

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**Caracterização da neuroinvasividade do SARS-CoV-2 e dos efeitos
neuroprotetores do canabidiol em um modelo *in vitro* utilizando o sistema celular
SH-SY5Y**

ISABELA PIRES DOS SANTOS

RIBEIRÃO PRETO

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

ISABELA PIRES DOS SANTOS

Caracterização da neuroinvasividade do SARS-CoV-2 e dos efeitos neuroprotetores do canabidiol em um modelo *in vitro* utilizando o sistema celular SH-SY5Y

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Para a obtenção do título de Mestre em ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Alline Cristina de Campos

RIBEIRÃO PRETO

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Santos, Isabela Pires dos

Caracterização da neuroinvasividade do SARS-CoV-2 e dos efeitos neuroprotetores do canabidiol em um modelo *in vitro* utilizando o sistema celular SH-SY5Y. Ribeirão Preto, 2022.

107 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Campos, Alline Cristina de.

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. Neurotropismo. 4. Neuroinvasividade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: SANTOS, Isabela Pires dos

Título: Caracterização da neuroinvasividade do SARS-CoV-2 e dos efeitos neuroprotetores do canabidiol em um modelo *in vitro* utilizando o sistema celular SH-SY5Y

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo Para a obtenção do título de Mestre em ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/2022

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Alline Cristina de Campos

FMRP

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Membro 1: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Membro 2: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, por terem me ensinado a beleza da busca pelo conhecimento e pelo apoio de toda uma vida. Ao meu marido por todo amor e compreensão. A minha irmã, minha sobrinha e meus amigos por alegrarem tanto o meu coração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado até aqui. Por ter me agraciado com a bênção de iniciar a carreira que eu escolhi, no lugar que eu sonhei. E por ter me concedido condições físicas e mentais para concluir essa etapa.

Ao meu marido, Raoni, por todo amor, dedicação, compreensão e amizade. Por todas as conversas, desabafos, por ter comemorado comigo nas vitórias, secado (literalmente) minhas lágrimas em momentos de angústia e por ser uma grande inspiração para mim. Por cuidar de mim com tanto carinho e por me fazer te amar mais a cada dia.

Aos meus pais, Jorge e Naidê, por sempre me incentivarem tanto a lutar pelos meus sonhos, e nunca desistir, porque “melhor é o fim das coisas”. Por terem me apoiado durante toda a vida e por serem pessoas tão especiais. Me sinto honrada de ser filha de vocês. Espero um dia conseguir retribuir de alguma forma tudo que vocês fizeram e ainda fazem por mim.

À minha irmã, Helena, por ser também minha grande amiga e confidente. Por ser tão resiliente e inspiradora. Por se fazer presente, mesmo a milhares de km de distância. E por ter iluminado tanto minha vida com a nossa Pipoquinha.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Alline Campos, por ter sido uma fonte de inspiração para mim desde a graduação. Por todo o incentivo, pelos aconselhamentos e pela paciência e disponibilidade para dividir seus conhecimentos.

Ao Rafa, por ser essa pessoa tão incrível. Por todo o auxílio durante esses anos. Por ter me acompanhado até debaixo de chuva para terminar os experimentos, por todos os ensinamentos sobre vírus, cultura de células, exossomos, PCR (são muitas expertises) e, claro, também pelas conversas sobre gatos e perfumes.

À Karlinha, por ser sempre tão maravilhosa. Por ser essa pessoa super carismática e sempre tão solícita. Pela paciência e disponibilidade para me ensinar desde os primeiros passos da cultura celular e, acima de tudo, por ter alegrado tanto os nossos dias.

Ao Davi (Pacu) por todos os ensinamentos, por ter me ajudado tanto em tantos experimentos. Pelas conversas sobre os assuntos mais diversos possíveis, pelos memes, cantoria e dancinhas durante os experimentos também.

À Fran, por ser tão brilhante e tão humilde ao mesmo tempo. Por toda ajuda em experimentos, por todas as dúvidas que eu tive e você explicou, mas, acima de tudo, por ser esse ser humano tão iluminado e admirável.

Ao Pedro, por todo o auxílio nos últimos experimentos. Por tanta simpatia, por todos os desabafos e por ter se encaixado tão bem no nosso tão amado “team COVID”.

Aos colegas do laboratório de Farmacologia da Neuroplasticidade, Zezé, Dri, Tamires, Mel, Gabriel e Ju Bueno, por terem me recebido com tanto carinho no grupo de pesquisa e por fazerem do laboratório um ambiente tão acolhedor.

Às minhas amigas de longa data, Cris, Bia, Edna, Anne, Taissa, Camila e Rebeca, por me ouvirem, me apoiarem e me incentivarem em tantas fases diferentes da vida. Vocês são preciosas para mim.

Ao professor Dr. Francisco Guimarães, por ter cedido tão gentilmente o espaço de seu laboratório para a realização de experimentos presentes neste trabalho.

Ao professor Dr. Eurico de Arruda Neto, ao Dr. Ronaldo, Dr^a Andreia, e a todos os funcionários do departamento de Virologia da FMRP, por todo o apoio e colaboração para a realização dos experimentos de infecção celular.

Ao professor Dr. Alexandre Todorovic e sua equipe, pela grande colaboração nos experimentos envolvendo amostras de pacientes humanos.

Aos professores de Farmacologia da UFRRJ, por terem despertado em mim o interesse pela área acadêmica. Em especial, ao professor Fábio Fagundes da Rocha, que me orientou durante a Iniciação Científica e me inspirou a continuar estudando neurofarmacologia.

À Gislaine, sempre tão solícita e disposta a ajudar todos os alunos da pós-graduação. Por ter sido sempre tão gentil e paciente comigo durante esses anos.

A todos os funcionários da FMRP e do Hospital Dia Psiquiátrico, pelo suporte técnico, pela gentileza e por toda a assistência que dedicam a nós, alunos da pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e ao Instituto L'Óreal pelo apoio financeiro.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

Marie Curie



RESUMO

Resumo

PIRES-DOS-SANTOS, I. **Caracterização da neuroinvasividade do SARS-CoV-2 e dos efeitos neuroprotetores do canabidiol em um modelo *in vitro* utilizando o sistema celular SH-SY5Y.** 2022. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Passados dois anos do início da pandemia de COVID-19, estudos apontam que a doença pode acarretar sintomas sistêmicos no corpo humano. Além da sintomatologia clássica respiratória, a patologia vem sendo associada a disfunções cardiovasculares, metabólicas e neurológicas. Os sinais de acometimento do Sistema Nervoso Central costumam surgir durante a fase aguda da infecção, todavia, a persistência dos sintomas neurológicos, além do desencadeamento de distúrbios neuropsiquiátricos após a resolução do quadro, vem chamando atenção de médicos e pesquisadores. Nota-se, portanto, a importância da melhor elucidação do neurotropismo e do potencial de neuroinvasividade do SARS-CoV-2, bem da busca por fármacos que ofereçam a neuroproteção contra danos neurológicos a longo prazo relacionados com a doença. O presente estudo investigou a neuroinvasividade do SARS-CoV-2 em amostras *post-mortem* de via olfatória de pacientes falecidos em decorrência de COVID-19 e, posteriormente, observou os efeitos do canabidiol em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) infectadas pelo novo coronavírus. As amostras de pacientes foram submetidas aos ensaios de RT-PCR e de imunofluorescência, para a detecção da expressão de SARS-CoV-2. Foram também avaliadas quanto à expressão de citocinas inflamatórias, por meio de ensaios de RT-PCR e Dot Blot, que demonstraram a expressão de fatores inflamatórios tanto em amostras positivas, quanto em negativas para a expressão gênica de SARS-CoV-2. Células SH-SY5Y foram empregadas para um modelo *in vitro* de neuroinfecção por SARS-CoV-2 e tratadas com concentrações de 100 nM, 300nM, 1uM, 3uM e 10uM de CBD. Foram submetidas a ensaios de RT-PCR, viabilidade e proliferação celular. Os resultados sugerem que o CBD não exerça efeito virucida relevante, porém, na concentração de 1uM, apresentou efeito pró-neurogênico. Os resultados sugerem que o CBD exerça efeito neuroprotetor sobre a linhagem celular testada em presença de SARS-CoV-2.

Palavras-chave: COVID-19, SARS-CoV-2, neurotropismo, neuroinvasividade, neuroproteção, SH-SY5Y, canabidiol



ABSTRACT

Abstract

PIRES-DOS-SANTOS, I. **Characterization of the neuroinvasiveness of SARS-CoV-2 and the neuroprotective effects of cannabidiol in an *in vitro* model using the SH-SY5Y cellular system.** 2022. Dissertation (Master). Ribeirão Preto School of Medicine – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Two years after the beginning of the COVID-19 pandemic, studies have shown that the disease can be related to systemic symptoms in the human body. In addition to the classic respiratory symptoms, the pathology has been associated with cardiovascular, metabolic, and neurological disorders. The signs of Central Nervous System involvement usually appear during acute infection, however, the persistence of some neurological symptoms and the triggering of neuropsychiatric disorders after the cure have alarmed physicians and researchers. Therefore, it is important to better elucidate the neurotropism and neuroinvasive potential of SARS-CoV-2, as well as the search for drugs that offer neuroprotection against long-term neurological damage related to the disease. The present study investigated the neuroinvasiveness of SARS-CoV-2 in *post-mortem* olfactory samples from patients who died as a result of COVID-19 and, subsequently, observed the effects of cannabidiol on human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) infected by the new coronavirus. Patient samples were subjected to RT-PCR and immunofluorescence assays for the detection of SARS-CoV-2 expression. They were also evaluated for the expression of inflammatory cytokines in RT-PCR and Dot Blot assays, which demonstrated the expression of inflammatory factors in both positive and negative samples for SARS-CoV-2 gene expression. SH-SY5Y cells were employed for an *in vitro* model of SARS-CoV-2 neuroinfection and treated with concentrations of 100nM, 300nM, 1uM, 3uM, and 10uM of CBD. They were submitted to RT-PCR, viability, and cell proliferation assays. The results suggest that CBD does not exert a relevant virucidal effect, however, at a concentration of 1uM, it showed a pro-neurogenic effect. The results suggest that CBD exerts a neuroprotective effect on the cell line tested in the presence of SARS-CoV-2.

Key-words: COVID-19, SARS-CoV-2, neurotropism, neuroinvasiveness, neuroprotection, SH-SY5Y, cannabidiol

SUMÁRIO

Sumário

1. Introdução	18
1.1. Os vírus neurotrópicos e suas possíveis consequências	18
1.2. SARS-CoV-2: pandemia e dados de neuroinvasividade	23
1.3. Neuroplasticidade, vírus e transtornos neuropsiquiátricos	31
1.4. A neuroplasticidade como alvo farmacológico	33
1.5. O Canabidiol, a neuroplasticidade e os transtornos neuropsiquiátricos	36
1.6. Hipótese	40
1.7. Objetivos	40
1.7.1. Objetivos gerais	40
1.7.2. Objetivos específicos	41
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Ensaios em amostras <i>post-mortem</i> coletadas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto falecidos em decorrência da COVID-19.....	43
2.1.1. Comitê de ética	43
2.1.2. Imunofluorescência – ensaios para a para a detecção de SARS-CoV-2 e caracterização de tecido olfatório.....	43
2.1.3. RT-PCR para a detecção da expressão gênica de SARS-CoV-2 e das citocinas IL-6 e IL-10.....	44
2.1.4. Dot Blot (Array de citocinas)	44
2.2. Ensaios em cultura celular.....	46
2.2.1. Cultura de células	46
2.2.2. Infecção <i>in vitro</i> de células SH-SY5Y com SARS-CoV-2.....	46
2.2.3. Ensaio de viabilidade celular.....	46
2.2.4. RT-PCR.....	47
2.2.5. Imunofluorescência – ensaio de proliferação celular	48
2.2.6. Drogas	49
3. RESULTADOS	52
3.1. Resultados clínicos e biomoleculares dos ensaios relacionados a pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto falecidos em decorrência da COVID-19	52

3.1.1. Pacientes: Informações gerais, Comorbidades e Sintomas Neurológicos	52
3.1.2. Ensaios de imunofluorescência para a detecção de proteína viral e caracterização de via neural olfatória	53
3.1.3. RT-PCR para detecção da expressão gênica de SARS-CoV-2 e de citocinas em via neural olfatória	55
3.1.4. <i>Dot blot</i> (Array de citocinas)	56
3.2. Resultados dos ensaios em cultura celular	57
3.2.1. Avaliação da expressão gênica viral nas células SH-SY5Y infectadas por SARS-CoV-2	58
3.2.2. Efeito neuroprotetor concentração dependente (curva em U invertido) do Canabidiol sobre as células SH-SY5Y infectadas com o SARS-CoV-2.....	60
4. Discussão	66
5. Conclusões	77
6. Referências	79
Anexo I – Docking molecular do canabidiol	101
Anexo II- Administração de Canabidiol fluorescente em células neurais infectadas por SARS-CoV-2	103
Anexo III- Aparente favorecimento à replicação viral pela administração de Artesunato (ART)	104
Anexo VI – Participações em publicações científicas	106

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os vírus neurotrópicos e suas possíveis consequências

Infecções virais do Sistema Nervoso Central (SNC) podem provocar diversas disfunções de gravidades distintas, que podem estar associadas com sequelas neurológicas a curto ou longo prazo, ou ainda com a mortalidade (DEPLA *et al.*, 2022). O acesso de vírus neurotrópicos ao SNC está relacionado com sua capacidade de permear o complexo sistema de proteção central, que é a barreira hematoencefálica (BHE), uma estrutura complexa e altamente especializada, com início de desenvolvimento durante o período intrauterino, constituída por células endoteliais capilarizadas, seladas por *tight junctions*, astrócitos e pericitos (BRANISTE *et al.*, 2014). O sucesso da transposição viral pela BHE pode ocorrer devido a citopatologia induzida diretamente pelo vírus, ou mesmo pela resposta imunológica anti-viral do hospedeiro (SWANSON; MCGAVERN, 2015).

Herpesvíroses, enterovíroses e arbovíroses são algumas das doenças virais que podem afetar o SNC com maior frequência, podendo se manifestar tanto com sintomas mais brandos, como cefaleia e tonturas, quanto com quadros mais severos, como encefalite, meningite e mielite (LEON *et al.*, 2021). As manifestações mais graves, como a encefalite, podem ser decorrentes de complicações raras de infecções comuns, como ocorre em certas herpesvíroses. Entretanto, elas podem também configurar a apresentação característica de doenças virais mais atípicas, como, por exemplo, a hidrofobia (raiva). Além disso, a encefalite viral pode ser o único sinal neurológico da infecção, ou ocorrer concomitantemente a quadros como meningite, mielite, neurite e radiculite (VENKATESAN; MURPHY, 2018).

Alguns vírus integrantes da família *Herpesviridae* (HVs) desenvolveram mecanismos engenhosos para superar as defesas do SNC e infectar o mesmo. A capacidade dos HVs entrarem em estado de latência, característica importante da família a qual pertencem, permite

que eles persistam no hospedeiro indefinidamente. Sendo assim, os HVs representam os patógenos mais frequentemente detectados no cérebro humano (HOGESTYN; MOCK; MAYER-PROSCHEL, 2018). As duas vias primárias utilizadas pelos HVs para infectar o SNC são a hematogênica (transporte direto pela BHE), e a disseminação retrógrada, na qual a infecção ocorre nas terminações nervosas periféricas e os patógenos utilizam redes de transporte axonal para invadir o cérebro (ZHOU, LI; MIRANDA-SAKSENA; SAKSENA, 2013).

Há indícios que conectam a infecção por certos tipos de HVs com a ocorrência de doenças neurodegenerativas. A presença de DNA de Herpes simplex do tipo 1 (HSV-1) no cérebro de idosos, principalmente nos portadores do alelo tipo 4 do gene da apolipoproteína (APOE), foi relatada como um fator de risco para a doença de Alzheimer (AD) (ITZHAKI; WOZNIAK, 2008). Além disso, Wosniak e colaboradores demonstraram que o HSV-1 está relacionado com o aumento do depósito de placas de β -amiloide (proteína envolvida na AD) em cultura celular de neuroblastoma humano (WOZNIAK *et al.*, 2007). O Herpes vírus humano do tipo 6 (HHV-6), por sua vez, já foi proposto em diversos relatos como possível participante da etiopatogenia da Esclerose Múltipla (MS) (HOGESTYN; MOCK; MAYER-PROSCHEL, 2018).

Entre as enteroviroses, o *Poliovirus* (subtipo do *Enterovirus C*) é um dos integrantes de maior importância quanto a neuroinvasividade. O agente provoca poliomielite parálitica ao adentrar o SNC e se replicar nos neurônios motores cerebrais e da medula espinhal (COYNE; KIM; BERGELSON, 2007). A infecção tem início nas mucosas da orofaringe e do intestino, se difunde para a corrente sanguínea, de onde as partículas virais partem para locais secundários de replicação. O *Poliovirus* alcança o SNC tanto por transporte retrógrado, por meio de neurônios periféricos até a medula espinhal do hospedeiro, quanto por permeação da BHE (RACANIELLO, 2006).

As arboviroses (virose cujos vetores são artrópodes) representam risco de saúde pública em diversos países, principalmente os de clima tropical (POWER *et al.*, 2022). Geralmente são relacionadas com infecções agudas, o que resulta em diversos sintomas, que variam de febre baixa a febre hemorrágica. Entretanto, algumas infecções por arbovírus podem estar associadas a quadros importantes de neuroinflamação, que podem desencadear disfunções neurológicas como encefalite, paralisia, deficiências oftalmológicas ou distúrbios de desenvolvimento (CLÉ *et al.*, 2020).

O *Zika virus* (ZKV) é o arbovírus mais relatado em relação a infecções congênitas, provavelmente devido à grande extensão da epidemia por ele provocada na última década (PLATT; MINER, 2017). A infecção pelo ZKV vem sendo fortemente relacionada com complicações em gestações e distúrbios neurológicos nos fetos. (KOMARASAMY *et al.*, 2022). A microcefalia é o sintoma mais comum associado com a Síndrome Congênita do Zika, que tem como principais características a redução de tamanho e volume cerebrais, o desenvolvimento anormal de neurônios e o número reduzido de células neurais na substância cinzenta do cérebro (WHEELER, 2018).

Assim como o ZKV, o *Rubella virus* (RBV) também é reportado por provocar infecções congênitas. Apesar da infecção por RBV geralmente causar sintomas leves, como febre baixa e rash cutânea em adultos e crianças, quando ela ocorre durante a gestação, principalmente no decorrer do primeiro trimestre, pode resultar em aborto espontâneo, morte fetal, ou o nascimento de crianças com um conjunto de malformações congênitas conhecidas como Síndrome da Rubéola Congênita (SRC) (GRANT *et al.*, 2017). Alguns dos sintomas comuns da SRC incluem catarata, deficiência auditiva neuro-sensorial, cardiopatia congênita, icterícia, púrpura, hepato-esplenomegalia e microcefalia (WINTER; MOSS, 2022).

Os coronavírus humanos (HCoVs), apesar de afetarem majoritariamente o sistema respiratório, consistem em outro conjunto de vírus que podem atingir o SNC humano, podendo

estar relacionados com o surgimento de sintomas neurológicos. Esses patógenos são altamente disseminados na natureza e apresentam grande similaridade, tanto em estrutura molecular, quanto em modo de replicação, com diversos coronavírus neuroinvasivos que afetam animais (DESFORGES *et al.*, 2019). O potencial neuroinvasivo de coronavírus já foi descrito na literatura através da detecção de RNA de cepas endêmicas de HCoV-229E e OC43 em amostras cerebrais *post-mortem* de pacientes portadores de Esclerose Múltipla (ARBOUR *et al.*, 2000)(STEWART; MOUNIR; TALBOT, 1992). Além disso, a presença de SARS-CoV também já foi detectada em células neuronais de pacientes que faleceram em decorrência de complicações da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS)(GU *et al.*, 2005).

Além das propriedades de neuroinvasividade, a neuropatogenicidade dos HCoVs também vem sendo reportada nas últimas décadas. Na literatura há relatos de encefalite (MORFOPOULOU *et al.*, 2016), paralisia flácida (TURGAY *et al.*, 2015) e diversas outras afecções neurológicas associadas com a infecção por coronavírus. Curiosamente, a cura da infecção aguda parece não ser determinante na eliminação do vírus do SNC humano, já que existem relatos de detecção viral, tanto em cérebro, quanto em fluido cerebrospinal de pacientes assintomáticos e clinicamente curados, o que sugere a permanência da infecção central (ARBOUR *et al.*, 2000)(CRISTALLO *et al.*, 1997).

Em 2018, Dubé e colaboradores realizaram ensaios em cultura celular e em um modelo animal de neuroinfecção por HCoV-OC43 com a finalidade de identificar as possíveis formas de neuropropagação viral. Os pesquisadores descreveram a rota de proliferação viral da cavidade nasal para o bulbo olfatório e córtex piriforme e, em seguida, para o tronco cerebral. Identificaram, ainda, a propagação de neurônio a neurônio como um modo subjacente de disseminação viral em cultura celular. Tais resultados sugerem que, tanto a difusão passiva de partículas virais, quanto o transporte axonal poderiam ser estratégias válidas de propagação utilizadas pelo coronavírus em questão (DUBÉ *et al.*, 2018).

Pode-se afirmar, portanto, que certos vírus apresentam neurotropismo e que as infecções por eles provocadas podem representar riscos ao sistema nervoso do ser humano. A tabela 1 apresenta alguns dos principais vírus neurotrópicos, bem como as manifestações neurológicas reportadas decorrentes de sua infecção central em seres humanos.

Tabela 1: Vírus neurotrópicos que afetam seres humanos e suas manifestações neurológicas

Vírus	Família	Manifestações neurológicas	Referência
Zika virus (ZIKV)	<i>Flaviviridae</i>	Microcefalia, meningoencefalite, mielite, síndrome de Guillain-Barré	(LEON <i>et al.</i> , 2021)
Dengue virus (DENV 1-4)	<i>Flaviviridae</i>	Encefalopatia, encefalite, disfunções neuro-oftálmicas e musculares	(CAROD-ARTAL <i>et al.</i> , 2013)
Rubella virus (RBV)	<i>Togaviridae</i>	Microcefalia, calcificação difusa distribuída nos gânglios da base, distúrbios comportamentais, retardo mental	(IHUNWO <i>et al.</i> , 2022)
Herpes simplex virus (HSV-1, 2)	<i>Herpesviridae</i>	Encefalite, meningite, mielite, cefaleia, confusão mental, letargia	(ŠUDOMOVÁ <i>et al.</i> , 2022)
Cytomegalovirus (HCMV)	<i>Herpesviridae</i>	Declínio cognitivo, aumento do risco de desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas	(ZHENG <i>et al.</i> , 2021)

Epstein-Barr vírus (HHV-4)	<i>Herpesviridae</i>	Meningoencefalite, encefalite, convulsões, alucinações visuais e psicose aguda	(JENSON, 2000)
HIV-1	<i>Retroviridae</i>	Encefalite, mielite, neuropatias com desmielienização	(UWISHEMA <i>et al.</i> , 2022)
Influenza vírus (A e B)	<i>Orthomyxoviridae</i>	Convulsões, encefalopatia, mielite transversa, síndrome de Guillain-Barré	(CHOI <i>et al.</i> , 2021)
Enterovirus C (Poliovirus)	<i>Picornaviridae</i>	Mielite, paralisia flácida temporária ou permanente, fraqueza muscular e disfunção respiratória	(TSEHA, 2021)
Borna disease vírus (BoDV-1)	<i>Bornaviridae</i>	Encefalite	(FRANK <i>et al.</i> , 2022)
Rabies vírus (RABV)	<i>Rabdoviridae</i>	Encefalomielite progressiva e letal	(MORI <i>et al.</i> , 2005)
HCoV-OC43	<i>Coronaviridae</i>	Encefalite	(MORFOPOULOU <i>et al.</i> , 2016)
HCoV-229E	<i>Coronaviridae</i>	Paralisia Flácida	(TURGAY <i>et al.</i> , 2015)

1.2. SARS-CoV-2: pandemia e dados de neuroinvasividade

Em dezembro de 2019 serviços de saúde da cidade de Wuhan, China, reportaram os primeiros casos de pneumonia de origem desconhecida. Muitos dos pacientes tinham em comum a exposição a um mercado atacadista local de frutos do mar (*The Huanan Seafod Market*), conhecido por comercializar também animais ainda vivos (SINGHAL, 2020). O

sistema de vigilância epidemiológica local foi rapidamente acionado, e amostras respiratórias de pacientes foram encaminhadas a laboratórios de referência para investigação etiológica. Ainda no mês de dezembro a China notificou a questão à Organização Mundial da Saúde (OMS), e em janeiro de 2020 o agente etiológico foi identificado como um novo coronavírus, que apresentava grande similaridade com o SARS-CoV (WU *et al.*, 2020), vírus que já tinha provocado a epidemia Síndrome Respiratória Aguda Grave no ano de 2003 (MIYAH *et al.*, 2022). Devido a semelhança com o SARS-CoV, o novo integrante da família *Coronaviridae* foi denominado SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Corona Virus 2*), e a doença por ele causada passou a ser chamada de COVID-19 (COrona VIRus Disease 2019) (MOHAMADIAN *et al.*, 2021).

Em 2020, Chan e colaboradores rastrearam o curso da COVID-19 em uma família de sete pessoas, revelando que o SARS-CoV-2 poderia ser transmitido entre seres humanos (CHAN *et al.*, 2020). Atualmente, sabe-se que o novo coronavírus pode ser transmitido entre humanos de diversas maneiras, mediadas por fluidos expelidos ou aerossóis exalados por indivíduos infectados, que atingem direta ou indiretamente a superfície da mucosa de um hospedeiro suscetível (YEN *et al.*, 2022).

Assim como os outros coronavírus (CoVs) da família *Coronaviridae*, o SARS-CoV-2 é um vírus envelopado de RNA de fita simples e, assim como os demais CoVs altamente patogênicos, ele pertence ao gênero *Betacoronavirus* (HARRISON; LIN; WANG, 2020). Os vírions são compostos pelas proteínas estruturais nucleocapsídeo (N), membrana (M), envelope (E) e spike (S), que apresenta subunidades S1 e S2. As etapas de entrada das partículas virais na célula hospedeira, incluindo a ligação à membrana da célula e a fusão, são mediadas pela glicoproteína S, que é inserida na membrana viral em múltiplas cópias, conferindo ao vírus a aparência de uma coroa (JACKSON *et al.*, 2022).

O ciclo de vida do SARS-CoV-2, portanto, tem início com a ligação da proteína S do envelope viral ao receptor, enzima conversora de angiotensina (ACE2), da célula do hospedeiro. A invasão celular depende de algumas etapas, incluindo dois processos de clivagem: o primeiro, do sítio S1/S2 pela proteína de superfície transmembrana serina protease 2 (TMPRSS2), e o segundo, realizado pela catepsina endolisossomal L. Ambos medeiam a fusão membranar vírus-célula na superfície celular e nos compartimentos endossomais, respectivamente (SHANG *et al.*, 2020). Após a entrada na célula hospedeira, o RNA viral é liberado no citosol, onde é traduzido nas proteínas replicadas (ORF1a/b). As poliproteínas (pp1a e pp1b) são clivadas em proteínas não estruturais complexas de replicase individuais (nsps) (incluindo a RNA polimerase dependente de RNA - RdRp). A replicação começa em vesículas de membrana dupla induzidas por vírus derivadas do retículo endoplasmático, que finalmente se integram para formar teias elaboradas de membranas convolutas. O genoma de fita positiva de entrada serve, então, como um modelo para RNA de fita negativa de comprimento total e RNA subgenômico (sg). A tradução de sgRNA resulta em proteínas estruturais e proteínas acessórias (N, S, M e E) que são inseridas no compartimento intermediário ER-Golgi (ERGIC) para a montagem do vírion. Finalmente, genomas de RNA de sentido positivo subsequentes são incorporados em virions recém-sintetizados, que são secretados pela membrana plasmática (HARRISON; LIN; WANG, 2020). Os processos envolvidos no ciclo de vida viral estão demonstrados na figura 1.

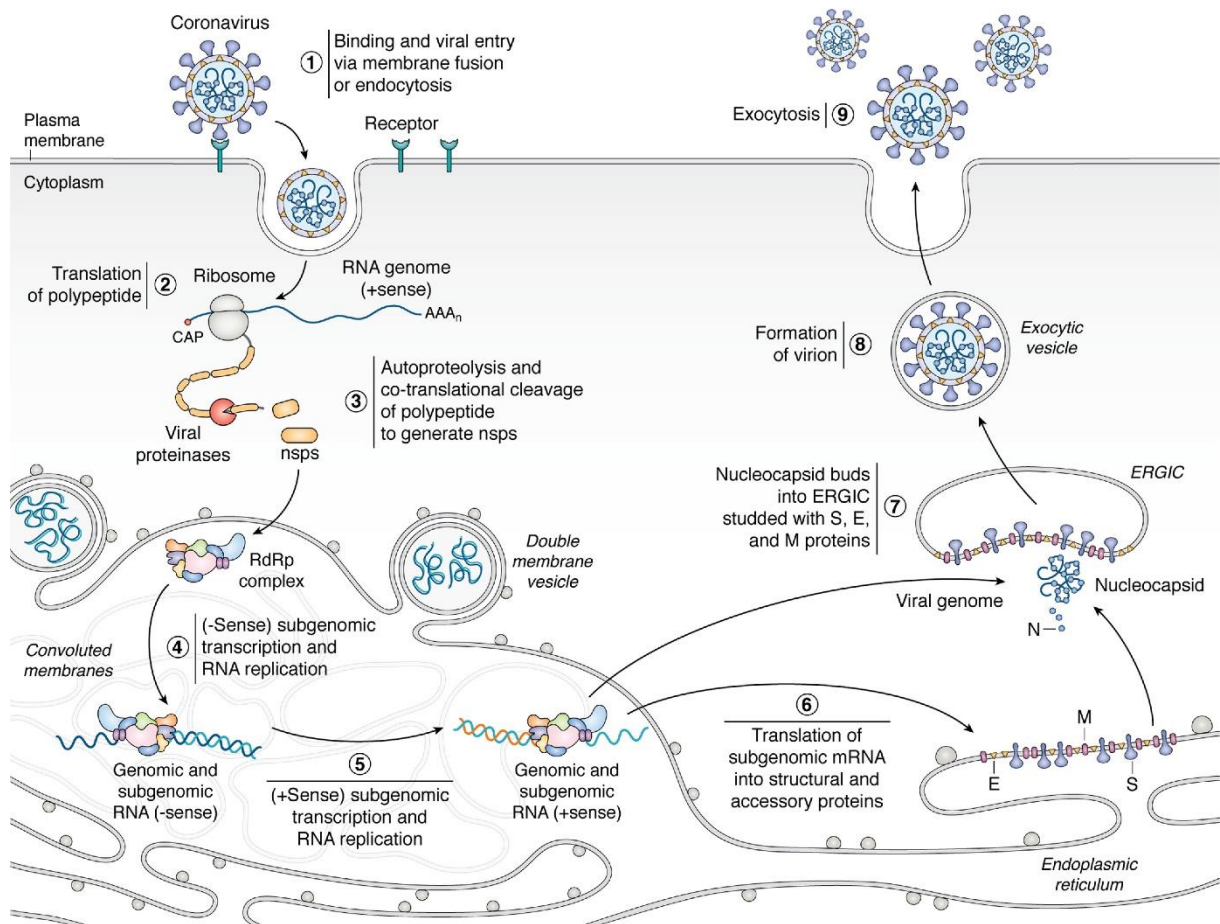


Figura 1: Processos envolvidos nas etapas de invasão celular, replicação genômica e liberação de vírions de SARS-CoV-2. (1) Ligação da proteína Spike viral com seu respectivo receptor, a enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) localizado na membrana plasmática da célula hospedeira, iniciando a etapa de adesão do vírus. A ativação da proteína S se dá pela ação da Serina Protease Transmembranar 2 (TMPRSS2), que promove a clivagem da proteína S viral, possibilitando a invasão celular viral por endocitose. (2) O genoma de RNA de sentido positivo é traduzido pela maquinaria de tradução do hospedeiro, (3) para produzir poliproteínas que são clivadas co-traducionalmente por proteases codificadas na poliproteína para gerar componentes do complexo RdRp. (4) O complexo RdRp utiliza o genoma como modelo para gerar subgenoma de sentido negativo e RNAs de comprimento de genoma, (5) que por sua vez são usados como modelos para a síntese de genomas de progênie de comprimento total de sentido positivo e mRNAs subgenômicos. (6) A transcrição e a replicação ocorrem em membranas convolutas (CM) adjacentes aos DMVs que são ambos derivados do retículo endoplasmático rugoso. Os mRNAs subgenômicos são traduzidos em proteínas estruturais e acessórias. (6 e 7) O RNA genômico de sentido positivo é ligado pelo nucleocapsídeo e brota no ERGIC, onde é cravejado com proteínas estruturais S, E e M traduzidas de RNAs subgenômicos de sentido positivo. (8 e 9) O vírion envelopado é, então, liberado da célula hospedeira por exocitose (HARTENIAN *et al.*, 2020).

Apesar de a via de entrada pelos receptores ACE2 ser, até o momento, a mais descrita na literatura, ela parece não ser a única utilizada pelo vírus (KYROU *et al.*, 2021). Daly e colaboradores demonstraram por meio de cristalografia que o bloqueio da interação do SARS-CoV-2 com receptores de neuropilina do tipo 1 (NRP1) por meio de inibidores seletivos reduziu a entrada e a infectividade viral em cultura de células (DALY *et al.*, 2020). Cantuti-Castrelveti *et al.* também observaram em seus estudos que os receptores NRP1 estão relacionados ao aumento da infectividade do novo coronavírus, efeito este que é inibido por anticorpo monoclonal de bloqueio contra NRP1 (CANTUTI-CASTELVETRI *et al.*, 2020). Mais recentemente, pesquisadores da Escola de Medicina da Universidade de Boston demonstraram que a Vimentina, uma proteína expressa em células endoteliais humanas, liga-se à proteína S e acelera a entrada celular do SARS-CoV-2. Os achados dos autores sugerem que a Vimentina pode facilitar a infecção viral e contribuir para complicações vasculares associadas à COVID-19 (AMRAEI *et al.*, 2022).

Os pacientes infectados por SARS-CoV-2 podem apresentar sintomas que variam de leves a severos, sendo grande parte da população portadora assintomática. Os sintomas mais comuns relatados incluem febre, tosse e dispneia (CIOTTI *et al.*, 2020). Em pacientes com pneumonia, a radiografia de tórax geralmente mostra múltiplas manchas e opacidade em “vidro fosco” (KAUFMAN *et al.*, 2020). Sinais gastrointestinais como diarreia, vômito e dores abdominais também podem estar presentes, e surgem previamente à febre e aos sintomas respiratórios em certos casos (WANG, DAWEI *et al.*, 2020).

Disfunções cardiovasculares também são relatadas como consequência da COVID-19. Algumas das complicações incluem miocardite, infarto agudo do miocárdio, arritmias cardíacas e tromboembolismo venoso. Nos casos de maior gravidade, pode ocorrer instabilidade hemodinâmica e choque cardiogênico (LONG *et al.*, 2020). Anormalidades nos achados ecográficos e de eletroencefalograma no cenário de COVID-19 são marcadores de gravidade

da doença e geralmente estão correlacionadas com desfechos desfavoráveis (DRIGGIN *et al.*, 2020).

Os pacientes portadores de COVID-19 podem apresentar célere agravamento do quadro patológico, indo a óbito devido a falência múltipla dos órgãos, induzida pela “tempestade de citocinas” característica dos casos graves da doença (CIOTTI *et al.*, 2020). Tal tempestade é resultado da infecção por SARS-CoV-2, que provoca uma resposta imune com produção alta de citocinas inflamatórias e baixa de interferon (HU; HUANG; YIN, 2021). O vírus pode ativar rapidamente células que secretam citocinas pró-inflamatórias, como fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e interleucina-6 (IL-6). O GM-CSF ativa ainda os monócitos inflamatórios CD14⁺ e CD16⁺, que passam a produzir quantidades de IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e outras citocinas (ZHOU, YONGGANG *et al.*, 2020). A tempestade de citocinas na COVID-19 é caracterizada principalmente por uma alta expressão de IL-6 e TNF- α (HU; HUANG; YIN, 2021).

Embora os sintomas respiratórios sejam ainda os mais relacionados à COVID-19, manifestações neurológicas decorrentes da doença são cada vez mais relatadas (ELLUL *et al.*, 2020). O espectro dessas complicações ainda não foi totalmente elucidado, porém está claro que uma proporção substancial de pacientes apresenta desordens de cunho neurológico durante a fase aguda e/ou após a mesma (MISRA *et al.*, 2021). Os sintomas de acometimento central incluem cefaleia, anosmia, ageusia, confusão mental, tontura, náuseas, episódios convulsivos, acidente vascular encefálico, paralisia e encefalopatia (FOTUHI *et al.*, 2020). Diversos estudos mostraram que, em média, 30 a 60% dos pacientes ainda apresentam sintomas após 6 meses do início da doença, abrangendo os neurológicos e psiquiátricos, como hemorragia intracraniana, parkinsonismo, comprometimento cognitivo e distúrbios do sono (TAQUET *et al.*, 2021).

Neuroinvasividade reflete a capacidade de um agente etiológico de invadir o Sistema Nervoso Central ou o Periférico. Vírus neurotrópicos, de forma geral, podem atingir o SNC

através de inervações periféricas ou pela via hematogênica (LUDLOW *et al.*, 2016). O SARS-CoV-2, portanto, poderia entrar no SNC através das terminações nervosas dos nervos cranianos que inervam o trato respiratório, com posterior transporte axonal (anterógrado ou retrógrado) do vírus para o SNC. Para a neuroinvasão pela via hematogênica, o vírus precisa promover a viremia e atravessar a BHE e/ou a barreira sanguínea do líquido cefalorraquidiano (BSLCR) (BAUER *et al.*, 2022). A figura 2 ilustra possíveis vias de entrada do vírus no SNC.

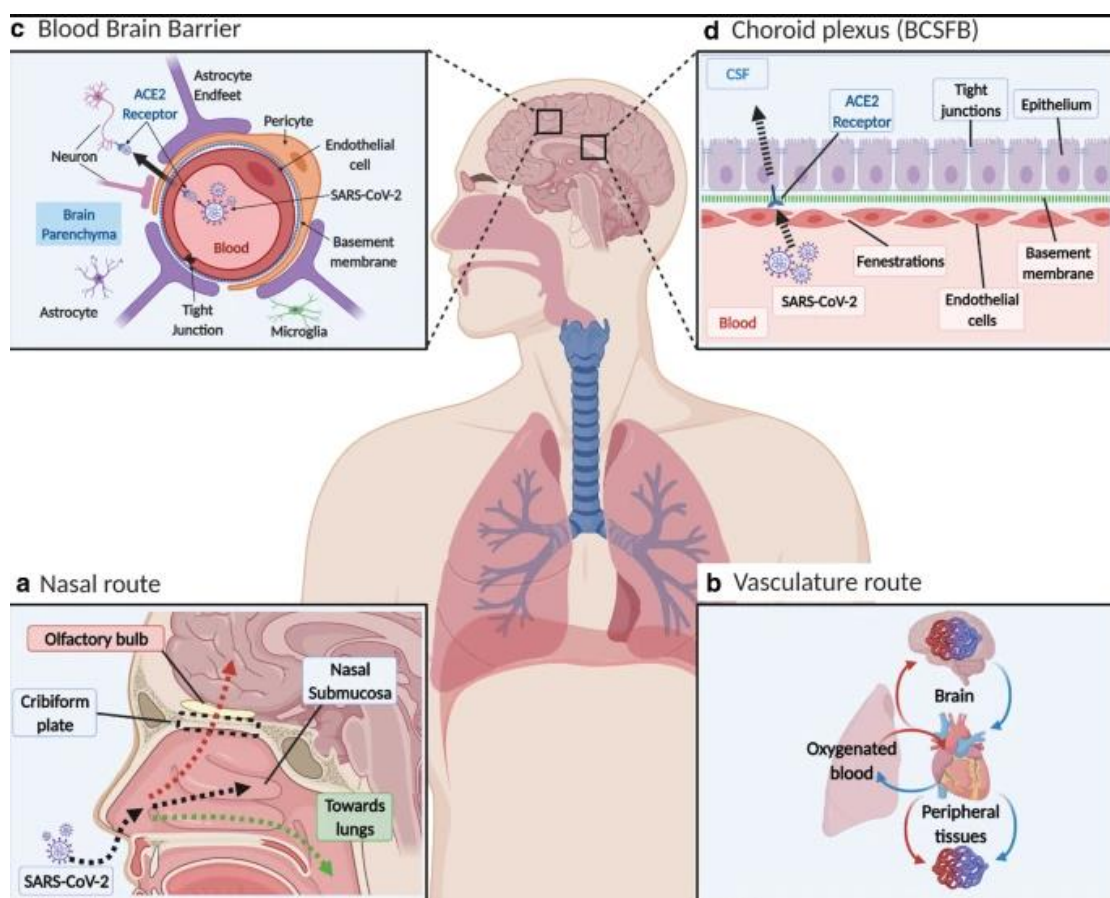


Figura 2: Rotas alternativas que poderiam possibilitar a neuroinvasividade do SARS-CoV-2. Distribuição do SARS-CoV-2 no sangue e possível entrada no cérebro através das barreiras vasculares do SNC. (A) Entrada do vírus pela via nasal: o SARS-CoV-2 entra na cavidade nasal como gotículas e (1) entra nas vias aéreas com o ar inspirado, (2) trafega na submucosa nasal através da vascularização do nariz e adentra os vasos sanguíneos e/ou linfáticos, e (3) pode ter acesso aos nervos olfatórios e, conseqüentemente, ao bulbo olfatório. (B) Entrada viral via vascularização: Após a infecção pulmonar, o patógeno pode transpassar a membrana alveolar, adentrar a corrente sanguínea e, finalmente, acessar os demais órgãos humanos, incluindo o cérebro. (C) Transposição da Barreira Hematoencefálica (BHE): a BHE é uma estrutura altamente especializada na interface entre o sangue e o cérebro. É composta por *tight junctions* nas células endoteliais e faz parte de uma estrutura celular complexa

conhecida como unidade neurovascular (UNV). A UNV é a unidade funcional da BBB e é composta por múltiplas células, incluindo pericitos, astrócitos, micróglia e neurônios, que interagem com as células endoteliais, bem como a membrana basal. ACE2 é expressa tanto em células endoteliais, quanto em pericitos, bem como em certas células neuronais. (D) Plexo coroide: esta é a interface entre o sangue e o líquido cefalorraquidiano (LCR), conhecida como barreira sanguínea do LCR (BSLCR). As células endoteliais do plexo coróide são mais permeáveis do que as da BHE, com lacunas conhecidas como fenestrações. O epitélio do plexo coróide expressa ACE2, o que poderia ser uma possível via de entrada do SARS-CoV-2 no LCR e depois no parênquima cerebral (MCQUAID; BRADY; DEANE, 2021).

Um número crescente de relatos corrobora a hipótese da neuroinvasividade do SARS-CoV-2. Em 2020, Huang e colaboradores detectaram a presença do novo coronavírus no líquido cefalorraquidiano de uma paciente portadora de COVID-19 (HUANG, Y. HANNA; JIANG; HUANG, 2020). Já no ano de 2021, Song e colaboradores lançaram mão de três diferentes abordagens experimentais, com a finalidade de investigar a capacidade de neuroinfecção do SARS-CoV-2. O estudo demonstrou a infecção viral em organoides cerebrais humanos, que acarretou alterações metabólicas, tanto em neurônios infectados, quanto em células neuronais vizinhas. Numa segunda etapa, o grupo demonstrou a neuroinfecção *in vivo*, em camundongos transgênicos que superexpressavam ACE2 humana. Por fim, os pesquisadores detectaram a presença de SARS-CoV-2 em neurônios corticais em amostras cerebrais de pacientes que faleceram em decorrência de COVID-19 (SONG *et al.*, 2021).

Tanto receptores ACE2, que consistem na principal via de entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras, quanto as proteínas TMPRSS2, já foram detectados em células do sistema nervoso (DONG *et al.*, 2020). Os primeiros, inclusive, foram expressos em alto nível no córtex piriforme do cérebro humano, e sua expressão também pôde ser observada em neurônios excitatórios e inibitórios, e algumas células não-neurais, incluindo astrócitos e oligodendrócitos no giro temporal médio e córtex cingulado posterior (CHEN, RONGRONG *et al.*, 2021). Além disso, os receptores NRP1, que são altamente expressos no epitélio respiratório e olfativo, também tiveram sua expressão observada no SNC, principalmente em regiões relacionadas ao

olfato, como os tubérculos olfatórios e os giros paraolfatórios, o que sugere a participação NRP1 como mediadores adicionais da infecção central por SARS-CoV-2 (DAVIES *et al.*, 2020).

1.3. Neuroplasticidade, vírus e transtornos neuropsiquiátricos

Até um passado relativamente recente, a neurociência descrevia o SNC maduro como uma estrutura complexa, porém com pouca capacidade de reparação ou reorganização. Atualmente, todavia, evidências sugerem claramente que o cérebro humano é plástico, com a capacidade de mudar sua estrutura neural, conectividade e função ao longo da vida (CHEN, HAIWEN; EPSTEIN; STERN, 2010). Dessa maneira, a neuroplasticidade pode ser definida como a capacidade do sistema nervoso de alterar sua atividade em resposta a estímulos intrínsecos ou extrínsecos, reorganizando sua estrutura, funções ou conexões (MATEOS-APARICIO; RODRÍGUEZ-MORENO, 2019). O cérebro é, portanto, agora considerado uma estrutura morfológica e funcionalmente dinâmica, influenciada pelo ambiente e constituída por redes glio-neuro-sinápticas distribuídas e interativas (DUFFAU, 2006).

A plasticidade cerebral pode determinar modificações em estratégias cognitivas gerais no enfrentamento de novos desafios, por meio do recrutamento de novas redes neurais ou de alteração na força de conexão das redes envolvidas (SHARMA; CLASSEN; COHEN, 2013). Alguns fenômenos que podem ser compreendidos como manifestações da neuroplasticidade incluem as alterações morfológicas dentríticas e axonais, como, por exemplo, modificações estruturais, o aumento ou a redução do número de espinhos dendríticos. Pode ocorrer ainda o fortalecimento ou a redução da força sináptica, bem como a neurogênese (BRUEL-JUNGERMAN; DAVIS; LAROCHE, 2007).

A neuroplasticidade pode envolver alterações nas sinapses, como mudanças na eficácia, formação de novas e eliminação das já existentes. A ativação da plasticidade neural pode, portanto, eliminar ou criar novas conexões neurais, além de poder causar a morte de células

nervosas (MØLLER, 2008). Nesse contexto, pode-se afirmar que a plasticidade cerebral pode nem sempre ter um aspecto positivo.

Tanto análises epidemiológicas de doenças neuropsiquiátricas humanas, quanto estudos conduzidos em modelos animais, demonstraram a correlação entre infecções e uma ampla gama de distúrbios neuropsiquiátricos (LIPKIN; HORNIG, 2004). Dessa forma, nas últimas décadas tem sido levantada a hipótese de que a infecção viral persistente pode desempenhar um papel importante em transtornos mentais humanos de etiologia incerta (BRNIC *et al.*, 2012).

O *Borna Disease Virus* (BDV), por exemplo, é um RNA vírus altamente neurotrópico que infecta persistentemente o SNC de diversas espécies animais, incluindo o ser humano, e está relacionado com anormalidades comportamentais e doenças neuropsiquiátricas (AMSTERDAM, 1985). Uma vez que a replicação não citolítica é uma marca registrada do BDV, González-Dunia e colaboradores propuseram que o dano ao SNC ligado ao BDV poderia ser causado em parte pela interferência viral na plasticidade neuronal (GONZALEZ-DUNIA *et al.*, 2005).

Outro agente etiológico que parece estar envolvido em alterações neuroplásticas é o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV1). Assim como o BDV, ele também apresenta neurotropismo e grande potencial de neuroinvasividade, sendo muitas vezes relacionado a casos de declínio cognitivo nos pacientes, mesmo na era do tratamento anti-retroviral (CLIFFORD; ANCES, 2013). Em experimentos com modelos de roedores transgênicos, foi observado que a infecção parecia ser responsável por profundas alterações funcionais na fisiologia sináptica, além das mudanças comportamentais apresentadas pelos animais (FITTING *et al.*, 2013).

Estudos prévios relataram a correlação entre a infecção por certos coronavírus, como MERS-CoV e SARS-CoV, e a ocorrência de manifestações neurológicas, como déficit de memória, sinais de depressão e ansiedade, psicose e ideação suicida, tanto na fase aguda, quanto após a resolução da doença (RAONY *et al.*, 2020). A infecção por SARS-CoV-2, como já

mencionado, também tem sido associada com sintomas neurológicos, que podem permanecer mesmo após a recuperação do quadro agudo da COVID-19. Os mecanismos pelos quais a doença pode acarretar tais sinais ainda vem sendo investigados. Uma das possibilidades seria a tempestade de citocinas característica à patologia.

Algumas citocinas inflamatórias, como IL-6 e IL-1 β , são produzidas basalmente em condições saudáveis. Todavia, no decorrer do quadro de doenças periféricas e centrais nas quais os níveis cerebrais de IL-1 β e IL-6 estão aumentados, ambas tendem a inibir a plasticidade sináptica, aprendizagem e memória (BESEDOVSKY; DEL REY, 2011). Estudos reportaram a presença de altos níveis de IL-6 no sangue de pacientes infectados por SARS-CoV-2 (RAGAB et al., 2020) , bem como no SNC de camundongos transgênicos K18-hACE2 infectados por SARS-CoV (NETLAND et al., 2008). A interleucina-6 é expressa em níveis baixos em indivíduos saudáveis, porém, na presença de alterações homeostáticas, sua expressão torna-se mais elevada, podendo rapidamente ser detectada, e mesmo após a remoção do agente estressor, seus níveis podem se manter elevados e causar doenças (TANAKA et al., 2014). Dessa forma, especula-se se a desregulação na expressão de IL-6 decorrente da infecção por SARS-CoV-2 poderia estar relacionada com alterações neuroplásticas e com o desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos.

1.4. A neuroplasticidade como alvo farmacológico

Nas últimas décadas, os fenômenos envolvidos na neuroplasticidade vem sendo constantemente investigados. Estudos demonstram que as alterações cerebrais em seres humanos podem ser dependentes das atividades cotidianas. No ano de 2000, Maguire e colaboradores mostraram por meio de imagens de ressonância magnética, que motoristas de táxi da cidade de Londres apresentavam aumento do volume hipocampal, em relação a

indivíduos que exerciam outras atividades profissionais, provavelmente relacionado à navegação espacial (MAGUIRE *et al.*, 2000).

Mesmo após lesões severas, como acidente vascular cerebral (AVC) ou lesão cerebral traumática, a plasticidade neural é possível devido à existência de conectividade difusa e significativa no SNC, bem como pela possibilidade de formação de novos circuitos por meio de remapeamento neuronal (CHEN, HAIWEN; EPSTEIN; STERN, 2010). Nos casos de AVC isquêmicos, após algumas horas da interrupção do fluxo sanguíneo para o tecido neural, a função tecidual é irreparável, e a recuperação de funções subsequente a ela é possibilitada pelo redirecionamento da atividade neural para partes funcionais do cérebro, que podem vir a assumir diretamente as funções perdidas, ou, mais frequentemente, sofrer mudanças em sua organização estrutural, através da ativação da plasticidade neural. Dessa forma, fica claro que os efeitos da ativação da plasticidade neural podem ser benéficos para os indivíduos, à medida em que permitem a adaptação do SNC a diferentes demandas. A ativação da plasticidade neural, entretanto, também pode ser prejudicial, pois pode estar associada a distúrbios neurológicos (MØLLER, 2008).

A neuroplasticidade maladaptativa pode resultar em sintomas de cunho neurológico e distúrbios, como certas formas de dor crônica (dor neuropática central) e zumbido intenso nos ouvidos (MØLLER, 2008). Estudos demonstram que a dor crônica, por sua vez, está relacionada com alterações plásticas nos circuitos neurais, acarretando o surgimento de emoções negativas, como depressão e ansiedade (YAMAUCHI *et al.*, 2022). Além disso, há relatos de que estímulos negativos, como estresse, dor e comprometimento cognitivo, podem resultar tanto em depressão quanto em alterações na plasticidade neural (LIU *et al.*, 2017). Tais achados fomentam a hipótese da neuroplasticidade do transtorno depressivo maior (TDM), que propõe a correlação entre a disfunção da plasticidade neural e o desenvolvimento patológico básico do TDM (KUHN *et al.*, 2014).

Devido a sua grande relevância para a manutenção da homeostase do SNC, a plasticidade neural vem sendo investigada como um possível alvo farmacológico para o tratamento de distúrbios centrais. Em casos de TDM, por exemplo, estudos clínicos e pré-clínicos fornecem evidências da ocorrência de atrofia e morte de neurônios hipocámpais (LEE; OGLE; SAPOLSKY, 2002). O tratamento antidepressivo parece se opor a esses efeitos celulares adversos, que podem ser considerados como uma perda de plasticidade neural, bloqueando ou revertendo a atrofia dos neurônios do hipocampo, aumentando assim a sobrevivência e a função celular. (DUMAN; MALBERG; THOME, 1999). De forma não menos relevante, alterações neuroplásticas, principalmente na plasticidade sináptica, também são frequentemente observadas em doenças neurodegenerativas, como as doenças de Alzheimer e Parkinson. (MANGO *et al.*, 2019).

Uma das intervenções reportadas por sua capacidade modular a plasticidade cerebral em humanos é a Estimulação Cerebral Não-Invasiva, que consiste na estimulação elétrica do cérebro com finalidade terapêutica. Existem cinco técnicas principais: (i) Estimulação Magnética Transcraniana Repetitiva; (ii) Estimulação Eletroterapêutica Craniana; (iii) Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua; (iv) Eletroestimulação Cortical Não-Invasiva de Impedância Reduzida; e (v) Estimulação Transcraniana por Ruído Aleatório (SCHULZ; GERLOFF; HUMMEL, 2013).

Devido a seu potencial modulatório neuroplástico, a Estimulação Cerebral Não-Invasiva vem sendo investigada como alternativa terapêutica para o tratamento de diversos distúrbios neurológicos (SCHULZ; GERLOFF; HUMMEL, 2013). Recentemente, Kuo e colaboradores utilizaram um modelo murino de doença de Parkinson para demonstrar que a estimulação elétrica cerebral, tanto precoce quanto a longo prazo, era capaz de reduzir a disfunção motora e exercer efeitos neuroprotetores nos animais (KUO *et al.*, 2022). Em humanos, a Estimulação Magnética Transcraniana Repetitiva surgiu como um tratamento promissor para o TDM em

adultos que não-responsivos às intervenções farmacológicas ou comportamentais tradicionais (OBERMAN *et al.*, 2021).

As técnicas de estimulação cerebral também são utilizadas para o tratamento de diversas outras condições neuropsiquiátricas, como epilepsia, adicção à substâncias de abuso, dor neuropática e acidente vascular cerebral (SCHULZ; GERLOFF; HUMMEL, 2013). Dessa forma, pode-se destacar a importância da investigação dos mecanismos moleculares que influenciam na plasticidade cerebral humana, bem como a busca por novas opções de intervenções farmacológicas com potencial modulatório (MANGO *et al.*, 2019).

1.5. O Canabidiol, a neuroplasticidade e os transtornos neuropsiquiátricos

O gênero *Cannabis* de plantas compreende principalmente as espécies *sativa* e *indica*, que são utilizadas há milênios na confecção de roupas, papel, em cerimônias religiosas e para fins recreativos e medicinais (DEVINSKY *et al.*, 2014). Os compostos derivados da *Cannabis sativa*, pertencem ao grupo dos canabinoides, conjunto heterogêneo que engloba três categorias principais: os endógenos, os sintéticos e os fitocanabinoides (onde as substâncias oriundas da planta em questão se enquadram) (RUSSO; GUY, 2006). Os fitocanabinoides, começaram a ser isolados e identificados entre o fim da década de 30 e o início da de 40 por Adams e Todd, respectivamente em 1942 e 1946 (ADAMS, 1942) (TODD, 1946).

Os componentes majoritários da *C. sativa* são o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) e o canabidiol (CBD), diferenciado do THC por não apresentar ação psicotomimética. Em 1963, após cerca de vinte anos dos estudos iniciais, a estrutura do CBD foi elucidada por Mechoulam e Shvo (MECHOULAM; SHVO, 1963). Dez anos após, Karniol e Carlini viriam a postular, após a realização de ensaios em coelhos e roedores, que o CBD antagonizaria os efeitos excitatórios do THC, além de indiretamente potencializar o efeito depressor do mesmo (KARNIOL; CARLINI, 1973).

Nas últimas décadas, o estudo de canabinoides ganhou grande notoriedade, pois eles foram relatados como moduladores de eventos imunes e plásticos do SNC, bem como das funções comportamentais e cognitivas (CAMPOS, A C *et al.*, 2015). O CBD, principal derivado não-psicotomimético da *C. sativa*, apresenta um amplo potencial terapêutico (IZZO *et al.*, 2009). Diversos estudos demonstraram a segurança e a eficácia da administração de CBD em portadores de epilepsia refratária ao tratamento convencional. Os resultados apontam para uma redução significativa dos episódios de crises convulsivas, o que promove a melhora da qualidade de vida dos pacientes (GASTON; MARTIN; SZAFLARSKI, 2021).

Uma vasta gama de ensaios envolvendo o CBD realizados em modelos animais é relatada na literatura. Em 1990, Guimarães e colaboradores esclareceram a aparente contradição acerca dos efeitos do canabinoide sobre o comportamento do tipo ansioso em ratos. Utilizando um modelo comportamental de ansiedade, os pesquisadores demonstraram que o CBD exercia um efeito ansiolítico na forma de uma curva de dose-resposta em “U invertido”, onde as concentrações mais altas se mostravam ineficazes (GUIMARÃES *et al.*, 1990).

No ano de 2013, Campos e colaboradores, por sua vez, mostraram que a administração de CBD na dose de 30mg/kg em ratos, de forma concomitante ao estresse crônico imprevisível, prevenia os efeitos ansiogênicos do modelo de estresse, além de promover a elevação da produção de células progenitoras no hipocampo (efeito pró-neurogênico) (CAMPOS, ALLINE C. *et al.*, 2013). Ensaios em ratos evidenciaram também que a administração de CBD está associada ao efeito do tipo antidepressivo. Em seus estudos, Linge e colaboradores demonstraram que este efeito pode ser de início rápido e sustentado, evidenciado pelo aumento dos níveis de serotonina e glutamato no córtex pré-frontal dos animais, além de reversão do comportamento anedônico (LINGE *et al.*, 2016).

Os efeitos benéficos neuroplásticos do CBD também já foram demonstrados em um modelo murino de isquemia cerebral transiente global. O tratamento com a droga foi capaz de

atenuar a neurodegeneração hipocampal, além de prevenir a perda de espinhos dendríticos, apresentando, portanto, efeito neuroprotetor (MEYER *et al.*, 2021). Além disso, em outros estudos pré-clínicos o CBD já apresentou propriedades, anti-inflamatórias, antioxidantes e anti-*insônia* (ABATE; UBERTI; TAMBARO, 2021), ampliando ainda mais o leque de possibilidades para suas possíveis indicações terapêuticas.

Modelos *in vitro* também foram utilizados para a elucidação dos efeitos do canabidiol em células do SNC. A tabela 2 demonstra exemplos de efeitos da administração de CBD em variadas concentrações, em modelos *in vitro* de exposição de células do sistema nervoso central a determinados estímulos.

Tabela 2: Efeitos de diferentes concentrações de CBD em estudos *in vitro*

Tipo Celular	Estímulo	[CBD] uM (concentrações eficazes em destaque)	Tempo de exposição	Efeito	Referência
<i>Cultura primária de neurônios corticais de ratos</i>	Glutamato / Hidroperóxido de terc-BUTILA	1/ 3,16/ 10 /31,16	18-20h	Neuroprotetor contra a toxicidade glutamatérgica e a mediada por aumento de ROS	(HAMPSON <i>et al.</i> , 1998)
<i>Cultura primária de micróglia</i>	LPS	0,1 / 1 / 10	4h	Anti-inflamatório; inibidor da ativação microglial	(SONEGO <i>et al.</i> , 2018)
<i>HiB5 (células progenitoras de hipocampo)</i>	-	0,05/ 0,1 / 0,25 / 0,5uM	16h	Pró-neurogênico	(CAMPOS, ALLINE C. <i>et al.</i> , 2013)
<i>SH-SY5Y e cultura primária de células</i>	Oligomicina, FCCP, 4-AP	0,1 / 1	0h- Overnight	Neuroprotetor contra Oligomicina e FCCP e regulação	(RYAN <i>et al.</i> , 2009)

<i>hipocampais de rato</i>	do Ca ²⁺ intracelular				
<i>HT22, PC12 e cultura de células primárias cerebelares de rato</i>	H ₂ O ₂	0,1 / 1 / 2,5 / 5 / 10	Overnight	Antioxidante e Neuroprotetor	(MARSICANO <i>et al.</i> , 2002)
<i>Cultura primária de neurônios cerebelares de ratos</i>	H ₂ O ₂ e Rotenona	0 / 2.5 / 5 / 10	24 ou 48h	Antioxidante e Neuroprotetor	(ECHEVERRY <i>et al.</i> , 2021)
<i>Cultura primária de neurônios hipocampais de rato</i>	Glutamato	0,1 / 1 / 10	4h	Neuroprotetor contra a toxicidade glutamatérgica	(LIMA <i>et al.</i> , 2020)

Ainda durante os meses iniciais da pandemia de COVID-19, a comunidade científica prontamente se mobilizou em busca de alternativas farmacológicas que pudessem combater a nova doença. Nesse contexto, o redirecionamento do uso de drogas já existentes poderia ser promissor, visto que reduziria o tempo necessário para a disponibilização do tratamento para a população. O canabidiol, atualmente, é considerado uma das moléculas mais interessantes no campo da farmacologia, uma vez que exerce uma ampla gama de efeitos terapêuticos. Sendo assim, surgiu a hipótese de que o CBD poderia limitar a severidade e a progressão da COVID-19 (ESPOSITO *et al.*, 2020).

No ano de 2020, Wang e colaboradores utilizaram modelos artificiais humanos 3D de tecidos de via oral, respiratória e intestinal para avaliar os efeitos de extratos de *C. sativa* com alto teor de CBD sobre proteínas envolvidas com a infecção do SARS-CoV-2. O estudo demonstrou que a droga provocava diminuição da expressão das enzimas ACE2 e TMPRSS2,

que são de grande importância para a invasão viral nas células hospedeiras (WANG, BO *et al.*, 2020).

Já em 2021, Nagarkatti e colaboradores ressaltaram a grande relevância das propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias dos canabinoides, e sugeriram um potencial papel dessas moléculas no manejo da síndrome do desconforto respiratório agudo, relacionada com complicações da COVID-19 (NAGARKATTI; MIRANDA; NAGARKATTI, 2020). Além disso, no mesmo ano, um estudo demonstrou a eficácia *in vitro* do CBD, dependente de PPAR- γ , na prevenção de danos epiteliais e resposta hiperinflamatória desencadeada pela proteína S do SARS-CoV-2 em células Caco-2 (CORPETTI *et al.*, 2021). Tais achados fomentam a importância da realização de estudos que auxiliem a desvendar o papel do CBD no contexto da infecção pelo novo coronavírus.

1.6. Hipótese

Considerando-se que:

- (1) A infecção por SARS-CoV-2 tem sido relacionada com o surgimento de sintomas neurológicos persistentes, alterações estruturais e moleculares nas células do SNC;
- (2) O canabidiol tem efeitos neuroplásticos positivos relatados e está intimamente relacionado com a neuroproteção em diferentes disfunções do SNC,

a hipótese do presente trabalho é que a administração de canabidiol em células de neuroblastoma humano infectadas por SARS-CoV-2 poderia promover a neuroproteção, por meio de alterações na plasticidade celular.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivos gerais

Investigar a neuroinvasividade do SARS-CoV-2 em amostras *post-mortem* de via olfatória de pacientes falecidos em decorrência de COVID-19 e, posteriormente, utilizar um modelo *in vitro* de neuroinfecção para avaliar os efeitos do canabidiol em células de neuroblastoma humano infectadas pelo novo coronavírus.

1.7.2. Objetivos específicos

- Investigar a expressão gênica de SARS-CoV-2 em amostras *post-mortem* humanas de via olfatória;
- Avaliar por imunofluorescência a presença de SARS-CoV-2 nas mesmas amostras;
- Avaliar a expressão de citocinas inflamatórias nas amostras analisadas;
- Investigar os efeitos da administração de diferentes concentrações de canabidiol em linhagem celular de neuroblastoma humano submetida à infecção prévia com SARS-CoV-2.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Ensaios em amostras *post-mortem* coletadas de pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto falecidos em decorrência da COVID-19

2.1.1. Comitê de ética

Todos os protocolos foram aprovados e conduzidos de acordo com as resoluções do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CAAE 43040920.0.0000.5440; Parecer 4.560.267).

2.1.2. Imunofluorescência – ensaios para a para a detecção de SARS-CoV-2 e caracterização de tecido olfatório

Tecido neural foi coletado via região intranasal, através de biopsia minimamente invasiva de pacientes não-sobreviventes a COVID-19, e fatias de tecido foram fixadas em lâminas de microscopia. Previamente ao ensaio de imunofluorescência, foi realizada a desparafinização tecidual, por meio da realização de duas lavagens (10 minutos cada) em xilol, seguidas por duas lavagens consecutivas de 5 minutos cada em etanol 100%. Após, o tecido passou por mais lavagens de 5 minutos em etanol 90%, 80%, 70% e em água destilada. Em seguida, foram realizadas três lavagens de 10 minutos com TBS/0,5% triton, prosseguindo para a recuperação antigênica em tampão citrato de sódio pré-aquecido a 95°C. As lâminas passaram pelo processo de resfriamento, ainda em tampão, e passaram por três lavagens de 5 minutos cada em TBS/0,5% triton. Posteriormente, foram submetidas ao bloqueio com TBS/0,5% triton/1% BSA, durante 2h, em temperatura ambiente. Realizou-se, então, a incubação dos anticorpos primários. Para a marcação de SARS-CoV-2, foi utilizado o anticorpo primário de proteína de nucleocapsídeo (NP) produzido em coelho, na diluição de 1:500; para a marcação de astrócitos, anticorpo GFAP produzido em cabra, na diluição de 1:50; e a marcação neuronal foi realizada com anticorpo TUJ-1 produzido em rato, na diluição de 1:50. A incubação perdurou um total de 48h, em câmara úmida e escura. No ensaio para caracterização do tecido

olfatório, os anticorpos primários incubados nesta etapa foram OMP (produzido em cabra, na diluição de 1:100) e Proteína Spike (produzida em coelho, na diluição de 1:500), para a marcação de neurônios olfatórios e de SARS-CoV-2. Após, foram realizadas três lavagens de 10 minutos cada em TBS/0,5% triton/0,1% BSA, seguidas pela incubação dos anticorpos secundários (*anti-rabbit* no comprimento de onda de 488, *anti-goat* de 594 e *anti-mouse* em 647 nm). A incubação nos anticorpos secundários foi realizada ao abrigo da luz, e teve duração de 1h30min. As lâminas foram lavadas mais três vezes, por 10 minutos cada, sendo uma com TBS/0,5% triton, e duas com TBS. Foi realizada a incubação em Hoechst por 10 minutos, seguida por três lavagens de 5 minutos cada com TBS. Finalmente, as lâminas foram montadas em meio adequado e analisadas em microscopia de fluorescência.

2.1.3. RT-PCR para a detecção da expressão gênica de SARS-CoV-2 e das citocinas IL-6 e IL-10

As amostras *post-mortem* coletadas via biopsia intranasal minimamente invasiva foram acondicionadas em eppendorfs individuais, contendo 500uL de TRIzol™ (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA*). Os tecidos foram, então, submetidos ao processo de lise e homogeneização tecidual em *Tissuelyser*. Em seguida, foram realizadas as etapas de extração de RNA com TRIzol™ (*TRIzol Plus RNA Purification, Thermo Fisher Scientific, EUA*), síntese de cDNA (*High-Capacity RNA to cDNA™ Kit, Thermo Fisher Scientific, EUA*) e RT-PCR para a quantificação da expressão do gene N2 de SARS-CoV-2 e de Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-10 (IL-10). O ensaio de PCR em tempo real foi realizado com o uso de primers e sondas específicos, com *TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™)*. Todos os ensaios foram realizados segundo as instruções dos respectivos fabricantes.

2.2.4. Dot blot (Array de citocinas)

Um total de quatro amostras *post-mortem* de tecido olfatório foram submetidas ao ensaio *Human Cytokine Array* (R&D Systems, MN, EUA), com a finalidade de realizar a

determinação paralela dos níveis relativos de certas citocinas e quimiocinas humanas. As amostras foram selecionadas segundo o seguinte critério: metade deveria ser considerada positiva para a presença de SARS-CoV-2, e a outra metade, negativa. As duas amostras positivas foram as que apresentaram níveis detectáveis de expressão de ambos os genes virais (E e N2) no ensaio de RT-PCR, enquanto as outras duas restantes foram consideradas negativas, por não apresentarem a expressão dos mesmos genes. As membranas de nitrocelulose contendo anticorpos de captura (em duplicata) foram submetidas à etapa de bloqueio de sítios inespecíficos por tampão de bloqueio fornecido pelo kit (em agitação, durante uma hora). Enquanto isso, as amostras selecionadas para as análises foram preparadas conforme as instruções do fabricante e, em seguida, foram adicionados 15uL de coquetel de anticorpos de detecção de *array* de citocinas humanas a cada uma delas, que permaneceram em incubação durante uma hora, em temperatura ambiente. O tampão de bloqueio foi aspirado da placa de quatro poços contendo as membranas de nitrocelulose, e as mesmas foram incubadas individualmente (cada membrana em seu respectivo poço), com as misturas de amostras e anticorpos *overnight*, sob agitação, em temperatura de 2-8°C. No segundo dia de protocolo, as membranas foram cuidadosamente depositadas em recipiente plástico individuais, para serem submetidas aos processos de lavagem (três lavagens com o *wash buffer*, sob agitação). Após, as membranas foram retiradas dos recipientes de lavagem, e incubadas com estreptavidina – HRP (diluída conforme instruções do fabricante) durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Passado o tempo de incubação, o processo de lavagem foi repetido, e o excesso de *wash buffer* foi drenado. Procedeu-se, então, a incubação das membranas com *Chemi Reagent Mix* (1mL em cada uma), cuidadosamente difundido por toda a superfície. Após, todo o excesso de reagentes foi desprezado e as membranas foram encaminhadas para o processo de revelação por quimioluminescência, em um fotodocumentador (*ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare Life Science*).

2.2. Ensaio em cultura celular

2.2.1. Cultura de células

Para a realização dos experimentos, foi utilizada a cultura de células SH-SY5Y, uma linhagem derivada de neuroblastoma humano. As células foram mantidas em meios adequados, suplementados com soro fetal bovino, antibióticos e fatores de crescimento em condições padrão de incubação (5% CO₂, atmosfera umidificada, 33 ou 37°C). Após o descongelamento, as mesmas foram acompanhadas até atingirem a confluência (75% de ocupação das placas ou garrafas de cultura), e passadas ao menos quatro vezes (não mais do que doze) antes do início dos experimentos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e em três tempos distintos: 0h, 2h e 4h.

2.2.2. Infecção *in vitro* de células SH-SY5Y com SARS-CoV-2

As células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro revestidas com Laminina e Poli-D-Lisina. Após a confluência (75-90% de ocupação), as placas contendo as células foram encaminhadas ao Laboratório de Biossegurança Nível 3, localizado no Centro de Pesquisa em Virologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. As células foram infectadas com isolado clínico de SARS-CoV-2 (MOI=1) durante 2h, sob leve agitação. O inócuo, então, foi aspirado dos poços e as células foram submetidas a 3 lavagens com tampão fosfato-salino (PBS). Após, as células foram mantidas em condições ideais de incubação até o início do tratamento com canabidiol.

2.2.3. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5- difenil tetrazolium]), cuja redução a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular, foi realizado em placas de cultura de 24 poços. Uma solução de MTT 0,5 mg/mL diluído em

PBS foi adicionada e incubada por 2h. O sobrenadante foi, então, retirado e os cristais de formazan solubilizados com DMSO. A solução formada em cada poço foi plaqueada (placa de 96 poços) e analisada em um leitor de placas a 595 nm. O experimento foi realizado em triplicata, em uma réplica biológica.

2.2.4. RT-PCR

Para a detecção do gene N2 do SARS-CoV-2 nas células tratadas com CBD, foi realizado RT-PCR, de acordo com o protocolo do grupo Charité (CORMAN *et al.*, 2020). Previamente ao ensaio de RT-PCR para determinar a carga viral no lisado celular e no sobrenadante, foram realizadas a extração de RNA com TRIzol™ (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*, EUA), e a síntese de cDNA (*High-Capacity RNA to cDNA™ Kit, Thermo Fisher Scientific*, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação da expressão gênica de SARS-CoV-2 foi realizada com *TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™)*, seguindo as instruções do fabricante. Todos os ensaios de PCR em tempo real foram realizados no termociclador de PCR em tempo real Step-One Plus (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), com *primers* e sondas específicos (tabela 3), e os valores foram normalizados pela expressão dos genes de manutenção da β -actina. O experimento foi realizado em um total de três replicatas biológicas.

Tabela 3: Primers e sondas utilizados para PCR em tempo real

Gene	Primer	Sequência	Referência
E	Forward	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	(CORMAN <i>et al.</i> , 2020)
	Reverse	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	
	Probe	FAM-ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG- BBQ	

	Forward	CACATTGGCACCCGCAATC	
N	Reverse	GAGGAACGAGAAGAGGCTTG	
	Probe	FAM-ACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCA- BBQ	
	Forward	CCCAGCCATGTACGTTGCTA	
β-actina	Reverse	TCACCGGAGTCCATCACGAT	(PROENCA- MODENA <i>et</i> <i>al.</i> , 2012)
	Probe	Fam-ACGCCTCTGGCCGTACCACTGG-Tamra	

2.2.5. Imunofluorescência – ensaio de proliferação celular

Para a detecção e quantificação de células em proliferação, foi realizado o ensaio de proliferação celular baseado na incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) na fita de DNA. As células foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro revestidas com Laminina e Poli-D-Lisina. Após a confluência (75-90% de ocupação), as células foram infectadas com SARS-CoV-2 e incubadas com diferentes concentrações de CBD (300nM, 100nM; 3uM, 1uM e 10 uM), em três diferentes *time-points* (0h, 2h ou 4h). Duas horas antes do final do tempo de incubação, as células foram suplementadas com BrdU (1mg/mL). Ao final do período de 2h, o experimento foi interrompido e o sobrenadante celular, composto pelo meio de cultura (que foi imediatamente misturado com TRIZOL e armazenado a -80°C para análise de qPCR) foi removido de cada um dos poços e substituído por uma solução de 4% de PFA + 6% de sacarose por 10 minutos. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e mantidas a 4°C por 24h. O protocolo de imunocitoquímica para BrdU teve início com a incubação das células em uma solução 2N de ácido clorídrico (HCl) durante 30

minutos, a 37°C, seguida por um período de incubação de 10 minutos a 4°C. O HCl, então, foi completamente removido de todos os poços e lavado duas vezes com uma solução de ácido bórico (pH = 8,9). Após este procedimento, as células foram lavadas 3 vezes com PBS + (Soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS) + 0,1% de albumina de soro bovino (BSA) + 0,25% de Triton 100X) e, em seguida, incubadas com solução de bloqueio (PBS + 1% de Albumina de Soro Bovino (BSA) + 0,25% de Triton 100X) por 2h. Após o bloqueio, lamínulas contendo as células foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários: *anti-rat-BrdU* (1:500, *Abcam-Cambridge*, Reino Unido), *anti-rabbit-Microtubule Associated Protein-2* (MAP-2, 1:500, Millipore- Burlington, Massachusetts, Estados Unidos-EUA). A incubação teve duração de 1h, em temperatura ambiente. Os núcleos totais foram marcados com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). No segundo dia do procedimento, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS+ e incubadas com os respectivos anticorpos secundários Alexa Fluor (*Anti-rat 594*, *anti-rabbit 647*; 1:1000, *Invitrogen-Carlsbad*, Califórnia, EUA). Em uma segunda rodada do ensaio, após 30 minutos de bloqueio, lamínulas contendo as células foram incubadas *overnight* com o anti-soro SARS-CoV-2 (produzido em camundongo, 1:1.000, conforme Pontelli e colaboradores (PONTELLI *et al.*, 2020). Após, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário (*anti-mouse 488*, 1:1000, *Invitrogen-Carlsbad*, Califórnia, EUA). Ao final do período de incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS+ e montadas em lâminas de vidro com Cytoseal 60 (*Eletron Microscopy Science- Hatfield, PA*, EUA). As células BrdU+ foram contadas em quatro quadrantes diferentes em microscópio confocal (*TCS SPE, Leica, Wetzlar*, Alemanha). O número total de células de cada quadrante também foi contado (com base no total de núcleos). As células BrdU+ foram expressas como % de células BrdU/número total. O experimento foi realizado em um total de três replicatas biológicas.

2.2.6. Drogas

Foi utilizado canabidiol (CBD), Laboratórios BSPG, diluído em dimetilsulfóxido (DMSO).

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Resultados clínicos e biomoleculares dos ensaios relacionados a pacientes internados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto falecidos em decorrência da COVID-19

3.1.1. Pacientes: Informações gerais, Comorbidades e Sintomas Neurológicos

Em parceria com o Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, nosso grupo de pesquisas realizou ensaios em amostras *post-mortem* de pacientes que faleceram em decorrência de complicações da COVID-19. Durante a internação dos mesmos, foram coletadas informações relativas ao estado geral de saúde, a presença de comorbidades e a ocorrência de sinais neurológicos, como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4: Informações gerais, comorbidades e sintomas neurológicos.

Paciente Nº	Sexo	Idade	Dias entre o diagnóstico e o óbito	Comorbidades		Sintomas Neurológicos		
				Principais	Outras	C	ANM	DIS
1	M	24	15	DM; OB		X	X	
2	F	31	6	OB	Oclusão intestinal e urinária por massa tumoral			
3	F	69	13	DM; PC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica			
4	M	49	30	OB; F; AA	Aspergilose pulmonar; Bronquiolite obliterante; Insuficiência venosa em membro inferior direito			
5	F	77	24	HAS		X		
6	M	74	13	DM; HAS; PC; F	Doença renal crônica em estágio IV; Acidente cerebrovascular prévio			
7	F	69	12	DM; HAS; OB; F	Hipotireoidismo; Dislipidemia			

8	F	53	26	F	Estenose traqueal; Traqueomalácia; Infarto Agudo do miocárdio prévio; Acidente cerebrovascular prévio		
9	M	65	10	DM; PC	Hipertrigliceridemia; Hipotireoidismo		
10	F	53	19	HAS	Hipotireoidismo	X	X
11	M	74	25	DM; HAS; OB; PC	Hipertensão pulmonar em investigação; Apneia do sono obstrutiva séria; Acidente cerebrovascular prévio, com sequelas motoras; Hipotireoidismo; Osteoartrite no joelho; Doença renal crônica em estágio III		
12	M	43	34	OB			X X
13	M	78	38	HAS; OB	Hipotireoidismo		
14	F	68	11	DM; HAS; OB; F	Doença renal crônica; Depressão; Dislipidemia		
15	F	83	24		Doença de Alzheimer; Hipotireoidismo		
16	M	73	17		Asma		

DM: Diabetes Mellitus; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; OB: Obesidade; PC: Patologia Cardíaca; F: Fumante; AA: Adicção ao Álcool; C: Cefaleia; ANM: Anosmia; DIS: Disgeusia. Dados não publicados.

3.1.2. Ensaios de imunofluorescência para a detecção de proteína viral e caracterização de via neural olfatória

As amostras *post-mortem* coletadas via biópsia minimamente invasiva foram submetidas a ensaios de imunofluorescência. Na figura 3, podem-se observar as imagens de microscopia de fluorescência, contendo as marcações de núcleos celulares (Hoechst), de SARS-

CoV-2 (proteína NP) e de neurônios (TUI-1). Na imagem inferior direita, de *merge* das marcações, observa-se a presença de neurônios infectados.

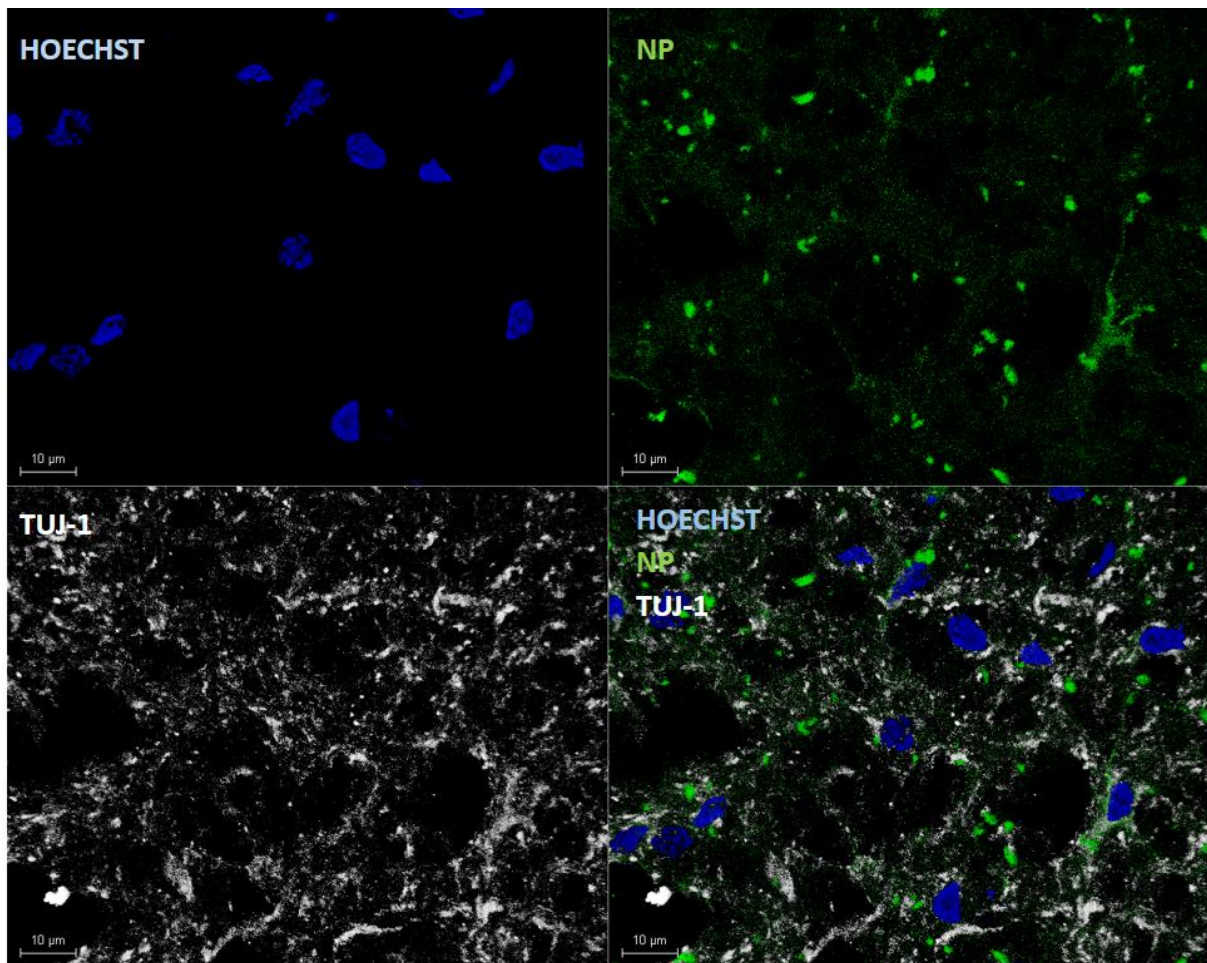


Figura 3: Neurônios humanos infectados por SARS-CoV-2. Imagens de microscopia de fluorescência realizada em amostras *post-mortem* de tecido de via olfativa, coletado por biópsia minimamente invasiva, de paciente que faleceu por complicações de COVID-19. Na extremidade superior esquerda podem-se observar os núcleos celulares, por meio da marcação de Hoechst, na tonalidade azul; ao lado direito da mesma, há marcação de SARS-CoV-2, com a proteína viral de Nucleocapsídeo (NP), em verde; na extremidade inferior esquerda, observa-se a presença de neurônios, por meio da marcação de TUI-1, em branco; à sua direita, imagem de sobreposição das marcações anteriormente mencionadas, demonstrando a infecção dos neurônios por SARS-CoV-2.

Com o intuito de confirmar que amostras *post-mortem* eram constituídas de tecido neural olfatório, foi realizado o ensaio de imunofluorescência, utilizando marcações para a caracterização de neurônios olfatórios, astrócitos, proteína S do SARS-CoV-2 e núcleos

celulares (OMP, GFAP, Spike e DAPI, respectivamente). As imagens de microscopia de fluorescência podem ser observadas na figura 4.

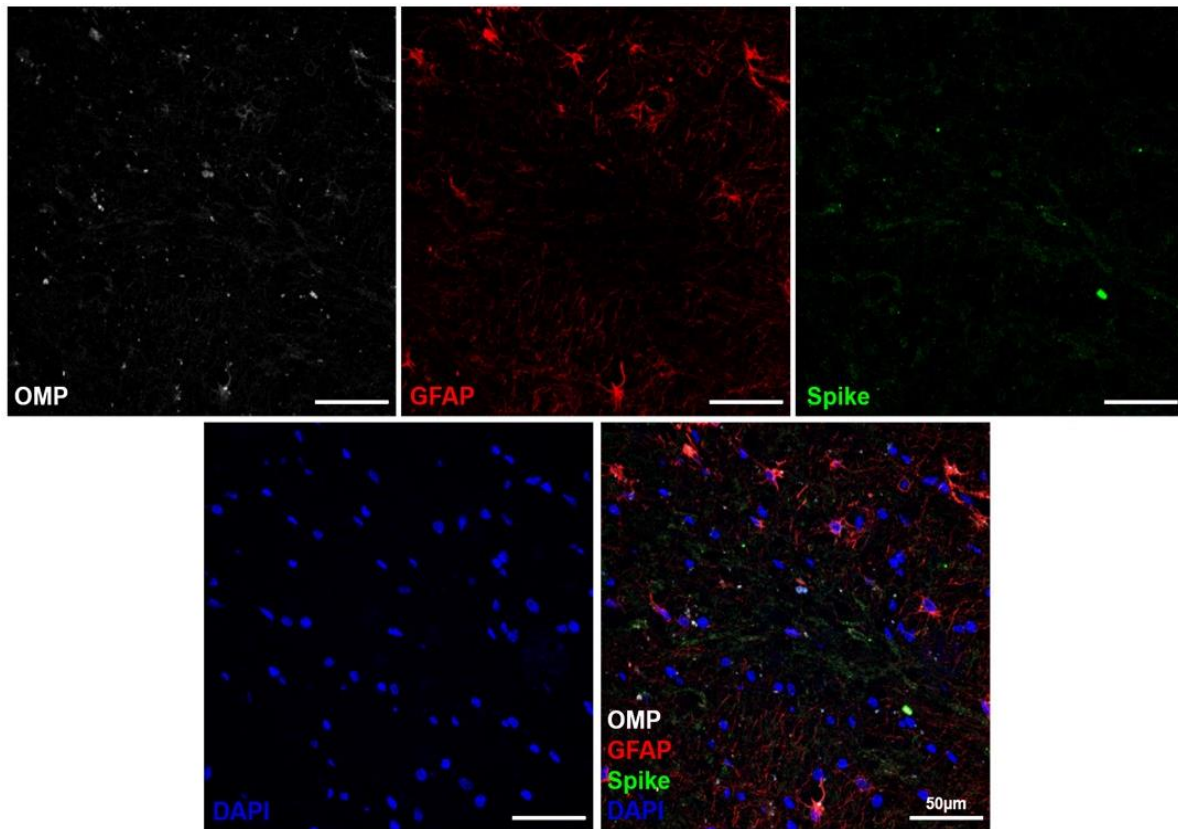


Figura 4: Neurônios olfatórios e astrócitos humanos infectados por SARS-CoV-2. Imagens de microscopia de fluorescência, apresentando neurônios olfatórios marcados com *Olfactory Marker Protein* (OMP), na tonalidade branca; astrócitos marcados com *Glial Fibrillary Acid Protein* (GFAP), em vermelho; SARS-CoV-2, marcada com a proteína viral Spike, em verde; e a marcação nuclear realizada com *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI), em azul. Na extremidade inferior direita, observa-se a sobreposição de marcações, indicando a presença de SARS-CoV-2 em neurônios olfatórios e astrócitos, oriundos de amostras *post-mortem* de pacientes que faleceram por complicações da COVID-19.

3.1.3. RT-PCR para detecção da expressão gênica de SARS-CoV-2 e de citocinas em via neural olfatória

As amostras de via olfatória de pacientes que faleceram em decorrência de complicações da COVID-19 foram processadas e submetidas ao ensaio de RT-PCR, para a detecção da expressão gênica de SARS-CoV-2, bem como das interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10). Como

pode ser observado na figura 5, nem todas as amostras apresentaram expressão gênica viral em níveis detectáveis no ensaio realizado.

Amostras *post-mortem* de via olfatória

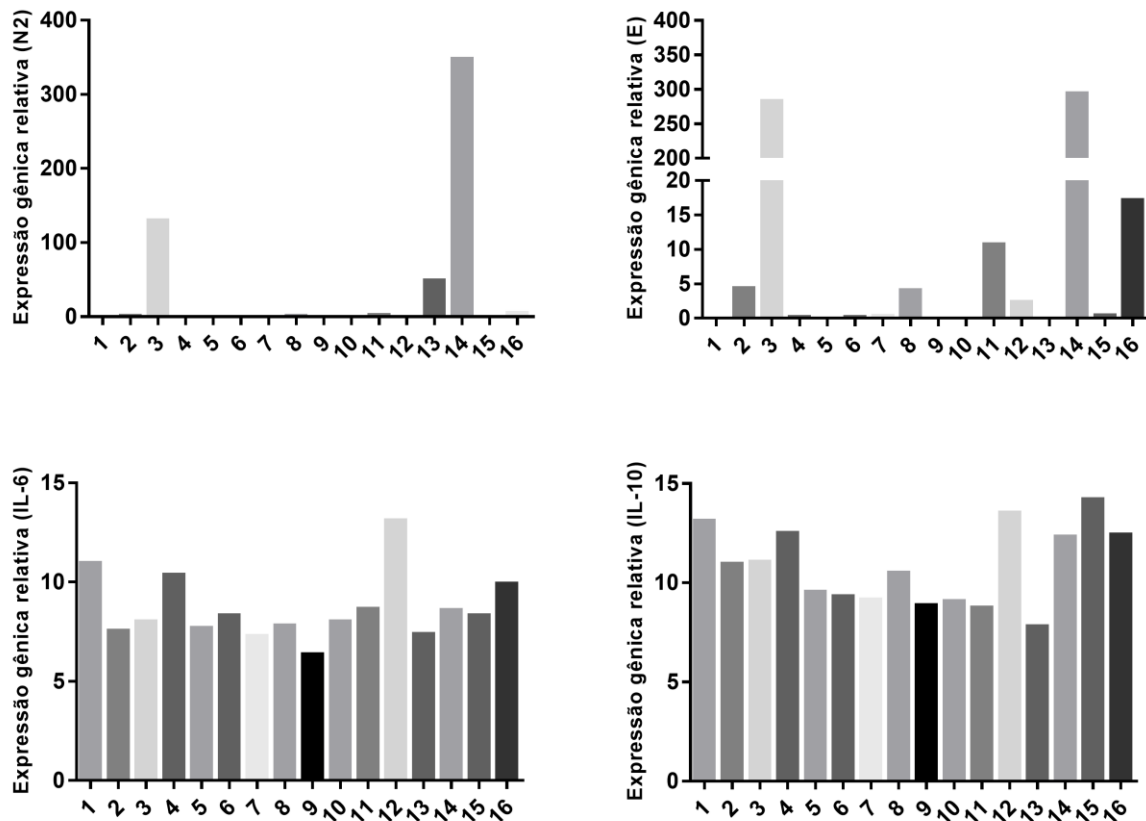


Figura 5: Expressão gênica relativa de SARS-CoV-2 e Citocinas. Expressão relativa dos genes E e N2 de SARS-CoV-2, detectada por ensaio de RT-PCR em amostras de tecido olfatório de pacientes que faleceram em decorrência de COVID-19 (gráficos superiores). Todos os pacientes apresentaram, em vida, o diagnóstico clínico e laboratorial da patologia, porém, nem todas as amostras exibiram níveis detectáveis de expressão gênica de SARS-CoV-2. Os gráficos inferiores demonstram a expressão relativa das interleucinas 6 e 10 (IL-6 e IL-10) nas mesmas amostras. Normalização dos valores realizada pela expressão de β -actina nas amostras analisadas.

3.1.4. *Dot blot* (Array de citocinas)

Como pode ser observado na figura 6, o ensaio de *dot blot* detectou a expressão das citocinas pró-inflamatórias Interleucina-18 (IL-18) e Fator de Inibição da Migração de Macrófagos (MIF) nas amostras testadas. As amostras positivas para a expressão de ambos os

genes E e N2 de SARS-CoV-2 no ensaio de RT-PCR estão identificadas com o sinal “+”, enquanto as negativas, com o sinal “-”. A expressão de IL-18 e MIF foi independente da presença de genes virais nas amostras analisadas.

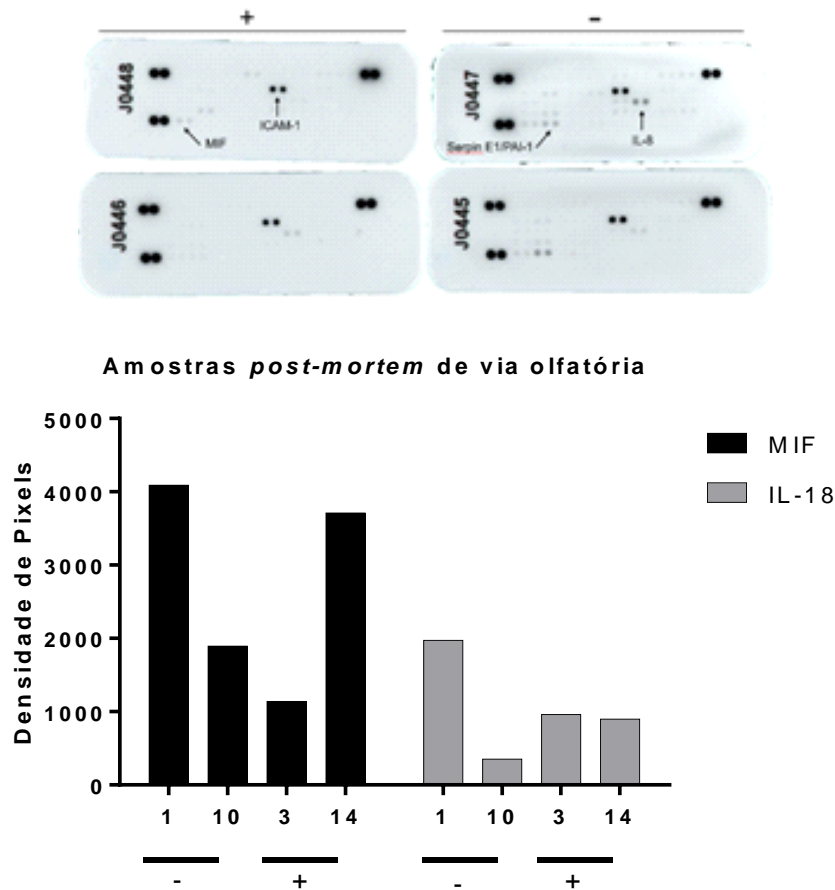


Figura 6: Expressão de citocinas pró-inflamatórias em amostras de tecido olfatório humano obtidas por ensaio de Dot blot. No quadro superior, observam-se imagens de quimioluminescência de membranas de nitrocelulose utilizadas no ensaio de *Dot blot*, com expressão de citocinas pró-inflamatórias (pontos escuros). No quadro inferior, observa-se o gráfico demonstrativo da expressão das citocinas IL-18 e MIF, de acordo com a intensidade de pixels obtida nas análises das imagens do quadro superior.

3.2. Resultados dos ensaios em cultura celular

3.2.1. Avaliação da expressão gênica viral nas células SH-SY5Y infectadas por SARS-CoV-2

Para a avaliação da expressão relativa do gene N2 do SARS-CoV-2 nas células, foi realizado o PCR em tempo real (RT-PCR), tanto no lisado celular, quanto no sobrenadante, e a normalização foi realizada através da análise da expressão de β -actina. As células foram incubadas com SARS-CoV-2 (vírus selvagem) (MOI=1), e o tratamento com canabidiol foi realizado em três concentrações distintas (300nM, 1 μ M e 3 μ M), em diferentes espaços de tempo após a infecção. No tempo 0h, CBD foi adicionado concomitantemente ao vírus, e nos tempos 2h e 4h, o fármaco foi adicionado duas e quatro horas após a infecção das células, respectivamente. Conforme pode ser observado na figura 7, o tratamento com CBD reduziu expressão gênica viral na concentração de 3 μ M, na análise do lisado celular. A concentração de 300nM do fitocanabinoide, por sua vez, reduziu a expressão de SARS-CoV-2 no sobrenadante das células. Em todas as outras concentrações, o CBD não alterou a expressão do gene N2 no lisado, nem no sobrenadante das células SH-SY5Y.

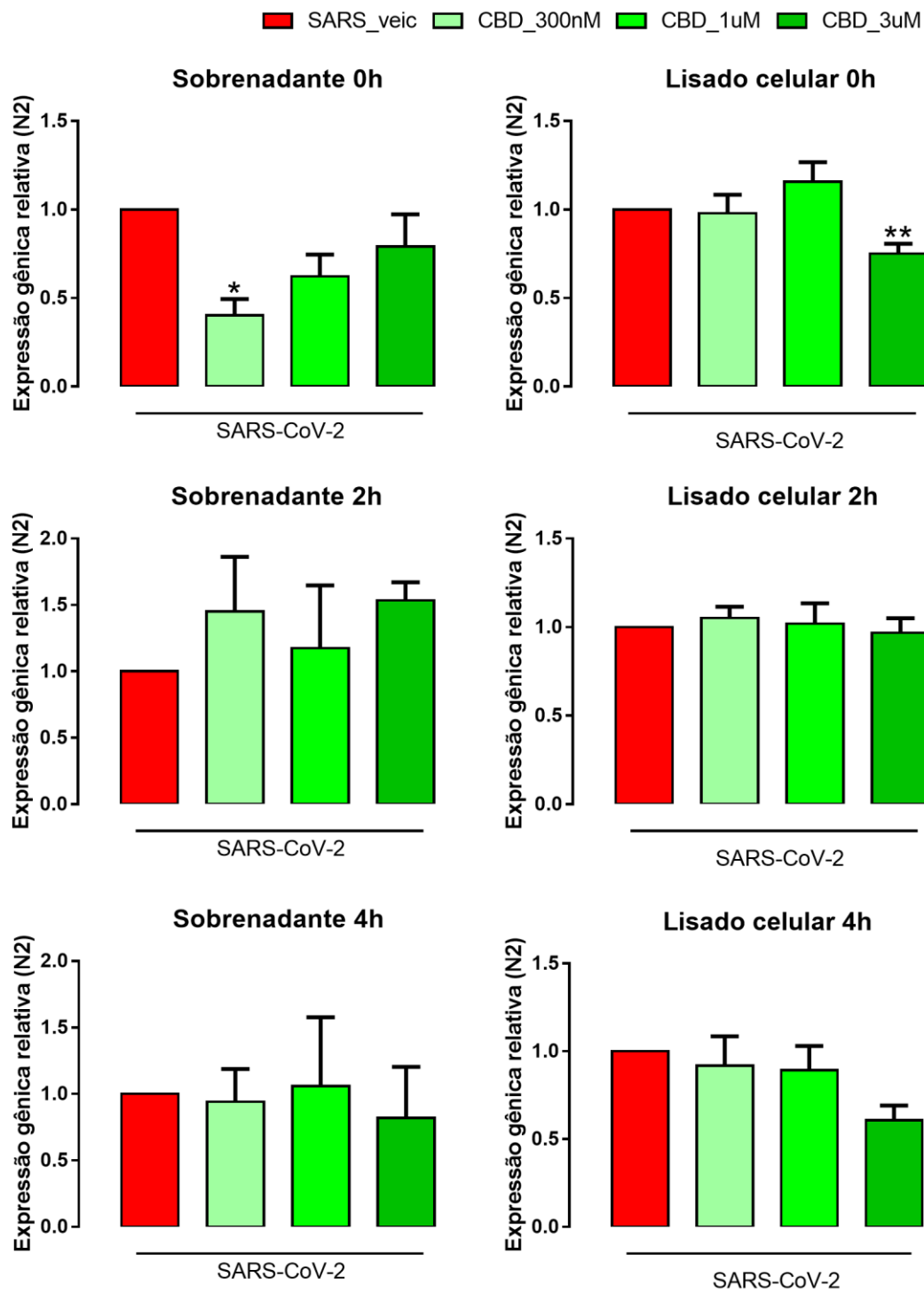


Figura 7: Expressão relativa do gene N2 de SARS-CoV-2 no sobrenadante e lisado de células de neuroblastoma humano. Redução da expressão gênica viral após a administração de canabidiol na concentração de 300nM no sobrenadante, e na concentração de 3uM, no lisado celular. Ambas as reduções de expressão do gene N2 de SARS-CoV-2 foram observadas no tempo de 0h. Não foram observadas alterações significativas na expressão gênica viral nos demais *time points* e nas outras concentrações avaliadas. Barras representam a média

do erro padrão de três experimentos independentes. Análise estatística ANOVA 1 fator: *p = 0,0093; **p = 0,0172. N=3.

3.2.2. Efeito neuroprotetor concentração dependente (curva em U invertido) do Canabidiol sobre as células SH-SY5Y infectadas com o SARS-CoV-2

Para a avaliação da viabilidade das células de neuroblastoma humano infectadas por SARS-CoV-2 após o tratamento com CBD, foi realizado o ensaio de redução do brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Os resultados podem ser observados na figura 8.

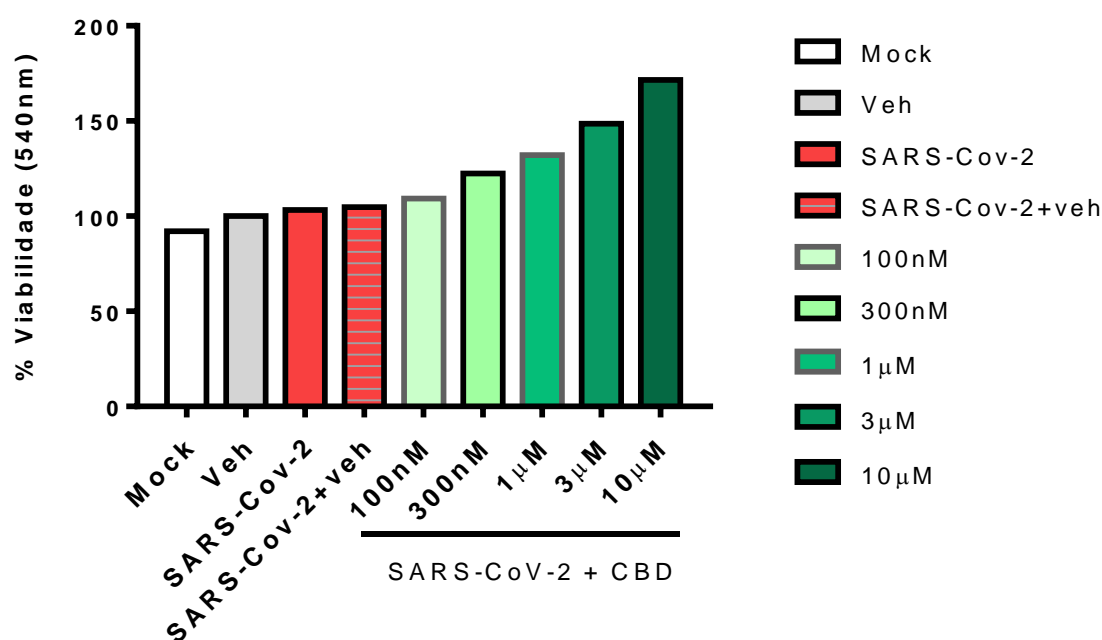


Figura 8: Efeito de concentrações de CBD sobre a viabilidade de células de neuroblastoma humano infectadas por SARS-CoV-2. Células SH-SY5Y infectadas com SARS-CoV-2 foram incubadas com diferentes concentrações de CBD (100nM, 300nM, 1uM, 3uM e 10uM) e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). N=1.

Os resultados do ensaio de MTT demonstram uma aparente tendência a elevação da viabilidade celular nas células tratadas com CBD, de forma concentração-dependente. Além disso, nenhuma concentração de CBD utilizada parece ter sido prejudicial à viabilidade das células. Após o ensaio de MTT, foi realizado o protocolo de imunofluorescência para detecção de células BrdU positivas, possibilitando a avaliação da proliferação das células submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de CBD.

Para a avaliação da proliferação celular, as células foram analisadas quanto à incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina que se incorpora na fase S do ciclo celular. Sendo assim, a quantificação da incorporação de BrdU pode ser diretamente correlacionada com a taxa de proliferação das células em análise. A quantificação foi realizada através de microscopia de fluorescência.

Como pode-se observar nas figuras 9 e 10, o tratamento com CBD foi capaz de aumentar a taxa de proliferação das células SH-SY5Y infectadas por SARS-CoV-2, na concentração de 1000nM.

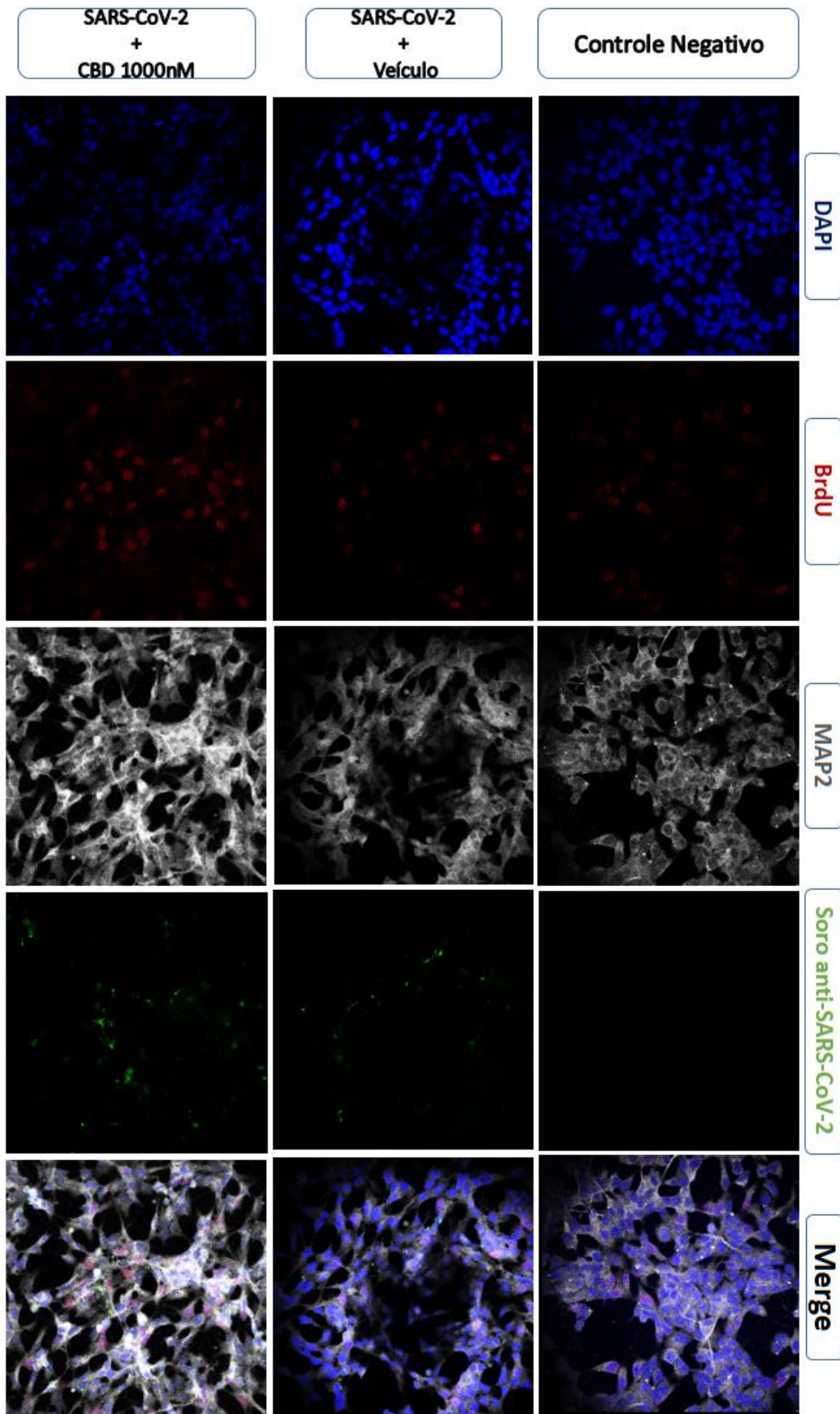


Figura 9: Aumento de células de neuroblastoma humano infectadas por SARS-CoV-2 BrdU⁺ após tratamento com canabidiol (1000nM). Imagem de microscopia de imunofluorescência, apresentando marcação de núcleos celulares com 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), em coloração azul; anticorpo anti-BrdU, para a marcação de células em proliferação; marcação neuronal com *Microtubule-Associated Protein 2* (MAP-2) em branco; e SARS-CoV-2 por meio de marcação de soro hiperimune de camundongo contra SARS-CoV-2 em verde. As três imagens da extremidade inferior da figura apresentam a sobreposição das marcações anteriormente mencionadas.

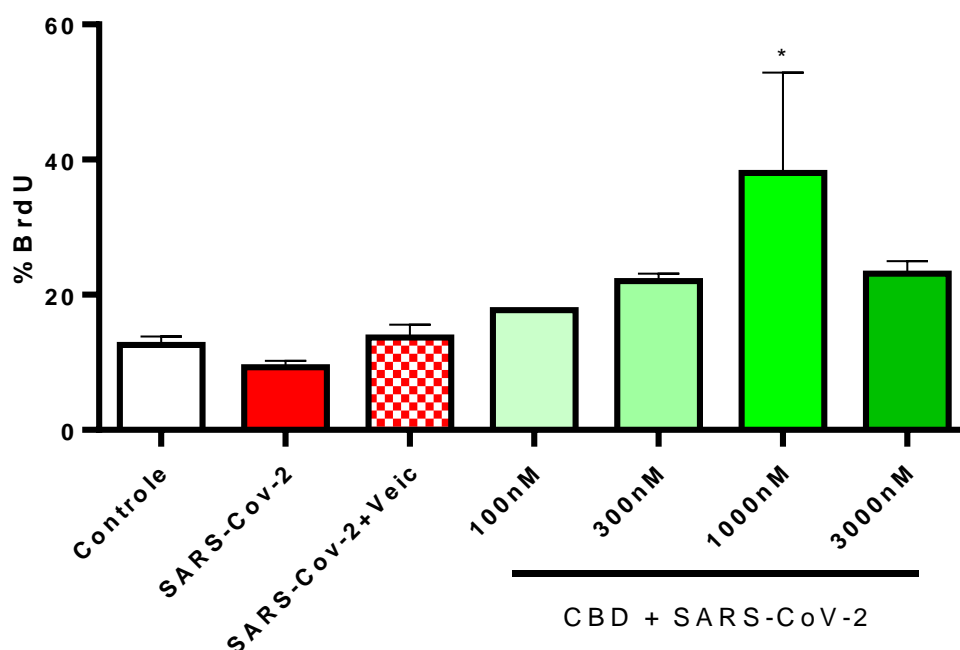


Figura 10: Proliferação celular em células de neuroblastoma humano infectadas com SARS-CoV-2 e tratadas com diferentes concentrações de canabidiol. A taxa de proliferação celular foi analisada por quantificação da incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), através de microscopia de fluorescência (figura 5). Barras representam a média do erro padrão. Resultados representam análise de três réplicas biológicas. Análise estatística ANOVA 1 fator: *p = 0,0447. N=3

Nos ensaios realizados, o tratamento com CBD, portanto, demonstrou-se seguro quanto a manutenção da viabilidade celular, e apresentou ação pró-neurogênica, evidenciada pelo aumento da taxa de proliferação celular, observada através de microscopia de fluorescência (inserção de BrdU) (Figura 9). Sendo assim, os resultados demonstrados são sugestivos de que o CBD possa exercer efeito neuroprotetor sobre as células derivadas de neuroblastoma humano

infectadas pelo SARS-CoV-2. Entretanto, a droga parece não exercer um efeito virucida relevante na linhagem celular testada no presente estudo, já que não alterou a expressão gênica viral na grande maioria dos ensaios realizados nas células e no lisado celular, no teste de RT-PCR.

DISCUSSÃO

4. Discussão

Antes da identificação do SARS-CoV-2, seis outras espécies de coronavírus eram conhecidas pela capacidade de infectar o ser humano. Quatro delas (HCoV-229E, -OC43, -NL63 e -HKU1), eram consideradas endêmicas mundialmente, sendo reportadas por causarem principalmente sintomas respiratórios leves, de forma sazonal (DESFORGES *et al.*, 2019). As outras duas, SARS-CoV e MERS-CoV, foram responsáveis, respectivamente, pelas epidemias de SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*) e MERS (*Middle East Respiratory Syndrome*), que acarretaram milhares de mortes, em grande parte por conta de suas complicações respiratórias (SAAD *et al.*, 2014). Tanto as duas cepas epidêmicas, quanto as demais espécies mais inócuas de HCoVs foram associadas a doenças ocasionais do Sistema Nervoso Central e do Periférico (ELLUL *et al.*, 2020).

No ano de 2000, Arbour e colaboradores realizaram uma extensa pesquisa de caracterização de RNA de coronavírus em um grande painel de amostras cerebrais humanas. Os ensaios foram elaborados com a finalidade de prover evidências experimentais do neurotropismo e da neuroinvasividade de duas cepas de HCoVs (229E e OC43), bem como sua possível associação com a patologia da Esclerose Múltipla (MS). Os resultados apontaram uma prevalência significativa de OC43 em amostras de pacientes com MS (35,9%), o que despertou a atenção de pesquisadores para a importância da distinção entre a ocorrência de infecção viral oportunista, e a associação direta do vírus com a doença neurológica (ARBOUR *et al.*, 2000).

A presença de SARS-CoV-2 em estruturas do SNC vem sendo bastante reportada na literatura, tanto em modelos animais, quanto em amostras cerebrais humanas (SONG *et al.*, 2021). Os sintomas neurológicos correlacionados com a COVID-19 são cada vez mais relatados, e dados sugerem que os danos no SNC ou SNP decorrentes da doença podem ser causados diretamente pelo vírus, ou indiretamente, via respostas imunes inatas e adaptativas do corpo à infecção (ELLUL *et al.*, 2020).

Até o momento, dados sugerem que o SARS-CoV-2 e outros HCoV-229E talvez não sejam tão altamente neurovirulentos quanto outras espécies virais, como o *Herpes simplex*, certos enterovírus e o arbovírus, que podem causar destruição desenfreada de neurônios (ELLUL *et al.*, 2020), como discutido previamente neste trabalho. Entretanto, há fortes evidências de anormalidades cerebrais relacionadas à COVID-19 (PATERSON *et al.*, 2020), e as mesmas não se restringem aos pacientes com quadros mais severos da doença.

Em 2020, Matschke e colaboradores investigaram as características neuropatológicas em amostras *post-mortem* de cérebros de pacientes que faleceram após o diagnóstico de COVID-19 (porém, não necessariamente em decorrência da doença). Entre os achados histopatológicos estavam lesões isquêmicas delimitadas e astrogliose generalizada. Além disso, foi observada ativação microglial e infiltração de linfócitos T citotóxicos, ambas pronunciadas no tronco cerebral e no cerebelo. Neste mesmo trabalho, foi notado que apenas 53% das amostras analisadas apresentavam níveis detectáveis de RNA de SARS-CoV-2 e, interessante, a presença do vírus não estava associada com a gravidade das lesões (MATSCHE *et al.*, 2020).

Assim como no estudo mencionado acima, em nossos resultados, nem todas as amostras analisadas apresentaram níveis detectáveis de RNA viral. Entretanto, comparando os dados da tabela IV com a figura 5, pode-se observar que alguns pacientes apresentaram sintomas neurológicos leves (anosmia, cefaleia e/ou disgeusia), independentemente da presença do SARS-CoV-2 no material analisado. Além disso, a produção de citocinas IL-6 e IL-10 não parece ter relação com a expressão gênica de SARS-CoV-2 nas amostras, o que sugere que os mecanismos envolvidos no processo de inflamação talvez não dependam da ação viral direta no SNC.

No ensaio de *dot blot* (figura 6), pode-se observar que as amostras positivas e as negativas para a expressão gênica de SARS-CoV-2 apresentaram níveis similares de expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-18 e MIF. Nas últimas décadas, estudos destacaram um papel

crucial da IL-18 na mediação da neuroinflamação e neurodegeneração em condições patológicas do SNC, como infecções bacterianas ou virais, doenças desmielinizantes e lesões cerebrais isquêmicas e traumáticas (FELDERHOFF-MUESER *et al.*, 2005). O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), por sua vez, é um fator pró-inflamatório pleiotrópico, cuja participação nos mecanismos de desenvolvimento de doenças neuropsiquiátricas vem sendo gradualmente reconhecida nos últimos anos (CHEN, XI *et al.*, 2022).

As amostras foram testadas no *array* de citocinas com a finalidade de avaliar se a expressão gênica de SARS-CoV-2 poderia acarretar possíveis contrastes na expressão de citocinas pró-inflamatórias. Porém, diferenças significativas não foram observadas. A detecção viral nas amostras, portanto, parece não ter influência relevante na expressão dos fatores inflamatórios analisados.

A relação entre a expressão de fatores pró-inflamatórios e as manifestações neurológicas da COVID-19 vem sendo explorada ultimamente. Recentemente, Guasp e colaboradores realizaram um estudo que visava avaliar o papel diagnóstico e prognóstico do Líquido Cefalorraquidiano (LCR) e de biomarcadores séricos de inflamação e dano neuronal em pacientes com a forma aguda da COVID-19, que apresentavam complicações neurológicas decorrentes da doença. Os pacientes foram acompanhados durante 18 meses e, ao fim desse tempo, foram submetidos a exames laboratoriais. Foi observado que, em comparação com os indivíduos saudáveis do grupo controle, os pacientes que apresentaram a forma neurológica da COVID-19 apresentaram níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias (IL-18, IL-6 e IL-8), tanto nas amostras de LCR (GUASP *et al.*, 2022). O fato de que a expressão de fatores pró-inflamatórios pode permanecer elevada mesmo após meses da resolução do quadro clínico agudo da COVID-19 desperta atenção sobre as possíveis consequências a longo-prazo da doença.

Alterações neuropatológicas acompanhadas de neuroinflamação pronunciada vem sendo cada vez mais descritas em amostras cerebrais de pacientes que apresentaram a forma letal da COVID-19 (SCHURINK *et al.*, 2020). Além disso, há uma preocupação crescente em relação às consequências neurológicas a longo prazo para pessoas que sofreram uma infecção com sintomas leves, ou até mesmo assintomática.

Recentemente, Philippens e colaboradores realizaram ensaios para investigar alterações cerebrais na fase pós-aguda da infecção por SARS-CoV-2 em macacos resos e cinomolgos (2 a 6 semanas após a infecção experimental, vias intratraqueal e intranasal). Os animais apresentaram apenas sintomas leves da infecção, todavia, as análises *post-mortem* demonstraram infiltração de células T e ativação microglial no parênquima cerebral de todos os animais infectados, independentemente da presença de RNA ou antígeno viral. Além disso, agregados intracelulares de α -sinucleína foram encontrados nos cérebros de ambas as espécies de macacos (PHILIPPENS *et al.*, 2022). Tais resultados indicam fortemente o potencial neuropatológico da infecção por SARS-CoV-2, mesmo quando está associada a um quadro sintomatológico brando. Além disso, eles evidenciam que as alterações no SNC podem perdurar após o período agudo da doença. Sendo assim, os relatos podem ser considerados alarmantes, quanto ao risco neuropatológico a longo prazo, após o fim da viremia e resolução do quadro clínico clássico-agudo.

Na literatura atual, há um crescente número de evidências que indicam que os pacientes portadores de COVID-19 podem apresentar diversos sintomas neuropsiquiátricos, que podem persistir ou até mesmo iniciar após a cura da doença (EFSTATHIOU *et al.*, 2022). Os sinais neurológicos observados com maior frequência no início da infecção são anosmia, ageusia ou disgeusia, cefaleia, mialgia, dores articulares, fadiga e confusão mental, que podem durar semanas ou meses (RUDROFF *et al.*, 2020).

Entretanto, as manifestações neuropsiquiátricas da COVID-19 aguda podem ainda incluir distúrbios de consciência, delírio, agitação, encefalopatia, encefalite, acidente vascular cerebral isquêmico agudo, lesão cerebral isquêmica, convulsões, vertigem e parestesia (SCHOU *et al.*, 2021). Estudos apontam ainda a associação entre a infecção aguda por SARS-CoV-2 e o desenvolvimento ou reincidência de transtornos como ansiedade, depressão e insônia, além da ocorrência de sintomas iniciais de psicose, que também foi relatada no cenário de infecção aguda por COVID-19 (VARATHARAJ *et al.*, 2020).

A tempestade de citocinas, resultante da ativação desenfreada do processo inflamatório sistêmico observado na fase aguda da doença, parece desempenhar um papel fundamental na persistência dos sintomas neurológicos (EFSTATHIOU *et al.*, 2022). O aumento substancial dos níveis circulantes de quimiocinas e interleucinas compromete a barreira hematoencefálica, o que possibilita que as mesmas adentrem o parênquima cerebral e afetem, por exemplo, as células gliais (WILSON; WENINGER; HUNTER, 2010).

Os astrócitos e a micróglia auxiliam na manutenção da homeostase do SNC por meio de transporte de íons, captação de neurotransmissores, eliminação de espécies reativas de oxigênio, regulação do fluxo sanguíneo, síntese e armazenamento de glicogênio, regulação da neurogênese e formação, manutenção e eliminação de sinapses. Além disso, estão envolvidos no controle de permeabilidade da BHE e depuração linfática (VERKHRATSKY; NEDERGAARD; HERTZ, 2015)(TAY *et al.*, 2017). A infecção por SARS-CoV-2 e sua característica tempestade de citocinas pró-inflamatórias pode, portanto, prejudicar mecanismos homeostáticos de extrema relevância ao interferir desempenho dessas células (TREMBLAY *et al.*, 2020). Sendo assim, pode-se hipotetizar que a produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias e a disfunção de células da glia podem causar alterações na plasticidade neuronal, função sináptica, mielinização e prejudicar a manutenção da permeabilidade da BHE. Como

consequência, podem ocorrer disfunção cognitiva e outros sintomas neuropsiquiátricos de longo prazo da COVID-19 (TREMBLAY *et al.*, 2020).

Apesar de existirem fortes evidências que a COVID-19 está relacionada com o surgimento de anormalidades cerebrais, a literatura ainda apresenta poucos relatos sobre a influência da forma branda da doença em cérebros humanos (MANCA *et al.*, 2021). Diante disso, recentemente, um grupo de cientistas da Universidade de Oxford realizou um estudo para investigar as alterações no cérebro de pacientes que foram infectados por SARS-CoV-2, tendo apresentado apenas sintomas leves.

O estudo utilizou dados de ressonâncias magnéticas cerebrais de um total de 785 pacientes (entre positivos para COVID-19 e controles negativos), com idades entre 51 e 81 anos, participantes do *UK Biobank*. Todos os pacientes foram submetidos duas varreduras cerebrais, sendo uma inicial e outra tardia. Aqueles que foram infectados pelo novo coronavírus, foram submetidos à primeira bateria de testes previamente ao diagnóstico, enquanto a segunda foi realizada após cerca de 5 meses do início da infecção. Em comparação com o grupo controle, os pacientes que foram acometidos COVID-19 apresentaram um maior declínio cognitivo entre as duas varreduras cerebrais. Além disso, foi observada redução na espessura da substância cinzenta no córtex orbitofrontal e giro para-hipocampal, maior dano tecidual em regiões funcionalmente relacionadas com o córtex olfatório primário, e uma redução do volume cerebral global (DOUAUD *et al.*, 2022). Os resultados ressaltam a importância da observação e investigação extensivas dos desdobramentos da infecção por SARS-CoV-2 no cérebro humano, bem como intensificam a necessidade de possíveis intervenções terapêuticas que possibilitem a recuperação dos danos centrais a longo prazo.

Estudos de diferentes países demonstraram que muitos indivíduos apresentaram sintomas persistentes 6 meses após a COVID-19, com fadiga ou fraqueza muscular, insônia e ansiedade ou depressão, entre as sequelas mais comuns (DAMIANO *et al.*, 2022). Entretanto,

recentemente, Huang e colaboradores apontaram que, embora a maioria dos sobreviventes de COVID-19 se recupere física e funcionalmente um ano após a infecção aguda, alguns ainda apresentam problemas de mobilidade, dor ou desconforto e ansiedade ou depressão em comparação com pessoas que não passaram pela patologia (HUANG, LIXUE *et al.*, 2021). Nesse contexto, nota-se que ainda não existe um consenso da comunidade científica sobre a duração dos sintomas da síndrome da COVID-19 longa, que são, em muitos casos, de cunho neuropsiquiátrico.

Unindo as informações sobre as alterações cerebrais (moleculares e estruturais) associadas com a COVID-19, é possível levantar a hipótese de que a doença pode estar relacionada com adaptações neuroplásticas maladaptativas, que acarretam a permanência dos sintomas neurológicos após o quadro agudo da infecção. Há, portanto, uma demanda importante de busca por opções farmacológicas de neuroproteção e recuperação da função neuroplástica das estruturas centrais afetadas pela doença. Por seus diversos efeitos neuroprotetores já descritos na literatura, o canabidiol parece ser uma alternativa promissora.

No presente estudo, o tratamento de células derivadas de neuroblastoma humano com CBD mostrou-se seguro nas concentrações utilizadas, visto que não demonstrou tendência de redução de viabilidade celular no ensaio do MTT, antes, porém, demonstrou uma aparente tendência a elevar a viabilidade das células infectadas previamente com SARS-CoV-2, de maneira concentração-dependente (Figura 8). Há relatos na literatura que correlacionam alterações neuroplásticas com o processo inflamatório decorrente de infecções virais. Hosseini e colaboradores demonstraram em um modelo de roedores a perda de espinhas dendríticas em neurônios hipocâmpais, conseqüente da infecção por duas variantes distintas do Influenza vírus A, sendo a H7N7 neurotrópica, e a H3N2 não-neurotrópica. Os pesquisadores identificaram que as alterações plásticas persistiam após a fase aguda da doença, e eram independentes da

neuroinvasão viral, já que também eram observadas nos animais infectados pela cepa não-neurotrópica (HOSSEINI *et al.*, 2018).

Nossos resultados indicam que o tratamento com CBD parece não apresentar efeito virucida relevante, já que a expressão do gene N2 de SARS-CoV-2 foi reduzida apenas no tempo de 0h, nas concentrações de 300nM (sobrenadante) e 3uM (lisado celular), permanecendo pouco alterada na grande maioria dos demais *time-points* e concentrações.

Os resultados acima mencionados vão de acordo com os achados demonstrados no estudo de Crippa e colaboradores, publicado recentemente em parceria com nosso grupo de pesquisas. No mesmo, foram investigadas a segurança e a eficácia da administração de CBD (300mg diários, durante 14 dias) em pacientes com COVID-19 leve ou moderada. Observou-se, então, que a administração do fármaco foi segura, e não provocou a ocorrência de efeitos adversos graves. Entretanto, a droga não alterou a evolução clínica da doença (CRIPPA *et al.*, 2021).

Contudo, o presente trabalho também demonstrou um possível efeito neuroprotetor do CBD, por meio de ensaio de imunofluorescência para quantificação de inserção de BrdU nas células SH-SY5Y (Figura 9). Na concentração de 1000nM, o fitocanabinoide aumentou a taxa de proliferação celular em presença de SARS-CoV-2, indicando que a droga exerceu um efeito pró-neurogênico frente à infecção.

Diversas evidências indicam que o processo de neurogênese adulta (em nichos neurogênicos, como por exemplo, o hipocampo) contribui positivamente para a manutenção de funções cognitivas saudáveis ao longo da vida humana (HANSPAL; GILLOTIN, 2022). No que tange às doenças neuropsiquiátricas, é crescente o número de estudos que destacam a relevância da neurogênese, bem como seu potencial como alvo terapêutico. Em 2003, Santerelli e colaboradores demonstraram, através de métodos genéticos e radiológicos realizados em camundongos, que a interrupção da neurogênese induzida por fármacos antidepressivos

bloqueava as respostas comportamentais aos mesmos. A partir desses achados, os pesquisadores sugeriram que os efeitos comportamentais aos antidepressivos crônicos poderiam ser mediados por estimulação de neurogênese hipocampal (SANTARELLI *et al.*, 2003).

No ano de 2010, Demars e colaboradores demonstraram em um modelo murino para a doença de Alzheimer, que a neurogênese hipocampal era severamente afetada, bem como a diferenciação neuronal. Os pesquisadores observaram que o comprometimento neurogênico ocorria de maneira precoce e que era acompanhado por um aumento dos níveis de proteína TAU fosforilada, principalmente nos nichos neurogênicos. A partir de tais resultados, os pesquisadores hipotetizaram que a neurogênese prejudicada poderia ser um evento antecessor à patologia clássica da doença de Alzheimer, e que a mesma poderia estar relacionada com o comprometimento cognitivo precoce apresentado pelos animais (DEMARS *et al.*, 2010).

Levando-se em consideração a grande importância da neurogênese em afecções de cunho neurológico, a busca por métodos farmacológicos pró-neurogênicos se faz relevante. Nesse contexto, o canabidiol (CBD) pode ser apontado como uma possível opção terapêutica, visto que estudos demonstram seu potencial neuroprotetor e pró-neurogênico. Em 2011, Esposito e colaboradores demonstraram em experimentação *in vivo* e *in vivo*, que o CBD apresentava efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores, ambos dependentes dos receptores PPAR γ . Além disso, demonstraram ainda que o CBD facilitou significativamente a neurogênese hipocampal em ratos utilizados como modelo para a doença de Alzheimer (ESPOSITO *et al.*, 2011).

Complicações neurológicas posteriores à fase aguda da COVID-19 vem sendo frequentemente reportadas na literatura. Tal síndrome, denominada “COVID longa”, geralmente cursa com fadiga, disfunções cognitivas, distúrbios de sono, entre outros sintomas (AL-RAMADAN *et al.*, 2021). Considerando a ampla gama de efeitos favoráveis do canabidiol

já mencionada no presente trabalho, pode-se ressaltar a importância da realização de pesquisas que investiguem o potencial terapêutico do CBD no tratamento das manifestações neurológicas após a infecção por SARS-CoV-2.

A partir dos resultados encontrados no presente estudo, sugerimos que, apesar de parecer não exercer atividade virucida importante contra o SARS-CoV-2, o canabidiol tem potencial neuroprotetor e pró-neurogênico na linhagem celular de neuroblastoma humano utilizada nos ensaios. Esses achados parecem interessantes, especialmente no contexto das expectativas por fármacos que possam auxiliar na recuperação neuroplástica de áreas cerebrais humanas afetadas pela fisiopatologia da COVID-19.

Sabe-se, todavia, que a experimentação *in vitro* não garante a segurança e/ou eficácia da administração de drogas em sistemas complexos (WHITEBREAD *et al.*, 2005). Este modelo experimental é muito válido para a realização de investigações preliminares, visando o delineamento inicial do comportamento farmacológico de drogas em sistemas mais simples. Dessa forma, faz-se necessário destacar as limitações experimentais do presente trabalho, que deve ser considerado como uma demonstração preliminar dos efeitos do canabidiol em células neuronais humanas submetidas a infecção prévia por SARS-CoV-2, sendo, conseqüentemente, insuficiente para determinar o potencial terapêutico da droga avaliada na patologia da COVID-19 em seres humanos. Logo, é necessária a investigação mais apurada dos mecanismos envolvidos nos processos de neuroproteção mediados pela administração de CBD nas células neurais humanas.

CONCLUSÕES

5. Conclusões

Os resultados do presente estudo demonstraram a neuroinvasividade do SARS-CoV-2 em amostras *post-mortem* de via olfatória de pacientes que faleceram em decorrência de complicações da COVID-19. Ressaltaram, todavia, que nem todas as amostras analisadas foram positivas quanto a detecção gênica viral, e que a expressão de fatores pró-inflamatórios ocorreu tanto nas positivas, quanto nas negativas. Tal achado pode sugerir que os efeitos desfavoráveis da infecção por SARS-CoV-2 podem não estar diretamente relacionados com a neuroinvasão. Os ensaios *in vitro* indicaram um efeito neuroprotetor e pró-neurogênico do tratamento com canabidiol em células de neuroblastoma humano infectadas previamente com SARS-CoV-2. Mais estudos são necessários para a confirmação dos efeitos da neuroinfecção por SARS-CoV-2, o processo inflamatório acarretado por ela e para a melhor elucidação dos efeitos do canabidiol em células neurais desafiadas a infecção.

REFERÊNCIAS

6. Referências

ABATE, Giulia; UBERTI, Daniela; TAMBARO, Simone. Potential and Limits of Cannabinoids in Alzheimer's Disease Therapy. **Biology** v. 10, n. 6, p. 542 , 17 jun. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-7737/10/6/542>>.

ADAMS, R. Marihuana: Harvey Lecture, February 19, 1942. **Bulletin of the New York Academy of Medicine** v. 18, n. 11, p. 705–30 , nov. 1942. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19312292>>.

AL-RAMADAN, Ali *et al.* Acute and Post-Acute Neurological Complications of COVID-19. **Neurology International** v. 13, n. 1, p. 102–119 , 9 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2035-8377/13/1/10>>.

AMRAEI, Razie *et al.* Extracellular vimentin is an attachment factor that facilitates SARS-CoV-2 entry into human endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 119, n. 6 , 8 fev. 2022. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2113874119>>.

AMSTERDAM, Jay D. Borna Disease Virus. **Archives of General Psychiatry** v. 42, n. 11, p. 1093 , 1 nov. 1985. Disponível em: <<http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archpsyc.1985.01790340077011>>.

ARBOUR, Nathalie *et al.* Neuroinvasion by Human Respiratory Coronaviruses. **Journal of Virology** v. 74, n. 19, p. 8913–8921 , 1 out. 2000. Disponível em: <<https://jvi.asm.org/content/74/19/8913>>.

BAUER, Lisa *et al.* The neuroinvasiveness, neurotropism, and neurovirulence of SARS-CoV-2. **Trends in neurosciences** v. 45, n. 5, p. 358–368 , maio 2022. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35279295>>.

BESEDOVSKY, Hugo O.; DEL REY, Adriana. Central and Peripheral Cytokines Mediate Immune-Brain Connectivity. **Neurochemical Research** v. 36, n. 1, p. 1–6 , 4 jan. 2011.

Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11064-010-0252-x>>.

BRANISTE, Viorica *et al.* The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. **Science Translational Medicine** v. 6, n. 263 , 19 nov. 2014. Disponível em:

<<https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3009759>>.

BRNIC, Dragan *et al.* Borna Disease Virus Infects Human Neural Progenitor Cells and Impairs Neurogenesis. **Journal of Virology** v. 86, n. 5, p. 2512–2522 , mar. 2012. Disponível

em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.05663-11>>.

BRUEL-JUNGERMAN, Elodie; DAVIS, Sabrina; LAROCHE, Serge. Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry** v. 13, n. 5, p. 492–505 , out. 2007. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901258>>.

CAMPOS, A C *et al.* Cannabidiol increases survival and promotes rescue of cognitive function in a murine model of cerebral malaria. **Neuroscience** v. 289, p. 166–80 , 19 mar.

2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25595981>>.

CAMPOS, Alline C. *et al.* The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system.

International Journal of Neuropsychopharmacology v. 16, n. 6, p. 1407–1419 , 1 jul.

2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ijnp/article/16/6/1407/754216>>.

CANTUTI-CASTELVETRI, Ludovico *et al.* Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. **Science** v. 370, n. 6518, p. 856–860 , 13 nov. 2020. Disponível em:

<<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abd2985>>.

CAROD-ARTAL, Francisco Javier *et al.* Neurological complications of dengue virus infection. **The Lancet Neurology** v. 12, n. 9, p. 906–919 , set. 2013. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442213701509>>.

CHAN, Jasper Fuk-Woo *et al.* A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. **The Lancet** v. 395, n. 10223, p. 514–523 , fev. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620301549>>.

CHEN, Haiwen; EPSTEIN, Jane; STERN, Emily. Neural Plasticity After Acquired Brain Injury: Evidence from Functional Neuroimaging. **PM&R** v. 2, p. S306–S312 , dez. 2010.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/j.pmrj.2010.10.006>>.

CHEN, Rongrong *et al.* The Spatial and Cell-Type Distribution of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in the Human and Mouse Brains. **Frontiers in Neurology** v. 11 , 20 jan. 2021.

Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2020.573095/full>>.

CHEN, Xi *et al.* Multifaceted interconnections between macrophage migration inhibitory factor and psychiatric disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry** v. 112, p. 110422 , jan. 2022. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278584621001810>>.

CHOI, Gwang-Jun *et al.* Influenza-associated Neurologic Complications in Hospitalized Pediatric Patients. **Pediatric Infectious Disease Journal** v. 40, n. 12, p. e466–e471 , 7 dez. 2021.

Disponível em: <<https://journals.lww.com/10.1097/INF.0000000000003332>>.

CIOTTI, Marco *et al.* The COVID-19 pandemic. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences** v. 57, n. 6, p. 365–388 , 17 ago. 2020. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408363.2020.1783198>>.

CLÉ, Marion *et al.* Neurocognitive impacts of arbovirus infections. **Journal of**

Neuroinflammation v. 17, n. 1, p. 233 , 10 dez. 2020. Disponível em:

<<https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-020-01904-3>>.

CLIFFORD, David B; ANCES, Beau M. HIV-associated neurocognitive disorder. **The**

Lancet Infectious Diseases v. 13, n. 11, p. 976–986 , nov. 2013. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147330991370269X>>.

CORMAN, Victor M *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time

RT-PCR. **Eurosurveillance** v. 25, n. 3 , 23 jan. 2020. Disponível em:

<<https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>>.

CORPETTI, Chiara *et al.* Cannabidiol inhibits <sc>SARS-Cov</sc> -2 spike (S) protein-

induced cytotoxicity and inflammation through a <sc>PPAR γ </sc> -dependent

<sc>TLR4</sc> / <sc>NLRP3</sc> /Caspase-1 signaling suppression in Caco-2 cell

line. **Phytotherapy Research** v. 35, n. 12, p. 6893–6903 , 12 dez. 2021. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.7302>>.

COYNE, Carolyn B; KIM, Kwang S; BERGELSON, Jeffrey M. Poliovirus entry into human

brain microvascular cells requires receptor-induced activation of SHP-2. **The EMBO**

Journal v. 26, n. 17, p. 4016–4028 , 5 set. 2007. Disponível em:

<<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7601831>>.

CRIPPA, José Alexandre S. *et al.* Cannabidiol for COVID-19 Patients with Mild to Moderate

Symptoms (CANDIDATE Study): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled

Clinical Trial. **Cannabis and Cannabinoid Research** , 7 out. 2021. Disponível em:

<<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/can.2021.0093>>.

CRISTALLO, A *et al.* Human coronavirus polyadenylated RNA sequences in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. **The new microbiologica** v. 20, n. 2, p. 105–14 , abr. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9208420>>.

DALY, James L. *et al.* Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. **Science** v. 370, n. 6518, p. 861–865 , 13 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abd3072>>.

DAMIANO, Rodolfo Furlan *et al.* Post-COVID-19 psychiatric and cognitive morbidity: Preliminary findings from a Brazilian cohort study. **General Hospital Psychiatry** v. 75, p. 38–45 , mar. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163834322000020>>.

DAVIES, Julie *et al.* Neuropilin-1 as a new potential SARS-CoV-2 infection mediator implicated in the neurologic features and central nervous system involvement of COVID-19. **Molecular Medicine Reports** , 15 set. 2020. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2020.11510>>.

DEMARS, Michael *et al.* Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. **Journal of Neuroscience Research** v. 88, n. 10, p. 2103–2117 , 5 mar. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jnr.22387>>.

DEPLA, Josse A. *et al.* Human Brain Organoids as Models for Central Nervous System Viral Infection. **Viruses** v. 14, n. 3, p. 634 , 18 mar. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/14/3/634>>.

DESFORGES, Marc *et al.* Human Coronaviruses and Other Respiratory Viruses: Underestimated Opportunistic Pathogens of the Central Nervous System? **Viruses** v. 12, n. 1, p. 14 , 20 dez. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/12/1/14>>.

DEVINSKY, Orrin *et al.* Cannabidiol: Pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. **Epilepsia** v. 55, n. 6, p. 791–802 , jun. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epi.12631>>.

DONG, Mengzhen *et al.* ACE2, TMPRSS2 distribution and extrapulmonary organ injury in patients with COVID-19. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 131, p. 110678 , nov. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332220308714>>.

DOUAUD, Gwenaëlle *et al.* SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. **Nature** v. 604, n. 7907, p. 697–707 , 28 abr. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41586-022-04569-5>>.

DRIGGIN, Elissa *et al.* Cardiovascular Considerations for Patients, Health Care Workers, and Health Systems During the COVID-19 Pandemic. **Journal of the American College of Cardiology** v. 75, n. 18, p. 2352–2371 , maio 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109720346374>>.

DUBÉ, Mathieu *et al.* Axonal Transport Enables Neuron-to-Neuron Propagation of Human Coronavirus OC43. **Journal of Virology** v. 92, n. 17 , set. 2018. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00404-18>>.

DUFFAU, Hugues. Brain plasticity: From pathophysiological mechanisms to therapeutic applications. **Journal of Clinical Neuroscience** v. 13, n. 9, p. 885–897 , nov. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967586806004383>>.

DUMAN, Ronald S; MALBERG, Jessica; THOME, Johannes. Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. **Biological Psychiatry** v. 46, n. 9, p. 1181–1191 , nov. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322399001778>>.

ECHEVERRY, Carolina *et al.* A Comparative In Vitro Study of the Neuroprotective Effect

Induced by Cannabidiol, Cannabigerol, and Their Respective Acid Forms: Relevance of the 5-HT_{1A} Receptors. **Neurotoxicity Research** v. 39, n. 2, p. 335–348 , 4 abr. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s12640-020-00277-y>>.

EFSTATHIOU, Vasiliki *et al.* Long COVID and neuropsychiatric manifestations (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine** v. 23, n. 5, p. 363 , 1 abr. 2022. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2022.11290>>.

ELLUL, Mark A *et al.* Neurological associations of COVID-19. **The Lancet Neurology** v. 19, n. 9, p. 767–783 , set. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442220302210>>.

ESPOSITO, Giuseppe *et al.* Cannabidiol Reduces A β -Induced Neuroinflammation and Promotes Hippocampal Neurogenesis through PPAR γ Involvement. **PLoS ONE** v. 6, n. 12, p. e28668 , 5 dez. 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0028668>>.

ESPOSITO, Giuseppe *et al.* The potential of cannabidiol in the COVID-19 pandemic. **British Journal of Pharmacology** v. 177, n. 21, p. 4967–4970 , 16 nov. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.15157>>.

FELDERHOFF-MUESER, Ursula *et al.* IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration? **Trends in Neurosciences** v. 28, n. 9, p. 487–493 , set. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166223605001669>>.

FITTING, Sylvia *et al.* Synaptic Dysfunction in the Hippocampus Accompanies Learning and Memory Deficits in Human Immunodeficiency Virus Type-1 Tat Transgenic Mice. **Biological Psychiatry** v. 73, n. 5, p. 443–453 , mar. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322312008529>>.

FOTUHI, Majid *et al.* Neurobiology of COVID-19. **Journal of Alzheimer's disease : JAD** v.

76, n. 1, p. 3–19 , 2020. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32538857>>.

FRANK, Christina *et al.* Human Borna disease virus 1 (BoDV-1) encephalitis cases in the north and east of Germany. **Emerging Microbes & Infections** v. 11, n. 1, p. 6–13 , 31 dez. 2022. Disponível em:

<<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2021.2007737>>.

GASTON, Tyler E.; MARTIN, Roy C.; SZAFIARSKI, Jerzy P. Cannabidiol (CBD) and cognition in epilepsy. **Epilepsy & Behavior** v. 124, p. 108316 , nov. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525505021005771>>.

GONZALEZ-DUNIA, Daniel *et al.* Borna disease virus interference with neuronal plasticity. **Virus Research** v. 111, n. 2, p. 224–234 , ago. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170205001255>>.

GRANT, Gavin B. *et al.* Progress in Rubella and Congenital Rubella Syndrome Control and Elimination — Worldwide, 2000 – 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report** v. 66, n. 45, p. 1256–1260 , 17 nov. 2017. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/wr/mm6645a4.htm>>.

GU, Jiang *et al.* Multiple organ infection and the pathogenesis of SARS. **Journal of Experimental Medicine** v. 202, n. 3, p. 415–424 , 1 ago. 2005. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/202/3/415/52686/Multiple-organ-infection-and-the-pathogenesis-of>>.

GUASP, Mar *et al.* CSF Biomarkers in COVID-19 Associated Encephalopathy and Encephalitis Predict Long-Term Outcome. **Frontiers in Immunology** v. 13 , 11 abr. 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.866153/full>>.

GUIMARÃES, F. S. *et al.* Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze.

Psychopharmacology v. 100, n. 4, p. 558–559 , abr. 1990. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/BF02244012>>.

HAMPSON, A. J. *et al.* Cannabidiol and (-) 9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 95, n. 14, p. 8268–8273 , 7 jul. 1998. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.14.8268>>.

HANSPAL, MayaA; GILLOTIN, Sébastien. A new age in understanding adult hippocampal neurogenesis in Alzheimer’s disease. **Neural Regeneration Research** v. 17, n. 12, p. 2615 , 2022. Disponível em: <<https://journals.lww.com/10.4103/1673-5374.339472>>.

HARRISON, Andrew G.; LIN, Tao; WANG, Penghua. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. **Trends in Immunology** v. 41, n. 12, p. 1100–1115 , dez. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490620302337>>.

HARTENIAN, Ella *et al.* The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry** v. 295, n. 37, p. 12910–12934 , set. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925817499546>>.

HOGESTYN, JessicaM; MOCK, DavidJ; MAYER-PROSCHEL, Margot. Contributions of neurotropic human herpesviruses herpes simplex virus 1 and human herpesvirus 6 to neurodegenerative disease pathology. **Neural Regeneration Research** v. 13, n. 2, p. 211 , 2018. Disponível em: <<https://journals.lww.com/10.4103/1673-5374.226380>>.

HOSSEINI, Shirin *et al.* Long-Term Neuroinflammation Induced by Influenza A Virus Infection and the Impact on Hippocampal Neuron Morphology and Function. **The Journal of Neuroscience** v. 38, n. 12, p. 3060–3080 , 21 mar. 2018. Disponível em: <<https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.1740-17.2018>>.

HU, Biying; HUANG, Shaoying; YIN, Lianghong. The cytokine storm and COVID-19.

Journal of Medical Virology v. 93, n. 1, p. 250–256 , 30 jan. 2021. Disponível em:
<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.26232>>.

HUANG, Lixue *et al.* 1-year outcomes in hospital survivors with COVID-19: a longitudinal cohort study. **The Lancet** v. 398, n. 10302, p. 747–758 , ago. 2021. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673621017554>>.

HUANG, Y. Hanna; JIANG, Daniel; HUANG, Jong T. SARS-CoV-2 Detected in Cerebrospinal Fluid by PCR in a Case of COVID-19 Encephalitis. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 87, p. 149 , jul. 2020. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159120307704>>.

IHUNWO, Amadi Ogonda *et al.* Neurogenesis and Viral Infection. **Frontiers in Immunology** v. 13 , 17 fev. 2022. Disponível em:
<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.826091/full>>.

ITZHAKI, Ruth F.; WOZNIAK, Matthew A. Herpes Simplex Virus Type 1 in Alzheimer’s Disease: The Enemy Within. **Journal of Alzheimer’s Disease** v. 13, n. 4, p. 393–405 , 28 abr. 2008. Disponível em:
<<https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-2008-13405>>.

IZZO, Angelo A. *et al.* Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends in Pharmacological Sciences** v. 30, n. 10, p. 515–527 , out. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016561470900128X>>.

JACKSON, Cody B. *et al.* Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology** v. 23, n. 1, p. 3–20 , 5 jan. 2022. Disponível em:
<<https://www.nature.com/articles/s41580-021-00418-x>>.

JENSON, Hal B. Acute complications of Epstein-Barr virus infectious mononucleosis.

Current Opinion in Pediatrics v. 12, n. 3, p. 263–268 , jun. 2000. Disponível em:

<<http://journals.lww.com/00008480-200006000-00016>>.

KARNIOL, I. G.; CARLINI, E. A. Pharmacological interaction between cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol. **Psychopharmacologia** v. 33, n. 1, p. 53–70 , 1973. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/BF00428793>>.

KAUFMAN, Audrey E *et al.* Review of radiographic findings in COVID-19. **World Journal of Radiology** v. 12, n. 8, p. 142–155 , 28 ago. 2020. Disponível em:

<<https://www.wjgnet.com/1949-8470/full/v12/i8/142.htm>>.

KOMARASAMY, Thamil Vaani *et al.* Zika Virus Neuropathogenesis: The Different Brain Cells, Host Factors and Mechanisms Involved. **Frontiers in Immunology** v. 13 , 16 mar.

2022. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.773191/full>>.

KUHN, Marion *et al.* Fear Extinction as a Model for Synaptic Plasticity in Major Depressive Disorder. **PLoS ONE** v. 9, n. 12, p. e115280 , 29 dez. 2014. Disponível em:

<<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0115280>>.

KUO, Chi-Wei *et al.* Long-Term Motor Cortical Electrical Stimulation Ameliorates 6-Hydroxydopamine-Induced Motor Dysfunctions and Exerts Neuroprotective Effects in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience** v. 14 , 16 fev. 2022.

Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2022.848380/full>>.

KYROU, Ioannis *et al.* Not only ACE2—the quest for additional host cell mediators of SARS-CoV-2 infection: Neuropilin-1 (NRP1) as a novel SARS-CoV-2 host cell entry

mediator implicated in COVID-19. **Signal Transduction and Targeted Therapy** v. 6, n. 1, p. 21 , 18 dez. 2021. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41392-020-00460-9>>.

LEE, Angela L; OGLE, William O; SAPOLSKY, Robert M. Stress and depression: possible links to neuron death in the hippocampus. **Bipolar Disorders** v. 4, n. 2, p. 117–128 , abr. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-5618.2002.01144.x>>.

LEON, Lucas Lopes *et al.* Arbovirus, herpesvirus, and enterovirus associated with neurological syndromes in adult patients of a university hospital, 2017-2018. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 54 , 2021. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822021000100337&tlng=en>.

LIMA, Isabel Vieira de Assis *et al.* Cannabidiol anticonvulsant effect is mediated by the PI3K γ pathway. **Neuropharmacology** v. 176, p. 108156 , out. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390820302240>>.

LINGE, Raquel *et al.* Cannabidiol induces rapid-acting antidepressant-like effects and enhances cortical 5-HT/glutamate neurotransmission: role of 5-HT1A receptors. **Neuropharmacology** v. 103, p. 16–26 , abr. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390815302136>>.

LIPKIN, W Ian; HORNIG, Mady. Psychotropic viruses. **Current Opinion in Microbiology** v. 7, n. 4, p. 420–425 , ago. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527404000785>>.

LIU, Wei *et al.* The Role of Neural Plasticity in Depression: From Hippocampus to Prefrontal Cortex. **Neural Plasticity** v. 2017, p. 1–11 , 2017. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/np/2017/6871089/>>.

LONG, Brit *et al.* Cardiovascular complications in COVID-19. **The American Journal of Emergency Medicine** v. 38, n. 7, p. 1504–1507 , jul. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735675720302771>>.

LUDLOW, Martin *et al.* Neurotropic virus infections as the cause of immediate and delayed neuropathology. **Acta Neuropathologica** v. 131, n. 2, p. 159–184 , 10 fev. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00401-015-1511-3>>.

MAGUIRE, Eleanor A. *et al.* Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 97, n. 8, p. 4398–4403 , 11 abr. 2000. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.070039597>>.

MANCA, Riccardo *et al.* Heterogeneity in Regional Damage Detected by Neuroimaging and Neuropathological Studies in Older Adults With COVID-19: A Cognitive-Neuroscience Systematic Review to Inform the Long-Term Impact of the Virus on Neurocognitive Trajectories. **Frontiers in Aging Neuroscience** v. 13 , 3 jun. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2021.646908/full>>.

MANGO, Dalila *et al.* Targeting Synaptic Plasticity in Experimental Models of Alzheimer's Disease. **Frontiers in Pharmacology** v. 10 , 16 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2019.00778/full>>.

MARSICANO, Giovanni *et al.* Neuroprotective properties of cannabinoids against oxidative stress: role of the cannabinoid receptor CB1. **Journal of neurochemistry** v. 80, n. 3, p. 448–56 , fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11905991>>.

MATEOS-APARICIO, Pedro; RODRÍGUEZ-MORENO, Antonio. The Impact of Studying Brain Plasticity. **Frontiers in Cellular Neuroscience** v. 13 , 27 fev. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2019.00066/full>>.

MATSCHKE, Jakob *et al.* Neuropathology of patients with COVID-19 in Germany: a post-mortem case series. **The Lancet Neurology** v. 19, n. 11, p. 919–929 , nov. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442220303082>>.

MCQUAID, Conor; BRADY, Molly; DEANE, Rashid. SARS-CoV-2: is there neuroinvasion? **Fluids and Barriers of the CNS** v. 18, n. 1, p. 32 , 14 dez. 2021. Disponível em: <<https://fluidsbarrierscns.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12987-021-00267-y>>.

MECHOULAM, R.; SHVO, Y. Hashish—I. **Tetrahedron** v. 19, n. 12, p. 2073–2078 , jan. 1963. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004040206385022X>>.

MEYER, Erika *et al.* Cannabidiol Confers Neuroprotection in Rats in a Model of Transient Global Cerebral Ischemia: Impact of Hippocampal Synaptic Neuroplasticity. **Molecular Neurobiology** v. 58, n. 10, p. 5338–5355 , 24 out. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s12035-021-02479-7>>.

MISRA, Shubham *et al.* Frequency of Neurologic Manifestations in COVID-19. **Neurology** v. 97, n. 23, p. e2269–e2281 , 7 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000012930>>.

MIYAH, Youssef *et al.* COVID-19 Impact on Public Health, Environment, Human Psychology, Global Socioeconomy, and Education. **The Scientific World Journal** v. 2022, p. 1–8 , 11 jan. 2022. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2022/5578284/>>.

MOHAMADIAN, Malihe *et al.* COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. **The Journal of Gene Medicine** v. 23, n. 2 , 6 fev. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jgm.3303>>.

MØLLER, Aage R. Neural Plasticity: For Good and Bad. **Progress of Theoretical Physics Supplement** v. 173, p. 48–65 , 2008. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ptps/article-lookup/doi/10.1143/PTPS.173.48>>.

MORFOPOULOU, Sofia *et al.* Human Coronavirus OC43 Associated with Fatal

Encephalitis. **New England Journal of Medicine** v. 375, n. 5, p. 497–498 , 4 ago. 2016.

Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1509458>>.

MORI, Isamu *et al.* Olfactory transmission of neurotropic viruses. **Journal of Neurovirology**

v. 11, n. 2, p. 129–137 , jan. 2005. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1080/13550280590922793>>.

NAGARKATTI, Prakash; MIRANDA, Kathryn; NAGARKATTI, Mitzi. Use of

Cannabinoids to Treat Acute Respiratory Distress Syndrome and Cytokine Storm Associated

with Coronavirus Disease-2019. **Frontiers in Pharmacology** v. 11 , 6 nov. 2020. Disponível

em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2020.589438/full>>.

NETLAND, Jason *et al.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Causes

Neuronal Death in the Absence of Encephalitis in Mice Transgenic for Human ACE2.

Journal of Virology v. 82, n. 15, p. 7264–7275 , ago. 2008. Disponível em:

<<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00737-08>>.

OBERMAN, Lindsay M. *et al.* Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation for Adolescent

Major Depressive Disorder: A Focus on Neurodevelopment. **Frontiers in Psychiatry** v. 12 ,

13 abr. 2021. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpsy.2021.642847/full>>.

PATERSON, Ross W *et al.* The emerging spectrum of COVID-19 neurology: clinical,

radiological and laboratory findings. **Brain** v. 143, n. 10, p. 3104–3120 , 1 out. 2020.

Disponível em: <<https://academic.oup.com/brain/article/143/10/3104/5868408>>.

PHILIPPENS, Ingrid H. C. H. M. *et al.* Brain Inflammation and Intracellular α -Synuclein

Aggregates in Macaques after SARS-CoV-2 Infection. **Viruses** v. 14, n. 4, p. 776 , 8 abr.

2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/14/4/776>>.

PLATT, Derek J; MINER, Jonathan J. Consequences of congenital Zika virus infection.

Current Opinion in Virology v. 27, p. 1–7 , dez. 2017. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879625717300822>>.

PONTELLI, Marjorie C *et al.* Infection of human lymphomononuclear cells by SARS-CoV-2.

bioRxiv : the preprint server for biology , 7 ago. 2020. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34013264>>.

POWER, Grace M *et al.* Socioeconomic risk markers of arthropod-borne virus (arbovirus)

infections: a systematic literature review and meta-analysis. **BMJ Global Health** v. 7, n. 4, p.

e007735 , 15 abr. 2022. Disponível em: <[https://gh.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjgh-](https://gh.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjgh-2021-007735)

2021-007735>.

PROENCA-MODENA, Jose Luiz *et al.* High Rates of Detection of Respiratory Viruses in

Tonsillar Tissues from Children with Chronic Adenotonsillar Disease. **PLoS ONE** v. 7, n. 8,

p. e42136 , 3 ago. 2012. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0042136>>.

RACANIELLO, Vincent R. One hundred years of poliovirus pathogenesis. **Virology** v. 344,

n. 1, p. 9–16 , jan. 2006. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682205005830>>.

RAGAB, Dina *et al.* The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. **Frontiers in**

Immunology v. 11 , 16 jun. 2020. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01446/full>>.

RAONY, Ícaro *et al.* Psycho-Neuroendocrine-Immune Interactions in COVID-19: Potential

Impacts on Mental Health. **Frontiers in Immunology** v. 11 , 27 maio 2020. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.01170/full>>.

RUDROFF, Thorsten *et al.* Post-COVID-19 Fatigue: Potential Contributing Factors. **Brain**

Sciences v. 10, n. 12, p. 1012 , 19 dez. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3425/10/12/1012>>.

RUSSO, Ethan; GUY, Geoffrey W. A tale of two cannabinoids: The therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. **Medical Hypotheses** v. 66, n. 2, p. 234–246 , jan. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987705004317>>.

RYAN, Duncan *et al.* Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience** v. 29, n. 7, p. 2053–63 , 18 fev. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228959>>.

SAAD, Mustafa *et al.* Clinical aspects and outcomes of 70 patients with Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a single-center experience in Saudi Arabia. **International Journal of Infectious Diseases** v. 29, p. 301–306 , dez. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1201971214016221>>.

SANTARELLI, Luca *et al.* Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. **Science** v. 301, n. 5634, p. 805–809 , 8 ago. 2003. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1083328>>.

SCHOU, Thor Mertz *et al.* Psychiatric and neuropsychiatric sequelae of COVID-19 – A systematic review. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 97, p. 328–348 , out. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159121002816>>.

SCHULZ, Robert; GERLOFF, Christian; HUMMEL, Friedhelm C. Non-invasive brain stimulation in neurological diseases. **Neuropharmacology** v. 64, p. 579–587 , jan. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390812002018>>.

SCHURINK, Bernadette *et al.* Viral presence and immunopathology in patients with lethal COVID-19: a prospective autopsy cohort study. **The Lancet Microbe** v. 1, n. 7, p. e290–e299 , nov. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666524720301440>>.

SHANG, Jian *et al.* Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 117, n. 21, p. 11727–11734 , 26 maio 2020. Disponível em:

<<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2003138117>>.

SHARMA, Nikhil; CLASSEN, Joseph; COHEN, Leonardo G. Neural plasticity and its contribution to functional recovery. [S.l: s.n.], 2013. p. 3–12. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444529015000010>>.

SINGHAL, Tanu. A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19). **Indian journal of pediatrics** v. 87, n. 4, p. 281–286 , 2020. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32166607>>.

SONEGO, Andreza B. *et al.* Cannabidiol prevents haloperidol-induced vacuos chewing movements and inflammatory changes in mice via PPAR γ receptors. **Brain, Behavior, and Immunity** v. 74, p. 241–251 , nov. 2018. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889159118305828>>.

SONG, Eric *et al.* Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. **Journal of Experimental Medicine** v. 218, n. 3 , 1 mar. 2021. Disponível em:

<<https://rupress.org/jem/article/218/3/e20202135/211674/Neuroinvasion-of-SARS-CoV-2-in-human-and-mouse>>.

STEWART, Janet N.; MOUNIR, Samir; TALBOT, Pierre J. Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients. **Virology** v. 191, n. 1, p. 502–505 , nov. 1992. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004268229290220J>>.

ŠUDOMOVÁ, Miroslava *et al.* Flavonoids Target Human Herpesviruses That Infect the Nervous System: Mechanisms of Action and Therapeutic Insights. **Viruses** v. 14, n. 3, p. 592 , 13 mar. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/14/3/592>>.

SWANSON, Phillip A; MCGAVERN, Dorian B. Viral diseases of the central nervous system. **Current Opinion in Virology** v. 11, p. 44–54 , abr. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1879625715000115>>.

TANAKA, Toshio *et al.* A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. **Seminars in Immunology** v. 26, n. 1, p. 88–96 , fev. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044532314000104>>.

TAQUET, Maxime *et al.* 6-month neurological and psychiatric outcomes in 236 379 survivors of COVID-19: a retrospective cohort study using electronic health records. **The Lancet Psychiatry** v. 8, n. 5, p. 416–427 , maio 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2215036621000845>>.

TAY, Tuan Leng *et al.* Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. **The Journal of Physiology** v. 595, n. 6, p. 1929–1945 , 15 mar. 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/JP272134>>.

TODD, A. R. Hashish. **Experientia** v. 2, n. 2, p. 55–60 , fev. 1946. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02163886>>.

TREMBLAY, Marie-Eve *et al.* Neuropathobiology of COVID-19: The Role for Glia. **Frontiers in Cellular Neuroscience** v. 14 , 11 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2020.592214/full>>.

TSEHA, Sintayehu Tsegaye. Polio: The Disease that Reemerged after Six Years in Ethiopia. **Ethiopian journal of health sciences** v. 31, n. 4, p. 897–902 , jul. 2021. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34703190>>.

TURGAY, Cokyaman *et al.* A rare cause of acute flaccid paralysis: Human coronaviruses.

Journal of Pediatric Neurosciences v. 10, n. 3, p. 280 , 2015. Disponível em:

<<http://www.pediatricneurosciences.com/text.asp?2015/10/3/280/165716>>.

UWISHEMA, Olivier *et al.* Neurological disorders in HIV: Hope despite challenges.

Immunity, Inflammation and Disease v. 10, n. 3 , 10 mar. 2022. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iid3.591>>.

VARATHARAJ, Aravinthan *et al.* Neurological and neuropsychiatric complications of COVID-19 in 153 patients: a UK-wide surveillance study. **The Lancet Psychiatry** v. 7, n. 10, p. 875–882 , out. 2020. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221503662030287X>>.

VENKATESAN, Arun; MURPHY, Olwen C. Viral Encephalitis. **Neurologic Clinics** v. 36, n. 4, p. 705–724 , nov. 2018. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0733861918312428>>.

VERKHRATSKY, Alexei; NEDERGAARD, Maiken; HERTZ, Leif. Why are Astrocytes Important? **Neurochemical Research** v. 40, n. 2, p. 389–401 , 12 fev. 2015. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s11064-014-1403-2>>.

WANG, Bo *et al.* In search of preventative strategies: novel high-CBD cannabis sativa extracts modulate ACE2 expression in COVID-19 gateway tissues. **Aging** , 24 nov. 2020.

Disponível em: <<http://www.aging-us.com/article/202225/text>>.

WANG, Dawei *et al.* Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA** v. 323, n. 11, p. 1061 , 17 mar.

2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2761044>>.

WHEELER, Anne C. Development of Infants With Congenital Zika Syndrome: What Do We Know and What Can We Expect? **Pediatrics** v. 141, n. Supplement_2, p. S154–S160 , 1 fev. 2018. Disponível em:

<https://publications.aap.org/pediatrics/article/141/Supplement_2/S154/34317/Development-of-Infants-With-Congenital-Zika>.

WHITEBREAD, Steven *et al.* Keynote review: In vitro safety pharmacology profiling: an essential tool for successful drug development. **Drug Discovery Today** v. 10, n. 21, p. 1421–1433 , nov. 2005. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644605036329>>.

WILSON, Emma H.; WENINGER, Wolfgang; HUNTER, Christopher A. Trafficking of immune cells in the central nervous system. **Journal of Clinical Investigation** v. 120, n. 5, p. 1368–1379 , 3 maio 2010. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/41911>>.

WINTER, Amy K; MOSS, William J. Rubella. **The Lancet** v. 399, n. 10332, p. 1336–1346 , abr. 2022. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014067362102691X>>.

WOZNIAK, Matthew A. *et al.* Herpes simplex virus infection causes cellular β -amyloid accumulation and secretase upregulation. **Neuroscience Letters** v. 429, n. 2–3, p. 95–100 , dez. 2007. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394007010786>>.

WU, Fan *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China.

Nature v. 579, n. 7798, p. 265–269 , 12 mar. 2020. Disponível em:

<<http://www.nature.com/articles/s41586-020-2008-3>>.

YAMAUCHI, Naoki *et al.* Chronic pain–induced neuronal plasticity in the bed nucleus of the stria terminalis causes maladaptive anxiety. **Science Advances** v. 8, n. 17 , 29 abr. 2022.

Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abj5586>>.

YEN, Hui-Ling *et al.* Transmission of SARS-CoV-2 delta variant (AY.127) from pet hamsters to humans, leading to onward human-to-human transmission: a case study. **The Lancet** v. 399, n. 10329, p. 1070–1078 , mar. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673622003269>>.

ZHENG, Haixia *et al.* Association between cytomegalovirus infection, reduced gray matter volume, and resting-state functional hypoconnectivity in major depressive disorder: a replication and extension. **Translational Psychiatry** v. 11, n. 1, p. 464 , 7 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41398-021-01558-6>>.

ZHOU, Li; MIRANDA-SAKSENA, Monica; SAKSENA, Nitin K. Viruses and neurodegeneration. **Virology Journal** v. 10, n. 1, p. 172 , 31 dez. 2013. Disponível em: <<https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-10-172>>.

ZHOU, Yonggang *et al.* Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. **National Science Review** v. 7, n. 6, p. 998–1002 , 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nsr/article/7/6/998/5804736>>.

Anexo I – Docking molecular do canabidiol

Em parceria com o Grupo de Modelagem Molecular de Sistemas Biológicos, liderado pelo Prof. Dr. Laurent Dardenne, do Laboratório Nacional de Computação Científica, foi realizada a investigação do potencial de ligação do canabidiol em possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da COVID-19. Entre eles, estavam os receptores Nsp3, Nsp5, Nsp12 e Nsp15, Spike (livre e complexado com ACE-2) e proteína de nucleocapsídeo (do SARS-CoV-2) e TMPRSS2 (do hospedeiro). Os experimentos foram realizados com dois programas diferentes de docking: Glide e DockThor (disponível gratuitamente como servidor web em www.dockthor.lncc.br), ambos baseados em métodos de busca e funções de pontuação distintos. As tabelas abaixo (A e B) demonstram os resultados obtidos nas análises realizadas nos programas mencionados, respectivamente. Tais dados representam a previsão de afinidade de ligação entre o canabidiol e as proteínas relacionadas com a infecção por SARS-CoV-2, em comparação com um ligante-referência. Como pode-se observar, ambos os programas utilizados, previram que o canabidiol apresentaria menor afinidade de ligação às proteínas-alvo, em relação ao ligante-referência.

Tabela A: Triagem virtual, obtida através de análises no programa Glide, de predição de afinidade de ligação entre o canabidiol (CBD) e proteínas-alvo.

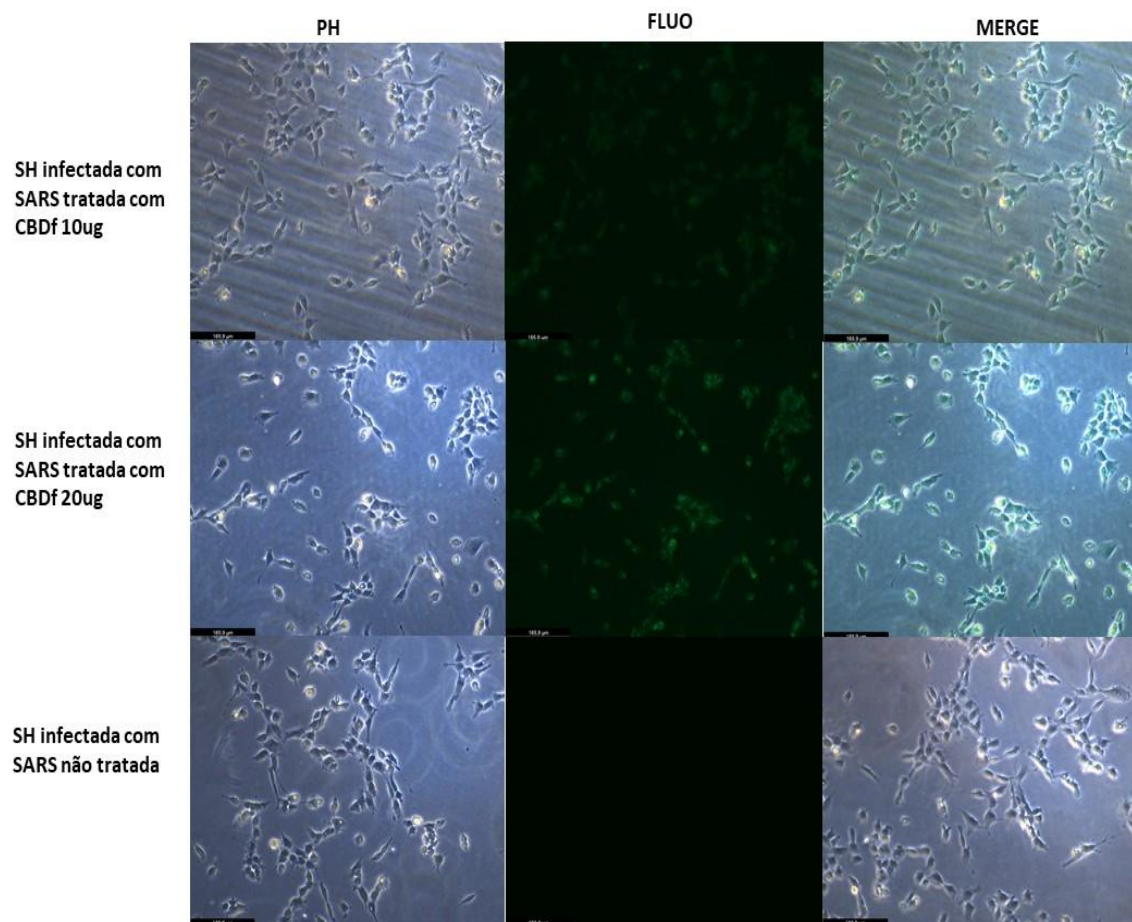
Composto	Spike-							
	Nsp3	Nsp5	Nsp12	Nsp15	NP	Spike	ACE2	TMPRSS2
Canabidiol	-4.275	-6.453	-3.555	-5.000	-4.743	-4.083	-2.997	-5.216
Ligante- referência		-6.046		-5.611				-10.036

Tabela B: Triagem virtual, obtida através de análises no programa DockThor-VR, de predição de afinidade de ligação entre o canabidiol (CBD) e proteínas-alvo.

Composto	Spike-							
	Nsp3	Nsp5	Nsp12	Nsp15	NP	Spike	ACE2	TMPRSS2
Canabidiol	-7.855	-8.074	-6.667	-8.492	-8.382	-8.201	-7.501	-7.193
Ligante- referência		-9.860		-7.210				-9.824

Anexo II- Administração de Canabidiol fluorescente em células neurais infectadas por SARS-CoV-2

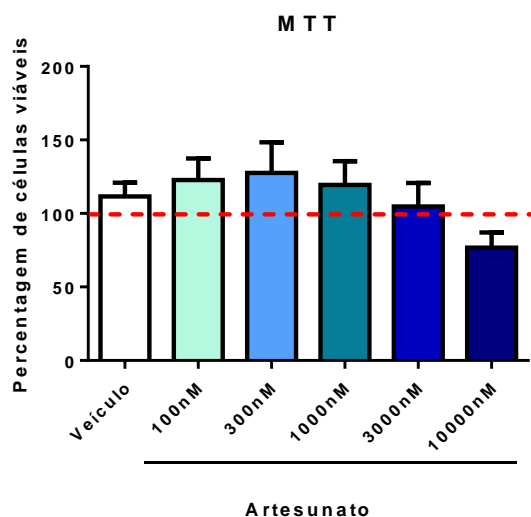
Células SH-SY5Y foram infectadas com SARS-CoV-2 e tratadas com concentrações de 10 ou 20ug de canabidiol fluorescente em nanopartículas. Na imagem abaixo, podem ser observadas punctas em verde fluorescente, em formato circular, indicando a localização intracelular da droga.



Células SH-SY5Y infectadas por SARS-CoV-2 tratadas com Canabidiol Fluorescente em nanopartículas, nas concentrações de 10 ou 20ug. Da esquerda para a direita: em fileiras verticais, PH=microscopia por contraste de fase; FLUO=microscopia de fluorescência; MERGE. N=1.

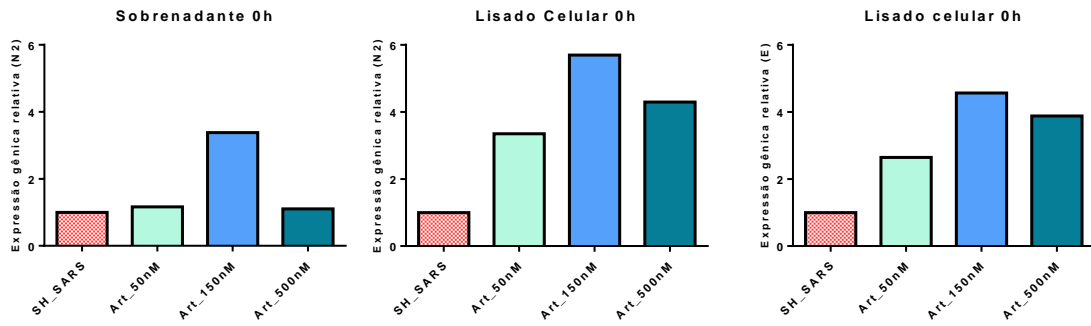
Anexo III- Aparente favorecimento à replicação viral pela administração de Artesunato (ART)

As células tratadas com ART passaram pelo teste de redução do MTT, para que pudesse ser analisada a viabilidade das mesmas após o tratamento. Esse ensaio foi realizado como uma triagem inicial de concentrações ideais para os testes posteriores (a análise da viabilidade celular nas células tratadas com ART e infectadas por SARS-CoV-2 será realizada posteriormente). Conforme mostra a figura abaixo, o ART não alterou estatisticamente a viabilidade das células.



Efeito de concentrações de ART na viabilidade celular. Células SH-SY5Y foram incubadas com diferentes concentrações de ART (100nM, 300nM, 1uM, 3uM e 10uM) e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de redução do MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio). N=4.

Para a análise da expressão dos genes E e N2 do SARS-CoV-2 nas células e no sobrenadante celular, foi realizado o q-PCR. Como pode ser observado na figura a seguir, na primeira replicata testada, o artesunato parece favorecer a replicação viral nas células SH-SY5Y infectadas pelo SARS-CoV-2. Especialmente na concentração de 300nM, o aumento na replicação viral acontece tanto no lisado celular, quanto no sobrenadante.



Análise da expressão de genes virais no sobrenadante e componente celular de células SH-SY5Y infectadas com SARS-CoV-2. Expressão do gene N2 no sobrenadante normalizado pela expressão de RNase P. Expressão dos genes N2 e E na fração celular normalizados pela expressão de β -actina. N=1.

Anexo VI – Participações em publicações científicas



Original Investigation | Psychiatry

Efficacy and Safety of Cannabidiol Plus Standard Care vs Standard Care Alone for the Treatment of Emotional Exhaustion and Burnout Among Frontline Health Care Workers During the COVID-19 Pandemic A Randomized Clinical Trial

José Alexandre S. Crippa, PhD; Antonio W. Zuardi, PhD; Francisco S. Guimarães, PhD; Alline Cristina Campos, PhD; Flávia de Lima Osório, PhD; Sonia Regina Loureiro, PhD; Rafael G. dos Santos, PhD; José Diogo S. Souza, MD; Juliana Mayumi Ushirohira, MD, MSc; Julia Cozar Pacheco, RPh; Rafael Rinaldi Ferreira, PhD, RPh; Karla Cristinne Mancini Costa, MSc; Davi Silveira Scomparin, MSc; Franciele Franco Scarante, MSc; Isabela Pires-Dos-Santos, VMD; Raphael Mechoulam, PhD; Flávio Kapczinski, PhD; Benedito A. L. Fonseca, PhD; Danilo L. A. Esposito, PhD; Karina Pereira-Lima, PhD; Srijan Sen, PhD; Maristela Haddad Andraus, MSc, RPh; Jaime E. C. Hallak, PhD; for the Burnout and Distress Prevention With Cannabidiol in Front-line Health Care Workers Dealing With COVID-19 (BONSAI) Trial Investigators

Abstract

IMPORTANCE Frontline health care professionals who work with patients with COVID-19 have an increased incidence of burnout symptoms. Cannabidiol (CBD) has anxiolytic and antidepressant properties and may be capable of reducing emotional exhaustion and burnout symptoms.

OBJECTIVE To investigate the safety and efficacy of CBD therapy for the reduction of emotional exhaustion and burnout symptoms among frontline health care professionals working with patients with COVID-19.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS This prospective open-label single-site randomized clinical trial used a 1:1 block randomization design to examine emotional exhaustion and burnout symptoms among frontline health care professionals (physicians, nurses, and physical therapists) working with patients with COVID-19 at the Ribeirão Preto Medical School University Hospital in São Paulo, Brazil. Participants were enrolled between June 12 and November 12, 2020. A total of 214 health care professionals were recruited and assessed for eligibility, and 120 participants were randomized in a 1:1 ratio by a researcher who was not directly involved with data collection.

INTERVENTIONS Cannabidiol, 300 mg (150 mg twice per day), plus standard care or standard care alone for 28 days.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES The primary outcome was emotional exhaustion and burnout symptoms, which were assessed for 28 days using the emotional exhaustion subscale of the Brazilian version of the Maslach Burnout Inventory–Human Services Survey for Medical Personnel.

RESULTS A total of 120 participants were randomized to receive either CBD, 300 mg, plus standard care (treatment arm; n = 61) or standard care alone (control arm; n = 59) for 28 days. Of those, 118 participants (59 participants in each arm; 79 women [66.9%]; mean age, 33.6 years [95% CI, 32.3–34.9 years]) received the intervention and were included in the efficacy analysis. In the treatment arm, scores on the emotional exhaustion subscale of the Maslach Burnout Inventory significantly decreased at day 14 (mean difference, 4.14 points; 95% CI, 1.47–6.80 points; partial eta squared [η_p^2] = 0.08), day 21 (mean difference, 4.34 points; 95% CI, 0.94–7.73 points; η_p^2 = 0.05), and day 28 (mean difference, 4.01 points; 95% CI, 0.43–7.59 points; η_p^2 = 0.04). However, 5 participants, all of whom were in the treatment group, experienced serious adverse events: 4 cases of elevated liver enzymes (1 critical and 3 mild, with the mild elevations reported at the final 28-day assessment) and 1

(continued)

Key Points

Question Is cannabidiol (CBD) therapy capable of reducing emotional exhaustion and burnout symptoms among frontline health care professionals working with patients with COVID-19?

Findings In this randomized clinical trial of 120 frontline health care professionals, emotional exhaustion scores were reduced among participants receiving CBD plus standard care compared with those receiving standard care alone. Five participants who received CBD plus standard care experienced serious adverse events, with full recovery after discontinuation.

Meaning The study's findings suggest that CBD may act as an effective agent for the reduction of emotional exhaustion and burnout symptoms among frontline health care professionals, although it is necessary to balance the benefits with potential undesired effects when making decisions regarding the use of CBD.

+ Visual Abstract

+ Supplemental content

Author affiliations and article information are listed at the end of this article.

Open Access. This is an open access article distributed under the terms of the CC-BY License.

JAMA Network Open. 2021;4(8):e2120603. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.20603

August 13, 2021 1/14

Cannabidiol for COVID-19 Patients with Mild to Moderate Symptoms (CANDIDATE Study): A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial

José Alexandre S. Crippa,^{1,2,*} Julia Cozar Pacheco,¹ Antonio W. Zuardi,^{1,2} Francisco S. Guimarães,^{2,3} Alline Cristina Campos,³ Flávia de Lima Osório,^{1,2} Sonia Regina Loureiro,¹ Rafael G. dos Santos,^{1,2} José Diogo S. Souza,¹ Juliana Mayumi Ushirohira,¹ Rafael Rinaldi Ferreira,³ Karla Cristinne Mancini Costa,³ Davi Silveira Scomparin,³ Franciele Franco Scarante,³ Isabela Pires-Dos-Santos,³ Raphael Mechoulam,⁴ Flávio Kapczinski,^{2,5,6} Benedito A.L. Fonseca,⁷ Danillo L.A. Esposito,⁷ Afonso Dinis Costa Passos,⁸ Amaury Lelis Dal Fabbro,⁸ Fernando Bellissimo-Rodrigues,⁸ Eurico Arruda,⁹ Sandro Scarpelini,¹⁰ Maristela Haddad Andraus,¹¹ Julio Cesar Nather Junior,¹² Danilo Tadao Wada,¹² Marcel Koenigk-Santos,¹² Antonio Carlos Santos,¹² Geraldo Busatto Filho,¹³ and Jaime E.C. Hallak^{1,2}; for the Cannabidiol for COVID-19 Patients (CANDIDATE) Trial Investigators

Abstract

Importance: Owing to its anti-inflammatory properties and antiviral “in vitro” effect against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), cannabidiol (CBD) has been proposed as a potential treatment for coronavirus disease 2019 (COVID-19).

Objective: To investigate the safety and efficacy of CBD for treating patients with mild to moderate COVID-19.

Design: Randomized, parallel-group, double-blind, placebo-controlled clinical trial conducted between July 7 and October 16, 2020, in two sites in Brazil.

Setting: Patients were recruited in an emergency room.

Participants: Block randomized patients (1:1 allocation ratio—by a researcher not directly involved in data collection) with mild and moderate COVID-19 living in Ribeirão Preto, Brazil, seeking medical consultation, and those who voluntarily agreed to participate in the study.

Interventions: Patients received 300 mg of CBD or placebo added to standard symptomatic care during 14 days.

Main Outcome and Measure: The primary outcome was reduction or prevention of the deterioration in clinical status from mild/moderate to severe/critical measured with the COVID-19 Scale or the natural course of the resolution of typical clinical symptoms. Primary study outcome was assessed on days 14, 21, and 28 after enrollment.

Results: A total of 321 patients were recruited and assessed for eligibility, and 105 were randomly allocated either in CBD ($n=49$) or in placebo ($n=42$) group. Ninety-one participants were included in the analysis of efficacy. There were no baseline between-group differences regarding disease severity ($\chi^2=0.025$, $p=0.988$) and median time to symptom resolution (12 days [95% confidence interval, CI, 6.5–17.5] in the CBD group, 9 days [95% CI,

¹Department of Neuroscience and Behavior, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

²National Institute for Science and Technology—Translational Medicine, São Paulo, Brazil.

³Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

⁴Department of Medicinal Chemistry and Natural Products, The Institute for Drug Research, School of Pharmacy, The Hebrew University of Jerusalem, Jerusalem, Israel.

⁵Department of Psychiatry and Behavioural Neurosciences, McMaster University and St. Joseph's Healthcare Hamilton, Hamilton, Canada.

⁶Graduate Program in Psychiatry and Behavioral Sciences, Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Departments of ⁷Internal Medicine, ⁸Social Medicine, ⁹Cell and Molecular Biology, and ¹⁰Surgery and Anatomy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

¹¹Chromatex Laboratory Ltda., São Paulo, Brazil.

¹²Department of Medical Imaging, Hematology, and Clinical Oncology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

¹³Laboratory of Psychiatric Neuroimaging (LIM 21), Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

^{*}ORCID ID (<https://orcid.org/0000-0001-9520-6746>).

*Address correspondence to: José Alexandre S. Crippa, PhD, Department of Neuroscience and Behavior, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 3900, Ribeirão Preto, São Paulo CEP 14049-900, Brazil, E-mail: jcrippa@fmrp.usp.br