EFEITOS DA PROTEÍNA SPIKE DO SARS-CoV-2 NO MICROAMBIENTE ASTROGLIAL 3D EM CÉLULAS U-87MG DIFERENCIADAS.

Erick José Nogueira de Andrade, Luiza de Andrade Giraldi, Geisa Rodrigues Salles, 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, eriick.n.andrade@gmail.com.

Resumo

A proteína Spike do SARS-CoV-2 tem sido associada a efeitos extrapulmonares, incluindo alterações no sistema nervoso central e respostas astrogliais. Este estudo investigou os efeitos da proteína Spike em um modelo tridimensional (3D) astroglial utilizando células de gliobastoma humano (U-87MG) diferenciadas. As células foram cultivadas em moldes 3D e expostas à proteína Spike recombinante (0,5 µg/mL) por 1 hora. A morfologia e a organização dos esferoides foram avaliadas por microscopia confocal, utilizando marcação com faloidina, DAPI e estreptavidina, além de microscopia eletrônica de varredura. Em comparação com o grupo controle, os esferoides expostos à Spike apresentaram heterogeneidade estrutural, alterações na organização da actina e irregularidade superficial, com presença de estruturas celulares e fibrilares heterogêneas. Os resultados combinados indicam que a exposição à proteína Spike está associada a alterações morfológicas e estruturais em esferoides diferenciados de U-87MG. Portanto, este modelo representa uma abordagem experimental relevante para investigar os efeitos estruturais de componentes do SARS-CoV-2 em microambientes astrogliais.

Palavras-chave: Astrócitos. Alterações Morfológicas. Alterações Estruturais. Neurotoxicidade. Cultura Tridimensional.

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica.

Introdução

A pandemia iniciada em 2019 foi causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), agente etiológico da COVID-19. Identificado pela primeira vez em dezembro do mesmo ano, esse vírus pertence à família Coronaviridae e apresenta elevada capacidade de transmissão entre indivíduos, principalmente por meio de gotículas respiratórias e aerossóis, e foi inicialmente associado a manifestações respiratórias, incluindo pneumonia e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). A entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras é mediada pela proteína Spike, uma glicoproteína trimérica altamente glicosilada localizada na superfície viral, que desempenha papel fundamental na ligação ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) presente nas células humanas (Salvamani *et al*., 2020).

Entretanto, com a progressão da infecção pelo SARS-CoV-2, evidências demonstraram que seus efeitos extrapolam o sistema respiratório, comprometendo diferentes órgãos e sistemas. Entre as manifestações extrapulmonares, as alterações neurológicas passaram a receber atenção crescente, incluindo déficits cognitivos, encefalopatias, distúrbios neuroinflamatórios e complicações cerebrovasculares. Nesse contexto, estudos relataram aumento de biomarcadores associados à lesão e à ativação de células do sistema nervoso central, como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), indicando importante envolvimento astroglial na fisiopatologia da COVID-19 (Needham *et al*., 2022; Ren; Digby; Needham, 2021).

Ademais, os astrócitos desempenham funções essenciais na manutenção da homeostase cerebral, incluindo suporte metabólico aos neurônios, regulação da transmissão sináptica, controle do ambiente extracelular e participação nas respostas inflamatórias do sistema nervoso central. A linhagem celular U-87MG, derivada de glioblastoma humano, é amplamente empregada como modelo experimental astroglial em estudos de neuroinflamação, neurotoxicidade e interação neurônio-glia. Em cultivo in vitro, essas células permitem investigar os efeitos de diferentes estímulos sobre a fisiologia e a reatividade astroglial, bem como os mecanismos celulares envolvidos na resposta a agentes patogênicos e fatores inflamatórios (Vandenbark *et al*., 2021).

Os modelos 3D de cultura celular, conhecidos como esferoides, representam uma abordagem experimental que reproduz de forma mais fiel a organização estrutural e funcional dos tecidos em comparação aos modelos bidimensionais convencionais. Esses sistemas favorecem a formação de interações célula-célula e célula-matriz, além de estabelecer gradientes de nutrientes, oxigênio e metabólitos, aproximando-se das condições fisiológicas encontradas no sistema nervoso central (De Andrade Giraldi *et al.,* 2026). No contexto das pesquisas em neurociência, os modelos 3D têm sido amplamente empregados para investigar mecanismos de neuroinflamação, reatividade astroglial e interações entre células da glia, permitindo uma representação mais fiel do microambiente cerebral e das respostas celulares observadas em condições fisiológicas e patológicas (De Simone *et al*., 2023).

Diante desse cenário, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos da glicoproteína Spike do SARS-CoV-2 no microambiente astroglial 3D, utilizando células U-87MG diferenciadas, por meio da caracterização de alterações morfológicas e estruturais associadas à exposição à proteína.

Metodologia

As células da linhagem U-87MG (glioblastoma humano) foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Estreptomicina. As culturas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2, com troca do meio a cada dois dias.

Os moldes 3D 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 1 mL da solução de agarose, sobre a qual foram posicionados carimbos para a formação das cavidades esferoidais. Após a 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.

Ao atingirem aproximadamente 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e, posteriormente, semeadas na densidade de 1×10^5 células/mL. Inicialmente, permaneceram em meio completo por 5 dias. Em seguida, foram submetidas à diferenciação astroglial por mais 5 dias, em meio DMEM contendo 10 µM de ácido retinoico, 0,5% de SFB e 1% de Penicilina/Estreptomicina.

Após o período de diferenciação, os esferoides foram divididos em grupos experimentais controle e tratado. O grupo controle recebeu apenas meio de diferenciação, enquanto no tratado os esferoides foram expostos à proteína Spike recombinante de comprimento total do SARS-CoV-2 (aminoácidos 1–1208), produzida em células HEK293 no Laboratório de Engenharia de Cultivo Celular (LECC/COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil; lote 0151021) e purificada por cromatografia de afinidade. A caracterização da proteína foi confirmada por análises de SDS-PAGE e Western blot. A proteína foi fornecida em PBS contendo biotina e azida de sódio a 0,02% e armazenada a −80 °C até o momento do uso. Para os experimentos, foi utilizada a concentração final de 0,5 µg/mL. O meio de diferenciação foi então substituído pela solução contendo a proteína Spike, e os esferoides foram incubados por 1 h a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO_2. Ao término desse período, a solução contendo a proteína foi removida e substituída novamente pelo meio de diferenciação, mantendo-se as culturas por mais 24 h.

Após o período de incubação, os esferoides foram fixados em paraformaldeído a 4% por 40 minutos. Posteriormente, as amostras foram destinadas às análises por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) e imunofluorescência.

Para a análise morfológica por MEV-FEG, os esferoides foram submetidos à desidratação em série crescente de etanol (30%, 50%, 70% e 100%), permanecendo por 10 minutos em cada concentração. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 10 minutos em uma solução contendo acetona e hexametildisilazano (HMDS), na proporção de 1:1, seguida de incubação em HMDS 100% até sua completa evaporação, permitindo a secagem das estruturas. Após a secagem, os esferoides foram montados em stubs metálicos com fita condutiva de carbono, metalizados com uma fina camada de ouro em sputter coater e analisados em microscópio eletrônico de varredura.

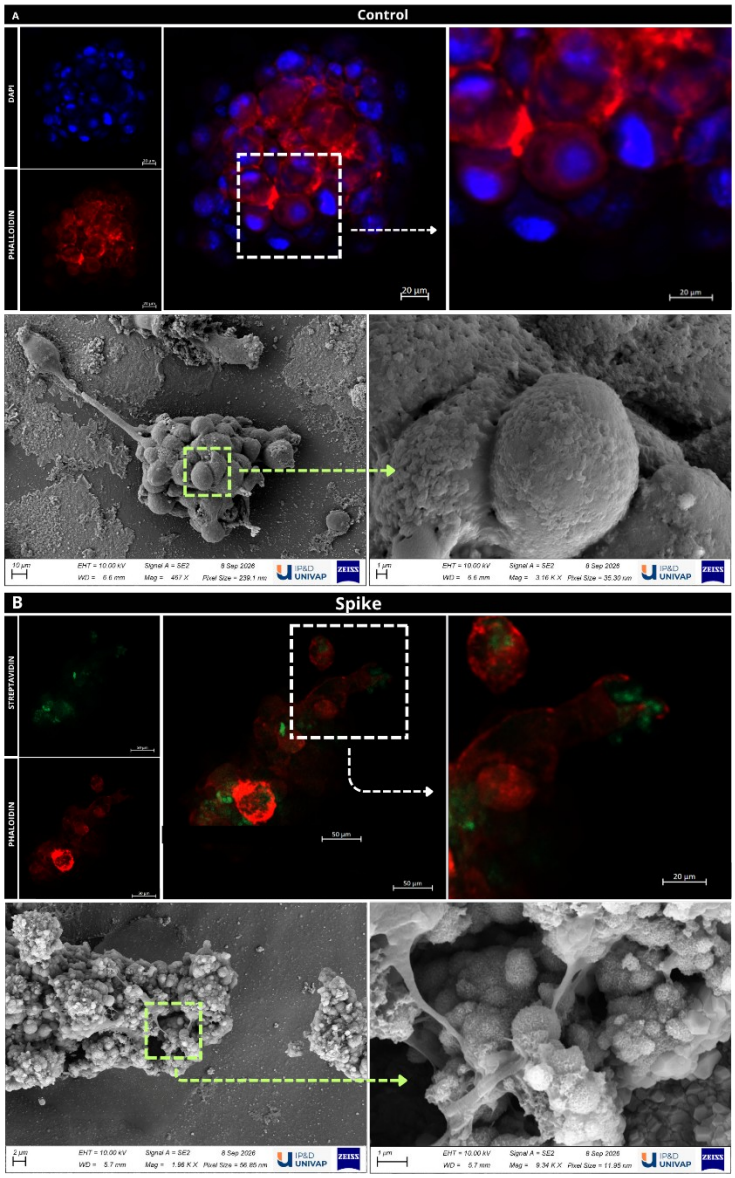
Para a análise por imunofluorescência, os esferoides fixados foram permeabilizados com Triton X-100 a 0,1% e incubados overnight, a 4 °C, com faloidina (1:500), DAPI (1:5000) e estreptavidina conjugada a fluoróforo (5 µg/mL). A detecção da proteína Spike foi realizada por meio da ligação da estreptavidina conjugada ao fluoróforo à biotina previamente presente na proteína, permitindo sua visualização por microscopia confocal. As amostras foram então analisadas utilizando um microscópio Zeiss Axiovert 100M (Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemanha).

Foi realizado dois experimentos independentes, com três réplicas técnicas por grupo experimental. O estudo teve caráter predominantemente qualitativo e descritivo, com foco na caracterização morfológica dos esferoides por MEV-FEG e na avaliação da distribuição dos sinais de fluorescência por microscopia confocal.

Resultados

A análise por microscopia confocal e por microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu caracterizar a organização estrutural e a morfologia dos esferoides de células U-87MG diferenciadas na ausência e na presença da proteína S.

Figura 1 - Análise morfológica dos esferoides astrogliais por microscopia confocal e microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG). (A) Grupo Controle e (B) Grupo exposto à proteína Spike. Na microscopia confocal, são apresentadas as marcações do citoesqueleto (Faloidina, vermelho), núcleo (DAPI, azul) e detecção da proteína Spike (Estreptavidina, verde).



Fonte: Autores, 2026.

No grupo Controle (Figura 1A), a microscopia confocal evidenciou uma estrutura 3D compacta e organizada, com núcleos distribuídos ao longo do esferoide, identificados pela marcação com DAPI, e organização do citoesqueleto de actina, evidenciada pela faloidina. A análise por MEV-FEG (Figura 1A) corroborou esses achados, mostrando um agregado celular predominantemente compacto, constituído por células de morfologia arredondada e superfície relativamente contínua. Em maior aumento, foram observadas células justapostas e com limites superficiais relativamente definidos, indicando organização celular no esferoide.

Após a exposição à proteína Spike, foram observadas alterações na organização tridimensional dos esferoides. Na microscopia confocal (Figura 1B), o grupo Spike apresentou distribuição mais heterogênea da marcação de faloidina, acompanhada pela presença de estruturas celulares alongadas e prolongamentos. A marcação por estreptavidina, utilizada para detecção da Spike, apresentou sinal verde associado às estruturas celulares, com distribuição heterogênea no esferoide.

As imagens obtidas por MEV-FEG (Figura 1B) evidenciaram diferenças adicionais na organização superficial dos esferoides expostos à Spike. Em comparação ao Controle, o grupo Spike apresentou uma arquitetura superficial mais irregular, com agregados celulares menos uniformemente organizados e presença de estruturas com aspecto granular e fibrilar entre as células. Em maior aumento, observaram-se células com superfície mais irregular e regiões com material intercelular aparente, além de prolongamentos ou estruturas de conexão entre diferentes regiões do agregado. Dessa forma, as análises por confocal e MEV-FEG demonstraram alterações concomitantes na organização do citoesqueleto e na morfologia superficial dos esferoides após exposição à proteína Spike.

Em conjunto, os resultados indicam que a exposição à proteína Spike esteve associada a alterações morfológicas no microambiente astroglial 3D, evidenciadas tanto pela reorganização da actina e da arquitetura celular observada por microscopia confocal quanto pela maior irregularidade da superfície e do arranjo celular observada por MEV-FEG.

Discussão

Os resultados obtidos por microscopia confocal e MEV-FEG demonstram que a exposição à proteína Spike está associada a alterações na organização estrutural dos esferoides de células U-87MG diferenciadas. Enquanto o grupo Controle apresentou arquitetura 3D mais compacta e organizada, com células relativamente justapostas e superfície mais regular, o grupo exposto à Spike apresentou maior irregularidade estrutural, alterações na distribuição da actina e presença de prolongamentos e estruturas superficiais heterogêneas. A análise integrada das duas técnicas permitiu avaliar tanto a organização do citoesqueleto e a distribuição da Spike quanto a morfologia superficial dos esferoides.

A maior heterogeneidade observada na distribuição da faloidina e as alterações morfológicas identificadas por MEV-FEG podem estar relacionadas a modificações na organização do citoesqueleto e nas interações celulares. A actina participa da manutenção da forma celular, adesão e interação célula-célula e célula-matriz, sendo, portanto, importante para a organização de estruturas 3D. Nesse contexto, Do *et al.* (2024) demonstraram que a interação da Spike com ACE2 pode promover alterações na actina cortical, associadas à modulação de proteínas ERM (Ezrina, Radixina e Moesina) e à redução da rigidez cortical celular. Além disso, Kou *et al.* (2025) demonstraram que a Spike pode modular mecanismos relacionados à reorganização da actina durante processos de fusão celular, envolvendo reguladores como Rac e RhoA e o complexo Arp2/3. Esses achados fornecem uma possível base para as alterações na organização da actina observadas no presente modelo.

A presença da marcação associada à Spike no modelo tridimensional também é relevante diante das evidências de interação do SARS-CoV-2 com células astrogliais. McMahon *et al*. (2021) demonstraram, em organoides corticais humanos, a participação preferencial de células gliais na resposta ao SARS-CoV-2. Andrews *et al*. (2022) também demonstraram tropismo do vírus por astrócitos corticais humanos, enquanto Crunfli *et al.* (2022) identificaram a proteína Spike em tecido cerebral de indivíduos com COVID-19, com predominância da marcação em astrócitos. Embora esses estudos avaliem principalmente a infecção pelo vírus, e não a exposição à Spike isolada utilizada neste trabalho, eles reforçam a relevância das células astrogliais como possíveis alvos de componentes virais.

Ademais, Hasler *et al*. (2025) demonstraram que a subunidade S1 da Spike pode ser internalizada por astrócitos humanos e induzir alterações endolisossomais e características associadas à

senescência, envolvendo via de sinalização do receptor Toll-like 7 (TLR7)/proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK). Kong *et al*. (2022), utilizando organoides cerebrais e astrócitos humanos, também observaram respostas inflamatórias associadas à exposição ao SARS-CoV-2. Esses achados sugerem que componentes da Spike podem interferir na homeostase astroglial, oferecendo contexto para as alterações morfológicas observadas no presente estudo.

Assim, a alteração concomitante da organização da actina e da morfologia superficial dos esferoides sugere que a exposição à Spike pode afetar diferentes aspectos da organização celular no microambiente astroglial 3D. Assim, os resultados indicam uma possível associação entre a exposição à proteína e modificações estruturais, morfológicas e na organização do citoesqueleto das células U-87MG diferenciadas, reforçando a relevância dos modelos 3D para investigar os efeitos de componentes do SARS-CoV-2 sobre o microambiente astroglial.

Conclusão

A exposição à proteína Spike do SARS-CoV-2 promoveu alterações morfológicas e estruturais nos esferoides de células U-87MG diferenciadas, caracterizadas por maior irregularidade da arquitetura celular, reorganização do citoesqueleto de actina e modificações na morfologia superficial observada por MEV-FEG. Em conjunto, os resultados sugerem que a Spike pode interferir na organização do microambiente astroglial 3D. Dessa forma, o modelo 3D de U-87MG mostrou-se uma ferramenta relevante para investigar os efeitos estruturais da proteína Spike sobre células astrogliais e contribuir para a compreensão de possíveis alterações neurológicas associadas à exposição a componentes do SARS-CoV-2.

Referências

ANDREWS, Madeline G. *et al.* Tropism of SARS-CoV-2 for human cortical astrocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 119, n. 30, 26 jul. 2022.

CRUNFLI, Fernanda *et al.* Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 119, n. 35, 30 ago. 2022.

DE ANDRADE GIRALDI, Luiza *et al.* Neurotherapeutic potential of photobiomodulation in a 3D Model of Alzheimer's disease induced by oxidative stress. In vitro models, 4 maio 2026.

DE SIMONE, Uliana *et al.* Human Astrocyte Spheroids as Suitable In Vitro Screening Model to Evaluate Synthetic Cannabinoid MAM2201-Induced Effects on CNS. International Journal of Molecular Sciences, v. 24, n. 2, p. 1421, 11 jan. 2023.

DO, Thi Ly *et al.* Interaction of SARS-CoV-2 Spike protein with ACE2 induces cortical actin modulation, including dephosphorylation of ERM proteins and reduction of cortical stiffness. Human Cell, v. 38, n. 1, p. 3, 22 out. 2024.

HASLER, Wendie A. *et al.* SARS-CoV-2 spike triggers TLR7-dependent endolysosome dysfunction and senescence in human astrocytes. Journal of Neuroinflammation, v. 22, n. 1, p. 254, 31 out. 2025.

KONG, Weili *et al.* Neuropilin-1 Mediates SARS-CoV-2 Infection of Astrocytes in Brain Organoids, Inducing Inflammation Leading to Dysfunction and Death of Neurons. mBio, v. 13, n. 6, 20 dez. 2022.

KOU, Linting *et al.* Role of membrane proximal actin regulators in SARS-CoV-2 spike-induced cell-cell fusion. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 766, p. 151846, jun. 2025.

MCMAHON, Courtney L. *et al.* SARS-CoV-2 targets glial cells in human cortical organoids. Stem Cell Reports, v. 16, n. 5, p. 1156–1164, maio 2021.

NEEDHAM, Edward J. *et al.* Brain injury in COVID-19 is associated with dysregulated innate and adaptive immune responses. Brain, v. 145, n. 11, p. 4097–4107, 21 nov. 2022.

REN, A. L.; DIGBY, R. J.; NEEDHAM, E. J. Neurological update: COVID-19. Journal of Neurology, v. 268, n. 11, p. 4379–4387, 30 nov. 2021.

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, 1 out. 2020.

VANDENBARK, Arthur A. *et al.* Microglia and astrocyte involvement in neurodegeneration and brain cancer. Journal of Neuroinflammation, v. 18, n. 1, p. 298, 23 dez. 2021.

Agradecimentos

Agradecemos à Me. Priscila M. S. C. M. Leite e à Dra. Angela A. M. Vieira, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D/UNIVAP), pelo auxílio nos procedimentos de microscopia confocal e pelo suporte técnico durante a aquisição das imagens no microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (MEV-FEG). Este trabalho contou com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio dos processos nº 174942/2024-9, 138459/2024-0, 157999/2025-4, 152384/2024-3 e 404953/2025-5; da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil, por meio do processo nº 88887.271538/2026-00; e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Brasil, por meio do processo nº 01.13.0275.00.