que existem diferenças massivas entre as taxas de respiração mitocondrial em células oriundas de diferentes animais. Estes achados, aliados com o aumento da produção de EROSmt nos diferentes modelos, indicam não somente que a infecção de fato causa disfunção mitocondrial, mas que a resposta antiviral mediada por IFN I tem relação para tal, dado que animais Ifnar-/apresentaram os maiores níveis de EROSmt produzidos quando comparados com suas contrapartes. Dados na literatura já indicam que a resposta de IFN I impacta diretamente no funcionamento mitocondrial (AGOD et al., 2017; CHAO et al., 2019; SHAN; VAZQUEZ; LEWIS, 1990) e, como exemplo, estudos já demonstraram que a produção de EROSmt controla a expressão de IFN I em células dendríticas plasmocitóides (AGOD et al., 2017).

Indo de encontro à elevada produção de EROsmt, estão processos de alteração quanto a morfologia mitocondrial. Processos de fissão quando exacerbados, levam à perda da integridade da rede mitocondrial as quais afetam diretamente a sinalização antiviral dada a diminuição da oligomerização de adaptador MAVS e sua subsequente sinalização (YASUKAWA et al., 2009). Ademais, mitocôndrias disfuncionais normalmente seguem por reciclagem via mitofagia, uma espécie de extensão da via autofágica a fim da remoção de organelas defectivas (NEWMAN; SHADEL, 2018). Neste sentido, também já foi evidenciada a dependência do ZIKV quanto aos processos autofágicos celulares (CHIRAMEL; BEST, 2018b) envolvendo principalmente a modulação da via de mTOR (LIANG et al., 2016), foco de outro projeto do nosso grupo que traz ainda mais indícios de que perturbações em processos autofágicos podem estar relacionados com as alterações aqui discutidas.

Corroborando os dados levantados que indicam fortemente alterações mitocondriais durante a infecção por ZIKV em astrócitos primários, observamos alterações morfológicas mitocondriais ao nível de microscopia de fluorescência nos diferentes modelos. Interessantemente, animais Ifnar<sup>-/-</sup> ausentes do receptor de IFN I, não apresentaram alterações visíveis 72 h.p.i., contrastando com astrócitos SJL e de humanos,

os quais tiveram perfís quase inversos. Os dados apresentados em astrócitos humanos também vão de encontro com achados na literatura que demonstram o alongamento mitocondrial em hepatócitos infectados por ZIKV e DENV (BARBIER et al., 2017) mas mantêm o perfil morfológico encontrado em neurônios (YANG et al., 2020). Em uma análise mais ampla, é possível que o alongamento mitocondrial evidenciado em astrócitos humanos seja um mecanismo de subversão de processos apoptóticos, evitando a saída de fatores como o Citocromo C para o citosol ou ainda, evitando que fragmentos de mtDNA ou RNA interajam com receptores citosólicos desencadeando uma resposta antiviral. É importante ressaltar, porém, que os dados obtidos a partir de microscopia de fluorescência tradicional, não são consideradas técnicas "padrão ouro" para tais análises, podendo deixar brechas em suas interpretações. Esperamos que no futuro, técnicas mais avançadas como microscopia confocal e o *tracking* mitocondrial ao longo do tempo possam esclarecer melhor tais achados.

A avaliação da expressão diferencial de genes envolvidos no controle da dinâmica mitocondrial evidencia um aumento da expressão da proteína MFN2 envolvida na fusão mitocondrial em astrócitos humanos de maneira similar às encontrada em neurônios infectados por ZIKV (YANG et al., 2020). Porém, a avaliação de genes relacionados à dinâmica mitocondrial não substituem ensaios que visam a quantificação proteica das mesmas, as quais são reconhecidas por serem altamente reguladas por modificações póstraducionais (TILOKANI et al., 2018b) como previamente demonstrado (YANG et al., 2020). De fato, foi evidenciado uma redução significativa da abundância da proteína MFN2 em astrócitos humanos após a infecção pelo ZIKV, apresentando resultados totalmente opostos quanto à expressão gênica. Em linha, não somente foi evidenciado o que parece ser a tentativa da restauração dos níveis de MFN2. Levando em conta o contexto de uma infecção viral, a proteína MFN2 já foi demonstrada ser essencial para a modulação de respostas mediadas pelo adaptador MAVS (YASUKAWA et al., 2009), crucial para a sinalização downstream dos receptores MDA-5 e RIG-I além de promover a sobrevivência celular (YU et al., 2015). Não obstante, o DRP1, outra proteína envolvida no controle da dinâmica mitocondrial apresentou a fosforilação em seu resíduo de serina 616 diminuído, o que parece indicar a atividade diminuída da atividade da quinase CDK1/5 essencial para a manutenção do ciclo celular (HAN et al., 2020; KO et al., 2016). É interessante notar que, esses dados vão de encontro com a quebra total do ciclo celular induzida pelo ZIKV em NPCs (RYCHLOWSKA et al., 2022) e que a fosforilação do

resíduo 616 está relacionado com a inibição da clássica função que induz a fragmentação mitocondrial (CHO et al., 2014).

Além dos dados morfológicos e de expressão de genes envolvidos na dinâmica mitocondrial, foi possível observar a elevação da expressão relativa de marcadores tanto nucleares quanto mitocondriais que podem estar refletindo no nível de ativação de fatores de transcrição relacionados com a via de estresse celular e da própria biogênese mitocondrial (GUREEV; SHAFOROSTOVA; POPOV, 2019; PAKOS-ZEBRUCKA et al., 2016) somente em animais Ifnar<sup>-/-</sup>, indicando ainda mais um possível papel da resposta de IFN-1 no controle de processos correlatos.

A totalidade dos dados obtidos nos modelos estudados, quando colocadas em perspectiva pela análise de PCA evidenciam claramente as diferenças encontradas entre os grupos, apresentando uma separação espacial clara. Os grupos de animais WT, resistentes à infecção tiveram seus grupos infectados e controles agrupados e próximos ao grupo animal com maior relação genética (Ifnar-/-). Animais mais susceptíveis, como os Ifnar-/-, apresentaram um alto grau de separação principalmente devido ao nível de despolarização mitocondrial da mesma maneira que os grupos SJL. De maneira interessante, animais SJL se agruparam com os astrócitos primários humanos quanto às características morfológicas e funcionais mitocondriais. Como análises por PCA normalmente têm seu poder por compreenderem um grande número de dados, foi adicionado dados oriundos de astrócitos primários de hamsters infectados ou não por SARS-CoV-2, os quais não apresentam alterações mitocondriais (OLIVEIRA et al., 2021), se mantendo totalmente distanciados dos grupos de camundongos e humanos, evidenciando ainda mais as diferenças entre diferentes modelos animais os quais se devem, aparentemente por seus diferentes *backgrounds* genéticos.

Mecanisticamente, ainda faltam dados na literatura para a total compreensão de tais resultados, porém, um estudo recente que compara a atividade astrocitária de camundongos e humanos deixa evidente que, principalmente ao nível de resposta de IFN, existem grandes diferenças no comportamento da expressão e metabolismo dos diferentes modelos (LI et al., 2021a). Por fim, com os dados utilizados na análise de PCA, foi realizada uma análise de correlação a fim de encontrar padrões e melhor elucidar os dados obtidos. Quanto aos dados puramente mitocondriais, foi possível traçar a correlação positiva entre o nível de despolarização e o tamanho da rede mitocondrial, a qual, não surpreendentemente (DEHESHI et al., 2015), se mostram inversamente correlação à morte

celular. Estas correlações podem ser posteriormente utilizadas para a predição de infecção ou suportar estudos posteriores relacionados além de realçarem possíveis eventos desencadeados pela infecção que possam estar relacionados com sua patogênese.

Indo mais a fundo quanto ao funcionamento mitocondrial durante a infecção, realizamos ensaios de respirometria de alta resolução, os quais nos geraram dados cruciais para o entendimento da atividade mitocondrial e metabolismo glicolítico durante a infecção. Ainda, utilizando da manipulação farmacológica, inibindo processos de fissão mitocondrial (MDIVI-1), podemos vislumbrar que tanto a respiração basal quanto a vazão de elétrons mitocondrial se mostraram reduzidos durante a infecção. Valores os quais tiveram o retorno a níveis comparáveis com os grupos controle durante o tratamento por MDIVI-1. Os efeitos fisiológicos da vazão de elétrons ainda se permanecem em sua grande parte desconhecidos, porém, trabalhos já descrevem certos links entre a vazão de elétrons com a imunidade inata, principalmente pela sinalização de Ca2+ intracelular (NANAYAKKARA; WANG; YANG, 2019). Com isso, ficam em aberto algumas questões como qual seria o estado dos canais de Ca<sup>2+</sup>, ou, até mesmo, qual seria o status das caspases relacionadas com o desencadeamento de processos apoptóticos intrínsecos frente ao ZIKV. Neste ponto, é importante relembrar que a atividade de MDIVI-1 já se mostrou um fármaco consideravelmente inespecífico, apresentando efeitos off-target como a inibição de atividade de outras dinaminas e, além disso, não podemos negligenciar que exista um certo bias frente a relativa alta taxa de morte celular induzida pelo composto. Ademais, trabalhos realizados em neurônios demonstraram sua capacidade de inibir transientemente a atividade e consequente produção de EROSmt pelo complexo I mitocondrial, além de inibir o RET por mecanismos ainda não completamente elucidados (BORDT et al., 2017). Esses efeitos esperados do MDIVI-1 podem explicar a diminuição da replicação viral quando levamos em conta a totalidade dos dados obtidos neste trabalho, porém, estudos especialmente dedicados ao funcionamento do composto MDIVI-1 precisam ser realizados antes que conclusões mais sólidas sejam definidas.

Juntamente com as taxas de respiração mitocondrial, foi medido a atividade da via glicolítica em geral, sendo esta impactada em diversos parâmetros pela infecção. O resultado mais surpreendente foi a elevação das taxas glicolíticas durante o tratamento por MDIVI-1, o qual se mostrou antagônico com dados previamente descritos na literatura (BORDT et al., 2017; DAI et al., 2020). Todavia, é interessante notar que a maioria dos resultados na literatura quanto a atividade glicolítica durante o tratamento por

MDIVI-1 se deu em linhagens celulares transformadas, o qual este trabalho, pelo conhecimento do autor, se mostra o primeiro a vislumbrar tais alterações em astrócitos primários humanos. Parâmetros como a reserva, capacidade, e acidificação não glicolítica se mostraram diminuídos quando comparados com os grupos controle e tratados, sendo os últimos, os que apresentaram atividade glicolítica bem mais elevada como previamente comentado. Em partes, esses resultados podem se dar por se tratar de células terminalmente diferenciadas, tendo em vista que astrócitos detêm taxas de metabolismo em geral mais baixas, quando comparadas com células em divisão, além de apresentarem a capacidade de sobreviver por muito tempo em situações de falha mitocondrial via glicólise em situações fisiológicas (SUPPLIE et al., 2017). Neste ponto, questões como a ativação astrocitária frente a infecção pelo ZIKV impactam no metabolismo geral e refletem em tais resultados ainda se permanecem. Infelizmente, quando consideramos a razão de despolarização mitocondrial em astrócitos humanos juntamente com os dados de respirometria, não conseguimos traçar nenhuma interação, dado a não diferença entre os grupos infectados e controle.

Como o trabalho também foi delimitado a explorar bidirecionalmente a relação patógeno-mitocôndria, após manipulação farmacológica de vias correlatas, foi demonstraram a dependência do ZIKV ao uso de ATP e/ou EROS oriundos do complexo I mitocondrial e de produtos da via glicolítica, refletindo em sua replicação. Esses dados são corroborados por experimentos previamente conduzidos que demonstram a dependência da replicação de diversos vírus como o SARS-CoV-2 (CODO et al., 2020) e o DENV (FONTAINE et al., 2015), os quais aparentam necessitar que estados metabólicos específicos estejam em vigor a fim de estabelecerem seu ciclo. Deste modo, assim como mencionado anteriormente, pela natureza parasítica dos vírus frente ao organismo infectado, os mesmos evoluíram de maneira a sequestrar e manipular diversas vias metabólicas para manutenção de sua replicação (PLAZA et al., 2016). Seguindo essas análises, também foi possível evidenciar diferenças quanto ao nível da resposta imune elicitada pela infecção durante os tratamentos pelos níveis de ISGs expressos. Curiosamente, a inibição da conversão de glutamina para glutamato nas mitocôndrias pelo análogo DON foi o que apresentou um discreto aumento de cópias virais em astrócitos SJL e uma maior redução da resposta antiviral nos diferentes modelos estudados (SJL e Ifnar-/-). O envolvimento da glutamina na replicação viral já foi demonstrado ser de crítica importância para diversos vírus (FONTAINE; CAMARDA;

LAGUNOFF, 2014b; OLIVEIRA et al., 2021) mas ainda carece de informações quanto ao ZIKV da mesma maneira que sua influência na resposta de IFN ainda permanece obscura fora do âmbito linfocítico (BACURAU et al., 2010). Ainda nesse contexto, a atividade de microRNAs durante infecções virais também deve ser considerado. Estudos prévios de nosso (POLONIO; PERON, 2021) e de outros grupos já demonstraram a atividade do miR-302b na modulação das atividades do DRP1, metabolismo da glutamina e da via do IFN-I (YASUKAWA et al., 2020), os tornando interessantes objetos de estudo. Em contraste, e com surpresa, o tratamento das células com o análogo da glicose 2-DG, capaz de bloquear a via glicolítica em sua totalidade, não foram os grupos com os quais a expressão de ISGs foram menores. Nesse sentido, é importante notar que a dada redução não ocorreu em todos ISGs avaliados, provavelmente dado a diferentes programas transcricionais elicitados durante a infecção. Como exemplo, o ISG15, não se mostrou alterado durante os tratamentos o qual já foi demonstrado ser alvo do exploit viral facilitando sua replicação pela degradação da via JAK/STAT (SINGH et al., 2019). Contudo, estudos mais aprofundados como a avaliação de citocinas, estado de ativação de fatores de transcrição, microRNAs e outros fatores capazes de impactar na resposta inata frente ao ZIKV precisam ser feitos.

Neste sentido, nossos resultados indicam o que parece ser uma interessante interação do ZIKV com a sinalização de ácidos nucleicos citosólicos na forma de RNA e principalmente, no contexto deste trabalho, (mt)DNA. Historicamente conhecidos como receptores atuantes frente a infecções microbianas, a via cGAS-STING vem nos últimos anos se revelando como componente principal de diversas outras funções relacionadas com a homeostase de IFN e de ácidos nucleicos (MOTWANI; PESIRIDIS; FITZGERALD, 2019b). A proteína NS1 do ZIKV recentemente foi demonstrada como indutora da degradação de cGAS a fim de diminuir a resposta de IFN I frente a sinalização de dsDNA mitocondrial gerado a partir do estresse da organela durante a infecção (ZHENG et al., 2018) de maneira similar a NS2B do DENV (AGUIRRE et al., 2017). Esses resultados foram obtidos a partir de células humanas da imunidade inata (THP-1) e, deste modo, estudos mais aprofundados necessitam ser realizados para esclarecer se o mesmo mecanismo de evasão adotado pelo ZIKV permanece funcional em astrócitos e, principalmente, em outros organismos. Nesse sentido, os dados apresentados quanto à expressão de genes antivirais durante os tratamentos aparentam ambíguos, visto que o tratamento por compostos que afetam diretamente funções mitocondriais elevam (camundongos) ou levam a diminuição (humanos) da resposta antiviral e ainda, qual a extensão de tais fenômenos na biologia do ZIKV.

Por fim, estabelecemos também uma série de ferramentas moleculares que podem ser de grande auxílio na resposta/confirmação das observações encontradas neste trabalho e entre outras questões que possam surgir. A expressão de proteínas não estruturais do ZIKV já se mostrou de extrema importância no descobrimento de diversas facetas e mecanismos desencadeados pelo vírus, além da compreensão de processos celulares colateralmente (virus as a tool). O uso dessas ferramentas, uma vez que diminui o número de variáveis experimentais por parte da infecção, pode facilitar a interpretação dos dados obtidos assim como esclarecer partes de um todo, neste caso, a infecção pelo ZIKV. Como exemplo, a proteína NS3 do ZIKV parece interagir com componentes da MEM causando a disrupção de respostas inatas (RIEDL et al., 2019). Todavia, interações entre proteínas não estruturais do ZIKV ainda não foram relatadas em terem efeitos diretos quanto a morfologia mitocondrial, o que se espera encontrar em sequência com este trabalho. Como previamente discutido, os efeitos da morfologia mitocondrial quanto a replicação e resposta imune frente ao vírus precisam ser mais claramente elucidados. Para tal, o estabelecimento do knock-down de proteínas como MFN2 e DRP1, que parecem estar afetadas durante a infecção pode ser de grande valia na avaliação de como será o comportamento viral na ausência de tais proteínas. A fins de teorização, esperamos que a ausência da proteína MFN2 afete não somente a replicação viral, mas também na ativação de programas antivirais específicos, principalmente os que dependem do adaptador MAVS, baseados nos resultados deste e de outros trabalhos já disponíveis. Com isso, a produção de shRNAs que auxiliem no controle de variáveis, assim como a expressão específica de proteínas virais, podem nos ajudar a estabelecer melhor as relações exploradas neste trabalho. Contudo, infelizmente devido ao curto tempo para a execução, validação e experimentação de tais ferramentas, o presente trabalho se absteve somente a apresentar as ferramentas de modo geral.

Em suma, os resultados aqui descritos abrem diversas questões sobre a natureza da interação mitocôndria e ZIKV, natureza esta que ainda permanece em sua grande parte desconhecida pelo conhecimento científico atual. Estudos direcionados a fim de esclarecer se tais interações são puramente colaterais também devem ser realizados. Fica evidente, também, as diferenças entre essas interações nos diferentes modelos utilizados, ressaltando uma última vez a importância da escolha dos mesmos, quanto ao seu uso

experimental. Por fim, este trabalho representa um pequeno recorte do microcosmo celular em que a ciência brasileira *per aspera,* tenta chegar *ad astra*.
# **1.6. CONCLUSÕES**

• O ZIKV apresenta perfis diferenciais de tropismo em astrócitos de diferentes organismos;

• A infecção pelo ZIKV, especialmente em humanos induz estresse mitocondrial e a geração de EROSmt;

• O estresse induzido pelo ZIKV causa alterações na morfologia mitocondrial, as quais podem refletir diretamente na sua função;

• A infecção por ZIKV causa alterações no metabolismo de glicose e na respiração mitocondrial;

• O ZIKV induz a degradação da proteína MFN2 em astrócitos primários humanos;

- As alterações mitocondriais induzidas pelo ZIKV são espécie dependentes;
- A resposta antiviral celular frente ao ZIKV depende das funções mitocondriais;
- A replicação do ZIKV está ligada ao metabolismo de glicose e glutamina.



Figura 11. A infecção pelo ZIKV em astrócitos primários apresenta relação bilateral com a atividade mitocondrial. Astrócitos primários humanos e de diferentes modelos murinos apresentam níveis diferenciais quanto às alterações mitocondriais causadas pela

infecção por ZIKV. Da mesma maneira, a resposta inata antiviral e a capacidade replicativa do vírus se mostraram dependentes do mal funcionamento mitocondrial.

# 1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOD, Z. et al. Regulation of type I interferon responses by mitochondria-derived reactive oxygen species in plasmacytoid dendritic cells. **Redox biology**, v. 13, p. 633–645, 1 out. 2017.

AGUIRRE, S. et al. Dengue virus NS2B protein targets cGAS for degradation and prevents mitochondrial DNA sensing during infection. **Nature Microbiology 2017 2:5**, v. 2, n. 5, p. 1–11, 27 mar. 2017.

AHLMANN-ELTZE, C.; HUBER, W. glmGamPoi: Fitting Gamma-Poisson generalized linear models on single cell count data. **Bioinformatics**, v. 36, n. 24, p. 5701–5702, 2020.

AITKEN, R. J. et al. Cis-unsaturated fatty acids stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 91, n. 10, p. 4154–4163, 2006.

ALFANO, C. et al. The unfolded protein response: A key player in zika virusassociated congenital microcephaly. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 13, 29 jan. 2019.

AL-MUFTI, F. et al. Acute Cerebrovascular Disorders and Vasculopathies Associated with Significant Mortality in SARS-CoV-2 Patients Admitted to The Intensive Care Unit in The New York Epicenter. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 30, n. 2, p. 105429, 2021.

ARAUJO, D. B. et al. SARS-CoV-2 isolation from the first reported patients in brazil and establishment of a coordinated task network. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, n. 12, p. 1–8, 2020.

AUDI, A. et al. Seasonality of Respiratory Viral Infections: Will COVID-19 Follow Suit? **Frontiers in Public Health**, v. 8, n. September, p. 1–8, 2020.

AWOGBINDIN, I. O. et al. Microglial Implications in SARS-CoV-2 Infection and COVID-19: Lessons From Viral RNA Neurotropism and Possible Relevance to Parkinson's Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 15, n. June, 2021.

BACURAU, R. F. P. et al. Changes in Glucose and Glutamine Lymphocyte Metabolisms Induced by Type I Interferon α. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 2010.

BARBIER, V. et al. Dengue virus induces mitochondrial elongation through impairment of Drp1-triggered mitochondrial fission. **Virology**, v. 500, p. 149–160, 1 jan. 2017.

BARTON, L. M. et al. COVID-19 Autopsies, Oklahoma, USA. American journal of clinical pathology, p. 1–9, 2020.

BASTARD, P. et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. **Science**, v. 370, n. 6515, 2020.

BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. The Lancet, v. 6736, n. 17, 2017.

BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 6, p. 724–738, 2011.

BG, K. A yellow fever epizootic in Zika Forest, Uganda, during 1972: Part 2: Monkey Serology. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 71, n. 4, p. 300–3, 1977.

BHARADWAJ, S. et al. SARS-CoV-2 and Glutamine: SARS-CoV-2 Triggered Pathogenesis via Metabolic Reprograming of Glutamine in Host Cells. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. January, p. 1–14, 2021.

BITTNER, C. X. High resolution measurement of the glycolytic rate. Frontiers in Neuroenergetics, v. 2, n. September, p. 1–11, 2010.

BORDT, E. A. et al. The Putative Drp1 Inhibitor Mdivi-1 is a Reversible MitochondrialComplex I Inhibitor that Modulates Reactive Oxygen Species. **Developmental cell**, v. 40, n. 6, p. 583, 3 mar. 2017.

BOUZIER-SORE, A.-K.; PELLERIN, L. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, n. October, p. 1–13, 2013.

BREDA, C. N. DE S. et al. **Mitochondria as central hub of the immune system**. **Redox Biology**Elsevier B.V., , 1 set. 2019.

BUSHONG, E. A.; MARTONE, M. E.; ELLISMAN, M. H. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. **International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 73–86, 2004.

CARMO, G. M. I. DO et al. Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika em nascidos vivos no Brasil: descrição da distribuição dos casos notificados e confirmados em 2015-2016. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, n. 2, p. 1–12, 2018.

CENTONZE, D. et al. The link between inflammation, synaptic transmission and neurodegeneration in multiple sclerosis. **Cell death and differentiation**, v. 17, n. 7, p. 1083–91, jul. 2010.

CHAMBERS, J. W.; MAGUIRE, T. G.; ALWINE, J. C. Glutamine Metabolism Is Essential for Human Cytomegalovirus Infection. **Journal of Virology**, v. 84, n. 4, p. 1867–1873, 2010.

CHAN, J. F. W. et al. Zika Virus Infection in Dexamethasone-immunosuppressed Mice Demonstrating Disseminated Infection with Multi-organ Involvement Including Orchitis Effectively Treated by Recombinant Type I Interferons. **EBioMedicine**, v. 14, p. 112–122, 1 dez. 2016.

CHAO, C. C. et al. Metabolic Control of Astrocyte Pathogenic Activity via cPLA2-MAVS. Cell, v. 179, n. 7, p. 1483- 1498.e22, 2019.

CHAO, H. et al. Disentangling oxidation/hydrolysis reactions of brain mitochondrial cardiolipins in pathogenesis of traumatic injury. **JCI insight**, v. 3, n. 21, 2 nov. 2018.

CHATEL-CHAIX, L. et al. Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. **Cell Host and Microbe**, v. 20, n. 3, p. 342–356, 14 set. 2016.

CHEN, Q.; SUN, L.; CHEN, Z. J. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. **Nature Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1142–1149, 2016.

CHEN, R. et al. The Spatial and Cell-Type Distribution of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Human and Mouse Brains. **Frontiers in Neurology**, v. 11, n. January, 2021.

CHIRAMEL, A. I.; BEST, S. M. Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. Virus ResearchElsevier B.V., , 2 ago. 2018a.

CHIRAMEL, A. I.; BEST, S. M. Role of Autophagy in Zika Virus Infection and Pathogenesis. **Virus research**, v. 254, p. 34, 2 ago. 2018b.

CHO, B. et al. CDK5-dependent inhibitory phosphorylation of Drp1 during neuronal maturation. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 46, n. 7, p. e105, 2014.

CHU, H. et al. Host and viral determinants for efficient SARS-CoV-2 infection of the human lung. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2021.

CODO, A. C. et al. Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 $\alpha$ /Glycolysis-Dependent Axis. Cell Metabolism, v. 32, n. 3, p. 437, 1 set. 2020.

COYNE, C. B. **STING'ing Zika virus in neurons**. **Nature Microbiology**Nature Publishing Group, 1 set. 2018.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature 2016 534:7606**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 11 maio 2016.

DAI, W. et al. Mitochondrial division inhibitor (mdivi-1) decreases oxidative metabolism in cancer. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 9, p. 1288, 4 abr. 2020.

DE OLIVEIRA, L. G. et al. Unraveling the Link Between Mitochondrial Dynamics and Neuroinflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 16 mar. 2021.

DEHESHI, S. et al. Changes in mitochondrial morphology induced by calcium or rotenone in primary astrocytes occur predominantly through ros-mediated remodeling. **Journal of Neurochemistry**, v. 133, n. 5, p. 684–699, 1 jun. 2015.

DEL BRUTTO, O. H. et al. Cognitive decline among individuals with history of mild symptomatic SARS-CoV-2 infection: A longitudinal prospective study nested to a population cohort. **European Journal of Neurology**, n. February, p. 1–9, 2021.

DONG, X. X.; WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. Acta Pharmacologica Sinica, 23 abr. 2009.

DONG, Y.; KALUEFF, A. V.; SONG, C. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium overload and endoplasmic reticulum stress are involved in interleukin-1beta-induced neuronal apoptosis in rat hippocampus. **Journal of Neuroimmunology**, v. 307, p. 7–13, 15 jun. 2017.

DOSSI, E.; VASILE, F.; ROUACH, N. Human astrocytes in the diseased brain. **Brain Research Bulletin**, v. 136, p. 139–156, 2018.

DZAMBA, D.; HONSA, P.; ANDEROVA, M. NMDA Receptors in Glial Cells: Pending Questions. **Current Neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 250–262, 25 abr. 2013.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicologic Pathology, 2007.

ESKANDAR, E. N. et al. Neurologic Syndromes Predict Higher In-Hospital Mortality in COVID-19. **Neurology**, v. 96, n. 11, p. e1527–e1538, 2021.

EYMIEUX, S. et al. Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in Vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 7, p. 3565–3576, 2021.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.

FERNANDES, A. et al. Short-term free-floating slice cultures from the adult human brain. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2019, n. 153, p. 1–9, 2019.

FINAK, G. et al. MAST: A flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 1–13, 2015.

FINKEL, Y. et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. Nature, v. 589, n. 7840, p. 125–130, 2021.

FONTAINE, K. A. et al. Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. **Journal of Virology**, v. 89, n. 4, p. 2358–2366, 15 fev. 2015.

FONTAINE, K. A.; CAMARDA, R.; LAGUNOFF, M. Vaccinia Virus Requires Glutamine but Not Glucose for Efficient Replication. **Journal of Virology**, v. 88, n. 8, p. 4366–4374, 2014a.

FONTAINE, K. A.; CAMARDA, R.; LAGUNOFF, M. Vaccinia Virus Requires Glutamine but Not Glucose for Efficient Replication. **Journal of Virology**, v. 88, n. 8, p. 4366, 15 abr. 2014b.

FRAGIEL, M. et al. Incidence, clinical, risk factors and outcomes of Guillain-Barré in Covid-19. Annals of Neurology, v. 89, n. 3, p. 598–603, 2021.

GAO, G. F. et al. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular

phylogenies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 2, p. 548–553, 2002.

GAO, M. et al. Role of Mitochondria in Ferroptosis. **Molecular Cell**, v. 73, n. 2, p. 354-363.e3, 17 jan. 2019.

GARCÍA, C. C. et al. Cellular Organelles Reorganization During Zika Virus Infection of Human Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1558, 8 jul. 2020.

GERKIN, R. C. et al. Recent smell loss is the best predictor of COVID-19 among individuals with recent respiratory symptoms. **Chemical Senses**, v. 46, n. December 2020, p. 1–12, 2021.

GORMAN, M. J. et al. An Immunocompetent Mouse Model of Zika Virus Infection. Cell Host and Microbe, v. 23, n. 5, p. 672- 685.e6, 9 maio 2018.

GUAN, W.-J. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **The New England journal of medicine**, p. 1–13, 2020.

GUPTA, A. et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. Nature Medicine, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, 2020.

GUREEV, A. P.; SHAFOROSTOVA, E. A.; POPOV, V. N. Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: Interaction between the Nrf2 and PGC-1α signaling pathways. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. MAY, p. 435, 2019.

HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

HAFEMEISTER, C.; SATIJA, R. Normalization and variance stabilization of singlecell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. **bioRxiv**, p. 1–15, 2019.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. Journal of Virology, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

HAN, H. et al. PINK1 phosphorylates Drp1S616 to regulate mitophagy-independent mitochondrial dynamics. **EMBO Reports**, v. 21, n. 8, 8 ago. 2020.

HAO, Y. et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. Cell, v. 184, n. 13, p. 3573-3587.e29, 2021.

HARRIS, J. et al. **Mitophagy and the release of inflammatory cytokines**. **Mitochondrion**Elsevier B.V., , 1 jul. 2018.

HAY, M. et al. Clinical development success rates for investigational drugs. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 40–51, jan. 2014.

HERTZ, L.; PENG, L.; DIENEL, G. A. Energy metabolism in astrocytes: High rate of oxidative metabolism and spatiotemporal dependence on glycolysis/glycogenolysis. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 27, n. 2, p. 219–249, 2007.

HINAREJOS, I. et al. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neuroinflammation in neurodegeneration with brain iron accumulation (Nbia).

AntioxidantsMDPI AG, , 1 out. 2020.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Article SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. p. 271–280, 2020.

IMAI, M. et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 28, p. 16587–16595, 2020.

JIANG, J. et al. scREAD: A Single-Cell RNA-Seq Database for Alzheimer's Disease. **iScience**, v. 23, n. 11, p. 101769, 2020.

JORGAČEVSKI, J. et al. ZIKV Strains Differentially Affect Survival of Human Fetal Astrocytes versus Neurons and Traffic of ZIKV-Laden Endocytotic Compartments. **Scientific Reports 2019 9:1**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 30 maio 2019.

JULANDER, J. G.; SIDDHARTHAN, V. Small-Animal Models of Zika Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl\_10, p. S919–S927, 16 dez. 2017.

KAMER, K. J.; MOOTHA, V. K. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. Nature Reviews Molecular Cell BiologyNature Publishing Group, , 21 ago. 2015.

KHALID, M. et al. Zika Virus: Immune Evasion Mechanisms, Currently Available Therapeutic Regimens, and Vaccines. **Viral Immunology**, v. 30, n. 10, p. 682–690, 2017.

KIM, J. et al. VDAC oligomers form mitochondrial pores that release small mtDNA fragments and promote lupus-like disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 366, n. 6472, p. 1531, 20 dez. 2019.

KO, A. R. et al. The Differential DRP1 Phosphorylation and Mitochondrial Dynamics in the Regional Specific Astroglial Death Induced by Status Epilepticus. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, n. MAY, 18 maio 2016.

KOOL, J. L. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. p. 2536–2543, 2009.

KRAUS, F.; RYAN, M. T. The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. Journal of Cell ScienceCompany of Biologists Ltd, , 2017.

LAMONICA, B. E. et al. OSVZ progenitors in the human cortex: an updated perspective on neurodevelopmental disease. **Current opinion in neurobiology**, v. 22, n. 5, p. 747–753, out. 2012.

LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. Cell Host & Microbe, v. 19, n. 5, p. 720–730, 11 maio 2016.

LEIER, H. C. et al. A global lipid map defines a network essential for Zika virus replication. **Nature Communications 2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 21 jul. 2020.

LEPELLEY, A.; WAI, T.; CROW, Y. J. Mitochondrial Nucleic Acid as a Driver of

Pathogenic Type I Interferon Induction in Mendelian Disease. Frontiers in Immunology, v. 12, n. August, p. 1–10, 2021.

LI, C. et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 1, p. 120–126, 2016.

LI, J. et al. Conservation and divergence of vulnerability and responses to stressors between human and mouse astrocytes. **Nature Communications 2021 12:1**, v. 12, n. 1, p. 1–20, 25 jun. 2021a.

LI, J. et al. Conservation and divergence of vulnerability and responses to stressors between human and mouse astrocytes. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2021b.

LIANG, Q. et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 663–671, 2016.

LJOSA, V.; CARPENTER, A. E. Introduction to the Quantitative Analysis of Two-Dimensional Fluorescence Microscopy Images for Cell-Based Screening. **PLOS Computational Biology**, v. 5, n. 12, p. e1000603, dez. 2009.

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 6736, n. 20, p. 1–10, 2020.

MAEKAWA, H. et al. Mitochondrial Damage Causes Inflammation via cGAS-STING Signaling in Acute Kidney Injury. **Cell Reports**, v. 29, n. 5, p. 1261-1273.e6, 29 out. 2019.

MAIA, M. et al. Zika: neurological and ocular findings in infant without microcephaly. **The Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2502, 2016.

MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. ER stress and Its functional link to mitochondria: Role in cell survival and death. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 9, p. 1–13, 2011.

MAO, L. et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. **JAMA Neurology**, v. 77, n. 6, p. 683–690, 2020.

MARINESCU, I. et al. Sars-cov-2 infection in patients with serious mental illness and possible benefits of prophylaxis with memantine and amantadine. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 61, n. 4, p. 1007–1022, 2020.

MARSHALL, J. J.; MASON, J. O. Mouse vs man: Organoid models of brain development & disease. **Brain Research**, v. 1724, p. 146427, 1 dez. 2019.

MARTÍNEZ-REYES, I.; CHANDEL, N. S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. **Nature Communications 2020 11:1**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 3 jan. 2020.

MCBRIDE, H. M.; NEUSPIEL, M.; WASIAK, S. Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. Current Biology, 25 jul. 2006.

MCNAB, F. et al. Type I interferons in infectious disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 2, p. 87–103, 2015.

MEINHARDT, J. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. **Nature Neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 168–175, 2021.

MENDES, N. D. et al. Free-floating adult human brain-derived slice cultures as a model to study the neuronal impact of Alzheimer's disease-associated A $\beta$  oligomers. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 307, p. 203–209, 2018.

MENG, G. et al. Mitophagy promotes replication of oncolytic Newcastle disease virus by blocking intrinsic apoptosis in lung cancer cells. **Oncotarget**, v. 5, n. 15, p. 6365–6374, 2014.

MERAD, M. et al. The immunology and immunopathology of COVID-19. Science, v. 375, n. 6585, p. 1122–1127, 2022.

MI, H. et al. Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). **Nature Protocols**, v. 14, n. 3, p. 703–721, 2019.

MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081–1091, 2016.

MOFFAT, J. et al. A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. **Cell**, v. 124, n. 6, p. 1283–1298, 24 mar. 2006.

MOTWANI, M.; PESIRIDIS, S.; FITZGERALD, K. A. DNA sensing by the cGAS– STING pathway in health and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 11, p. 657– 674, 2019a.

MOTWANI, M.; PESIRIDIS, S.; FITZGERALD, K. A. **DNA sensing by the cGAS**–**STING pathway in health and disease**. **Nature Reviews Genetics**Nature Publishing Group, , 1 nov. 2019b.

MURUGAN, M.; LING, E.-A.; KAUR, C. Glutamate Receptors in Microglia. CNS & Neurological Disorders - Drug Targets, v. 12, n. 6, p. 773–784, 27 dez. 2013.

NAGASHIMA, S. et al. MITOL deletion in the brain impairs mitochondrial structure and ER tethering leading to oxidative stress. **Life Science Alliance**, v. 2, n. 4, 2019.

NAGU, P. et al. CNS implications of COVID-19: A comprehensive review. **Reviews in the Neurosciences**, v. 32, n. 2, p. 219–234, 2021.

NANAYAKKARA, G. K.; WANG, H.; YANG, X. Proton leak regulates mitochondrial reactive oxygen species generation in endothelial cell activation and inflammation - A novel concept. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 662, p. 68, 2 fev. 2019.

NASIRUDEEN, A. M. A. et al. RIG-i, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 1, 2011.

NEWMAN, L. E.; SHADEL, G. S. Pink1/Parkin link inflammation, mitochondrial

**stress, and neurodegeneration**. **The Journal of cell biology**NLM (Medline), , 1 out. 2018.

NUGENT, E. K. et al. Zika Virus: Epidemiology, Pathogenesis and Human Disease. American Journal of the Medical Sciences, v. 353, n. 5, p. 466–473, 2017.

OLIVEIRA, D. B. L. et al. Persistence and Intra-Host Genetic Evolution of Zika Virus Infection in Symptomatic Adults: A Special View in the Male Reproductive System. **Viruses**, v. 10, p. 615, 2018.

OLIVEIRA, L. G. DE et al. SARS-CoV-2 Infection Impacts Carbon Metabolism and Depends on Glutamine for Replication in Syrian Hamster Astrocytes. **bioRxiv**, p. 2021.10.23.465567, 24 out. 2021.

PAKOS-ZEBRUCKA, K. et al. The integrated stress response. **EMBO Reports**, v. 17, n. 10, p. 1374, out. 2016.

PELVIG, D. P. et al. Neocortical glial cell numbers in human brains. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 11, p. 1754–1762, 2008.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature 2018 560:7720**, v. 560, n. 7720, p. 573–581, 29 ago. 2018.

PINTO, B. G. G. et al. ACE2 expression is increased in the lungs of patients with comorbidities associated with severe COVID-19. **Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 4, p. 556–563, 2020.

PIRAS, I. S. et al. Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder. **Brain, behavior, and immunity**, v. 38, p. 91–9, 2014.

PLAZA, J. J. G. et al. **Role of metabolism during viral infections, and crosstalk with the innate immune system**. **Intractable and Rare Diseases Research**International Advancement Center for Medicine and Health Research, 2016.

POTOKAR, M.; JORGAČEVSKI, J.; ZOREC, R. Astrocytes in flavivirus infections. International Journal of Molecular SciencesMDPI AG, , 2019.

RAMBOLD, A. S.; PEARCE, E. L. Mitochondrial Dynamics at the Interface of Immune Cell Metabolism and Function. **Trends in Immunology**, v. 39, n. 1, p. 6–18, 2018.

REHMANI, R. et al. Spectrum of neurologic & neuroimaging manifestation in COVID-19. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 13, p. 100238, 2021.

REIKINE, S.; NGUYEN, J. B.; MODIS, Y. Pattern recognition and signaling mechanisms of RIG-I and MDA5. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. JUL, p. 1–7, 2014.

REMSIK, J. et al. Inflammatory Leptomeningeal Cytokines Mediate COVID-19 Neurologic Symptoms in Cancer Patients. **Cancer Cell**, v. 39, n. 2, p. 276-283.e3, 2021.

RYCHLOWSKA, M. et al. Zika Virus Induces Mitotic Catastrophe in Human Neural

Progenitors by Triggering Unscheduled Mitotic Entry in the Presence of DNA Damage While Functionally Depleting Nuclear PNKP. **Journal of virology**, v. 96, n. 9, 11 maio 2022.

S, S. et al. Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. **The New England journal of medicine**, v. 375, n. 19, p. 1907–1909, 10 nov. 2016.

SCHILDGE, S. et al. Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. Journal of Visualized Experiments, n. 71, p. 1–7, 2013.

SHAN, B.; VAZQUEZ, E.; LEWIS, J. A. Interferon selectively inhibits the expression of mitochondrial genes: a novel pathway for interferon-mediated responses. **The EMBO Journal**, v. 9, n. 13, p. 4307, 1990.

SMITH, G.; GALLO, G. To mdivi-1 or not to mdivi-1: Is that the question? **Developmental neurobiology**, v. 77, n. 11, p. 1260, 1 nov. 2017.

SNYDER-KELLER, A. et al. Brain Iron Accumulation and the Formation of Calcifications After Developmental Zika Virus Infection. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, v. 79, n. 7, p. 767–776, 1 jul. 2020.

STEFANIK, M. et al. Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. **BMC Neuroscience**, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2018.

STOBART, J. L.; ANDERSON, C. M. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, n. MAR, 26 mar. 2013.

SUPPLIE, L. M. et al. Respiration-Deficient Astrocytes Survive As Glycolytic Cells In Vivo. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 16, p. 4231, 4 abr. 2017.

TAY, M. Z. et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020.

THAI, M. et al. MYC-induced reprogramming of glutamine catabolism supports optimal virus replication. **Nature Communications**, v. 6, p. 1–9, 2015.

TIAN, J. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. **Nature**, 2020.

TILOKANI, L. et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. **Essays in Biochemistry**, v. 62, p. 341–360, 2018a.

TILOKANI, L. et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. **Essays in Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 341, 20 jul. 2018b.

VALENTE, A. J. et al. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. **Acta Histochemica**, v. 119, n. 3, p. 315–326, 1 abr. 2017.

VAN DEN POL, A. N. et al. Neurobiology of Disease Zika Virus Targeting in the Developing Brain. 2017.

VASILE, F.; DOSSI, E.; ROUACH, N. Human astrocytes: structure and functions in

the healthy brain. Brain Structure and Function, v. 222, n. 5, p. 2017–2029, 2017.

VERAS, F. P. et al. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. Journal of Experimental Medicine, v. 217, n. 12, dez. 2020.

WANG, C.; YOULE, R. J. The Role of Mitochondria. Annual Review of Genetics, 2009.

WANG, L. et al. Progress in Research on SARS-CoV-2 Infection Causing Neurological Diseases and Its Infection Mechanism. **Frontiers in Neurology**, v. 11, n. January, p. 1–9, 2021.

WANG, Y.; QIN, Z. H. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. **Apoptosis**, v. 15, n. 11, p. 1382–1402, nov. 2010.

WAUTERS, E. et al. Discriminating mild from critical COVID-19 by innate and adaptive immune single-cell profiling of bronchoalveolar lavages. **Cell Research**, n. November 2020, 2021.

WEST, A. P.; SHADEL, G. S.; GHOSH, S. Mitochondria in innate immune responses. Nature Reviews Immunology 2011 11:6, v. 11, n. 6, p. 389–402, 20 maio 2011.

WHITAKER, M. et al. Persistent COVID-19 symptoms in a community study of 606,434 people in England. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2022.

WHO. Zika Virus Fact Sheet. WPRO Fact Sheets, v. 11, n. 1, p. 1-3, 2016.

WITKOWSKI, M. et al. Untimely TGF $\beta$  responses in COVID-19 limit antiviral functions of NK cells. **Nature**, v. 600, n. 7888, p. 295–301, 2021.

WU, J. et al. SARS-CoV-2 ORF9b inhibits RIG-I-MAVS antiviral signaling by interrupting K63-linked ubiquitination of NEMO. **Cell Reports**, v. 34, n. 7, p. 108761, 2021.

WUERTZ, K. M. G. et al. STING is required for host defense against neuropathological West Nile virus infection. **PLoS Pathogens**, v. 15, n. 8, 2019.

YANG, A. C. et al. Dysregulation of brain and choroid plexus cell types in severe COVID-19. **Nature**, v. 595, n. 7868, p. 565–571, 2021.

YANG, S. et al. Zika Virus-Induced Neuronal Apoptosis via Increased Mitochondrial Fragmentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 3316, 23 dez. 2020.

YASUKAWA, K. et al. Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. Science Signaling, v. 2, n. 84, p. ra47–ra47, 18 ago. 2009.

YESILKAYA, U. H.; SEN, M.; BALCIOGLU, Y. H. COVID-19-related cognitive dysfunction may be associated with transient disruption in the DLPFC glutamatergic pathway. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 87, p. 153–155, 2021.

YIN, X. et al. MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells. **Cell Reports**, v. 34, n. 2, 2021.

YU, C. Y. et al. Dengue Virus Impairs Mitochondrial Fusion by Cleaving Mitofusins.

PLOS Pathogens, v. 11, n. 12, p. e1005350, 2015.

ZHANG, L.; QIN, Y.; CHEN, M. Viral strategies for triggering and manipulating mitophagy. AutophagyTaylor and Francis Inc., , 3 out. 2018.

ZHANG, Z.; RONG, L.; LI, Y. P. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis. Oxidative medicine and cellular longevityNLM (Medline), , 2019.

ZHAO, X.; BHATTACHARYYA, A. Human Models Are Needed for Studying Human Neurodevelopmental Disorders. **American Journal of Human Genetics**, v. 103, n. 6, p. 829, 6 dez. 2018.

ZHENG, Y. et al. Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1-caspase-1 axis. **The EMBO Journal**, v. 37, n. 18, 14 set. 2018.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, 2020.

### 2.1 CAPÍTULO II - SARS-COV-2 INFECTION IMPACTS CARBON METABOLISM AND DEPENDS ON GLUTAMINE FOR REPLICATION IN SYRIAN HAMSTER ASTROCYTES

Lilian Gomes de Oliveira<sup>1,2+</sup>, **Yan de Souza Angelo**<sup>1,2+</sup>, Pedro Yamamoto<sup>1,2</sup>, Victor Corasolla Carregari<sup>3</sup>, Fernanda Crunfli<sup>3</sup>, Guilherme Reis-de-Oliveira<sup>3</sup>, Lícia Costa<sup>3</sup>, Pedro Henrique Vendramini<sup>3</sup>, Érica Almeida Duque<sup>4</sup>, Nilton Barreto dos Santos<sup>4, \*</sup>, Egidi Mayara Firmino<sup>5</sup>, Isadora

Marques Paiva<sup>5</sup>, Glaucia Maria Almeida<sup>6</sup>, Adriano Sebollela<sup>6</sup>, Carolina Manganeli Polonio<sup>1,2</sup>, Nagela Ghabdan Zanluqui<sup>1,2</sup>, Marília Garcia de Oliveira<sup>1</sup>, Patrick da Silva<sup>1,2</sup>, Gustavo Gastão Davanzo<sup>7</sup>, Marina Caçador Ayupe<sup>8</sup>, Caio Loureiro Salgado<sup>8</sup>, Antônio Francisco de Souza Filho<sup>9</sup>, Marcelo Valdemir de Araújo<sup>9</sup>, Taiana Tainá Silva-Pereira<sup>9</sup>, Angélica Cristine de Almeida Campos<sup>10</sup>, Luiz Gustavo Bentim Góes<sup>10</sup>, Marielton dos Passos Cunha<sup>10</sup>, Elia Garcia Caldini<sup>11</sup>, Maria Regina D'Império Lima<sup>12</sup>, Denise Morais Fonseca<sup>8</sup>, Ana Márcia de Sá Guimarães<sup>9</sup>, Paola Camargo Minoprio<sup>10</sup>, Carolina Demarchi Munhoz<sup>4</sup>, Cláudia Madalena Cabrera Mori<sup>13</sup>, Pedro Manoel Moraes-Vieira<sup>7</sup>, Thiago Mattar Cunha<sup>5</sup>, Daniel Martins-de-Souza<sup>3,14,15,16</sup>, Jean Pierre Schatzmann Peron<sup>1,2,17</sup>.

<sup>1</sup> Neuroimmune Interactions Laboratory, Institute of Biomedical Science, Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil CEP 05508-000.

<sup>2</sup> Neuroimmunology of Arboviruses Laboratory, Scientific Platform Pasteur, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil CEP 05508-020.

<sup>3</sup> Laboratory of Neuroproteomics, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil CEP 130838-62.

<sup>4</sup> Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil CEP 05508-000.

<sup>5</sup> Center for Research in Inflammatory Diseases (CRID); Department of Pharmacology -Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil CEP 14048-900. <sup>6</sup> Department of Biocehmistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil. CEP 01448-900.

<sup>7</sup> Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil CEP 130838-62.

<sup>8</sup> Laboratory of Mucosal Immunology, Department of Immunology - Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil CEP 05508-000.

<sup>9</sup>Laboratory of Applied Research in Mycobacteria, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil CEP 05508-000.

<sup>10</sup> Scientific Platform Pasteur - USP, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil CEP 05508-020.

<sup>11</sup>Laboratory of Cellular Biology (LIM 59), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP CEP 01246-903 Brazil.

<sup>12</sup> Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil CEP 05508-000.

<sup>13</sup> Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, São Paulo, SP, Brazil CEP 05508-270.

<sup>14</sup> Experimental Medicine Research Cluster (EMRC), University of Campinas, Campinas, SP, Brazil CEP 13083-862.

<sup>15</sup> D'Or Institute for Research and Education (IDOR), São Paulo, SP, Brazil CEP 04502-001.

<sup>16</sup> Instituto Nacional de Biomarcadores em Neuropsiquiatria (INBION), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, São Paulo, SP, Brazil CEP 05303-903.

<sup>17</sup> Immunopathology and Allergy Post Graduate Program, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, SP CEP 01246-903 Brazil.

<sup>+</sup> These authors contributed equally to this work.

\**In memoriam* of a great scientist and human being that lost the battle against COVID-19.

#### **2.2 ABSTRACT**

COVID-19 causes more than million deaths worldwide. Although much is understood about the immunopathogenesis of the lung disease, a lot remains to be known on the neurological impact of COVID-19. Here we evaluated immunometabolic changes using astrocytes *in vitro* and dissected brain areas of SARS-CoV-2 infected Syrian hamsters. We show that SARS-CoV-2 alters proteins of carbon metabolism, glycolysis, and synaptic transmission, many of which are altered in neurological diseases. Real-time respirometry evidenced hyperactivation of glycolysis, further confirmed by metabolomics, with intense consumption of glucose, pyruvate, glutamine, and alpha ketoglutarate. Consistent with glutamine reduction, the blockade of glutaminolysis impaired viral replication and inflammatory response *in vitro*. SARS-CoV-2 was detected *in vivo* in hippocampus, cortex, and olfactory bulb of intranasally infected animals. Our data evidence an imbalance in important metabolic molecules and neurotransmitters in infected astrocytes. We suggest this may correlate with the neurological impairment. **Keywords:** SARS-CoV2, COVID-19, neuropathology, glutamine, proteomics.

#### **2.3 INTRODUCTION**

Human coronaviruses are enveloped 30Kb single-stranded (+) RNA viruses and the causative agent of common cold and severe acute respiratory syndrome (SARS). Six members of the *coronaviridae* family are capable of infecting humans, considered of low (HCoV 229E, HCoV NL63, HCoV HKU1 and CoV OC43) or high (SARS-CoV, MERS-CoV and SARS-CoV2) pathogenicity(AUDI et al., 2020). SARS-CoV-2 pandemic started in December 2019 in Wuhan, China after the probable spill over from bats due to mutations of the spike proteins (GUAN et al., 2020; TIAN et al., 2020).

Mild disease is observed in most patients, who develop fever, headache, and coughing. Some patients, however, evolve to severe acute respiratory syndrome (SARS), characterized by lung inflammation with intense myeloid cellular inflammatory infiltrate, hyaline membrane formation and alveolitis, clearly evidenced by lung magnetic resonance imaging (MRI) (BARTON et al., 2020; TIAN et al., 2020; ZHOU et al., 2020).

This results in dyspnea, difficult breathing, and low oxygen saturation. Most severe cases evolve with cytokine storm and systemic organ failure (LU et al., 2020), mainly in people with comorbidities such as hypertension, obesity, and diabetes, probably due to either altered immune responses (BASTARD et al., 2020; WITKOWSKI et al., 2021) or to the higher expression of angiotensin converting enzyme-2 (ACE-2) in the lungs (PINTO et al., 2020). Since January 30<sup>th</sup>, 2020, when the WHO declared a state of emergency and international concern, more than 6.2 million people died of COVID-19.

Viral particles invade host cells using its Receptor Binding Domain (RBD) of the spike protein through the interacting with Angiotensin Converting Enzyme-2 (ACE-2) expressed mostly on type II pneumocytes but also on other cell types, including endothelial cells, astrocytes, enterocytes and many others (CHEN et al., 2021; CHU et al., 2021). Further, spike is cleaved in subunits S1 and S2 by the protease Transmembrane Protease Serine 2 (TMPRSS2) (HOFFMANN et al., 2020) on the surface of host cells, promoting the fusion with cell membrane for further release of the genome into the cytoplasm. In the cytoplasm, Open Reading Frames 1a and 1b (ORF1a and ORF1b) are translated from the (+) RNA strand into 16 non-structural proteins, whereas (-) RNA strands are used as template for replication and for the translation of sub-genomic RNAs. Sub-genomic RNAs are then translated into structural proteins, as spike (S), envelope (E), nucleocapsid (N) and membrane (M), that are assembled into viral particles and released to the extracellular space (FINKEL et al., 2021). During this process, viral RNA may be sensed by innate immunity sensors, as RIG-I (WU et al., 2021) and MDA-5 (NASIRUDEEN et al., 2011; YIN et al., 2021) leading to inflammasome activation and cytokine secretion. It triggers signaling pathways that culminate in the production of proinflammatory and anti-viral cytokines, as IL-1b, IL-6, TNF-a and type I interferons, which are exacerbated in patients evolving to cytokine storm, as reviewed (TAY et al., 2020). Conversely, this is associated with intense lung infiltration of myeloid cells, such as neutrophils (TAY et al., 2020; VERAS et al., 2020) and monocytes, as well as of lymphocytes with high expression of the exhaustion markers, PD-1 and TIM-3 (WAUTERS et al., 2021). Clearly, the immune response during COVID-19 has a dual role, as it may reduce viral burden, but also account for disease exacerbation (GUPTA et al., 2020). These evidences show the complexity of COVID-19 as well as the difficulty in predicting worse disease outcomes.

In this context, despite being a respiratory disease, COVID-19 patients may develop several other manifestations<sup>18</sup>, including anosmia and ageusia (GERKIN et al., 2021)<sup>19</sup>, suggesting an impact in the central nervous system. In fact, it has been demonstrated that SARS-CoV-2 infects olfactory sensory neurons (OSN) and uses the transmucosal route to reach brain tissue (MEINHARDT et al., 2021). The neurological importance of SARS-CoV-2 infection is a great matter of debate. A retrospective study performed in Wuhan, China, from January to February 2020 analyzed 214 patients, of whom 36.4% developed neurological symptoms related to cerebrovascular events and impaired consciousness (MAO et al., 2020). Since then, many case reports and cohort prospective studies have been published pointing to signs and symptoms of neurological alterations that range from the anosmia and ageusia, to leptomeningitis (REMSIK et al., 2021), stroke, microvascular damage (AL-MUFTI et al., 2021), severe headache, encephalopathy (REHMANI et al., 2021), and even peripheral Guillain-Barré Syndrome (FRAGIEL et al., 2021). Histopathological analysis revealed multiple ischemic areas, encephalopathy, and microglial activation. Interestingly, recent reports have also pointed to residual psychiatric features in patients that recovered from COVID-19, as chronic fatigue, cognitive decline (DEL BRUTTO et al., 2021), mood disorders and depression (ESKANDAR et al., 2021; NAGU et al., 2021), during the so-called "brain fog", long COVID-19 or the Post-Acute Sequelae of COVID-19 (MERAD et al., 2022).

Whether these are direct viral effects or indirect results of systemic inflammation is a matter of controversy, and the real impact of SARS-CoV-2 to the human brain remains elusive, and extensively discussed (AWOGBINDIN et al., 2021). In this sense, here we used *in vitro* and *in vivo* systems to evaluate immunometabolic and energetic changes using Golden Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with SARS-CoV-2. We observed that the virus infects hamster's astrocytes *in vitro* and further inducing a pro-inflammatory response. Interestingly, we observed that SARS-CoV-2 shifts main metabolic pathways, specially subverting the glutamine usage for enhanced replication. Corroborating this, the blockade of glutaminolysis significantly impairs viral progeny. Also, respirometry confirmed intense metabolic activity in the presence of the virus, further corroborated by metabolomics and metabolites consumption. *In vivo*, we confirmed the presence of viral RNA in the cortex and hippocampus of infected animals, associated with consistent changes in the protein profile. Thus, here we suggest that the virus hijacks cellular carbon metabolism, especially glutamine consumption, for its own benefit, in detriment of a proper cellular metabolic function. Due to the importance of glutamatergic transmission for appropriate neuronal synaptic formation and connectivity, here we propose a correlation between SARS-CoV-2 infection over memory and cognition due to metabolic imbalance of important neurotransmitters, especially glutamate/glutamine. Moreover, our proteomic analysis showed a significant impact on carbon metabolism pathways consistent with brain diseases, such as Parkinson's Disease, Multiple Sclerosis, and long-term depression, which were also concordant with changes observe in COVID-19 deceased patients. This brings attention to a possible correlation of altered carbon and energy metabolism with the cognitive and memory impairment observed in patients with long COVID-19 or PASC.

#### 2.4 MATERIALS AND METHODS

#### 2.4.1 Virus isolation and propagation

SARS-CoV-2/SPPU-0691 (GenBank accession number MW441768) was obtained, isolated, and propagated at Scientific-Platform Pasteur-USP (SPPU) and used for the experiments in vitro. The respiratory sample (naso-oropharyngeal swab) was acquired during the acute phase of infection and complying with the inclusion criteria for clinical suspicion of associated viral infection to SARS-CoV-2 adopted by the Ministry of Health of Brazil. Viral stocks were generated in Vero CCL81 cells. This cell line is very well established in the literature for propagating viruses and is not found in ICLAC and was kindly donated by Prof. José Luiz Proença Modena. Vero cells were used at maximum passage of 10th. Prior to infection, cells were maintained in DMEM Low glucose (LGC<sup>®</sup>) supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (Gibco<sup>®</sup>) and 1% penicillin/streptomycin (LGC<sup>®</sup>) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The initial inoculum (passage 1) was prepared to dilute the clinical samples (1:5) in non-supplemented DMEM low glucose (Gibco<sup>®</sup>). The inoculum was then added to the flask containing Vero cells and maintained for 1 hour at 37°C, following addition of fresh DMEM low glucose media supplemented with 2% FBS and 1% penicillin/streptomycin. The cell culture was observed for cytopathic effects on each day after the inoculation. When a prominent cytopathic effect was observed the cell culture supernatant was collected, centrifuged to remove debris (500g), and stored at -80°C as the first viral passage. The same strategy was employed three times to obtain a fourth passage isolate. Fourth passage viral stocks were used in this study titrated by plaque-forming unit (PFU) assay, according to protocols described

elsewhere (ARAUJO et al., 2020). SARS-CoV-2 strain human/BRA/SP02cc/2020 (GenBank access number: MT350282.1) was used in the *in vivo* experiments.

# 2.4.2 Primary astrocytes cultures of Golden Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*)

Primary astrocytes were obtained from Syrian hamster neonates at days 2-4 postpartum (dpp). The protocols were approved by the Ethics Committee for Animal Research of University of Sao Paulo (CEUA nº 7971160320 / 3147240820) and all efforts were made to minimize animal suffering. Animals were obtained from the Department of Pathology, School of Veterinary Medicine and from the Animal Science Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health from the University of São Paulo. Briefly, hamster neonates used for brain cultures were euthanized by decaptation brains were harvested, and the meninges were removed following tissue digestion with 0.05% of trypsin (Gibco<sup>®</sup>) at 37°C for 10 minutes. Next, tissue was mechanically disrupted and centrifuged 500g for 5 minutes. Cells were then resuspended in DMEM Ham's-F12 (LGC<sup>®</sup>) supplemented with 10% FBS (Gibco<sup>®</sup>), 1% penicillin/streptomycin, 1% nonessential amino acids (LGC<sup>®</sup>), 1% sodium pyruvate (LGC<sup>®</sup>) and 1% L-glutamine (LGC<sup>®</sup>) and seeded in cultures flasks maintained overnight at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cells were then washed with phosphate saline buffer (PBS) and replaced with fresh media. The media were changed every three days until the confluency was reached, when culture flasks were shaken at 200rpm for 3 hours at 37°C for detaching of microglia. Floating cells were removed, and the remaining attached cells were harvested for in vitro assays. To develop all in vitro cultures used in infection experiments we used 20 Syrian Hamsters pups. Each culture was performed from 4 pulled brains.

#### 2.4.3 In vitro infection with SARS-CoV-2

Primary astrocytes were infected with SARS-CoV-2 at MOI 1 or 0.1 for 1h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After infection, inoculum was washed, and cells were incubated with fresh DMEM HAMs F-12 supplemented with 10% FBS (LGC<sup>®</sup>), 1% penicillin/streptomycin (LGC<sup>®</sup>), 1% NEAA (LGC<sup>®</sup>), sodium pyruvate (LGC<sup>®</sup>) and L-glutamine (LGC<sup>®</sup>) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Supernatant and cells were harvested after 24-, 48- or 72-hours post infection for further analysis. For the experiments with inhibitors, astrocytes were treated with inhibitors for 2h prior to infection. For

experiments with glucose (17 mM) and glutamine (2mM) supplementation, supplementation was also added 2h prior infection.

#### 2.4.4 In vivo Infection of Golden Syrian Hamsters with SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 strain human/BRA/SP02cc/2020 (GenBank access number: MT350282.1) was used in the in vivo experiments of this study. This virus was obtained from nasopharyngeal swabs from the first patient (HIAE01) to be diagnosed with COVID-19 in Brazil (ARAUJO et al., 2020), isolated in Vero ATCC CCL-81 cells and quantified by using the Median Tissue Culture Infectious Dose (TCID50) assay. This sample was also confirmed to be free of other common 18 human respiratory viruses using a qPCR respiratory panel. A third passage aliquot was used to infect the hamsters. Brain samples from SARS-CoV-2-infected and uninfected hamsters from two unrelated experiments were used herein (one performed with 15–16-week-old females and another with 18week-old males). Accordingly, conventional hamsters were acquired from the Gonçalo Muniz Institute, Fiocruz, Salvador, Brazil and maintained at the biosafety level 3 animal facility of the Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences (ICB), USP, Brazil, with food and water ad libitum. Animals were housed in pairs and groups homogenized based on weight. Animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees of the ICB and the College of Veterinary Medicine, USP (protocols #9498230321, #3147240820, #2076201020). In both experiments, animals were anesthetized intraperitoneally with 100 mg/kg of ketamine and 5 mg/kg of xylazine at day zero for the intranasal inoculation of 50 µl of 1 x 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> of SARS-CoV-2 suspended in DMEM with 2% FBS (infected group) or 50 µl of sterile DMEM with 2% FBS (uninfected, mock group). Hamsters were followed daily for clinical signs and weight. Subgroups (n = 3 to 5) of animals were euthanized with a combination of 5 mg/kg of morphine followed by an overdose of ketamine (600mg/kg) and xylazine (30 mg/kg) on days 3, 4, 5, 7 and/or 14 post-infection, depending on the experiment. Brains were collected aseptically at necropsy, using sterile surgical forceps and scissors, and directly placed in 50 mL falcon tubes with DMEM. Brain samples were collected from three infected female hamsters on day 3, and five infected and four uninfected hamsters on day 7. Brain samples were collected from 5 infected male animals on days 3, 5, 7, and 14, and from three non-infected hamsters on day 7.

#### 2.4.5 Drugs and Inhibitors

This study was conducted using the following drugs and inhibitors: 6-diazo-5-oxo-L-nor-Leucine, 50uM (DON, Cat. Number. 157-03-9; Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA); 2-deoxy-D-Glucose-6-phosphate, 5mM (2-DG, Cat. Number.17149; Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA) and Etomoxir, 3uM (Cat. Number. 11969; Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA).

## 2.4.6 Cytotoxicity assay

Cytotoxicity of each metabolic pathway inhibitor was performed with alamarBlue<sup>TM</sup> reagent according manufacturer guidelines. Briefly, primary Syrian hamster's astrocytes were plated in 96-well plate and treated with 2-DG (range of 0.05 to 500mM), Etomoxir (range of 0.03 to 300µM) or DON (range of 0.05 to 500 µM) for 72 hours (the same time point used in all experiments) before the addition of alamarBlue<sup>TM</sup> diluted 1:10. Cells were incubated with alamarBlue<sup>TM</sup> for 4 hours and analyzed by plate reader at wavelengths of 570nm and 600nm. Survival was calculated according to reduction percentage relative to untreated cells.

#### 2.4.7 Plaque-forming unit assay

For virus titration, Vero CCL81 cells were seeded in 24 well plates one day before the infection for adhesion. Supernatants from *in vitro* assays were serially diluted in pure DMEM low glucose and inoculated for 1 hour at 37°C. Next, the inoculum was removed and replaced with DMEM low glucose containing 2% FBS, 1% penicillin/streptomycin and 1% carboxymethylcellulose. After 3 days, the media was removed, and the cells fixed with 3.7% formaldehyde overnight. The cell monolayers were stained with 1% crystal violet for 15 minutes. The viral titer was calculated based on the count of plaques formed in the wells corresponding to each dilution expressed as plaque-forming units per mL (PFU/mL).

#### 2.4.8 RNA extraction, viral load, and gene expression analysis

RNA extraction from cell lysates was performed using the MagMAX<sup>TM</sup> Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit (Catalog number: A48383) (Applied Biosystems<sup>®</sup>) and carried out according to the manufacturer's instructions. RNA extraction was performed using Trizol<sup>®</sup> reagent (ThermoFisher<sup>®</sup>) and carried out according to the

manufacturer's instructions. RNA quantity was determined by NanoDrop (ThermoFisher<sup>®</sup>). Total RNA samples (up to 2  $\mu$ g) were reverse transcribed using the oligo(dT) primer from the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher<sup>®</sup>). Molecular detection of SARS-CoV-2 was performed with TaqMan<sup>TM</sup> Gene Expression Assay (Cat. N. 4331182, ThermoFisher<sup>®</sup>) with specific primers/probes previously described<sup>40</sup>. The quantitative assay was performed using a standard curve produced with serial dilutions of SARS-CoV-2 RNA expressed on a Briggsian logarithm scale as genome equivalents per ug of total RNA. Gene expression assays were performed using Power SYBR® Green Master Mix (Cat. N. 4368577, ThermoFisher<sup>®</sup>) with primers described below. The median cycle threshold (C<sub>1</sub>) value from experimental replicates and 2<sup>-DDCt</sup> method were used for relative quantification analysis and all C<sub>t</sub> values were normalized to *Actb*. All qRT-PCR assays were performed on QuantStudio<sup>TM</sup> 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher<sup>®</sup>).

Target gene	Primer sequence (5'- 3')				
Actb_Hm	F – AAGATGACCCAGATCATGTTTGAG R - ACGTACATGGCTGGGGTGTTG				
SARS-CoV-2 (E_Sarbeco)	F - ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT R - ATATTGCAGCAGTACGCACACA P1 FAM - ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1				
<i>lfitm3</i> _Hm	F - AGCAGCCTTTTCTTGACAGC R- ACCATTCCGCAACACACTTC				
<i>Il-6</i> _Hm	F – GGACAATGACTATGTGTTGTTAGAA R - AGGCAAATTTCCCAATTGTATCCAG				
Ace-2_Hm	F - TCTCAGCCTTGTTGCTGTTGCT R - AGACAGGTCTTCAGCTTCCTGGT				
<i>Tnfa</i> _Hm	F – TGAGCCATCGTGCCAATG R - AGCCCGTCTGCTGGTATCAC				
Isg20_Hm	F – TGCAGCATTGTGAACTTCAGTG R - GCAGGATCTCTAGTCTGGCTTC				
<i>ll-1b</i> _Hm	F – TTCTGTGACTCCTGGGATGGT R - GTTGGTTTATGTTCTGTCCGTTG				
Ifna_Hm	F- CTGGTGGCTGTGAGGAAATA				

Table 1. I fillers used for gene expression analysis	T	ab	le	1.	Primers	used	for	gene	expression	analysis
--	---	----	----	----	---------	------	-----	------	------------	----------

#### 2.4.9 Proteomics

#### 2.4.9.1 LC-MS/MS Analysis

After infection hamster astrocytes were resuspended in lysis buffer (100mM Tris HCL, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X) with freshly added protease and phosphatase inhibitors (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA®) and subjected to ultrasonication (3 cycles of 20s). Samples were submitted to the FASP protocol (Distler U., and Tenzer S., 2016). Samples had their buffer exchanged in a microcolumn tip with a 10kDa MW cut off. Tryptic digestion was performed in column. Forty micrograms of protein were used to carry out the FASP protocol, where the samples were reduced, alkylated, and later digested using trypsin. Digested peptides from each sample were resuspended in 0.1% formaldehyde. The separation of tryptic peptides was performed on an ACQUITY MClass System (Waters Corporation<sup>®</sup>). One µg of each digested sample was loaded onto a Symmetry C18 5  $\mu$ m, 180  $\mu$ m × 20 mm precolumn (Waters Corp<sup>®</sup>) used as trapping column and subsequently separated by a 120 min reversed phase gradient at 300 nL/min (linear gradient, 3–55% ACN over 90 min) using a HSS T3 C18 1.8  $\mu$ m, 75  $\mu$ m × 150 mm nanoscale and LC column (Waters Corp®) maintained at 30 °C. For the gradient elution water-Formic Acid (99.9/0.1, v/v) has been used as eluent A and Acetonitrile Formic Acid (99.9/0.1, v/v) as eluent B. The separated peptides were analyzed by High Definition Synapt G2-Si Mass spectrometer directly coupled to the chromatographic system. Differential protein expression was evaluated with a data-independent acquisition (DIA) of shotgun proteomics analysis by Expression configuration mode (MSe). The mass spectrometer operated in "Expression Mode" switching between low (4 eV) and high (25–60 eV) collision energies on the gas cell, using a scan time of 1.0s per function over 50–2000 m/z. All spectra were acquired in Ion Mobility Mode by applying a wave velocity for the ion separation of 1.000m/s and a transfer wave velocity of 175m/s. The processing of low and elevated energy, added to the data of the reference lock mass ([Glu1]-Fibrinopeptide B Standard, Waters Corp®) provides a time-aligned inventory of accurate mass retention time components for both the low and elevated-energy (EMRT, exact mass retention time). Each sample was run in three technical replicates. Continuum

LC-MS data from three replicate experiments for each sample have been processed for qualitative and quantitative analysis using the software Progenesis (Waters Corp<sup>®</sup>). The qualitative identification of proteins was obtained by searching in an unreviewed database Mesocricetus auratus (Syrian Golden hamster) UNIPROT Proteome ID UP000189706. Search parameters were set as: automatic tolerance for precursor ions and for product ions, minimum 1 fragment ions matched per peptide, minimum 3 fragment ions matched per protein, minimum 1 unique peptide matched per protein, 2 missed cleavage, carbamydomethylation of cysteines as fixed modification and oxidation of methionine as variable modifications, false discovery rate (FDR) of the identification algorithm < 1%. Label free quantitative analysis was obtained using the relative abundance intensity integrated in Progenesis software, using all peptides identified for normalization. The expression analysis was performed considering technical replicates available for each experimental condition following the hypothesis that each group is an independent variable. The protein identifications were based on the detection of more than two fragment ions per peptide, and more than two peptides measured per protein. The list of normalized proteins was screened according to the following criteria: protein identified in at least 70% of the runs from the same sample and only modulated proteins with a p < p0.05 were considered significant.

#### 2.4.9.2 Metabolomics of Hamsters astrocytes

Hamster's primary astrocytes were cultured as described above. Next, the medium was washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) at physiologic pH and cells were collected with 600  $\mu$ L of methanol (MeOH). Finally, the samples were dried and stored in the freezer at -80 °C until metabolites extraction.

**Bligh-Dyer polar metabolites extraction**: Volumes of 150  $\mu$ L of water (H<sub>2</sub>O), 190  $\mu$ L of methanol (MeOH), and 370  $\mu$ L of chloroform (HCCl 3) were added, and then the tubes were shaken vigorously for 2 minutes. Subsequently, the dimensions were centrifuged for 5 minutes at 13,000 g. The aqueous supernatant was collected and dried for 60 in a concentrator. All samples were stored in a freezer at -80 °C until analyzed by UPLC-MS/MS.

**Metabolites Analysis:** The samples were resuspended in 80  $\mu$ L of a 1:1 mixture of acetonitrile:water (ACN:H<sub>2</sub>O). For each analysis, we injected 3  $\mu$ L of sample, and the separation was performed by hydrophobic interaction liquid chromatography (HILIC)

analysis using an acquity UPLC<sup>®</sup> BEH amide 1.7 mm, 2.1 mm x 100 mm column. The mobile phases used for the separations were ACN:H<sub>2</sub>O (80:20) as mobile phase A and ACN: H<sub>2</sub>O (30:70) as mobile phase B, containing 10 mM of ammonium acetate (NH<sub>4</sub> CHOO) and 0.1% of ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH) was additive in both mobile phases. Then, the separation was performed by isocratic flow of 0.3 mL/min, to start with 99% A and was up to 1% A in 7 min. In the final part, we return to 99% A in 1 min and remain for 2 min to equilibrate the column before the next injection. The total run time was 10 min. Negative ion mode was recorded and the instrument was operated in MS E mode in the m/z range of 50–800 Da, with an acquisition time of 0.1 s per scan. The raw files were preprocessed by Progenesis QI Waters® software. The identification was performed with a 5-ppm error for the precursor ion.

#### 2.4.10 Real-time metabolic assays

An XFe24 Extracellular Flux analyzer (Agilent<sup>®</sup>) was used to determine the bioenergetic profile. Cells were plated at 2 x  $10^4$  cells per well in XFe24 plates 24h before infection with SARS-CoV-2. Glycolytic Stress and Mito Stress Tests were performed on XFe24 Bioanalyzer at 72 hpi. All assays were performed following manufacturer's protocols. Results were normalized to cell number.

#### 2.4.11 Electron microscopy

Hamster astrocytes infected and uninfected were recovered, washed with PBS 1x, and fixed with Glutaraldehyde 4% overnight. Samples were washed with PBS 1x and followed to dehydration process with acetone gradient, desiccation, and gold metallization. Finally, samples were analyzed in JOEL1010 transmission electron microscope. Generated images were loaded into Fiji software for further analysis. For TEM mitochondrial measurements, the images were filtered and manually measured for width and length.

#### 2.4.12 Mitochondrial analysis

For measurements of mitochondrial superoxide, the cells were stained with LIVE/DEAD<sup>TM</sup> Fixable Green (L34970; ThermoFisher<sup>®</sup>, 15 min) and MitoSOX<sup>TM</sup> Red mitochondrial superoxide indicator (M36008; ThermoFisher<sup>®</sup>; 2.5uM, 10 min). Cells were then washed with warm 1X PBS and fixed with 4% PFA for 15 minutes at 4C. Next,

cells were analyzed using a Accuri C6 Plus (BD Biosciences<sup>®</sup>) cytometer and data analyzed using FlowJo X software.

#### 2.4.13 Immunofluorescence

On day 7 of astrocyte culture, 2 x 10<sup>4</sup> cell were seeded in a 24-well plate, after overnight incubation with culture media cells were fixed with ice-cold 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 for 30 minutes. After antigen retrieval (Tris/EDTA-Tween-20 buffer - 10mM Tris, 1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9 - for 30 minutes at 95°C, followed by 20 minutes at room temperature), cells were permeabilized with 0.5% Triton-X100 in PBS for 10 minutes, blocked with blocking solution (5% donkey serum + 0.05% Triton X-100 in PBS) (Sigma-Aldrich) for 2 hours at room temperature and incubated with primary antibodies: GFAP (1:1000, Sigma-Aldrich), IBA1 (1:500, Abcam), and MAP2 (1:500, Sigma-Aldrich) diluted in blocking solution, overnight at 4°C. The cells were PBS washed and incubated with secondary antibodies (AlexaFluor 594; AlexaFluor 488; 1:2000, Invitrogen) diluted in PBS + 0.05% Triton X-100 for 2 hours at room temperature, protected from light. For nuclear staining, cells were incubated for 20 minutes at room temperature with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; 1:150000, Sigma-Aldrich), mounted on glass slides with Fluoromount-G (Invitrogen) mounting medium and sealed with nail polish. Images were acquired using Nikon Eclipse 80i fluorescence microscope (Nikon Instruments Inc., NY, USA) coupled with Nikon Digital Camera DXM 1200 C. Quantification was made using ImageJ software (NIH), where 5 to 10 randomly chosen visual fields per coverslip from three independent cultures were analyzed.

#### 2.4.14 Hamster brain slice culture and SARS-CoV-2 infection

Brain sections were obtained from male hamsters and prepared as previously described, with modifications (FERNANDES et al., 2019; MENDES et al., 2018). Whole brain - cerebellum and brainstem were removed - was sliced at 200  $\mu$ m in a VT1000s automatic vibratome (Leica) and cultivated free-floating with Neurobasal A (Gibco) medium supplemented with 1% Glutamax (Gibco), 1% penicillin/streptomycin (Gibco), 2% B27 (Gibco), and 0.25 $\mu$ g/mL fungizone (Sigma). For virus infection, the medium was removed, and the brain slices were exposed to 3x10<sup>6</sup> TCID50 of SARS-CoV-2 or an equivalent volume of mock medium. Infection was performed for 2h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>

in a biosafety level 3 laboratory. The inoculum was removed, the tissue was washed, and the slices were maintained in fresh medium at  $37^{\circ}$ C and 5% CO<sub>2</sub> until processing for subsequent analysis. This procedure was approved by the CEUA-FMRP (#066/2020).

#### 2.4.15 Single Nuclei Transcriptomic Profile Analysis

Raw snRNA-seq data were obtained from frozen medial frontal cortex tissue from six post-mortem control and seven COVID-19 patients assessed herein were obtained from the dataset GSE159812 on NCBI GeneExpression Omnibus public databank. Reads were aligned to the hg38 genome (refdata-gex-GRCh38-2020-A) using CellRanger software (v.6.0.0) (10x Genomics) generating the raw gene counts matrix. Reads mapping to premRNA were also counted to account for unspliced nuclear transcripts. After quantification using the CellRanger count pipeline on each individual library, the CellRanger aggr pipeline was used to aggregate the libraries into two distinct groups, control and infected. We subsequently used these grouped matrices as input to downstream analysis in Seurat (version 4.0.4)(HAO et al., 2021), initially filtering nuclei with unique molecular identifiers over 2,500 or less than 200, besides outliers with more than 5% mitochondrial counts. We performed normalization regressing out heterogeneity associated with mitochondrial contamination fitting the counts to a Gamma-Poisson General Linear Model, removing this confounding source of variation through scTransform Seurat's function (HAFEMEISTER; SATIJA, 2019) and glmGamPoi package (AHLMANN-ELTZE; HUBER, 2020). Integration of both groups was executed identifying cross-dataset pairs of cells that are in a matched biological state ('anchors'), correcting technical differences between those groups to improve comparative snRNAseq analysis. Dimensionality reduction was implemented by Principal Component Analysis, followed by UMAP embedding using the first 20 principal components, the same parameter as used for clustering with both FindNeighbors and FindClusters (at 0.5 resolution) Seurat's functions. Marker genes were identified through MAST positive differential expression (FINAK et al., 2015) of each cluster against all others and cell types annotation was achieved using previously published marker genes(JIANG et al., 2020). Differential gene-expression comparison between the control individuals and infected patients was done using the MAST algorithm (v.1.18.0). Genes with fold change > 0.25 (absolute value), adjusted p value (Bonferroni correction) < 0.1 and detected in a minimum fraction of 10% nuclei in either of the two populations were considered

differentially expressed. Differentially Expressed Genes (DEGs) corresponding to the Differentially Expressed Proteins (DEPs) from hamster brain proteomics and concordant fold-change were subjected to Gene Ontology analysis, performed through online database PANTHER using PANTHER Pathways dataset(MI et al., 2019).

#### 2.4.16 Statistical analysis

The experiments were assessed for normality by shapiro-wilk test. Data was plotted and analyzed using the GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software<sup>®</sup>, San Diego, CA). For analyses between 2 groups, Student's *t* test was used. For comparisons among 3 or more groups, *One*-way ANOVA, followed by Tukey post hoc tests was used as described in figures legends. Differences were considered statistically significant when P value was <0.05. No exclusion criteria were pre-determined. No sample calculation was performed, data size was performed according to previous studies conducted in our laboratory with viral infections and treatments with inhibitors (1). Giovannoni, F., Bosch, I., Polonio, C.M. et al. AHR is a Zika virus host factor and a candidate target for antiviral therapy. Nat Neurosci 23, 939–951 (2020).

#### **2.5 RESULTS**

#### 2.5.1 SARS-CoV-2 infects Syrian hamsters' astrocytes

We started our experiments by infecting brain slices of adult Syrian golden hamsters with 3x10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub> of SARS-CoV-2 (Supplementary figure1A). Tissue infection was confirmed by spike protein detection in GFAP<sup>+</sup> astrocytes (Supplementary figure 1B) and corroborated by increased nucleocapsid RNA (N1) concentration 48 hpi (Supplementary Figure 1C). Thus, we decided to specifically investigate the impact of SARS-CoV-2 infection on astrocytes. For that, hamster's primary cultures obtained from 2-4 days old pups composed of more than 80% astrocytes and very few neurons and microglia (Supplementary Figure 2A-D) were infected with MOI 0.1 of SARS-CoV-2 (strain SPPU-0691/B.1.1.28 Genbank: MW441768#). Confirming data from tissue slices, we detected SPIKE proteins in GFAP<sup>+</sup> cells (Figure 1A-C). Conversely, increased amounts of SARS-CoV-2 RNA were detected in the cell cultures at 48- and 72-hours post infection (hpi) (Figure 1D) confirmed by viral particles detected in the culture supernatant in which the viral load was significantly increased at 72 hpi compared to 24 hpi for (Figure 1E). Next, we performed qPCR for genomic and subgenomic amplification to confirm viral replication. As shown in Figure 1F, there was a positive correlation at 24, 48 and 72 hpi (R=0,9; p=0,083). We also performed transmission electron microscopy (TEM) for viral particles visualization. Figure 1G shows viral particles attached to the cell surface (black arrowheads), as well as the presence of double-membrane vesicles (asterisks), characteristics of coronavirus infection (EYMIEUX et al., 2021).



**Figure 1. SARS-CoV-2 infects and replicates in astrocyte cultures.** SARS-CoV-2 spike protein (red) was identified in astrocytes cultures Presence of SARS-CoV-2 spike protein in uninfected (A) and infected astrocytes (MOI 1) at 72 hpi (B and C). Viral RNA (D) and infectious particles (E) were detected in astrocytes infected with MOI 0.1 by qPCR and PFU assay, respectively. Statistical analysis was performed by *One*-way ANOVA. Correlation plots comparing SARS-CoV-2 subgenomic RNA and genomic RNA CTs (F). Regression line for each time point indicated 95% confidence area shown in shaded areas. Spearman's correlation coefficient and associated p-values are shown. Transmission electron microscopy of astrocytic cultures infected with MOI 0.1 at 72 hpi (E). Black arrows indicate SARS-CoV-2 particles attached to the cell surface and red asterisks indicates double-membrane vesicles. The data is representative of three experiments. Experimental replicates: 0, 24, 48, and 72hpi, n = 5 (F). n = number of independent cell culture preparations.

Statistical information: (DF total, 23; F, 25,7; p-value <0,0001) (D) and *t*-tests (DF, 4; t-value, 16,07; p-value, <0,0001).

# 2.5.2 SARS-CoV-2 astrocyte infection induces pro-inflammatory cytokines, interferon-stimulated genes and changes the expression of carbon metabolism related proteins *in vitro*

Next, we evaluated whether SARS-CoV-2 changes the overall expression of proteins and the production of pro-inflammatory cytokines in hamster's primary astrocytes. As shown in Figure 2A, principal component analysis (PCA) of preoteomics evidences the differential clusterization of control vs. infected samples at 72 hpi. Next, and consistent with the literature, we observed that *Il-1b*, *Il-6*, *Tnf-a* and *Ifn-a* are significantly increased 72 hpi at MOI 0.1 (Figure 2B-E). Confirming that type I interferons are active, we also observed that the interferon-stimulated genes (ISGs), *Isg20, Iftm3* and including *Ace-2*, were up-regulated (Figure 2F-H).

Through proteomic analysis we observed the differential expression of 646 proteins (DEP), of which 568 were up-regulated and 78 down-regulated in infected cells compared to controls (10 controls vs 8 SARS-CoV-2) (Figure 2I and Supplementary Figure 3A). A pathway-protein analysis using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database evidenced that the great majority of DEP were correlated to carbon metabolism (Got1, Eno3, Aldoc, Tald1, PgK1, Ogdh, Pkfp, Pfk1, Gfpt), tricarboxylic acid cycle (Mdh1, Acly, Sdha, Ogdh, Dlst, Idh1, Cs, Suclg1), glycolysis (Aldoc, Gapdhs, Pgk1, Ldhb, Pfkl, Eno3, Pfkp, Eno1, Pgk2, Pklr, Aldh9a1), as well as to protein processing in the endoplasmic reticulum (Pdia3, Cryab, Dnajb11, Sec23a, Lman1, Hsph1) (Figure 2J and Supplementary Figure 3B). Of note, these proteins are enriched in pathways that are also dysregulated in several brain diseases, such as Huntington Disease (HD), Parkinson's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) (Nefh, Rab1a, Rab39b, Pfn1, Psma4, Psmc6, Ndufv2, Gnai3, Ap2a1, Slc25a5) (Figure 2J and Supplementary Figure 2B). Conversely, by comparing our data with data sets from human brain samples from SARS-CoV-2 infected subjects, we observed an overlap of approximately 53 proteins (Supplementary Figure 3C). Consistently, most of these changes are related to alterations in the overall metabolic profile of the cells, including carbon metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, and pentose phosphate pathway (Supplementary Figure 3D).



Figure 2. SARS-CoV-2 induces pro-inflammatory cytokines, interferon stimulated genes expression and protein alterations in hamsters' primary astrocytes. Principal component analysis of infected and uninfected cultures proteomic data (A). Quantitative PCR for pro-inflammatory (B-D) and interferon stimulated genes (E-H) of cultures infected with SARS-CoV-2 MOI 0.1. Fold change is the relative expression of infected to control cultures. Statistical analyses were performed by *t*-test and p < 0.05 was considered significant. Heatmap of proteomic analysis from cultures infected with SARS-CoV-2 MOI 0.1. n=8 for infected and n=10 for control samples (I). Color density represents the protein z-score. DEPs from proteomic data submitted to KEGG database

analysis (J). The nodes in gray represent major pathways and the color of the genes the z-score (red to blue). Experimental replicates: CTRL, n=8; CoV-2, n=9 (A, I and J) CTRL, n=3; CoV-2, n=3 (B-H). n = number of independent cell culture preparations. The data is representative of two experiments. Statistical information: DF, 4; t-value, 11.55; p-value, 0.0003 (B); DF, 4; t-value, 9.3; p-value, 0.0003 (C); DF, 4; t-value, 33.94; p-value, <a href="#relevanture-output://www.example.com">relevanture-output://www.example.com</a> (B); DF, 4; t-value, 9.3; p-value, 0.0003 (C); DF, 4; t-value, 33.94; p-value, <a href="#relevanture-output://www.example.com">relevanture-output://www.example.com</a> (D); DF, 4; t-value, 9.3; p-value, 0.0003 (C); DF, 4; t-value, 33.94; p-value, <a href="#relevanture-output://www.example.com">relevanture-output://www.example.com</a> (B); DF, 4; t-value, 9.3; p-value, 0.0003 (C); DF, 4; t-value, 33.94; p-value, <a href="#relevanture-output://www.example.com">relevanture-output://www.example.com</a> (B); DF, 4; t-value, 9.3; p-value, 0.0003 (C); DF, 4; t-value, 2.98; p-value, 0.04 (F); DF, 4; t-value, 8.02; p-value, 0.0013 (G); DF, 3; t-value, 2.17; p-value, 0.07 (H).

#### 2.5.3 SARS-CoV-2 induces metabolic changes in astrocytes in vitro

Because SARS-CoV-2 infection induced important changes in carbon metabolism-related proteins, we next validated these findings. First, we infected the cultures with SARS-CoV-2 (MOI 0.1) and assessed mitochondrial morphology through transmission electron microscopy (TEM). As shown in Figure 3A, mitochondria from SARS-CoV-2 samples are more fragmented than in control cultures. This was associated with increased mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production at 24 and 72 hpi (Figure 3B). Next, we performed high resolution real-time respirometry at 72 hpi. Conversely, we observed that both glycolytic capacity and non-glycolytic acidification were increased in the presence of the virus (Figure 3C and Supplementary Figure 4B), although, basal and maximal mitochondrial respiration were not statistically different, despite the trend (Figure 3D).



Figure 3. SARS-CoV-2 infection alters mitochondrial morphology, reactive oxygen species production and cellular bioenergetics of hamsters's astrocytes cultures. Mitochondrial related analysis was performed after SARS-CoV-2 infection (MOI 0.1) at 72 hpi. Mitochondrial morphological changes were evidenced by TEM (scale bar 200nm) (A). Statistical analysis was performed by t-test. Mitochondrial ROS production was measured by flow cytometry at 24- and 72 hpi, graphs represent median intensity fluorescence (MFI) (B). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Sydak's multiple comparisons post-hoc test. Bioenergetic profile by oxygen consumption rate (OCR) (C) and extracellular acidification rate (ECAR) of infected cells at 72 hpi (D). Statistical analysis was performed by t-test. Statistical significance: p < p0.05. Experimental replicates: CTRL, n = 3; CoV-2, n = 3 (B). CTRL, n = 3; CoV-2, n = 34 (C and D). n = number of independent cell culture preparations. Data are representative of two experiments. Statistical information: Statistical information: DF, 88; t-value, 3.351; p-value, 0.0012 (A); DF, 1; F, 128.9; p-value, 0.0003 (B); DF, 5; t-value, 4.89; pvalue, 0.0095 (C, left); DF, 5; t-value, 3.9; p-value, 0.011 (C, right); DF, 5; t-value, 1.91; p-value, 0.113 (D, left); DF, 5; t-value, 1.60; p-value, 0.17 (D, right).

#### 2.5.4 SARS-CoV-2 changes the metabolic profile of hamsters' primary astrocytes

To deeply characterize the metabolic changes induced by SARS-CoV-2 infection in astrocytes, we performed a targeted metabolomic analysis at 72 hpi with MOI 0.1. We observed a significant reduction in almost all metabolites evaluated (Figure 4). Glucose was reduced (Figure 4A) as well as many of TCA cycle precursors, such as lactate (Figure 4B), pyruvate (Figure 4C), serine (Figure 4D), acetate (Figure 4E), aspartate (Figure 4J) 2-hydroxyglutarate (Figure 4M) as well as succinate (Figure 4L), strongly suggesting anaplerotic reactions to supply the synthesis of biomolecules, which may be involving in supporting viral replication. Interestingly, although glutamate levels were maintained, there was a significant decrease of glutamine (Figure 4G), alpha-ketoglutarate (Figure 4K) and 2-hydroxyglutarate (Figure 4M) levels in infected samples. The levels of GABA (Figure 4I), another glutamate precursor, was unchanged. Interestingly, palmitate levels were increased (Figure 4F), further suggesting that TCA intermediates are being used as building blocks for novel biomolecules, such as lipids. Altogether, our data show an intense activation of cataplerotic and anaplerotic pathways, especially with a switch to glutamine and alfa-ketoglutarate consumption and lipid synthesis.



**Figure 4. SARS-CoV-2 impacts hamsters' astrocytes metabolic pathways.** Targeted metabolomic data of glycolysis (A-C), TCA cycle (K), fatty acid (E and F) and glutamate related metabolites (H, I K and M) of hamsters' astrocytes cultures infected or not with SARS-CoV-2 at MOI 0.1. The arrows represent the relationship between metabolites. The analysis was conducted at 72 hpi (MOI 0.1) and data is represented by the area under the curve of each metabolite detection peak. Statistical analysis was performed by Welch's *t*-test and p < 0.05 was considered significant. Experimental replicates: CTRL, n = 9; CoV-2, n = 9. n = number of independent cell culture preparations. Statistical information: Statistical information: DF, 16; t-value, 5.98; p-value, 0.026(C); ); DF, 13.99; t-value, 3.589; p-value, 0.003(B); DF, 9.98; t-value, 2.59; p-value, 0.026(C); ); DF, 15.26; t-value, 3.358; p-value, 0.0042(D); DF, 14.48; t-value, 3.748; p-value, 0.002(E); DF, 15.96; t-value, 2.175; p-value, 0.024(F); DF, 14.46; t-value, 5.551; p-value, <0.0001(G); DF, 10.94; t-value, 1.262; p-value, 0.233(H); DF, 13.43; t-value, 0.9791; p-value,
(continued) 0.3448 (I); DF, 12.07; t-value, 3.454; p-value, 0.0047 (J); DF, 13.80; t-value, 3.414; p-value, 0.0043 (K); DF, 16.0; t-value, 5.682; p-value, <0.0001 (L); DF, 9.34; t-value, 2.275; p-value, 0.0479 (M).

#### 2.5.5 SARS-CoV-2 replication in astrocytes is dependent on glutamine

To further determine which specific metabolic pathway is more important in favoring SARS-CoV-2 replication, we treated infected cultures with inhibitors of fatty acid metabolism (Etomoxir), glutaminolysis (L-DON) and glycolytic pathways (2-DG). As illustrated in Figure 5A, we first evaluated cell viability in the absence of infection to select the correct concentration. Further, as illustrated by Figure 5C, blockade of glycolysis with 2-deoxyglucose (2-DG) did not significantly change SARS-CoV-2 replication at 24-72 hpi., further corroborated by PFU assay (Figure 5C). Also, the use of etomoxir, an inhibitor of the carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT-1a), indicates low dependence of mitochondrial fatty acid oxidation (Figure 5C-D). Interestingly, the inhibition of mitochondrial glutaminase (GLS) with L-6-Diazo-5-oxo-norleucine (L-DON), did not change genome replication (Figure 5C), but significantly decreased the release of viral particles (Figure 5D). Accordingly, the addition of glutamine (2mM) in the absence of glucose significantly increased viral replication, whereas glucose (17mM) was not able to do so (Figure 5E).

Next, we evaluated the expression of proinflammatory cytokines during the treatment with L-DON. Blockade of GLS with L-DON decreased the transcription of *ll-1b*, *ll-6* (Figure 5F-G), and *lfn-a* (Figure 5I) but not *Tnf-a* (Figure 5H) when compared to non-treated groups. This is in accordance with the reduction of the ISGs, *Ace-2*, *Isg20* and *lftm3* (Figure 5J-L). These results evidence that glutamine is important for viral replication and the blockade of glutaminolysis reduces viral loads which in turn reduces type I IFN and pro-inflammatory responses.



Figure 5. Blockade of glutaminolysis reduces SARS-CoV-2 replication and proinflammatory gene expression. Illustration showing the targets of 2-DG, Etomoxir, and DON blocking glycolysis,  $\beta$ -oxidation and glutaminolysis, respectively (A). Cell viability following 72h treatment with 2-DG (0,05-500mM), Etomoxir (0,03-300µM) and DON (0,05-500µM) (B). Cultures were pre-treated with 2-DG (5mM), Etomoxir (3µM) and DON (50µM) 2 hours prior to SARS-CoV-2 infection (MOI 0.1). Viral RNA and infectious particles were quantified after 72 hpi by qPCR (C) and PFU (D). Viral RNA of cultures supplemented or not with glucose (17mM) or glutamine (2 mM) (E). qPCR of pro-inflammatory and interferon stimulated genes from cultures treated with DON (F-L).

(continued) Statistical analysis were performed by multiple *t*-test (C) or one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons (D-L). Cultures were performed in triplicates and graphs representative of two experiments. Statistical information: DF, 4; t-value, 2.399; p-value, 0.0744 (C); DF, 11; F, 50.14; p-value, <0.0001 (D); DF, 8; F, 7.408; p-value, 0.02 (E); DF, 11; F, 237.6; p-value, <0.0001 (F); DF, 11; F, 40.65; p-value, <0.0001 (G); DF, 11; F, 13.08; p-value, 0.0019 (H); DF, 11; F, 9.728; p-value, 0.0048 (I); DF, 11; F, 6.032; p-value, 0.0189 (J); DF, 11; F, 40.01; p-value, <0.0001 (K); DF, 9; F, 7.759; p-value, 0.00173 (L);

# 2.5.6 SARS-CoV-2 RNA is detected in the cortex, hippocampus, and olfactory bulb of hamsters *in vivo*.

It has already been demonstrated that the Syrian hamster is a permissive model to nasal infection with SARS-CoV-2 (IMAI et al., 2020). Thus, we decided to use this model to address whether the virus reaches important areas of the brain, such as cortex, hippocampus, and olfactory bulb after intranasal infection with 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> as illustrated. Consistently, we confirmed the presence of SARS-CoV-2 in these areas, both at 3-, 5-, 7and 14-days post-infection (dpi) (Figure 6A) with higher titers at day 3. To confirm genome replication, we performed qPCR for genomic and subgenomic fractions. As observed in vitro, there was a positive correlation in the hippocampus (R=0,062; p=0,011), cortex (R=0,758; p=0,025), olfactory bulb (R= 0,771; p=0,0019) and other regions (R=0,74; p=0,00067). We also observed increased expression of the same proinflammatory cytokines evaluated in vitro, as Il-6, Il-1b and Tnfa, as well as the ISGs Isg20 and Iftm3, both in the hippocampus (Figure 6B) and cortex (Figure 6D). Interestingly, although *Il-1b* was increased in the cortex (Figure 6D), no difference was observed in the hippocampus (Figure 6B). The same was observed for Il-6 which is increased the hippocampus (Figure 6B) but not in the cortex (Figure 6D). As expected, proteomic analysis of these brain samples showed that in the hippocampus, DEPs correlated with pathways of oxidative phosphorylation, long-term potentiation, dopaminergic and cholinergic synapses, among others (Figure 6C). In the cortex, DEPs correlated with important neuronal function, as synaptic vesicle cycle, dopaminergic and GABAergic synapses, as well as to neurological features of brain diseases, as Parkinson's disease and long-term depression (Figure 6E). To further confirm whether these changes are in accordance with those observed in human COVID-19 patients, we compared the DEPs from our *in vivo* proteomic analysis with a data set from the literature that analyzed more than 64,000 single cells obtained from the frontal cortex and choroid plexus of 8 deceased COVID-19 patients (Figure 6F). We found a strong convergence of important signaling pathways enriched in both datasets, such as those for metabotropic and

ionotropic glutamate receptors, Wnt signalling and adrenergic activation. Also, important physiological processes were related between hamster and human samples, as synaptic vessel trafficking, glycolysis, and inflammation, which were further consistent with the enrichment of DEPs correlated to brain diseases, as Parkinson's disease, Huntington's disease, and Alzheimer's disease (Figure 6G). We also performed qPCR for the expression of glutamate transporters and receptors in the hippocampus and cortex of the infected animals, but we detected no differences (Supplementary Figure 5 B-C). Next, we also compared our protemics with single cell specific populations from the human brains, as astrocytes, microglia and excitatory neurons (Supplementary Figure 6). Altogether, our data support the hypothesis that important changes in protein expression and carbon metabolism are occurring in the brains of infected Golden Syrian hamsters, and these changes may share similarities to those observed in COVID-19 patients.



Figure 6. SARS-CoV-2 infects Syrian hamsters' brains in vivo and elicit changes comparable to the human disease. The animals were inoculated intranasally with  $10^5$  TCID of SARS-CoV-2 and viral RNA detection was performed by qPCR in different areas of the brain over the infection course (A). Cytokine expression by qPCR (B and D) and KEGG pathways analysis (C and E) of mock or infected hippocampus and cortex, respectively at 72 dpi. The fold change was normalized by the relative expression of uninfected groups and only significant DEPs (FDR adjusted) were included in the KEGG analysis. Statistical analysis in gene expression graphs were performed by *t*-test and p<0.05 was considered significant. Illustrative scheme of data generation from the comparison of our hamster proteomic data to human data set (F). The generated data were fed into an alluvial graph connecting the DEPs from hamster brain proteomics with significant ontology pathways of public human brain single-cell sequencing data sorted by specific brain cell populations (G). Experimental replicates: 3dpi, n= 5; 5dpi, n = 5;

(continued) 7dpi, n = 4; 14dpi, n =3 (A) Mock, n= 5 and CoV-2 n=6 (B-E). n = number of animals in each experimental group. OPC = Oligodendrocyte progenitor cell. Graphs are representative of two experiments. Statistical information: *Il-6*: DF, 9; t-value, 2.701; p-value, 0.0243; *Il-1b*: DF, 9; t-value, 0.6621; p-value, 0.5245; *Tnfa*: DF, 9; t-value, 2.966; p-value, 0.0158; *Ace-2*: DF, 9; t-value, 1.5717; p-value, 0.1635; *Isg20*: DF, 9; t-value, 1.826; p-value, 0.1011; *Iftm3*: DF, 9; t-value, 2.462; p-value, 0.0361; *Ifna*: DF, 9; t-value, 2.690; p-value, 0.0248 (B). *Il-6*: DF, 9; t-value, 1.746; p-value, 0.1147; *Il-1b*: DF, 9; t-value, 4.279; p-value, 0.021; *Tnfa*: DF, 9; t-value, 3.724; p-value, 0.0047; *Ace-2*: DF, 9; t-value, 1.326; p-value, 0.21; *Isg20*: DF, 9; t-value, 6.948; p-value, <0.0001; *Iftm3*: DF, 9; t-value, 2.643; p-value, 0.0268; *Ifna*: DF, 9; t-value, 5.07; p-value, 0.0007 (D).

#### **2.6 DISCUSSION**

Although the great majority of people infected with SARS-CoV-2 develop only mild or asymptomatic disease, COVID-19 has already taken more than 6.2 million lives worldwide. Moreover, although it is essentially a lung disease, unconventional neurological symptoms have been reported since the beginning of the pandemic, from mild anosmia and ageusia, to more severe neurological cases of encephalitis, cerebrovascular disease, ataxia and seizures (WANG et al., 2021). Most recently, the description of the long COVID-19,the "brain fog" or the PASC still intrigues physicians and researchers, as cases of cognitive impairment, memory decline, disorientation, chronic fatigue and depression have been increasing significantly (WHITAKER et al., 2022), evidencing the complexity of the disease (MERAD et al., 2022; PIRAS et al., 2014).

In this context, here we show that SARS-CoV-2 infects the central nervous system of Syrian hamsters, *Mesocricetus auratus, in vitro* and *in vivo*. More importantly, we observed that the infection actively changes both metabolic and proteomic profile. Proteomic analysis of primary astrocytes *in vitro*, as well as dissected cortex and hippocampus *in vivo*, demonstrated relevant changes in proteins related to carbon metabolism, biosynthesis of amino acids and the tricarboxylic acid cycle (TCA) This was further corroborated by the overall increase in glycolysis and oxygen consumption assessed by respirometry, which has already been demonstrated in mononuclear cells (CODO et al., 2020)and lung epithelial cells. Conversely, KEEG pathway analysis evidenced a conversion to pathways enriched in neurological diseases such as Huntington disease, Parkinson disease and long-term depression, whose symptoms are similar to those observed in many COVID-19 patients.

The fact that viruses actively hijack cellular metabolism is well known, as for CMV, HSV, HIV, vaccinia virus, and many others, as reviewed (BHARADWAJ et al., 2021). This occurs either to facilitate viral replication and virion assembling or to evade local immune responses. Although the presence of replicating SARS-CoV-2 in human brains is still a matter of debate, its impact on neurological function, as memory and cognition, has become unquestionable. In this sense, the relevance of glutamatergic synapses for appropriate brain function is fundamental, as more than 90% of excitatory synapses are mediated by glutamate ionotropic and metabotropic receptors. Due to its importance, glutamate is constantly recycled within the cell, either as a neurotransmitter, as glutamate and aspartate, and transported to pre-synaptic vesicles by vesicular glutamate transporters (Vglut) or following its conversion from glutamine to glutamate and then to alpha-ketoglutarate to fuel the TCA cycle during cataplerosis. This conversion is essential and happens extensively in astrocytes and neurons through the function of glutaminase. Of note, conversion from glucose and glutamine is the major source of glutamate in the brain, as very little is absorbed from the blood circulation. During certain circumstances, this balance may shift from one side to another, such as during infection or neurodegenerative diseases. Thus, it is clear that the balance between glutamate and glutamine plays a pivotal role in both synaptic transmission and energy acquisition for proper neuronal activity.

Consistently, we showed that SARS-CoV-2 replication in hamster glial cells significantly changes the levels of glutamine and alpha-ketoglutarate, as assessed by metabolomics. Also, glucose and TCA cycle components were reduced, whereas viral replication increases along with cytokine secretion. This is consistent with our previous findings in monocytes(CODO et al., 2020). However, here we show that along with increased glycolysis, astrocyte infection with SARS-CoV-2, also used glutamine as a source of carbon. Unexpectedly, viral replication in astrocytes was independent of glycolysis, as 2-DG treatment did not impact viral replication. However, here we show that SARS-CoV-2 replication depends on glutamine, as the blockade of glutaminolysis with 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) significantly reduced viral replication, and consequently, the production of inflammatory cytokines. This is also consistent with recent reports showing that SARS-CoV2 infection alters the expression of many TCA cycle proteins as well as their metabolites in lung epithelial cells (THAI et al., 2015). Thus, it seems clear that SARS-CoV-2 impacts the overall status of protein expression,

specifically of those involved in carbon and energy metabolism, and these changes may directly impact brain function.

Among the symptoms observed in patients with long-covid are cognitive impairment, memory loss, and confusion. Conversely, hippocampal glutamatergic neurons as well as a balanced concentration of glutamate or amino acid transporters in the synapses are pivotal for long term potentiation and memory (CENTONZE et al., 2010). Thus, it is suitable to speculate that during COVID-19, glutamine consumption due to viral hijacking of cellular metabolism may affect glutamate/glutamine balance, and thus leading to the neurological symptoms mentioned. In fact, it has already been shown that SARS-CoV-2 changes the expression of excitatory amino acid transporters as SLC1A3 in COVID-19 patients astrocytes (YANG et al., 2021), which is important for the recapture of synaptic glutamate. Corroborating this hypothesis, a recent case report investigated a 29 years old COVID-19 patient that developed transient attention deficit and memory problems. Conversely, Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) for the analysis of glutamate, glutamine and N-acetyl aspartate clearly showed a reduction of these molecules in the dorso-lateral prefrontal cortex (DLPFC), which is consistent with our findings. Interestingly, three months after infection, neurological impairment has stopped, and glutamate/glutamine levels were reestablished (YESILKAYA; SEN; BALCIOGLU, 2021).

Thus, to our knowledge, this is the first report to demonstrate the impact of COVID-19 over the metabolic and proteomic profile of brain cells, specifically astrocytes. Moreover, we show that SARS-CoV-2 benefits from glutamine as an important source of energy, which in fact has already been shown for vaccinia virus (FONTAINE; CAMARDA; LAGUNOFF, 2014a) and cytomegalovirus (CHAMBERS; MAGUIRE; ALWINE, 2010) in distinct cellular populations. Moreover, our proteomic analysis of hamster's brains *in vivo* compared to human single cell RNA sequencing corroborates the importance of the metabolic and energetic imbalance of glutamate/glutamine that may take place in the brain of neurological in COVID-19 patients. Our data brings attention not only to the physiology of the COVID-19 brain but also suggesting that glutamate signaling may be target of specific therapies in patients that develop neurological impairments, as memory loss and cognitive decline, as already discussed elsewhere (MARINESCU et al., 2020).

## 2.7 CONCLUSIONS

- SARS-CoV-2 causes abortive infection in hamsters' primary astrocytes in vitro;
- SARS-CoV-2 infection in *in vitro* and *in vivo* heavily impacts protein expression;
- SARS-CoV-2 infection causes upregulation of pro-inflammatory genes *in vitro* and neuroinflammation *in vivo;*
- Glutamine metabolismo is crucial to SARS-CoV-2 replication;
- Protein alterations found in hamster brain cortexes are similar to the ones in human.



Figure 7. SARS-CoV-2 impacts metabolic and protein profile of brain and primary mixed glial cells from Syrian hamsters: a glimpse for SARS-CoV-2 induced neurological disorders. The presence of SARS-CoV-2 within different regions (olfactory bulb, hippocampus and cortex) of infected Syrian hamster's brain demonstrates that the virus can avidly reach the central nervous system. As well as during *in vitro* infection, the brain's presence of SARS-CoV-2 is associated with increased expression of pro-inflammatory cytokines (*II-6, II-1b, Tnfa*) and interferon stimulated genes (*Ace-2, Isg20, Iftm3*) (A). Primary mixed glial cells infected *in vitro* also demonstrated dysregulated metabolic pathways such as mitochondrial respiration and glycolysis associated with an important decrease of intermediates and substrates from tricarboxylic

cycle (TCA) (**B**). Importantly, the blockage of glutaminolysis was critical for the maintenance of viral replication, pMGC and gene expression induced by the virus (**C**). Finally, protein analysis evidenced that SARS-CoV-2 infection in both pMGC and brain results in enriched pathways associated with neurological diseases such as Parkinson, Alzheimer and Huntington which are also found in single cell analysis of COVID-19 patients' brains.

## **2.8 REFERENCES**

Audi, A. *et al.* Seasonality of Respiratory Viral Infections: Will COVID-19 Follow Suit? *Front. Public Heal.* **8**, 1–8 (2020).

Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* (2020) doi:10.1038/s41586-020-2008-3.

Guan, W.-J. *et al.* Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N. Engl. J. Med.* 1–13 (2020) doi:10.1056/NEJMoa2002032.

Zhou, P. *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* (2020) doi:10.1038/s41586-020-2012-7.

Barton, L. M., Duval, E. J., Stroberg, E., Ghosh, S. & Mukhopadhyay, S. COVID-19 Autopsies, Oklahoma, USA. *Am. J. Clin. Pathol.* 1–9 (2020) doi:10.1093/ajcp/aqaa062.

Lu, R. *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* **6736**, 1–10 (2020).

Pinto, B. G. G. *et al.* ACE2 expression is increased in the lungs of patients with comorbidities associated with severe COVID-19. *J. Infect. Dis.* **222**, 556–563 (2020).

Chu, H. *et al.* Host and viral determinants for efficient SARS-CoV-2 infection of the human lung. *Nat. Commun.* **12**, 1–15 (2021).

Chen, R. *et al.* The Spatial and Cell-Type Distribution of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Human and Mouse Brains. *Front. Neurol.* **11**, (2021).

Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Article SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. 271–280 (2020) doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.

Finkel, Y. et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. Nature 589, 125–130 (2021).

Wu, J. *et al.* SARS-CoV-2 ORF9b inhibits RIG-I-MAVS antiviral signaling by interrupting K63-linked ubiquitination of NEMO. *Cell Rep.* **34**, 108761 (2021).

Nasirudeen, A. M. A. *et al.* RIG-i, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**, (2011).

Yin, X. et al. MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung

Epithelial Cells. Cell Rep. 34, (2021).

Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A. & Ng, L. F. P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 363–374 (2020).

Veras, F. P. *et al.* SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J. Exp. Med.* **217**, (2020).

Wauters, E. *et al.* Discriminating mild from critical COVID-19 by innate and adaptive immune single-cell profiling of bronchoalveolar lavages. *Cell Res.* (2021) doi:10.1038/s41422-020-00455-9.

Gupta, A. *et al.* Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat. Med.* **26**, 1017–1032 (2020).

Gerkin, R. C. *et al.* Recent smell loss is the best predictor of COVID-19 among individuals with recent respiratory symptoms. *Chem. Senses* **46**, 1–12 (2021).

Meinhardt, J. *et al.* Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat. Neurosci.* **24**, 168–175 (2021).

Mao, L. *et al.* Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients with Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* **77**, 683–690 (2020).

Remsik, J. *et al.* Inflammatory Leptomeningeal Cytokines Mediate COVID-19 Neurologic Symptoms in Cancer Patients. *Cancer Cell* **39**, 276-283.e3 (2021).

Al-Mufti, F. *et al.* Acute Cerebrovascular Disorders and Vasculopathies Associated with Significant Mortality in SARS-CoV-2 Patients Admitted to The Intensive Care Unit in The New York Epicenter. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* **30**, 105429 (2021).

Rehmani, R., Segan, S., Maddika, S. R., Lei, Y. W. & Broka, A. Spectrum of neurologic & neuroimaging manifestation in COVID-19. *Brain, Behav. Immun. - Heal.* **13**, 100238 (2021).

Fragiel, M. *et al.* Incidence, clinical, risk factors and outcomes of Guillain-Barré in Covid-19. *Ann. Neurol.* **89**, 598–603 (2021).

Del Brutto, O. H. *et al.* Cognitive decline among individuals with history of mild symptomatic SARS-CoV-2 infection: A longitudinal prospective study nested to a population cohort. *Eur. J. Neurol.* 1–9 (2021) doi:10.1111/ene.14775.

Eskandar, E. N. *et al.* Neurologic Syndromes Predict Higher In-Hospital Mortality in COVID-19. *Neurology* **96**, e1527–e1538 (2021).

Nagu, P., Parashar, A., Behl, T. & Mehta, V. CNS implications of COVID-19: A comprehensive review. *Rev. Neurosci.* **32**, 219–234 (2021).

Hao, Y. *et al.* Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* **184**, 3573-3587.e29 (2021).

Hafemeister, C. & Satija, R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *bioRxiv* 1–15 (2019) doi:10.1101/576827.

Ahlmann-Eltze, C. & Huber, W. glmGamPoi: Fitting Gamma-Poisson generalized linear models on single cell count data. *Bioinformatics* **36**, 5701–5702 (2020).

Finak, G. *et al.* MAST: A flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data. *Genome Biol.* **16**, 1–13 (2015).

Jiang, J., Wang, C., Qi, R., Fu, H. & Ma, Q. scREAD: A Single-Cell RNA-Seq Database for Alzheimer's Disease. *iScience* **23**, 101769 (2020).

Mi, H. *et al.* Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat. Protoc.* **14**, 703–721 (2019).

Eymieux, S. *et al.* Ultrastructural modifications induced by SARS-CoV-2 in Vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**, 3565–3576 (2021).

Imai, M. *et al.* Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 16587–16595 (2020).

Wang, L. *et al.* Progress in Research on SARS-CoV-2 Infection Causing Neurological Diseases and Its Infection Mechanism. *Front. Neurol.* **11**, 1–9 (2021).

Piras, I. S. *et al.* Anti-brain antibodies are associated with more severe cognitive and behavioral profiles in Italian children with Autism Spectrum Disorder. *Brain. Behav. Immun.* **38**, 91–9 (2014).

Bharadwaj, S., Singh, M., Kirtipal, N. & Kang, S. G. SARS-CoV-2 and Glutamine: SARS-CoV-2 Triggered Pathogenesis via Metabolic Reprograming of Glutamine in Host Cells. *Front. Mol. Biosci.* **7**, 1–14 (2021).

Codo, A. C. *et al.* Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1α/Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metab.* **32**, 437-446.e5 (2020).

Thai, M. *et al.* MYC-induced reprogramming of glutamine catabolism supports optimal virus replication. *Nat. Commun.* **6**, 1–9 (2015).

Centonze, D. *et al.* The link between inflammation, synaptic transmission and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Cell Death Differ.* **17**, 1083–91 (2010).

Yang, A. C. *et al.* Dysregulation of brain and choroid plexus cell types in severe COVID-19. *Nature* **595**, 565–571 (2021).

Yesilkaya, U. H., Sen, M. & Balcioglu, Y. H. COVID-19-related cognitive dysfunction may be associated with transient disruption in the DLPFC glutamatergic pathway. *J.* 

Clin. Neurosci. 87, 153–155 (2021).

Fontaine, K. A., Camarda, R. & Lagunoff, M. Vaccinia Virus Requires Glutamine but Not Glucose for Efficient Replication. *J. Virol.* **88**, 4366–4374 (2014).

Chambers, J. W., Maguire, T. G. & Alwine, J. C. Glutamine Metabolism Is Essential for Human Cytomegalovirus Infection. *J. Virol.* **84**, 1867–1873 (2010).

Marinescu, I., Marinescu, D., Mogoantă, L., Efrem, I. C. & Stovicek, P. O. Sars-cov-2 infection in patients with serious mental illness and possible benefits of prophylaxis with memantine and amantadine. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **61**, 1007–1022 (2020).

### **2.9 FUNDING SUPPORT**

This study was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) grants to JPSP (#2017/26270-0 and #2020/06145-4), AMSG (#2020/07251-2), PMCM (2017/27131-9), PMMV (#2015/15626-8; 2020/04579-7), DMF (#2015/25364-0) JBS grant to MRDIL (FUSP Agreement 3558). Fellowships to CMP (#2017/11828-0), NGZ (#2019/12431-2), MGO (#2019/12431-2), MCA (#2019/12691-41), CLS (#2019/13916-0); AMSG AFSF fellowship: 2020/09149-0; TTSP fellowship: CAPES 88887.508739/2020; MRDIL (CNPq 303810/20181). JPSP is recipient of a G4 grant from Institut Pasteur (FUSP-Pasteur 3303-01). LGO and YSA are recipients of CAPES fellowship.

### 2.10 ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank all the members of the Neuroimmune Interactions Laboratory, the Scientific Platform Pasteur-USP and the Laboratory of Neuroproteomics for discussions and suggestions. CNPEN/LNaNo personnel for the support with the TEM images. This research used facilities of the Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano), part of the Brazilian Centre for Research in Energy and Materials (CNPEM), a private non-profit organization under the supervision of the Brazilian Ministry for Science, Technology, and Innovations (MCTI). The (names of the facilities) staff is acknowledged for the assistance during the experiments (proposal numbers). No thanks to the Brazilian federal government, whose huge financial cuts make Brazilian science to agonize.

### 2.11 AUTHOR'S CONTRIBUTION

LGO and YSA designed and performed all in vitro and in vivo experiments and analyzed data; PY performed in vitro experiments, VCC, FC, GRS and LC performed the proteomics and metabolomics and analyzed the data; EDA and NBS performed immunofluorescence and analyzed the data, GMA, EMF, IMP performed the experiments with brain slices, CMP, NGZ, MGO helped with all in vitro experiments; EGC performed TEM; PS performed all bioinformatics analyses; GGD performed *in vitro* respirometry and analyzed data; MCA, CLS, AFSF, MVA and TTSP performed in vivo infection, ACAC and LGBG helped isolating SARS-CoV2, MPC helped isolating the virus and sequenced the viral genome; MRL, DMF and AMSG provided in vivo samples and reagents from infected animals and edited the manuscript; PCM provided materials and reagents and edited the manuscript; CDM provided reagents for immunofluorescence and analyzed data; CMCM provided animals and reagents; PMMV provided reagents for respirometry, analyzed data and edited the manuscript; TMC provided reagents and performed the brain slice experiments, analyzed data and discussed the manuscript; DMS provided reagents and performed proteomics and metabolomics, analyzed the data, and edited the manuscript; JPSP designed and supervised the project, analyzed data and wrote the manuscript.

## 3. REALIZAÇÕES NO PERÍODO (2020-22)

### 3.1 Publicações e submissões de artigos científicos em jornais indexados

- Unraveling the links between mitochondria and neuroinflammation. OLIVEIRA.
  L. G. & ANGELO. Y. S.; IGLESIAS. A. H.; PERON, J. P. S. 10.3389/fimmu.2021.624919. Artigo de revisão, Front. Immunol. (2021).
- Atypical prolonged viral shedding with intra-host SARS-CoV-2 evolution in a mildly affected symptomatic patient. CUNHA, M. P.; ANGELO, Y. S.; PERON, J. P. S.; MINOPRIO, P. *et. al.* 10.3389/fmed.2021.760170. Artigo original, Front. Med (2021).
- SARS-CoV-2 Infection Impacts Carbon Metabolism and Depends on Glutamine for Replication in Syrian Hamster Astrocytes. OLIVEIRA, L. G. & ANGELO,
   Y. S; PERON, J.P.S *et. al.* 10.1111/jnc.15679. Artigo original, Journal of Neurochemistry (2022).
- Evaluation of the effectiveness of UV-C dose for photoinactivation of SARS-CoV-2 in contaminated N95 respirator, surgical and cotton fabric masks. METOLINA, P., ANGELO, Y. S., RAMOS, B. *et al.* Artigo original, Photochem Photobiol Sci (2022). 10.1007/s43630-022-00268-2.
- Bacteria promote HIV-1 replication in activated peripheral blood CD4+ T cells and reveal the localization of CD25 at the virological synapse. ZNAIDIA, M., ANGELO, Y. S., SCHWARTZ, O., CASARTELLI, N *et. al.* Artigo original, manuscrito em preparação (2022).
- Putrescine supplementation shifts macrophage L-arginine metabolism relatedgenes reducing Leishmania amazonensis infection. ZANATTA, M. J., ACUÑA, S. M., ANGELO, Y. S., MUXEL, S. M. et. al. Artigo original, 2022, em revisão (PLOS One, 19 Setembro)

### 3.2 Participação em eventos científicos

• Apresentação do trabalho: "Characterization of ZIKV-Mitochondria interplay in different animal models" durante o X Annual Meeting of the Graduate Program in Immunology. 16 a 18 de novembro de 2021. São Paulo – São Paulo, Brasil.

• Apresentação oral do trabalho: "*In vitro* viral kinetics front the root-to-tip of the SARS-CoV-2 lineage P.1. (*gamma* variant) from Brazil" durante o Journées du

Département Santé Globale - Institut Pasteur Global Health Department. 28 a 29 de outubro de 2021. Paris, França.

• **Participação do trabalho**: "Padronization of central nervous system cell culture system of hamsters (*mesocricetus auratus*) with posterior SARS-CoV-2 infection" durante o V Seminário de Ciência e Tecnologia em Biomodelos - Fundação Oswaldo Cruz. 7 a 8 de dezembro de 2020. Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, Brasil.

## 3.3 Prêmios

Prêmio de melhor video apresentado no IX Annual Meeting of the Graduate
 Program in Immunology. "Ética em Pesquisa com Animais". 9 a 10 de setembro de 2020.
 São Paulo – São Paulo, Brasil.