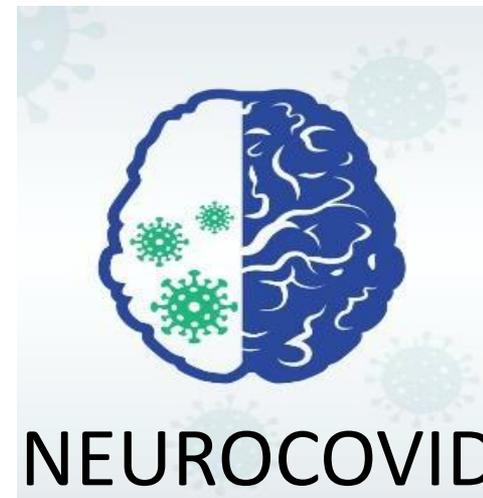


Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães



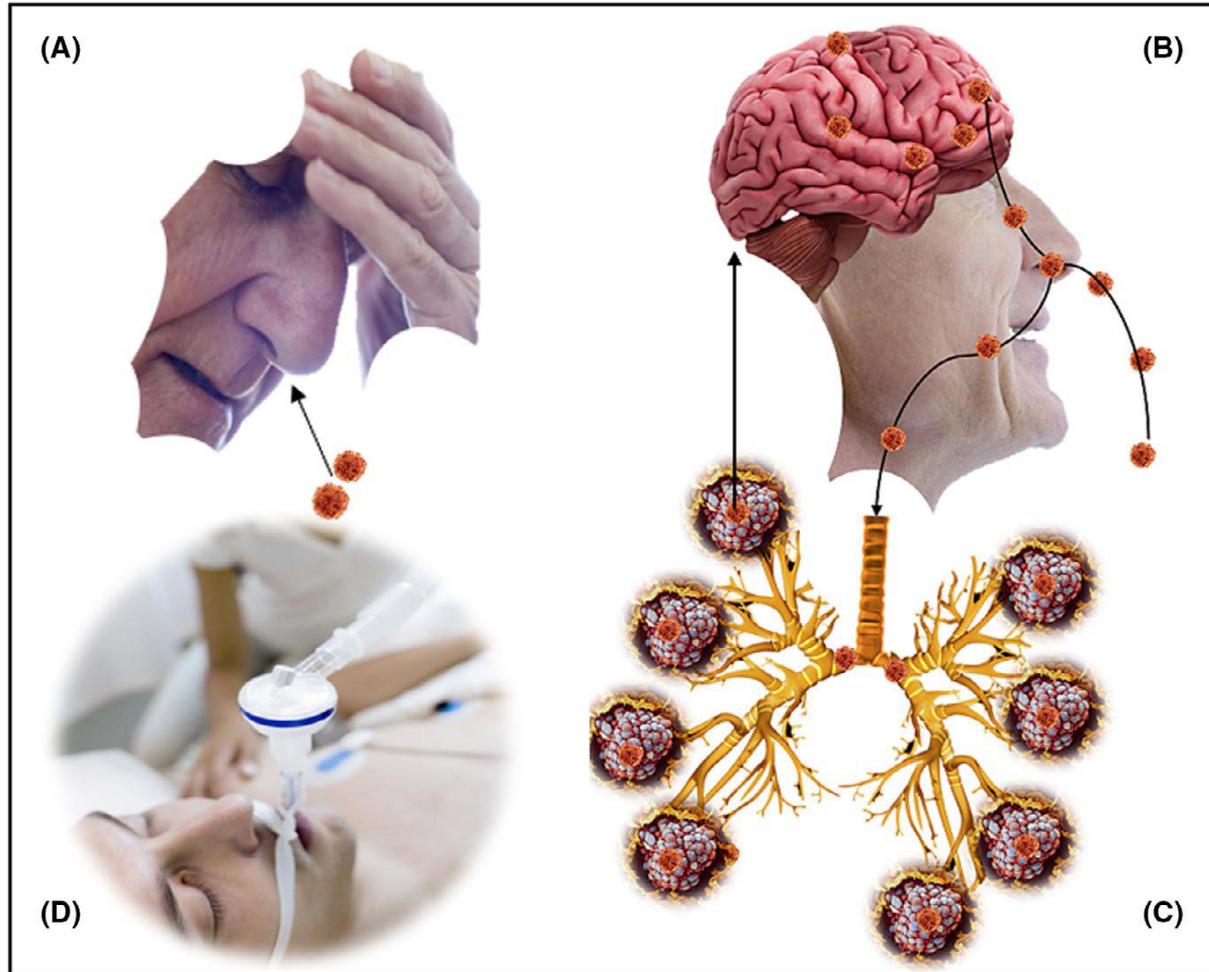
NEUROCOVID

Associação do SARS-CoV-2 com a ocorrência, o prognóstico e a patogênese das doenças cerebrovasculares e outras manifestações neurológicas

**Clarice Neuenschwander Lins de Moraes
Departamento de Virologia
Instituto Aggeu Magalhães
FIOCRUZ-PE**



Manifestações Neurológicas



BAIG, 2020



Neurotropismo do Sars CoV-2

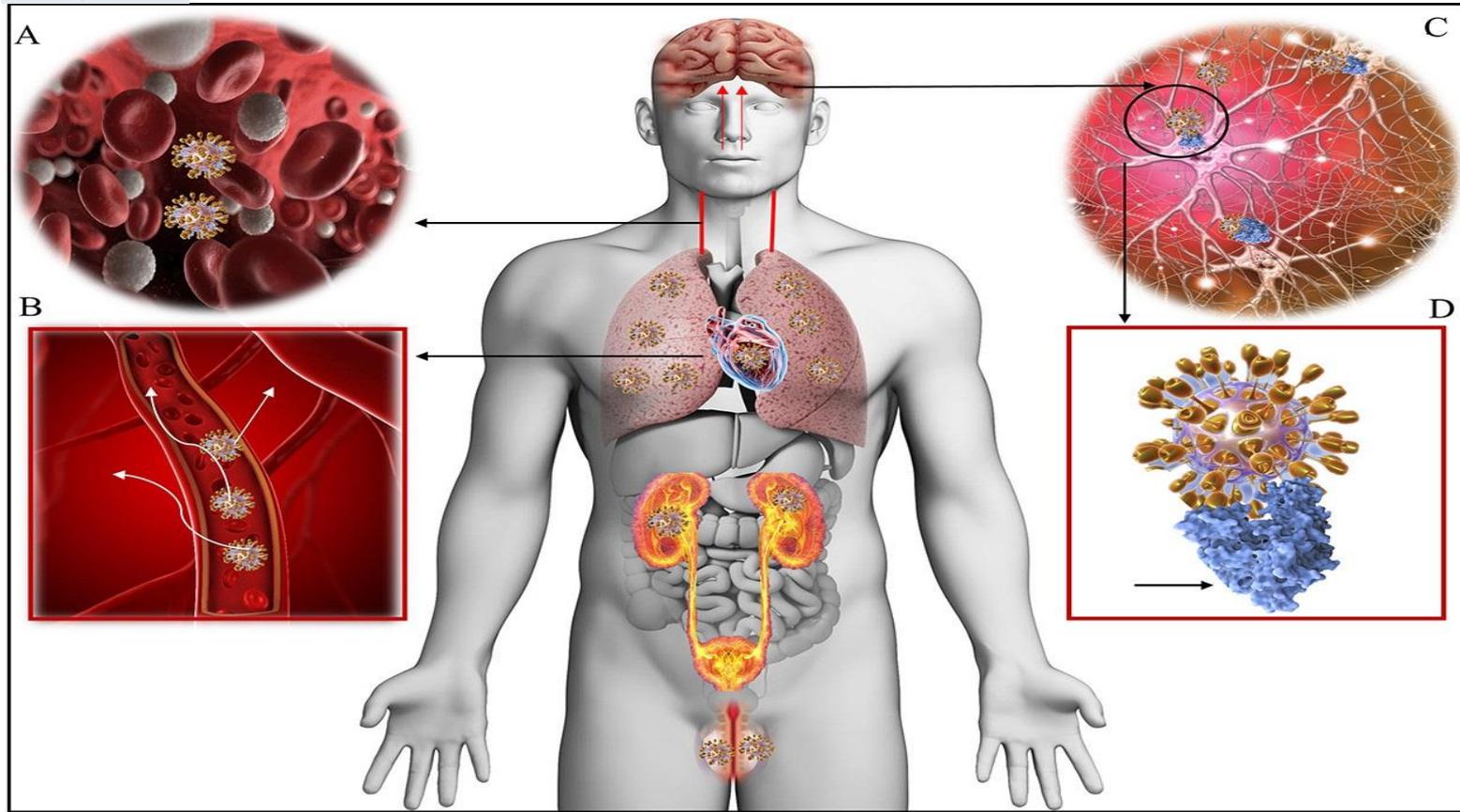
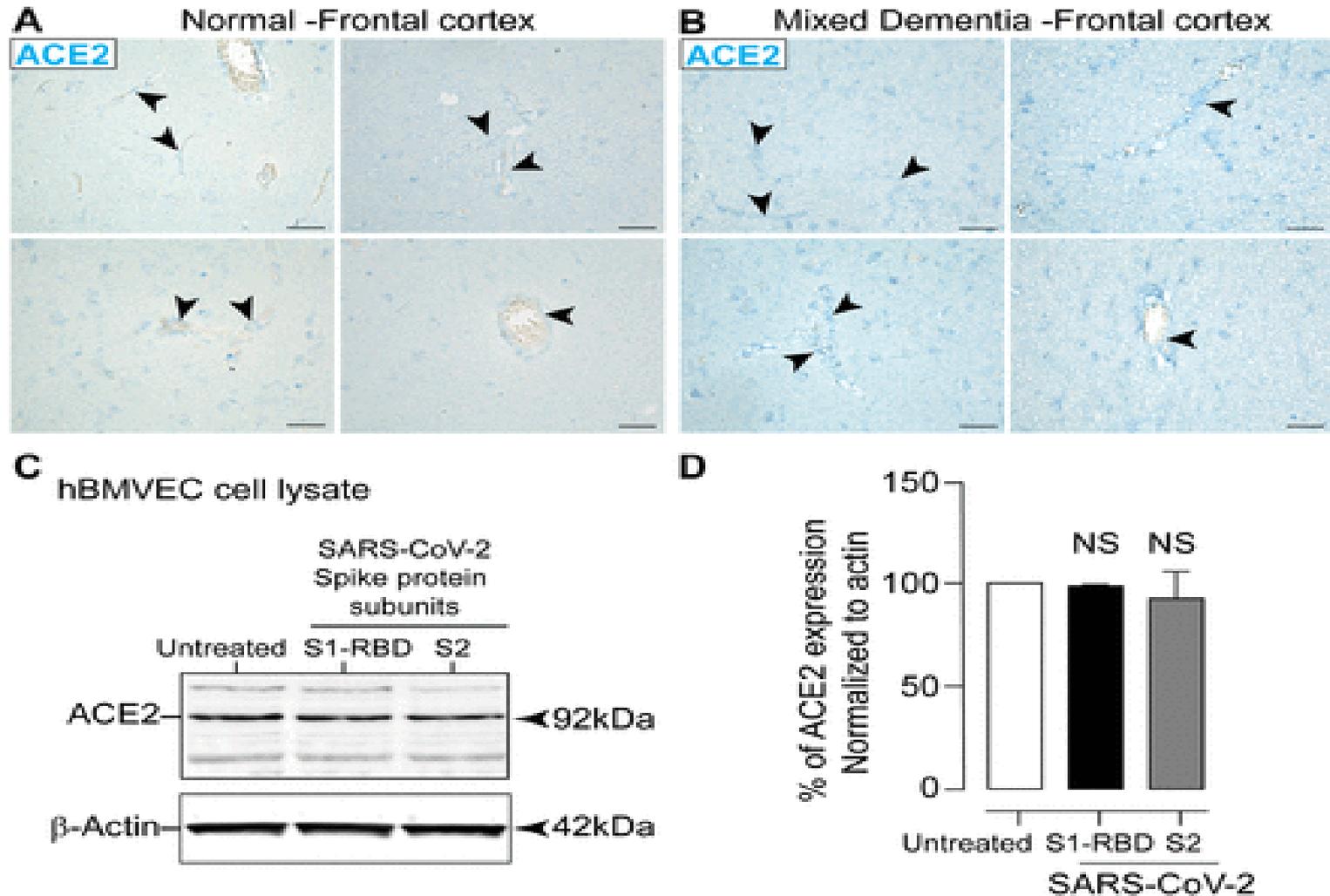


Figure 1. Tissue distribution of ACE2 receptors in humans. Viremia (A) disseminates the COVID-19 virus throughout the body via the bloodstream (B). Neurotropism may occur via circulation and/or an upper nasal cribriform plate route that enables the COVID-19 to reach the brain (C) and bind and engage with the ACE2 receptors (D, blue). COVID-19 docks on the ACE2 via spike protein (D, golden spikes). Shown are lungs, heart, kidneys, intestines, brain, and testicles that are well-known to express ACE2 receptors and are possible targets of COVID-19. (BAIG et al.2020)

ACE2 expression in human cerebral vasculature and in primary human brain endothelial cells (hBMVEC) in culture





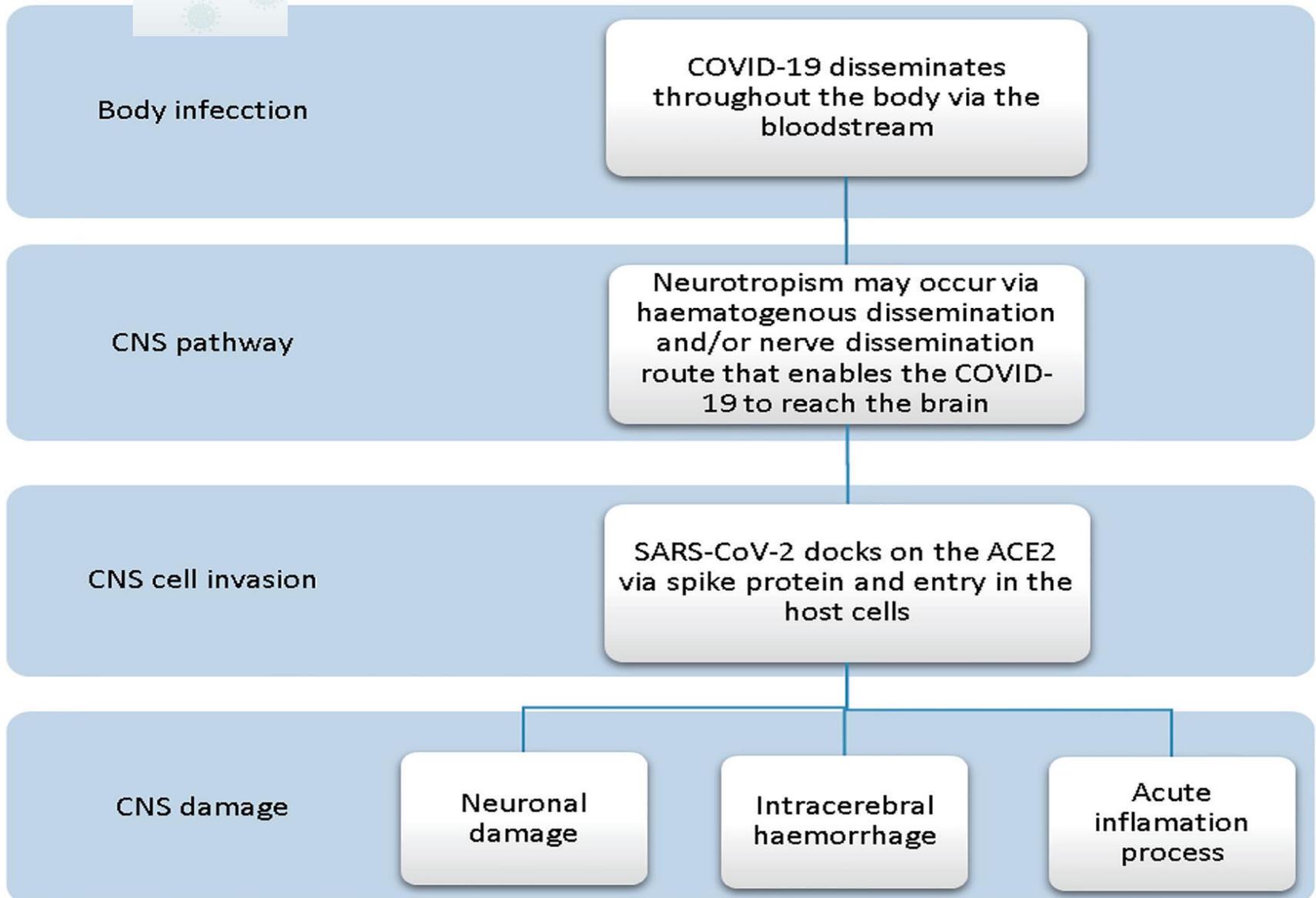
Como o vírus, através da ligação da Spike com o receptor ACE-2 nas células endoteliais cerebrais, e a resposta imune anti-viral alteram a integridade e função da BBB? Quais os mecanismos?

Ação direta da entrada do vírus nas células endoteliais microvasculares cerebrais irá causar uma **mudança fenotípica nessas células para um estado inflamatório**:

- ✓ Aumento da expressão de moléculas de adesão chaves ICAM 1 e VCAM-1, que participam da migração transendotelial de células imunes para o SNC;
- ✓ Aumento da expressão gênica e citocinas inflamatórias (como IL-1, IL-6, TNF-alpha) e quimiocinas (CCL5, CXCL10) que atraem leucócitos, e atuam na BBB aumentando a permeabilidade vascular;
- ✓ Aumento da expressão gênica de MMPs (que vão atuar degradando as proteínas das junções oclusivas);
- ✓ Resposta imune inflamatória gerada, com aumento da permeabilidade e integridade da BBB faz com que haja mais passagem e células infectadas com o vírus (“cavalos de troia”ou **Trojan Horses**”) para parênquima do SNC e além disso faz com que ocorra hemorragia, até mesmo antes dos danos neuronais ocorrerem.



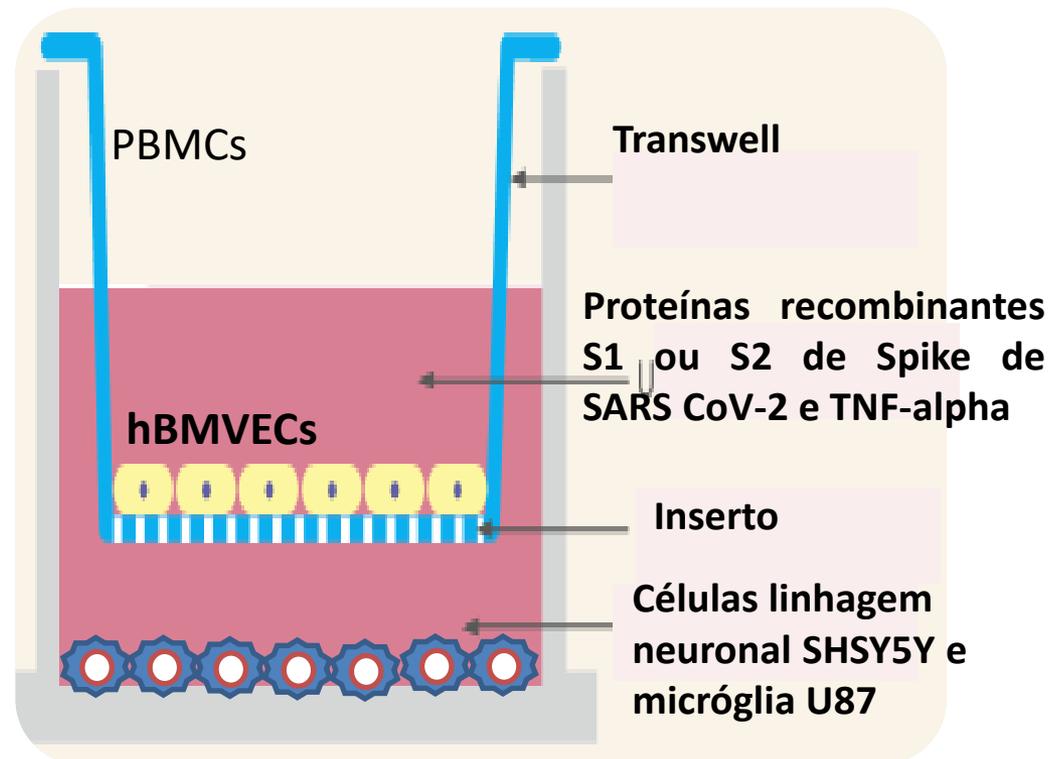
Resumindo a relação entre a COVID-19 e SNC





Objetivo específico 3: Testar um modelo *in vitro* de mimetização da barreira hematoencefálica para a infecção pelo SARS-CoV-2.

Modelo *in vitro* 2D de BBB: co-cultivo indireto

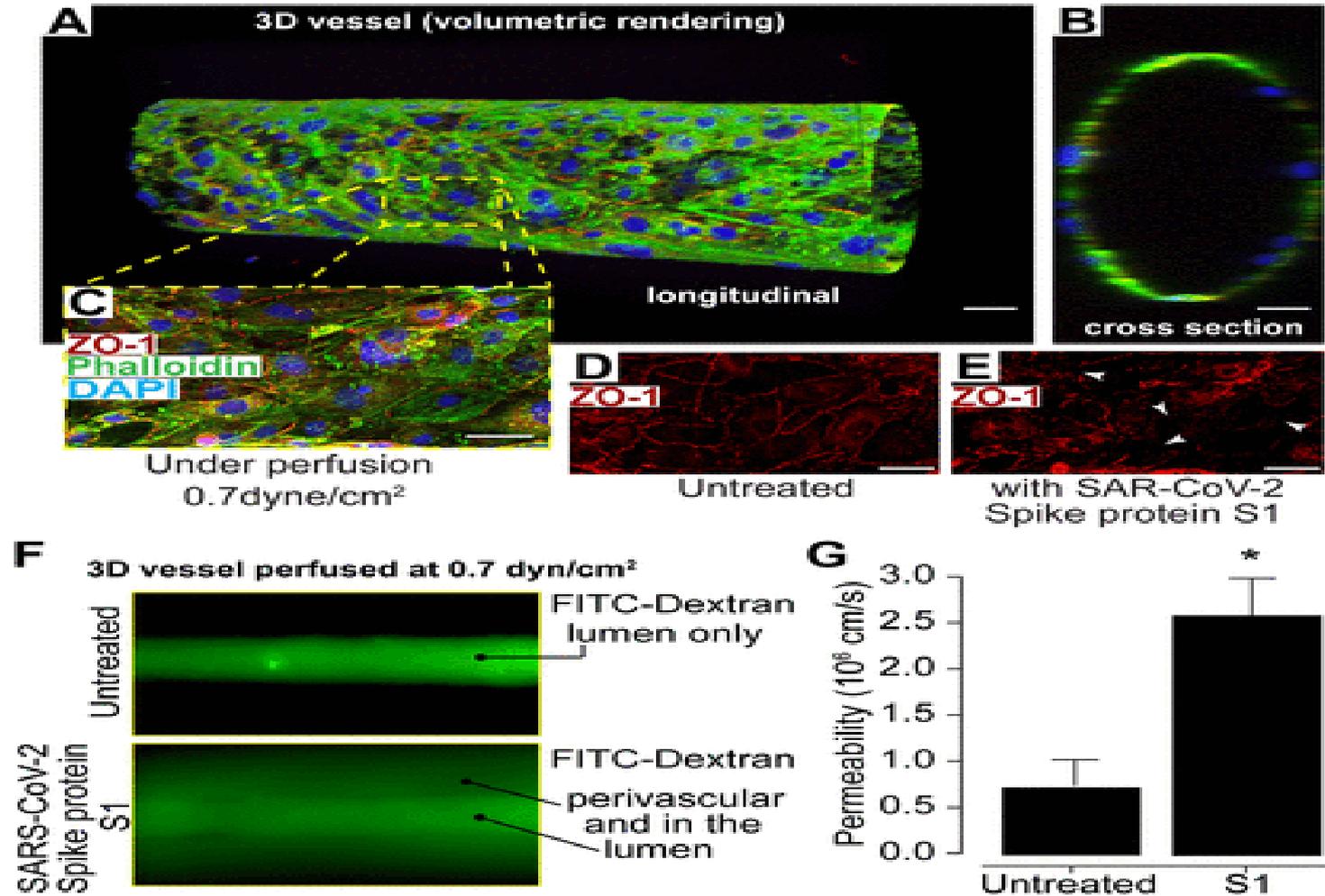




Objetivo específico 3

- ✓ Realizar o co-cultivo indireto entre PBMCs, células nervosas, endoteliais microvasculares cerebrais frente as proteínas recombinantes S1 e S2 de SARS CoV-2 ou TNF-alpha(controle positivo) ou sem estímulo (controle negativo);
- ✓ Avaliar a resistência elétrica transendotelial (TEER- mede o quanto a BBB está íntegra, quanto maior a TEER, mais resistente está a BBB e junções oclusivas) e à permeabilidade ao FITC-Dextran em monocamadas de células endoteliais microvasculares cerebrais no co- cultivo indireto com células nervosas frente as proteínas recombinantes S1 e S2 de SARS CoV-2 ou TNF-alpha(controle positivo) ou sem estímulo (controle negativo);
- ✓ Avaliar a expressão gênica de moléculas de adesão, citocinas inflamatórias e MMPs nas hBMVECs
- ✓ Verificar o perfil imunofenotípico das PBMCs que migrarem através do inserto semipermeável, e as citocinas e quimiocinas no sobrenadante do co-cultivo (adaptado de Afonso et al 2008);
- ✓ Avaliar apoptose/necrose das células nervosas e aspectos ultraestruturais das células nervosas e endoteliais após co-cultivo indireto através de MET.

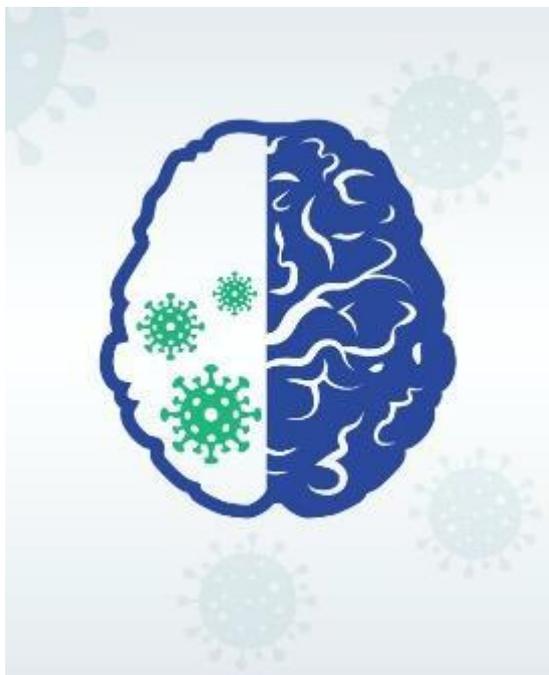
Exemplo de modelo *in vitro* 3D de BBB





Objetivo específico 2: Conhecer o padrão de resposta inflamatória e trombogênica *ex vivo* em adultos infectados por SARS-CoV-2 com e sem EVC

- ✓ Em amostras biológicas de 100 casos infectados, 100 controles infectados, 100 controles não-infectados, iremos:
- ✓ Avaliar títulos de anticorpos por PRNT (Teste de Neutralização por Redução de Placa) e níveis de quimiocinas (RANTES, CXCL8, MIG, MCP1, IP10) e citocinas (TNF, IFN- γ , IFN- α , IL 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 17), por citometria de fluxo em alíquotas de soro (casos e controles) e de LCR (casos com líquido colhido por indicação clínica);
- ✓ Obter as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) por gradiente de Ficol Hypaque;
- ✓ Avaliar a frequência de subpopulações de células T CD4 (perfil Th1, Th2, Th17), TCD8 (perfil Tc1/Tc2/Tc17), Células T reg (CD4, CD25, FoxP3) e marcação para citocinas intracelulares (IFN- γ /TNF/IL-4, 10, 17), por imunofenotipagem em citômetro de fluxo (no IAM) (resposta imune sistêmica);
- ✓ Pesquisa de epítopos de células T e B por ELISPOT (em Liverpool).



OBRIGADA!

clarice@cpqam.fiocruz.br