

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

HUNTER VILLELA AUGUSTO

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS ANTIVIRAIS DO CANABIDIOL NA
INFECCÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

ALFENAS/MG

2024

HUNTER VILLELA AUGUSTO

**INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS ANTIVIRAIS DO CANABIDIOL NA
INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Protásio Veras

Coorientador: Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Augusto, Hunter Villela.

Investigação dos Efeitos Antivirais do Canabidiol na Infecção pelo Vírus Chikungunya / Hunter Villela Augusto. - Alfenas, MG, 2024.

62 f. -

Orientador(a): Flavio Protasio Veras.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Chikungunya. 2. Vírus. 3. Interferon. 4. Canabidiol. 5. Vírus Emergentes.
I. Veras, Flavio Protasio, orient. II. Título.

HUNTER VILLELA AUGUSTO

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS ANTIVIRAIS DO CANABIDIOL NA INFECÇÃO PELO VÍRUS CHIKUNGUNYA

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas

Aprovada em: 16 de dezembro de 2024.

Prof. Dr. Flavio Protasio Veras

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Marisa Ionta

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG

Prof. Dr. Anderson Geremias Macedo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Flavio Protasio Veras, Professor do Magistério Superior**, em 16/12/2024, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1405901** e o código CRC **B61EADC5**.

Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais, à minha irmã e a todos aqueles que me ajudaram para que eu pudesse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao final deste período tão enriquecedor e importante em minha vida, agradeço aos Céus por guiarem meus passos neste caminho, concedendo-me sabedoria e resiliência, necessárias para atingir meus objetivos e por manterem acesa em meu coração a chama da minha sede de conhecimento.

Aos meus pais, Regiani e Dario, pelo apoio incondicional em minhas escolhas, por terem me mostrado como este mundo é interessante, como a vida está cheia de coisas novas para serem descobertas a todo instante e pelo estímulo nos estudos desde a minha mais tenra idade. À minha irmã, Kaiane, pelo carinho, doçura e companheirismo. À minha avó, Zilda, pelo apoio e pelos conselhos.

À Universidade Federal de Alfenas, ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas (PPGMCF) e ao Laboratório de Neuroimunobiologia da Dor (LABNID) por oferecer a oportunidade e a infraestrutura necessária para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flavio Protasio Veras, pela orientação, aprendizado, paciência e confiança depositada em mim, além dos conselhos que contribuíram para a minha formação, tanto como pesquisador, quanto como ser humano.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza, pelo apoio e por ceder o espaço de seu laboratório para que eu pudesse realizar minha pesquisa.

Ao grupo de pesquisa de Imunofarmacologia da Resposta Viral, em especial Camila e Julia, por participarem de forma ativa em meus experimentos, pelas reuniões, pelas risadas e pela amizade.

Aos colegas do LABNID, João, Lívia e Rafaela, por toda ajuda, pela amizade e companheirismo diários.

Aos animais utilizados, por doarem suas vidas para que eu pudesse realizar meus experimentos.

Oportunamente, também agradeço a mim mesmo, pois se eu não tivesse persistido e sido leal aos meus princípios, não teria chegado até aqui.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Não sei o que posso parecer para o mundo; mas para mim mesmo pareço ter sido apenas como um menino brincando na praia, e me divertindo em encontrar de vez em quando uma pedra mais lisa ou uma concha mais bonita do que o normal, enquanto o grande oceano da verdade jazia totalmente desconhecido diante de mim.”

Isaac Newton

(Em Brewster, *Memoirs of the Life, Writings and Discoveries of Sir Isaac Newton* (1855), Vol. II, Cap. 27)

RESUMO

A infecção causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), representa uma ameaça emergente e seus insetos vetores, *Aedes aegypti* e *albopictus*, estão bem estabelecidos em várias regiões do planeta, desse modo, epidemias da doença são registradas globalmente. Os sintomas típicos causados pela infecção por CHIKV incluem febre, cefaleia, edema nas articulações e prurido, enquanto na fase crônica, o principal sintoma é a artralgia. Até o momento presente, não existem terapias vacinais para infecção por CHIKV, e os tratamentos se concentram unicamente em medidas paliativas. Portanto, a busca por terapias eficazes é crucial para mitigar a propagação do CHIKV e minimizar os seus impactos na saúde pública. Nesse sentido, o canabidiol (CBD), um dos compostos ativos presentes na *Cannabis sativa*, tem sido amplamente estudado por seu potencial terapêutico em inflamação e em infecções virais. Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo investigar e compreender os mecanismos antivirais associados ao CBD na infecção pelo CHIKV. Para tanto, cultura *in vitro* da linhagem celular Vero foi estabelecida e, posteriormente, foi induzida a infecção por CHIKV utilizando-se de um sistema de vírus *reporter* que incorpora a proteína fluorescente mCherry no genoma viral (CHIKV-mCherry). Por meio de fluorimetria e microscopia confocal, a expressão de mCherry foi monitorada nas células infectadas. Ainda, a toxicidade do CBD nas células Vero foi avaliada pelo ensaio colorimétrico WST-8, utilizando quatro diferentes concentrações (1, 3, 10 e 30 μM). A concentração de 3 μM de CBD foi utilizada nos experimentos subsequentes. Com o objetivo de avaliar a eficácia antiviral do CBD, seguiu-se então o tratamento das células Vero com CBD e CHIKV, através de quatro grupos experimentais: I. Mock (Não Infectado), II. CHIKV (Vírus), III. CBD + CHIKV (pré-tratamento, feito nos períodos de 24, 12, 8, 6 e 2 horas antes da infecção) e IV. CHIKV + CBD (pós-tratamento, realizado 2 horas após a infecção). Passadas 24 horas após a infecção, a eficácia destes tratamentos foi avaliada. Foi observada uma redução da carga viral e da replicação nas células tratadas com CBD após a infecção com CHIKV, conotado pela menor expressão de mCherry na análise de microscopia confocal. Também houve uma redução dos efeitos citopáticos (conjunto de alterações provocadas pelo vírus nas células infectadas) no grupo tratado com CBD após a infecção, além de uma modulação muito pequena da infecção viral nos grupos pré-infectados. Os resultados apontam a eficácia do CBD na redução da infecção por CHIKV, provavelmente devido às suas propriedades imunomoduladoras. Isto faz do CBD um potencial candidato a ser utilizado no tratamento de infecções por CHIKV.

Palavras-chave: Chikungunya; vírus; interferon; canabidiol; vírus emergentes; alfavírus; canabinoides.

ABSTRACT

The infection caused by the Chikungunya virus (CHIKV) represents an emerging threat and its insect vectors, *Aedes aegypti* and *albopictus*, are well established in various regions of the planet, so epidemics of the disease are recorded globally. Typical symptoms caused by CHIKV infection include fever, headache, joint swelling and itching, while in the chronic phase, the main symptom is arthralgia. To date, there are no vaccine therapies for CHIKV infection, and treatments focus solely on palliative measures. Therefore, the search for effective therapies is crucial to mitigate the spread of CHIKV and minimize its impact on public health. In this sense, cannabidiol (CBD), one of the active compounds present in *Cannabis sativa*, has been widely studied for its therapeutic potential in inflammation and viral infections. Therefore, this study aims to investigate and understand the antiviral mechanisms associated with CBD in CHIKV infection. To this end, an *in vitro* culture of the Vero cell line was established and CHIKV infection was subsequently induced using a reporter virus system that incorporates the fluorescent protein mCherry into the viral genome (CHIKV-mCherry). Using fluorimetry and confocal microscopy, the expression of mCherry was monitored in the infected cells. In addition, the toxicity of CBD on Vero cells was assessed by the WST-8 colorimetric assay, using four different concentrations (1, 3, 10 and 30 μM). The concentration of 3 μM of CBD was used in the subsequent experiments. In order to assess the antiviral efficacy of CBD, Vero cells were then treated with CBD and CHIKV in four experimental groups: I. Mock (Uninfected), II. CHIKV (Virus), III. CBD + CHIKV (pre-treatment, carried out 24, 12, 8, 6 and 2 hours before infection) and IV. CHIKV + CBD (post-treatment, carried out 2 hours after infection). Twenty-four hours after infection, the effectiveness of these treatments was evaluated. A reduction in viral load and replication was observed in CBD-treated cells after infection with CHIKV, connoted by the lower expression of mCherry in confocal microscopy analysis. There was also a reduction in cytopathic effects (set of changes caused by the virus in infected cells) in the CBD-treated group after infection, as well as very little modulation of viral infection in the pre-infected groups. The results indicate the effectiveness of CBD in reducing CHIKV infection, probably due to its immunomodulatory properties. This makes CBD a potential candidate for use in the treatment of CHIKV infections.

Keywords: Chikungunya; viruses; interferon; cannabidiol; emerging viruses; alphavirus; cannabinoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estrutura química do Canabidiol	22
Figura 2 –	Morfologia das células Vero	32
Figura 3 –	Fluorimetria do CHIKV	33
Figura 4 –	Heat-Map da replicação viral	34
Figura 5 –	Imagens de microscopia confocal de células Vero infectadas com o vírus Chikungunya ...	34
Figura 6 –	Viabilidade celular do Canabidiol	37
Figura 7 –	CBD reduz infecção in vitro pelo CHIKV.....	39
Figura 8 –	CBD atenua os efeitos citopáticos causados pelo CHIKV.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
AXL	Receptor Tirosina Quinase AXL
C57BL/6	Camundongos C57 Black 6
CB1R	Receptor Canabinóide do Tipo 1
CBD	Canabidiol
CBR	Receptor Canabinoide
cdc25A	Ciclo de Divisão Celular 25 A
CDK	Quinase Dependente de Ciclina
CHIKF	Febre Chikungunya
CHIKV	Vírus Chikungunya
CPE	Efeito Citopático
DCs	Células Dendríticas
DMO	Densidade Mineral Óssea
DN4	Questionário para Diagnóstico de Dor Neuropática DN4
DsRNA	RNA de Fita Dupla
ECSA	Linhagem Leste/Central/Sul-Africana
eIF2- α	Fator de Iniciação da Tradução Eucariótica 2A
EVA	Escala Visual Analógica
GABA A	Receptor do Sistema Gabaérgico Tipo A
GAS	Sítio de Ativação do Interferon Gama
GTPases	Enzimas Catalisadoras da Hidrólise de Guanosina Trifosfato
HCV	Vírus da Hepatite C
HeLa	Células de Henrietta Lacks
HESCs	Células Estromais Endometriais Humanas
HGMSCs	Células Estromais Mesenquimais Gengivais Humanas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HRP	Peroxidase de Raiz-Forte
IFN- α	Interferon-alfa
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gamma

I κ B	Quinase IkappaB
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
ISGs	Genes Estimulados por Interferon
ISRE	Elemento de Resposta Sensível ao Interferon
LPS	Lipopolissacarídeo
MBCS	Sítio de Clivagem Multibásica
MEF	Células de Fibroblastos Embrionários de Camundongo
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Oriente Médio por Coronavírus
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MM	Células-Tronco Mesenquimais Primárias de Rato
MOI	Multiplicidade de Infecção
MTX	Metotrexato
NF-K β	Fator Nuclear Kappa B
NK	Células Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	Fases de Leitura Aberta
PKR	Proteína Quinase R
PPARs	Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma
PS	Fosfatidilserina
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAse L	Ribonuclease L
Ser51	Serina 51
SeV	Vírus Sendai
SNC	Sistema Nervoso Central
STAT1	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 1
TARV	Regime de Terapia Antirretroviral
THC	Δ 9-tetrahydrocannabinol
TIM-1	Domínio Mucina-1 da Imunoglobulina de Células T
TMPRSS2	Serina Protease Transmembrana do Tipo 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF α	Fator de Necrose Tumoral-Alfa
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

UTRs	Regiões Não Traduzidas
WA	Linhagem da África Ocidental
WT	Tipo Selvagem
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	VÍRUS CHIKUNGUNYA	16
2.2	BIOLOGIA DO CHIKV	17
2.3	PATOGÊNESE DO CHIKV	18
2.4	TERAPIA PARA INFECÇÃO POR CHIKV	20
2.5	CANABIDIOL	21
2.6	CÉLULAS VERO	23
2.7	INTERFERON	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	METODOLOGIA	28
4.1	CULTURA DE CÉLULAS	28
4.2	CHIKV-MCHERRY E ENSAIOS DE INFECÇÃO	28
4.3	PROTOCOLO DE INFECÇÃO <i>IN VITRO</i>	28
4.4	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	29
4.5	TRATAMENTO COM CBD	29
4.6	AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO DO CBD	30
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM CELULAR VERO	31
5.2	A INFECÇÃO PELO CHIKV É PRODUTIVA EM CÉLULAS VERO	32
5.3	DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO-EFEITO DO CBD EM CÉLULAS VERO	36
5.4	O CBD EXERCE ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>IN VITRO</i> FRENTE A INFECÇÃO POR CHIKV	38
5.5	CBD PREVINE O EFEITO CITOPÁTICO CAUSADO PELO CHIKV <i>IN VITRO</i>	42
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

O avanço das doenças infecciosas constitui um problema de saúde pública mundial. Essas patologias ocorrem quando um novo patógeno é disseminado ou reaparece após um declínio nos casos de infecção, e existem diversos fatores associados à sua ocorrência, como mudanças ocorridas nos agentes patogênicos ao longo da evolução, modificações na forma de interação das populações humanas, tanto entre si quanto com o ambiente, e as alterações climáticas (van Doorn, 2014). Entre os patógenos que se destacam por causar doenças infecciosas emergentes estão os vírus, que, quando causam doenças emergentes, são chamados de vírus emergentes (Nii-Trebi, 2017), como o HIV, SARS-CoV, Ebola, Marburg e Nipah (Parrish *et al.*, 2008).

Dentre os principais vírus emergentes encontra-se o Chikungunya (CHIKV). O nome chikungunya significa “aquilo que se curva”, possuindo origem Suwahili ou Makonde Kun Qunwala e descreve tanto o vírus como a doença. Dependendo da severidade do quadro, alguns pacientes podem apresentar dores nas articulações que podem levar a uma postura curvada, o que está relacionado diretamente com o nome da doença (Robinson, 1955). Os casos de infecções causadas por vírus transmitidos por artrópodes (arboviroses), como a CHIKV, são registrados em diversas localidades ao redor do globo, principalmente em regiões onde o clima tropical está presente (Azevedo *et al.*, 2013; Weaver *et al.*, 2013), como o Brasil, um país de proporções continentais cuja maior parte do território é caracterizada por um clima tropical.

Tendo em vista os casos crescentes do CHIKV e seus impactos na saúde pública ao redor do mundo, juntamente com a inexistência de medicamentos totalmente eficazes no combate ao vírus e vacinas para a prevenção da doença, logo, a busca por métodos terapêuticos capazes de levar à cura deste quadro infeccioso torna-se extremamente crucial, principalmente em países onde surtos são frequentemente registrados, como é o caso do Brasil. O canabidiol (CBD), é um dos compostos com forte potencial antiviral que têm recebido mais atenção, com estudos comprovando sua eficácia contra vírus como Zika Virus (ZIKV), também transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti* (Marquez *et al.*, 2024), SARS-CoV-2 (van Breemen *et al.*, 2022) e Hepatitis C Virus (HCV) (Lowe *et al.*, 2017). Diante destes fatos, investigamos os mecanismos antivirais exercidos pelo CBD,

almejando compreender melhor seu mecanismo de ação e a propor um novo tratamento eficaz no quadro infeccioso provocado pelo CHIKV.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VÍRUS CHIKUNGUNYA

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um alphavírus pertencente à família *Togaviridae* transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. Os principais sintomas característicos da infecção incluem febre aguda, artralgia e erupção cutânea, que normalmente são seguidos por sintomas artríticos crônicos cuja duração pode variar de meses a anos (Horwood *et al.*, 2015). Esse agente, foi descoberto pela primeira vez na Tanzânia em 1952, se espalhando efetivamente até atingir as Américas no ano de 2013 (Weaver *et al.*, 2015).

Originalmente, o vírus veio da África e foi introduzido na Ásia posteriormente, dividindo-se em três genótipos: África Ocidental (WA), África Oriental/Central/Sul (ECSA) e Asiático, havendo ainda a sub-linhagem do Oceano Índico (IOL), uma divisão da linhagem ECSA. Esses genótipos se espalharam para o mundo inteiro, contudo, os genótipos Asiático e ECSA são os mais prevalentes pelo mundo (Wahid *et al.*, 2017).

A transmissão do CHIKV se dá em 2 ciclos, urbano e silvestre, respectivamente. No ciclo urbano, a transmissão ocorre de humano para mosquito, e no ciclo silvestre a mesma ocorre de animal para mosquito e para humano, sendo esta última encontrada principalmente na África (Singh *et al.*, 2011). O mosquito se reproduz perto ou dentro de habitações humanas, se alimentando durante o dia ou no início da noite (Mavale *et al.*, 2010). Outros tipos de transmissão viral também já foram descritos na literatura. Em casos relatados no Brasil, 13 pacientes que receberam o transplante de rim e fígado infectados com CHIKV apresentaram sintomas articulares crônicos, sem ocorrer, no entanto, mortes ou danos nos enxertos (Girão *et al.*, 2017). O CHIKV também pode ser isolado de enxertos de córnea, embora não existam casos por transplante de córnea relatados até o momento (Couderc *et al.*, 2012), e também já foi detectado no sêmen 30 dias após o início dos sintomas, embora as evidências de transmissão sexual entre humanos sejam inexistentes até o atual momento (Bandeira *et al.*, 2016). Níveis de CHIKV capazes de induzir virose também já foram encontrados no sangue de pacientes assintomáticos em 2009, na Tailândia (Appassakij *et al.*, 2013). A transmissão vertical do vírus (de mãe para filho) foi descrita pela primeira vez em uma epidemia ocorrida na ilha de La Réunion (Gérandin *et al.*, 2008).

2.2 BIOLOGIA DO CHIKV

Estruturalmente, o CHIKV se apresenta como um vírus pequeno, envelopado e com um genoma de RNA de sentido positivo de aproximadamente 11,8 kb de comprimento. Seu genoma contém duas fases de leitura abertas (ORFs) que estão flanqueadas por regiões não traduzidas 5' e 3' (UTRs), estando separados por uma região intergênica não codificante. O comprimento do 5'UTR é de 76nt e este contém um cap 5' do tipo 0 N 7-metilguanossina para o início da tradução dependente de cap. O 3'UTR varia em comprimento entre ~500 e ~900nt, incluindo também uma cauda de poliadenilato 3'. A codificação das proteínas não estruturais nsP1–4 é feita pelo ORF-1. Estas proteínas formam módulos distintos do complexo de replicase viral responsável pela síntese de RNA do CHIKV, e o processo de replicação do RNA genômico ocorre dentro de complexos que estão ligados à membrana na membrana plasmática (Kallio *et al.*, 2016). À medida em que ocorre a progressão do processo de replicação, o processamento proteolítico dos precursores proteicos não estruturais no complexo replicase favorece a sua associação com a cadeia negativa e subsequente replicação de transcritos genômicos completos de sentido positivo. A síntese dos transcritos subgenômicos (26S) de ORF-2, responsáveis pela codificação das proteínas estruturais (capsídeo, glicoproteínas do envelope e canal de viroporina 6K) ocorre a partir de um promotor subgenômico presente na fita negativa (MELTON *et al.*, 2002). As proteínas não estruturais do vírus são codificadas com cinco proteínas estruturais: C, E3, E2, 6K e E1 (Chen *et al.*, 2013).

Os principais vetores responsáveis pela transmissão do vírus são *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, os mesmos que transmitem o vírus da dengue. Suas características biológicas e ecológicas permitem que a febre Chikungunya se manifeste globalmente (Fernández-Salas *et al.*, 2015). As espécies vetoras se destacam por sua preferência pelo sangue humano e por sua capacidade de estabelecimento fora das regiões nativas, sendo desse modo extremamente adaptáveis (Higgs *et al.*, 2015).

No caso do *Aedes aegypti*, seu comportamento faz com que ele seja o vetor ideal devido à sua natureza antropofílica. Adicionalmente, as fêmeas adultas realizam várias refeições sanguíneas durante o ciclo gonotrófico, sendo os recipientes artificiais os locais preferidos para a deposição das larvas (Gubler, 2002), onde a água doce fica armazenada, como vasos de flores, potes de água e em itens descartados como potes, latas e pneus de veículos (Who, 2009).

Quanto ao *Aedes albopictus* (mosquito tigre asiático), este se destaca por ter colonizado regiões tropicais e temperadas de todos os 5 continentes. Adotado como hospedeiro pelo CHIKV, este vetor é nativo do Sudeste Asiático, tendo sido identificado pela primeira vez na Albânia e na América do Norte no início da década de 1980, tendo sido introduzidos provavelmente através de depósitos de pneus usados (Hawley *et al.*, 1987). Este vetor foi importante em epidemias registradas recentemente desde seu último surgimento no Quênia, no ano de 2004 (Charrel *et al.*, 2007; Talbalaghi *et al.*, 2010; Wikan *et al.*, 2012) e possui algumas características que o tornam um vetor ideal: uma vida longa que dura de 4 a 8 semanas, ovos resistentes que podem permanecer viáveis durante a estação seca e um raio de voo que varia de 400 a 600 metros. Além disso, possui hábitos diurnos e é silencioso e agressivo (Vazeille *et al.*, 2007). Durante períodos de chuvas fortes, a densidade de mosquitos sofre um aumento e assim, conseqüentemente, a circulação do vírus também aumenta (Powers *et al.*, 2007).

2.3 PATOGÊNESE DO CHIKV

A febre Chikungunya apresenta um período de incubação de 3 a 7 dias, após o qual surgem febre alta e mialgia. Após o início das febres surge poliartralgia envolvendo as articulações distais sobre as proximais (Hua *et al.*, 2017). As mãos constituem a parte mais afetada, envolvendo também os joelhos e o tornozelo com dor intensa que pode durar até 3 semanas (Madariaga *et al.*, 2015). Outras manifestações incluem erupção cutânea maculopapular nas extremidades (Tini *et al.*, 2018), lesões vesiculobolhosas e mucocutâneas (Pakran *et al.*, 2011; Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Outras manifestações clínicas incluem diarreia, vômito, encefalite (Arpino *et al.*, 2009), conjuntivite (Ulloa-Padilla *et al.*, 2018) e sepse (Sharma *et al.*, 2018). Normalmente, nos casos de infecção aguda por CHIKV, lesões cutâneas também estão presentes, afetando principalmente o tronco e os membros do paciente (Inamadar *et al.*, 2008; Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Nas crianças infectadas pelo vírus, uma das principais causas de hospitalização foram as complicações neurológicas, como encefalite e convulsões febris (Robin *et al.*, 2008). Nos casos em que ocorreu a morte do paciente, os mais afetados foram neonatos, adultos com doenças preexistentes e idosos, e dentre as principais causas que levaram o indivíduo ao óbito estão a encefalite, a insuficiência cardíaca e a falência de múltiplos órgãos (Economopoulou *et al.*, 2008).

Certos tipos celulares são mais suscetíveis à infecção pelo CHIKV, como células epiteliais e endoteliais humanas, além de macrófagos residentes (Matusali *et al.*, 2019). O local preferido do vírus para realizar o processo de replicação viral são macrófagos infectados, o que acaba por contribuir para o caráter crônico da doença (Hoarau *et al.*, 2010). O primeiro local de replicação do vírus é a pele humana. Posteriormente, o vírus adentra os gânglios linfáticos e o sistema circulatório, e a partir daí, espalha-se para todos os órgãos (Kam *et al.*, 2009).

A entrada dos alfavírus na célula ocorre por endocitose mediada por clatrina (KIELIAN *et al.*, 2010). Uma das vias de entrada do CHIKV nas células musculares que foi identificada é a micropinocitose, onde as partículas virais se colocam com um marcador macropinosomo. Os tratamentos *in vitro* com inibidores de endocitose levaram à uma inibição mínima da infecção por CHIKV *in vitro*. Já o tratamento com um inibidor de micropinocitose e o knockdown de uma proteína envolvida na formação de macropinosomas fizeram com que houvesse uma redução significativa dos títulos virais (Lee *et al.*, 2019). Outras vias de entrada também foram descritas na literatura, sendo um importante mecanismo infeccioso o envolvimento de bolhas apoptóticas. Nos fibroblastos primários e em células HeLa, o desencadeamento do processo de apoptose pelo vírus CHIKV ocorreu por vias intrínsecas e extrínsecas, formando corpos apoptóticos (bolhas celulares apoptóticas), que são protuberâncias irregulares na membrana plasmática que ocasionalmente se desprendem. O CHIKV, escondido dentro de tais bolhas, infectou as células vizinhas. Deste modo, as bolhas apoptóticas infectam macrófagos. Contudo, a replicação viral em macrófagos originados de bolhas celulares não produziu uma resposta inflamatória. Sendo assim, isso acaba constituindo um mecanismo viral de invasão celular pela evasão imunológica, permitindo que o CHIKV escape da resposta do hospedeiro (Krejchich-Trotot *et al.*, 2010).

Um preditor confiável da gravidade da doença parece ser a carga viral, uma vez que os casos em que a hospitalização é necessária apresentam viremia mais elevada quando comparados com aqueles que não necessitam de hospitalização (Waggoner *et al.*, 2016). As sequelas a longo prazo possuem uma estimativa de 30 a 40% dos indivíduos infectados. Estas incluem artrite e/ou artralgia persistente (Murillo-Zamora *et al.*, 2017). Em fibroblastos sinoviais humanos, a suscetibilidade e a permissibilidade à infecção experimental *ex vivo* mostraram que existe uma forte regulação positiva dos genes RANTES / CCL5 e da IL-8 em associação com a artrite das células infectadas (Pott *et al.*, 2021), e em macacos, a expressão do RNA viral a longo prazo esteve ligada à infiltração

das células mononucleares do tecido sinovial. Nos macacos, a fase crônica da infecção por CHIKV esteve caracterizada por macrófagos ativados persistentes, além da presença do RNA viral e dos antígenos virais no fígado e nos órgãos linfóides por até 2 meses. A inoculação de altas doses virais nos animais resultou em artrite, meningoencefalite e morte (Labadie *et al.*, 2010).

Normalmente, a eliminação sistêmica do vírus ocorre dentro de poucos dias, ficando indetectável no sangue periférico (Hoarau *et al.*, 2010). Contudo, manifestações atípicas incomuns e mais graves estão sendo reconhecidas em pacientes específicos portadores de comorbidades, como polimorfismos do receptor do tipo Toll (de Lima Cavalcanti *et al.*, 2022). Os seres humanos são capazes de eliminar o vírus eficientemente em um período que varia de 4 a 7 dias (Laurent *et al.*, 2007; Carey *et al.*, 1969; Brighton *et al.*, 1983). Ainda assim, segundo os dados epidemiológicos, 85% dos indivíduos portadores de anticorpos relataram sintomas relacionados ao quadro infeccioso (Lemant *et al.*, 2008). Alguns pacientes desenvolvem dores crônicas nas articulações na fase pós-aguda, que possui um período que varia de 21 dias a 3 meses após o começo dos sintomas (Simon *et al.*, 2015).

2.4 TERAPIA PARA INFECÇÃO POR CHIKV

Dada a inexistência de vacinas e de medicamentos que sejam eficazes contra a doença, os tratamentos atuais se resumem em medidas paliativas, proporcionando alívio sintomático através do uso de fármacos anti-inflamatórios.

Na forma aguda e sem complicações da infecção por CHIKV, o tratamento requer apenas repouso, analgesia e hidratação oral (Simon *et al.*, 2015; Brito *et al.*, 2016). Os analgésicos de nível 1, usados no tratamento da dor leve, como os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e o paracetamol, e os de nível 2, usados em casos de dor moderada, como fármacos opioides, hidrocona, codeína e tramadol (Anekar *et al.*, 2023), são utilizados na abordagem terapêutica padrão. No caso de persistência da dor ou de uma grande intensidade da mesma na fase inicial (maior que 7 na escala visual analógica – EVA), os analgésicos de nível 3, como opioides mais fortes que os citados acima, podem ser utilizados (Zaid *et al.*, 2018). Se porventura, no exame clínico, for suscitado da existência de dor neuropática, isso pode revelar hipoestesia (sensação reduzida), neuralgia (dor aguda e excruciante que ocorre quando um ou mais nervos são acometidos), alodinia (que é caracterizada pela dor como resposta à um estímulo que, em condições normais,

não provocaria dor) e parestesia (caracterizada por uma sensação de dormência ou formigamento). Então, a otimização da analgesia irá requerer avaliação através do uso do questionário DN4, Diagnóstico Diferencial para Dor Neuropática, à beira do leito (Bouhassira *et al.*, 2005). A artralgia persistente, um sintoma bastante característico do quadro infeccioso por CHIKV, apresenta semelhanças com a artrite reumatóide e por isso, alguns medicamentos com efeitos limitados têm sido utilizados, estes incluem sulfassalazina e leflunomida (Bouquillar *et al.*, 2009). Para o tratamento da inflamação normalmente são utilizados os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), como ibuprofeno, diclofenaco e naproxeno (Burt *et al.*, 2012).

Os critérios que indicam os casos em que existe necessidade de hospitalização são a dor não controlada com analgésicos de nível 1 e de nível 2, sangramento, insuficiência hemodinâmica, além de comorbidades e sintomas atípicos do quadro, como manifestações renais, cardíacas e neurológicas (Webb *et al.*, 2022). Em caso de internação na UTI, o manejo do paciente consiste em ventilação mecânica, suporte hemodinâmico e purificação extra-renal (suporte multimodal). Nos casos em que existe a manifestação de polineuropatia associada, o uso intravenoso de imunoglobulinas mostra ser benéfico apenas para alguns pacientes (Scott *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2019).

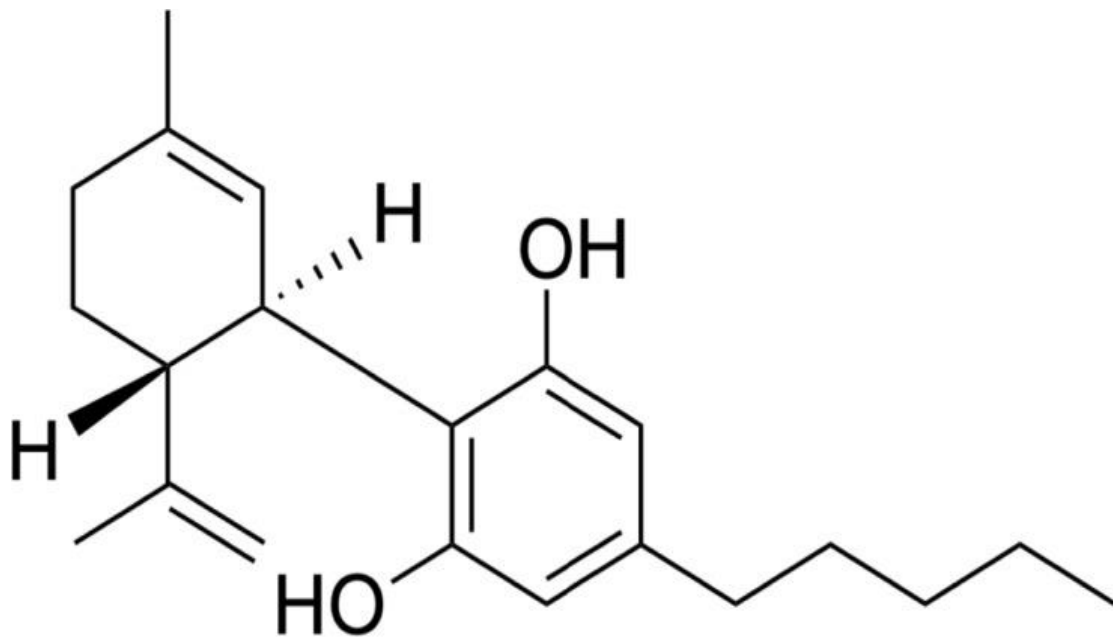
Na literatura, os estudos têm variado muito quanto aos resultados da eficácia dos medicamentos utilizados no tratamento da fase crônica da doença: o metotrexato (MTX) mostra-se eficaz na redução dos sintomas (Amaral *et al.*, 2020; Adarsh *et al.*, 2020), porém, o número de estudos com este medicamento é limitado (Amaral *et al.*, 2018). A hidroxicloroquina, os corticosteroides e outras terapias como duloxetine e pregabalina mostram-se parcialmente eficazes (Kumar *et al.*, 2021). A ribavirina mostrou um sucesso parcial, levando à melhora das dores nas articulações e à redução do inchaço dos tecidos moles (Ravichandran, 2008), além do Bindarit, um inibidor da síntese de proteína quimiotática de monócitos que mostrou um efeito protetor contra a perda óssea induzida pela infecção por CHIKV (Chen *et al.*, 2015).

2.5 CANABIDIOL

Os avanços científicos têm comprovado a eficácia da utilização de produtos derivados da planta *Cannabis sativa*, utilizada desde a antiguidade com propósitos terapêuticos. Estudos já mostraram a eficácia de produtos derivados da planta na epilepsia, dor e em outras condições neurológicas e mentais (Arzimanoglou *et al.*, 2020;

Bonaccorso *et al.*, 2019; McGuire *et al.*, 2017; Millar *et al.*, 2019). Em seu material vegetal, a planta contém em torno de 140 compostos, os canabinóides. O canabidiol (CBD), composto derivado da *C. sativa*, tem diversas ações farmacológicas (**Figura 1**). Dentre as diversas vias de sinalização celular do corpo humano que atua o CBD, está o sistema endocanabinóide (Paland *et al.*, 2021). Este composto atua como neurotransmissor lipídico na ativação dos receptores canabinóides: o receptor canabinóide 1 (CB1) e o receptor canabinóide 2 (CB2).

Figura 1 – Estrutura Química do Canabidiol



Cannabidiol (CBD)

Fonte: Adaptado de Peyravian *et al.* (2020).

Os receptores CB1 estão localizados principalmente no cérebro e em órgãos periféricos, incluindo o fígado, o útero e a tireoide. Já os receptores CB2 se encontram expressos, de forma predominante, nas células imunológicas (macrófagos), e no sistema gastrointestinal. A principal função dos receptores CB1 é o bloqueio da liberação de neurotransmissores, inibindo os canais de cálcio sensíveis à voltagem e a adenilil ciclase, o que é relatado por vários estudos que descobriram que a ativação do receptor CB1 pré-sináptico leva à redução da neurotransmissão (Hoffman *et al.*, 2000). Quanto aos receptores CB2, é relatado que em modelos de doenças inflamatórias, os mesmos exercem

o controle das funções imunológicas. Modelos animais com ausência de receptores CB2 mostram uma exacerbação da resposta inflamatória graças à um aumento na função das células imunológicas. Desse modo, administrar agonistas do receptor CB2 é capaz de tratar a inflamação (Newton *et al.*, 2009).

As evidências têm mostrado que os canabinóides podem atuar como antivirais. Os canabinóides que contêm CBD podem modular o nível de proteína enzima conversora de angiotensina II (ACE2) (Wang *et al.*, 2020), o que pode diminuir a suscetibilidade à COVID-19, por exemplo, onde o vírus entra no hospedeiro pela ACE2 presente em vários tecidos, como o revestimento da membrana nasal, o tecido pulmonar e o trato gastrointestinal (Beyersted *et al.*, 2021). Outros estudos também sugerem que o CBD é mais eficiente contra o coronavírus humano do que medicamentos antivirais como Remdesivir (Raj *et al.*, 2021). No caso do Remdesivir, embora ele seja capaz de levar à redução da taxa de mortalidade de pacientes com COVID-19, infiltrados inflamatórios ainda ocorrem nos pulmões (Williamson *et al.*, 2020). No caso da Hepatite C, o CBD foi capaz de inibir o vírus em 84,5% com efeito de citotoxicidade mínimo (Lowe *et al.*, 2017), e no HIV-1, o CBD foi capaz de reduzir a expressão viral, além de diminuir a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias e desativar a caspase 1 (Arias *et al.*, 2023). Assim, o canabidiol apresenta-se como um composto eficaz nas terapias contra doenças causadas por vírus.

2.6 CÉLULAS VERO

A linhagem celular Vero deriva de células epiteliais renais do Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*) (Ammerman *et al.*, 2008), tendo sido isolada pela primeira vez na década de 1960 por dois pesquisadores japoneses (Yasumura; Kawakita, 1963), sendo amplamente usada em estudos envolvendo a produção de vírus e vacinas (Trabelsi *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2017; Chan *et al.*, 2013; Spruth *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2015). O crescimento deste tipo de célula é dependente de ancoragem, só ocorrendo proliferação na presença de uma superfície adequada (Shen *et al.*, 2019).

Estas células oferecem uma fácil manutenção (Kumar *et al.*, 2021) e, por serem uma linhagem celular contínua, sua passagem pode ser feita indefinidamente, fazendo assim com que haja uma caracterização celular extensiva e a formação de grandes bancos de células, o que constitui uma vantagem em relação a outros tipos celulares, como

fibroblastos de embriões de galinha (Kiesslich; Kamen, 2020), além de poderem ser adaptadas para crescer em condições sem soro (Merten *et al.*, 1994).

As células Vero também são suscetíveis à infecção por diversos vírus, como o vírus da rubéola (Rhim *et al.*, 1969), raiva (Rourou *et al.*, 2019), CHIKV (Sudeep *et al.*, 2019), SARS-CoV-2 (Dighe *et al.*, 2022), dentre outros. Em um estudo realizado com o Zika Vírus (ZIKV), também transmitido pelo mesmo vetor do CHIKV, este tipo celular demonstrou produzir títulos virais mais altos do que outras linhagens celulares não humanas, como células-tronco mesenquimais primárias de rato (MM) e células de fibroblastos embrionários de camundongo (MEF) (Ramos da Silva *et al.*, 2019). Tais características tornam este tipo de célula apropriado e interessante para ser utilizado em estudos com o vírus Chikungunya.

2.7 INTERFERON

Os interferons (IFNs) são proteínas pertencentes às citocinas, um grupo de moléculas sinalizadoras intimamente envolvidas com a regulação da resposta imune. Os IFNs possuem uma particular importância no combate a infecções virais, além desempenharem um papel vital na supressão tumoral, na transdução de sinal e na ativação de células imunológicas. Eles são classificados em três subtipos principais: alfa, beta e gama, sendo os dois primeiros pertencentes subclasse de interferon Tipo 1 e a última pertencente à subclasse Tipo 2 (De Andrea *et al.*, 2002). Também foi descoberta uma terceira subclasse, do Tipo 3, que inclui o interferon lambda (Lasfar *et al.*, 2016). A ação dos IFNs contra as infecções virais se baseia em uma dupla ação, basicamente: primeiro, eles induzem um estado antiviral nas células, tanto infectadas quanto vizinhas, e em seguida, preparam as células dendríticas (DCs), ligando a imunidade inata e a imunidade adaptativa (McNab *et al.*, 2015; Ye *et al.*, 2019).

Estas proteínas são capazes de exercer uma potente atividade antiviral em diversos estágios do ciclo replicativo dos vírus, como entrada, transcrição, maturação e liberação, graças à mediação da expressão de genes antivirais. Os IFNs causam uma estimulação da expressão da proteína quinase R (PKR) através de um elemento de resposta sensível ao interferon (ISRE) e do sítio de ativação do interferon gama (GAS) no promotor do gene PKR. Posteriormente, a atividade quinase do gene PKR, leva à fosforilação do fator de iniciação da tradução eucariótica 2A (eIF2-a) em Serina 51 (Ser51). É importante ressaltar que eIF2-a-GTP é necessário para o início da tradução

viral. Além disso, outros papéis da PKR são desempenhados por meio da fosforilação da serina do transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT1) e da fosforilação da quinase I κ B (IkB), levando à ativação de genes dependentes do fator nuclear kappa B (NF-Kb). Adicionalmente, sabe-se que os interferons induzem fortemente o sistema 2-5 A oligossintetase/RNase L: as RNase Ls são ativadas por ácidos ribonucleicos (RNAs) de fita dupla, levando à degradação de todo o RNA de fita simples, o que acaba por inibir a replicação viral. Outros mecanismos induzidos por interferons que são responsáveis por inibir e interferir na replicação viral envolvem o agrupamento oligomérico das proteínas Mx (uma família de GTPases) e a proteína de ligação ao guanilato (Thomas *et al.*, 2003).

Além das já citadas propriedades antivirais, os IFNs também apresentam propriedades antiproliferativas, as quais, segundo as suspeitas dos pesquisadores, se devem às ações de STAT1 e PKR, à indução de inibidores da quinase dependente de ciclina (CDK) e à diminuição de ciclina D e ciclo de divisão celular 25 A (cdc25A). Os IFNs também atuam em conjunto com o RNA de fita dupla (dsRNA), fator de necrose tumoral (TNF) e lipopolissacarídeo (LPS) para promover a apoptose (Thomas *et al.*, 2003).

A imunomodulação também é outra característica dos IFNs, sendo o interferon gama o imunomodulador predominante. Os IFNs do tipo 1 atuam como citocinas antivirais, podendo ativar as células natural killer (NK), destruindo os alvos virais, secretando anticorpos contra os patógenos, aumentando a proliferação das células B e a resposta das células T CD8 (linfócitos citotóxicos T que expressam o receptor CD8 em suas membranas) por meio da regulação positiva da expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I nas células de superfície. Os IFNs do tipo 1 também são capazes de aumentar a expressão de moléculas do MHC de classe II (Thomas *et al.*, 2003). Clinicamente, os IFNs são utilizados para tratar infecções virais, como a Hepatite C, câncer e doenças autoimunes, como a esclerose múltipla. No caso do interferon lambda, ele é utilizado por pesquisadores em modelos de infecções virais (Sharieff *et al.*, 2002).

Interferons do tipo I são importantes reguladores da imunidade inata e adaptativa, essenciais para a atividade antiviral (Ivashkiv *et al.*, 2014), induzindo a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs), que por sua vez exercem muitas funções efetoras antivirais (Schoggins *et al.*, 2011). No quadro infeccioso do HIV, por exemplo, já foi mostrado que macrófagos primários podem ser protegidos da infecção do vírus ao serem tratados com IFN tipo I antes da exposição viral (Wie *et al.*, 2013), e no

caso do CHIKV, sabe-se que o IFN α é um mediador importante da resposta imune contra esse vírus em específico (Sourisseau *et al.*, 2007). Sabe-se também que o vírus HIV prejudica as funções dos ISGs antivirais, escapando assim de um reconhecimento eficaz da resposta imune inata (Gondim *et al.*, 2021; Sandstrom *et al.*, 2017; Rasaiyaah *et al.*, 2013). Desse modo, uma resposta imune equilibrada se torna essencial no tratamento de uma infecção viral, razão essa à qual o CBD vai de encontro, pois ele é capaz de modular a expressão de genes de resposta ao IFN do tipo I em macrófagos (Tomer *et al.*, 2022). O CBD também possui influência sobre outros tipos de interferon, como o interferon-gamma (IFN- γ): um estudo *in vitro* mostrou que extratos de cannabis que possuem alto teor de CBD regulam negativamente a expressão dos receptores ACE2 em tecidos inflamados artificialmente submetidos a TNF α /IFN- γ (Wang *et al.*, 2020). Além disso, o CBD também é capaz de diminuir a liberação de IFN induzida por LPS (Kozela *et al.*, 2010). Dada a capacidade imunomoduladora do CBD, esse composto desponta como um potencial candidato no tratamento de infecções virais, frequentemente registradas no mundo todo.

3 OBJETIVOS

Este trabalho foi desenvolvido elaborando objetivos gerais e específicos, que são, respectivamente.

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos antivirais do CBD no contexto da infecção pelo CHIKV, além de compreender como este exerce influência sobre o interferon.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a infecção do CHIKV em células Vero;
- b) Caracterizar as concentrações farmacológicas do CBD em células Vero;
- c) Determinar a eficácia do CBD em infecção pelo CHIKV;
- d) Avaliar o efeito protetor do CBD em infecção pelo CHIKV.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

Uma cultura *in vitro* de células da linhagem Vero foi estabelecida, utilizando Dulbecco's modified Eagle's medium: F12 (DMEM: F12) (Elabscience[®]) juntamente com solução antibiótica de Penicilina-Estreptomicina e Soro Bovino Fetal (SBF), ambos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Estas células foram gentilmente cedidas pelo prof. Sean Whelan, colaborador de nosso grupo, do departamento de microbiologia da *Washington University*. Inicialmente, para um melhor desenvolvimento da cultura, foi utilizado meio DMEM suplementado com 20% de SBF e posteriormente, para a manutenção das células, foi utilizado meio DMEM suplementado com 10% de SBF. As células foram cultivadas em garrafas de tamanho pequeno e conforme adquiriam confluência foram passadas para garrafas de tamanho médio e grande, após digestão com tripsina, sendo mantidas em incubadora a 37°C sob 5% de CO₂.

4.2 CHIKV-MCHERRY E ENSAIOS DE INFECÇÃO

O vírus utilizado para os experimentos possui a proteína fluorescente mCherry inserida no genoma viral (CHIKV-mCherry). Todos os estoques do vírus foram propagados em células Vero e armazenados em uma temperatura de -80 °C. Para os ensaios de curva de MOI (Multiplicity of Infection) de CHIKV-mCherry, as células Vero foram cultivadas, e infectadas utilizando MOI de 0.1, 1 e 5, sendo posteriormente analisadas por fluorimetria.

4.3 PROTOCOLO DE INFECÇÃO *IN VITRO* E MICROSCOPIA CONFOCAL

Após atingirem confluência, as células foram semeadas em placas de 24 ou 96 poços de fundo chato e posteriormente incubadas para a adesão celular. No dia seguinte, após o descongelamento do CHIKV-mCherry em temperatura ambiente, o inóculo

utilizado para a infecção foi preparado misturando o vírus com meio DMEM livre de SBF. Posteriormente, foi feita a infecção da maneira como se segue: o sobrenadante foi retirado dos poços a serem infectados e em seguida, foi colocado o inóculo em uma quantidade de 50 μ L por poço. Em seguida, as placas foram tampadas, protegidas com papel alumínio e colocadas em balança orbital, durante duas horas, para o processo de adsorção do vírus. Após esse tempo, o inóculo foi retirado e os poços foram novamente cobertos com meio em um volume final de 150 μ L ou 300 μ L por poço. Por fim, as placas foram novamente incubadas. As imagens foram adquiridas pelo microscópio confocal Nikon AX com ampliação de 600x (Nikon). A infecção pelo CHIKV-mCherry em células Vero foram identificadas pela expressão de mCherry (Vermelho) e DAPI (azul) para identificação celular. As imagens apresentam barra de escala de 100 micrometros e foram processadas utilizando o software Fiji/ImageJ.

4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A citotoxicidade do CBD ou determinação do efeito citopático foi avaliada utilizando o ensaio WST-8/CCK8 (Cell Counting Kit-8, Elabscience[®]), um ensaio colorimétrico utilizada para medição das células viáveis em cultura. Após condições experimentais, o reagente de trabalho foi preparado diluindo o composto WST-8 em PBS estéril. Subsequentemente, o sobrenadante foi retirado e o reagente de trabalho foi adicionado aos poços. As placas foram então incubadas durante um período de 2 horas e posteriormente retiradas, onde os resultados foram quantificados por meio da utilização de um leitor de placa por absorbância de 450 nm;

4.5 TRATAMENTO COM CBD

O CBD foi incubado nas células Vero infectadas e utilizado em 6 diferentes períodos de tempo: 24, 12, 8, 6 e 2 horas antes da infecção (pré-tratamento), além de 2 horas após a infecção (pós-tratamento). O pré-tratamento foi feito da seguinte maneira: o meio foi retirado dos poços e em seguida o CBD foi colocado nos períodos já citados. Subsequentemente, o CBD foi retirado e o vírus foi inoculado para a infecção, sendo as placas então protegidas com papel alumínio e colocadas em agitador orbital durante 2

horas. Terminado este período, o vírus foi retirado e os poços foram preenchidos com meio DMEM e incubados. Para o pós-tratamento, o mesmo procedimento de infecção foi feito, porém, o CBD foi colocado nos poços após a retirada do inóculo e guardado em estufa para incubação durante 2 horas, período após o qual o fármaco foi retirado, os poços preenchidos com meio e as placas incubadas. Terminados os períodos de tratamento, o sobrenadante foi coletado e foram feitas as lâminas para a análise por microscopia confocal das lamínulas pré-existentes nos poços.

4.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOPÁTICO DO CHIKV

O efeito citopático do vírus foi avaliado por meio do ensaio colorimétrico WST-8/CCK8 nos períodos de 24 e 48 horas após a infecção e tratamento com CBD. Após os referidos períodos, o sobrenadante foi retirado, o reagente de trabalho foi adicionado e as placas foram novamente incubadas durante 2 horas. Após esse período, os resultados foram quantificados por meio da leitura da placa.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software *GraphPad Prism*® (Versão 8.0.1) foi utilizado para a análise estatística dos resultados e representação gráfica. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância unidirecional (*One-way ANOVA*) seguida de um teste de comparações múltiplas (Teste de Dunnett). Valores de $p < 0,05$ foram considerados como indicativos de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estabelecimento da linhagem celular Vero

Inicialmente, foi padronizado e estabelecido o cultivo das células Vero. Após o descongelamento, o processo de estabilização celular demandou um período considerável até que as células atingissem um estágio adequado de desenvolvimento, aderência e organização morfológica. Durante esse período, as células foram inicialmente cultivadas em meio DMEM suplementado com 20% de SBF para favorecer sua recuperação e proliferação, e posteriormente ajustadas para DMEM com 10% de SBF para manter as condições ideais de crescimento e viabilidade (**Figura 2**). Neste estudo, as células utilizadas para a realização dos experimentos expressam serina protease transmembrana do tipo 2 (TMPRSS2) – Vero E6/TMPRSS2 – na superfície celular, uma característica que as tornam fisiologicamente mais interessantes para a replicação viral, visto que a presença dessa enzima pode reduzir a frequência de mutações no sítio de clivagem multibásica (MBCS), como foi observado para o SARS-CoV-2 (Lamers *et al.*, 2021, Case *et al.*, 2020). Em outras palavras, a utilização dessa célula permite que o vírus, ao infectá-la e replicar, permaneça semelhante ao vírus do tipo selvagem (*Wild Type*), devido à não ocorrência de mutações, fazendo assim que os resultados dos experimentos sejam mais consistentes com a realidade (**Figura 2**).

Figura 2 – Morfologia das Células Vero



Fonte: do autor (2024)

Nota: Células foram cultivadas em meio DMEM e plaqueadas por 24h, apresentando crescimento confluyente com características epiteliais típicas, evidenciadas por sua aderência e organização celular.

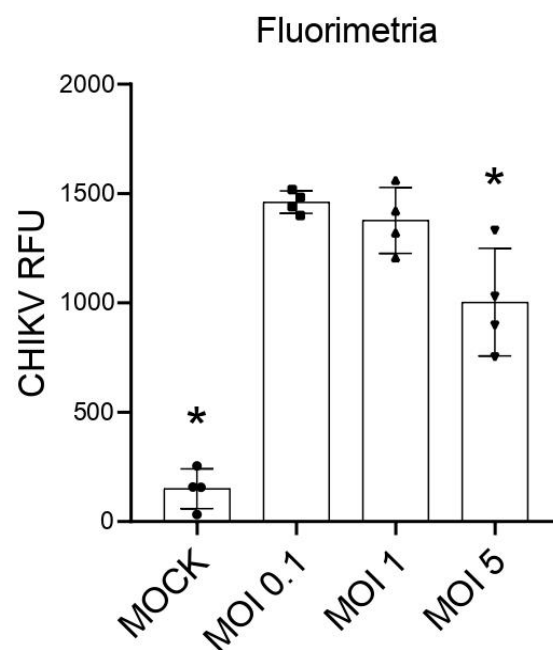
No caso do SARS-CoV-2, também foi mostrado que a sua infectividade nas células Vero E6/TMPRSS2 é maior do que nas células Vero E6 e Calu-3 (Matsuyama *et al.*, 2020), tornando este tipo celular preferido para a propagação viral, pois a serina protease aumenta a interação com as proteínas de entrada do vírus com receptores destes na célula hospedeira. Assim, as células utilizadas mostraram excelente replicação e adesão, tendo sido adaptadas com sucesso à cultura e à infecção, suportando adequadamente a replicação do CHIKV.

5.2 A INFECÇÃO PELO CHIKV É PRODUTIVA EM CÉLULAS VERO

Em um próximo passo, realizamos ensaios de infecção *in vitro* CHIKV. Para isso, células Vero foram cultivadas em placas de 24 poços na presença de lamínulas. Após aderência e confluência das células, os vírus foram incubados por 24 horas e a seguir foram observados a expressão de mCherry, presente no genoma do CHIKV, por

fluorimetria e microscopia confocal. Utilizamos diferentes quantidades de partículas de CHIKV ou multiplicidade de infecção (MOI), por exemplo, MOI = 1 é equivalente a uma infecção no qual 1 vírus infecta 1 célula. Dentre as multiplicidades de infecção testadas, a de 0,1 e de 1 garantiram uma melhor produção viral, enquanto MOI = 5 se mostrou menos produtiva (Figura 3 e 4). De fato, como observado abaixo, conseguimos fazer com que o vírus se adaptasse às células, garantindo altos níveis de infecção e consequentemente, uma infecção produtiva. A emissão de fluorescência na cor vermelha pelo marcador mCherry indica que a célula foi infectada.

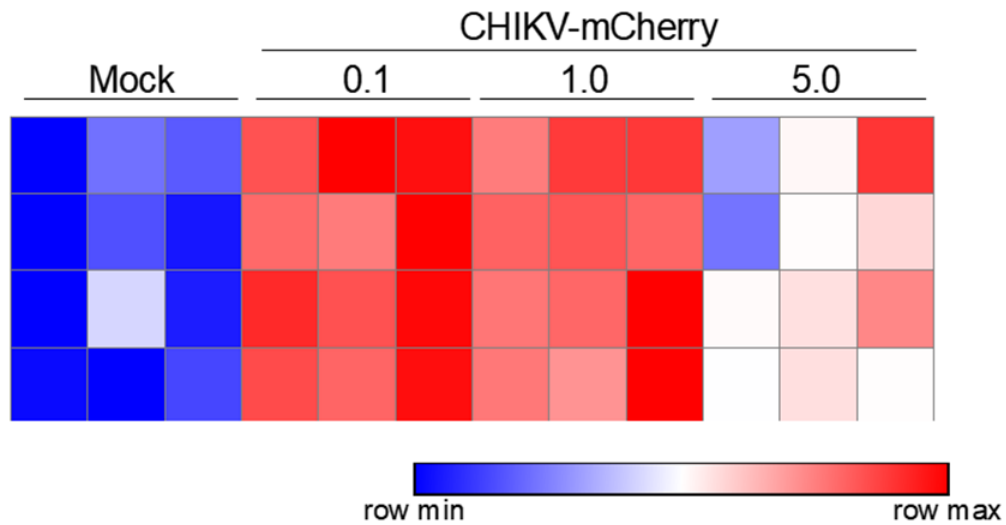
Figura 3 – Fluorimetria do CHIKV.



Fonte: do autor (2024)

Nota: Multiplicidades de infecção (MOI) de 0,1, 1 e 5, mostrando a produção viral quantificada por meio de unidades de fluorescência relativas (RFU). Os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa entre o grupo utilizado como controle (Mock) e MOI 5 ($P < 0,05$), conforme apontado pela análise de variância unidirecional (*One-way ANOVA*) e pelo Teste de Dunnett. Mock: controle sem infecção.

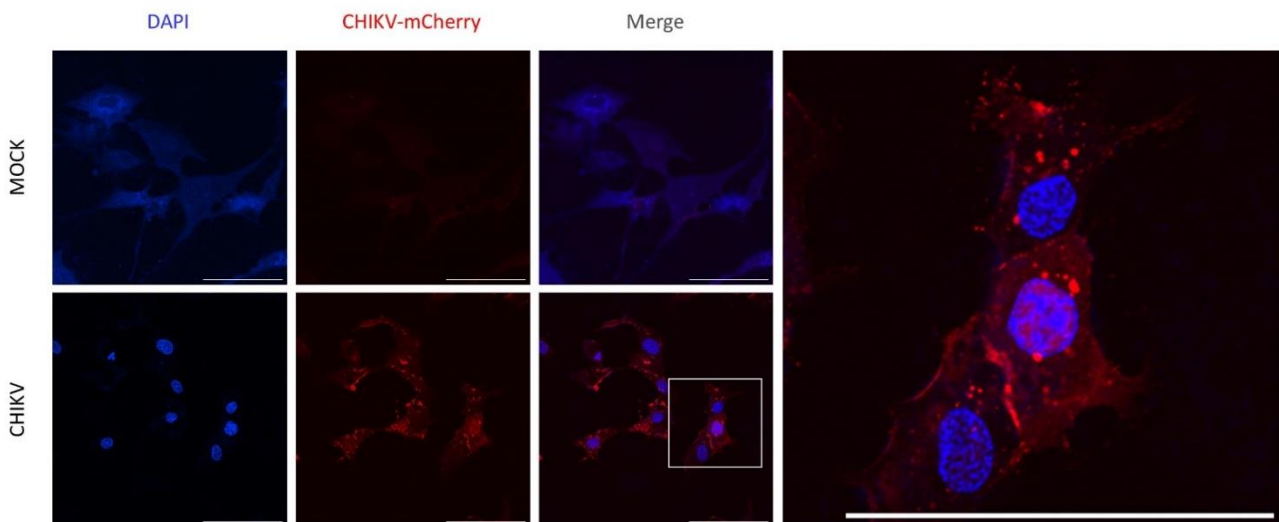
Figura 4 – *Heat-Map* da replicação viral.



Fonte: do autor (2024)

Nota: Multiplicidades de infecção (MOI) de 0.1, 1.0 e 5.0. Tons mais frios azul) indicam uma menor replicação viral e tons mais quentes (vermelho) indicam uma maior replicação viral. A utilização de uma grande quantidade do vírus não resultou em grande produção viral. Mock: controle sem infecção.

Figura 5 – Imagens de microscopia confocal de células Vero infectadas com o vírus Chikungunya.



Fonte: do autor (2024)

Nota: À direita, detalhe ampliado da porção delimitada pelo quadrado na parte inferior da imagem, mostrando o DNA, DAPI (em azul) infectadas pelo vírus (pontos fluorescentes em vermelho). MOCK – controle sem infecção; CHIKV – vírus Chikungunya; DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol; Merge – sobreposição das imagens à esquerda. Barra de escala: 100 micrometros.

A fluorescência vermelha emitida pelo marcador mCherry foi facilmente detectada por microscopia confocal com $MOI = 1$, confirmando a presença do vírus nas células e indicando sucesso na infecção. Esse resultado é crucial, pois evidencia as condições 1 são ideais para garantir uma expressão viral significativa nas células Vero, facilitando o monitoramento visual da infecção com o marcador fluorescente mCherry e ensaios farmacológicos anti-virais adequados.

O conceito de MOI é definido como a proporção de vírions infecciosos para células em uma cultura (Shabram; Aguilar-Cordova, 2000), sendo um parâmetro-chave na descrição de interações entre vírions e células, na previsão da dinâmica das infecções e no entendimento da evolução viral (Zwart *et al.*, 2013). Um estudo de 2015 que utilizou o vírus Sendai (SeV), descobriu que células infectadas com MOI mais baixo induziram a produção de mais subtipos de interferon do que aquelas que foram infectadas com MOI mais alto, mostrando como este parâmetro pode afetar a indução de IFN. Assim, a utilização do mesmo vírus em diferentes quantidades pode induzir a produção de diferentes subtipos desta citocina (Zaritsky *et al.*, 2015).

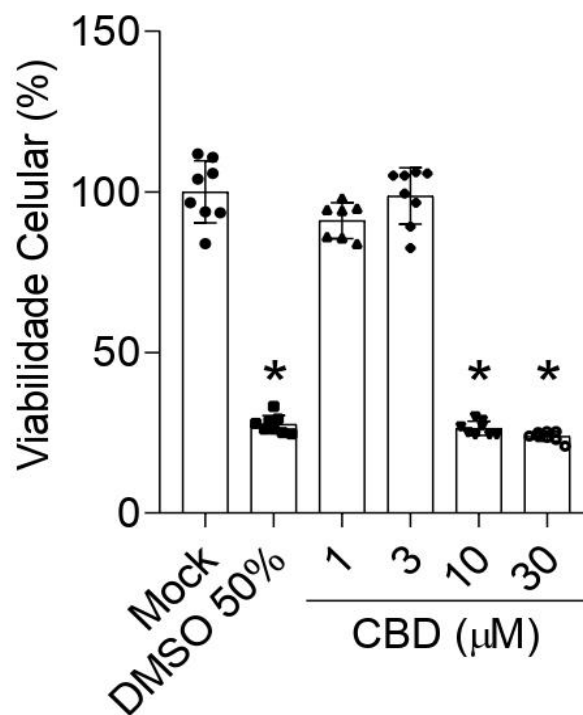
A infectividade específica do CHIKV nas células Vero é aumentada pelos níveis de fosfatidilserina (PS) no folheto externo do vírus (Reyes Ballista *et al.*, 2023), visto que estes receptores de PS mediam a entrada viral por meio da ligação com o domínio mucina-1 da imunoglobulina de células T (TIM-1) e o receptor tirosina quinase AXL (AXL) (Reyes Ballista *et al.*, 2023; Moller-Tank *et al.*, 2013; Kirui *et al.*, 2021). Tais características das células Vero se mostram muito pertinentes para a infecção pelo CHIKV.

5.3 DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO-EFEITO DO CBD EM CÉLULAS VERO

Determinar a toxicidade *in vitro* de um fármaco é essencial para avaliar sua segurança antes de avançar para estudos em organismos vivos e, eventualmente, para uso clínico. Esse teste inicial permite identificar potenciais efeitos adversos nas células, como morte celular, alterações morfológicas e disfunções metabólicas, com menor custo e maior rapidez em comparação aos estudos *in vivo*. A análise *in vitro* ajuda a filtrar substâncias tóxicas precocemente, reduzindo o risco de efeitos colaterais graves em testes subsequentes e garantindo maior segurança no desenvolvimento do fármaco.

Nesse sentido, objetivamos determinar as concentrações viáveis de CBD em células Vero para avaliarmos o seu potencial anti-viral. Sendo assim, plaqueamos as células Vero e após aderência e confluência, incubamos o CBD em 4 concentrações diferentes: 1, 3, 10 e 30 μM . Após 24 horas, utilizando o ensaio colorimétrico de viabilidade WST-8/CCK8 para determinarmos níveis toxicidade do CBD. Primeiramente, as células sem estímulo (Mock) apresentaram viabilidade de 100% (controle positivo do ensaio), enquanto na presença de DMSO na concentração de 50% (controle de morte celular) apresentou níveis reduzidos de células viáveis. Em relação ao CBD, observamos que as concentrações 10 e 30 μM mostraram-se tóxicas para as células, levando a uma viabilidade celular menor que 30%, no entanto, as concentrações de 1 e 3 μM apresentaram viabilidade celular (**Figura 6**).

Figura 6 – Viabilidade celular do Canabidiol.



Fonte: do autor (2024)

Nota: As concentrações de 1, 3, 10 e 30 micromolar de CBD foram incubadas em células Vero por 24 h e determinamos sua viabilidade pelo ensaio WST-8/CCK8 (Enhanced Cell Counting Kit-8). Os asteriscos (*) indicam

diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) comparado ao grupo Mock (controle de células viáveis) conforme apontado pela análise de variância unidirecional (*One-way ANOVA*) e pelo Teste de Dunnett. Mock - controle; DMSO - dimetilsulfóxido; CBD - canabidiol; μM - micromolar.

É possível observar no gráfico de viabilidade do Canabidiol (**Figura 6**), que a concentração de 3 μM levou à uma viabilidade celular de aproximadamente 99%. No entanto, também é possível observar que o número de células viáveis nesta concentração foi maior do que na concentração de 1 μM , onde a viabilidade foi de quase 90%. Dito isso, a concentração de 3 μM foi considerada para os experimentos.

A utilização de doses mais altas de CBD causa redução da viabilidade celular, como pode ser visto em estudos com diferentes tipos de células: em células estromais mesenquimais gengivais humanas (hGMSCs), com as concentrações de 10 e 25 μM (Rajan *et al.*, 2017); em queratinócitos humanos (CDD 1102 KERTr), onde acima de 10 μM houve redução da taxa de sobrevivência em torno de 75% (Jastrzab *et al.*, 2019); em células estromais endometriais humanas (hESCs), com 20 μM reduzindo de forma significativa a viabilidade (Almada *et al.*, 2020) e em sebócitos humanos, com a viabilidade sendo reduzida com 50 μM e com a exposição durante 6 dias a 10 μM (Oláh *et al.*, 2014).

No caso deste estudo, onde foram utilizadas células Vero, uma dose muito alta levaria à uma morte celular exacerbada, e dessa maneira, não ocorreria nem mesmo uma infecção viral eficaz. Daí nota-se a importância do ensaio de viabilidade celular, que apontou que com uma dosagem baixa é possível manter as células viáveis e obter o efeito farmacológico desejado, simultaneamente. O uso terapêutico do CBD deve estar relacionado a baixas doses de administração (Pagano *et al.*, 2020).

5.4 O CBD EXERCE ATIVIDADE ANTIVIRAL *IN VITRO* FRENTE A INFECÇÃO POR CHIKV

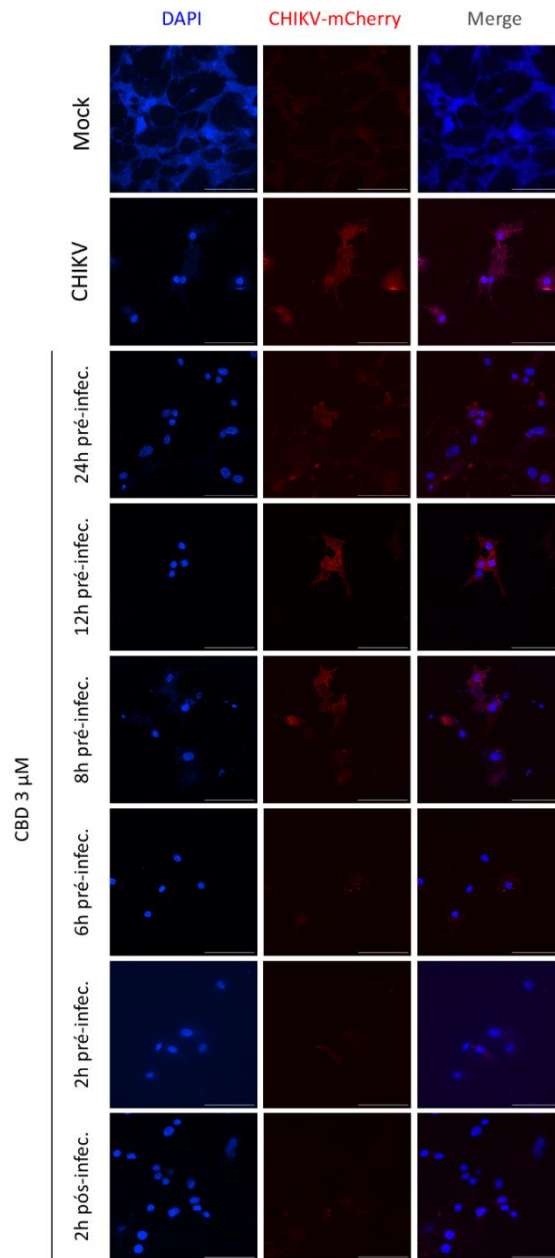
O CBD é capaz de modular a função das células imunes, exercendo efeitos anti-inflamatórios que podem ser atribuídos a via do NF- κ B e do interferon beta (IFN β) (Kozela *et al.*, 2010), este último um interferon do tipo I e importante antiviral (Haji

Albolvahab *et al.*, 2016) que atua recrutando células para promover a ativação da resposta imune adquirida do hospedeiro, inibindo assim a proliferação das células infectadas e consequentemente, limitando a replicação viral (Lee; Ashkar, 2018).

Nosso próximo passo foi investigar os efeitos do CBD na infecção por CHIKV. Para isso, CBD foi utilizado em diferentes períodos de tempo na forma de pré- e pós-tratamento durante a infecção viral. Para a primeira condição, incubamos o CBD 24, 12, 8, 6 e 2 horas antes da infecção com CHIKV. Para observarmos efeito após a infecção, utilizamos o CBD 2 horas após a incubação com vírus. Mock sem infecção e CHIKV sem tratamento foram utilizados como os controles do experimento.

O CBD mostrou ser capaz de proteger as células tanto antes da infecção, quanto após a infecção. Os efeitos puderam ser observados de maneira mais visível a partir do período de 6 hrs antes da infecção, com o pico da efetividade sendo observado no tratamento de 2 hrs após a infecção do CHIKV (**Figura 7**). Isso sugere que o CBD pode proteger contra o CHIKV tanto nos estágios iniciais da infecção, quanto em estágios posteriores. O pico da concentração plasmática do CBD ocorre entre 2,5 e 5 horas, o que pode explicar a eficácia menos significativa nos pré-tratamentos de 24, 12 e 8 hrs (Meissner; Cascella, 2024).

Figura 7 – CBD reduz infecção *in vitro* pelo CHIKV.



Fonte: do autor (2024)

Nota: Eficácia do CBD, na concentração de 3 micromolar (μM), frente à infecção pelo CHIKV nos períodos de 24, 12, 8, 6 e 2 hrs antes da infecção, além de 2 hrs após a infecção. A imagem representa o DNA, DAPI (em azul) infectadas pelo vírus (pontos fluorescentes em vermelho). MOCK – controle sem infecção; CHIKV – vírus Chikungunya; DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol; Merge – sobreposição das imagens à esquerda. Barra de escala: 100 micrometros.

Em um estudo publicado em 2022, células renais utilizadas como controle e tratadas com CBD na concentração de 2 μM mostraram uma expressão significativamente elevada do gene IFN β e de outros IFN, mostrando o efeito benéfico de preparação da imunidade celular que o CBD proporciona. Além disso, neste mesmo estudo, também foi mostrado que o CBD, sozinho, não causou apoptose ou reduziu o número de células (Fernandes *et al.*, 2022).

Como pode ser observado na **Figura 7**, o pré-tratamento com CBD no período de 24 horas não foi muito eficaz. Em um estudo publicado este ano, células hepáticas HepG2 e hepatócitos humanos expostas ao mesmo período de tratamento demonstraram danos celulares significativos após a exposição ao tratamento, devido a distúrbios no ciclo celular e estresse do retículo endoplasmático (Chen *et al.*, 2024). Evidentemente, o CBD age nas células por si próprio, induzindo um determinado nível de estresse. Contudo, no referido estudo as concentrações de CBD utilizadas foram de 50 e 100 μM , muito mais elevadas do que as utilizadas aqui, o que, de certa forma, pode ter levado à uma maior chance de morte celular. Daí surge a importância de se usar doses baixas, como nos nossos experimentos. Obviamente, nossa intenção é eliminar o CHIKV e também preservar as células, como em qualquer tratamento. Visto que o CBD age como um estressor, usar doses mais elevadas não significa que um efeito mais significativo será obtido. No nosso pré-tratamento de 24 horas, conseguimos preservar as células integralmente, permitindo assim que houvesse a infecção, mesmo que não tenhamos obtido uma redução viral eficaz.

Em nosso estudo, hipotetizamos que o CBD pode levar a uma redução da carga viral por meio do aumento da produção de IFN do tipo I (dado o potencial imunomodulador da substância). Ao utilizarmos uma quantidade menor de vírus (MOI de 1), as células espectadoras (ainda não infectadas pelo CHIKV) podem ter sido preparadas imunologicamente pelo CBD para responder à infecção (pré-tratamento), principalmente no período de 6 horas (próximo ao pico da concentração plasmática do CBD, que é de 2,5 a 5 horas (Meissner; Cascella, 2024), que teve um efeito virucida mais consistente, juntamente com o pré-tratamento de 2 horas e o pós-tratamento de 2 horas. Caso tivéssemos utilizado uma quantidade de vírus maior, como MOI de 5, as células espectadoras estariam em menor quantidade (quando comparadas ao MOI de 1), pois já estariam infectadas e não teriam tempo para serem preparadas pelo CBD.

Estruturalmente, o CBD é caracterizado por um anel aromático, um anel terpeno perpendicular e uma cadeia lateral pentil (Pagano *et al.*, 2020). Mesmo sendo usado

amplamente e estando disponível nas farmácias, ainda há poucas informações acerca dos parâmetros farmacocinéticos do CBD em humanos. Sua meia-vida varia de 1,4 a 10,9 horas após ser administrado de forma oral por spray e de 2 a 5 dias com administração oral repetida. Intravenosamente, sua meia-vida é de 24 horas, e após fumar, 31 horas (Millar *et al.*, 2018). É lipofílico e tem uma distribuição rápida nos pulmões, fígado, coração, cérebro e tecidos hipovascularizados. Sua lipofilicidade permite que ele seja transportado através da placenta para o leite materno, sendo metabolizado no fígado e excretado principalmente pela via fecal (Kis *et al.*, 2019).

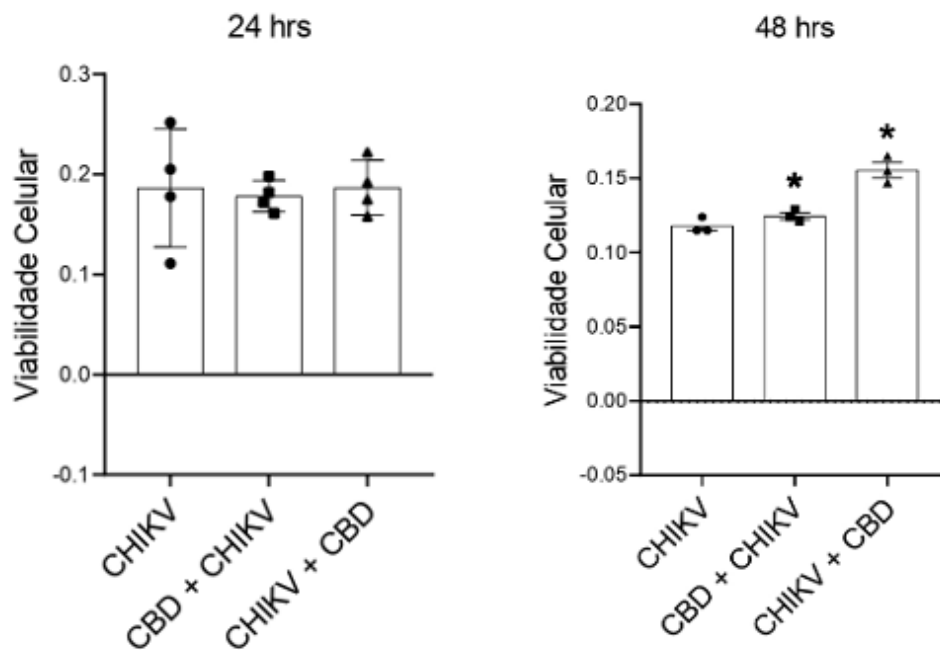
Quando comparado com o tetrahydrocanabidiol (THC), o CBD parece exercer menos efeitos colaterais. A literatura destaca que os efeitos negativos do THC incluem euforia, estado confusional, sonolência, midríase, taquicardia, alterações na pressão arterial e degeneração neuronal (Rawal *et al.*, 2012; Muthumalage *et al.*, 2019), enquanto que na cavidade oral os efeitos incluem xerostomia, leucoplasia e gengivite (Cho *et al.*, 2005). Os efeitos de ambos parecem se contraporem uns aos outros, como no sistema nervoso central (SNC), onde o THC é rotulado como perigoso, devido aos seus psicoativos prejudiciais, enquanto que o CBD mostra-se como seguro, por causa de sua capacidade de neutralização dos efeitos do THC (Pintori *et al.*, 2023). Tanto o THC quanto o CBD interagem com os receptores CB1 e CB2 metabotrópicos. Contudo, as ações exercidas por eles nesses receptores diferem completamente: enquanto o THC possui ação como agonista parcial (Pertwee, 2008), o CBD atua como um modulador alostérico negativo (Ligresti *et al.*, 2016), reduzindo a potência e a eficácia dos agonistas do CBR, como o THC e outros ligantes (Martínez *et al.*, 2020; Elmes *et al.*, 2015). Tomando como base estes dados, parece ser muito mais plausível a utilização do CBD em vez do THC, devido aos efeitos negativos deste último, mesmo que ele também exerça efeitos antivirais (Medveczky *et al.*, 2004; Molina *et al.*, 2011; Chandra *et al.*, 2015; Raj *et al.*, 2021; Pitakbut *et al.*, 2022).

Embora, a princípio, estes resultados possam sugerir que o CBD possa ser usado como preventivo contra a infecção pelo CHIKV, muitas questões devem ser consideradas antes que o CBD possa ser levado em consideração para a prevenção contra este vírus. Como este é um estudo exploratório e *in vitro*, ainda é cedo demais para se afirmar qualquer conclusão. Outros testes são necessários para a obtenção de dados mais consistentes: testar o CBD em macrófagos para avaliar a inflamação é um deles, visto que estas células do sistema imune são utilizadas pelo CHIKV como reservatórios para a sua replicação (Yao *et al.*, 2023).

5.5 CBD PREVINE O EFEITO CITOPÁTICO CAUSADO PELO CHIKV *IN VITRO*

Finalmente, realizamos ensaios *in vitro* com células Vero para avaliar o efeito protetor do CBD contra o CHIKV. Para isso, plaqueamos as células Vero e após aderência e confluência, infectamos com CHIKV por 24 e 48 horas. Após os tempos de infecção, utilizamos ensaio colorimético de viabilidade WST-8/CCK8. Observamos, a redução da viabilidade celular, ou seja, o efeito citopático (CPE) causado pelo CHIKV, principalmente após 48 horas. De maneira interessante, após incubarmos o CBD 2 horas antes ou após a infecção, observamos que o composto reduziu significativamente o CPE nas células infectadas (**Figura 8**).

Figura 8 – CBD atenua os efeitos citopáticos causados pelo CHIKV.



Fonte: do autor (2024)

Nota: Efeito citopático do vírus frente às células Vero, nos períodos de 24 e 48 horas. Os asteriscos (*) indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) comparado ao grupo controle (CHIKV), conforme apontado pela análise de variância unidirecional (*One-way ANOVA*) e pelo pós-teste de Dunnett.

O CPE se refere ao conjunto de alterações celulares provocadas por uma infecção viral, sendo um marcador direto da infecção. Tais alterações são altamente específicas do vírus, constituindo um marcador fenotípico de muitas espécies de vírus

(Céspedes-Tenório; Arias-Arias, 2023). No caso do CHIKV, a literatura mostra que ele é altamente citopático em cultura de células humanas, com as células infectadas sofrendo morte celular apoptótica de forma rápida (Griffin, 2007; Sourisseau *et al.*, 2007). Em outro estudo que também utilizou células Vero, o efeito citopático produzido pelo CHIKV nestas células foi mais forte do que o produzido em células de mosquito (Yong-Gang *et al.*, 2013).

Em 2020, um estudo realizado em modelos humanos de tecidos orais, intestinais e das vias aéreas descobriu que extratos de *Cannabis sativa* com alto teor de CBD são capazes de modular o nível de TMPRSS2, reduzindo assim a entrada do SARS-CoV-2 nas células e, conseqüentemente, levando à uma redução da carga viral (Wang *et al.*, 2020), visto que esta é uma protease necessária para a entrada do vírus (Hoffmann *et al.*, 2020). Como aqui utilizamos células que expressam TMPRSS2, o CBD pode ter regulado negativamente o nível desta proteína, reduzindo a invasão celular pelo CHIKV.

De acordo com a **Figura 8**, observamos que a viabilidade foi preservada mais fortemente quando o CBD foi empregado no pós-tratamento. Isso levanta dúvidas como, por exemplo, se o CBD também seria capaz de atuar no CHIKV e se o seu campo de ação se restringe unicamente às células. Indubitavelmente, sugerimos que o pré-tratamento deixou as células bem preparadas imunologicamente para lidar com a infecção viral, o que indica de forma nítida a proteção a nível celular fornecida pelo CBD, estendendo assim a viabilidade. Já foi demonstrado por pesquisadores que a infecção pelo CHIKV leva à um aumento do IFN α dentro de um período de 24 horas, e os mesmos argumentam que essa expressão aumentada poderia explicar, potencialmente, a diminuição da replicação viral dentro de 48 horas após a infecção (Archila *et al.*, 2022). Esse mesmo quadro também poderia se encaixar aqui, explicando assim a maior viabilidade celular dentro do período de 48 horas.

6 CONCLUSÃO

De acordo com o apresentado, demonstramos que o CBD foi capaz de inibir a infecção pelo CHIKV *in vitro*, tanto antes quanto após a infecção viral. Esses resultados sugerem o potencial do CBD como um agente antiviral e/ou imunomodulador, destacando a importância de estudos adicionais em outros modelos *in vitro* como em macrófagos infectados e ensaios *in vivo* para avaliar outros parâmetros de sua ação e segurança.

REFERÊNCIAS

- ADARSH M.B., SHARMA S.K., DWIVEDI P., SINGH M.P., DHIR V., JAIN S. Methotrexate in Early Chikungunya Arthritis: A 6 Month Randomized Controlled Open-label Trial. **Current Rheumatology Reviews**, Índia, v. 16, n. 4, p. 319-323, 2020.
- ALMADA M., AMARAL C., OLIVEIRA A., FERNANDES P.A., RAMOS M.J., FONSECA B.M., CORREIA-DA-SILVA G., TEIXEIRA N. Cannabidiol (CBD) but not tetrahydrocannabinol (THC) dysregulate in vitro decidualization of human endometrial stromal cells by disruption of estrogen signaling. **Reproductive Toxicology**, Portugal, v. 93, p. 75-82, 2020.
- AMARAL J.K., BINGHAM C.O. 3rd, SCHOEN R.T. Successful Methotrexate Treatment of Chronic Chikungunya Arthritis. **Journal of Clinical Rheumatology**, Estados Unidos, v. 26, n. 3, p. 119-124, 2020.
- AMARAL J.K., SUTARIA R., SCHOEN R.T. Treatment of Chronic Chikungunya Arthritis With Methotrexate: A Systematic Review. **Arthritis Care & Research (Hoboken)**, Estados Unidos, v. 70, n. 10, p. 1501-1508, 2018.
- AMMERMAN, N.C., BEIER-SEXTON, M. and AZAD, A.F. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. **Current Protocols in Microbiology**, Estados Unidos, v. 11, p. A.4E.1-A.4E.7, 2008.
- ANEKAR A.A., HENDRIX J.M., CASCELLA M. **WHO Analgesic Ladder**. Treasure Island, Flórida: StatPearls Publishing, 23 jan. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554435/>. Acesso em 30 jan. 2025.
- ANTUNES DE BRITO, C. A. et al. Pharmacologic management of pain in patients with Chikungunya: a guideline. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 49, p. 668–679, 2016.
- APPASSAKIJ H., KHUNTIKI P., KEMAPUNMANUS M., WUTTHANARUNGSAN R., SILPAPOJAKUL K. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? **Transfusion**, Tailândia, v. 53, n. 10 Pt 2, p. 2567-2574, 2013.
- ARCHILA E.D., LÓPEZ L.S., CASTELLANOS J.E., CALVO E.P. Molecular and biological characterization of an Asian-American isolate of Chikungunya virus. **PLoS One**, Colômbia, v. 17, n. 4, p. e0266450, 2022.
- ARPINO C., CURATOLO P., REZZA G. Chikungunya and the nervous system: what we do and do not know. **Reviews in Medical Virology**, Itália, v. 19, n. 3, p. 121-129, 2009.
- ARZIMANOGLU A., BRANDL U., CROSS J.H., GIL-NAGEL A., LAGAE L., LANDMARK C.J., SPECCHIO N., NABBOUT R., THIELE E.A., GUBBAY O. The Cannabinoids International Experts Panel; Collaborators. Epilepsy and cannabidiol: a guide to treatment. **Epileptic Disorders**, França, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2020.
- BANDEIRA A.C., CAMPOS G.S., ROCHA V.F., SOUZA B.S., SOARES M.B., OLIVEIRA A.A., ABREU Y.C., MENEZES G.S., SARDI S.I. Prolonged shedding of

Chikungunya virus in semen and urine: A new perspective for diagnosis and implications for transmission. **IDCases**, Brasil, v. 6, p. 100-103, 2016.

BANDYOPADHYAY D., GHOSH S.K. Mucocutaneous features of Chikungunya fever: a study from an outbreak in West Bengal, India. **Indian Journal of Dermatology**, Índia, v. 47, n. 11, p. 1148-1152, 2008.

BEYERSTEDT S., CASARO E.B., RANGEL É.B. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Brasil, v. 40, n. 5, p. 905-919, 2021.

BONACCORSO S., RICCIARDI A., ZANGANI C., CHIAPPINI S., SCHIFANO F. Cannabidiol (CBD) use in psychiatric disorders: A systematic review. **Neurotoxicology**, Reino Unido, v. 74, p. 282-298, 2019.

BOUHASSIRA D., ATTAL N., ALCHAAR H., BOUREAU F., BROCHET B., BRUXELLE J., CUNIN G., FERMANIAN J., GINIES P., GRUN-OVERDYKING A., JAFARI-SCHLUEP H., LANTÉRI-MINET M., LAURENT B., MICK G., SERRIE A., VALADE D., VICAUT E. Comparison of pain syndromes associated with nervous or somatic lesions and development of a new neuropathic pain diagnostic questionnaire (DN4). **Pain**, França, v. 114, n. 1-2, p. 29-36, 2005.

BOUQUILLARD E, COMBE B. A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following Chikungunya fever. A mean follow-up of two years. **Joint Bone Spine**, França, v. 76, n. 6, p. 654-657, 2009.

BRIGHTON S.W., PROZESKY O.W., DE LA HARPE A.L. Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. **South African Medical Journal**, África do Sul, v. 63, n. 9, p. 313-315, 1983.

BROWN A.J. *et al.* Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase. **Antiviral Research**, Estados Unidos, v. 169, p. 104541, 2019.

BURT F.J., ROLPH M.S., RULLI N.E., MAHALINGAM S., HEISE M.T. Chikungunya: a re-emerging virus. **Lancet**, África do Sul, v. 379, n. 9816, p. 662-671, 2012.

CAMARDA V., FISCHETTI C., ANZELLOTTI N., MOLINARI P., AMBROSIO C., KOSTENIS E., REGOLI D., TRAPPELLA C., GUERRINI R., SEVERO S., CALO G. Pharmacological profile of NOP receptors coupled with calcium signaling via the chimeric protein G alpha q_{i5}. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Itália, v. 379, n. 6, p. 599-607, 2009.

CAREY D.E., MYERS R.M., DERANITZ C.M., JADHAV M., REUBEN R. The 1964 chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Índia, v. 63, n. 4, p. 434-445, 1969.

CASE J.B., ROTHLAUF P.W., CHEN R.E., LIU Z., ZHAO H., KIM A.S., BLOYET L.M., ZENG Q., TAHAN S., DROIT L., ILAGAN M.X.G., TARTELL M.A., AMARASINGHE G., HENDERSON J.P., MIERSCH S., USTAV M., SIDHU S., VIRGIN H.W., WANG D., DING S., CORTI D., THEEL E.S., FREMONT D.H.,

DIAMOND M.S., WHELAN S.P.J. Neutralizing Antibody and Soluble ACE2 Inhibition of a Replication-Competent VSV-SARS-CoV-2 and a Clinical Isolate of SARS-CoV-2. **Cell Host & Microbe**, Estados Unidos, v. 28, n. 3, p. 475-485, 2020.

CÉSPEDES-TENORIO D., ARIAS-ARIAS J.L. The Virus-Induced Cytopathic Effect. **Sub-cellular Biochemistry**, Costa Rica, v. 106, p. 197-210, 2023.

CHAN J.F., CHAN K.H., CHOI G.K., TO K.K., TSE H., CAI J.P., YEUNG M.L., CHENG V.C., CHEN H., CHE X.Y., LAU S.K., WOO P.C., YUEN K.Y. Differential cell line susceptibility to the emerging novel human betacoronavirus 2c EMC/2012: implications for disease pathogenesis and clinical manifestation. **Journal of Infectious Diseases**, China, v. 207, n. 11, p. 1743-1752, 2013.

CHANDRA L.C., KUMAR V., TORBEN W., VANDE STOUWE C., WINSAUER P., AMEDEE A., MOLINA P.E., MOHAN M. Chronic administration of Δ 9-tetrahydrocannabinol induces intestinal anti-inflammatory microRNA expression during acute simian immunodeficiency virus infection of rhesus macaques. **Journal of Virology**, Estados Unidos, v. 89, n. 2, p. 1168-1181, 2015.

CHARREL R.N., DE LAMBALLERIE X., RAOULT D. Chikungunya outbreaks--the globalization of vectorborne diseases. **New England Journal of Medicine**, França, v. 356, n. 8, p. 769-771, 2007.

CHEN R., WANG E., TSETSARKIN K.A., WEAVER S.C. Chikungunya virus 3' untranslated region: adaptation to mosquitoes and a population bottleneck as major evolutionary forces. **PLoS Pathogens**, Estados Unidos, v. 9, n. 8, p. e1003591, 2013.

CHEN S., LI X., WU Q., LI Y., PUIG M., MOULIN F., CHOUDHURI S., GINGRICH J., GUO L. Investigation of cannabidiol-induced cytotoxicity in human hepatic cells. **Toxicology**, Estados Unidos, v. 506, p. 153884, 2024.

CHEN W., FOO S.S., TAYLOR A., LULLA A., MERITS A., HUESTON L., FORWOOD M.R., WALSH N.C., SIMS N.A., HERRERO L.J., MAHALINGAM S. Bindarit, an inhibitor of monocyte chemotactic protein synthesis, protects against bone loss induced by chikungunya virus infection. **Journal of Virology**, Austrália, v. 89, n. 23, p. 12232, 2015.

CHO C.M., HIRSCH R., JOHNSTONE S. General and oral health implications of cannabis use. **Australian Dental Journal**, Austrália, v. 50, n. 2, p. 70-74, 2005.

COUDERC T., GANGNEUX N., CHRÉTIEN F., CARO V., LE LUONG T., DUCLOUX B., TOLOU H., LECUIT M., GRANDADAM M. Chikungunya virus infection of corneal grafts. **Journal of Infectious Diseases**, França, v. 206, n. 6, p. 851-859, 2012.

DE ANDREA M., RAVERA R., GIOIA D., GARIGLIO M., LANDOLFO S. The interferon system: an overview. **European Journal of Paediatric Neurology**, Itália, v. 6, Suplemento A, p. A41-A46, 2002.

DE LAMBALLERIE X., BOISSON V., REYNIER J.C., ENAULT S., CHARREL R.N., FLAHAULT A., ROQUES P., LE GRAND R. On chikungunya acute infection and chloroquine treatment. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, França, v. 8, n. 6, p. 837-839, 2008.

DE LIMA CAVALCANTI T.Y.V., PEREIRA M.R., DE PAULA S.O., FRANCA R.F.O. A Review on Chikungunya Virus Epidemiology, Pathogenesis and Current Vaccine Development. **Viruses**, Brasil, v. 14, n. 5, p. 969, 2022.

DIGHE H., SARKALE P., PATIL D.Y., MOHANDAS S., SHETE A.M., SAHAY R.R., LAKRA R., PATIL S., MAJUMDAR T., GAWANDE P., YEMUL J., VEDPATHAK P., YADAV P.D. Differential Cell Line Susceptibility to the SARS-CoV-2 Omicron BA.1.1 Variant of Concern. **Vaccines (Basel)**, Índia, v. 10, n. 11, p. 1962, 2022.

ECONOMOPOULOU A., DOMINGUEZ M., HELYNCK B., SISSOKO D., WICHMANN O., QUENEL P., GERMONNEAU P., QUATRESOUS I. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Réunion. **Epidemiology and Infection**, França, v. 137, n. 4, p. 534-541, 2009.

ELMES M.W., KACZOCHA M., BERGER W.T., LEUNG K., RALPH B.P., WANG L., SWEENEY J.M., MIYAUCHI J.T., TSIRKA S.E., OJIMA I., DEUTSCH D.G. Fatty acid-binding proteins (FABPs) are intracellular carriers for Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) and cannabidiol (CBD). **Journal of Biological Chemistry**, Estados Unidos, v. 290, n. 14, p. 8711-8721, 2015.

EWEAS A.F., ALHOSSARY A.A., ABDEL-MONEIM A.S. Molecular Docking Reveals Ivermectin and Remdesivir as Potential Repurposed Drugs Against SARS-CoV-2. **Frontiers in Microbiology**, Arábia Saudita, v. 11, p. 592908, 2021.

FERNANDES A.I.V., SOUZA J.R., SILVA A.R., CRUZ S.B.S.C., CASTELLANO L.R.C. Immunoglobulin Therapy in a Patient With Severe Chikungunya Fever and Vesiculobullous Lesions. **Frontiers in Immunology**, Brasil, v. 2, n. 10, p. 1498, 2019.

FERNANDES M.F., CHAN J.Z., HUNG C.C.J., TOMCZEWSKI M.V., DUNCAN R.E. Effect of cannabidiol on apoptosis and cellular interferon and interferon-stimulated gene responses to the SARS-CoV-2 genes ORF8, ORF10 and M protein. **Life Sciences**, Canadá, v. 15, n. 301, p. 120624, 2022.

FERNÁNDEZ-SALAS I., DANIS-LOZANO R., CASAS-MARTÍNEZ M., ULLOA A., BOND J.G., MARINA C.F., LOPEZ-ORDÓÑEZ T., ELIZONDO-QUIROGA A., TORRES-MONZÓN J.A., DÍAZ-GONZÁLEZ E.E. Historical inability to control *Aedes aegypti* as a main contributor of fast dispersal of chikungunya outbreaks in Latin America. **Antiviral Research**, México, v. 124, p. 30-42, 2015.

GÉRARDIN P., BARAU G., MICHAULT A., BINTNER M., RANDRIANAIVO H., CHOKER G., LENGLET Y., TOURET Y., BOUVERET A., GRIVARD P., LE ROUX K., BLANC S., SCHUFFENECKER I., COUDERC T., ARENZANA-SEISDEDOS F., LECUIT M., ROBILLARD P.Y. Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. **PLoS Medicine**, França, v. 5, n. 3, p. e60, 2008.

GIRÃO E.S., RODRIGUES DOS SANTOS B.G., DO AMARAL E.S., COSTA P.E.G., PEREIRA K.B., DE ARAUJO FILHO A.H., HYPPOLITO E.B., MOTA M.U., MARQUES L.C.B.F., COSTA DE OLIVEIRA C.M., DA SILVA S.L., GARCIA J.H.P., FERNANDES P.F.C.B.C. Chikungunya Infection in Solid Organ Transplant Recipients. **Transplantation Proceedings**, Colômbia, v. 49, n. 9, p. 2076-2081, 2017.

GONDIM M.V.P, SHERRILL-MIX S., BIBOLLET-RUCHE F., RUSSELL R.M., TRIMBOLIS., SMITH A.G., LI Y., LIU W., AVITTO A.N., DE VOTO J.C., CONNELL J., FENTON-MAY A.E., PELLEGRINO P., WILLIAMS I., PAPASAVVAS E., LORENZI J.C.C., SALANTES D.B., MAMPE F., MONROY M.A., COHEN Y.Z., HEATH S., SAAG M.S., MONTANER L.J., COLLMAN R.G., SILICIANO J.M., SILICIANO R.F., PLENDERLEITH L.J., SHARP P.M., CASKEY M., NUSSENZWEIG M.C., SHAW G.M., BORROW P., BAR K.J., HAHN B.H. Heightened resistance to host type 1 interferons characterizes HIV-1 at transmission and after antiretroviral therapy interruption. **Science Translational Medicine**, Estados Unidos, v. 13, n. 576, p. eadb8179, 2021.

GRIFFIN, D. E. **Fields Virology**. 5 ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 3091 p.

GUBLER DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, Estados Unidos, v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

HAJI ABDOLVAHAB M., MOFRAD M.R., SCHELLEKENS H. Interferon Beta: From Molecular Level to Therapeutic Effects. **International Review of Cell and Molecular Biology**, Países Baixos, v. 326, p. 343-372, 2016.

HAWLEY WA, REITER P, COPELAND RS, PUMPUNI CB, CRAIG GB JR. *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. **Science**, França, v. 236, n. 4805, p. 1114-1116, 1987.

HIGGS S., VANLANDINGHAM D. Chikungunya virus and its mosquito vectors. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, Estados Unidos, v. 15, n. 4, p. 231-240, 2015.

HOARAU J.J., JAFFAR BANDJEE M.C., KREJBICH TROTOT P., DAS T., LI-PAT-YUEN G., DASSA B., DENIZOT M., GUICHARD E., RIBERA A., HENNI T., TALLET F., MOITON M.P., GAUZÈRE B.A., BRUNIQUET S., JAFFAR BANDJEE Z., MORBIDELLI P., MARTIGNY G., JOLIVET M., GAY F., GRANDADAM M., TOLOU H., VIEILLARD V., DEBRÉ P., AUTRAN B., GASQUE P. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **Journal of Immunology**, França, v. 184, n. 10, p. 5914-5927, 2010.

HOFFMAN A.F., LUPICA C.R. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, Estados Unidos, v. 20, n. 7, p. 2470-2479, 2000.

HOFFMANN M., KLEINE-WEBER H., SCHROEDER S., KRÜGER N., HERRLER T., ERICHSEN S., SCHIERGENS T.S., HERRLER G., WU N.H., NITSCHKE A., MÜLLER M.A., DROSTEN C., PÖHLMANN S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, Alemanha, v. 181, n. 2, p. 271-280, 2020.

HORWOOD P.F., BUCHY P. Chikungunya. **Revue Scientifique et Technique**, Cambodja, v. 34, n. 2, p. 479-489, 2015.

HUA C., COMBE B. Chikungunya Virus-Associated Disease. **Current Rheumatology Reports**, França, v. 19, n. 11, p. 69, 2017.

INAMADAR, A.C., PALIT, A., SAMPAGAVI, V.V., RAGHUNATH, S. AND DESHMUKH, N.S. Cutaneous manifestations of chikungunya fever: observations made during a recent outbreak in south India. **International Journal of Dermatology**, Índia, v. 47, p. 154-159, 2008.

IVASHKIV L.B., DONLIN L.T. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews Immunology**, Estados Unidos, v. 14, n. 1, p. 36-49, 2014.

JASTRZĄB A., GĘGOTEK A., SKRZYDLEWSKA E. Cannabidiol Regulates the Expression of Keratinocyte Proteins Involved in the Inflammation Process through Transcriptional Regulation. **Cells**, Polônia, v. 8, n. 8, p. 827, 2019.

JIN J., SHERMAN M.B., CHAFETS D., DINGLASAN N., LU K., LEE T.H., CARLSON L.A., MUENCH M.O., SIMMONS G. An attenuated replication-competent chikungunya virus with a fluorescently tagged envelope. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Estados Unidos, v. 12, n. 7, p. e0006693, 2018.

KALLIO K., HELLSTRÖM K., JOKITALO E., AHOLA T. RNA Replication and Membrane Modification Require the Same Functions of Alphavirus Nonstructural Proteins. **Journal of Virology**, Tailândia, v. 90, n. 3, p. 1687-1692, 2015.

KAM Y.W., ONG E.K., RÉNIA L., TONG J.C., NG L.F. Immuno-biology of Chikungunya and implications for disease intervention. **Microbes and Infection**, Singapura, v. 11, n. 14-15, p. 1186-1196, 2009.

KHANNA N.R., GERRIETS V. **Interferon**. Treasure Island, Flórida: StatPearls Publishing, 10 jul. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555932/#>. Acesso em 30 jan. 2025.

KIELIAN M., CHANEL-VOS C., LIAO M. Alphavirus Entry and Membrane Fusion. **Viruses**, Estados Unidos, v. 2, n. 4, p. 796-825, 2010.

KIESSLICH S., KAMEN A.A. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines. **Biotechnology Advances**, Canadá, v. 44, p. 107609, 2020.

KIM S.R., JEONG M.S., MUN S.H., CHO J., SEO M.D., KIM H., LEE J., SONG J.H., KO H.J. Antiviral Activity of Chrysin against Influenza Virus Replication via Inhibition of Autophagy. **Viruses**, Coreia do Sul, v. 13, n. 7, p. 1350, 2021.

KIRUI J., ABIDINE Y., LENMAN A., ISLAM K., GWON Y.D., LASSWITZ L., EVANDER M., BALLY M., GEROLD G. The Phosphatidylserine Receptor TIM-1 Enhances Authentic Chikungunya Virus Cell Entry. **Cells**, Alemanha, v. 10, n. 7, p. 1838, 2021.

KIS B., IFRIM F.C., BUDA V., AVRAM S., PAVEL I.Z., ANTAL D., PAUNESCU V., DEHELEAN C.A., ARDELEAN F., DIACONEASA Z., SOICA C., DANCIU C. Cannabidiol-from Plant to Human Body: A Promising Bioactive Molecule with Multi-Target Effects in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, Romênia, v. 20, n. 23, p. 5905, 2019.

KONDO F.V., CABRERA W.H.K., RIBEIRO O.G., DE FRANCO M., JENSEN J.R., PICOLO G., SANT'ANNA M.B., SPADAFORA-FERREIRA M., BORREGO A., IBAÑEZ O.M., STAROBINAS N. Pain and Cellular Migration Induced by Bothrops jararaca Venom in Mice Selected for an Acute Inflammatory Response: Involvement of Mast Cells. **Frontiers in Immunology**, Brasil, v. 12, p. 779473, 2022.

KOZELA E., PIETR M., JUKNAT A., RIMMERMAN N., LEVY R., VOGEL Z. Cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially inhibit the lipopolysaccharide-activated NF-kappaB and interferon-beta/STAT proinflammatory pathways in BV-2 microglial cells. **Journal of Biological Chemistry**, Israel, v. 285, n. 3, p. 1616-1626, 2010.

KREJBICH-TROTOT P., DENIZOT M., HOARAU J.J., JAFFAR-BANDJEE M.C., DAS T., GASQUE P. Chikungunya virus mobilizes the apoptotic machinery to invade host cell defenses. **FASEB Journal**, Ilha da Reunião, v. 25, n. 1, p. 314-25, 2010.

KUMAR S., SARMA P., KAUR H., PRAJAPAT M., BHATTACHARYYA A., AVTI P., SEKHAR N., KAUR H., BANSAL S., MAHENDIRATTA S., MAHALMANI V.M., SINGH H., PRAKASH A., KUHAD A., MEDHI B. Clinically relevant cell culture models and their significance in isolation, pathogenesis, vaccine development, repurposing and screening of new drugs for SARS-CoV-2: a systematic review. **Tissue Cell**, Índia, v. 70, p. 101497, 2021.

KUMAR R., AHMED S., PARRAY H.A., DAS S. Chikungunya and arthritis: An overview. **Travel Medicine and Infectious Disease**, Índia, v. 44, p. 102618, 2021.

LABADIE K., LARCHER T., JOUBERT C., MANNIOUI A., DELACHE B., BROCHARD P., GUIGAND L., DUBREIL L., LEBON P., VERRIER B., DE LAMBALLERIE X., SUHRBIER A., CHEREL Y., LE GRAND R., ROQUES P. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, França, v. 120, n. 3, p. 894-906, 2010.

LAKSHMANAN I., BATRA S.K. Protocol for Apoptosis Assay by Flow Cytometry Using Annexin V Staining Method. **Bio-protocol**, Estados Unidos, v. 3, n. 6, p. e374, 2013.

LAMERS M.M., MYKYTYN A.Z., BREUGEM T.I., WANG Y., WU D.C., RIESEBOSCH S., VANDEN DOEL P.B., SCHIPPER D., BESTEBROER T., WU N.C., HAAGMANS B.L. Human airway cells prevent SARS-CoV-2 multibasic cleavage site cell culture adaptation. **eLife**, Estados Unidos, v. 10, p. e66815, 2021.

LASFAR A., ZLOZA A., COHEN-SOLAL K.A. IFN-lambda therapy: current status and future perspectives. **Drug Discovery Today**, Estados Unidos, v. 21, n. 1, p. 167-171, 2016.

LAURENT P., LE ROUX K., GRIVARD P., BERTIL G., NAZE F., PICARD M., STAIKOWSKY F., BARAU G., SCHUFFENECKER I., MICHAULT A. Development of a sensitive real-time reverse transcriptase PCR assay with an internal control to detect and quantify chikungunya virus. **Clinical Chemistry**, Ilha da Reunião, v. 53, n. 8, p. 1408-1414, 2007.

LEE A.J., ASHKAR A.A. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. **Frontiers in Immunology**, Canadá, v. 9, p. 2061, 2018.

LEE C.H.R., MOHAMED HUSSAIN K., CHU J.J.H. Macropinocytosis dependent entry of Chikungunya virus into human muscle cells. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Singapura, v. 13, n. 8, p. e0007610, 2019.

LEMANT J., BOISSON V., WINER A., THIBAUT L., ANDRÉ H., TIXIER F., LEMERCIER M., ANTOK E., CRESTA M.P., GRIVARD P., BESNARD M., ROLLOT O., FAVIER F., HUERRE M., CAMPINOS J.L., MICHAULT A. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005-2006. **Critical Care Medicine**, França, v. 36, n. 9, p. 2536-2541, 2008.

LI Y.G., SIRIPANYAPHINYO U., TUMKOSIT U., NORANATE N., ANUEGOONPIPAT A., TAO R., KUROSU T., IKUTA K., TAKEDA N., ANANTAPREECHA S. Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. **Intervirolgy**, Japão, v. 56, n. 1, p. 6-12, 2013.

LIGRESTI A., DE PETROCELLIS L., DI MARZO V. From Phytocannabinoids to Cannabinoid Receptors and Endocannabinoids: Pleiotropic Physiological and Pathological Roles Through Complex Pharmacology. **Physiological Reviews**, Itália, v. 96, n. 4, p. 1593-1659, 2016.

LIU C.C., LEE S.C., BUTLER M., WU S.C. High genetic stability of dengue virus propagated in MRC-5 cells as compared to the virus propagated in vero cells. **PLoS One**, Taiwan, v. 3, n. 3, p. e1810, 2008.

LOWE H.I., TOYANG N.J., MCLAUGHLIN W. Potential of Cannabidiol for the Treatment of Viral Hepatitis. **Pharmacognosy Research**, Jamaica, v. 9, n. 1, p. 116-118, 2017.

MADARIAGA M., TICONA E., RESURRECION C. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Peru, v. 20, n. 1, p. 91-98, 2016.

MARÍN-PALMA D., TABARES-GUEVARA J.H., ZAPATA-CARDONA M.I., FLÓREZ-ÁLVAREZ L., YEPES L.M., RUGELES M.T., ZAPATA-BUILES W., HERNANDEZ J.C., TABORDA N.A. Curcumin Inhibits In Vitro SARS-CoV-2 Infection In Vero E6 Cells through Multiple Antiviral Mechanisms. **Molecules**, Colômbia, v. 26, n. 22, p. 6900, 2021.

MARQUEZ A.B., VICENTE J., CASTRO E., VOTA D., RODRÍGUEZ-VARELA M.S., LANZA CASTRONUOVO P.A., FUENTES G.M., PARISE A.R., ROMORINI L., ALVAREZ D.E., BUENO C.A., RAMIREZ C.L., ALAIMO A., GARCÍA C.C. Broad-Spectrum Antiviral Effect of Cannabidiol Against Enveloped and Nonenveloped Viruses. **Cannabis and Cannabinoid Research**, Argentina, v. 9, n. 3, p. 751-765, 2024.

MARTÍNEZ V., IRIONDO DE-HOND A., BORRELLI F., CAPASSO R., DEL CASTILLO M.D., ABALO R. Cannabidiol and Other Non-Psychoactive Cannabinoids for Prevention and Treatment of Gastrointestinal Disorders: Useful Nutraceuticals? **International Journal of Molecular Sciences**, Espanha, v. 21, n. 9, p. 3067, 2020.

MATSUYAMA S., NAO N., SHIRATO K., KAWASE M., SAITO S., TAKAYAMA I., NAGATA N., SEKIZUKA T., KATOH H., KATO F., SAKATA M., TAHARA M., KUTSUNA S., OHMAGARI N., KURODA M., SUZUKI T., KAGEYAMA T.,

TAKEDA M. Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Japão, v. 117, n. 13, p. 7001-7003, 2020.

MATUSALI G., COLAVITA F., BORDIL., LALLE E., IPPOLITO G., CAPOBIANCHI M.R., CASTILLETTI C. Tropism of the Chikungunya Virus. **Viruses**, Itália, v. 11, n. 2, p. 175, 2019.

MAVALE M., PARASHAR D., SUDEEP A., GOKHALE M., GHODKE Y., GEEVARGHESE G., ARANKALLE V., MISHRA A.C. Venereal transmission of chikungunya virus by *Aedes aegypti* mosquitoes (Diptera: Culicidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Índia, v. 83, n. 6, 1242-1244. 2010.

MCGUIRE P., ROBSON P., CUBALA W.J., VASILE D., MORRISON P.D., BARRON R., TAYLOR A., WRIGHT S. Cannabidiol (CBD) as an Adjunctive Therapy in Schizophrenia: A Multicenter Randomized Controlled Trial. **American Journal of Psychiatry**, Reino Unido, v. 175, n. 3, p. 225-231, 2018.

MCNAB F., MAYER-BARBER K., SHER A., WACK A., O'GARRA A. Type I interferons in infectious disease. **Nature Reviews Immunology**, Reino Unido, v. 15, n. 2, p. 87-103, 2015.

MEDVECZKY M.M., SHERWOOD T.A., KLEIN T.W., FRIEDMAN H., MEDVECZKY P.G. Delta-9 tetrahydrocannabinol (THC) inhibits lytic replication of gamma oncogenic herpesviruses in vitro. **BMC Medicine**, Estados Unidos, v. 2, p. 34, 2004.

MEISSNER H., CASCELLA M. **Cannabidiol (CBD)**. Treasure Island, Flórida: StatPearls Publishing. 07 mai. 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556048/>. Acesso em 30 jan. 2025.

MELTON J.V., EWART G.D., WEIR R.C., BOARD P.G., LEE E., GAGE P.W. Alphavirus 6K proteins form ion channels. **Journal of Biological Chemistry**, Austrália, v. 277, n. 49, p. 46923-46931, 2002.

MERTEN O.W., KIERULFF J.V., CASTIGNOLLES N., PERRIN P. Evaluation of the new serum-free medium (MDSS2) for the production of different biologicals: use of various cell lines. **Cytotechnology**, França, v. 14, n. 1, p. 47-59, 1994.

MILLAR S.A., STONE N.L., BELLMAN Z.D., YATES A.S., ENGLAND T.J., O'SULLIVAN S.E. A systematic review of cannabidiol dosing in clinical populations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Estados Unidos, v. 85, n. 9, p. 1888-1900, 2019.

MILLAR S.A., STONE N.L., YATES A.S., O'SULLIVAN S.E. A Systematic Review on the Pharmacokinetics of Cannabidiol in Humans. **Frontiers in Pharmacology**, Estados Unidos, v. 9, p. 1365, 2018.

MOLINA P.E., WINSAUER P., ZHANG P., WALKER E., BIRKE L., AMEDEE A., STOUWE C.V., TROXCLAIR D., MCGOEY R., VARNER K., BYERLEY L., LAMOTTE L. Cannabinoid administration attenuates the progression of simian immunodeficiency virus. **AIDS Research and Human Retroviruses**, Estados Unidos, v. 27, n. 6, p. 585-592, 2011.

R.A., RENNERT P.D., MAURY W. Role of the phosphatidylserine receptor TIM-1 in enveloped-virus entry. **Journal of Virology**, Estados Unidos, v. 87, n. 15, p. 8327-8341, 2013.

MURILLO-ZAMORA E., MENDOZA-CANO O., TRUJILLO-HERNÁNDEZ B., ALBERTO SÁNCHEZ-PIÑA R., GUZMÁN-ESQUIVEL J. Persistent arthralgia and related risks factors in laboratory-confirmed cases of Chikungunya virus infection in Mexico. **Revista Panamericana de Salud Publica**, México, v. 41, p. e72, 2017.

MUTHUMALAGE T., RAHMAN I. Cannabidiol differentially regulates basal and LPS-induced inflammatory responses in macrophages, lung epithelial cells, and fibroblasts. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Estados Unidos, v. 382, p. 114713, 2019.

NEWTON C.A., CHOU P.J., PERKINS I., KLEIN T.W. CB(1) and CB(2) cannabinoid receptors mediate different aspects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC)-induced T helper cell shift following immune activation by Legionella pneumophila infection. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, Estados Unidos, v. 4, n. 1, p. 92-102, 2009.

NII-TREBI N.I. Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. **Biomed Research International**, Gana, p. 5245021, 2017.

OLÁH A., TÓTH B.I., BORBÍRÓ I., SUGAWARA K., SZÖLLÖSI A.G., CZIFRA G., PÁL B., AMBRUS L., KLOEPPER J., CAMERA E., LUDOVICI M., PICARDO M., VOETS T., ZOUBOULIS C.C., PAUS R., BÍRÓ T. Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. **Journal of Clinical Investigation**, Reino Unido, v. 124, n. 9, p. 3713-3724, 2014.

PAGANO S., CONIGLIO M., VALENTI C., FEDERICI M.I., LOMBARDO G., CIANETTI S., MARINUCCI L. Biological effects of Cannabidiol on normal human healthy cell populations: Systematic review of the literature. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Itália, v. 132, p. 110728, 2020.

PAKRAN J., GEORGE M., RIYAZ N., ARAKKAL R., GEORGE S., RAJAN U., KHADER A., THOMAS S., ABDURAHMAN R., SASIDHARANPILLAI S., THUMBAYIL L. Purpuric macules with vesiculobullous lesions: a novel manifestation of Chikungunya. **International Journal of Dermatology**, Índia, v. 50, n. 1, p. 61-69, 2011.

PALAND N., PECHKOVSKY A., ASWAD M., HAMZA H., POPOV T., SHAHAR E., LOURIA-HAYON I. The Immunopathology of COVID-19 and the Cannabis Paradigm. **Frontiers in Immunology**, Israel, v. 12, p. 631233, 2021.

PARRISH C.R., HOLMES E.C., MORENS D.M., PARK E.C., BURKE D.S., CALISHER C.H., LAUGHLIN C.A., SAIF L.J., DASZAK P. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Estados Unidos, v. 72, n. 3, p. 457-470, 2008.

PEREIRA R.C., SILVA A.N., SOUZA M.C., SILVA M.V., NEVES P.P., SILVA A.A., MATOS D.D., HERRERA M.A., YAMAMURA A.M., FREIRE M.S., GASPAS L.P., CARIDE E. An inactivated yellow fever 17DD vaccine cultivated in Vero cell cultures. **Vaccine**, Brasil, v. 33, n. 35, p. 4261-4268, 2015.

PERTWEE R.G. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, Reino Unido, v. 153, n. 2, p. 199-215, 2008.

PEYRAVIAN N., DEO S., DAUNERT S., JIMENEZ J.J. Cannabidiol as a Novel Therapeutic for Immune Modulation. **ImmunoTargets and Therapy**, Estados Unidos, v. 9, p. 131-140, 2020.

PINTORI N., CARIA F., DE LUCA M.A., MILIANO C. THC and CBD: Villain versus Hero? Insights into Adolescent Exposure. **International Journal of Molecular Sciences**, Estados Unidos, v. 24, n. 6, p. 5251, 2023.

PITAKBUT T., NGUYEN G.N., KAYSER O. Activity of THC, CBD, and CBN on Human ACE2 and SARS-CoV1/2 Main Protease to Understand Antiviral Defense Mechanism. **Planta Medica**, Alemanha, v. 88, n. 12, p. 1047-1059, 2022.

POTT F., POSTMUS D., BROWN R.J.P., WYLER E., NEUMANN E., LANDTHALER M., GOFFINET C. Single-cell analysis of arthritogenic alphavirus-infected human synovial fibroblasts links low abundance of viral RNA to induction of innate immunity and arthralgia-associated gene expression. **Emerging Microbes & Infections**, Alemanha, v. 10, n. 1, p. 2151-2168, 2021.

POWERS A.M., LOGUE C.H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, Estados Unidos, v. 88, Pt. 9, p. 2363-2377, 2007.

RAJ V., PARK J.G., CHO K.H., CHOI P., KIM T., HAM J., LEE J. Assessment of antiviral potencies of cannabinoids against SARS-CoV-2 using computational and in vitro approaches. **International Journal of Biological Macromolecules**, Coreia do Sul, v. 168, p. 474-485, 2021.

RAMOS DA SILVA S., CHENG F., HUANG I.C., JUNG J.U., GAO S.J. Efficiencies and kinetics of infection in different cell types/lines by African and Asian strains of Zika virus. **Journal of Medical Virology**, China, v. 91, n. 2, p. 179-189, 2019.

RASAIYAAH J., TAN C.P., FLETCHER A.J., PRICE A.J., BLONDEAU C., HILDITCH L., JACQUES D.A., SELWOOD D.L., JAMES L.C., NOURSADEGHI M., TOWERS G.J. HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment. **Nature**, Reino Unido, v. 503, n. 7476, p. 402-405, 2013.

RAVICHANDRAN R., MANIAN M. Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. **Journal of Infection in Developing Countries**, Índia, v. 2, n. 2, p. 140-142, 2008.

RAWAL S.Y., DABBOUS M.K.h, TIPTON DA. Effect of cannabidiol on human gingival fibroblast extracellular matrix metabolism: MMP production and activity, and production of fibronectin and transforming growth factor β . **Journal of Periodontal Research**, Estados Unidos, v. 47, n. 3, p. 320-329, 2012.

REYES BALLISTA J.M., MIAZGOWICZ K.L., ACCIANI M.D., JIMENEZ A.R., BELLOLI R.S., HAVRANEK K.E., BRINDLEY M.A. Chikungunya virus entry and infectivity is primarily facilitated through cell line dependent attachment factors in mammalian and mosquito cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Estados Unidos, v. 11, p. 1085913, 2023.

RHIM J.S., SCHELL K., CREASY B., CASE W. Biological characteristics and viral susceptibility of an African green monkey kidney cell line (Vero). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Estados Unidos, v. 132, n. 2, p. 670-678, 1969.

ROBIN S., RAMFUL D., LE SEACH' F., JAFFAR-BANDJEE M.C., RIGOU G., ALESSANDRI J.L. Neurologic manifestations of pediatric chikungunya infection. **Journal of Child Neurology**, França, v. 23, n. 9, p. 1028-1035, 2008.

ROBINSON M.C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Tanzânia, v. 49, n. 1, p. 28-32, 1955.

ROUROU S., BEN ZAKKOUR M., KALLEL H. Adaptation of Vero cells to suspension growth for rabies virus production in different serum free media. **Vaccine**, Tunísia, v. 37, n. 47, p. 6987-6995, 2019.

SANDSTROM T.S., RANGANATH N., ANGEL J.B. Impairment of the type I interferon response by HIV-1: Potential targets for HIV eradication. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Canadá, v. 37, p. 1-16, 2017.

SCHNEIDER K.A., ESCALANTE A.A. A likelihood approach to estimate the number of co-infections. **PLoS One**, Estados Unidos, v. 9, n. 7, p. e97899, 2014.

SCHOGGINS J.W., RICE C.M. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. **Current Opinion in Virology**, Estados Unidos, v. 1, n. 6, p. 519-525, 2011.

SCOTT S.S.O., BRAGA-NETO P., PEREIRA L.P., NÓBREGA P.R., DE ASSIS AQUINO GONDIM F., SOBREIRA-NETO M.A., SCHIAVON C.C.M. Immunoglobulin-responsive chikungunya encephalitis: two case reports. **Journal of Neurovirology**, Brasil, v. 23, n. 4, p. 625-631, 2017.

SHABRAM P., AGUILAR-CORDOVA E. Multiplicity of infection/multiplicity of confusion. **Molecular Therapy**, Estados Unidos, v. 2, n. 5, p. 420-421, 2000.

SHARIEFF K.A., DUNCAN D., YOUNOSSI Z. Advances in treatment of chronic hepatitis C: 'pegylated' interferons. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, Estados Unidos, v. 69, n. 2, p. 155-159, 2002.

SHARMA P.K., KUMAR M., AGGARWAL G.K., KUMAR V., SRIVASTAVA R.D., SAHANI A., GOYAL R. Severe Manifestations of Chikungunya Fever in Children, India, 2016. **Emerging Infectious Diseases**, Índia, v. 24, n. 9. P. 1737-1739, 2018.

SHEN C.F., GUILBAULT C., LI X., ELAHI S.M., ANSORGE S., KAMEN A., GILBERT R. Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. **Vaccine**, Canadá, v. 37, n. 47, p. 6996-7002, 2019.

SIMON F., JAVELLE E., CABIE A., BOUQUILLARD E., TROISGROS O., GENTILE G., LEPARC-GOFFART I., HOEN B., GANDJBAKHCH F., RENE-CORAIL P., FRANCO J.M., CAUMES E., COMBE B., POIRAUDEAU S., GANE-TROPLENT F., DJOSSOU F., SCHAEVERBEKE T., CRIQUET-HAYOT A., CARRERE P., MALVY D., GAILLARD P., WENDLING D. Société de pathologie infectieuse de langue française. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent

presentations). November 2014. **Medecine et Maladies Infectieuses**, França, v. 45, n. 7, p. 243-263, 2015.

SINGH S.K., UNNI S.K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. **Reviews in Medical Virology**, Índia, v. 21, n. 2, p. 78-88, 2011.

SOUNDARA RAJAN T., GIACOPPO S., SCIONTI D., DIOMEDE F., GRASSI G., POLLASTRO F., PIATTELLI A., BRAMANTI P., MAZZON E., TRUBIANI O. Cannabidiol Activates Neuronal Precursor Genes in Human Gingival Mesenchymal Stromal Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, Itália, v. 118, n. 6, p. 1531-1546, 2017.

SOURISSEAU M., SCHILTE C., CASARTELLI N., TROUILLET C., GUIVEL-BENHASSINE F., RUDNICKA D, SOL-FOULON N., LE ROUX K., PREVOST M.C., FSIHI H., FRENKIEL M.P., BLANCHET F., AFONSO P.V., CECCALDI P.E., OZDEN S., GESSAIN A., SCHUFFENECKER I., VERHASSELT B., ZAMBORLINI A., SAÏB A., REY F.A., ARENZANA-SEISDEDOS F., DESPRÈS P., MICHAULT A., ALBERT M.L., SCHWARTZ O. Characterization of reemerging chikungunya virus. **PLoS Pathogens**, França, v. 3, n. 6, p. e89, 2007.

SOUZA M.C., FREIRE M.S., SCHULZE E.A., GASPAR L.P., CASTILHO L.R. Production of yellow fever virus in microcarrier-based Vero cell cultures. **Vaccine**, Brasil, v. 27, n. 46, p. 6420-6423, 2009.

SPRUTH M., KISTNER O., SAVIDIS-DACHO H., HITTER E., CROWE B., GERENCER M., BRÜHL P., GRILLBERGER L., REITER M., TAUER C., MUNDT W., BARRETT P.N. A double-inactivated whole virus candidate SARS coronavirus vaccine stimulates neutralising and protective antibody responses. **Vaccine**, Áustria, v. 24, n. 5, p. 652-661, 2006.

SUDEEP A.B., VYAS P.B., PARASHAR D., SHIL P. Differential susceptibility & replication potential of Vero E6, BHK-21, RD, A-549, C6/36 cells & *Aedes aegypti* mosquitoes to three strains of chikungunya virus. **Indian Journal of Medical Research**, Índia, v. 149, n. 6, p. 771-777, 2019.

TALBALAGHI A., MOUTAILLER S., VAZEILLE M., FAILLOUX A.B. Are *Aedes albopictus* or other mosquito species from northern Italy competent to sustain new arboviral outbreaks? **Medical and Veterinary Entomology**, Itália, v. 24, n. 1, p. 83-87, 2010.

THOMAS H., FOSTER G., PLATIS D. Mechanisms of action of interferon and nucleoside analogues. **Journal of Hepatology**, Reino Unido, v. 40, n. 2, p. 364, 2003.

TINI M.L., REZZA G. Morbilliform skin rash with prominent involvement of the palms in Chikungunya fever. **IDCases**, Itália, v. 13, p. e00421, 2018.

TIWARI M., PARIDA M., SANTHOSH S.R., KHAN M., DASH P.K., RAO P.V. Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. **Vaccine**, Índia, v. 27, n. 18, p. 2513-2522, 2009.

TOMER S., MU W., SURYAWANSHI G., NG H., WANG L., WENNERBERG W., REZEK V., MARTIN H., CHEN I., KITCHEN S., ZHEN A. Cannabidiol modulates expression of type I IFN response genes and HIV infection in macrophages. **Frontiers in Immunology**, Estados Unidos, v. 13, p. 926696, 2022.

TRABELSI K., MAJOUL S., ROUROU S., KALLEL H. Process intensification for an enhanced replication of a newly adapted RM-65 sheep pox virus strain in Vero cells grown in stirred bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, Tunísia, v. 90, p. 131-139, 2014.

ULLOA-PADILLA J.P., DÁVILA P.J., IZQUIERDO N.J., GARCÍA-RODRÍGUEZ O., JIMÉNEZ I.Z. Ocular Symptoms and Signs of Chikungunya Fever in Puerto Rico. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, Porto Rico, v. 37, n. 2, p. 83-87, 2018.

VAN BREEMEN R.B., MUCHIRI R.N., BATES T.A., WEINSTEIN J.B., LEIER H.C., FARLEY S., TAFESSE F.G. Cannabinoids Block Cellular Entry of SARS-CoV-2 and the Emerging Variants. **Journal of Natural Products**, Estados Unidos, v. 85, n. 1, p. 176-184, 2022.

VAN DOORN H.R. Emerging infectious diseases. **Medicine (Abingdon)**, Países Baixos. V. 42, n. 1, p. 60-63, 2014.

VASCONCELOS, P.F.D.C. *et al.* **Arboviroses**. In: LEÃO, Raimundo Nonato Queiroz de (Coord). *Medicina tropical e infectologia na Amazônia*. Belém: Samauma Editorial, 2013. cap. 23, p. 481-503. Disponível em: <https://patua.iec.gov.br/handle/iec/6753>. Acesso em 30 jan. 2025.

VAZEILLE M., MOUTAILLER S., COUDRIER D., ROUSSEAU C., KHUN H., HUERRE M., THIRIA J., DEHECQ J.S., FONTENILLE D., SCHUFFENECKER I., DESPRES P., FAILLOUX A.B. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. **PLoS One**, França, v. 2, n. 11, p. e1168, 2007.

WAGGONER J.J., GRESH L., VARGAS M.J., BALLESTEROS G., TELLEZ Y., SODA K.J., SAHOO M.K., NUÑEZ A., BALMASEDA A., HARRIS E., PINSKY B.A. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 63, n. 12, p. 1584-1590, 2016.

WAHID B., ALI A., RAFIQUE S., IDREES M. Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. **International Journal of Infectious Diseases**, Paquistão, v. 58, p. 69-76, 2017.

WANG B., KOVALCHUK A., LI D., RODRIGUEZ-JUAREZ R., ILNYTSKY Y., KOVALCHUK I., KOVALCHUK O. In search of preventive strategies: novel high-CBD Cannabis sativa extracts modulate ACE2 expression in COVID-19 gateway tissues. **Aging (Albany NY)**, Canadá, v. 12, n. 22, p. 22425-22444, 2020.

WEAVER S.C. Urbanization and geographic expansion of zoonotic arboviral diseases: mechanisms and potential strategies for prevention. **Trends in Microbiology**, Estados Unidos, v. 21, p. 360-363, 2013.

WEAVER S.C., CHARLIER C., VASILAKIS N., LECUIT M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual Review of Medicine**, França, v. 69, n. 395-408, 2018.

WEAVER S.C., FORRESTER N.L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. **Antiviral Research**, Estados Unidos, v. 120, p. 32-39, 2015.

WEBB E., MICHELEN M., RIGBY I., DAGENS A., DAHMASH D., CHENG V., JOSEPH R., LIPWORTH S., HARRISS E., CAI E., NARTOWSKI R., JANURAGA P.P., GEDELA K., SUKMANINGRUM E., CEVIK M., GROVES H., HART P., FLETCHER T., BLUMBERG L., HORBY P.W., JACOB S.T., SIGFRID L. An evaluation of global Chikungunya clinical management guidelines: A systematic review. **EClinicalMedicine**, Reino Unido, v. 54, p. 101672, 2022.

WHO, Research SPf, Diseases TiT, Diseases WHODoCoNT, Epidemic WHO, Alert P. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143157/>. Acesso em 30 jan. 2025.

WIE S.H., DU P., LUONG T.Q., ROUGHT S.E., BELIAKOVA-BETHELL N., LOZACH J., CORBEIL J., KORNBLUTH R.S., RICHMAN D.D., WOELK C.H. HIV downregulates interferon-stimulated genes in primary macrophages. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, Coreia do Sul, v. 33, n. 2, p. 90-95, 2013.

WIKAN N., SAKOONWATANYOO P., UBOL S., YOKSAN S., SMITH D.R. Chikungunya virus infection of cell lines: analysis of the East, Central and South African lineage. **PLoS One**, Tailândia, v. 7, n. 1, p. e31102, 2012.

WILLIAMSON B.N., FELDMANN F., SCHWARZ B., MEADE-WHITE K., PORTER D.P., SCHULZ J., VAN DOREMALEN N., LEIGHTON I., YINDA C.K., PÉREZ-PÉREZ L., OKUMURA A., LOVAGLIO J., HANLEY P.W., SATURDAY G., BOSIO C.M., ANZICK S., BARBIAN K., CIHLAR T., MARTENS C., SCOTT D.P., MUNSTER V.J., DE WIT E. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. **Nature**, Estados Unidos, v. 585, n. 7824, p. 273-276, 2020.

WU W., ORR-BURKS N., KARPILOW J., TRIPP R.A. Development of improved vaccine cell lines against rotavirus. **Scientific Data**, Estados Unidos, v. 4, p. 170021, 2017.

YANG K., TONG L., CHEN C., ZHANG P., PI H., RUAN H., WU J. Therapeutic effects of extracts from Radix Toddaliae Asiaticae on collagen-induced arthritis in Balb/c mice. **Journal of Ethnopharmacology**, China, v. 146, n. 1, p. 355-362, 2013.

YAO Z., RAMACHANDRAN S., HUANG S., JAMI-ALAHMADI Y., WOHLSCHEGEL J.A., LI M.M.H. Chikungunya virus glycoproteins transform macrophages into productive viral dissemination vessels. **bioRxiv**, Estados Unidos, v. Maio 2023, p. 542714, 2023.

YASUMURA, Y. "The research for the SV40 by means of tissue culture technique." **Nippon Rinsho**, Japão, v. 21, p. 1201-1219, 1963.

YE L., SCHNEPF D., STAEHELI P. Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. **Nature Reviews Immunology**, Alemanha, v. 19, n. 10, p. 614-625, 2019.

YNDART ARIAS A., KOLISHETTI N., VASHIST A., MADEPALLI L., LLAGUNO L., NAIR M. Anti-inflammatory effects of CBD in human microglial cell line infected with HIV-1. **Scientific Reports**, Estados Unidos, v. 13, n. 1, p. 7376, 2023.

ZAID A., GÉRARDIN P., TAYLOR A., MOSTAFAVI H., MALVY D., MAHALINGAM S. Chikungunya Arthritis: Implications of Acute and Chronic Inflammation Mechanisms on Disease Management. **Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)**, França, v. 70, n. 4, p. 484-495, 2018.

ZARITSKY L.A., BEDSAUL J.R., ZOON K.C. Virus Multiplicity of Infection Affects Type I Interferon Subtype Induction Profiles and Interferon-Stimulated Genes. **Journal of Virology**, Estados Unidos, v. 89, n. 22, p. 11534-11548, 2015.

ZWART M.P., TROMAS N., ELENA S.F. Model-selection-based approach for calculating cellular multiplicity of infection during virus colonization of multi-cellular hosts. **PLoS One**, Espanha, v. 8, n. 5, p. e64657, 2013.