

AValiação DOS EFEITOS DA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-COV-2 EM CÉLULAS SH-SY5Y DIFERENCIADAS EM MODELO NEURONAL 3D

Erick José Nogueira de Andrade, Milena Yuki Rosental Sudo, Cristina Pacheco Soares.

Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil, erick.n.andrade@gmail.com, mlenarosental@gmail.com, cpsoares@univap.br

Resumo

SARS-CoV-2 (coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2) tem sido associado a manifestações neurológicas, possivelmente ligadas à ação neurotrófica de sua proteína spike. Este estudo investigou os efeitos da exposição à proteína spike em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciadas em um fenótipo neuronal usando um modelo de esferoide 3D. Após o tratamento, a imuno-histoquímica e os ensaios de viabilidade (Alamar Blue) revelaram um aumento na sobrevivência celular, apesar da desorganização pronunciada do citoesqueleto, irregularidades nucleares e adesão celular comprometida. Esses achados sugerem que a proteína spike por si só pode desencadear uma resposta pró-sobrevivência transitória enquanto compromete a integridade estrutural neuronal, potencialmente contribuindo para as disfunções neurológicas observadas na COVID-19 (Doença Coronavírus 2019).

Palavras-chave: Células Neurônais. SARS-CoV-2. Imunomarcacão. Viabilidade.

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica.

Introdução

A pandemia de 2020, causada pelo Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) — popularmente conhecido como Coronavírus — foi inicialmente associada a doenças respiratórias, como pneumonia e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). A entrada desse patógeno nas células hospedeiras é mediada pela proteína Spike (S) também chamada de glicoproteína, uma proteína trimérica fortemente glicosilada, presente na superfície do vírus, que desempenha papel essencial na ligação ao receptor ACE2 das células humanas (Salvamani *et al.*, 2020; Tang, 2024).

À medida que a infecção por SARS-CoV-2 avançou, observou-se a ocorrência de disfunções em múltiplos órgãos, incluindo lesão renal aguda e miocardite. No entanto, a manifestação de sintomas neurológicos trouxe grande preocupação, com relatos de distúrbios prolongados da consciência, doenças neurológicas mediadas por mecanismos imunológicos e eventos cerebrovasculares. Estudos demonstraram que pacientes com COVID-19 apresentaram níveis elevados de biomarcadores associados a lesões cerebrais, como a proteína beta-amiloide e a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Ren; Digby; Needham, 2021).

A linhagem celular SH-SY5Y, derivada de neuroblastoma humano, é amplamente utilizada em pesquisas neurológicas, incluindo estudos sobre diferenciação neural, neurotoxicidade, neuroproteção, metabolismo e doenças neurodegenerativas (Ross; Spengler; Biedler, 1983). Cultivada *in vitro*, essa linhagem permite a investigação de funções neurais fisiológicas e das respostas a diferentes estímulos, como a exposição a substâncias químicas. Além disso, as células SH-SY5Y podem ser diferenciadas quimicamente para adquirir características morfológicas e funcionais de neurônios humanos (Camdzic; Aga; Gokcumen, 2023).

Modelos tridimensionais (3D) de cultura celular, também conhecidos como esferoides, oferecem um ambiente experimental mais próximo do fisiológico. Eles possibilitam a formação de microambientes altamente semelhantes aos tecidos e órgãos humanos, tanto em estrutura quanto em função (Souza *et al.*, 2023). Esses modelos têm se mostrado essenciais na compreensão da fisiologia e das condições patológicas em eventos neurobiológicos, permitindo a replicação de mecanismos específicos do cérebro, como sinapses, interações celulares e processos de neuroinflamação (Salles; Giralddi; Soares, 2024).

Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar o impacto da glicoproteína S do SARS-CoV-2 em células SH-SY5Y diferenciadas para modelo neuronal, com foco em suas possíveis alterações no citoesqueleto, núcleo e adesão celular.

Metodologia

Cultivo da linhagem SH-SY5Y

As células da linhagem SH-SY5Y (neuroblastoma humano) foram mantidas em meio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12*), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Estreptomicina. As culturas foram incubadas a 37 °C em estufa com 5% de CO₂, sendo o meio trocado a cada dois dias.

Preparação dos moldes de agarose para cultura 3D

Os moldes tridimensionais foram confeccionados com agarose a 2% (m/v), dissolvida em tampão fosfato salina (PBS) e esterilizada por autoclave. Em placas de 12 poços, foram adicionados 2 mL da solução, sobre os quais foram posicionados carimbos para a formação de cavidades esféricas. Após solidificação à temperatura ambiente, os carimbos foram removidos, os poços preenchidos com PBS, e as placas armazenadas a 4 °C até o momento da semeadura celular.

Plaqueamento e diferenciação neuronal

Ao atingirem cerca de 80% de confluência, as células foram plaqueadas na densidade de 5×10^5 células/mL. Inicialmente, permaneceram por 5 dias em meio completo. Em seguida, foram submetidas à diferenciação neuronal por mais 5 dias, em meio contendo 10 µM de ácido retinóico, 0,5% de SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina, diluídos em DMEM/F12.

Tratamento com glicoproteína Spike (S)

Após o período de diferenciação, o meio foi substituído por solução contendo 0,5 µg/mL de proteína S recombinante. Os esferoides foram incubados por 1 h a 37 °C, sob 5% de CO₂. Após esse tempo, o meio foi novamente substituído pelo de diferenciação, sendo as culturas mantidas por mais 24 h.

Avaliação da viabilidade e morfologia celular

Para análise de viabilidade, o meio foi substituído por solução de Resazurina a 10% em DMEM/F12, e as amostras incubadas a 37 °C, 5% de CO₂, por 2 horas. A fluorescência foi medida com excitação a 544 nm e emissão a 640 nm. Como controle negativo, utilizou-se solução de Resazurina incubada nas mesmas condições, porém sem células. Após o ensaio, as amostras foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS.

Imunomarcação: citoesqueleto, núcleo e adesão focal

Após fixação, os esferoides foram permeabilizados por 10 minutos com Triton X-100 a 0,1% em PBS e lavados. Em seguida, foram incubados overnight a 4 °C com faloidina conjugada ao fluoróforo Texas Red®-X, para marcação da actina filamentosa. Posteriormente, foram incubados por 1 h com anticorpo primário anti-FAK (*focal adhesion kinase*), seguido por anticorpo secundário AP-Rabbit Anti-Mouse IgG1. Para marcação nuclear, adicionou-se DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). As amostras foram então analisadas em microscópio confocal (Zeiss Axiovert 100M, Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemanha).

Resultados

As células cultivadas apresentaram confluência adequada para o procedimento de plaqueamento (Figura 2A). Após a tripsinização, foram plaqueadas em moldes de agarose, com diâmetro médio de aproximadamente 1 mm em cada cavidade do molde, dispostos em placas de 12 poços (Figura 2B). Após 10 dias de cultivo, os esferoides formados apresentavam morfologia regular e estavam prontos para a exposição à glicoproteína Spike e para as análises subsequentes (Figura 2C).

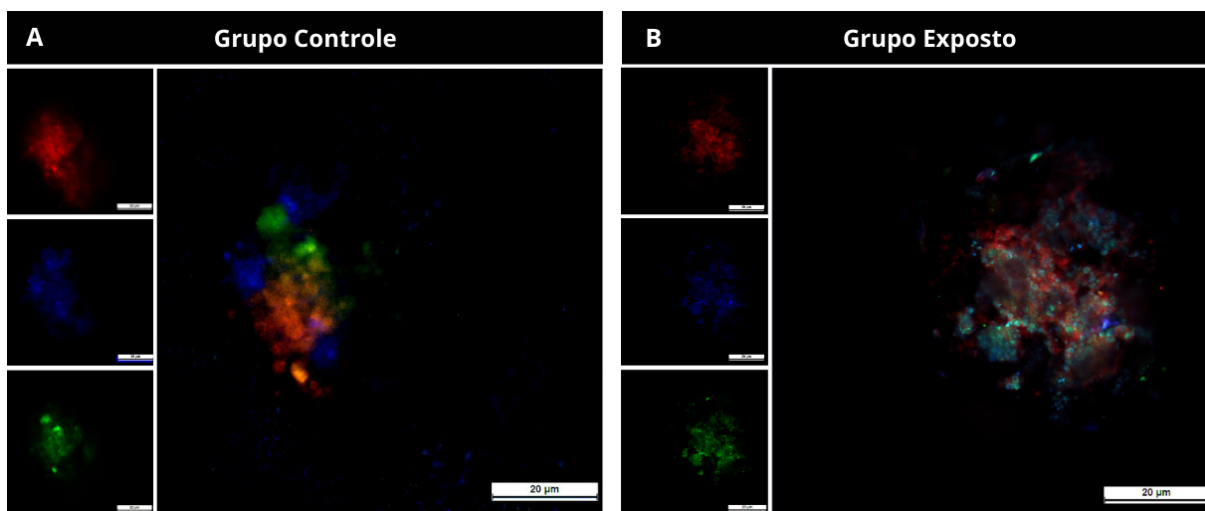
A viabilidade celular dos esferoides foi avaliada por meio de um ensaio quantitativo, comparando o grupo controle (esferoides diferenciados não tratados) com o grupo experimental exposto à glicoproteína Spike do SARS-CoV-2. Conforme ilustrado na Figura 2D, os resultados evidenciaram um aumento estatisticamente significativo na viabilidade celular do grupo tratado, apresentando média superior a 140% da viabilidade relativa, considerando o controle como 100%, com $p < 0,01$, indicando alta significância estatística.

A análise por imunofluorescência em esferoides 3D de células SH-SY5Y diferenciadas para fenótipo neuronal revelou alterações morfológicas expressivas após exposição à proteína Spike, conforme demonstrado na Figura 1. No grupo controle (Figura 1A), a marcação com faloidina (vermelho) evidenciou um citoesqueleto organizado, circundando os núcleos evidenciados pelo DAPI (azul). A proteína de adesão FAK (verde) apresentou distribuição homogênea na periferia dos esferoides, indicando preservação da adesão celular. Os núcleos exibiram morfologia regular e centralizada, sugerindo integridade estrutural do modelo tridimensional.

Por outro lado, no grupo tratado com a glicoproteína Spike (Figura 1B), observou-se desorganização significativa da arquitetura esferoidal. A marcação de faloidina apresentou-se fragmentada e difusa, refletindo alterações no citoesqueleto. A sinalização de FAK mostrou intensidade reduzida e distribuição dispersa, com perda da concentração periférica típica, indicando comprometimento dos pontos de adesão celular. Além disso, os núcleos (DAPI) demonstraram morfologia irregular e desorganizada, sugerindo prejuízo na integridade nuclear.

Embora tenha sido observada desorganização estrutural nas análises morfológicas, o aumento na viabilidade sugere uma possível resposta compensatória das células ao estímulo da Spike, possivelmente mediada pela ativação de vias de sinalização pró-sobrevivência.

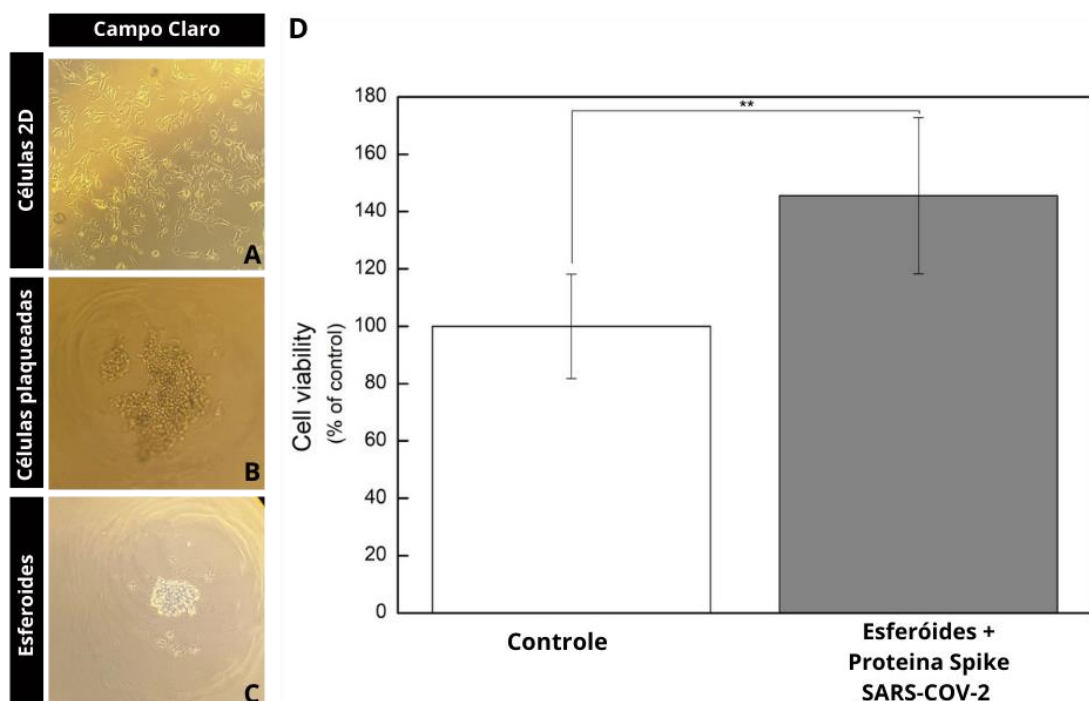
Figura 1: Microscopia Confocal dos esferoides neuronais. (A) Grupo Controle e (B) Grupo Exposto a glicoproteína Spike. Marcação de citoesqueleto (Faloidina, vermelho), núcleo (DAPI, azul) e adesão focal (FAK, verde) de esferoide de SH-SY5Y diferenciadas para modelo neuronal, nos poços para cultura 3D.



Fonte: os autores

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Figura 2: Formação de esferoides. (A) Micrografias de campo claro das células SH-SY5Y. (B) Micrografia de campo claro das células SH-SY5Y plaqueadas nos moldes 3D. (C) Micrografia de campo claro dos esferoides de células neuronais formados. (D) Citoviabilidade dos esferoides no modelo neuronal com e sem a exposição a proteína Spike. (** $p < 0,01$, em comparação ao grupo controle dos esferoides neuronais).



Fonte: os autores

Discussão

Os resultados obtidos demonstraram que a exposição de esferoides de células SH-SY5Y diferenciadas à glicoproteína Spike do SARS-CoV-2 levou a um aumento significativo da viabilidade celular em comparação ao grupo controle, acompanhado, entretanto, de alterações morfológicas relevantes, evidenciadas pela imunomarcagem. Essa aparente discrepância — elevação da viabilidade frente à perda de organização estrutural — sugere que a proteína Spike pode induzir uma resposta celular pró-sobrevivência, mesmo em condições de estresse estrutural.

Estudos recentes indicam que a interação da proteína Spike com receptores celulares, como ACE2 (Enzima conversora da angiotensina 2) e integrinas, pode ativar cascatas de sinalização intracelular associadas à sobrevivência e proliferação, incluindo as vias PI3K/Akt (fosfatidilinositol 3-quinase /Proteína quinase B) e MAPK/ERK (Buzhdygan *et al.*, 2020; Nader & Kerrigan, 2022). A ativação dessas vias pode resultar em aumento da atividade metabólica celular, o que, em ensaios colorimétricos ou fluorimétricos de viabilidade, tende a refletir como incremento no sinal, mesmo na ausência de aumento real no número de células viáveis.

A imunomarcagem revelou alterações significativas no citoesqueleto (faloidina), na distribuição da proteína de adesão FAK e na morfologia nuclear (DAPI) após exposição à Spike. Esses achados sugerem comprometimento da adesão célula-célula e célula-matriz, além de instabilidade estrutural nuclear. Alterações na organização de FAK e no citoesqueleto já foram descritas como eventos precoces em processos de disfunção celular induzida por proteínas virais, podendo preceder a apoptose ou outras formas de morte celular programada. Dessa forma, o aumento observado na viabilidade pode representar um efeito transitório, correspondente a uma fase inicial de ativação celular e reprogramação fenotípica, que precede a perda funcional mais acentuada (Meng *et al.*, 2023).

Outro aspecto importante a considerar é que os ensaios de viabilidade baseados em Alamar Blue avaliam indiretamente a sobrevivência celular por meio da atividade metabólica redox. Estudos indicam que, em condições de estresse, as células podem apresentar metabolismo exacerbado, incluindo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como tentativa de compensar danos celulares (Mesquita; Cruz; Lopes, 2010). Esse fenômeno pode levar a um aumento artificial no índice de viabilidade detectado pelo ensaio, mesmo na presença de desorganização estrutural significativa, comprometendo a interpretação dos resultados.

Em conjunto, esses resultados indicam que a proteína Spike pode modular a sobrevivência e a organização estrutural de neurônios derivados de SH-SY5Y por mecanismos complexos, envolvendo tanto a ativação de vias de sinalização pró-sobrevivência quanto o comprometimento progressivo da integridade citosquelética e nuclear (Meng *et al.*, 2023; Cantuti-castelvetri *et al.*, 2020). Estudos demonstram que a exposição à proteína Spike ativa vias celulares que podem inicialmente promover a sobrevivência celular, ao mesmo tempo que desencadeiam alterações morfológicas e estresse estrutural que precedem a disfunção celular (Wang *et al.*, 2021).

Conclusão

Com a exposição à proteína Spike, os esferoides neuronais apresentaram alterações morfológicas, com o citoesqueleto mais desorganizado. Os núcleos se tornaram irregulares, e a adesão celular foi comprometida, evidenciando fragmentos dos pontos de adesão. Esses resultados destacam o impacto da proteína no sistema neurológico e a necessidade de futuras investigações. É fundamental realizar estudos adicionais sobre o aumento inicial da viabilidade celular para determinar se é um efeito de curto prazo ou um passo para a degeneração, utilizando marcadores de morte celular.

Referências

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

CAMDZIC, M.; AGA, D. S.; ATILLA-GOKCUMEN, G. E. Cellular lipidome changes during retinoic acid (RA)-induced differentiation in SH-SY5Y cells: A comprehensive *in vitro* model for assessing neurotoxicity of contaminants. *Environment & health (Washington, D.C.)*, v. 1, n. 2, p. 110–120, 2023.

CANTUTI-CASTELVETRI, L. et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science (New York, N.Y.)*, v. 370, n. 6518, p. 856–860, 2020.

MESQUITA, J.; CRUZ, D.; LOPES, F. Cellular stress induced by resazurin leads to autophagy and cell death via production of reactive oxygen species and mitochondrial impairment. *PLoS ONE*, v. 5, n. 3, p. e9542, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0009542.

NADER, D.; KERRIGAN, S. W. Molecular cross-talk between integrins and cadherins leads to a loss of vascular barrier integrity during SARS-CoV-2 infection. *Viruses*, v. 14, n. 5, p. 891, 2022.

REN, A. L.; DIGBY, R. J.; NEEDHAM, E. J. Neurological update: COVID-19. *Journal of neurology*, v. 268, n. 11, p. 4379–4387, 2021.

ROSS, R. A.; SPENGLER, B. A.; BIEDLER, J. L. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 71, n. 4, p. 741–747, 1983.

SALLES, G. R.; DE ANDRADE GIRALDI, L.; SOARES, C. P. THREE-DIMENSIONAL MODEL OF OXIDATIVE STRESS IN ALZHEIMER'S DISEASE. 2024. Disponível em: <<https://congressos.univap.br/soac/index.php/IIISEBVaP/IIISEBVaP/paper/viewFile/232/281>>

*A Ciência do **NANO** e seu impacto transformador no **MACRO***

SALVAMANI, S. et al. Understanding the dynamics of COVID-19; implications for therapeutic intervention, vaccine development and movement control. British journal of biomedical science, v. 77, n. 4, p. 168–184, 2020.

SOUZA, R. T. V. Organoides de cérebro como modelos de doenças de Alzheimer e Parkinson: uma revisão narrativa sobre as perspectivas para medicina regenerativa e personalizada. [s.l.: s.n.].

TANG, X. Identifications of novel host cell factors that interact with the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein. The journal of biological chemistry. [s.l.: s.n.].

WANG, M. Y. SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, n. 11, [s.d.].

YEUNG-LUK, B. H. et al. SARS-CoV-2 infection alters mitochondrial and cytoskeletal function in human respiratory epithelial cells mediated by expression of spike protein. mBio, v. 14, n. 4, p. e0082023, 2023.