



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANATOMIA PATOLÓGICA

BEATRIZ ESTEVES VIEIRA

**EFEITO DA PRÉ-EXPOSIÇÃO AO ETANOL NA REATIVIDADE MICROGLIAL
INDUZIDA PELA PROTEÍNA SPIKE DE SARS-CoV2**

RIO DE JANEIRO

2025

BEATRIZ ESTEVES VIEIRA

**EFEITO DA PRÉ-EXPOSIÇÃO AO ETANOL NA REATIVIDADE MICROGLIAL
INDUZIDA PELA PROTEÍNA SPIKE DE SARS-CoV2**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Anatomia Patológica.

Orientadora: Joice Stipursky Silva

RIO DE JANEIRO

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

V658e Vieira, Beatriz Esteves
 Efeito da pré-exposição ao etanol na reatividade
 microglial induzida pela proteína Spike de SARS-CoV2
 / Beatriz Esteves Vieira. -- Rio de Janeiro, 2025.
 42 f.

 Orientadora: Joice Stipursky.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
 Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de
 Pós-Graduação em Medicina (Anatomia Patológica), 2025.

 1. COVID-19. 2. Álcool. 3. Neuroinflamação. 4.
 Microglia. 5. BV-2. I. Stipursky, Joice, orient.
 II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia Patológica (PPGAP), sob a orientação da Professora Joice Stipursky da Silva. A dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia das Interações Neurovasculares (LBINV) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro; sob recursos concedidos pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e pela *International Society for Neurochemistry* (ISN).

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus pais e minha irmã por terem me apoiado em cada momento dessa minha jornada, estando ao meu lado a cada novo desafio que eu precisei enfrentar; aos meus sobrinhos, que são luz em minha vida e me dão mais forças ainda para continuar e ajudar a criar um futuro melhor para eles através da ciência. Um milhão de vezes obrigada por todo o apoio, por serem meu pilar mais importante nessa e em todas as minhas jornadas.

Aos meus amigos, especialmente a Lorena, Raquel e Eduardo, que estiveram comigo desde o início ouvindo minhas frustrações sobre as células que não vingaram, os experimentos que deram errado, mas também compartilharam comigo as alegrias e realizações profissionais que eu obtive durante os dois anos do mestrado. Agradeço também aos que tiveram uma breve passagem nesse percurso, mesmo que não tenhamos mais contato ou uma relação próxima, o carinho que me proporcionaram durante os momentos bons e ruins estarão pra sempre em minha memória, eu sou eternamente grata por terem tido essa passagem em minha vida. Também sou infinitamente grata aos meus amigos que, mesmo não tendo um contato frequente, sei que a torcida pelo nosso sucesso é mútuo. Todos vocês que passaram e os que permaneceram na minha jornada, sempre acreditando em mim nos momentos que até eu mesma não conseguia: muitíssimo obrigada.

À minha orientadora Prof^a Joice Stipursky por me aceitar inicialmente como técnica no laboratório junto com as Prof^{as} Fernanda Gubert e Juliana Vasques, e depois por me aceitar como aluna em um dos seus projetos. Obrigada pela oportunidade e por terem me auxiliado nesse processo. Às minhas amigas de laboratório, que também estiveram presentes em todos os momentos possíveis e imagináveis, principalmente a Eduarda, que foi a primeira a me acolher quando eu entrei no LabCom1; à Milena, que me acompanhou durante toda a graduação e depois topou a missão de me substituir quando eu passei na seleção do mestrado; à Isabelle, que me proporcionou as risadas mais escandalosas possíveis; à Fernanda Carmo, que ilumina o laboratório toda vez que chega; à Mirella, a nossa torcedora mais fraca nas olimpíadas, que também me deu muito suporte nesse caminho; à Gabriella, que compartilhou comigo diversas situações de desespero com a linhagem de célula que utilizamos em comum; à Manuela, que também compartilhou inúmeros momentos dignos de lembrar para sempre, fazendo juntas o longo percurso até a nossa casa em um bairro bem distante do fundão; à Letícia, que foi a

primeira pessoa que eu fiquei encarregada de treinar como sendo aluna de iniciação científica; e agradeço também aos demais alunos que passaram no LabCom1 durante todo esse tempo.

À minha psicóloga Marjorie, que eu não poderia ter deixado de mencionar em meu TCC e agora em minha dissertação, pois sem o seu incrível trabalho eu não teria acreditado em mim e conseguido conquistar tudo o que conquistei em todos esses anos de parceria.

Aos meus colegas de profissão que de alguma forma cruzaram o meu caminho.

Aos incríveis professores que puderam me proporcionar todo o conhecimento exigido para que eu pudesse completar essa jornada.

A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, deixo aqui a minha eterna gratidão.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas.” – Carl Sagan

RESUMO

VIEIRA, Beatriz Esteves. Efeito da pré-exposição ao etanol na reatividade microglial induzida pela proteína Spike de SARS-CoV2. Rio de Janeiro: UFRJ, 2024. Dissertação (Mestrado em Anatomia Patológica) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

A COVID-19, causada pelo novo coronavírus, SARS-CoV-2, ocasionou mais de 700 milhões de casos confirmados de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). No auge da pandemia foi reconhecido pela OMS um aumento no consumo de bebidas alcóolicas na população de diversos países como um meio de lidar com a depressão e ansiedade resultantes do isolamento social. No sistema nervoso central (SNC), as células microgliais são as principais responsáveis pela resposta imune ao mediar a neuroinflamação. No contexto patológico, a microglia passa a secretar mediadores inflamatórios, altera sua morfologia e adota um perfil fagocítico. O consumo de álcool é reconhecidamente um fator que induz a neuroinflamação e neurodegeneração. No contexto da COVID-19, a neuroinflamação e a reatividade glial são eventos mediado pela infecção de células gliais humanas pelo SARS-CoV2, que reconhece, através de sua proteína de superfície Spike-1, a enzima conversora de angiotensina-2 (ACE-2) e outras proteínas como TMPRSS2 e TLR4. Apesar de diferentes fatores de risco para COVID-19 terem sido descritos, não se sabe se o consumo de álcool poderia representar um fator de risco para a reatividade microglial induzida por SARS-CoV2. Neste trabalho, cultivamos células microgliais murinas (BV-2) e as tratamos com etanol (170mM ou 340mM) por 24h (modelo agudo) ou 72hs (crônico, 1 tratamento por dia) seguido da exposição à proteína Spike-1 (1.8µg/ml) por 24h. Observamos por imunofluorescência que as células tratadas somente com etanol apresentaram aumento de 1,2x nos níveis de ACE-2 na condição de etanol 170mM em comparação ao controle. Células tratadas somente com Spike-1 apresentaram aumento de nos níveis de expressão de C3, um marcador de atividade fagocítica e ativação microglial, evento este que foi revertido pelo prévio tratamento crônico com etanol. O tratamento crônico com etanol apenas ou a exposição somente à Spike-1 parecem aumentar os níveis de IL-1 β e CD-86, evento estes que foi perdido pelo tratamento com Spike em células previamente expostas ao etanol. Tratamento com etanol sozinho não induziu a atividade fagocítica, evento este que só é observado pelo tratamento com Spike em células previamente expostas ao etanol. No *in vivo*, o etanol pareceu induzir a reatividade microglial pelo aumento dos níveis de IBA-1 no córtex cerebral, e alterou a expressão de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 de forma região específica. Já as microglias corticais humanas apresentaram níveis de expressão de ACE-2, TLR4, CD-11b e IBA-1 induzidos pelo etanol de forma dose dependente.

Estes dados sugerem que a exposição ao etanol parece reduzir a resposta microglial à Spike-1, o que poderia contribuir para a perda de função microglial no controle da resposta imune e neuroinflamação no SNC.

Palavras-chave: COVID-19, ÁLCOOL, NEUROINFLAMAÇÃO, MICROGLIA, BV-2.

ABSTRACT

VIEIRA, Beatriz Esteves. Effect of ethanol pre-exposure on microglial reactivity induced by SARS-CoV2 Spike protein. Rio de Janeiro: UFRJ, 2024. Master Thesis (Master Degree in Pathological Anatomy) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

COVID-19, caused by the coronavirus, SARS-CoV-2, has caused more than 700 million confirmed cases according to the World Health Organization (WHO). Along with life threatening symptoms, WHO also recognized, during the peak of the pandemic, an increase in alcoholic beverages consumption by population in different countries, reported as way to deal with depression and anxiety resulting from social isolation. In the Central Nervous System (CNS), microglial cells control the immune response by mediating neuroinflammation. It is known that alcohol consumption leads to neuroinflammation and neurodegeneration in CNS. In the context of COVID-19, neuroinflammation and glial reactivity are events mediated by the infection of human glial cells by SARS-CoV2, which recognizes, through its Spike-1 surface protein, the angiotensin-converting enzyme-2 (ACE-2) and other proteins such as TMPRSS2 and TLR4. Although different risk factors for COVID-19 have been described, it is not known whether alcohol consumption could represent a risk factor for SARS-CoV2-induced microglial reactivity. In this study, murine microglial cultures (BV-2) were treated with ethanol (170mM or 340mM) acute for 24h or chronically (1 treatment per day/72hs), and then exposed to the Spike1 protein (1µg/ml) for 24h. We observed by immunofluorescence that the ethanol treatment increases the levels of ACE2 by 1.2x, compared to the control. When analyzing markers of microglial reactivity, only spike-1 treated cells showed an increase in C3 expression levels, an event that was prevented by previous chronic treatment with ethanol. The chronic treatment alone or exposure to spike-1 alone appears to increase the levels of IL-1β and CD-86, an event that was lost by the spike-1 treatment in cells previously exposed to ethanol. Ethanol treatment alone did not induce phagocytic activity, an event that is only observed by Spike treatment in cells previously exposed to ethanol. *In vivo*, ethanol appeared to induce microglial reactivity by increasing IBA1 levels in the cerebral cortex and altered the expression of ACE-2, TMPRSS2 and TLR4 in the CNS in a region-specific manner. Human cortical microglia showed levels of expression of ACE-2, TLR4, CD-11b and IBA-1 induced by ethanol in a dose-dependent manner.

These data suggest that exposure to ethanol appears to reduce the microglial response to Spike-1, which could contribute to the loss of microglial function in controlling the immune response and neuroinflammation in the CNS.

Keywords: COVID-19, ALCOHOL, NEUROINFLAMMATION, MICROGLIA, BV-2.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Receptores e co-receptores para SARS-CoV2	Pág 4
Quadro 2	Anticorpos Primários e Secundários	26
Quadro 3	Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR	29

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 Sistemas e órgãos afetados pela infecção por SARS-CoV2 e seus possíveis sintomas	2
Figura 2 SARS-CoV2 e o mecanismo de entrada do vírus nas células	6
Figura 3 Mecanismos de entrada viral de SARS-CoV2 dependentes e independentes de ACE-2	7
Figura 4 Diferentes estados e funções da microglia no Sistema Nervoso Central	10
Figura 5 Perfis morfológicos da microglia	11
Figura 6 Efeitos do uso do álcool no Sistema Nervoso Central	16
Figura 7 Esquema de tratamento das células microgliais murinas BV-2 em modelos agudo e crônico	22
Figura 8 Microglias Humanas provenientes de cultura de astrócitos corticais humanos	23
Figura 9 Esquema de tratamento dos camundongos com etanol de forma crônica, seguido da dissecação do encéfalo	25
Figura 10 Tratamento com Etanol parece modular os níveis de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 em culturas de células microglias (BV-2)	31
Figura 11 O tratamento etanol e Spike-1 parece modular a proliferação celular em culturas de microglias (BV-2), mas não números totais de células	33
Figura 12 O tratamento com etanol e Spike-1 não altera os níveis de CD-11b em culturas de microglias (BV-2)	34
Figura 13 Células microgliais expostas à Spike-1 aumentam os níveis de C3, efeito que é perdido na presença de etanol	36
Figura 14 Efeito do tratamento com Spike-1 na morfologia microglial em culturas previamente expostas ao Etanol	39
Figura 15 O tratamento com Spike-1 induz o perfil fagocítico microglial independente da exposição ao Etanol	41
Figura 16 Efeito do tratamento com Spike-1 nos níveis de expressão de C3, IL-1 β e CD-86 em culturas de microglias (BV-2) previamente expostas cronicamente ao Etanol	42
Figura 17 Efeito da exposição crônica ao Etanol <i>in vivo</i> nos níveis de IBA-1 no córtex cerebral	44
Figura 18 Efeito da exposição crônica ao Etanol <i>in vivo</i> , nos níveis de ACE-2, TMPRSS2 e TLR-4 em diferentes regiões do SNC	45
Figura 19 Efeito do tratamento com Etanol nos níveis de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 em culturas de células microgliais humanas	2
Figura 20 Efeito da exposição ao Etanol nos níveis de CD-11b, IBA-1 e CD-45 em células microgliais humanas	6

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE-2	Enzima Conversora de Angiotensina-2
ADAM17	Desintegrina e Metaloprotease 17, do inglês <i>Disintegrin and Metalloprotease 17</i> , também conhecido como Enzima Conversora de Fator de Necrose Tumoral Alfa (TACE)
ARDS	Síndrome do desconforto respiratório agudo, do inglês <i>acute respiratory distress syndrome</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BHE	Barreira Hematoencefálica
C3	Componente Complemento 3, do inglês <i>complement component 3</i>
CD-11b	<i>Cluster</i> de diferenciação 11b, do inglês <i>cluster of differentiation molecule 11b</i>
CD-209/ CD-209L	<i>Cluster</i> de diferenciação 209, do inglês <i>cluster of differentiation molecule 209</i> , também conhecido como <i>DC-SIGN</i> (CD-209) ou como <i>L-SIGN</i> (CD-209L)
CD-45	<i>Cluster</i> de diferenciação 45, do inglês <i>cluster of differentiation molecule 45</i>
CD-86	<i>Cluster</i> de diferenciação 86, do inglês <i>cluster of differentiation molecule 86</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol (marcador de ácido nucleico)
DPP4/ CD-26	Dipeptidil Peptidase 4
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GRP78	Proteína Regulada por Glicose de 68kDa, do inglês <i>Glucose-Regulated Protein 78</i>
IBA-1	Proteína adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1, do inglês <i>Ionized calcium-binding adaptor molecule 1</i>
IFN-γ	Interferon-gama, do inglês <i>Interferon-gama</i>
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
ISG	Gene Estimulado por Intérferon, do inglês <i>interferon-stimulated gene</i>

Ki67	Kiel 67
LPS	Lipopolissacarídeo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MSS	Meio Sem Soro
NF-KB	Fator Nuclear Kappa B, do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>
NO	Óxido Nítrico, do inglês <i>nitric oxide</i>
NRP-1	Neuropilina-1
P/S	Penicilina/Estreptomicina
PBS	Tampão fosfato-salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldeído
qRT-PCR	Reação de PCR quantitativa (qPCR) em tempo real, do inglês <i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TACE	Enzima Conversora de Fator de Necrose Tumoral Alfa, do inglês <i>Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme</i>
TLR	Receptor do tipo Toll, do inglês <i>toll-like receptor</i>
TMPRSS2	Protease transmembrana serina 2, do inglês <i>transmembrane serine protease 2</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>tumor necrosis factor</i>
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
WT	Selvagem, do inglês <i>Wild-Type</i>
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 COVID-19.....	1
1.2 Sistema Nervoso Central como alvo do SARS-CoV2	8
1.3 Fatores de risco para COVID-19	13
1.4 Álcool e Sistema Nervoso Central	15
1.5 Álcool e COVID-19	18
2. JUSTIFICATIVA.....	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo Geral	20
3.2 Objetivos Específicos	20
4. METODOLOGIA	21
4.1 Cultivo de linhagem de microglias murinas BV-2	21
4.2 Cultivo de microglias humanas.....	22
4.3 Ensaio de Fagocitose	23
4.4 Exposição ao etanol em modelo <i>in vivo</i>	24
4.5 Imunofluorescência	25
4.5.1 Imunocitoquímica.....	25
4.5.2 Imunohistoquímica.....	27
4.6 Análises morfológicas <i>in vitro</i>	27
4.7 Reação de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR) ...	28
4.8 Quantificação e análises estatísticas	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Análise do efeito do tratamento com etanol nos níveis de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4	30
5.2 Efeito do tratamento com Spike-1 no número de células em culturas previamente expostas ao etanol.....	31

5.3 Efeito do tratamento com Spike-1 nos níveis de CD-11b em culturas previamente expostas ao etanol.....	33
5.4 Efeito do tratamento com Spike-1 nos níveis de C3 em culturas previamente expostas ao etanol	35
5.5 Efeito do tratamento com Spike-1 na morfologia microglial em culturas previamente expostas ao etanol	36
5.6 Efeito do tratamento com Spike-1 no potencial fagocítico de microglias previamente expostas ao etanol	40
5.7 Análise da expressão gênica de marcadores microgliais por RT-qPCR em células microgliais expostas cronicamente ao etanol, seguido do tratamento com Spike-1	42
5.8 Efeito da exposição crônica ao etanol <i>in vivo</i> nos níveis de IBA-1 no córtex cerebral de camundongos	43
5.9 Efeito da exposição crônica ao etanol <i>in vivo</i> na expressão de ACE-2, TMRSS2 e TLR4 em diferentes regiões do Sistema Nervoso Central	44
5.10 Efeito do tratamento de microglias humanas com etanol nos níveis de ACE-2, TMRSS2 e TLR4.....	45
5.11 Efeito do tratamento de microglias humanas com etanol nos níveis de CD-11b, IBA-1 e CD-45	47
6. DISCUSSÃO	47
7. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. COVID-19

No final de 2019, o mundo enfrentou o início do que se tornaria a maior pandemia da história recente. Na província de Wuhan, na China, foram relatados os primeiros casos de uma nova doença causando a chamada Síndrome Respiratória Aguda Grave, provocada por um novo coronavírus, SARS-CoV2, doença conhecida como *Coronavirus disease* (COVID)-19 (Huang *et al.*, 2020). Desde o decreto de pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 30 de janeiro de 2020 (Mehase, 2020), mais de 775 milhões de pessoas no mundo testaram positivo para a doença, causando mais de 7 milhões de óbitos (OMS, 2024) sendo, desde então, conhecida como “a maior calamidade em saúde no mundo desse século e o maior desafio que a humanidade já enfrentou desde a segunda guerra mundial” (Chakraborty & Maity, 2020). Do total de pessoas infectadas pelo vírus, quase 40 milhões dos casos e mais de 700 mil óbitos ocorreram somente no Brasil (Ministério da Saúde, Brasil, 2025).

Indivíduos infectados com o SARS-CoV2 podem ser assintomáticos, apresentar sintomas leves, como febre, perda do olfato e paladar, dores no corpo ou evoluir para a forma grave, onde ocorre a necessidade de internação, quando o paciente apresenta comprometimento respiratório severo, devido à insuficiência pulmonar (**Figura 1**). Além dos sintomas relatados por pacientes hospitalizados, observou-se também o comprometimento da função neural, como casos de doença cerebrovascular aguda com episódios de acidente vascular cerebral, cefaleia, tontura, perda de consciência, alterações na memória, ataxia e até mesmo epilepsia (Ellul *et al.*, 2020). De acordo com Brasil (2021), podem ocorrer casos críticos com presença de sepse, insuficiência respiratória e pneumonia graves, disfunção de

múltiplos órgãos, além de síndromes respiratórias, como a síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS, do inglês *acute respiratory distress syndrome*), podendo haver a necessidade de suporte respiratório e internações em unidades de terapia intensiva.

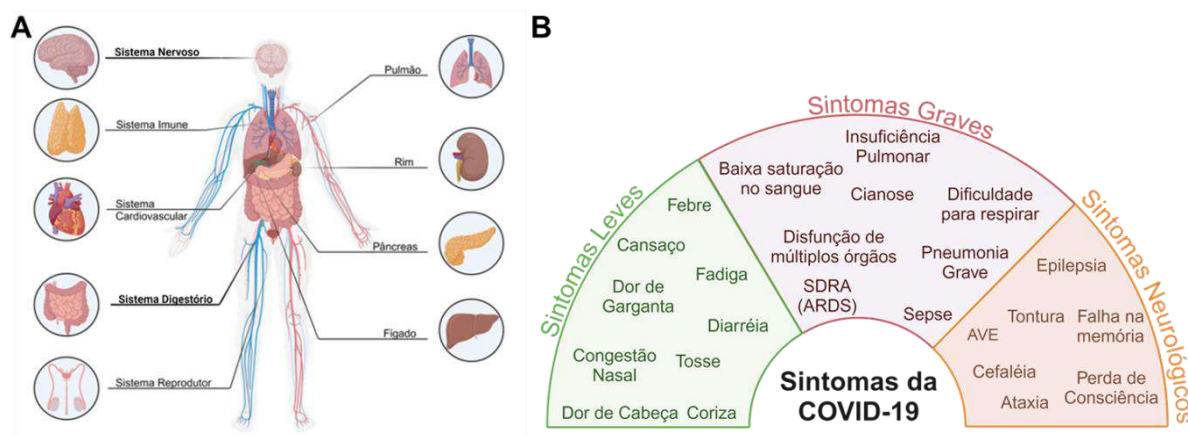


Figura 1. Sistemas e órgãos afetados pela infecção por SARS-CoV2 e seus possíveis sintomas. O SARS-CoV2 pode afetar diversos órgãos e sistemas do corpo humano (A), podendo não apresentar sintomas (assintomático), apresentar sintomas leves e graves, incluindo sintomas neurológicos (B). **SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo; AVE: Acidente Vascular Encefálico.** Criado em biorender.com

O SARS-CoV2 é um betacoronavírus de ácido ribonucleico (RNA), com material genético representado por uma única molécula de RNA positiva (RNA+), fita simples, não segmentada (**Figura 2A**). Dentre suas proteínas já identificadas, as proteínas estruturais são Spike (S), Nucleocapsídeo (N), Envelope (E) e Membrana (M) e outras 16 proteínas não estruturais (nsp1-16) (Ceraolo e Giorgi, 2020), sendo as proteínas S, E e M, ancoradas na bicamada lipídica que envolve o nucleocapsídeo e o RNA genômico (**Figura 2B**). A proteína do nucleocapsídeo está associada ao RNA genômico e atua regulando o processo da replicação viral quando a mesma já se encontra dentro da célula hospedeira (Helmy *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). A proteína M atua determinando o sítio de brotamento do vírus e a forma do envelope viral, além de ter uma interação direta com a proteína N que acaba por estabilizar o nucleocapsídeo. Já a proteína E atua desencadeando o

processo de montagem da partícula viral e brotamento (ICTV, 2011; Malik, 2020). Por fim, a proteína Spike-1, formada pelas subunidades S1 e S2, é responsável por realizar a ligação da superfície viral com proteínas receptoras presentes em células hospedeiras, possuindo uma aparência de coroa devido aos trómeros que formam espículas na superfície do vírus quando observados em microscópio eletrônico, dando origem ao nome “Coronavírus” (Helmy *et al.*, 2020; Uzunian, 2020). Essa proteína possui o domínio de ligação ao receptor (RBD, do inglês *Receptor Binding Domain*), o qual está localizado na subunidade S1, enquanto que na subunidade S2 se encontram os domínios de fusão, formados por sequências de repetição dos heptapeptídeos 1 e 2 (HR1 e HR2), constituídos por um terminal transmembrana e outro citoplasmático (**Figura 2C**; Xia *et al.*, 2020). Além disso, essa proteína também é capaz de reconhecer diferentes receptores (**Quadro 1**), como a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2), conhecida como sendo a principal porta de entrada do vírus na célula humana. Diversos órgãos e tecidos expressam altos níveis de ACE-2, como células do trato respiratório, células musculares, endoteliais, neurônios, astrócitos, microglias, e outros (Beyerstedt, Casaro & Rangel, 2020). Essa ligação com o receptor da célula alvo ocorre através do domínio S1 pelo domínio RBD e, após a interação S1(RBD)-ACE-2, o domínio S2 da proteína spike-1 é clivado através da enzima protease serina transmembranar 2 (TMPRSS2; **Figura 2C**), seguido do sítio S2' para completar o processo de fusão do vírus com a célula alvo (Jackson *et al.*, 2021). Contudo, apesar de ACE-2 ser considerada o principal receptor e estar presente na maioria dos órgãos, isso não serve como indicativo de que o vírus da COVID-19 entra no organismo através de órgãos e tecidos que tenham somente esse receptor (Masre *et al.*, 2020), podendo indicar que em baixos níveis de expressão o SARS-CoV2 tende a encontrar outros receptores (**Quadro 1**).

Outros co-receptores também já foram descritos capazes de auxiliar a entrada do vírus na célula (**Figura 3**), como TLR4 e ADAM17, (Bhattacharya *et al.*, 2020; Choudhury & Mukherjee, 2020; Achom, Das Pakray, 2022, Fontes-Dantas *et al.*, 2023), como também descritos no **quadro 1**.

Quadro 1: Receptores e co-receptores para SARS-CoV2

Receptor/co-receptor	Exemplos de locais onde é expresso	Referência(s)
ACE-2	Coração	Ni <i>et al.</i> , 2020; Vargas <i>et al.</i> , 2020 Salamanna <i>et al.</i> , 2020.
	Rim	
	Trato gastrointestinal	
	Diversas células do Sistema Nervoso Central	
	Pulmão	
TMPRSS2	Testículos	Hoffmann <i>et al.</i> , 2020 Jackson <i>et al.</i> , 2021; Barthe <i>et al.</i> , 2023
	Vasos Sanguíneos	
	Células epiteliais do trato respiratório, gastrointestinal e urogenital	
	Fígado	
	Pele	
TLR4	Células da membrana basal da mucosa oral	Rusanen <i>et al.</i> , 2024
	Queratinócitos	
	Fluidos corporais (forma diluída)	
	Células endoteliais	
	Célula Microglial	
ADAM17/ TACE	Neutrófilos	Oliveira <i>et al.</i> , 2024
	Células de Schwann	
	Células endoteliais	
	Células T	
	Linfonodos	
CD-147	Células epiteliais tubulares	Radzikowska <i>et al.</i> , 2020; Su <i>et al.</i> , 2021
	Células nervosas	
	Células mielóides	
	Células epiteliais do tecido olfatório	
	Macrófagos derivados medula óssea	
NRP-1	Células endoteliais	Cantuti-Castelvetri <i>et al.</i> , 2020; Mayi <i>et al.</i> , 2021
	Tecido renal	
	Tecido epitelial pulmonar	
	Megacariócitos	
	Plaquetas	
AXL	Epitélio Pulmonar	Wang <i>et al.</i> , 2021
DPP4/CD-26	Células mielóides	Vankadari <i>et al.</i> , 2020; Posadas-Sánchez <i>et al.</i> , 2021
	Capilares sanguíneos	
	Células do miocárdio	
	Células T CD4+	
	Coração	
Heparan Sulfato (HS)	Tecido Arterial	Cagno <i>et al.</i> , 2019; Salah & Mehta, 2021
	Capilares Sanguíneos	
	Células endoteliais venosas	
	Glândula da Tireoide	
	Células olfatórias	
GRP78		Chu <i>et al.</i> , 2018; Aguiar <i>et al.</i> , 2020; Fu <i>et al.</i> , 2021

De acordo com Jackson e colaboradores (2021), caso a célula alvo em que o vírus se ligou ao receptor não expresse níveis suficientes de TMPRSS2, o mesmo é internalizado por endocitose através da proteína clatrina até os endossomos, onde

será realizada o processo de clivagem do sítio S2' pelas proteases catepsinas (Figura 2C).

Em seu genoma estão presentes duas grandes quadros de leituras abertas (ORFs, do inglês *open reading frame*) – ORF1a e ORF1b –, que codificam as proteínas não estruturais, necessárias para a síntese de RNA por possuírem diversas funções enzimáticas. As ORF1a e ORF1b irão codificar as subunidades da maquinaria da replicase, as quais são produzidas através do processamento autoproteolítico de poliproteínas pp1a e pp1ab, respectivamente (Bai, Zhong & Gao, 2022). Assim, novas partículas virais são montadas através da associação de genomas e proteínas do nucleocapsídeo, com subsequente envelopamento da sua estrutura. As proteínas localizadas nesse envelope viral são inseridas nas membranas intracelulares, sendo então direcionadas ao local de montagem do vírus, encontrando-se com o nucleocapsídeo, para então desencadear o brotamento de partículas virais nos compartimentos da membrana (Bai, Zhong & Gao, 2022).

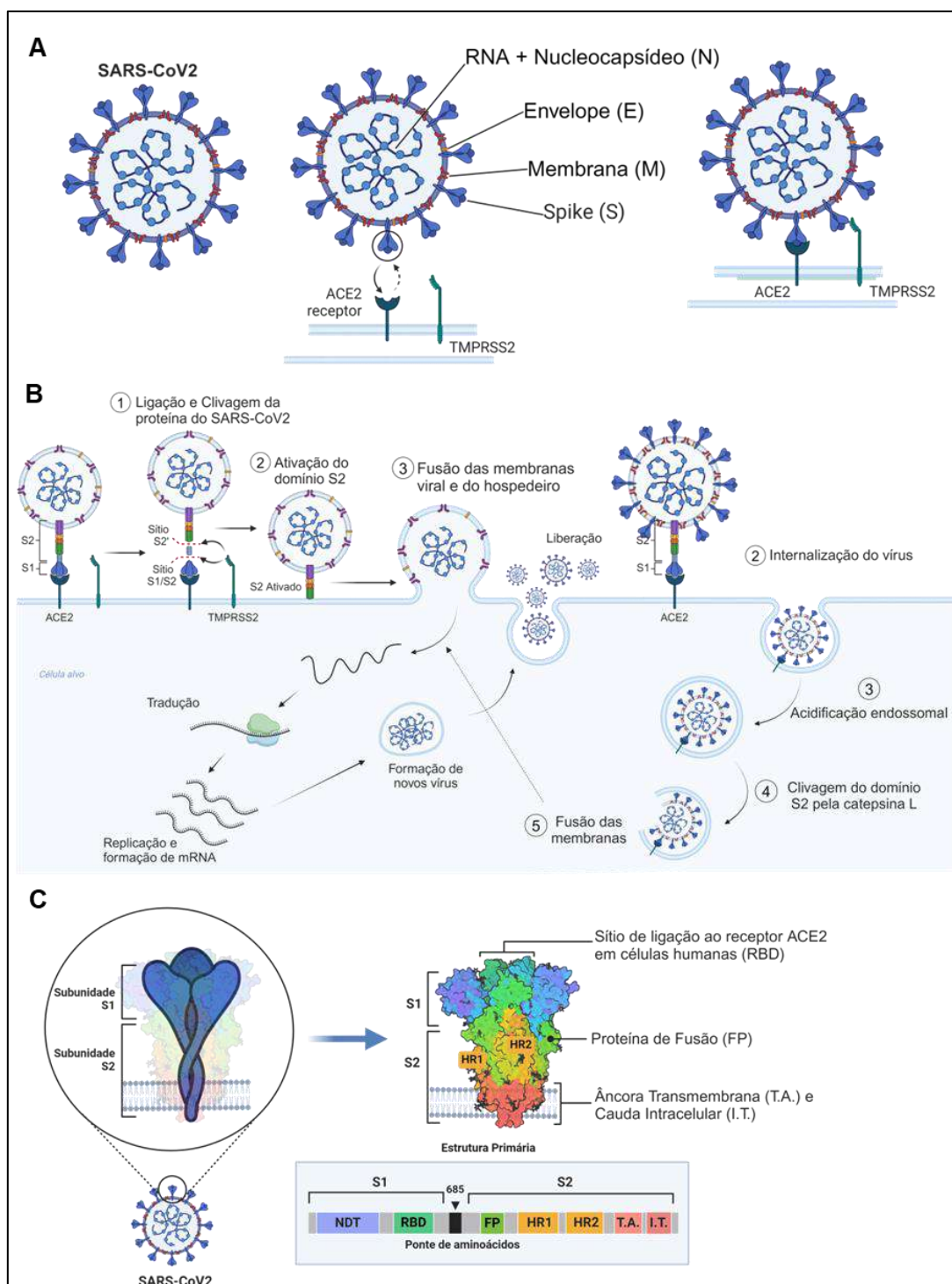


Figura 2. SARS-CoV2 e o mecanismo de entrada do vírus nas células. (A) Vírus SARS-CoV2 e suas proteínas essenciais: Nucleocapsídeo (N), Envelope (E), Membrana (M) e Spike (S), bem como seu principal receptor (ACE-2) e co-receptor (TMPRSS2); (B) Mecanismos de entrada do vírus na célula, onde no lado esquerdo há o esquema representativo onde ocorre a ligação do vírus com a célula alvo através do receptor ACE-2, seguida da clivagem através do co-receptor TMPRSS2, ativação do domínio S2 e da entrada através da fusão das membranas do vírus e da célula alvo. Já no lado direito há a ligação do SARS-CoV2 com o receptor ACE-2 seguido da internalização do vírus, no processo de endocitose pela proteína clatrina até os endossomos, onde será realizada o processo de clivagem do sítio S2' pelas proteases catipsinas para então ocorrer a fusão das membranas. Após qualquer um desses meios de entrada irá ocorrer a tradução e replicação do vírus para formação de mRNA, onde novos vírus irão ser formados para então serem liberados no meio extracelular; e (D) Subunidades S1 e S2 da proteína Spike, com ênfase nos domínios de cada subunidade. Criado em biorender.com

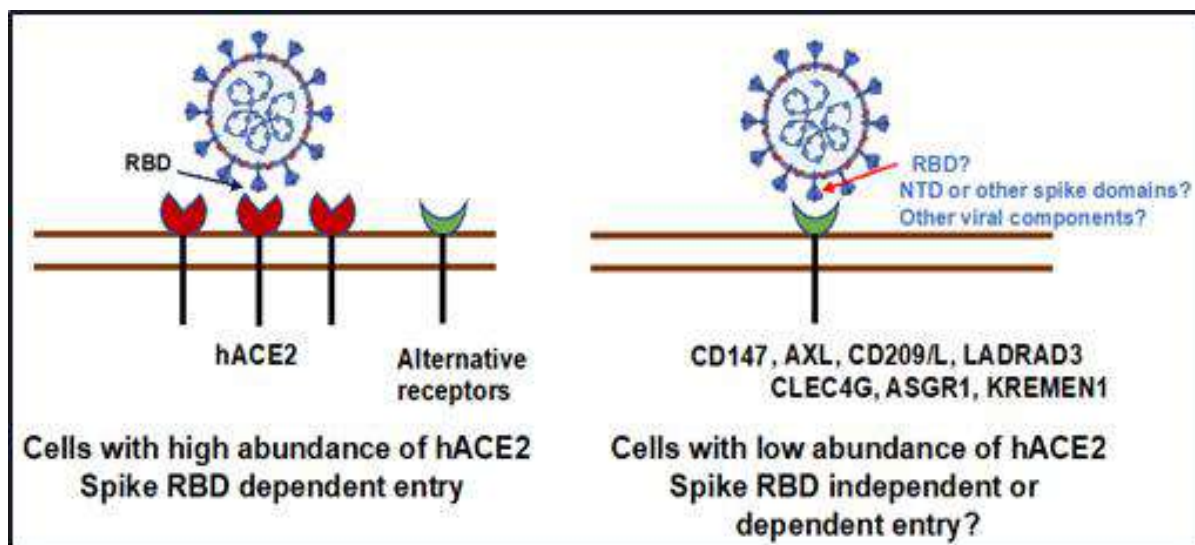


Figura 3. Mecanismos de entrada viral de SARS-CoV2 dependentes e independentes de ACE-2. Células que possuem grandes quantidades de receptores ACE-2 tornam o vírus dependente do mesmo para realizar a ligação com a célula, enquanto células com pouca quantidade desse receptor utilizam receptores alternativos. Fonte: Lim, Zhang, Chang, 2024.

Células epiteliais pulmonares, células cardíacas, endoteliais, células do plexo coróide, microglias e astrócitos expressam altos níveis de ACE-2 (Ni *et al.*, 2020; Vargas *et al.*, 2020). TMPRSS2 é abundantemente expresso em tecidos epiteliais, bem como astrócitos, pericitos e microglia (Hoffmann *et al.*, 2020, Malik *et al.*, 2023, Motta *et al.*, 2023). Como mencionado acima, em células que expressam baixos níveis de ACE-2 o vírus pode se ligar a receptores alternativos (Jackson *et al.*, 2022). De acordo com a literatura, o TLR4 também atua como um co-receptor do vírus, evidências sugerem que essa proteína possui a interação mais forte entre proteínas e a spike do SARS-CoV2 quando comparados com outros TLRs (Choudhury & Mukherjee, 2020). Outras evidências também sugerem que o SARS-CoV2 induz fortemente a expressão do gene estimulado por interferon (ISG) em contexto imunopatogênico no trato respiratório; também há evidências de que a ativação de ISG resulta no aumento da expressão de ACE-2 e sugerem um possível mecanismo no qual o vírus possa se ligar e ativar o TLR4 para aumentar a expressão de ACE-2

e, assim, promover a entrada do vírus na célula alvo (Aboudounya & Heads, 2021; Fontes-Dantas *et al.*, 2023). O TLR4 está presente tanto na superfície celular no local de reconhecimento de proteínas virais antes das mesmas entrarem na célula alvo, quanto nos endossomos quando a sua via de sinalização alternativa é acionada sendo, então, importante para inicializar as respostas inflamatórias e seu estímulo exacerbado pode levar a uma neuroinflamação prejudicial (Aboudounya & Heads, 2021).

1.2 Sistema Nervoso Central como alvo do SARS-CoV2

A COVID-19 pode desencadear sintomas neurológicos que resultam diretamente como resultados da tempestade de citocinas e hipóxia causadas pela inflamação sistêmica pelo SARS-COV2 e pela infecção por esse vírus em células da barreira hematoencefálica (BHE). A neuroinflamação exacerbada causada pela COVID-19 pode ocasionar disfunções neurovasculares na BHE e em células gliais, como a microglia, desencadeando assim os sintomas neurológicos (Xie *et al.*, 2023, Motta *et al.*, 2023). Esses sintomas neurológicos podem ser a perda do olfato (anosmia) e do paladar (ageusia), acidente vascular cerebral (AVC), tontura, dores de cabeça, problemas neuropsiquiátricos, cefaleia, encefalite, convulsão, entre outros (Nuzzo *et al.*, 2021; Pacnejer *et al.*, 2024). Dentre os problemas neuropsiquiátricos, que podem ser passageiros ou crônicos, estão a ansiedade, depressão e transtorno de estresse pós-traumático (TEPT; Taquet *et al.*, 2021). Estudos indicam que a esquizofrenia pode aumentar as chances de infecção por SARS-CoV2 devido ao uso de antipsicóticos (Nersesjan *et al.*, 2024), bem como ser uma das sequelas da COVID-19 por conta das alterações em células gliais (Baranova, Cao & Zhang, 2022). Estudos de Merzon *et al* (2021) e Liu, N *et al* (2021) mostram uma associação entre pessoas com Transtorno do Déficit de

Atenção com Hiperatividade (TDAH) e o risco aumentado de infecção por SARS-CoV2 e sintomas graves da COVID-19, mas ainda não sabem ao certo a correlação de ambas doenças.

As microglias são células originárias do saco vitelino (Saijo & Glass, 2011), sendo capazes de auto-renovação independentemente de células-tronco hematopoiéticas (Tay *et al.*, 2017), possuindo diferentes funções na manutenção da homeostasia cerebral, bem como atuando em processos patológicos (Costa, 2021). Apesar de possuírem bastante semelhança em morfologia e função com os macrófagos, suas origens embrionárias são diferentes, onde os macrófagos possuem origem embrionária mais tardia, sendo provenientes de células-tronco hematopoiéticas no fígado fetal (Hoeffel & Ginhoux, 2018).

As células microgliais, no contexto fisiológico, são responsáveis por desempenhar algumas funções (**Figura 4**), como a regulação da neurogênese (Cunningham, Martínez-Cerdeño & Noctor, 2013), a eliminação de células mortas e debris no SNC (Takahashi, Rochford & Neumann, 2005), o suporte neuronal através da liberação de fatores tróficos (Ueno *et al.*, 2013), fagocitar sinapses neuronais fracas ou disfuncionais (Shafer *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013), entre outras. Já durante o processo patológico, a microglia possui importante função durante a resposta imunológica e na neuroinflamação, ocorrendo uma rápida mudança na sua morfologia e função ao passar para um estado ativo e pró- ou anti-inflamatório (Kettenmann *et al.*, 2011; Plemel *et al.*, 2018). Os estados de reatividade microglial foram descritos inicialmente como M1, que seria o fenótipo “inflamatório”, e o M2 um fenótipo “neuroprotetor”, entretanto hoje em dia essas classificações estão caindo cada vez mais em desuso visto que já se sabe que os perfis de ativação microglial são na verdade um painel e que dependem do contexto celular, estímulo patológico,

região do SNC e momento em que houve o estímulo (Prinz, Jung & Priller, 2019; Savage, Carrier & Tremblay, 2019). Uma das proteínas envolvidas no processo fagocítico é a proteína IBA-1 (proteína adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1), cuja função demonstrada foi a de auxiliar na organização e reorganização dos filamentos de actina, aumentando as projeções de membrana para promover o processo fagocítico (Ohsawa *et al.*, 2003).

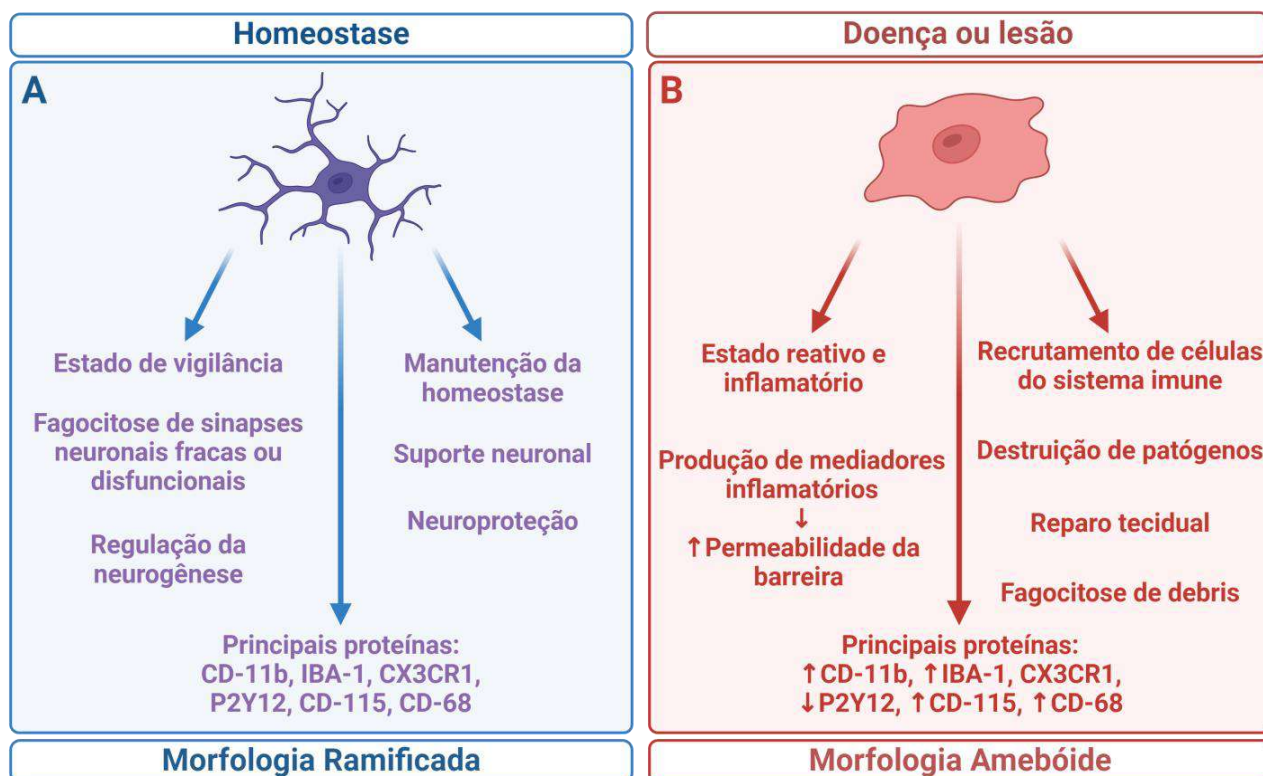


Figura 4. Diferentes estados e funções da microglia no Sistema Nervoso Central. (A) Célula em homeostase, onde desempenha a função de vigilância, manutenção da homeostase cerebral, fagocitose de células mortas, debris e sinapses neuronais fracas ou disfuncionais, regulação da neurogênese, suporte neuronal, neuroproteção, entre outros; (B) Célula em estado ativo e inflamatório, desempenhando a função de produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, recrutamento de células do sistema imune, destruição de patógenos, reparo tecidual, fagocitose de debris, entre outros, com modulação de suas principais proteínas. Criado em biorender.com

A mudança morfológica da microglia pode ser utilizada como parâmetro de análise do seu perfil de ativação. Quando essa célula se encontra em repouso (também chamado de estágio de vigilância), ela possui ramificações que rastreiam o ambiente em busca de patógenos. Ao perceber as mudanças no ambiente, a

microglia passa a retrain as ramificações e adquire a forma ativada (amebóide) (**Figura 5**). Entre esses dois estágios de morfologia há uma variedade de estágios intermediários que mudam de acordo com os estados celulares funcionais específicos de cada doença, porém ainda é incerto como ocorrem esses estados transicionais e a organização espacial no cérebro lesionado ou doente e ainda muitos artigos recentes utilizam a análise morfológica da microglia como um dos parâmetros para se correlacionar com a ativação pró inflamatória desta célula (Salamanca *et al.*, 2019).

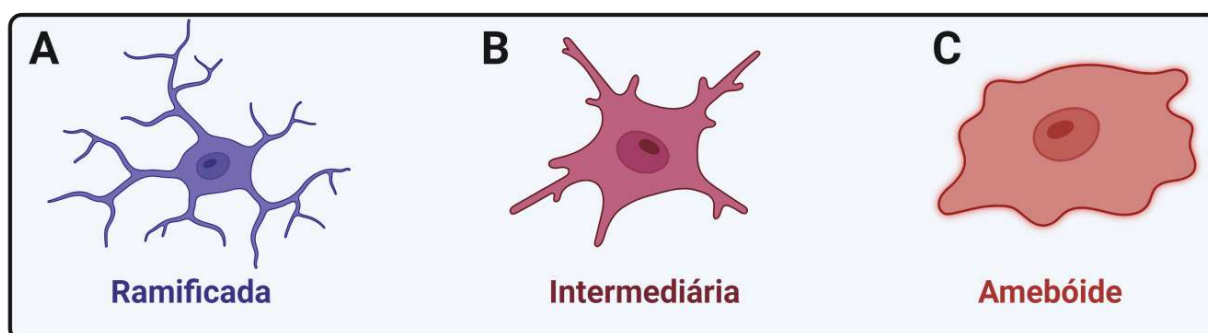


Figura 5. Perfis morfológicos da microglia. (A) Ramificada – estado **homeostático**, (B) Intermediária e (C) Amebóide – estado **reativo**. Criado em biorender.com

Além do aspecto morfológico, diversos marcadores de reatividade microglial tem sido identificados e correlacionados com os diferentes estados de ativação. As proteínas IBA-1, já mencionada, e a proteína de adesão CD-11b, da família de integrinas, tem sua expressão aumentada em microglias com perfil ativado pró- e anti-inflamatório (Korzhevskii & Kirik, 2016). Além disso, mais recentemente a proteína CD-45, uma tirosina fosfatase, tem sido correlacionada por sua função de supressão do perfil pró-inflamatório, uma vez que antagonistas da ativação desta enzima parecem aumentar a resposta pró-inflamatória microglial no contexto da doença de Alzheimer (Tan *et al.*, 2000). Além disso, a proteína da família complemento C3 já foi demonstrada como um dos principais marcadores de

ativação pró-inflamatória e atividade fagocítica microglial (Soteris & Sai, 2021). Classicamente, o fator de transcrição NF- κ B promove a transcrição de genes alvo, os quais muitos são pró-inflamatórios; sua sinalização é ativada através de duas vias distintas: via canônica e não-canônica (Sun *et al.*, 2022), sendo também é utilizado para identificar a ativação de vias de resposta pró inflamatórias (Liu, H *et al.*, 2021). Além disso, a secreção de citocinas está relacionada com o perfil de ativação da microglia, que ocorre quando a mesma responde a estímulos de citocinas e outros fatores (Nayak, Roth & McGavern, 2014; Tremblay *et al.*, 2015). A microglia é capaz de produzir e secretar citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , os quais já foram demonstrados secretados pela microglia durante o desenvolvimento e em contextos patológicos (Shigemoto-Mogami *et al.*, 2014). Em um estudo recente de Fontes-Dantas e colaboradores (2023) foi encontrado um aumento dos níveis de IBA-1 e que os níveis de expressão de TNF, INF- β e IL-6 foram modulados positivamente em células microgliais BV-2 que receberam spike por 24h, sem que afetasse os níveis de IL-1 β e IFNAR2.

De acordo com Almutairi e colaboradores (2021) as mudanças neuropatológicas demonstradas no SNC em decorrência da COVID-19 incluem a indução de respostas inflamatórias, as quais resultaram na liberação de mediadores inflamatórios. Um estudo *post mortem* demonstrou que 34 de 43 pacientes com COVID-19 apresentaram ativação microglial no cerebelo e no tronco cerebral (Matschke *et al.*, 2020). Já se sabe que a infecção sistêmica é capaz de induzir a ativação microglial no SNC e que essas células são mais suscetíveis a patógenos em comparação com astrócitos. A comunicação entre essas duas células é responsável pelo desencadeamento de liberação de fatores inflamatórios, como

TNF- α , óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Almutairi *et al.*, 2021).

1.3 Fatores de risco para COVID-19

Diversos fatores foram descritos como fatores de risco para progressão da COVID-19, como a obesidade (Silva *et al.*, 2021), diabetes *mellitus* (Garces *et al.*, 2022), hipertensão arterial, doenças cardiovasculares (Ribeiro e Uehara, 2022) e a idade (Chen *et al.*, 2022; Adesse *et al.*, 2022). Indivíduos obesos apresentam pré-disposição para agravamento de infecções pulmonares graves por SARS-CoV2 (Elrobaa & New, 2021), e também podem desenvolver uma piora no quadro respiratório devido à propensão de diminuição das vias aéreas, o que limita o fluxo de ar, além de apresentarem um desafio para a intubação quando necessária devido ao aumento da quantidade de tecido adiposo na laringe (Michalakis e Ilias, 2020). Pode-se destacar também o sedentarismo, podendo levar à obesidade, gerando resistência insulínica e prejudicar a resposta imune, contribuindo, assim para um possível desenvolvimento de diabetes *mellitus*. Em relação aos indivíduos diabéticos, ao prejudicar a resposta imune do organismo, acredita-se que isso pode levar à inflamação e estresse oxidativo, também podendo estar atrelada à microangiopatia associada a potencial toxicidade direta do SARS-CoV2, como em células beta pancreáticas (Garces *et al.*, 2022).

A maioria dos estudos que relacionaram a COVID-19 e a hipertensão arterial que está correlacionada à doenças cardiovasculares, apresentaram hipertensão como a doença crônica mais comum nos pacientes positivos para a Covid-19, com a maioria dos pacientes com idade superior a 60 anos (Ribeiro e Uehara, 2022). Esses pacientes apresentam disfunção endotelial, afetando diretamente a função vascular

e, ao realizar a associação com a idade, a hipertensão provoca o espessamento dos vasos sanguíneos, resultando no enrijecimento progressivo e perda de complacência das grandes artérias, desempenhando um papel crucial no avanço da patogênese da COVID-19 (Yugar-Toledo *et al.*, 2015; Nägele *et al.*, 2021). De fato, alterações vasculares, mas especialmente as neurovasculares foram descritas como indutoras da neuroinflamação e das sequelas neurológicas observadas na COVID-19 (Motta *et al.*, 2023).

Outro fator como a idade do indivíduo contribui para o estabelecimento da doença. Em um trabalho recente de nosso grupo, foi demonstrado que há uma correlação entre idade e a entrada do vírus no SNC, visto que naturalmente com a idade há uma redução da resposta imunológica, com uma perda de propriedades da BHE devido a disfunções em células endoteliais, levando ao aumento da permeabilidade da barreira (Adesse *et al.*, 2022). Disfunções na mitocôndria também foram demonstradas como algo capaz de favorecer o estabelecimento do vírus, bem como doenças neurodegenerativas em decorrência da idade. (Chen *et al.*, 2021).

Um trabalho de Morojele e colaboradores (2021) mostrou a correlação de diversas doenças infecciosas, como HIV/AIDS, tuberculose, pneumonia e a própria COVID-19 com o uso abusivo do álcool. E além de doenças metabólicas e associadas ao envelhecimento, o uso de bebidas alcoólicas tem sido sugerido como um fator de risco para a COVID-19 (Morojele *et al.*, 2021; Michalak *et al.*, 2024). De acordo Bantounou (2022), o uso excessivo do álcool pode causar danos em tecido epitelial, além de desregular o sistema imune inato e adaptativo, de modo que fique mais suscetível a infecções virais. Ainda de acordo com a autora, pessoas com cirrose alcoólica estão mais suscetíveis a desenvolver pneumonia devido à redução

de funções hepáticas. Além disso, já consta na literatura que o uso moderado de álcool pode elevar os níveis de ACE-2 por até 4 semanas após o consumo (Bantounou, 2022).

1.4 Álcool e Sistema Nervoso Central

O álcool é a droga psicotrópica mais utilizada em todo o mundo, com uma estimativa de ser consumida por mais de 2,5 bilhões de pessoas (OMS, 2024). Segundo o último relatório da OMS, a partir de um levantamento de dados de 2019, cerca de 2,6 milhões de óbitos foram atribuídos ao consumo de álcool, sendo equivalente a 4,7% de todas os óbitos. Os níveis de consumo *per capita* na região da Europa e Américas foram de 9,2 litros e 7,5 litros, respectivamente, enquanto somente no Brasil o consumo estimado foi de 7,7 litros, estando acima dos demais países da América. Ainda de acordo com este relatório, cerca de 400 milhões de pessoas no mundo vivem com transtornos pelo uso de álcool e outras drogas, sendo 209 milhões possuindo dependência de álcool.

O uso dessa substância afeta a atenção, gera comportamentos inapropriados ou agressivos, perda de capacidade de julgamento, perda da coordenação motora, marcha instável e fala arrastada (OMS, 2024), como mostra a **Figura 6**. De acordo com o relatório do Centro de Informações sobre Saúde e Álcool (CISA, 2024), no ano de 2023 as internações totalmente atribuíveis ao álcool foram de 27/100 mil habitantes, sendo a maioria de pessoas do sexo masculino na faixa etária de 35 a 54 anos. As principais causas dessas internações foram atribuídas à dependência de álcool e doença alcohólica do fígado, que juntas compõem mais da metade do número de internações desse ano, seguidos de intoxicação aguda, síndrome de abstinência e transtorno psicótico atribuível ao álcool. No ano anterior à pandemia foi registrada a menor taxa de mortes desde 2010, porém devido ao isolamento social

por conta da pandemia, houve um aumento crescente entre os anos de 2020 e 2022 (CISA, 2024).

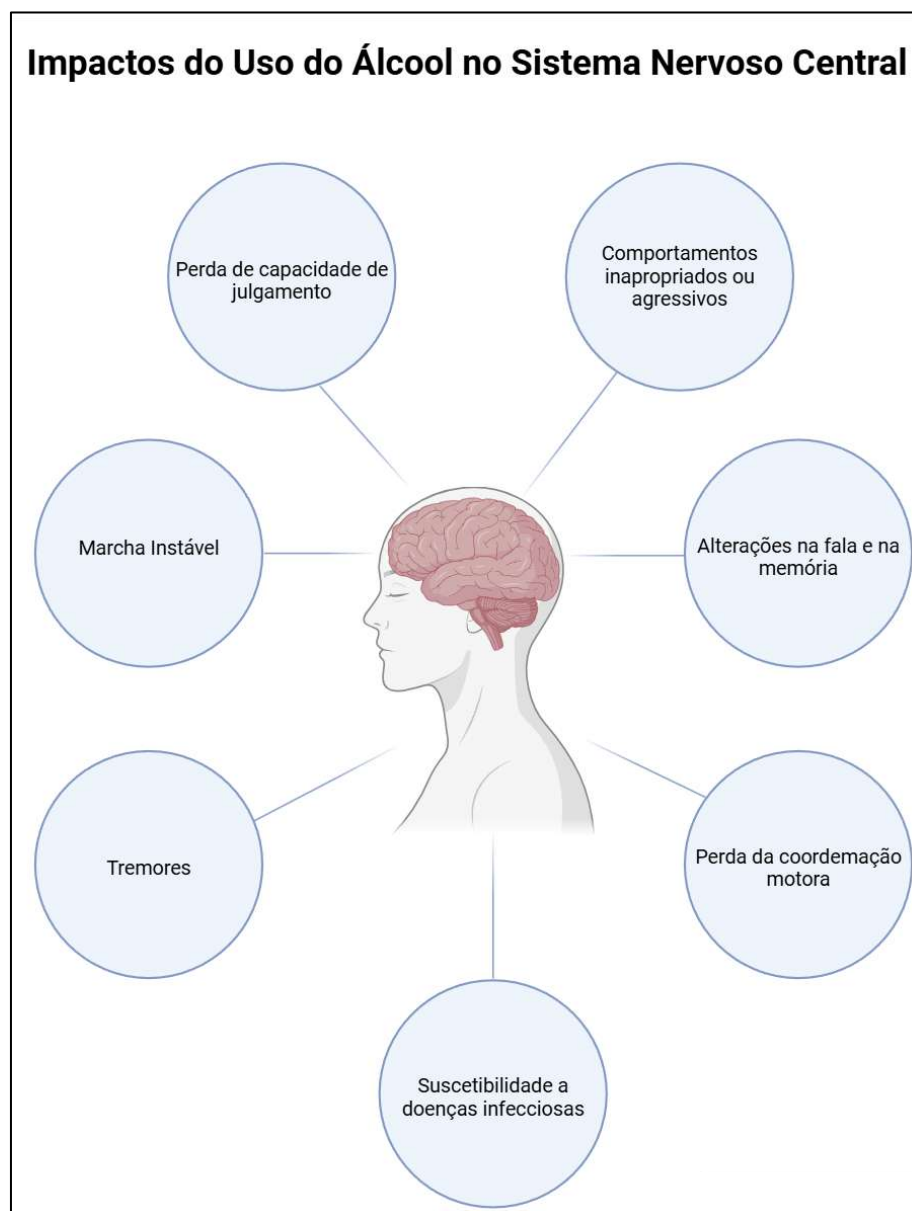


Figura 6. Efeitos do uso do álcool no Sistema Nervoso Central. Criado em biorender.com

De acordo com a literatura, o consumo crônico de álcool e sua consequente dependência podem causar comprometimento do sistema imune, cirrose hepática e complicações associadas ao sistema respiratório, como a síndrome do desconforto respiratório agudo (Corrao *et al.*, 2004; Simou, Leonardi-Bee & Britton, 2018). Além disso, esse nível de consumo e em altas doses pode ter efeitos neurotóxicos graves

e promover a neurodegeneração (Kamal *et al.*, 2020; Siqueira & Stipursky, 2022), levando ao comprometimento cognitivo com atrofia da substância branca, perda axonal e desmielinização em certas regiões do cérebro, como o hipocampo, lobo frontal e corpo caloso (Kamal *et al.*, 2020).

No SNC já foi descrito que o álcool pode desencadear alterações na expressão gênica relacionada à resposta imune em diferentes regiões do cérebro, induzindo assim uma resposta pró-inflamatória. É descrito atualmente que os receptores do tipo toll (TLRs) possuem um papel vital na resposta imune, pois sua ativação está relacionada a respostas inflamatórias de reconhecimento de patógenos (Bugge, Antallís & Wu, 2009) e sendo comumente expressos em células imunes, como células T, células NK, dendríticas, macrófagos e neutrófilos (McGettrick & O'Neill, 2007) e também pela microglia no SNC (Nayak *et al.*, 2012). Um estudo de Fernandez-Lizarbe, Montesinos e Guerri (2013) demonstrou que o etanol contribui para o quadro de neuroinflamação e dano neural ao modular níveis de TLR4 e TLR2. Apesar do etanol alterar os níveis desses marcadores dependa do estímulo, concentração de etanol e célula analisada, seus resultados sugerem que o álcool desencadeia a ativação neuroimune no cérebro ao estimular células microgлияis e respostas de sinalização de TLRs (Fernandez-Lizarbe, Montesinos & Guerri, 2013).

Recentemente nosso grupo demonstrou que células endoteliais cerebrais expostas a diferentes doses de etanol secretam fatores pró-inflamatórios que levam a falha da função e estabilidade neurovascular. Além disso, astrócitos expostos aos fatores secretados por células endoteliais expostas ao etanol também apresentam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α , o que é acompanhado pela ativação e translocação nuclear do fator de transcrição NF- κ B (Siqueira *et al.*, 2021). Já a exposição de células microgлияis ao etanol induz a sua

proliferação em roedores nos modelos de abuso ao álcool e o mesmo também foi encontrado em cérebros *post-mortem* de pacientes alcoolistas (Marshall, Geil, & Nixon, 2016; Siemsen *et al.*, 2020). Um estudo revelou que o transcriptoma da microglia provinda do córtex pré-frontal de camundongos que eram expostos ao etanol de forma crônica revelou alteração na expressão de genes da resposta e ativação imune (Warden *et al.*, 2020).

1.5 Álcool e Covid-19

Um estudo na Inglaterra investigou a correlação entre o risco da Covid-19 de acordo com diferentes tipos de bebidas alcoólicas, demonstrando que indivíduos que consomem bebidas enriquecidas em substâncias antioxidantes como o vinho apresentam risco menor em desenvolver sintomas graves de Covid-19, possivelmente devido ao fato de estas substâncias contraporem os efeitos do álcool em promover o estresse oxidativo. Por outro lado, bebidas que contêm um alto teor alcoólico, e neste sentido o consumo crônico também, aumentam em até 28% o risco do indivíduo testar positivo para SARS-CoV2 (Dai *et al.*, 2022), sugerindo que o alcoolismo possa oferecer maior predisposição à infecção pelo novo coronavírus. Nenhum estudo até hoje correlacionou o consumo de álcool com a predisposição ao estabelecimento da Covid-19 e até mesmo a progressão, agravamento e a duração dos sintomas após a fase aguda da doença.

Evidências sugerem que o consumo de álcool (social e moderado) modula os níveis de ACE-2 em diversos tecidos, especialmente no sistema pulmonar (Okuno *et al.*, 1986; Maul *et al.*, 2001; Bantounou, 2022). Uma pesquisa realizada em 2021 mostrou que o número de bebidas alcólicas ingeridas por semana estava

correlacionado com a síndrome do desconforto respiratório agudo após a infecção por SARS-CoV2 (Lassen *et al.*, 2021) e uma ligação molecular entre o álcool e a COVID-19 já foi discutida anteriormente pelas alterações no sistema imune inato e adaptativo (Rodríguez *et al.*, 2021). Recentemente um estudo demonstrou que a repetida exposição ao etanol aumenta a expressão de ACE-2 em diferentes regiões do encéfalo como hipocampo, córtex pré-frontal, bulbo olfatório, dentre outras (Crunfli *et al.*, 2020).

Neste contexto, embora as poucas evidências sugiram que a exposição ao álcool possa modular os níveis de receptores para o SARS-CoV2 e aumentar a piorar os sintomas respiratórios em indivíduos que consomem bebidas alcoólicas, não se sabe se o consumo de álcool pode modular os níveis de receptores utilizados pelo SARS-CoV2 no SNC, e daqueles envolvidos na resposta pró-inflamatória, especialmente em microglias e em astrócitos, ambas já destacadas por serem alvos de SARS-CoV2 (Buzhdygan *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021). Apesar dos efeitos nocivos ao organismo devido ao consumo crônico de álcool e que as poucas evidências sugiram um maior risco de progressão da doença (Vasudeva & Patel, 2020; Testino *et al.*, 2022), essa correlação ainda não está descrita.

2. JUSTIFICATIVA

A Covid-19 tem representado um enorme desafio para a comunidade científica e médica, e embora alguns fatores de risco já tenham sido descritos para o estabelecimento e agravamento da doença, além da manutenção das sequelas de longo prazo, como doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e idade, nada se sabe se consumo de drogas de abuso, como o álcool, pode representar mais um

fator de risco para o estabelecimento e/ou agravamento da neuroinflamação observada na COVID-19. Neste contexto, é essencial analisar se a exposição ao etanol é capaz de alterar a susceptibilidade das células microgliais a resposta de reatividade induzida pelo tratamento com a proteína Spike-1 de SARS-CoV2 e, com isso, sugerir um possível novo grupo de risco para a COVID-19 e para o estabelecimento de sequelas neurológicas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se as células microgliais que foram expostas à Spike-1 podem apresentar disfunções celulares pela prévia exposição ao etanol.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar se a exposição ao etanol *in vitro* modula a expressão de receptores-alvo para SARS-CoV2 em células microgliais murinas (BV-2) e humanas: ACE-2, TMPRSS2 e TLR4, por imunocitoquímica e RT-qPCR;
2. Analisar *in vitro* se a exposição prévia ao etanol, seguida do tratamento com a proteína viral purificada Spike-1, modula os níveis de marcadores de ativação de células microgliais BV-2 por imunocitoquímica e RT-qPCR;
3. Analisar funcionalmente *in vitro* se a exposição prévia ao etanol seguida do tratamento com a proteína viral purificada Spike-1 modula os níveis de marcadores de ativação de células microgliais BV-2 por ensaio de fagocitose;
4. Investigar *in vivo* se a exposição crônica ao álcool altera a expressão de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 em diferentes regiões do SNC, por RT-qPCR, e a reatividade microglial, por imunohistoquímica.

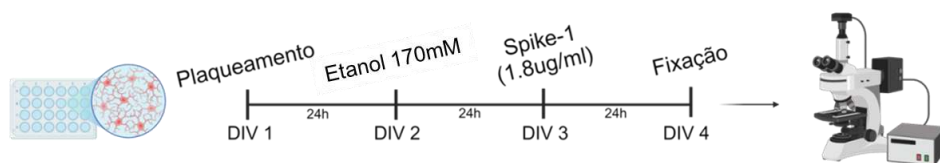
4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo de linhagem de microglias murinas BV-2

As células de microglia murinas de linhagem BV-2 obtidas no BCRJ foram cultivadas e expandidas em garrafas de cultura de 25cm² (Corning) em meio de cultura RPMI (Thermo Fisher) contendo soro fetal bovino (SFB) 10% e penicilina/estreptomicina (P/S) 1% (Thermo Fisher) e mantidas em incubadora de CO² (5%) a 37°C. Para realização dos experimentos, as células BV-2 foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços (Corning), contendo lamínulas de vidro de 13mm redondas, em presença de meio com soro (MCS). A densidade de plaqueamento utilizada foi 5.10⁴ células por poço. 24hs após o plaqueamento, as células foram tratadas com Etanol 170mM e 340mM (Sigma Aldrich) ou com meio sem soro (MSS) por 24 horas, sendo este o modelo de exposição “**Aguda**” (**Figura 7A**) ao etanol. Após este período, alguns poços tratados ou não previamente com etanol foram tratados com a proteína Spike-1 (1.8µg/mL), como descrito por Jana, Heaven & Alayash (2021), por 24 horas adicionais. Neste sentido, obtivemos 4 condições experimentais: “Controle (meio sem soro)”, “Etanol”, “Etanol + Spike-1” e “Spike-1”. Após os tratamentos, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% (Isofar) por 15 minutos, seguidos de lavagem com **tampão fosfato salino (PBS; Cloreto de sódio, Cloreto de potássio, Cloreto de cálcio, Fosfato de sódio, Fosfato de potássio, Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanossulfônico e Azida sódica; pH 7-7,4)** e submetidas à imunocitoquímica. Para o modelo de tratamento “**Crônico**” (**Figura 7B**), as células foram expostas a um tratamento diário com Etanol 170mM por 3 dias consecutivos. Após, as células foram tratadas com a proteína Spike-1 por 24hs, seguidas de fixação com PFA 4% por 15 minutos, lavagem com PBS e

processamento para imunocitoquímica, ou lisadas em Trizol (Thermo Fisher) e armazenadas em freezer -80°C.

A Modelo Agudo



B Modelo Crônico

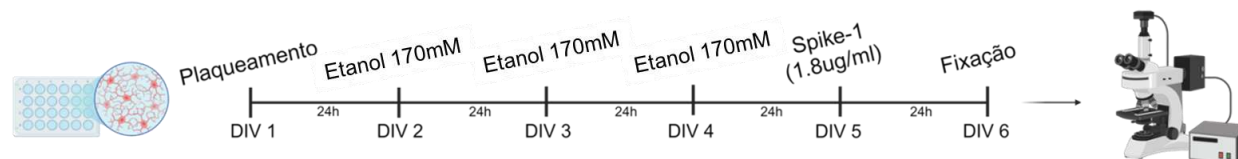


Figura 7. Esquema de tratamento das células microgлияis murinas BV-2 em modelos agudo e crônico. Criado em biorender.com

4.2 Cultivo de microgлияs humanas

As células de microgлияs humanas (**Figura 8**) foram obtidas através de cultura primária com astrócitos corticais humanos (Gibco™ Human Astrocytes $\geq 1 \times 10^6$ cells/mL; Cat.: K1884), sendo isoladas com auxílio de um agitador. Esses astrócitos corticais foram cultivados e expandidos em garrafas de cultura de 25cm² (Corning) em meio de cultura DMEM (Thermo Fisher) contendo soro fetal bovino (SFB) 10% e penicilina/estreptomicina (P/S) 1% (Thermo Fisher), ficando no agitador durante 30 minutos dentro da incubadora de CO₂ (5%) a 37°C. Passado esse tempo, o meio foi coletado e transferido para outra garrafa de mesmo tamanho e mantido na incubadora de CO₂ nas mesmas condições. Essas células microgлияis humanas foram cultivadas e expandidas em garrafas de cultura de 25cm² em meio de cultura DMEM contendo SFB 10% e P/S 1%, sendo mantidas em incubadora de CO₂ (5%) a 37°C. Para realização dos experimentos, as células foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços (Corning), contendo lamínulas de vidro de 13mm redondas, em

presença de meio com soro (MCS). A densidade de plaqueamento utilizada foi 5.10^4 células por poço. 24hs após o plaqueamento, as células foram tratadas com Etanol 170mM ou 340mM (Sigma Aldrich) ou com meio sem soro (MSS) por 24 horas, sendo este o modelo de exposição “**Aguda**” ao etanol. Neste sentido, obtivemos 3 condições experimentais: “Controle (meio sem soro)”, “Etanol 170mM” e “Etanol 340mM”. Após os tratamentos, as células foram fixadas com PFA 4% (Isofar) por 15 minutos, seguidos de lavagem com PBS e submetidas à imunocitoquímica.

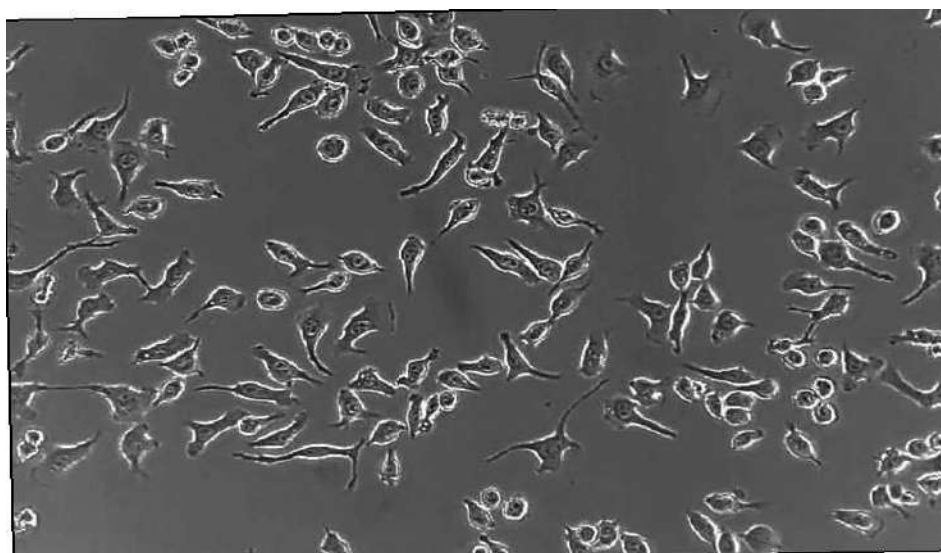


Figura 8. Microglias Humanas provenientes de cultura de astrócitos corticais humanos.

4.3 Ensaio de Fagocitose

As culturas de BV-2 foram mantidas e tratadas de forma “aguda” como descrito no item anterior, com etanol 170mM e 340mM, e processadas para análises do potencial fagocítico utilizando-se um Kit contendo microesferas de látex (*beads*) conjugadas a FITC de $0,1\mu\text{m}$ (Phagocytosis Assay Kit IgG FITC - Cayman Chemical). Além dos tratamentos com etanol e Spike-1, utilizamos lipopolissacarídeo (LPS; 500ng/mL) como um controle positivo do experimento, e ainda o MCS como controle de viabilidade celular. Nesse sentido, foram utilizados 8 condições experimentais: “MSS (meio sem soro)”, “MCS (meio com soro)”; “LPS”, “Etanol

170mM”, Etanol 340mM”, “Etanol 170mM + Spike-1”, “Etanol 340mM + Spike-1” e “Spike-1”. O ensaio foi realizado seguindo instruções do fabricante seguido da fixação por PFA 4%, e análise por microscopia de fluorescência e contraste de fase em microscópio Nikon TS2-FL.

4.4 Exposição ao etanol em modelo *in vivo*

Camundongos machos da linhagem B6SJL entre 8 e 10 semanas foram mantidos no Biotério do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e foram submetidos à procedimentos autorizados pelo CEUA do CCS/UFRJ sob número 145/24. Os animais possuíram acesso ilimitado a água e alimento, em sala refrigerada e com ciclos de luz (período de claro e escuro). Um dia antes do início das manipulações os animais foram pesados e separados em gaiolas individuais (1 animal por gaiola). Com isso, os animais foram expostos a dose de 4.0g/kg de etanol ou água (grupo controle) por gavagem durante 4 dias (1x/dia). No quinto dia, os animais foram transportados para o Laboratório de Biologia das Interações Neurovasculares (ICB/UFRJ), onde foram anestesiados com xilazina 10mg/mL e cetamina 100mg/mL, e após confirmação da perda dos reflexos motores, foram eutanasiados por deslocamento cervical. Após a eutanásia, o encéfalo foi removido, seguido de dissecação (**Figura 9**). Um hemisfério foi fixado por imersão por 48 horas em PFA 4%. O outro hemisfério foi dissecado para separação de 3 regiões de interesse: córtex cerebral, hipocampo e cerebelo. Os tecidos dissecados foram lisados em 1mL de Trizol (Thermo fisher), seguido de armazenamento em freezer - 80°C.

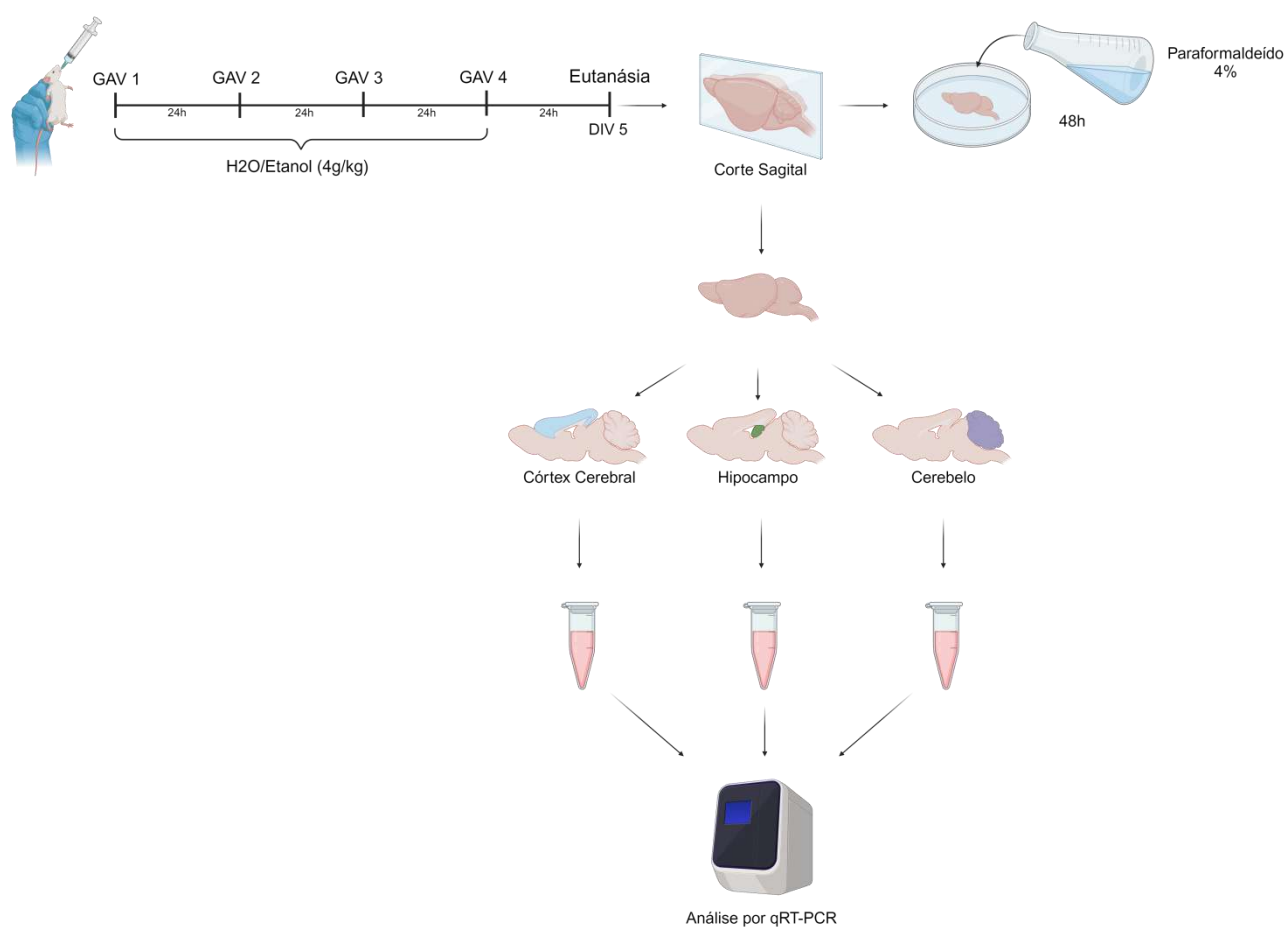


Figura 9. Esquema de tratamento dos camundongos com etanol de forma crônica, seguido da disseção do encéfalo. Criado em biorender.com

4.5 Imunofluorescência

4.5.1 Imunocitoquímica

Após a fixação das células microgliais BV-2 e humanas, estas foram incubadas com solução de bloqueio e permeabilização (soro normal de cabra 5%, Triton 0,2%, e albumina de soro bovino 3%, diluídos em PBS), por 1h em câmara úmida em temperatura ambiente. Após, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos primários (**Quadro 1**), **contra marcadores para microglias/macrófagos, como CD-11b, C3, CD-45 e IBA-1**, para proliferação como Ki67, receptor e co-receptores para SARS-CoV2 como ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 diluídos em solução de bloqueio overnight a 4°C. Após a incubação com os anticorpos primários, as lamínulas foram

lavadas em PBS, e incubadas com os anticorpos secundários (**Quadro 2**) diluídos em solução de bloqueio, por 2hs a temperatura ambiente em câmara úmida. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3x com PBS, os núcleos foram corados com DAPI (Thermo Fisher) por 10 min, e em seguida as lamínulas foram montadas em meio de montagem Fluoromount (Sigma Aldrich) em lâminas de microscopia. Fotomicrografias foram adquiridas em microscópio de fluorescência Nikon TS2-FL, em aumento de 20x.

Quadro 2: Anticorpos primários e secundários

Antígenos (Anticorpos Primários)	Nº de Catálogo	Produzido em	Diluição	Fabricante
ACE-2	MA532307	Camundongo	1/25	Invitrogen
C3	PA521349	Coelho	1/50	Invitrogen
CD-11b	M1/70.15.11.5.2	Rato	1/300	Hybridoma Bank
CD-45	AB528150	Humano	1/100	Hybridoma Bank
IBA-1	019-19741	Coelho	1/200	Wako
IBA-1	MABN92	Camundongo	1/100	Thermo Fisher
Ki67	RM-9106-S1	Coelho	1/200	NeoMarker
TLR4	MA516216	Camundongo	1/100	Invitrogen
TMPRSS2	P5H9-A3-S	Camundongo	1/100	Hybridoma Bank
Anticorpos Secundários	Nº de Catálogo	Especificidade	Diluição	Empresa
Alexa Fluor 488	A11001	Camundongo	1/300	Thermo Fisher
Alexa Fluor 488	A11008	Coelho	1/300	Thermo Fisher
Alexa Fluor 488	A11006	Rato	1/300	Thermo Fisher
Alexa Fluor 546	A11010	Coelho	1/1000	Thermo Fisher

4.5.2 Imunohistoquímica

Os encéfalos dos camundongos B6SJL foram fixados como descrito no item 4.4, foram seccionados em no vibrátomo (Leica) para obtenção de cortes sagitais de 40µm de espessura. Os cortes obtidos foram transferidos para poços de placas de 24 poços e os procedimentos a seguir foram realizados de forma *free floating*. Os cortes foram permeabilizados (soro normal de cabra 5%, Triton 0,2%, e albumina de soro bovino 3%, diluídos em PBS) contendo 0.5% Triton X-100 por 30 minutos e, em seguida, incubados em solução de bloqueio por 1 hora e 30 minutos sob agitação. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-IBA-1 (Thermo Fisher, 1:100) *overnight* a 4°C em câmara úmida. Posteriormente, os cortes foram lavados com PBS três vezes sob agitação durante 10 minutos cada lavagem. Em seguida, foram incubados em temperatura ambiente com o anticorpo secundário específico por 2 horas sob agitação. Após os cortes foram lavados 3 vezes com PBS, corados com DAPI por 10 minutos, lavados 2x e transferidos para laminas de vidro de microscopia e montadas com Fluoromount e lamínulas de vidro. As análises das imunofluorescências *in vivo* foram realizadas utilizando-se microscópio confocal SPE (Leica), em aumento de 40x.

4.6 Análises morfológicas *in vitro*.

As análises foram realizadas em culturas de BV-2 submetidas aos tratamentos nos diferentes grupos experimentais (item 4.1) e imunocitoquímica (4.5.1) para marcação de CD-11b e fotografadas em microscópio de fluorescência Nikon TS2-FL utilizando-se objetiva de 20x. As células marcadas foram separadas em três categorias quanto à morfologia: 1. Ramificadas, 2. Amebóides e 3. Intermediárias. Foram consideradas células apresentando morfologia ramificada, quando possuíam três ou mais prolongamentos visíveis ou uma aparência “achatada”. Considerou-se a

morfologia amebóide, células que apresentavam-se completamente circulares ou arredondadas. Já a morfologia intermediária, foi considerada para células que não se enquadravam nas categorias anteriores (**Figura 12B-D**). A contagem de cada tipo morfológico foi feita utilizando o recurso “*cell counter*” do programa ImageJ versão 1.54d.

4.7 Reação de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real (RT-qPCR)

Culturas de BV-2 expostas a diferentes tratamentos com etanol e Spike-1 (item 4.1) e o tecidos de animais expostos ao etanol (item 4.4) foram lisados com Trizol® Reagent (Thermo Fisher) e o RNA total foi isolado utilizando-se o kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research). O RNA foi dosado usando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher) e 1-2 µg do RNA purificado foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando-se o *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher). O cDNA sintetizado foi usado para a reação de PCR quantitativa (qPCR) em tempo real utilizando-se PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems™), para analisar a expressão de genes de interesse utilizando-se oligonucleotídeos específicos (Exxtend, Quadro 3). O ciclo das reações foi de: 95°C por 20 segundos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos, 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos no *QuantStudio™ 1 Flex* Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Os níveis de expressão relativa dos genes foram calculados usando o método $2^{-\Delta \Delta CT}$ (Livak; Schmittgen, 2001). Todas as reações foram feitas em triplicata.

Quadro 3 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR

Sequências de primers para camundongos	
ACE-2 F	TCCATTGGTCTTCTGCCATCCG
ACE-2 R	AGACCATCCACCTCCACTTCTC
TMPRSS2 F	AAGTCCTCAGGAGCACTG
TMPRSS2 R	CAGAACCTCCAAAGCACAGC
TLR4 F	AGCTTCTCCAATTTTTTCAGAACTTC
TLR4 R	TGAGAGGTGTGTAAGCCATGC
IL-1β F	CAGGCAGGCAGTATCACTCA
IL-1β R	TAATGGGAACGTCACACACC
C3 F	ACCTTACCTCGGCAAGTTTCT
C3 R	TTGTAGAGCTGCTGGTCAGG
CD-86 F	TGTTTCCGTGGAGACGCAAG
CD-86 R	TTGAGCCTTTGTAAATGGGCA
18S F	TTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCCGA
18S R	TCTTGGCAAATGCTTTCGCTCTGG
GADPH F	GCCTTCCGTGTTCTTACC
GADPH R	CCTCAGTGTAGCCCAAGAT

4.8 Quantificações e análises estatísticas

Para análises por imunofluorescência de culturas de BV-2 e microglias humanas, foram adquiridas fotomicrografias de 5 campos por lamínula no aumento de 20x. Para as análises de imunohistoquímica foram adquiridos fotomicrografias de

3 campos do córtex cerebral, utilizando-se 3 cortes por animal, utilizando-se microscópio confocal Leica TCS SP5. A intensidade de fluorescência para os diferentes marcadores celulares *in vitro* e *in vivo* foi quantificada utilizando-se o parâmetro *Integrated density* do software ImageJ. *In vitro*, os valores obtidos a partir destas análises foram divididos pelo número total de células (DAPI), o qual foi quantificado manualmente. Para a plotagem das quantificações e análises estatísticas utilizamos o software Prism Graph Pad 8.0.1. Foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para os resultados *in vitro* foi utilizado o teste *One Way Anova*, com índice de significância de 95% (valor de $p \leq 0,05$), sendo assim considerado estatisticamente significativo. Já para os resultados *in vivo*, foi realizado o teste *t* de Student.

5. RESULTADOS

5.1 Análise do efeito do tratamento agudo com etanol nos níveis de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 em células microgliais BV-2

Um dos principais receptores para a entrada do vírus na célula é a ACE-2, atuando em conjunto com o co-receptor TMPRSS2 (Hoffmann *et al.*, 2020), possuindo também como via alternativa a entrada através do TLR4 (Aboudounya, 2021). Com o objetivo de avaliar se o tratamento das células microgliais murinas BV-2 com etanol 170mM e 340mM desencadeia mudanças nos níveis das proteínas **ACE-2**, **TMPRSS2** e **TLR4**, foi realizada a metodologia de imunocitoquímica para estes marcadores em células BV-2 tratadas nas diferentes condições. Não foram observadas mudanças em nenhuma das concentrações de etanol utilizadas para os receptores em relação ao controle. Observamos somente uma diferença estatística de 31,42% entre as condições experimentais 170mM e 340mM nos níveis de TLR4

(Figura 10H, I, J), indicando que os níveis de TLR4 possam ser dose dependentes.

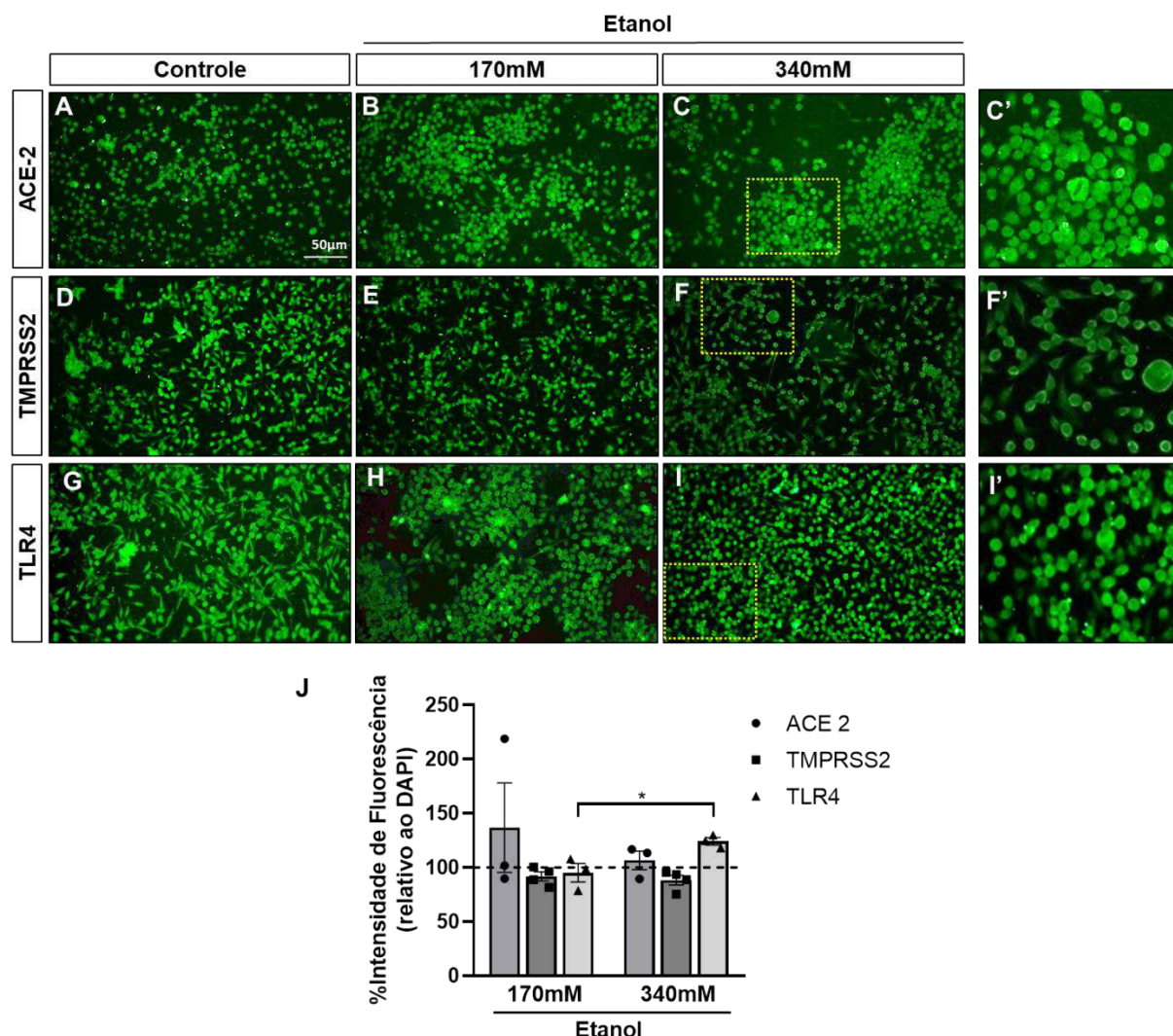


Figura 10. O tratamento com Etanol não modula os níveis de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 em culturas de células microgлияs (BV-2). Cultura de células microgлияs BV-2 foram tratadas por 24h com etanol 170mM e 340mM, seguidas de análise por imunocitoquímica ACE-2 (A-C), TMPRSS2 (D-F) e TLR4 (G-I). Não foram observadas diferenças nos níveis dos marcadores em relação ao controle (J). Os níveis de TLR4 apresentou-se diferente estatisticamente maior em células tratadas com etanol 340mM, quando comparadas àquelas tratadas com 170mM. As análises de cada receptor foram feitas de forma individual e só posteriormente os dados foram unidos para a formação do gráfico apresentado. *P = 0,02552. N = 3-4.

5.2 Efeito do tratamento com Spike-1 no número de células microgлияs BV-2 em culturas previamente expostas ao etanol.

Um dos eventos característicos do processo de transição das microgлияs de seu estado de homeostase para um estado ativado é a ativação da proliferação celular (Duchrow *et al.*, 2001).

Com o objetivo de avaliar se a resposta proliferativa ao tratamento das células microgliais murinas BV-2 com Spike-1 poderia ser alterada em células previamente expostas ao etanol (170mM) foi realizada a metodologia de imunocitoquímica para o marcador Ki67 para as células BV-2 tratadas nas diferentes condições, no que consideramos o modelo “**Agudo**” ou “**Crônico**” de exposição ao etanol, seguida do tratamento com Spike-1. Esses modelos foram escolhidos visto que os diferentes tipos de exposição ao etanol podem desencadear diferentes respostas microgliais relacionadas a migração e sinalização celular, respostas pró- e anti-inflamatórias e outras funções (Lee *et al.*, 2004; Asatryan *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2023).

De acordo com a **Figura 11**, ao analisarmos gráficos dos números totais de células nas diferentes condições através da marcação com DAPI, notamos que a condição etanol, tanto quando exposto de forma aguda (**Figura 11Q**) quanto crônica (**Figura 11S**), não forneceu diferenças estatísticas nas diferentes condições experimentais em relação ao controle. Em relação ao número de células Ki67+, ainda não é possível concluir os efeitos dos tratamentos visto que este dado é preliminar (n = 1), embora o perfil de efeitos nas diferentes condições aguda e crônica parecem ser opostos (**Figura 11R, T**).

Embora os tratamentos com etanol e Spike-1 não pareçam afetar o número total de células, ainda é preciso aumentar o número de experimentos para marcação de células Ki67+ para sabermos se de fato o etanol modula a capacidade de proliferação celular da microglia e se isso depende do tempo de tratamento.

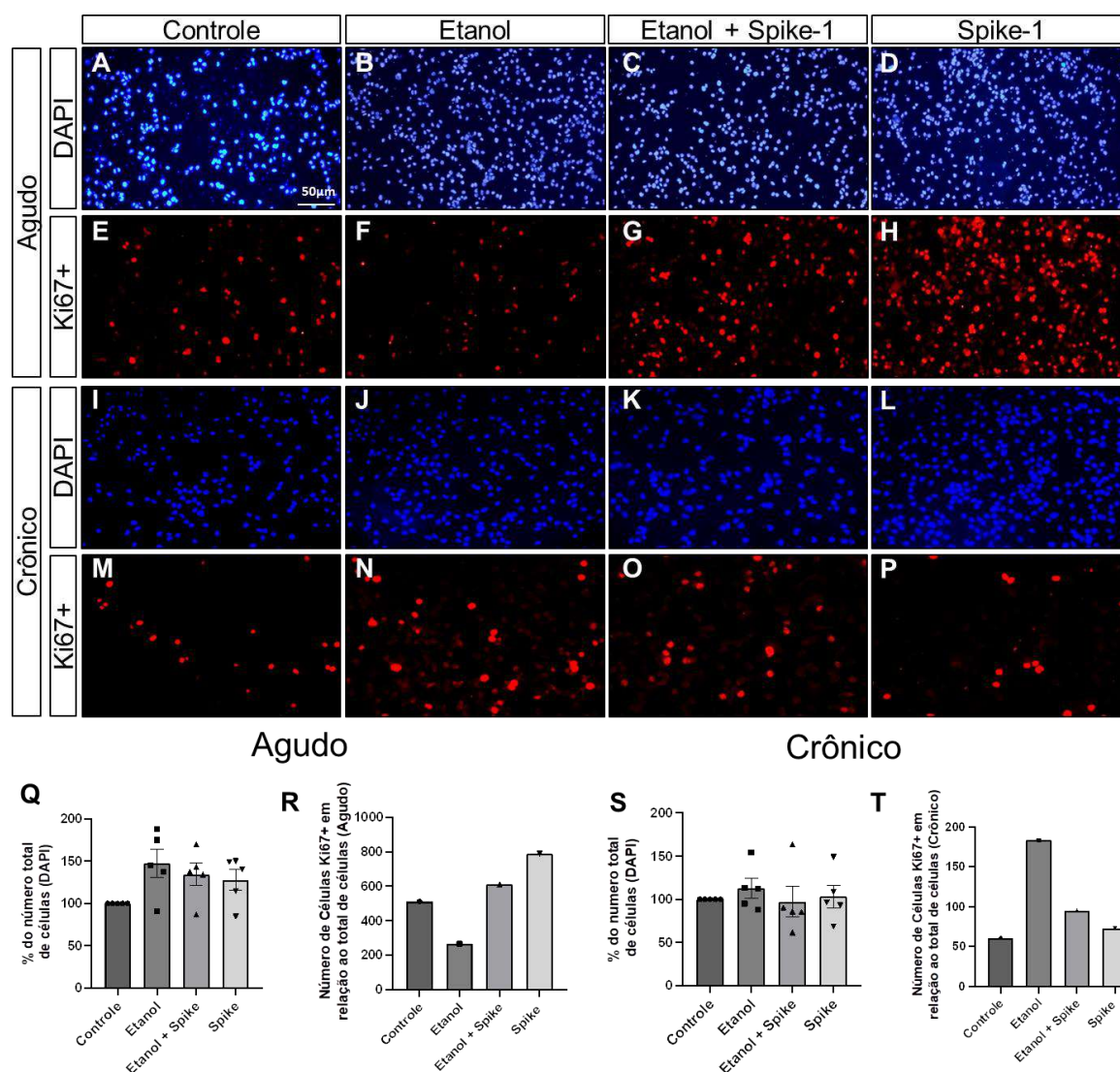


Figura 11. O tratamento etanol e Spike-1 não modula a proliferação celular em culturas de microglias (BV-2), bem como os números totais de células. Células microgлияis foram tratadas por 24h (tratamento agudo) e 72h (tratamento crônico) com etanol, seguido do tratamento com Spike-1. Análises por imunocitoquímica para DAPI (azul) e Ki67 (vermelho) mostram que as células expostas de forma aguda (A-D,Q) ou crônica (I-L, S) não apresentam diferenças estatísticas em nenhuma das condições experimentais em relação ao controle (Q-T). Ki67, N = 1; DAPI, N = 5.

5.3 Efeito do tratamento com Spike-1 nos níveis de CD-11b em culturas previamente expostas ao etanol

Diversos marcadores de reatividade microglial já foram identificados e correlacionados com os diferentes estados de ativação, entre eles está a proteína de adesão CD-11b, pertencente à família das integrinas. Quando a microglia exibe um perfil mais ativado e pró-inflamatório os níveis de expressão de CD-11b aumentam

(Korzhevskii & Kirik, 2016).

No intuito de avaliar se o tratamento das células microgliais murinas BV-2 com Spike-1 em células previamente expostas ao etanol desencadeiam mudanças nos níveis de **CD-11b**, tratamos as células microgliais murinas BV-2 seguindo o modelo “**Agudo**” e “**Crônico**” de exposição ao Etanol seguido de tratamento com a proteína Spike-1.

De acordo com a **Figura 12** podemos perceber que não há diferenças significativamente estatísticas em ambos os modelos de tratamento agudo e crônico em nenhuma das condições experimentais em relação ao controle e, com isso, é possível que um número maior de experimentos seja necessário para confirmar esses dados.

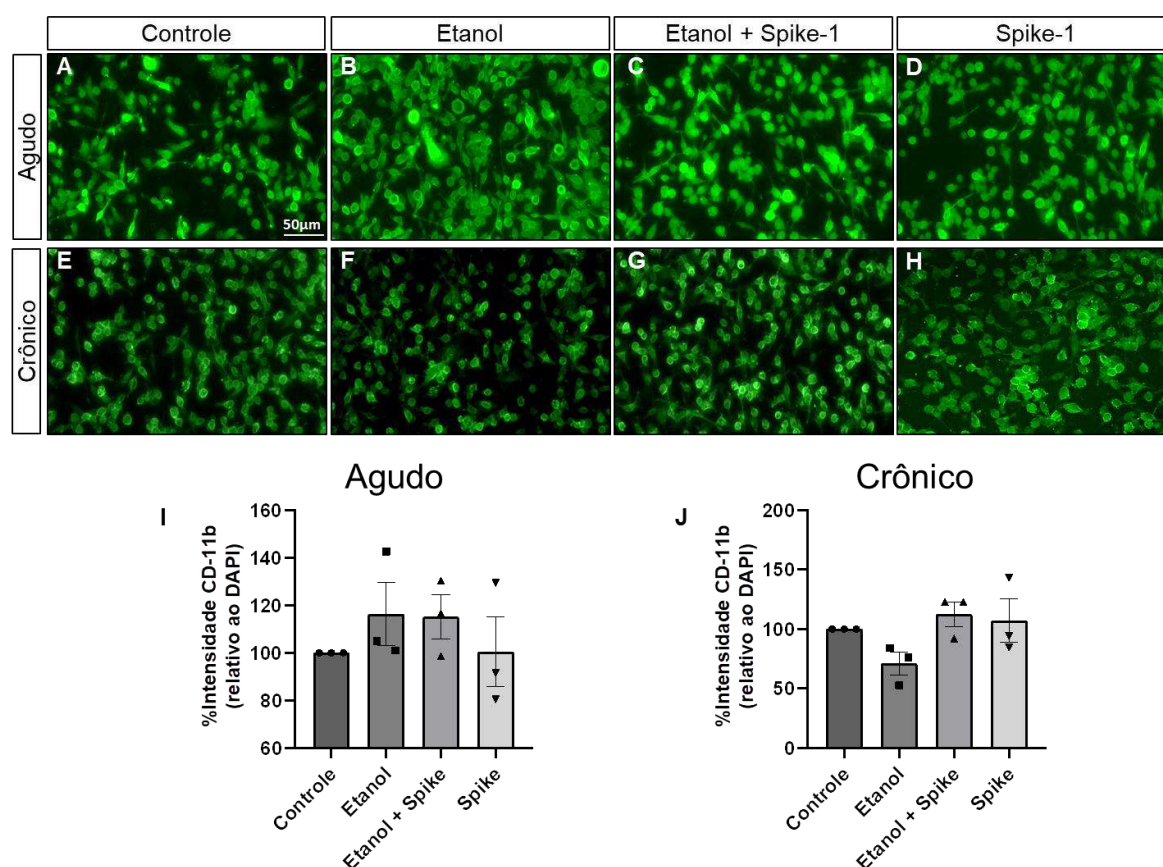


Figura 12. O tratamento com etanol e Spike-1 não altera os níveis de CD-11b em culturas de microglias (BV-2). Células microgliais foram tratadas por 24h com etanol, seguidas do tratamento com Spike-1 para análise por imunofluorescência para CD-11b. Análises não mostram diferenças significativas nas condições que receberam etanol de modo agudo ou crônico. N = 3

5.4 Efeito do tratamento com Spike-1 nos níveis de C3 em culturas previamente expostas ao etanol

Com o objetivo de avaliar se o tratamento das células microgliais murinas BV-2 com Spike-1 em células previamente expostas ao etanol desencadearam mudanças na expressão de C3, já demonstrada como um dos principais marcadores de ativação pró-inflamatória e atividade fagocítica microglial (Soteris & Sia, 2021), foi realizada a metodologia de imunocitoquímica para este marcador para as células BV-2 tratadas nas diferentes condições.

Ao observar a **Figura 13**, no modelo de tratamento agudo, observamos preliminarmente que o etanol e a Spike-1, separadas ou conjugadas, não modularam os níveis de C3 em comparação com o controle (**Figura 13A-D, I**), apesar de esses níveis aparentarem diminuir na presença da spike-1 e que as células que foram previamente expostas ao etanol seguidas do tratamento com spike-1 aparentam que o etanol possibilitou que a queda dos níveis de C3 não fossem maiores como na condição que recebeu apenas a proteína. Por outro lado, no tratamento crônico, o tratamento com etanol ou etanol+spike-1 não parecem alterar os níveis de C3, quando comparados ao controle (**Figura 13E-G,J**), mas o tratamento apenas com Spike-1 aumenta significativamente os níveis de C3 quando comparado com a condição controle, à etanol apenas e à etanol+spike-1 (**Figura 13E-H, J**).

Estes dados sugerem que no contexto da exposição crônica a Spike-1 aumenta os níveis de C3, contudo esse comportamento não é visto na presença do etanol. Para o modelo agudo é necessário realizar mais experimentos para avaliar se o comportamento de supressão dos níveis de C3 irá permanecer.

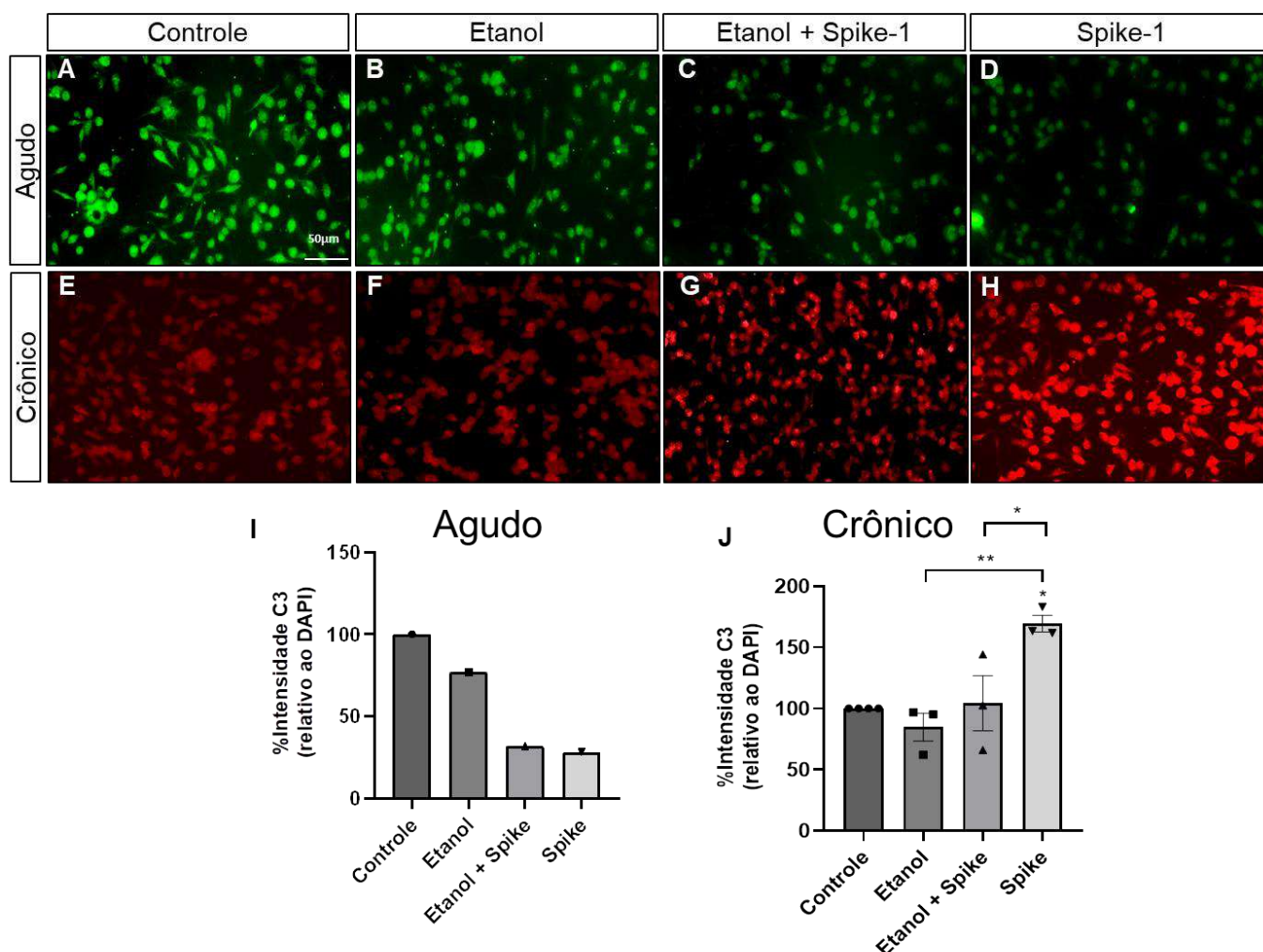


Figura 13. Células microgliais expostas à Spike-1 aumentam os níveis de C3 em presença crônica de etanol. Células microgliais foram tratadas por 24h com etanol, seguidas do tratamento com Spike-1 para análise por imunofluorescência para C3. No modelo agudo não foram observadas diferenças nas condições experimentais em relação ao controle. No modelo crônico, Spike-1 aumenta os níveis de C3 (H, J) e a prévia exposição ao etanol impede que este aumento ocorra (G, J), quando comparado com o controle, A exposição crônica ao etanol apenas não modula os níveis de C3 (F, J) em comparação ao controle, etanol. *P = 0,0128 (controle x spike); *P = 0,0278 (etanol+spike x spike); **P = 0,0055 (etanol x spike). Agudo, N = 1; Crônico, N = 4

5.5 Efeito do tratamento com Spike-1 na morfologia microglial em culturas previamente expostas ao etanol

Um dos parâmetros que pode ser utilizado na hora de realizar a análise do perfil de ativação da microglia é através da mudança morfológica. Ao sair de um estado homeostático e de vigilância, onde possui ramificações que rastreiam o ambiente em busca de patógenos, ela assume um estado ativo ao perceber as mudanças no ambiente. Com isso, a microglia acaba por retrair suas ramificações e adquire uma forma amebóide (reativa). Entre essas duas morfologias há diversos

estágios intermediários, que mudam de acordo com os estados celulares funcionais específicos de cada doença (Prinz, Jung & Priller, 2019).

Além da avaliação dos níveis de diferentes marcadores microgлияis, também nos interessamos em avaliar se o tratamento com Spike-1 em células previamente expostas ao etanol poderia promover mudanças morfológicas significativas nas células microgлияis, e se isso poderia se correlacionar com o processo de ativação destas células. Inicialmente, podemos observar por contraste de fase (**Figura 14**) a presença das diferentes morfologias presentes em nossa cultura. Neste contexto, quantificamos o número de células com morfologia ramificadas, indicando células em repouso/homeostase (**Figura 14A**); morfologias intermediárias, indicando morfologias transitórias entre ativado-repouso (**Figura 14B**); e ainda morfologia arredondada (**amebóide, Figura 14C**) que indicam células com perfil ativado/pró- ou anti-inflamatório (Salamanca *et al.*, 2019), que receberam tratamento de etanol 170mM de forma aguda e crônica.

Observamos que no modelo de tratamento **agudo** não observamos diferenças no número **células ramificadas** na presença do etanol (**Figura 14E**) em relação ao controle, sendo observado o mesmo no tratamento **crônico** (**Figura 14H**).

Em relação ao número de **células intermediárias**, também não observamos efeitos dos tratamentos nos números destas células, nem no modelo de tratamento **agudo** (**Figura 14F**) nem no **crônico** (**Figura 14I**) quando comparado ao controle. Entretanto, na análise dos números de **células amebóides** observamos no tratamento **agudo** que o etanol foi capaz de reduzir em 36,21% os números de células com esta morfologia em relação à condição controle, e que estes números são resgatados quando Spike-1 é adicionada a células previamente expostas (**Figura 14G**). No tratamento **crônico**, não observamos diferenças estatísticas entre

as condições em comparação ao controle (**Figura 14J**).

Apesar de no tratamento agudo haver diferenças estatísticas em algumas condições apresentadas ao compararmos com o controle, podemos perceber que no crônico estas alterações não estão mais presentes de forma tão aparente, sugerindo que a resposta microglial ocorra nas primeiras 24 horas de exposição ao etanol e que pelo menos com relação à morfologia amebóide a exposição ao etanol reduz a capacidade de ativação celular característica da microglia.

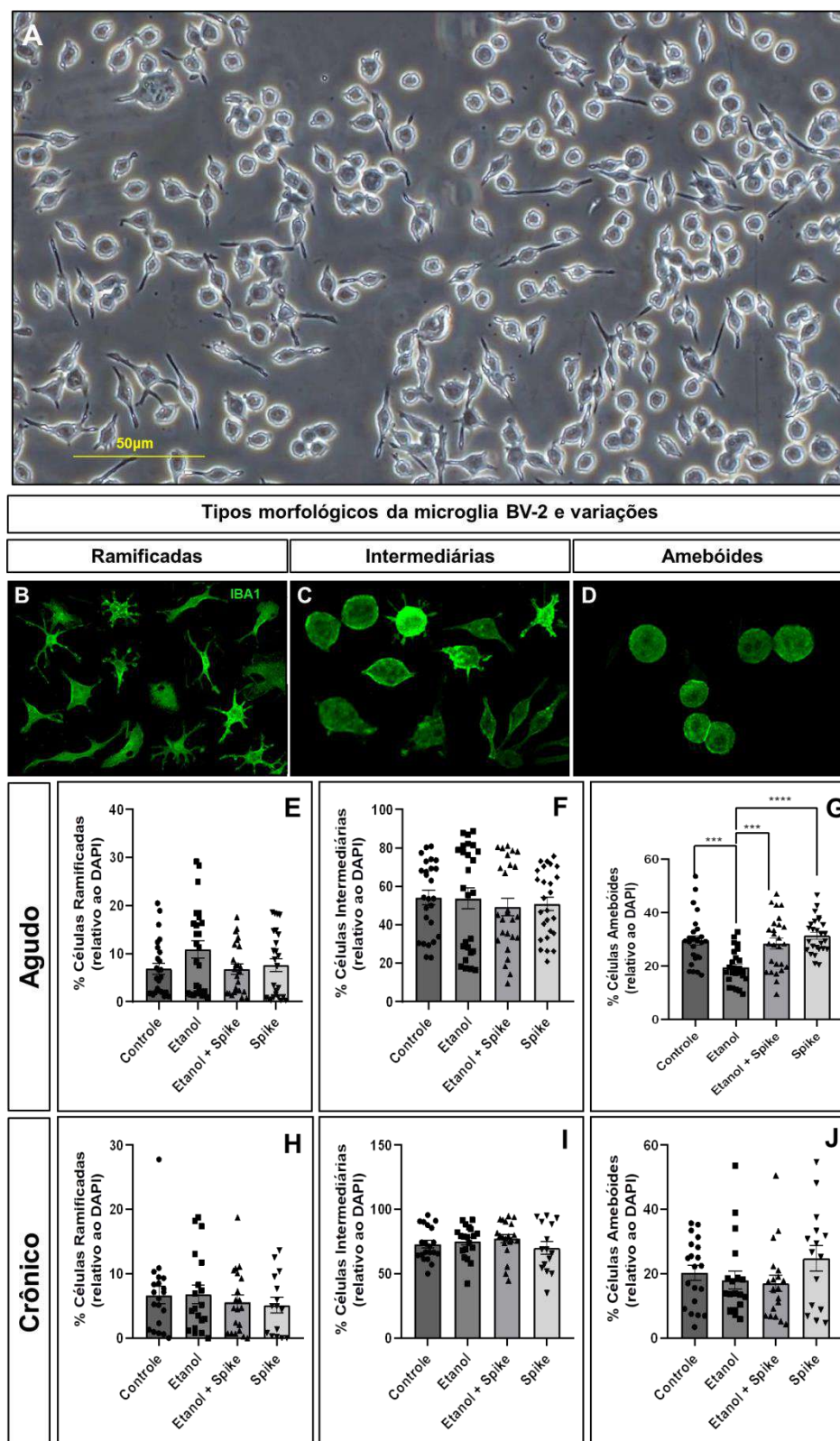


Figura 14. Efeito do tratamento com Spike-1 na morfologia microglial em culturas previamente expostas a Etanol 170mM. Cultura de células microgliais murinas de linhagem BV-2 mantidas em condições controle, observadas por contraste de fase (A), onde são visíveis a heterogeneidade das morfologias destacadas por imunocitoquímica para IBA-1 (verde): Ramificada (B), Intermediária (C) e Amebóide (D). Os gráficos representam as porcentagens dos números de células das respectivas morfologias diferentes condições experimentais. Amebóide: ***P = 0,0001 (Controle x Etanol); ***P = 0,0009 (Etanol x Etanol + Spike); ****P = <0,0001 (Etanol x Spike). Agudo, N = 3; Crônico, N = 4.

5.6 Efeito do tratamento com Spike-1 no potencial fagocítico de microglias previamente tratadas com etanol

Uma das principais características da célula microglial é a sua importante capacidade fagocítica, obtendo um papel crucial na manutenção da homeostase e também durante o contexto patológico durante a neuroinflamação (Shafer *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013; Lv *et al.*, 2023).

Para tal, realizamos um ensaio de fagocitose *in vitro*, utilizando um kit contendo *beads* (microesferas) de látex conjugadas a Fluoresceína (FITC). Em nosso modelo experimental de tratamento **agudo**, utilizamos as concentrações de etanol (100 e 340mM) para avaliarmos a intensidade de fluorescência das *beads* fluorescentes fagocitadas pelas microglias nas diferentes condições experimentais (**Figura 15**): Observamos que o tratamento com etanol 170 ou 340mM não provocou diferenças estatísticas em relação ao controle em relação ao potencial fagocítico das microglias (**Figura 15E-F, O**) Entretanto, a adição de Spike-1 à células previamente expostas ao etanol 170mM ou 340mM forneceu aumentos estatisticamente diferentes de 32 e 58%, respectivamente, em relação ao controle (**Figura 15G-J, O**). O tratamento que recebeu somente a Spike-1 forneceu aumento ainda mais significativo no potencial fagocítico das microglias em 81,3% quando comparado com o controle (**Figura 15K, L, O**). Utilizamos o tratamento com LPS como nosso controle positivo do experimento pelo seu potencial descrito de induzir a reatividade microglial (**Figura 15 M-O**).

Esse resultado pode nos indicar que a presença da Spike-1 apenas ou em células previamente tratadas com etanol estimula a ativação fagocítica de células microgliais, sugerindo que para esta resposta, apenas a presença de Spike-1 seja suficiente.

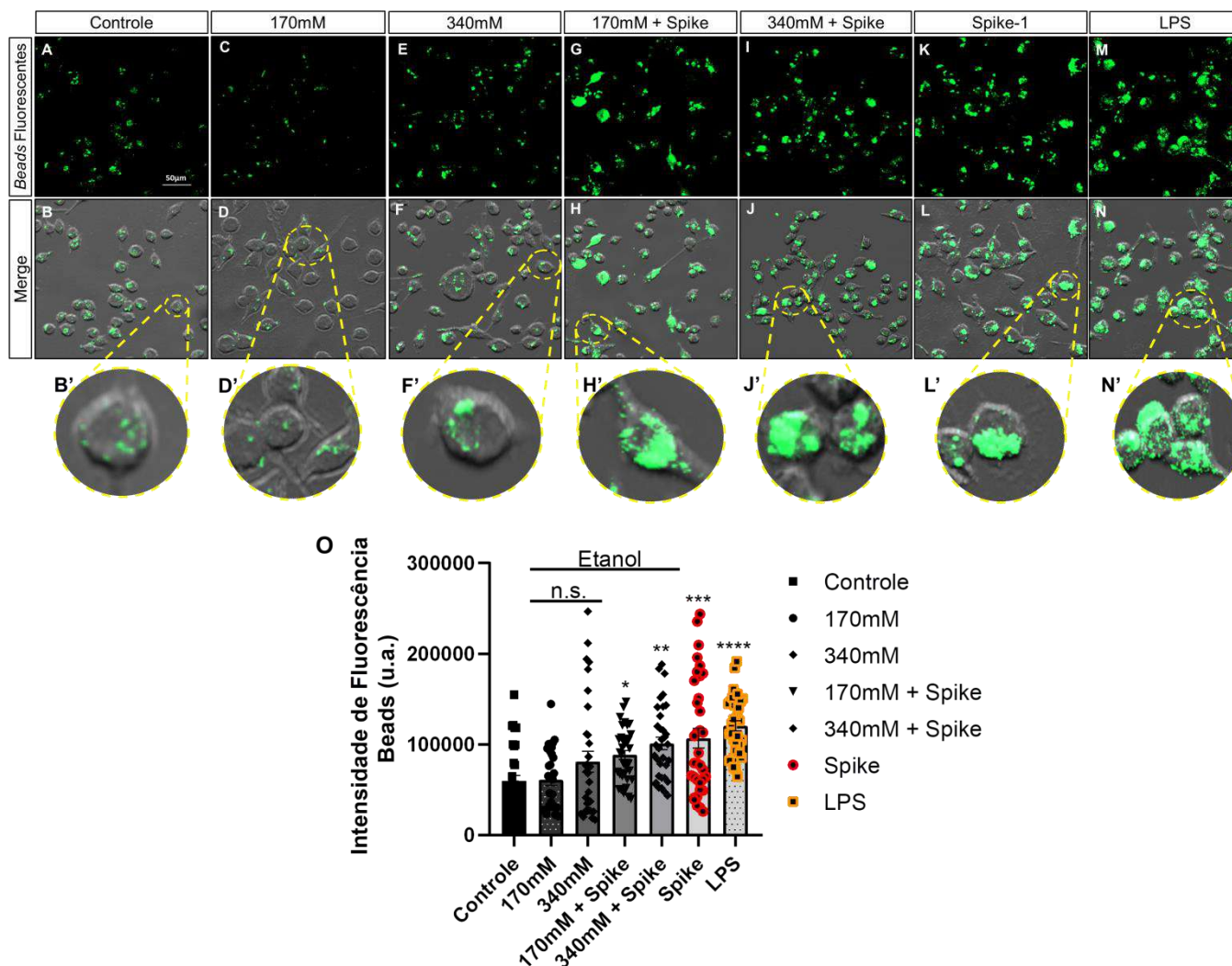


Figura 15. O tratamento com Spike-1 induz o perfil fagocítico microglial independente da exposição ao Etanol. Cultura de células microgliais murinas de linhagem BV-2 submetidas à exposição aguda a diferentes concentrações de etanol e em seguida, à Spike-1 e incubadas com *beads*-FITC (verde, A,C,E,G,I,K,M)). As imagens da co-localização do contraste de fase com a marcação das *beads*-FITC (B,D,F,H,J,L,N) mostram que nas condições etanol+spike-1 e Spike-1 ocorre aumento da fagocitose das *beads*-FITC (H,J,L,O), em comparação ao controle. *P = 0,0480; **P = 0,0011; ***P = 0,0001; ****P = <0,0001. N = 3.

5.7 Análise da expressão gênica de marcadores microgliais por RT-qPCR em células microgliais expostas cronicamente ao etanol, seguido do tratamento com Spike-1.

Como a reatividade microglial está atrelada a expressão de citocinas pró-inflamatórias e marcadores de reatividade microglial (Olah *et al.*, 2011), analisamos o nível de expressão de genes de C3, de IL-1 β (interleucina-1 beta) e CD-86 em

culturas de microglias BV-2 cultivadas e tratadas de acordo com o modelo “Crônico” de tratamento com etanol 100mM, seguida da exposição à Spike-1.

Observamos que os tratamentos com etanol ou Spike-1, sejam sozinhos ou conjugados, não modularam de forma significativa os níveis de mRNA para C3 em relação ao controle (**Figura 16A**), enquanto a presença da Spike-1 aumentou os níveis de CD-86 em 5x em relação ao controle (**Figura 16B**). Com relação aos níveis de IL-1 β os tratamentos também não modularam de forma estatisticamente diferente quando comparamos com a condição controle (**Figura 16C**).

Esses perfis de resposta, mesmo que não estatisticamente diferentes, podem ser um indicativo de que o etanol e a spike-1, quando sozinhas, possam modular, negativa ou positivamente, os níveis de C3, IL-1 β e CD-86, perfil este que parece ser perdido quando ambas estão conjugadas.

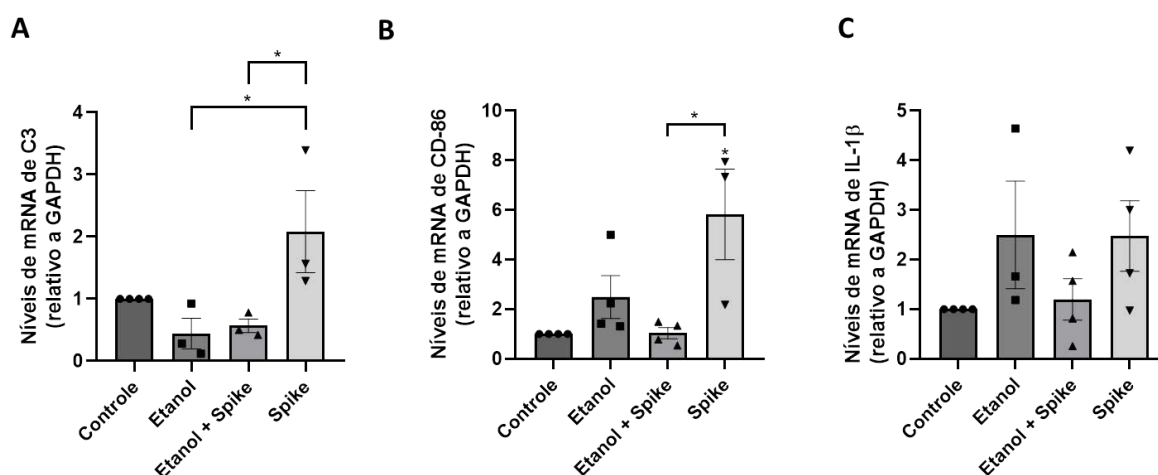


Figura 16. Efeito do tratamento com Spike-1 nos níveis de expressão de C3, IL-1 β e CD-86 em culturas de microglias (BV-2) previamente expostas cronicamente ao Etanol. Células microgliais de linhagem BV-2 foram tratadas com etanol 100mM e em seguida expostas ou não à Spike-1 e analisadas por RT-qPCR para C3 (A), CD-86 (B) e IL-1 β (C). Análises indicam que o tratamento apenas com a spike-1 é capaz de modular a expressão de CD-86, mas que o tratamento com Spike-1 em células previamente expostas ao etanol não altera a expressão gênica de C3 quando comparado a condição controle, apenas em relação às demais condições. IL-1 β também não apresentou diferenças na expressão gênica. *P = 0,0302 (etanol x spike), *P = 0,0451 (etanol+spike x spike), C3; *P = 0,0123 (controle x spike), *P = 0,0130 (etanol+spike x spike), CD-86. N = 4.

5.8 Efeito da exposição crônica ao etanol *in vivo* nos níveis de IBA-1 no córtex cerebral de camundongos

Uma vez que identificamos que o etanol parece modular o perfil reativo das células microgliais *in vitro*, o uso de linhagens celulares possui limitações. Para podermos ter uma melhor resposta sobre o perfil da célula microglial *in vivo*, utilizamos camundongos B6SJL de 8-10 semanas que receberam etanol administrado por gavagem durante 4 dias, 4g/kg (1x/dia), como descrito pelo nosso grupo previamente (Siqueira *et al.*, 2021). Animais controle receberam água através do mesmo procedimento. Após as exposições, os animais foram anestesiados, eutanasiados e os encéfalos removidos e processados para imunofluorescência para o marcador microglial IBA-1. A proteína IBA-1 é uma proteína ligadora de cálcio expressa em micróglia e macrófagos, e foi demonstrada estar relacionada à organização e reorganização dos filamentos de actina, aumentando as projeções de membrana para promover o processo fagocítico (Ohsawa *et al.*, 2018).

As análises de imunofluorescência demonstraram que no córtex cerebral de camundongos expostos cronicamente ao etanol não ocorre aumento na intensidade de marcação para **IBA-1**. De acordo com a **Figura 17** conseguimos observar uma morfologia hipertrofiada, com o corpo celular microglial aumentado em comparação aos animais controle (**Figura 17A-C**). Embora este ainda seja um resultado preliminar, este dado sugere que *in vivo* etanol possa induzir um perfil reativo microglial. Entretanto, além de aumentar o número de animais analisados, será necessário saber como se dá a resposta microglial nestes animais expostos ao etanol e em seguida à Spike-1.

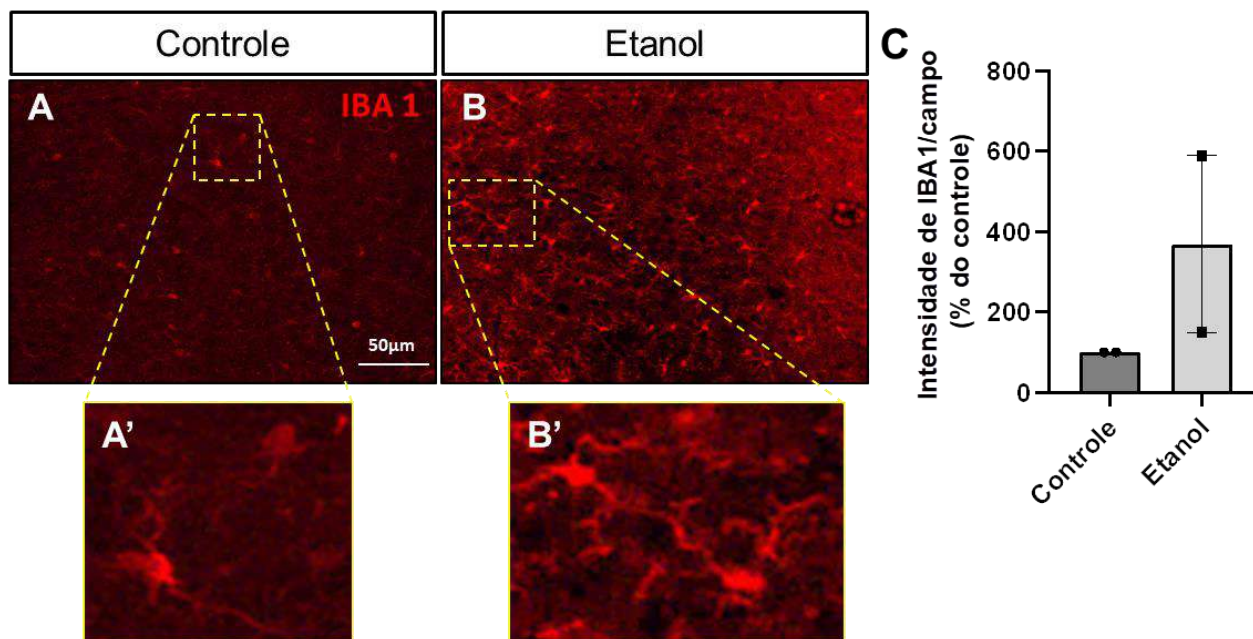


Figura 17. Efeito da exposição crônica ao Etanol *in vivo* nos níveis de IBA-1 no córtex cerebral. Imunofluorescência para IBA-1 do córtex cerebral de camundongos que receberam etanol por 4 dias por gavagem, representados nas condições Controle (A) e Etanol (B). N = 2 (controle); N = 2 (etanol).

5.9 Efeito da exposição crônica ao etanol *in vivo* na expressão de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 em diferentes regiões do Sistema Nervoso Central

Ainda no intuito de ampliar as análises *in vivo*, e como se sabe que a infecção por SARS-CoV2 é dependente da expressão de diferentes receptores e co-receptores, resolvemos analisar os níveis de expressão de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 por RT-qPCR em diferentes regiões do SNC em animais expostos cronicamente ao etanol.

Observamos, que os níveis de mRNA de ACE-2 estão reduzidos no córtex cerebral e hipocampo em 60% e 94,43%, respectivamente, mas aumentados em 4x na região do cerebelo em animais expostos ao etanol, em comparação ao grupo controle. Os níveis de mRNA de TMPRSS2 e TLR4 não foram modulados em nenhuma das áreas do encéfalo que foram analisadas quando comparamos com o grupo controle, porém os níveis de TMPRSS2 pareçam aumentar nas regiões do

hipocampo e cerebello. Estes dados são ainda preliminares uma vez que é necessário aumentar o número de animais analisados para confirmarmos também se esses aumentos de TMPRSS2 irão se manter.

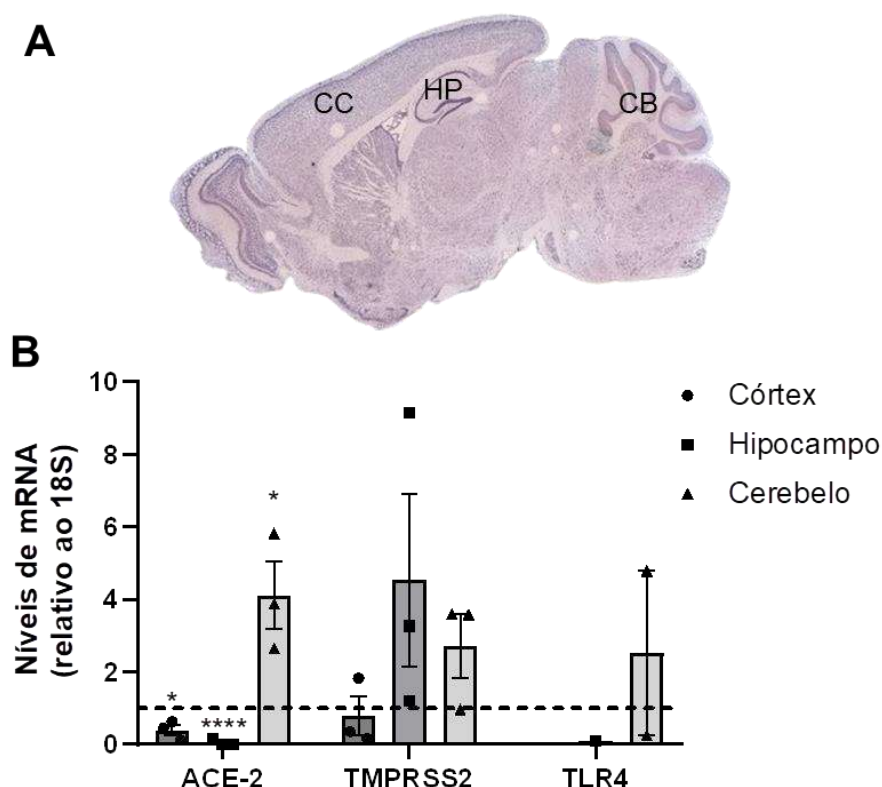


Figura 18. Efeito da exposição crônica ao Etanol *in vivo* nos níveis de ACE-2, TMPRSS2 e TLR-4 em diferentes regiões do SNC. Animais expostos ao etanol de forma crônica, tiveram seus encéfalos isolados e as regiões do córtex cerebral (CC), hipocampo (HP) e Cerebello (CB) (A) foram dissecadas e processadas para RT-qPCR. Os níveis de mRNA para ACE-2 estão reduzidos no córtex e no hipocampo, e aumentados no cerebello, e os níveis de mRNA para TMPRSS2 e TLR4 não se alteram no córtex cerebral, hipocampo ou cerebello. *P = 0,0158; *P = 0,0278 ****P = <0,0001 N = 1-3. Imagem A: VisiGene.com (Allen Brain Atlas – ABA).

5.10 Efeito do tratamento de microglias humanas com etanol nos níveis de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4

Uma questão importante no contexto da COVID-19 é o impacto desta doença para o SNC humano, e neste contexto iniciamos algumas análises utilizando microglias humanas isoladas a partir de uma suspensão celular de tecido cortical humano (Thermo Fisher), para validar alguns achados encontrados nas células BV-2

(murinas) ou ainda verificar se a responsividade aos diferentes tratamentos depende da espécie. Realizamos o cultivo destas células e preliminarmente as tratamos de forma aguda com 2 concentrações de etanol (170 e 340mM) para avaliar a expressão de **ACE-2**, **TMPRSS2** e **TLR4**. De acordo com a **Figura 19**, podemos perceber que essas células isoladas apresentam uma morfologia similar a BV-2 quando em cultivo, e expressam os marcadores de interesse citados acima (**Figura 19 A,B**).

Análises por imunocitoquímica destas culturas nos mostrou que a presença do etanol 170mM e 340mM não alteraram os níveis dos receptores analisados em comparação ao controle. Entretanto, estes resultados são ainda preliminares, sendo necessários mais experimentos para confirmar estes dados.

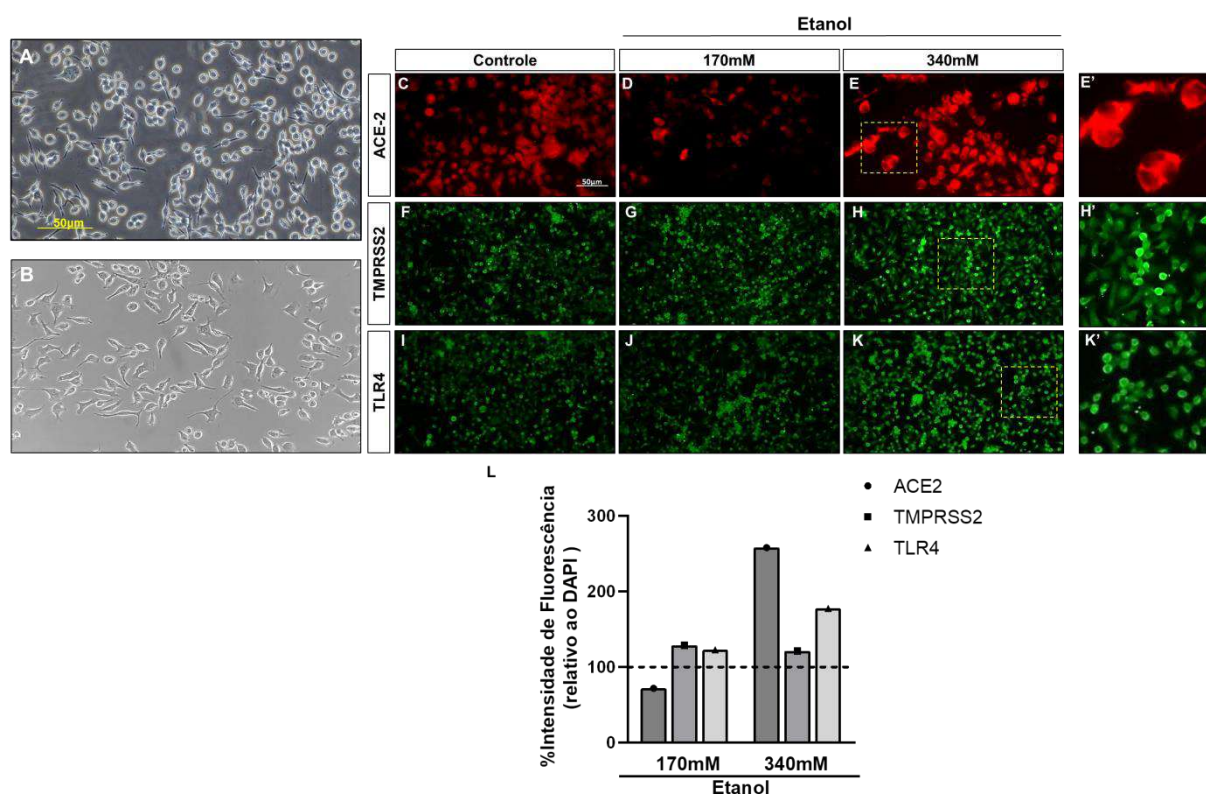


Figura 19. Efeito do tratamento com Etanol nos níveis de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 em culturas de células microgliais humanas. Foto em contraste de fase de células microgliais BV-2 (A) e humanas (B). Células microgliais humanas foram tratadas com etanol 170 e 340mM e analisadas por imunofluorescência. Em resultado preliminar, os níveis de ACE-2 (C-E), TMPRSS2 (F-H) e TLR4 (I-K) não são alterados na presença do etanol. As análises de cada receptor foram feitas de forma

individual e só posteriormente os dados foram unidos para a formação do gráfico apresentado N = 1.

5.11 Efeito do tratamento de células microgлияis humanas nos níveis de CD-11b, IBA-1 e CD-45

Com o intuito de iniciar as análises sobre o perfil de ativação em microgлияs humanas, realizamos o cultivo dessas células para realizar tratamento agudo com etanol 170 e 340mM, e avaliamos a expressão de CD-11b, IBA-1 e CD-45. De acordo com a **Figura 20**, também não observamos diferenças estatísticas nos níveis de CD-11b, IBA-1 e CD-45 quando os comparamos com o controle, porém, mesmo esses resultados sendo preliminares e necessitando de mais experimentos para confirmar os dados, os níveis dos três marcadores aparentam ser menores na presença do etanol 170mM, indicando uma possível perda de ativação e supressão de atividade pró-inflamatória microgлияl.

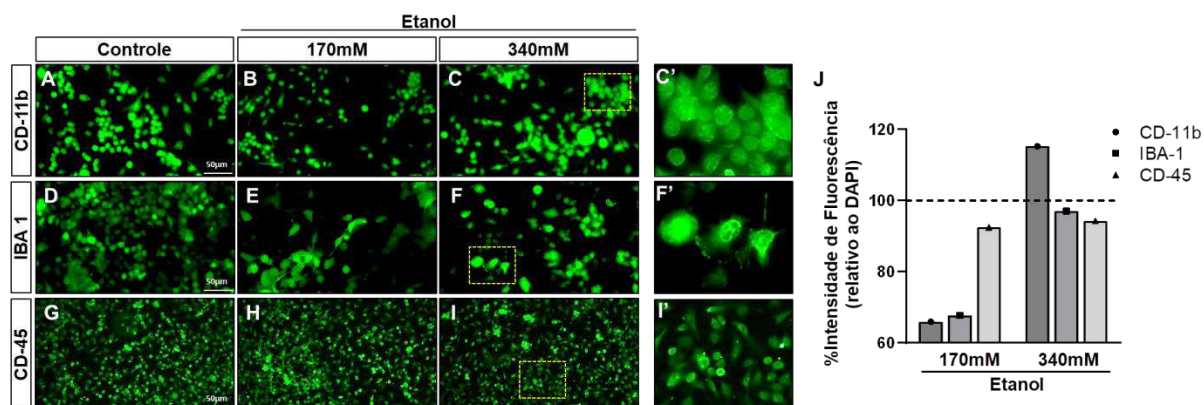


Figura 20. Efeito da exposição ao Etanol nos níveis de CD-11b, IBA-1 e CD-45 em células microgлияis humanas. Células microgлияis humanas foram tratadas com etanol 170 e 340mM e analisadas por imunofluorescência. De forma preliminar, os níveis de CD-11b (A-C), IBA-1 (D-F) e CD-45 (G-I) não se alteram em presença de etanol 170mM ou 340mM. As análises de cada receptor foram feitas de forma individual e só posteriormente os dados foram unidos para a formação do gráfico apresentado. N = 1.

6. DISCUSSÃO

A pandemia do novo coronavírus, responsável por causar a doença chamada COVID-19 (Ellul *et al.*, 2020), acabou desencadeando o aumento do uso de drogas lícitas devido ao isolamento social, ocasionando sérios efeitos sociais e psicológicos na população em muitos países, atingindo diversos grupos etários e socioeconômicos (Zhai *et al.*, 2022). Sabemos que o alcoolismo é responsável por reduzir a resposta imunológica do organismo, porém não se sabe ainda se o consumo crônico de álcool pode promover uma predisposição à infecção pelo SARS-CoV2, contribuir para progressão e agravamento da COVID-19, ou ainda para a manutenção das sequelas pós COVID (Testino & Pellicano, 2022). Apesar de haver estudos correlacionando o consumo de algumas bebidas com a diminuição do risco de sintomas graves enquanto o consumo de bebidas com alto teor alcóolico e em grande quantidade aumentam as chances de desenvolver a forma grave da COVID (Dai *et al.*, 2022), ainda não há estudos correlacionando o consumo de álcool com a predisposição ao estabelecimento da COVID-19. Um dos principais mecanismos de infecção pelo vírus SARS-CoV2 em células humanas envolve a ligação de sua proteína de superfície Spike-1 com proteínas de superfície celular, especialmente a enzima conversora de angiotensina-2 (ACE-2), a qual atuaria como um receptor para o vírus e sua principal porta de entrada, sendo as microglias e astrócitos algumas das células que expressam altos níveis de ACE-2 (Ni *et al.*, 2020; Vargas *et al.*, 2020). Proteases, como a TMPRSS2, auxiliam esse receptor a completar o processo ao fazer a clivagem do domínio S2 e sítio S2' da proteína spike-1 (Jackson *et al.*, 2021). Já foi demonstrado na literatura que microglia, astrócitos, células endoteliais e outros tipos celulares expressam níveis de ACE-2 e TMPRSS2, sendo o segundo em um nível maior na microglia em relação a ACE-2 (Torices *et al.*, 2021).

Em nosso trabalho não foram encontradas diferenças nos níveis dos receptores ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 em células BV-2 e humanas quando os comparamos com o controle tanto na condição que recebeu etanol 170mM quanto 340mM. Os níveis de TLR4 de células BV-2 mostraram-se alterados somente quando comparamos a condição 340mM em relação com a condição 170mM, mostrando um aumento de 31,42%. Apesar de as microglias humanas ainda serem resultados preliminares, os nossos resultados não condizem com os demais dados na literatura. Diversos estudos já demonstraram que em diversos tecidos e regiões do encéfalo, após o uso crônico do etanol, possuem níveis elevados de ACE-2, TMPRSS2 e TLR4 (Okuno *et al.*, 1986; Maul *et al.*, 2001; Fernandez-Lizarbe, Montesinos & Guerri, 2013; Crunfli *et al.*, 2020; Bantounou, 2022; Balasubramanian *et al.*, 2022). Neste trabalho foram utilizadas duas concentrações de etanol devido a diversos trabalhos já utilizando essas mesmas concentrações de 170mM e 340mM no intuito de mimetizar uma dose alta em pessoas alcoolistas (Lawrimore & Crews, 2017; Petagine *et al.*, 2025), causando por exemplo dificuldade motora, diminuição dos batimentos cardíacos e diminuição da temperatura corporal, podendo levar ao óbito.

No contexto da exposição ao etanol e à Spike-1, é fundamental entender se os efeitos observados neste trabalho podem estar sendo influenciados por alterações na proliferação celular. Alguns estudos já demonstraram que modelos de álcool mostraram uma ativação e proliferação microglial parcial (Nixon *et al.*, 2008; McClain *et al.*, 2011; Marshall *et al.*, 2013). Além disso, estudos recentes demonstram que a proteína Spike-1 induziu a ativação de mastócitos, que desencadeou a liberação de fatores inflamatórios em microglias e em células endoteliais microvasculares do cérebro humano (Wu *et al.*, 2024). O Ki67 é um marcador que está associado à

proliferação celular presente no núcleo das células durante as fases F1, S, G2 e M, sendo importante durante o ciclo celular (Duchrow *et al.*, 2001). Através da análise de DAPI e dos números de células Ki67+, de acordo com a Figura 11 não observamos diferenças estatísticas nos números de células proliferativas, nem no número total de células, em nenhuma das condições experimentais em relação ao controle, sugerindo que os tratamentos não alteram o perfil proliferativo destas células. Contudo, é importante mencionar que, mesmo que as análises para Ki67 em nosso modelo ainda sejam preliminares e que novos experimentos precisam ser realizados para confirmar esses resultados, podemos notar que no tratamento agudo as células aparentam um aumento na proliferação nas células que receberam apenas o tratamento com a proteína spike-1 quando comparamos com as que receberam apenas etanol. Quando comparamos essas duas condições com a que recebeu tratamento prévio com etanol seguido do tratamento com a spike-1, pode ser que, caso esse padrão se mantenha com o aumento do número de experimentos, o etanol possa inibir parcialmente a proliferação celular de células que posteriormente foram tratadas com spike-1, o que foi visto de forma inversa no modelo crônico de tratamento.

Uma vez que não tenhamos observado efeitos importantes no número de células totais nas culturas expostas a diferentes condições experimentais, e embora alguns dos efeitos pró- e anti-inflamatórios em células microgliais e macrófagos dependam da ativação da proliferação celular (Shigemoto-Mogami *et al.*, 2014), observamos que ambos os tratamentos agudo e crônico não alteraram os níveis de CD-11b em relação ao controle em células microgliais BV-2, podendo observar um perfil semelhante em células microgliais humanas, mesmo que não tenha sido em modelo “agudo” e “crônico” e que ainda seja um dado preliminar. A proteína CD-11b

é uma proteína de adesão que pertence à família das integrinas, tendo seus níveis aumentados quando a célula exibe um perfil mais ativo e pró- ou anti-inflamatório. Algumas células como neutrófilos, monócitos, microglias e macrófagos expressam níveis de CD-11b, sendo bastante comumente usado em ensaios de imunofluorescência para detectar reatividade microglial em culturas (Korzhevskii & Kirik, 2016). De acordo com um estudo realizado por Alfonso-Loeches e colaboradores (2010), camundongos adultos que receberam etanol por 5 meses apresentaram um aumento nos níveis de CD-11b no córtex cerebral e aumento de citocinas inflamatórias. Já Zhao e colaboradores (2013) encontraram resultados similares ao trabalho anteriormente mencionado após tratamento crônico e intermitente por 25 dias ao analisar as áreas do córtex e hipocampo.

Além disso, em modelos *in vitro* e *in vivo* de estudo da reatividade microglial no contexto da infecção por SARS-CoV2 também encontram elevados os níveis desta proteína quando células microgliais são infectadas por SARS-CoV2 ou expostas a proteína Spike-1 purificada (Emmi *et al.*, 2023; Dunai *et al.*, 2024). Neste contexto, embora não tenhamos observado diferenças estatísticas, é possível que para CD-11b os efeitos da exposição ao etanol sejam mais indutores em maiores concentrações ou tempos de exposição. Entretanto precisamos realizar novos experimentos para confirmar essas hipóteses.

Outro marcador de ativação pró-inflamatória e atividade fagocítica da microglia, é a proteína C3, uma proteína da família complemento (Soteros & Sai, 2021). De acordo com Zhou e colaboradores (2022), as proteínas do sistema complemento se ligam a sinapses imaturas ou com fraco desenvolvimento no SNC, onde irá ocorrer a poda através da microglia e essas sinapses são, então, reconhecidas por receptores do sistema complemento. Em microglias e astrócitos C1q e C3 são algumas das

proteínas envolvidas nesse processo de localização de sinapses “inapropriadas”.

Neste trabalho, apesar de não termos encontrado diferenças nos níveis de C3 em nenhuma das condições experimentais quando comparamos com o controle no modelo agudo, os níveis desse marcador na condição Spike no modelo crônico aumentaram em relação ao controle, possuindo também diferença estatística em relação às condições que receberam apenas etanol e que recebeu etanol seguido do tratamento com spike-1, podendo significar que o etanol possa reduzir a capacidade dessa proteína de modular os níveis de C3. Encontramos ainda um perfil de resposta semelhante em relação aos níveis de mRNA de C3 e CD-86, um outro importante marcador de ativação microglial e da resposta pró-inflamatória (Zhang, Park & Kim, 2023). Esses resultados podem sugerir que a exposição mais prolongada ao etanol seguida pelo tratamento com Spike-1 possa prejudicar a resposta da ativação microglial ao compararmos com as células que receberam somente o tratamento com a Spike-1.

Sabidamente IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória que é liberada por macrófagos e microglias com perfil ativo durante processos de neuroinflamação (Monif *et al.*, 2016), estando comumente associada a doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer (Smith *et al.*, 2011). Além disso, possui papel importante em funções fisiológicas do SNC, participando de processos de aprendizado e memória (Voet *et al.*, 2019). Já CD-86 possui também um papel crucial no sistema imune, sendo um marcador do estado M1 de ativação da microglia, um estado inflamatório e neurotóxico (Guo, Wang & Yin, 2022). Um estudo realizado por Peng & Nixon (2021) demonstrou um aumento dos níveis de CD-86 juntamente com CD-11b e CD-45 após ratos receberem etanol por quatro dias por gavagem.

A reatividade microglial está ainda atrelada a alterações morfológicas, que são

fundamentais para estas células exercerem suas funções tanto homeostáticas quanto de remoção de patógenos e debris celulares (Takahashi, Rochford & Neumann, 2005). De acordo com um estudo realizado por Jeong e Colaboradores (2022), foi observado que a infecção viral por SARS-CoV2 induziu respostas imunes na fase inicial da infecção e na apoptose na fase tardia, com a microglia humana apresentando um perfil mais reativo e pró-inflamatório.

Um estudo realizado por Melbourne e colaboradores (2024) demonstrou uma reatividade microglial moderada na área cortical do sistema límbico em ratos fêmeas tratadas com etanol por 4 dias, que sugeriu uma retração de ramificações de células microgliais através de análise morfológica. Porém, um estudo realizado em ratos adolescentes apresentaram uma ativação parcial da microglia no hipocampo desses animais, persistindo até o início da vida adulta, indicando que a exposição durante esse período desencadeia consequências a longo prazo (McClain *et al.*, 2011).

Neste trabalho, por se tratar do uso de uma linhagem celular, tentamos classificar as diferentes morfologias observadas *in vitro* em 3 categorias: ramificadas, intermediárias e amebóides. No modelo de exposição aguda não observamos diferenças estatísticas nos números de células ramificadas e intermediárias em células expostas ao etanol. Já as células com morfologias amebóides apresentaram-se em menor número em presença de etanol, sendo estes números resgatados em células que foram previamente tratadas com etanol e em seguida à Spike-1, quando comparado ao controle. No modelo crônico não encontramos resultados relevantes quando à alterações morfológicas em nenhuma condição experimental. Estes dados sugerem que a resposta microglial ocorra nas primeiras 24 horas de exposição ao etanol e que pelo menos com relação à morfologia amebóide a exposição ao etanol reduz a capacidade de ativação celular

característica da microglia.

As alterações morfológicas estão diretamente atreladas ao perfil fagocítico das células microgliais. A morfologia amebóide da microglia, característica de seu perfil ativo (Kinuthia, Wolf & Langmann, 2020), passa a favorecer uma maior capacidade fagocítica de células disfuncionais e patógenos (Henriques *et al.*, 2018).

Desta forma, decidimos também avaliar a capacidade fagocítica dessa célula em diferentes condições experimentais e observamos um aumento dessa função nas condições em que havia a presença da proteína Spike-1, seja sozinha ou em células previamente tratadas de forma aguda com etanol. Esse aumento da capacidade fagocítica encontrado no nosso trabalho pode ser confirmado por dados da literatura (Wang *et al.*, 2023), que dizem que o etanol inibe a fagocitose da microglia. De fato, em nosso modelo, o tratamento com etanol apenas não foi capaz de induzir o fenótipo fagocítico. Porém, já é descrito que a proteína Spike é capaz de modular esse perfil nessa célula (Samudyata *et al.*, 2022), sendo um forte indicador de que apenas o etanol sozinho não seja capaz de aumentar a fagocitose microglial. Logo, para esse perfil de resposta, a exposição ao etanol, sozinha, ou prévia a adição de Spike-1, não parece ser necessária. Entretanto, em alguns de nossos resultados percebemos que o tratamento crônico com etanol parece ser relevante para modular a resposta microglial à Spike-1. Será importante também avaliar o perfil de resposta fagocítica da microglia no modelo crônico ao etanol, seguido de exposição à Spike-1.

Até aqui, todos os nossos achados foram utilizando uma linhagem celular para modelar os efeitos da exposição ao etanol como um fator que pode influenciar a resposta microglial à proteína Spike-1. Para nos aprofundarmos nas análises, realizamos experimentos *in vivo*, onde encontramos um aparente aumento da

imunorreatividade para IBA-1 no córtex cerebral de camundongos expostos de forma crônica ao etanol em comparação ao grupo controle. Já foi descrito na literatura que o etanol é capaz de modular positivamente os níveis de IBA-1 no córtex e hipocampo de animais expostos ao etanol por 10 dias (Qin & Crews, 2012a-b) e 12 meses (Ehrlich, Pirchl & Humpel, 2012), corroborando com nosso dado onde, mesmo com um tempo menor de exposição, este já foi suficiente para induzir uma possível reatividade microglial *in vivo*. Em relação aos dados obtidos através do RT-qPCR das áreas do córtex cerebral, hipocampo e cerebelo para os receptores ACE-2, TMPRSS2 e TLR4, encontramos um aumento nos níveis de ACE-2 no cerebelo desses animais, bem como uma diminuição nas regiões do córtex e hipocampo para o mesmo marcador. Não encontramos diferenças estatísticas nos outros dois marcadores, apesar de termos encontrado um aparente aumento nos níveis de TMPRSS2 no hipocampo e cerebelo. Um estudo recente encontrou altos níveis de ACE-2 e TMPRSS2 em diversas regiões do encéfalo, como hipotálamo, hipocampo, cerebelo e córtex parietal, com alta expressão gênica de TMPRSS2 no hipocampo (Gupta *et al.*, 2024), já outro estudo indica que os níveis de expressão de ACE-2 são baixos no córtex cerebral e em comparação sendo um pouco maior nas regiões do tálamo e plexo coroide (Chen *et al.*, 2020). O primeiro estudo mencionado corrobora com os achados de nosso trabalho, porém pode ser necessário aumentar o número de experimentos para poder confirmar se as expressões desses receptores nessas regiões estão corretas.

7. CONCLUSÃO

Com isso, demonstramos que a proteína Spike é capaz de influenciar na capacidade fagocítica da microglia BV-2, com o etanol supostamente agindo como um inibidor quando exposto previamente à proteína. Esse resultado em conjunto

com os dados encontrados na mesma condição experimental para C3 através do ensaio de imunofluorescência e por RT-qPCR juntamente com CD-86 corroboram com essa hipótese. Os efeitos do etanol desencadearam mudanças morfológicas dentro das primeiras 24h, o que não foi visto no modelo crônico. Esse fato também corrobora com a ideia de que o consumo crônico do etanol faz com que essa célula perca a sua capacidade de mediar inflamação e atividade fagocítica, o que não foi visto na presença da Spike sem exposição prévia ao etanol. De qualquer forma, são necessários que mais experimentos sejam realizados para confirmar os resultados obtidos, principalmente os experimentos *in vivo*, visto que alguns não estão condizentes com o que já foi relatado na literatura sobre a modulação dos níveis de inflamação de célula microglial e de receptores para o SARS-CoV2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUDOUNYA, Mohamed M.; HEADS, Richard J.. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): sars-cov-2 may bind and activate tlr4 to increase ace2 expression, facilitating entry and causing hyperinflammation. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 2021, p. 1-18, 14 jan. 2021. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2021/8874339>.
- ACHOM, Amika; DAS, Ranjita; PAKRAY, Partha. An improved Fuzzy based GWO algorithm for predicting the potential host receptor of COVID-19 infection. **Computers In Biology And Medicine**, [S.L.], v. 151, p. 106050, dez. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiomed.2022.106050>
- ADESSE, Daniel; GLADULICH, Luis; ALVAREZ-ROSA, Liandra; SIQUEIRA, Michele; MARCOS, Anne Caroline; HEIDER, Marialice; MOTTA, Caroline Soares; TORICES, Silvia; TOBOREK, Michal; STIPURSKY, Joice. **Role of aging in Blood–Brain Barrier dysfunction and susceptibility to SARS-CoV-2 infection: impacts on neurological symptoms of covid-19.** *Fluids and Barriers of the CNS*, [S.L.], v. 19, n. 1, 18 ago. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12987-022-00357-5>.
- AGUIAR, Jennifer A.; TREMBLAY, Benjamin J-M.; MANSFIELD, Michael J.; WOODY, Owen; LOBB, Briallen; BANERJEE, Arinjay; CHANDIRAMOHAN, Abiram; TIESSEN, Nicholas; CAO, Quynh; DVORKIN-GHEVA, Anna. Gene expression and in situ protein profiling of candidate SARS-CoV-2 receptors in human airway epithelial cells and lung tissue. **European Respiratory Journal**, [S.L.], v. 56, n. 3, p. 2001123, 16 jul. 2020. European Respiratory Society (ERS). <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.01123-2020>.
- ALBERTS, Bruce *et al.* **Os sistemas imunes inato e adaptativo.** In: ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 24, p. 1297-1300. ISBN CDU 577.2:576.3. Acesso em: 19 ago. 2024.
- Álcool e a Saúde dos Brasileiros: Panorama 2024 / Organizador: Arthur Guerra de Andrade; Centro de Informações sobre Saúde e Álcool. - 1. ed. - São Paulo, SP : CISA – Centro de Informações sobre Saúde e Álcool, 2024. 98 p.; figs.; gráfs.; tabs.; fotografias.
- ALFONSO-LOECHES, Silvia; GUERRI, Consuelo. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. **Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 19-47, fev. 2011. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10408363.2011.580567>.
- ALMUTAIRI, Mohammed M.; SIVANDZADE, Farzane; ALBEKAIRI, Thamer H.; ALQAHTANI, Faleh; CUCULLO, Luca. Neuroinflammation and Its Impact on the Pathogenesis of COVID-19. **Frontiers In Medicine**, [S.L.], v. 8, n.p., 24 nov. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2021.745789>.
- AN, Jun; TOWN, Terrence; MORI, Takashi; WU, Yajuan; SAXE, Michael; CRAWFORD, Fiona; MULLAN, Mike. **CD45 Opposes β -Amyloid Peptide-Induced Microglial Activation via Inhibition of p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase.** *The Journal of Neuroscience*, [S.L.], v. 20, n. 20, p. 7587-7594, 15 out. 2000. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.20-20-07587.2000>.
- ASATRYAN, Liana; OSTROVSKAYA, Olga; LIEU, Dustin; DAVIES, Daryl L.. Ethanol differentially modulates P2X4 and P2X7 receptor activity and function in BV2 microglial cells. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 128, p. 11-21, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.030>
- BAI, Chongzhi; ZHONG, Qiming; GAO, George Fu. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. **Science China Life Sciences**, [S.L.], v. 65, n. 2, p. 280-294, 10 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4>.
- BALASUBRAMANIAN, Nagalakshmi; JAMES, Thomas D.; SELVAKUMAR, Govindhasamy Pushpavathi; REINHARDT, Jessica; MARCINKIEWCZ, Catherine A.. Repeated ethanol exposure and withdrawal alters angiotensin-converting enzyme 2 expression in discrete brain regions: implications for sars :cov :2 neuroinvasion. **Alcohol: Clinical and Experimental Research**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 219-239, jan. 2023. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.15000>.
- BANTOUNOU, Maria A.. A narrative review of the use of alcohol during the Covid-19 pandemic; effects and implications. **Journal Of Addictive Diseases**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 30-40, 4 abr. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10550887.2022.2058852>

BARANOVA, Ancha; CAO, Hongbao; ZHANG, Fuquan. Severe COVID-19 increases the risk of schizophrenia. **Psychiatry Research**, [S.L.], v. 317, p. 114809, nov. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2022.114809>.

BARTHE, Manon; HERTEREAU, Leslie; LAMGHARI, Noura; OSMAN-PONCHET, Hanan; BRAUD, Véronique M.. Receptors and Cofactors That Contribute to SARS-CoV-2 Entry: can skin be an alternative route of entry?. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 7, p. 6253, 26 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24076253>.

BEYERSTEDT, Stephany; CASARO, Expedito Barbosa; RANGEL, Érika Bevilaqua. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ace2) expression and tissue susceptibility to sars-cov-2 infection. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [S.L.], v. 40, n. 5, p. 905-919, 3 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-020-04138-6>.

BHATTACHARYA, Manojit; SHARMA, Ashish Ranjan; MALLICK, Bidyut; SHARMA, Garima; LEE, Sang-Soo; CHAKRABORTY, Chiranjib. Immunoinformatics approach to understand molecular interaction between multi-epitopic regions of SARS-CoV-2 spike-protein with TLR4/MD-2 complex. **Infection, Genetics And Evolution**, [S.L.], v. 85, p. 104587, nov. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104587>.

BOE, Andrew; DANG, Chinh; JEUNG, Darren; LUONG, Lon; SUNKIN, Susan; SUTRAM, Madhavi; YOUNGSTROM, Brian. **Mouse C86302**. 2006. Allan Brain Atlas (ABA). Disponível em: https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgVisiGene?hqp_dold=174572&hgslid=2112117866_aAsIHgFlvzs4lEN3EQXGah5lZVU1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Coronavírus Brasil. Brasil, 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. COVID-19: Sintomas. Brasil, 2021.

BUGGE, Thomas H.; ANTALIS, Toni M.; WU, Qingyu. Type II Transmembrane Serine Proteases. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 284, n. 35, p. 23177-23181, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.r109.021006>.

BUZHDYGAN, Tetyana P.; DEORE, Brandon J.; BALDWIN-LECLAIR, Abigail; BULLOCK, Trent A.; MCGARY, Hannah M.; KHAN, Jana A.; RAZMPOUR, Roshanak; HALE, Jonathan F.; GALIE, Peter A.; POTULA, Raghava. **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*, 11 out. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105131>

CAGNO, Valeria; TSELIGKA, Eirini D.; JONES, Samuel T.; TAPPAREL, Caroline. Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: true receptors or adaptation bias?. **Viruses**, [S.L.], v. 11, n. 7, p. 596, 1 jul. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v11070596>.

CANTUTI-CASTELVETRI, Ludovico; OJHA, Ravi; PEDRO, Liliana D.; DJANNATIAN, Minou; FRANZ, Jonas; KUIVANEN, Suvi; MEER, Franziska van Der; KALLIO, Katri; KAYA, Tuğberk; ANASTASINA, Maria. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. **Science**, [S.L.], v. 370, n. 6518, p. 856-860, 13 nov. 2020. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.abd2985>.

CERAULO, Carmine; GIORGI, Federico M.. Genomic variance of the 2019-nCoV coronavirus. **Journal of Medical Virology**, [S.L.], v. 92, n. 5, p. 522-528, 19 fev. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25700>.

CHAKRABORTY, Indranil; MAITY, Prasenjit. **COVID-19 outbreak: migration, effects on society, global environment and prevention**. *Science of the Total Environment*, [S.L.], v. 728, p. 138882, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138882>.

CHEN, Rongrong; WANG, Keer; YU, Jie; HOWARD, Derek; FRENCH, Leon; CHEN, Zhong; WEN, Chengping; XU, Zhenghao. The Spatial and Cell-Type Distribution of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Human and Mouse Brains. **Frontiers In Neurology**, [S.L.], v. 11, n.p., 20 jan. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2020.573095>

CHEN, Yanxia; LI, Can; LIU, Feifei; YE, Zhanhong; SONG, Wenchen; LEE, Andrew C. Y.; SHUAI, Huiping; LU, Lu; TO, Kelvin Kai-Wang; CHAN, Jasper Fuk-Woo. Age-associated SARS-CoV-2 breakthrough infection and changes in immune response in a mouse model. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 368-383, 24 jan. 2022. Informa UK Limited.

<http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2022.2026741>

CHOUDHURY, Abhigyan; MUKHERJEE, Suprabhat. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. **Journal Of Medical Virology**, [S.L.], v. 92, n. 10, p. 2105-2113, 17 maio 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.25987>.

CHU, Hin; CHAN, Che-Man; ZHANG, XI; WANG, Yixin; YUAN, Shuofeng; ZHOU, Jie; AU-YEUNG, Rex Kwok-Him; SZE, Kong-Hung; YANG, Dong; SHUAI, Huiping. Middle East respiratory syndrome coronavirus and bat coronavirus HKU9 both can utilize GRP78 for attachment onto host cells. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 293, n. 30, p. 11709-11726, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.ra118.001897>.

CORRAO, Giovanni; BAGNARDI, Vincenzo; ZAMBON, Antonella; LA VECCHIA, Carlo. **A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 diseases**. *Preventive Medicine*, 38(5), 613–619, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ypmed.2003.11.027>

COSTA, Luis Henrique Angenendt da; SANTOS-JUNIOR, Nilton Nascimento; CATALÃO, Carlos Henrique Rocha; ROCHA, Maria José Alves. Microglial Activation Modulates Neuroendocrine Secretion During Experimental Sepsis. **Molecular Neurobiology**, [S.L.], v. 58, n. 5, p. 2133-2144, 7 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-020-02241-5>.

CRUNFLI, Fernanda; CARREGARI, Victor C.; VERAS, Flavio P.; SILVA, Lucas S.; NOGUEIRA, Mateus Henrique; ANTUNES, André Saraiva Leão Marcelo; VENDRAMINI, Pedro Henrique; VALENÇA, Aline Gazzola Fragnani; BRANDÃO-TELES, Caroline; ZUCCOLI, Giuliana da Silva, *et al.* **Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients**. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, [S.L.], v. 119, n. 35, p. 1-12, 11 ago. 2022. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2200960119>.

CUNNINGHAM, Christopher L.; MARTÍNEZ-CERDEÑO, Verónica; NOCTOR, Stephen C.. **Diversity of Neural Precursor Cell Types in the Prenatal Macaque Cerebral Cortex Exists Largely within the Astroglial Cell Lineage**. *Plos One*, [S.L.], v. 8, n. 5, 28 maio 2013. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0063848>.

DAI, Xi-Jian; TAN, Liang; REN, Lina; SHAO, Yuan; TAO, Weiqun; WANG, Yongjun. **COVID-19 Risk Appears to Vary Across Different Alcoholic Beverages**. *Frontiers In Nutrition*, [S.L.], v. 8, 3 jan. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnut.2021.772700>.

DISABATO, Damon J.; QUAN, Ning; GODBOUT, Jonathan P.. **Neuroinflammation: the devil is in the details**. *Journal of Neurochemistry*, [S.L.], v. 139, n. 2, p. 136-153, 4 maio 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.13607>.

DUCHROW, Michael; SCHMIDT, Mirko; ZINGLER, Monika; ANEMÜLLER, Stefan; BRUCH, Hans-Peter; BROLL, Rainer. **Suppression of Cell Division by pKi-67 Antisense-RNA and Recombinant Protein**. *Cellular Physiology and Biochemistry*, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 331-338, 2001. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000047819>

DUNAI, Cordelia; HETHERINGTON, Claire; BOARDMAN, Sarah A.; CLARK, Jordan J.; SHARMA, Parul; SUBRAMANIAM, Krishanthi; THARMARATNAM, Kukatharmini; NEEDHAM, Edward J.; WILLIAMS, Robyn; HUANG, Yun. Pulmonary SARS-CoV-2 infection leads to para-infectious immune activation in the brain. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 15, n.p., 14 out. 2024. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2024.1440324>

EHRlich, D.; PIRCHL, M.; HUMPEL, C.. Effects of long-term moderate ethanol and cholesterol on cognition, cholinergic neurons, inflammation, and vascular impairment in rats. **Neuroscience**, [S.L.], v. 205, p. 154-166, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.054>

ELLUL, Mark A; BENJAMIN, Laura; SINGH, Bhagteshwar; LANT, Suzannah; MICHAEL, Benedict Daniel; EASTON, Ava; KNEEN, Rachel; DEFRES, Sylviane; SEJVAR, Jim; SOLOMON, Tom. **Neurological associations of COVID-19**. *The Lancet Neurology*, [S.L.], v. 19, n. 9, p. 767-783, set. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(20\)30221-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(20)30221-0).

ELROBAA, Islam H.; NEW, Karl J. COVID-19: Pulmonary and Extra Pulmonary Manifestations. *Front. Public Health Portugal*, v. 9, n.p., set 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpubh.2021.711616>

EMMI, Aron; RIZZO, Stefania; BARZON, Luisa; SANDRE, Michele; CARTURAN, Elisa; SINIGAGLIA,

Alessandro; RICCETTI, Silvia; DELLA BARBERA, Mila; BOSCOLO-BERTO, Rafael; COCCO, Patrizia. Detection of SARS-CoV-2 viral proteins and genomic sequences in human brainstem nuclei. **Npj Parkinson's Disease**, [S.L.], v. 9, n. 1, n.p., 13 fev. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41531-023-00467-3>

FERNANDEZ-LIZARBE, Sara; MONTESINOS, Jorge; GUERRI, Consuelo. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. **Journal Of Neurochemistry**, [S.L.], v. 126, n. 2, p. 261-273, 8 maio 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.12276>

FONTES-DANTAS, Fabricia L.; FERNANDES, Gabriel G.; GUTMAN, Elisa G.; LIMA, Emanuelle V. de; ANTONIO, Leticia S.; HAMMERLE, Mariana B.; MOTA-ARAUJO, Hannah P.; COLODETI, Lilian C.; ARAUJO, Suzana M.B.; FROZ, Gabrielle M.. **SARS-CoV-2 Spike protein induces TLR4-mediated long-term cognitive dysfunction recapitulating post-COVID-19 syndrome in mice**. *Cell Reports*, [S.L.], v. 42, n. 3, p. 112189, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112189>.

FU, Jiewen; WEI, Chunli; HE, Jiayue; ZHANG, Lianmei; ZHOU, Ju; BALAJI, Kyathegowdanadoddi Srinivasa; SHEN, Shiyi; PENG, Jiangzhou; SHARMA, Amrish; FU, Junjiang. Evaluation and characterization of HSPA5 (GRP78) expression profiles in normal individuals and cancer patients with COVID-19. **International Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 897-910, 2021. Ivyspring International Publisher. <http://dx.doi.org/10.7150/ijbs.54055>.

GARCES, Thiago Santos; SOUSA, George Jó Bezerra; CESTARI, Virna Ribeiro Feitosa; FLORÊNCIO, Raquel Sampaio; DAMASCENO, Lara Lúcia Ventura; PEREIRA, Maria Lúcia Duarte; MOREIRA, Thereza Maria Magalhães. Diabetes como um fator associado ao óbito hospitalar por COVID-19 no Brasil, 2020. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [S.L.], v. 31, n. 1, 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1679-49742022000100021>.

Global status report on alcohol and health and treatment of substance use disorders. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

GUO, Shenrui; WANG, Hui; YIN, Yafu. Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers In Aging Neuroscience**, [S.L.], v. 14, n.p., 16 fev. 2022. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2022.815347>

GUPTA, Tulika; KUMAR, Munish; KAUR, Ujjwal Jit; RAO, Asha; BHARTI, Ranjana. Mapping ACE2 and TMPRSS2 co-expression in human brain tissue: implications for sars-cov-2 neurological manifestations. **Journal Of Neurovirology**, [S.L.], v. 30, n. 3, p. 316-326, 10 abr. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s13365-024-01206-x>

HAN, Huan; MA, Qingfeng; LI, Cong; LIU, Rui; ZHAO, Li; WANG, Wei; ZHANG, Pingan; LIU, Xinghui; GAO, Guosheng; LIU, Fang, *et al.* **Profiling serum cytokines in COVID-19 patients reveals IL-6 and IL-10 are disease severity predictors**. *Emerging Microbes & Infections*, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1123-1130, jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2020.1770129>.

HELMY, Y. A. et al. The COVID-19 Pandemic: A Comprehensive Review of Taxonomy, Genetics, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control. *Journal of Clinical Medicine*, Basel, v. 9, n. 4, p. 1225, 2020. DOI: 10.3390/JCM9041225. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/4/1225>

HENEKA, Michael T.; GOLENBOCK, Douglas; LATZ, Eicke; MORGAN, Dave; BROWN, Robert. **Immediate and long-term consequences of COVID-19 infections for the development of neurological disease**. *Alzheimer's Research & Therapy*, [S.L.], v. 12, n. 1, 4 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13195-020-00640-3>.

HENEKA, Michael T.; KUMMER, Markus P.; LATZ, Eicke. **Innate immune activation in neurodegenerative disease**. *Nature Reviews Immunology*, [S.L.], v. 14, n. 7, p. 463-477, 25 jun. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3705>.

HENRIQUES, Joana F.; PORTUGAL, Camila C.; CANEDO, Teresa; RELVAS, João B.; SUMMAVIELLE, Teresa; SOCODATO, Renato. Microglia and alcohol meet at the crossroads: microglia as critical modulators of alcohol neurotoxicity. **Toxicology Letters**, [S.L.], v. 283, p. 21-31, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.11.002>

HOEFFEL, Guillaume; GINHOUX, Florent. **Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages**. *Cellular Immunology*, [S.L.], v. 330, p. 5-15, ago. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.001>.

HOFFMANN, Markus; KLEINE-WEBER, Hannah; SCHROEDER, Simon; KRÜGER, Nadine; HERRLER, Tanja; ERICHSEN, Sandra; SCHIERGENS, Tobias S.; HERRLER, Georg; WU, Nai-Huei; NITSCHKE, Andreas. **SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor.** *Cell*, [S.L.], v. 181, n. 2, p. 271-280, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.

HUANG, Chaolin; WANG, Yeming; LI, Xingwang; REN, Lili; ZHAO, Jianping; HU, Yi; ZHANG, Li; FAN, Guohui; XU, Jiuyang; GU, Xiaoying, *et al.* **Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China.** *The Lancet*, [S.L.], v. 395, n. 10223, p. 497-506, fev. 2020. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30183-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30183-5).

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES - ICTV. Coronaviridae. [S. l.], 2011.

JACKSON, Cody B.; FARZAN, Michael; CHEN, Bing; CHOE, Hyeryun. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 3-20, 5 out. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.

JANA, Sirsendu; HEAVEN, Michael R.; ALAYASH, Abdu I.. Cell-Free Hemoglobin Does Not Attenuate the Effects of SARS-CoV-2 Spike Protein S1 Subunit in Pulmonary Endothelial Cells. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 22, n. 16, p. 9041, 22 ago. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22169041>.

JEONG, Gi Uk; LYU, Jaemyun; KIM, Kyun-Do; CHUNG, Young Cheul; YOON, Gun Young; LEE, Sumin; HWANG, Insu; SHIN, Won-Ho; KO, Junsu; LEE, June-Yong. SARS-CoV-2 Infection of Microglia Elicits Proinflammatory Activation and Apoptotic Cell Death. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 10, n. 3, n.p., 29 jun. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.01091-22>.

JI, Kyungmin; AKGUL, Gulcan; WOLLMUTH, Lonnie P.; TSIRKA, Stella E.. **Microglia Actively Regulate the Number of Functional Synapses.** *Plos One*, [S.L.], v. 8, n. 2, 5 fev. 2013. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0056293>.

KAMAL, Haziq; TAN, Geok Chin; IBRAHIM, Siti Fatimah; SHAIKH, Mohd. Farooq; MOHAMED, Isa Naina; MOHAMED, Rashidi M. Pakri; HAMID, Adila A.; UGUSMAN, Azizah; KUMAR, Jaya. Alcohol Use Disorder, Neurodegeneration, **Alzheimer's and Parkinson's Disease: Interplay between oxidative stress, neuroimmune response and excitotoxicity.** *Frontiers In Cellular Neuroscience*, [S.L.], v. 14, 31 ago. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2020.00282>.

KAWAI, Kazushige; TSUNO, Nelson H.; MATSUHASHI, Mika; KITAYAMA, Joji; OSADA, Takuya; YAMADA, Jun; TSUCHIYA, Takeshi; YONEYAMA, Satomi; WATANABE, Toshiaki; TAKAHASHI, Koki. CD11b-mediated migratory property of peripheral blood B cells. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, [S.L.], v. 116, n. 1, p. 192-197, jul. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2005.03.021>.

KETTENMANN, Helmut; HANISCH, Uwe-Karsten; NODA, Mami; VERKHRATSKY, Alexei. **Physiology of Microglia.** *Physiological Reviews*, [S.L.], v. 91, n. 2, p. 461-553, abr. 2011. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>.

KINUTHIA, Urbanus Muthai; WOLF, Anne; LANGMANN, Thomas. Microglia and Inflammatory Responses in Diabetic Retinopathy. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 11, n.p., 6 nov. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.564077>.

KONDO, Yuji; LARABEE, Jason L.; GAO, Liang; SHI, Huiping; SHAO, Bojing; HOOVER, Christopher M.; MCDANIEL, J. Michael; HO, Yen-Chun; SILASI-MANSAT, Robert; ARCHER-HARTMANN, Stephanie A.. L-SIGN is a receptor on liver sinusoidal endothelial cells for SARS-CoV-2 virus. **Jci Insight**, [S.L.], v. 6, n. 14, n.p., 22 jul. 2021. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.148999>.

KORZHEVSKII, D. E.; KIRIK, O. V.. **Brain Microglia and Microglial Markers.** *Neuroscience And Behavioral Physiology*, [S.L.], v. 46, n. 3, p. 284-290, 25 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11055-016-0231-z>.

LASSEN, Mats Christian Højbjerg; SKAARUP, Kristoffer Grundtvig; SENGELOV, Morten; IVERSEN, Kasper; ULRIK, Charlotte Suppli; JENSEN, Jens Ulrik Stæhr; BIERING-SØRENSEN, Tor. **Alcohol Consumption and the Risk of Acute Respiratory Distress Syndrome in COVID-19.** *Annals Of The American Thoracic Society*, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 1074-1076, jun. 2021. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1513/annalsats.202008-988r1>.

LAWRIMORE, Colleen J.; CREWS, Fulton T.. Ethanol, TLR3, and TLR4 Agonists Have Unique Innate Immune Responses in Neuron-Like SH-SY5Y and Microglia-Like BV2. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, [S.L.], v. 41, n. 5, p. 939-954, 30 mar. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.13368>.

LEE, Heasuk; JEONG, Jaeyoon; SON, Eunyoung; MOSA, Ahmed; CHO, Gyeong Jae; CHOI, Wan Sung; HA, Jeoung-Hee; KIM, In Kyeom; LEE, Maan Gee; KIM, Choong-Young. Ethanol selectively modulates inflammatory activation signaling of brain microglia. **Journal Of Neuroimmunology**, [S.L.], v. 156, n. 1-2, p. 88-95, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.07.008>.

LI, Linlin; HUANG, Mingxiang; SHEN, Jianshan; WANG, Yao; WANG, Rui; YUAN, Cai; JIANG, Longguang; HUANG, Mingdong. Serum Levels of Soluble Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 in COVID-19 Patients Are Associated With Disease Severity. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 223, n. 1, p. 178-179, 14 out. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiaa642>.

LI, Xiaowei; GENG, Manman; PENG, Yizhao; MENG, Liesu; LU, Shemin. Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. **Journal Of Pharmaceutical Analysis**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 102-108, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2020.03.001>.

LIU, Hui; XIN, Junyi; CAI, Sheng; JIANG, Xia. **Mendelian randomization analysis provides causality of smoking on the expression of ACE2, a putative SARS-CoV-2 receptor**. *Elife*, [S.L.], v. 10, n. 0, n.p., 6 jul. 2021. ELife Sciences Publications, Ltd. <http://dx.doi.org/10.7554/elife.64188>.

LIU, Ningning; TAN, Jiang-Shan; LIU, Lu; WANG, Yufeng; HUA, Lu; QIAN, Qiuji. Genetic Predisposition Between COVID-19 and Four Mental Illnesses: a bidirectional, two-sample mendelian randomization study. **Frontiers In Psychiatry**, [S.L.], v. 12, n.p., 20 out. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpsy.2021.746276>.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D.. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LV, Qian-Kun; TAO, Kang-Xin; WANG, Xiao-Bo; YAO, Xiao-Yu; PANG, Meng-Zhu; LIU, Jun-Yi; WANG, Fen; LIU, Chun-Feng. Role of α -synuclein in microglia: autophagy and phagocytosis balance neuroinflammation in parkinson's disease. **Inflammation Research**, [S.L.], v. 72, n. 3, p. 443-462, 4 jan. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-022-01676-x>.

MAHASE, Elisabeth. **Covid-19: who declares pandemic because of alarming levels of spread, severity, and inaction**. *Bmj*, [S.L.], 12 mar. 2020. BMJ. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.m1036>.

MALIK, Johid Reza; ACHARYA, Arpan; AVEDISSIAN, Sean N.; BYRAREDDY, Siddappa N.; FLETCHER, Courtney V.; PODANY, Anthony T.; DYAVAR, Shetty Ravi. ACE-2, TMPRSS2, and Neuropilin-1 Receptor Expression on Human Brain Astrocytes and Pericytes and SARS-CoV-2 Infection Kinetics. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 10, p. 8622, 11 maio 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24108622>.

MALIK, Yasmin A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. The Malaysian Society of Pathologists, Kuala Lumpur, v. 42, n. 1, p. 3-11, 2020. Disponível em: <http://www.mjpath.org.my/2020/v42n1/properties-of-coronavirus.pdf>

MARSHALL, S. Alex; MCCLAIN, Justin A.; KELSO, Matthew L.; HOPKINS, Deann M.; PAULY, James R.; NIXON, Kimberly. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: the importance of microglia phenotype. **Neurobiology Of Disease**, [S.L.], v. 54, p. 239-251, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2012.12.016>.

MARSHALL, S. Alex; MCCLAIN, Justin A.; WOODEN, Jessica I.; NIXON, Kimberly. Microglia Dystrophy Following Binge-Like Alcohol Exposure in Adolescent and Adult Male Rats. **Frontiers In Neuroanatomy**, [S.L.], v. 14, n.p., 13 ago. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnana.2020.00052>.

MARSHALL, Simon; GEIL, Chelsea; NIXON, Kimberly. Prior Binge Ethanol Exposure Potentiates the Microglial Response in a Model of Alcohol-Induced Neurodegeneration. **Brain Sciences**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 16, 26 maio 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/brainsci6020016>.

MASRE, Siti Fathiah; JUFRI, Nurul Farhana; IBRAHIM, Farah Wahida; RAUB, Sayyidi Hamzi Abdul. Classical and alternative receptors for SARS-CoV-2 therapeutic strategy. **Reviews In Medical**

Virology, [S.L.], v. 31, n. 5, p. 1-9, 26 dez. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/rmv.2207>.

MATSCHKE, Jakob; LÜTGEHETMANN, Marc; HAGEL, Christian; SPERHAK, Jan P.; SCHRÖDER, Ann Sophie; EDLER, Carolin; MUSHUMBA, Herbert; FITZEK, Antonia; ALLWEISS, Lena; DANDRI, Maura; DOTTERMUSCH, Matthias; HEINEMANN, Axel; PFEFFERLE, Susanne; SCHWABENLAND, Marius; MAGRUDER, Daniel Sumner; BONN, Stefan; PRINZ, Marco; GERLOFF, Christian; PÜSCHEL, Klaus; KRASEMANN, Susanne; AEPFELBACHER, Martin; GLATZEL, Markus. Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. **The Lancet Neurology**, [S.L.], v. 19, p. 919-929, nov 2020. Elsevier BV. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30308-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30308-2)

MAUL, Bjoern; SIEMS, Wolf-Eberhard; HOEHE, Margret R.; GRECKSCH, Gisela; BADER, Michael; WALTHER, Thomas. **Alcohol consumption is controlled by angiotensin II**. *The FASEB Journal*, [S.L.], v. 15, n. 9, p. 1640-1642, 29 maio 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.00-0797fje>

MAYI, Bindu S.; LEIBOWITZ, Jillian A.; WOODS, Arden T.; AMMON, Katherine A.; LIU, Alphonse E.; RAJA, Aarti. The role of Neuropilin-1 in COVID-19. **Plos Pathogens**, [S.L.], v. 17, n. 1, n.p., 4 jan. 2021. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009153>.

MCCLAIN, Justin A.; MORRIS, Stephanie A.; DEENY, M. Ayumi; MARSHALL, S. Alex; HAYES, Dayna M.; KISER, Zachary M.; NIXON, Kimberly. Adolescent binge alcohol exposure induces long-lasting partial activation of microglia. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 25, p. 120-128, jun. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2011.01.006>.

MCCLELLAND, Andrew C.; BENITEZ, Steven J.; BURNS, Judah. **COVID-19 Neuroimaging Update: pathophysiology, acute findings, and post-acute developments**. *Seminars In Ultrasound, Ct And Mri*, [S.L.], v. 45, n. 4, p. 318-331, ago. 2024. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/j.sult.2024.03.003>.

MCGETTRICK, Anne F.; O'NEILL, Luke A. J.. **Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis**. *British Journal of Haematology*, [S.L.], v. 139, n. 2, p. 185-193, 25 set. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06802.x>.

MCQUAID, Conor; BRADY, Molly; DEANE, Rashid. **SARS-CoV-2: is there neuroinvasion?**. *Fluids and Barriers of the CNS*, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 2-21, 14 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12987-021-00267-y>.

MELBOURNE, Jennifer K.; WOODEN, Jessica I.; CARLSON, Erika R.; SHAJI, Chinchusha Anasooya; NIXON, Kimberly. Neuroimmune Activation and Microglia Reactivity in Female Rats Following Alcohol Dependence. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 25, n. 3, p. 1603, 28 jan. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25031603>

MERZON, Eugene; WEISS, Margaret D.; CORTESE, Samuele; ROTEM, Ann; SCHNEIDER, Tzipporah; CRAIG, Stephanie G.; VINKER, Shlomo; COHEN, Avivit Golan; GREEN, Ilan; ASHKENAZI, Shai. The Association between ADHD and the Severity of COVID-19 Infection. **Journal Of Attention Disorders**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 491-501, 2 abr. 2021. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/10870547211003659>.

MICHALAK, Agata; LACH, Tomasz; SZCZYGIEŁ, Karolina; CICHOSZ-LACH, Halina. COVID-19, Possible Hepatic Pathways and Alcohol Abuse—What Do We Know up to 2023? **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 2212, 12 fev. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25042212>

MICHALAKIS, Konstantinos; ILIAS, Ioannis. SARS-CoV-2 infection and obesity: common inflammatory and metabolic aspects. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 469-471, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2020.04.033>.

MONIF, Mastura; REID, Christopher A.; POWELL, Kim L.; DRUMMOND, Katherine J.; O'BRIEN, Terrence J.; WILLIAMS, David A.. Interleukin-1 β has trophic effects in microglia and its release is mediated by P2X7R pore. **Journal Of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 13, n. 1, n.p., 30 jun. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0621-8>

MOROJELE, Neo K.; SHENOI, Sheela V.; SHUPER, Paul A.; BRAITHWAITE, Ronald Scott; REHM, Jürgen. Alcohol Use and the Risk of Communicable Diseases. **Nutrients**, [S.L.], v. 13, n. 10, p. 3317, 23 set. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu13103317>.

MOTTA, Caroline Soares; TORICES, Silvia; ROSA, Barbara Gomes da; MARCOS, Anne Caroline;

ALVAREZ-ROSA, Liandra; SIQUEIRA, Michele; MORENO-RODRIGUEZ, Thaidy; MATOS, Aline da Rocha; CAETANO, Bráulio Costa; MARTINS, Jessica Santa Cruz de Carvalho. Human Brain Microvascular Endothelial Cells Exposure to SARS-CoV-2 Leads to Inflammatory Activation through NF- κ B Non-Canonical Pathway and Mitochondrial Remodeling. **Viruses**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 745, 14 mar. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v15030745>

NÄGELE, Matthias P.; HAUBNER, Bernhard; TANNER, Felix C.; RUSCHITZKA, Frank; FLAMMER, Andreas J.. Endothelial dysfunction in COVID-19: current findings and therapeutic implications. **Atherosclerosis**, [S.L.], v. 314, p. 58-62, dez. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2020.10.014>

NAYAK, Debasis; ROTH, Theodore L.; MCGAVERN, Dorian B.. **Microglia Development and Function**. *Annual Review Of Immunology*, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 367-402, 21 mar. 2014. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>.

NAYAK, Debasis; ZINSELMAYER, Bernd H.; CORPS, Kara N.; MCGAVERN, Dorian B.. **In vivo dynamics of innate immune sentinels in the CNS**. *Intravital*, [S.L.], v. 1, n. 2, p. 95-106, out. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/intv.22823>.

NERSESJAN, Vardan; CHRISTENSEN, Rune H B; ANDERSEN, Elisabeth Wreford; KONDZIELLA, Daniel; BENROS, Michael e. Antipsychotic exposure and infection risk in people with schizophrenia spectrum disorders during the COVID-19 pandemic: a danish nationwide registry study. **The Lancet Psychiatry**, [S.L.], v. 11, n. 10, p. 796-806, out. 2024. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366\(24\)00223-2](http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366(24)00223-2).

NI, Ling; YE, Fang; CHENG, Meng-Li; FENG, Yu; DENG, Yong-Qiang; ZHAO, Hui; WEI, Peng; GE, Jiwan; GOU, Mengting; LI, Xiaoli, *et al.* **Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals**. *Immunity*, [S.L.], v. 52, n. 6, p. 971-977, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.023>.

NIXON, K.; KIM, D.H.; POTTS, E.N.; HE, J.; CREWS, F.T.. Distinct cell proliferation events during abstinence after alcohol dependence: microglia proliferation precedes neurogenesis. **Neurobiology Of Disease**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 218-229, ago. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.04.009>.

NUZZO, Domenico; VASTO, Sonya; SCALISI, Luca; COTTONE, Salvatore; CAMBULA, Gaetano; RIZZO, Manfredi; GIACOMAZZA, Daniela; PICONE, Pasquale. Post-Acute COVID-19 Neurological Syndrome: a new medical challenge. **Journal Of Clinical Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 1947, 1 maio 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jcm10091947>.

OHSAWA, Keiko; IMAI, Yoshinori; SASAKI, Yo; KOHSAKA, Shinichi. **Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity**. *Journal of Neurochemistry*, [S.L.], v. 88, n. 4, p. 844-856, 14 jan. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>

OKUNO, F.; ARAI, M.; ISHII, H.; SHIGETA, Y.; EBIHARA, Y.; TAKAGI, S.; TSUCHIYA, M.. **Mild but prolonged elevation of serum angiotensin converting enzyme (ACE) activity in alcoholics**. *Alcohol*, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 357-359, nov. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0741-8329\(86\)90053-4](http://dx.doi.org/10.1016/0741-8329(86)90053-4).

OLAH, M.; BIBER, K.; VINET, J.; BODDEKE, H. W.G.M.. Microglia Phenotype Diversity. **Cns & Neurological Disorders - Drug Targets**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 108-118, 1 fev. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/187152711794488575>

OLIVEIRA, Kellysson Bruno; SOUZA, Fernanda Maria Araujo de; SÁ, Letícia Barros Maurício de; PACHECO, Amanda Larissa Dias; PRADO, Mariana Reis; RODRIGUES, Célio Fernando de Sousa; BASSI, Ênio José; SANTANA-MELO, Igor; SILVA-JÂNIO, Abelardo; SABINO-SILVA, Robinson. Potential Mechanisms Underlying COVID-19-Mediated Central and Peripheral Demyelination: roles of the raas and adam-17. **Molecular Neurobiology**, [S.L.], v. 62, n. 1, p. 1151-1164, 4 jul. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-024-04329-8>.

Organização Mundial da Saúde (OMS). *WHO COVID-19 dashboard*. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/>. Acesso em: 20 ago. 2024.

PACNEJER, Aliteia-Maria; BUTUCA, Anca; DOBREA, Carmen Maximiliana; ARSENIU, Anca Maria; FRUM, Adina; GLIGOR, Felicia Gabriela; ARSENIU, Rares; VONICA, Razvan Constantin; VONICA-TINCUI, Andreea Loredana; OANCEA, Cristian. Neuropsychiatric Burden of SARS-CoV-2: a review of

its physiopathology, underlying mechanisms, and management strategies. **Viruses**, [S.L.], v. 16, n. 12, p. 1811, 21 nov. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v16121811>.

PATANI, Rickie; HARDINGHAM, Giles E.; LIDDELOW, Shane A.. **Functional roles of reactive astrocytes in neuroinflammation and neurodegeneration**. *Nature Reviews Neurology*, [S.L.], v. 19, n. 7, p. 395-409, 12 jun. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-023-00822-1>.

PENG, Hui; NIXON, Kimberly. Microglia Phenotypes Following the Induction of Alcohol Dependence in Adolescent Rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 105-116, jan. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/acer.14504>

PETAGINE, Lucy; ZARIWALA, Mohammed G.; SOMAVARAPU, Satyanarayana; CHAN, Stefanie Ho Yi; KAYA, Evrim A.; PATEL, Vinood B.. Oxidative stress in a cellular model of alcohol-related liver disease: protection using curcumin nanoformulations. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 15, n. 1, n.p., 5 mar. 2025. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-025-91139-0>.

PLEMEL, Jason R.; MICHAELS, Nathan J.; WEISHAUP, Nina; CAPRARIELLO, Andrew V.; KEOUGH, Michael B.; ROGERS, James A.; YUKSELOGLU, Aran; LIM, Jaehyun; PATEL, Vikas V.; RAWJI, Khalil S., et al. **Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced demyelination: a primary lipid disrupting myelinopathy**. *Glia*, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 327-347, 25 out. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.23245>.

POSADAS-SÁNCHEZ, Rosalinda; SÁNCHEZ-MUÑOZ, Fausto; GUZMÁN-MARTÍN, Carlos Alfonso; COUDER, Adrian Hernández-Díaz; ROJAS-VELASCO, Gustavo; FRAGOSO, José Manuel; VARGAS-ALARCÓN, Gilberto. Dipeptidylpeptidase-4 levels and DPP4 gene polymorphisms in patients with COVID-19. Association with disease and with severity. **Life Sciences**, [S.L.], v. 276, p. 119410, jul. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119410>.

PRINZ, Marco; JUNG, Steffen; PRILLER, Josef. Microglia Biology: one century of evolving concepts. **Cell**, [S.L.], v. 179, n. 2, p. 292-311, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.053>.

PRUETT, Stephen B.; SCHWAB, Carlton; ZHENG, Qiang; FAN, Ruping. Suppression of Innate Immunity by Acute Ethanol Administration: a global perspective and a new mechanism beginning with inhibition of signaling through tlr3. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 173, n. 4, p. 2715-2724, 15 ago. 2004b. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.173.4.2715>.

PRUETT, Stephen B.; ZHENG, Qiang; FAN, Ruping; MATTHEWS, Kametra; SCHWAB, Carlton. Acute exposure to ethanol affects Toll-like receptor signaling and subsequent responses: an overview of recent studies. **Alcohol**, [S.L.], v. 33, n. 3, p. 235-239, jul. 2004a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.08.003>.

PRUETT, Stephen B; FAN, Ruping; ZHENG, Qiang. Acute ethanol administration profoundly alters poly I: c-induced cytokine expression in mice by a mechanism that is not dependent on corticosterone. **Life Sciences**, [S.L.], v. 72, n. 16, p. 1825-1839, mar. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205\(02\)02507-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0024-3205(02)02507-9).

QIN, Liya; CREWS, Fulton T. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. **Journal Of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 9, n. 1, n.p., 18 jun. 2012b. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-9-130>.

QIN, Liya; CREWS, Fulton T. NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration. **Journal Of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 9, n. 1, n.p., 12 jan. 2012a. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-9-5>.

RADZIKOWSKA, Urszula; DING, Mei; TAN, Ge; ZHAKPAROV, Damir; PENG, Yaqi; WAWRZYNIAK, Paulina; WANG, Ming; LI, Shuo; MORITA, Hideaki; ALTUNBULAKLI, Can. Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors. **Allergy**, [S.L.], v. 75, n. 11, p. 2829-2845, 24 ago. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/all.14429>.

RIBEIRO, Ana Cristina; UEHARA, Sílvia Carla da Silva André. Hipertensão arterial sistêmica como fator de risco para a forma grave da covid-19: revisão de escopo. **Revista de Saúde Pública**, [S.L.], v. 56, p. 20, 8 abr. 2022. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA). <http://dx.doi.org/10.11606/s1518-8787.2022056004311>.

RODRÍGUEZ, Carolina Varela; HORCAJADAS, Francisco Arias; ARROBA, Cristina Martín-Arriscado; RIPOLL, Carolina Combarro; GONZALEZ, Alba Juanes; PAJARES, Marina Esperesate; HOLGADO, Irene Rodrigo; MANCENÍDO, Álvaro Cadenas; RODRÍGUEZ, Laura Sánchez; PENALVA, Blanca Baselga. **COVID-19-Related Neuropsychiatric Symptoms in Patients With Alcohol Abuse Conditions During the SARS-CoV-2 Pandemic: a retrospective cohort study using real world data from electronic health records of a tertiary hospital.** *Frontiers in Neurology*, [S.L.], v. 12, n.p., 3 mar. 2021. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2021.630566>

RUSANEN, Peter; MARTTILA, Emilia; AMATYA, Sajeen Bahadur; HAGSTRÖM, Jaana; UTTAMO, Johanna; REUNANEN, Justus; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; SALO, Tuula. Expression of Toll-like receptors in oral squamous cell carcinoma. **Plos One**, [S.L.], v. 19, n. 4, n.p, 9 abr. 2024. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0300437>.

SAIJO, Kaoru; GLASS, Christopher K.. **Microglial cell origin and phenotypes in health and disease.** *Nature Reviews Immunology*, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 775-787, 25 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3086>.

SALAH, Husam M.; MEHTA, Jawahar L.. Heparan sulfate consumption as a potential mechanism of intra-cardiac thrombosis in SARS-CoV-2 infection. **Heart & Lung**, [S.L.], v. 50, n. 2, p. 242-243, mar. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.hrtlng.2020.12.008>.

SALAMANCA, Luis; MECHAWAR, Naguib; MURAI, Keith K.; BALLING, Rudi; BOUVIER, David S.; SKUPIN, Alexander. **MIC-MAC: an automated pipeline for high :throughput characterization and classification of three :dimensional microglia morphologies in mouse and human postmortem brain samples.** *Glia*, [S.L.], v. 67, n. 8, p. 1496-1509, 14 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/glia.23623>.

SALAMANNA, Francesca; MAGLIO, Melania; LANDINI, Maria Paola; FINI, Milena. Body Localization of ACE-2: on the trail of the keyhole of sars-cov-2. **Frontiers In Medicine**, [S.L.], v. 7, n. 59, n. p. 3 dez. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmed.2020.594495>.

SAMUDYATA; OLIVEIRA, Ana O.; MALWADE, Susmita; SOUSA, Nuno Rufino de; GOPARAJU, Sravan K.; GRACIAS, Jessica; ORHAN, Funda; STEPONAVICIUTE, Laura; SCHALLING, Martin; SHERIDAN, Steven D.. SARS-CoV-2 promotes microglial synapse elimination in human brain organoids. **Molecular Psychiatry**, [S.L.], v. 27, n. 10, p. 3939-3950, out. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41380-022-01786-2>

SAVAGE, Julie C.; CARRIER, Micaël; TREMBLAY, Marie-Ève. Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 13-26, 2019. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-9658-2_2.

SAVLA, Shreya R.; PRABHAVALKAR, Kedar S.; BHATT, Lokesh K.. Cytokine storm associated coagulation complications in COVID-19 patients: pathogenesis and management. **Expert Review Of Anti-Infective Therapy**, [S.L.], v. 19, n. 11, p. 1397-1413, 19 abr. 2021. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2021.1915129>.

SCHAFER, Dorothy P.; LEHRMAN, Emily K.; KAUTZMAN, Amanda G.; KOYAMA, Ryuta; MARDINLY, Alan R.; YAMASAKI, Ryo; RANSOHOFF, Richard M.; GREENBERG, Michael E.; BARRES, Ben A.; STEVENS, Beth. Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. **Neuron**, [S.L.], v. 74, n. 4, p. 691-705, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>.

SHEN, Shu; ZHANG, Jingyuan; FANG, Yaohui; LU, Sihong; WU, Jun; ZHENG, Xin; DENG, Fei. SARS-CoV-2 interacts with platelets and megakaryocytes via ACE2-independent mechanism. **Journal Of Hematology & Oncology**, [S.L.], v. 14, n. 1, n.p, 29 abr. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13045-021-01082-6>.

SHIGEMOTO-MOGAMI, Yukari; HOSHIKAWA, Kazue; GOLDMAN, James E.; SEKINO, Yuko; SATO, Kaoru. **Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone.** *The Journal of Neuroscience*, [S.L.], v. 34, n. 6, p. 2231-2243, 5 fev. 2014. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.1619-13.2014>.

SIEMSEN, Benjamin M.; LANDIN, Justine D.; McFaddin, Jon A.; Hooker, Kaylee N.; Chandler, Lawrence J.; Scofield, Michael D. Chronic intermittent ethanol and lipopolysaccharide exposure differentially alter Iba1-derived microglia morphology in the prelimbic cortex and nucleus accumbens core of male Long-Evans rats. **Journal of Neuroscience Research**. Estados Unidos da América, v.

8, n. 99, p. 1922-1939, 3 Jul 2020. <https://doi.org/10.1002/jnr.24683>

Silva GM, Pesce GB, Martins DC, Carreira L, Fernandes CA, Jacques AE. Obesidade como fator agravante da COVID-19 em adultos hospitalizados: revisão integrativa. *Acta Paul Enferm.* 2021;34:eAPE02321. <http://dx.doi.org/10.37689/acta-ape/2021AR02321>

SIMOU, Evangelia; LEONARDI-BEE, Jo; BRITTON, John. **The Effect of Alcohol Consumption on the Risk of ARDS.** *Chest*, [S.L.], v. 154, n. 1, p. 58-68, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2017.11.041>.

SIQUEIRA, Michele; ARAUJO, Ana Paula Bérqamo; GOMES, Flávia Carvalho Alcantara; STIPURSKY, Joice. **Ethanol Gestational Exposure Impairs Vascular Development and Endothelial Potential to Control BBB-Associated Astrocyte Function in the Developing Cerebral Cortex.** *Molecular Neurobiology*, [S.L.], v. 58, n. 4, p. 1755-1768, 2 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-020-02214-8>.

SIQUEIRA, Michele; STIPURSKY, Joice. **Blood brain barrier as an interface for alcohol induced neurotoxicity during development.** *Neurotoxicology*, [S.L.], v. 90, p. 145-157, maio 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2022.03.009>.

SMITH, Joshua A.; DAS, Arabinda; RAY, Swapan K.; BANIK, Naren L.. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. **Brain Research Bulletin**, [S.L.], v. 87, n. 1, p. 10-20, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.004>

SOTEROS, Breanne M.; SIA, Gek Ming. **Complement and microglia dependent synapse elimination in brain development.** *Wires Mechanisms of Disease*, [S.L.], v. 14, n. 3, p. 1-1, 4 nov. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wsbm.1545>.

STANCU, Ilie-Cosmin; CREMERS, Niels; VANRUSSELT, Hannah; COUTURIER, Julien; VANOOSTHUYSE, Alexandre; KESSELS, Sofie; LODDER, Chritica; BRÔNE, Bert; HUAUX, François; OCTAVE, Jean-Noël. **Aggregated Tau activates NLRP3-ASC inflammasome exacerbating exogenously seeded and non-exogenously seeded Tau pathology in vivo.** *Acta Neuropathologica*, [S.L.], v. 137, n. 4, p. 599-617, 5 fev. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-018-01957-y>.

SU, Hua; WAN, Cheng; WANG, Zhen-Di; GAO, Yong; LI, Yun-Cheng; TANG, Fang; ZHU, Hong-Yan; YI, Li-Xia; ZHANG, Chun. Expression of CD147 and Cyclophilin A in Kidneys of Patients with COVID-19. **Clinical Journal Of The American Society Of Nephrology**, [S.L.], v. 16, n. 4, p. 618-619, abr. 2021. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.2215/cjn.09440620>.

SUN, Emily; MOTOLANI, Aishat; CAMPOS, Leonardo; LU, Tao. **The Pivotal Role of NF- κ B in the Pathogenesis and Therapeutics of Alzheimer's Disease.** *International Journal Of Molecular Sciences*, [S.L.], v. 23, n. 16, p. 8972, 11 ago. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23168972>.

TAKAHASHI, Kazuya; ROCHFORD, Christian D.P.; NEUMANN, Harald. **Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2.** *The Journal of Experimental Medicine*, [S.L.], v. 201, n. 4, p. 647-657, 21 fev. 2005. Rockefeller University Press. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20041611>.

TAN, Jun; TOWN, Terrence; MORI, Takashi; WU, Yajuan; SAXE, Michael; CRAWFORD, Fiona; MULLAN, Mike. CD45 Opposes β -Amyloid Peptide-Induced Microglial Activation via Inhibition of p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase. **The Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 20, n. 20, p. 7587-7594, 15 out. 2000. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.20-20-07587.2000>.

TAQUET, Maxime; GEDDES, John R; HUSAIN, Masud; LUCIANO, Sierra; HARRISON, Paul J. 6-month neurological and psychiatric outcomes in 236 379 survivors of COVID-19: a retrospective cohort study using electronic health records. **The Lancet Psychiatry**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 416-427, maio 2021. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366\(21\)00084-5](http://dx.doi.org/10.1016/s2215-0366(21)00084-5).

TAY, Tuan Leng; MAI, Dominic; DAUTZENBERG, Jana; FERNÁNDEZ-KLETT, Francisco; LIN, Gen; SAGAR; DATTA, Moumita; DROUGARD, Anne; STEMPEL, Thomas; ARDURA-FABREGAT, Alberto. **A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia.** *Nature Neuroscience*, [S.L.], v. 20, n. 6, p. 793-803, 17 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4547>.

TESTINO, Gianni; PELLICANO, Rinaldo. **Alcohol consumption in the COVID-19 era.** *Minerva*

Gastroenterologica e Dietologica, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 90-92, jun. 2020. Edizioni Minerva Medica. <http://dx.doi.org/10.23736/s1121-421x.20.02698-7>.

TESTINO, Gianni; VIGNOLI, Teo; PATUSSI, Valentino; ALLOSIO, Pierluigi; AMENDOLA, Maria Francesca; ARICÒ, Sarino; BASELICE, Aniello; BALBINOT, Patrizia; CAMPANILE, Vito; FANUCCHI, Tiziana. Alcohol use disorder in the COVID-19 era: position paper of the Italian Society on Alcohol (SIA). **Addiction Biology**, [S.L.], v. 27, n. 1, n.p., 16 set. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/adb.13090>.

TREMBLAY, Marie-Ève; LECOURS, Cynthia; SAMSON, Louis; SÁNCHEZ-ZAFRA, Víctor; SIERRA, Amanda. **From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia**. *Frontiers In Neuroanatomy*, [S.L.], v. 9, n. 45, p. 1-0, 14 abr. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fnana.2015.00045>.

UENO, Masaki; FUJITA, Yuki; TANAKA, Tatsuhide; NAKAMURA, Yuka; KIKUTA, Junichi; ISHII, Masaru; YAMASHITA, Toshihide. **Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development**. *Nature Neuroscience*, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 543-551, 24 mar. 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3358>.

UZUNIAN, Armênio. Coronavirus SARS-CoV-2 and Covid-19. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.L.], n. 56, p. 1-4, 2020. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1676-2444.20200053>.

VAN KERKHOVE, Maria D.; VANDEMAELE, Katelijn A. H.; SHINDE, Vivek; JARAMILLO-GUTIERREZ, Giovanna; KOUKOUNARI, Artemis; DONNELLY, Christl A.; CARLINO, Luis O.; OWEN, Rhonda; PATERSON, Beverly; PELLETIER, Louise. Risk Factors for Severe Outcomes following 2009 Influenza A (H1N1) Infection: a global pooled analysis. **Plos Medicine**, [S.L.], v. 8, n. 7, n.p. 5 jul. 2011. Public Library of Science (PLOS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.1001053>.

VANKADARI, Naveen; WILCE, Jacqueline A.. Emerging COVID-19 coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 601-604, jan. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/22221751.2020.1739565>.

VARGAS, Gabriele; GERALDO, Luiz Henrique Medeiros; SALOMÃO, Natália Gedeão; PAES, Marciano Viana; LIMA, Flavia Regina Souza; GOMES, Flávia Carvalho Alcantara. **Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and glial cells: insights and perspectives**. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, [S.L.], v. 7, p. 100127, ago. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbih.2020.100127>.

VASUDEVA, Abhimanyu; PATEL, Tejas K. **Alcohol consumption: an important epidemiological factor in covid-19?**. *Journal of Global Health*, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 1-1, 8 set. 2020. International Global Health Society. <http://dx.doi.org/10.7189/jogh.10.020335>.

VOET, Sofie; SRINIVASAN, Sahana; LAMKANFI, Mohamed; VAN LOO, Geert. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. **Embo Molecular Medicine**, [S.L.], v. 11, n. 6, n.p., 23 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.15252/emmm.201810248>.

WANG, Luchen; SONG, Lingmin; MA, Juan; WANG, Huimei; LI, Yingzhi; HUANG, Danfei. Alcohol induces apoptosis and autophagy in microglia BV-2 cells. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 177, p. 113849, jul. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2023.113849>.

WANG, Shuai; QIU, Zongyang; HOU, Yingnan; DENG, Xiya; XU, Wei; ZHENG, Tingting; WU, Peihan; XIE, Shaofang; BIAN, Weixiang; ZHANG, Chong. ACE2 is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. **Cell Research**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 126-140, 8 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-020-00460-y>.

WARDEN, Anna S.; TRIPLETT, Todd A.; LYU, Aram; GRANTHAM, Emily K.; AZZAM, Moatasem M.; DACOSTA, Adriana; MASON, Sonia; BLEDNOV, Yuri A.; EHRLICH, Lauren I.R.; MAYFIELD, R. Dayne. Microglia depletion and alcohol: transcriptome and behavioral profiles. **Addiction Biology**, [S.L.], v. 26, n. 2, n. p., 16 mar. 2020. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/adb.12889>.

WU, Meng-Li; XIE, Chengzuo; LI, Xin; SUN, Jing; ZHAO, Jincun; WANG, Jian-Hua. Mast cell activation triggered by SARS-CoV-2 causes inflammation in brain microvascular endothelial cells and

microglia. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 14, p. 00, 4 abr. 2024. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2024.1358873>

XIA, Shuai; ZHU, Yun; LIU, Meiqin; LAN, Qiaoshuai; XU, Wei; WU, Yanling; YING, Tianlei; LIU, Shuwen; SHI, Zhengli; JIANG, Shibo. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. **Cellular & Molecular Immunology**, [S.L.], v. 17, n. 7, p. 765-767, 11 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0374-2>

XIE, Na-Na; ZHANG, Wen-Cong; CHEN, Jia; TIAN, Fang-Bing; SONG, Jian-Xin. Clinical Characteristics, Diagnosis, and Therapeutics of COVID-19: a review. **Current Medical Science**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 1066-1074, 14 out. 2023. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11596-023-2797-3>.

YUGAR-TOLEDO, Juan Carlos; YUGAR, Lara Buonalumi TÁCITO; TÁCITO, Lúcia Helena Bonalume; VILELA-MARTIN, José Fernando. Disfunção Endotelial e Hipertensão Arterial. **Rev Bras Hipertens**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 84-92, 2015. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-881232>

ZHAI, Merry; BONO, Kristy; ZHANG, Wei Wei; BONNE, Stephanie; GORDON, Emily; ZERBO, Erin; QUIJOTE, Harrison; GLASS, Nina. Drug and Alcohol Use in Trauma Patients Before and During the COVID-19 Pandemic. **Journal Of Surgical Research**, [S.L.], v. 283, p. 999-1004, mar. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2022.11.059>

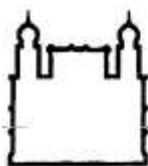
ZHANG, Bin; GAITERI, Chris; BODEA, Liviu-Gabriel; WANG, Zhi; MCELWEE, Joshua; PODTELEZHNIKOV, Alexei A.; ZHANG, Chunsheng; XIE, Tao; TRAN, Linh; DOBRIN, Radu. Integrated Systems Approach Identifies Genetic Nodes and Networks in Late-Onset Alzheimer's Disease. **Cell**, [S.L.], v. 153, n. 3, p. 707-720, abr. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.030>.

ZHANG, Yan; PARK, Yong Soo; KIM, In-Beom. A Distinct Microglial Cell Population Expressing Both CD86 and CD206 Constitutes a Dominant Type and Executes Phagocytosis in Two Mouse Models of Retinal Degeneration. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 24, n. 18, p. 14236, 18 set. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms241814236>

ZHAO, Ya-Nan; WANG, Fang; FAN, Yan-Xia; PING, Guan-Fang; YANG, Jing-Yu; WU, Chun-Fu. Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 236, p. 270-282, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.08.052>.

ZHOU, Miou; CORNELL, Jessica; SALINAS, Shelbi; HUANG, Hou-Yuan. Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory. **Neural Regeneration Research**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 705, 2022. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.322423>

ANEXO



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC



LICENÇA

L-021/2021

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-002/2021), intitulado, " Estudos celulares e moleculares da interação de SARS-CoV-2 e da proteína Spike1 com células de camundongo expressando a proteína ACE2 humana", sob a responsabilidade de DANIEL PEDRA ADESSE atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/05/2023 e inclui o uso total de:

- Camundongo, (*Mus musculus*), origem ICTB, conforme especificado abaixo:
 - B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Pr1mn/J – 27 machos de 8 a 10 semanas
 - B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Pr1mn/J -108 fêmeas de 8 a 10 semanas
- - C57BL/6J - 27 machos de 8 a 10 semanas
 - C57BL/6J - 108 fêmeas de 8 a 10 semanas

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 23 de novembro de 2021.

Tânia Zaverucha do Valle
Matrícula SIAPE 1362665
Coordenadora da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz