



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia



JORDAN FARES SAMPAR

Canabinoides induzem efeitos pró-neurogênicos
em cultura de precursores neurais derivados das células hipocâmpais de ratos:
o envolvimento da macroautofagia

Ribeirão Preto/SP
2018

JORDAN FARES SAMPAR

Canabinoides induzem efeitos pró-neurogênicos
em cultura de precursores neurais derivados das células hipocâmpais de ratos:
o envolvimento da macroautofagia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Graduação em Ciências
Biomédicas da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alline Cristina de
Campos

Ribeirão Preto/SP
2018

AGRADECIMENTOS

A meu pai, primordialmente, por grande parte das vezes ter apoiado minhas decisões (mesmo quando elas custavam a entrar em sua cabeça) e à minha tia Vânia, por, desde recém-nascido, junto aos meus avós, ter cuidado de mim e zelado pelo meu bem estar físico e emocional.

A orientadora deste projeto e chefe do Laboratório de Farmacologia da (Neuro)plasticidade, Prof.^a Dr.^a Alline Cristina de Campos, pelos devidos conselhos, as devidas broncas e, especialmente, pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório, mesmo diante dos muitos erros que cometi.

À Maria Laura Rodrigues Pinto, minha primeira inspiração acadêmica, por despertar e instaurar em mim o desejo pelo estudo do desenvolvimento embrionário, ainda quando eu estava na UFTM.

A Fernanda Crunfli, que acabou se tornando um porto-seguro nesta fase final do trabalho, ao Murilo Pazin, pelas ajudas em realizar uma grande parte dos experimentos desta monografia e à Maria Adriele, pela constante preocupação e ofertas de auxílio com os experimentos.

A Franciele, Gabriel, Karla, Eduardo, Melissa, Davi, Vinícius, Paula, Marrubia e Giu, meus amigos e colegas de laboratório, pelo convívio diário, pelas orientações e ajudas nos experimentos e, principalmente, por terem me recebido muito bem no laboratório e me fazer, muitas vezes, se espelhar na forma como muitos de vocês trabalham.

Ao Pedro, companheiro de vida, por ter me ensinado que a calma é essencial para o sucesso das atividades que precisamos realizar; aos seus pais, Nilton e Silvia, por sempre me receberem e tratarem muito bem; aos meus amigos, Aline, Jéssica, Júlia, Marcela, Mariane e Thainá, pelos momentos que dividimos nestes 4 anos juntos de CB; ao Bud e Safadão, pelos muitos almoços dominicais como uma família ribeirão-pretana; a Barbara, minha grande amiga durante os tempos de UFTM e aos muitos colegas e amigos que tive a oportunidade de fazer, pelos lugares que passei.

A Banca Examinadora deste trabalho, pelo aceite do convite bem como pela disposição em avaliar e criticar o meu trabalho, contribuindo para a minha formação.

A todas as pessoas que, por um descuido não proposital, eu tenha esquecido de mencionar aqui, mas que me abraçaram e abraçam calorosamente em diversas fases da minha vida, enquanto eu precisava.

Aos funcionários da FMRP, em seus mais derivados setores, pelos cuidados diretos e indiretos com os todos os alunos que passam por aqui.

E, finalmente, à minha mãe, por – certa vez – ter jogado todos os meus pertences para fora de casa. Você talvez não saiba, mas conseguiu criar um filho forte para o mundo.

“The second thing is modesty. Never think that you know everything. No matter in what high esteem you are held, always have the courage to say to yourself: I am ignorant.”

A letter to the youth, Ivan P. Pavlov

RESUMO

A autofagia é um processo celular evolutivo e catabólico que degrada os componentes do citoplasma através do envolvimento dos lisossomos e da via intracelular da mTOR. Estudos anteriores mostraram que este processo é importante não só para a reciclagem de organelas citoplasmáticas, mas também para a proteção e sobrevivência das células. No sistema nervoso central embrionário e adulto, a inibição do fluxo autofágico está associada à perturbação no neurodesenvolvimento e nos distúrbios neurodegenerativos, respectivamente. Paralelamente, tem sido descrito que os canabinoides – componentes da planta *Canabis sativa* – interferem no fluxo autofágico, sendo um dos mecanismos mais relevantes por trás dos efeitos anti-tumorigênicos do Canabidiol (CBD). A ativação de receptores CB₁ e CB₂ em linhagens de células precursoras neurais produz efeitos proliferativos e pró-neurogênicos. Dessa maneira, tentamos investigar se os efeitos pró-neurogênicos e/ou pró-proliferativos induzidos pelo tratamento com CBD estão associados à facilitação do fluxo autofágico. Utilizamos como modelo células progenitoras neurais extraídas do hipocampo de ratos no dia embrionário 16 (E16), chamadas HiB5 e avaliamos o efeito do tratamento com CBD (100 e 250 nM), Rapamicina (100 e 250 nM) e URB597 (50 nM) sobre a proliferação e viabilidade celular. A Rapamicina apresentou uma leve tendência em diminuir a viabilidade celular, ainda que favoreça o processo de proliferação celular; URB597 demonstrou ser, na concentração de 50 nM, tóxico para as células ao passo em que o CBD, nas concentrações administradas, não apresentou alterações nestes dois processos celulares. Verificou-se, também, pela técnica de *Western Blot*, o perfil de expressão de proteínas relacionadas ao fluxo autofágico, como mTOR e LC3b, perante o tratamento com CBD (250 nM), Rapamicina (250 nM) e URB597 (50 nM) ao longo de 24h. O tratamento com CBD levou a um aumento de mTOR, possivelmente demarcando uma ativação do começo da via autofágica, tal qual o tratamento com Rapamicina, como esperado. A concentração de 50 nM de URB597 parece levar as células à morte pelo mecanismo de autofagia, uma vez que houve aumento destas duas proteínas para a concentração de tratamento utilizada.

Palavras-chave: Canabidiol; Autofagia; Neurogênese; HiB5.

ABSTRACT

Autophagy is an evolutionary and catabolic cellular process that degrades cytoplasmic components with the involvement of lysosomes and intracellular pathway mediated by mTOR. Previous studies have shown that this process is important not only for the recycling of cytoplasmic organelles, but also for the protection and survival of cells. Inhibition of the autophagic flow in the embryonic and adult central nervous system is associated with neurodevelopmental disturbance and neurodegenerative disorders, respectively. In parallel, it has been described that cannabinoids - components of the *Canabis sativa* plant – modulate the autophagic flow, being one of the most relevant mechanisms behind the anti-tumorigenic effects of Cannabidiol (CBD). Activation of CB1 and CB2 receptors in neural precursor cell lines produces proliferative and pro-neurogenic effects. Therefore, in the present work, we investigate whether the pro-neurogenic and / or pro-proliferative effects induced by CBD treatment are associated with a facilitation of autophagic flow. Immortalized progenitor cells extracted from the hippocampus of embryonic day 16 (E16), called HiB5, were exposed to CBD (100 and 250 nM), Rapamycin (100 and 250 nM) and URB597 (50 nM) and proliferation and cell viability evaluated. Rapamycin showed a slight tendency to decrease cell viability, although it favors the process of cell proliferation; URB597 was shown to be toxic at 50 nM in the cells whereas CBD, at the concentrations administered, showed no alterations in these two cellular processes. The expression of autophagic flow-related proteins, such as mTOR and LC3b, was also verified by the Western Blot technique on treatment with CBD (250 nM), Rapamycin (250 nM) and URB597 (50 nM) at over 24 hours. Treatment with CBD, and the positive control Rapamycin increased phosphorylated form of mTOR, possibly marking an activation of the beginning of the autophagic pathway. The concentration of 50 nM URB597 appears to lead the cells to death by the autophagy mechanism, since there was an increase of these two proteins for the concentration of treatment used.

Keywords: Cannabidiol; Autophagy; Neurogenesis; HiB5.

LISTA DE ABREVIATURAS

CA – *cornu ammonis*

Timidina tritiada – [H³] – timidina

BrdU – 5'-Bromo-2-deoxiuridina

SGZ – Zona subgranular

DG – Giro denteado

SVZ – Zona subventricular

NSCs – *Neural Stem Cells*

GFAP – *Glial fibrillary acidic protein*

mTOR – *mammalian target of Rapamycin*

Atgs – *autophagy related genes*

CB1 – receptor canabinoide tipo 1

CB2 – receptor canabinoide tipo 2

AEA – anandamida

2-AG – 2 araquidonilglicerol

FAAH – Hidrolase amida de ácido graxo

MAGL – Monoacilglicerol lipase

eCB – endocanabinoides

CBD – Canabidiol

Rapa – Rapamicina

URB597 – *Cyclohexylcarbamic acid 3'-carbamoylbiphenyl-3-yl ester*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsufóxido

SFB – Soro Fetal Bovino

PFA – Paraformolaldeído

BSA – Albumina do soro bovino

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	7
1.1. O HIPOCAMPO E OS MECANISMOS DE NEUROPLASTICIDADE.....	7
1.2. NEUROGÊNESE ADULTA	7
1.3. O PROCESSO AUTOFÁGICO E A VIA DA MTOR	10
1.4. O SISTEMA ENDOCANABINOIDE	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. CULTURA DE CÉLULAS HIB5	14
3.2. DROGAS	14
3.3. TÉCNICAS/PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	14
3.3.1. IMUNOCITOQUÍMICA	14
3.3.2. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT).....	15
3.3.3. ANÁLISE MOLECULAR: <i>WESTERN BLOT</i>	16
3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	16
3.4.1. IMUNOCITOQUÍMICA	16
3.4.2. <i>WESTERN BLOT</i>	17
3.4.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT).....	18
3.5. ANÁLISE DE DADOS.....	18
4. RESULTADOS	18
4.1. EXPERIMENTO 1: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA DE CBD, RAPAMICINA E URB597.....	18
4.2 - EXPERIMENTO 2: EFEITO DO CBD, RAPAMICINA E URB SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR	22
4.3 - EXPERIMENTO 3 – EFEITO DO CBD, RAPAMICINA e URB597 SOBRE O PROCESSO AUTOFÁGICO.....	23
4.4. EXPERIMENTO 4 – EFEITO DO TRATAMENTO COM CBD, RAPAMICINA E URB NA EXPRESSÃO DE MEDIADORES DO PROCESSO AUTOFÁGICO	26
4.4.1 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTEICA DE MTOR E SUA FORMA FOSFORILADA	26
4.4.2. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTEICA DE LC3B	27

4.5. EXPERIMENTO 5 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM HIB5 APÓS EXPOSIÇÃO AO CBD, RAPAMICINA E URB.....	28
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	33
REFERÊNCIAS.....	34

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. O HIPOCAMPO E OS MECANISMOS DE NEUROPLASTICIDADE

O hipocampo está localizado bilateralmente nos lobos temporais do cérebro, pertencente ao sistema límbico e, é uma estrutura importante nos circuitos de memória, aprendizagem, controle das emoções e navegação espacial (Yu et al., 2017). Seu nome advém da semelhança entre a curvatura da estrutura e do peixe ósseo cavalo-marinho, cujo gênero é definido como *Hippocampus*. É dividido em sub-regiões, nomeadas *cornu ammonis 1*, *cornu ammonis 2*, *cornu ammonis 3* e giro denteado (CA1, CA2, CA3 e DG, respectivamente) (Yu et al., 2017). Aferências provenientes do córtex entorrinal, localizado caudalmente ao córtex olfatório do uncus, se projetam para o giro denteado através das vias perfurantes, fazendo sinapse com as células granulares. Estas células realizam a segunda sinapse com as células piramidais de CA3, que, por sua vez, realizam a terceira sinapse com as células piramidais de CA1 através das vias colaterais de Schaffer. Por fim, as células de CA1 ligam-se ao fórnice e este se projeta para regiões corticais e límbicas (Amaral et al., 2007; Knowles, 1992; Rusakov et al., 1999; Isaacson, 2002; Rolls, 2007).

Por ser recrutado durante processos cognitivos e emocionais, o hipocampo tem sido alvo de muitos estudos relacionados a transtornos mentais e neurológicos. Isso deve-se em parte devido à grande capacidade de adaptação dessa estrutura, visando a homeostase das conexões neurais. O hipocampo possui uma grande capacidade de adaptar-se e moldar-se frente a novas experiências, um conceito em neurociências denominado, neuroplasticidade (Purves et al., 2004). A neuroplasticidade é um processo coordenado, dinâmico e contínuo que promove a remodelação dos neurônios a pequena, média e longa duração para aperfeiçoar e/ou adaptar a função dos circuitos neuronais (Duffau, 2006); tem início na terceira semana do desenvolvimento embrionário humano, concomitante com a formação do cérebro e dos primeiros neurônios. Dentre os diversos processos neuroplásticos que ocorrem no hipocampo, o presente trabalho teve como destaque o processo de neurogênese hipocampal, em particular a adulta.

1.2. NEUROGÊNESE ADULTA

Por quase um século, a suposta “incapacidade” cerebral de gerar novos neurônios no cérebro adulto constituiu-se como um dos principais dogmas da neurociência (Campos et al., 2013). Até o final dos anos 50, acreditava-se que após-nascimento novos neurônios não seriam gerados e incorporados a circuitos existentes. No entanto, no começo da década de 60, utilizando-se da técnica de autorradiografia pela incorporação da timidina tritiada ($[H^3]$ -Timidina), análogo da timidina incorporada ao DNA durante a fase S do ciclo celular, Joseph Altman e colaboradores publicaram uma série de artigos relatando a ocorrência de neurogênese adulta em várias estruturais cerebrais de ratos jovens e adultos, incluindo o giro denteado, o bulbo olfatório e o neocórtex (Altman e Das, 1965; Altman, 1966; Altman, 1969).

Diante da precariedade de marcadores imunohistoquímicos e as pesquisas baseando-se exclusivamente em critérios morfológicos, a comunidade da área da neurociência não aceitou os achados de Altman e Das, bem como de pesquisadores como Kaplan, Nottebohn, Cameron e Gould que vieram posteriormente. Apenas no início dos anos 90, com a introdução do 5-bromo-2’deoxiuridina (BrdU), análogo sintético da timidina, captado pelas células durante a fase S da mitose sendo, portanto, um marcador de proliferação celular, que a pesquisa sobre a neurogênese adulta ganhou notoriedade (Eriksson et al., 1998). Utilizando-se desta técnica, diversos estudos em mamíferos confirmaram a neurogênese hipocampal adulta em roedores (Cameron et al., 1993; Seki e Arai, 1993; Kuhn et al., 1996; Gould et al., 1998) e primatas não-humanos e humanos (Eriksson et al., 1998 Kornack e Radic, 1999).

A neurogênese pode ser definida como um processo que se inicia com a proliferação celular e ocorre em regiões específicas do cérebro devido às características próprias ao seu microambiente, como a presença de células progenitoras com capacidade de autorrenovação e multipotência, células gliais, astrócitos, células endoteliais e de uma complexa matriz extracelular (Kempermann *et al.*, 2015). Até o presente momento, tem-se dado foco a duas regiões, sendo elas a camada subgranular (SGZ) do giro denteado (DG) (Gould et al., 1999; Shors et al., 2001; van Praag et al., 2002) e nos ventrículos cerebrais, na camada subventricular (SVZ) (Kempermann et al., 2004); porém, estudos recentes sugerem que este processo ocorre no estriado, hipotálamo e amígdala em situações fisiológicas e/ou patológicas (Ernst et al., 2004). Didaticamente, o processo neurogênico é dividido em cinco processos que tem início com a proliferação de células progenitoras (também chamadas de NSCs, do inglês *Neural Stem Cells*), seguido de sua diferenciação, da determinação do fenótipo neural, da maturação morfológica e fisiológica e se encerra com a formação e integração do novo neurônio no sistema nervoso (Ming e Song, 2012). Os experimentos deste trabalho de conclusão de curso estão focados na neurogênese hipocampal que ocorre na zona subgranular

do giro denteado e, portanto, não será descrito em detalhes o processo neurogênico que ocorre na zona subventricular.

Inicialmente, as NSCs (ou células do tipo 1), que tem seu corpo celular localizado na SGZ, expressam proteína glial fibrilar ácida (do inglês, *glial fibrillary acidic protein* ou GFAP) e nestina. Devido a sua morfologia ramificada e à extensa penetração entre os vasos sanguíneos, essas células possuem uma taxa de divisão muito baixa (Kronenberg et al., 2003) e, quando o fazem, é de forma assimétrica, originando uma célula semelhante a si e uma célula progenitora amplificada (tipo 2A). Após a fase proliferativa, essas células amplificadas podem migrar e se diferenciar em neuroblastos (também chamadas células tipo 2B e 3). As células tipo 2 continuam a expressar nestina (Duan et al., 2008) mas não mais GFAP (Kempermann et al., 2004). Caso sobrevivam a todo esse processo, essas células podem gerar novos neurônios imaturos e integrar-se às sinapses pré-existentes na camada granular do giro denteado e irão assumir a forma de células granulares glutamatérgicas. Nesta fase, que é pós-mitótica, ocorre a maturação de espinhos dendríticos, necessária para que haja a integração sináptica, e aumento da plasticidade sináptica (Kempermann et al., 2015). As células não recrutadas para o processo de maturação são entregues a apoptose (Zhao et al., 2006; Dayer et al., 2003).

Apesar de muitos estudos demonstrarem a relevância da neurogênese hipocampal adulta em roedores, existem formas de se mimetizar, estudar e analisar os processos moleculares responsáveis por este processo, poupando assim, ao máximo, o uso de animais para a experimentação. Reynolds e Weiss, em 1992, isolaram células do estriado de ratos adultos e as colocaram em meio de cultura junto a fatores de crescimento epidérmico. Eles observaram que as mesmas tinham a capacidade de se proliferar e expressar Nestina, uma proteína característica de *stem cells*, posteriormente assumindo a forma de astrócitos ou de neurônios (Reynolds e Weiss, 1992). Várias linhagens de células podem ser utilizadas para mimetizar o processo neurogênico *in vitro*, resultado em NSCs retiradas em diferentes fases – fetal, pós-natal e adulta – do neurodesenvolvimento (Azari e Reynolds, 2016). Refranz e colaboradores, em 1991, estabeleceram uma linhagem celular de precursores neurais retirados do hipocampo de ratos no dia embrionário 16 (E16), chamada HiB5 (Refranz et al., 1991). E16 coincide com o início de uma onda de neurogênese no hipocampo destes animais que se estende até a vida pós-natal precoce (Altman e Das, 1965; Bayer, 1980). As células HiB5 mantêm certas características que são observadas também em células precursoras hipocámpais humanas e, portanto, mostram-se como uma boa ferramenta para a melhor compreensão dos mecanismos subjacentes da neurogênese hipocampal adulta.

1.3. O PROCESSO AUTOFÁGICO E A VIA DA MTOR NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

No sistema nervoso central, muitas vias intracelulares mostram correlação com os processos de divisão, migração, diferenciação e sobrevivência neuronal, bem como auxiliam processos neuroplásticos fundamentais ao desenvolvimento, como a sinaptogênese e o remodelamento dendrítico (Fogaça, 2016). Para exemplificá-las, menciona-se a Akt (também denominada proteína quinase B), MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos, em especial a Erk1/2) e, de especial interesse para o presente trabalho, mTOR, do inglês *mammalian Target of Rapamycin*.

A mTOR é uma proteína serina-treonina quinase, inserida na família da proteína fosfoinositol-3 quinase (PI3K) (Ryskalin *et al.*, 2017). Elucidada em leveduras na década de 1990, como um alvo para a Rapamicina – potente macrolídeo imunossupressor –, a mTOR é uma proteína altamente conservada evolutivamente, incluindo as células neurais (Laplante e Sabatini, 2012), sendo está intimamente relacionada com o controle do crescimento e sobrevivência celular, processos proliferativos e a autofagia, além de atuar como um sensor metabólico celular (Rysalin *et al.*, 2017).

Diante destas atividades celulares, acredita-se que a mTOR promova suas ações através da interação a dois complexos diferentes: o mTORC1, relacionado intimamente à proliferação e sobrevivência celular, sensível à rapamicina e um regulador negativo da autofagia, e mTORC2, uma proteína importante para o neurodesenvolvimento embrionário, uma vez que seu *knock-out* promove letalidade (Fimia *et al.*, 2007). A ativação desses complexos se dá através da fosforilação pela Akt e resulta nos processos celulares mencionados acima (Saitoh *et al.*, 2002; Pause *et al.*, 1994; Mayer *et al.*, 2004).

Entretanto, a ativação de mTOR também é capaz de inibir a autofagia, um processo conservado e catabólico importante para a homeostase celular, uma vez que entrega constituintes citoplasmáticos danificados ou obsoletos ao lisossomo para, através de hidrolases ácidas, garantir a sobrevivência celular (Scarlati *et al.*, 2009). Até o presente momento, existem três formas de autofagia descritas: a microautofagia, a macroautofagia e a autofagia mediada por chaperonas (Todde *et al.*, 2009). Diante disso, o foco deste trabalho éfoi a macroautofagia, que será referida a diante como autofagia. Como descrito anteriormente, a inibição de mTOR inicia alterações intracelulares que culminam no fluxo

autofágico. A execução deste processo é regulada por proteínas, como a família de Atg (*Autophagy related genes*), ULK1/2, Beclin1, Ambra1 – importantes para a formação do autofagossomo, estrutura bimembranar derivada do retículo endoplasmático, golgi e mitocôndrias – e LC3 a e b que, ligados às membranas deste, constituem importantes marcadores da fase final autofágica, quando há a incorporação do autofagossomo ao lisossomo, originando o autofagolisossomo (Wesselborg and Stork, 2015; Damme et al., 2015).

Na falta de nutrientes, o complexo mTORC1 é inativado, permitindo que o complexo ULK1 recrute Beclin1 e Ambra1 para iniciar a nucleação do autofagossomo (Navarro-Yepes et al., 2014), sendo Ambra1 uma importante proteína para o neurodesenvolvimento (Yazdankhah et al., 2014) A autofagia também tem um papel importante no desenvolvimento e sobrevivência de células neurais, sendo importante para a manutenção do nicho neurogênico, bem como para o processo *per se* (Komatsu, 2006; Boya, 2008; Xi, 2016). Finalmente, mTORC1 participa do desenvolvimento inicial do sistema nervoso central, regulado pela manutenção das NSCs, diferenciação neuronal, migração e estabelecimento da integração sináptica (Ryskalin et al., 2017).

Diversos agentes parecem ser capazes de modular tanto a capacidade proliferativa das NSCs quanto o fluxo autofágico. Dentre eles, está o sistema endocanabinoide, uma vez que resultados na literatura sugerem que este sistema seja capaz de mediar estes processos autofágicos (Prenderville et al., 2015).

1.4. O SISTEMA ENDOCANABINOIDE

O sistema endocanabinoide (eCB) é um sistema de sinalização lipídica que tem a sua atividade iniciada com o desenvolvimento embrionário do cérebro e que é capaz de modular a neurotransmissão pré- e pós-natal (Campolongo et al., 2009; Campolongo et al., 2011; Fernandez-Ruiz et al., 2000). Ainda que hoje já se conheça muitos alvos moleculares dos endocanabinoides (Morena e Campolongo, 2014), sabe-se que eles exercem as suas funções através dos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1), localizados no sistema límbico, principalmente no hipocampo (Morena e Campolongo, 2014), e do tipo 2 (CB2), localizado principalmente em células do sistema imunológico, apesar de estudos terem demonstrado a existência dos mesmos no hipocampo (Onaivi et al., 2006; Van Sickle et al., 2005). É sugerido que os receptores CB1 e CB2 possam facilitar a proliferação, diferenciação,

migração e maturação dos precursores neurais (Aguado et al., 2005; Palazuelos et al., 2006; Campos et al., 2016).

Até o momento, os endocanabinoides anandamida (AEA) (Devane et al., 1992) e 2-araquinodoilglicerol (2-AG) (Sugiura et al., 1995) foram identificados e descritos como os principais mediadores do sistema endocanabinoide. Os mesmos são sintetizados sob demanda em neurônios pós-sinápticos e participam da neurotransmissão retrógrada, ou seja, acredita-se que atuem em receptores canabinoides localizados na membrana pré-sináptica, modulando a liberação de neurotransmissores excitatórios e inibitórios (Wilson e Nicoll, 2002; Mechoulam et al., 1998). A AEA atua como um agonista parcial de CB1 e CB2 (Pertwee, 2010) enquanto que o 2-AG age como agonista total destes mesmos receptores (Schweitzer e Piomelli, 1997). A ativação destes receptores resulta na inibição dos canais de cálcio e ativação de canais para potássio, levando à inibição da liberação de neurotransmissores (Szabo e Schlicker, 2005).

A AEA e o 2-AG são degradados, predominantemente, por hidrolases nomeadas FAAH (do inglês, *fatty acid amide hydrolase*) e MAGL (monoacilglicerol lipase), respectivamente. A modulação dessas enzimas representa um processo importante para a sinalização do sistema eCB (Huang et al., 2016) bem como a manipulação do sistema endocanabinoide parece estar envolvida na regulação da neurogênese hipocampal adulta (Aguado et al., 2005; Palazuelos et al., 2006; Jiang et al., 2007).

Além dos canabinóides sintéticos e endógenos, os receptores CB1 e CB2 podem ser alvo para os fitocanabinoides, extraídos da planta *Canabis sativa*, como o Canabidiol (CBD), principal componente não-psicomimético desta. Estudos demonstraram que o CBD atua sobre processos neuroplásticos, dentre eles a neurogênese, promovendo o aumento da sobrevivência neuronal (Esposito et al., 2011; Wolf et al., 2010). Palazuelos e colaboradores, em 2012, demonstraram, utilizando-se como modelo células HiB5, que o CBD promove a proliferação das NSCs via mTORC1 (Palazuelos et al., 2012). No mesmo sentido, Campos e colaboradores demonstraram que esse processo é decorrente da ativação de receptores CB₁ e CB₂.

Além destes efeitos, os canabinoides parecem induzir autofagia, processo importante para o efeito neuroprotetor em pacientes epiléticos (Hosseinzadeh et al., 2016; Koay et al., 2014). Ademais, foi demonstrado também que CBD inibe a sinalização de Akt, que consequentemente inibe mTORC1 e induz a autofagia (Shrivastava *et al.*, 2011; Fogaça *et al.*,

2014). Anandamida e ACEA, um canabinóide sintético, induzem autofagia canônica mediada por CB1 (Koay *et al.*, 2014).

Dentre os fitocanabinoides descritos acima, sabe-se que o canabidiol (CBD) é capaz de promover neurogênese hipocampal adulta ao mesmo tempo em que é capaz de modular a via autofágica da mTOR (Costa *et al.*, 2012). Recentemente, Fogaça e colaboradores (2018) demonstraram que os efeitos tipo-ansiolíticos promovidos pelo CBD em animais estressados seriam dependentes de processos autofágicos e neuroplásticos. Entretanto, é desconhecida a relação entre a neurogênese hipocampal adulta, canabinóides e o processo autofágico. Dessa forma, o presente trabalho tem como hipótese que modulam positivamente o fluxo autofágico em células precursoras neurais.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O principal objetivo dos estudos descritos abaixo foi determinar se os *in vitro* promovido pelos canabinoides em células tronco neurais envolve a facilitação do fluxo autofágico.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Investigar como os tratamentos com CBD, Rapamicina, URB597 e JZL184 são capazes de modular os processos de proliferação e viabilidade celular;
- b. Investigar se os efeitos do CBD encontrados na literatura se fazem presente *in vitro* e a relação destes resultados com o tratamento com Rapamicina, URB597.
- c. Avaliar se o tratamento com CBD altera a expressão das proteínas mTOR e LC3b, relacionadas ao processo autofágico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CULTURA DE CÉLULAS HIB5

Células imortalizadas HiB5 (Campos et al., 2013), derivadas de progenitores hipocampais extraídas de embriões de ratos no 16º dia de gestação (E16), foram mantidas a 33°C e atmosfera de 5% de CO₂ em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) com 1% v/v de glutamina, como forma de nutrição celular; 1% v/v dos antibióticos penicilina/estreptomicina e 10% v/v de soro fetal bovino (SFB), também como nutrição celular. Foram realizadas passagens das células quando a confluência na placa, ou seja, 70% da área da mesma está recoberta por células, foi atingida.

3.2. DROGAS

Foram utilizados Canabidiol (BSPG; 100, 250, 500 e 1000 nM, Campos et al., 2013), Rapamicina (LC Laboratories, inibidor da proteína mTOR, 25, 50, 100, 200 e 400 nM; Bahmad et al., 2018) URB 597 (Cayman, inibidor da enzima FAAH, 15, 30, 50 e 60 nM; Jiang et al., 2007) E JZL184 (Cayman, inibidor da enzima MAGL, 15, 30 e 60 nM, Rueda et al., 2002). Todas as drogas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) sendo a concentração máxima de 0.05% por poço. Como veículo, utilizou-se solução do meio de cultura com 0.05% de DMSO.

3.3. TÉCNICAS/PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1. IMUNOCITOQUÍMICA

Na terceira passagem das células (P₃), as células foram plaqueadas na concentração de 25.000 células/mL em placa de 24 poços contendo lamínulas de vidro pré-incubadas com poli-D-lisina 10µg/mL, sob as mesmas condições de meio de cultura e atmosfera (DMEM, 10% SFB). No dia seguinte, no período da manhã, o meio de cultura foi substituído por outro, contendo apenas 0.5% v/v SFB, 1% v/v penicilina/estreptomicina e 1% v/v de glutamina. Doze horas após, as células foram incubadas com as drogas e deixadas na estufa a 33°C por 18h. No dia seguinte, as células foram fixadas com a solução de paraformolaldeído (PFA) 4% com tampão fosfato (PB) 0.1% pH = 7.4 e glicose 6% e, posteriormente, procedeu-se com os

ensaios de imunocitoquímica. Os cristais contendo as células foram lavados três vezes de dez minutos cada, com 500 µL de tampão fosfato-salino (PBS) 1x. Em seguida, aplicou-se em cada poço 500µL de ácido clorídrico (HCl) 2M e a placa foi deixada na estufa, a 37°C, por trinta minutos. Posteriormente, colocou-se a placa por dez minutos na geladeira e, em seguida, cada poço foi lavado com 1 mL ácido bórico (H₃BO₃) 0.1M pH=9. Novamente lavou-se a placa três vezes de dez minutos cada com PBS 1x e a solução de bloqueio (0.25% v/v Triton X, 1% albumina do soro bovino (BSA) e q.s.p de PBS) foi aplicada por 2h a temperatura ambiente (25°C). Após esse processo, as lamínulas foram incubadas com anticorpo primário para LC3b (Cell Signaling, 1:500, rabbit) BrdU (Hybridoma Bank 1:200, mouse), GFAP (Cell Signaling 1:500, rabbit), Nestin (Millipore, 1:500, mouse) diluídos em solução de lavagem (0.25% v/v Triton X, 0.1% albumina do soro bovino (BSA) e q.s.p de PBS) e a placa foi protegida da luz, *overnight*, à temperatura ambiente.

No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas com solução de lavagem e, da mesma maneira, foram colocadas sob 20 µL de anticorpo secundário Alexa Fluor (Invitrogen, 1:1000) de acordo com o hospedeiro e comprimento de onda por quarenta minutos, com a placa protegida da luz. Dez minutos antes do tempo se encerrar, o marcador de núcleos totais Hoechst 33342 (Thermofisher, 1:10.000) foram colocados sob cada lamínula. Finalmente, as lamínulas foram fixadas em uma lâmina com o meio de montagem, Cytosil (Eletron Microscopy) de acordo com o seu tratamento e cada uma dessas foi nomeada de acordo com o experimento, tratamento e a data.

3.3.2. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

Em P₃, as células foram plaqueadas em placa de 24 poços, na concentração de 25.000 células/mL, sob as mesmas condições de meio de cultura e atmosfera. No dia seguinte, no período da manhã, o meio de cultura foi substituído por outro meio, contendo apenas 0.5% v/v SFB, 1% v/v penicilina/estreptomicina e 1% v/v de glutamina. Doze horas após, as células foram incubadas com os fármacos CBD (250 e 100 nM), Rapamicina (500 e 250 nM) e com a droga URB597 (50 nM) e deixadas na estufa a 33°C 24 horas após, as células foram lavadas com PBS e 400 µL de uma solução de MTT (Sigma, 5 mg/mL) diluído em PBS foi aplicado em cada poço. A placa foi incubada 3h na estufa a 37°C e, após esse período, retirou-se o sobrenadante de cada poço. 700 µL de DMSO foram aplicados em cada poço e o volume foi

homogeneizado. 200 µL deste volume foram aplicados em triplicata na placa de 96 poços e a leitura foi feita na absorvância de 595 nm (Multilabel Reader 2030 VICTOR X3).

3.3.3. ANÁLISE MOLECULAR: *WESTERN BLOT*

As células foram semeadas em placas de Petri e após o tratamento com os fármacos CBD e Rapamicina, ambos na concentração de 250 nM, e com a droga URB597, na concentração de 50 nM, foram estabelecidos cinco tempos distintos – 5', 30', 1h, 2h e 24h – para se analisar, pela técnica de WB, algumas proteínas da via autofágica. Ao fim de cada tempo, as placas foram lavadas com PBS gelado e sofreram o processo de arraste mecânico para se obter um homogenato proteico em tampão de lise contendo inibidores de proteases. O extrato rico em proteínas foi isolado e quantificado pelo método de Bradford para normalização da concentração de proteínas totais das amostras. Em seguida, as amostras de proteínas foram aplicadas (concentração de 20 µg/µL) em gel de poliacrilamida 4-12% para proteínas de peso molecular menor (10 a 75 kDa) e 3-8% para proteínas de peso molecular maior (90 a 200 kDa) e submetidas à eletroforese para depois serem transferidas para a membrana de nitrocelulose ativada com água. A membrana foi bloqueada (leite em pó Blotting-Grade Blocker BioRad 10%) e incubada com os anticorpos primários anti-mTOR, anti-pmTOR, e anti-LC3b *overnight* a 4°C sob agitação. Os anticorpos são da marca Cell Signaling e seus respectivos códigos são: #2972S, #2971 e #2775S. Neste experimento, eles foram utilizados na diluição de 1:1.000. Após lavagens de 5', 10' e 5' novamente, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-Rabbit (Cell Signaling, 1:10.000). A membrana foi lavada em tampão TBS-T e revelada em reação de quimiluminescência visualizada no fotodocumentador GE®.

3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.4.1. IMUNOCITOQUÍMICA

3.4.1.1. EXPERIMENTO 1 – AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE NESTINA E GFAP

Células HiB5 foram tratadas por 24h com CBD (100, 250, 500 e 1000 nM), Rapamicina (25, 50, 100, 200 e 400 nM), URB597 e JZL184 (ambos nas concentrações de 15, 30 e 60 nM). Em seguida, foi realizada uma imunocitoquímica para avaliar, através da relação entre GFAP e Nestina, o perfil de expressão da fase inicial do processo neurogênico.

3.4.1.2. EXPERIMENTO 2 – AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Células HiB5 foram tratadas por 24h com CBD (100 e 250 nM), Rapamicina (250 e 500 nM) e URB597 50 nM. Após esse período, foi realizada uma imunocitoquímica para avaliar a expressão de BrdU, marcador de proliferação celular.

3.4.1.3. EXPERIMENTO 3 – AVALIAÇÃO DO PERFIL CELULAR AUTOFÁGICO

Células HiB5 foram tratadas por 24h com CBD (100, 250, 500 e 1000 nM), Rapamicina (25, 50, 100, 200 e 400 nM), URB597 (15, 30 e 60 nM) e JZL184 (30 e 60 nM), a fim de se verificar a expressão de LC3b, proteína relacionada com a incorporação do autofagossomo.

3.4.2. WESTERN BLOT

3.4.2.1. EXPERIMENTO 4 – EXPRESSÃO PROTEICA DE MEDIADORES DO PROCESSO AUTOFÁGICO

Após o tratamento com CBD (250 nM), Rapamicina (250 nM) e URB597 (50 nM) em diferentes tempos (5', 30', 1h, 2h e 4h) e da obtenção das células, do seu processamento e da aplicação do método de WB descrito no tópico 3.4, foram avaliados os níveis das seguintes proteínas: mTOR, p-mTOR e LC3b.

3.4.3. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR (MTT)

3.4.3.1. EXPERIMENTO 5 – ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

24 horas após o tratamento das células HiB5 com CBD (100 e 250 nM), Rapamicina (250 e 500 nM) e URB597 50 nM, avaliou-se o perfil de viabilidade celular das mesmas através do ensaio de MTT.

3.5. ANÁLISE DE DADOS

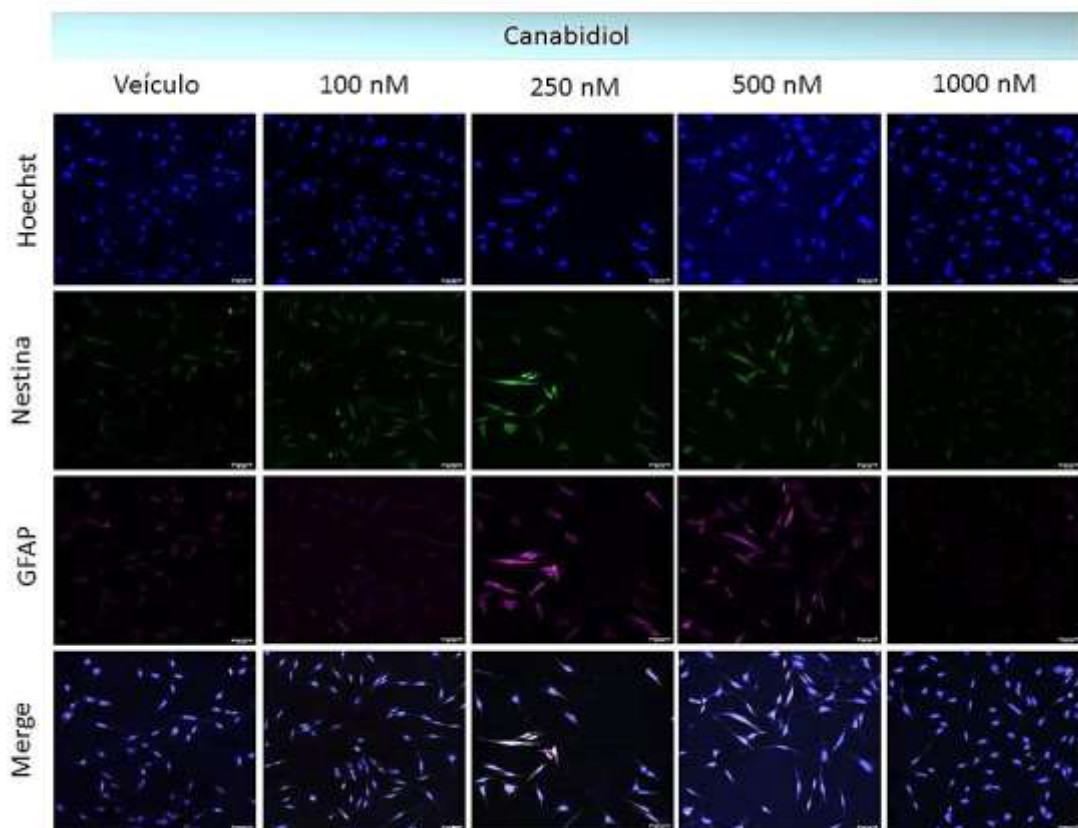
Os resultados foram analisados no programa SPSS 16.0 quanto à normalidade por meio do teste de Komolov-Smimov e a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Nos casos de distribuição normal, os dados foram analisados por one-way ANOVA, sendo o tratamento o fator independente e a expressão e absorbância os fatores dependentes. Quando apropriado, foi realizado teste post-hoc de Duncan. Foram considerados significativos valores de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA DE CBD, RAPAMICINA E URB597.

A fim de se verificar se os tratamentos com CBD, Rapamicina e URB597 poderia alterar a característica de pregenitores neurais, diferenciando-os, foi realizada a técnica de imunocitoquímica, utilizando células HiB5 como modelo, para verificar a relação entre a expressão de GFAP (marcador de células tronco neurais) e de Nestina (da fase proliferativa indiferenciada). O Canabidiol foi utilizado nas concentrações de 100, 250, 500 e 1000 nM; a Rapamicina, nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 nM; URB597 e JZL184, foram incubados nas concentrações de 15, 30 e 60 nM. O tratamento foi administrado por 24h. As Figuras 1, 2 e 3 mostram a relação da taxa de GFAP/Nestina pelo respectivo tratamento, bem como as imagens representativas de cada tratamento. As imagens foram obtidas através do microscópio confocal TSC-Leica no aumento de 20x e quantificadas no programa Image J. É

possível perceber que a concentração de 100 nM apresenta, mesmo sem uma significância estatística, uma tendência de aumento na taxa GFAP/Nestina, sugerindo que, nessas condições, as células tendem a permanecer no perfil de células tronco neurias. A concentração de 400 nM de Rapamicina apresentou uma diminuição da taxa, sugerindo um efeito oposto ao que foi observado na concentração de 100 nM de CBD. O tratamento com URB597 e JZL184, na concentração de 15 nM, parece alterar de forma discreta o perfil das células que podem estar evoluindo para precursores intermediários. Os experimentos foram realizados em quadruplicatas.



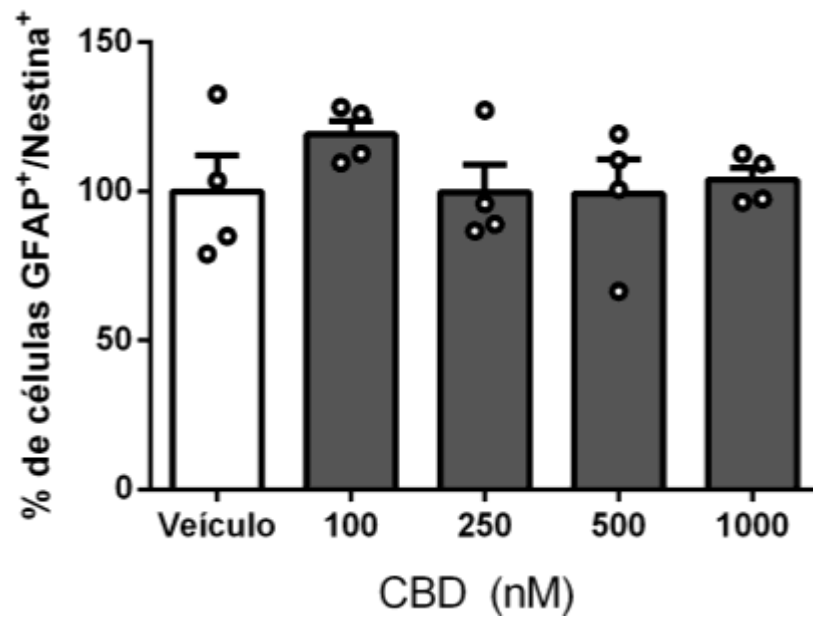
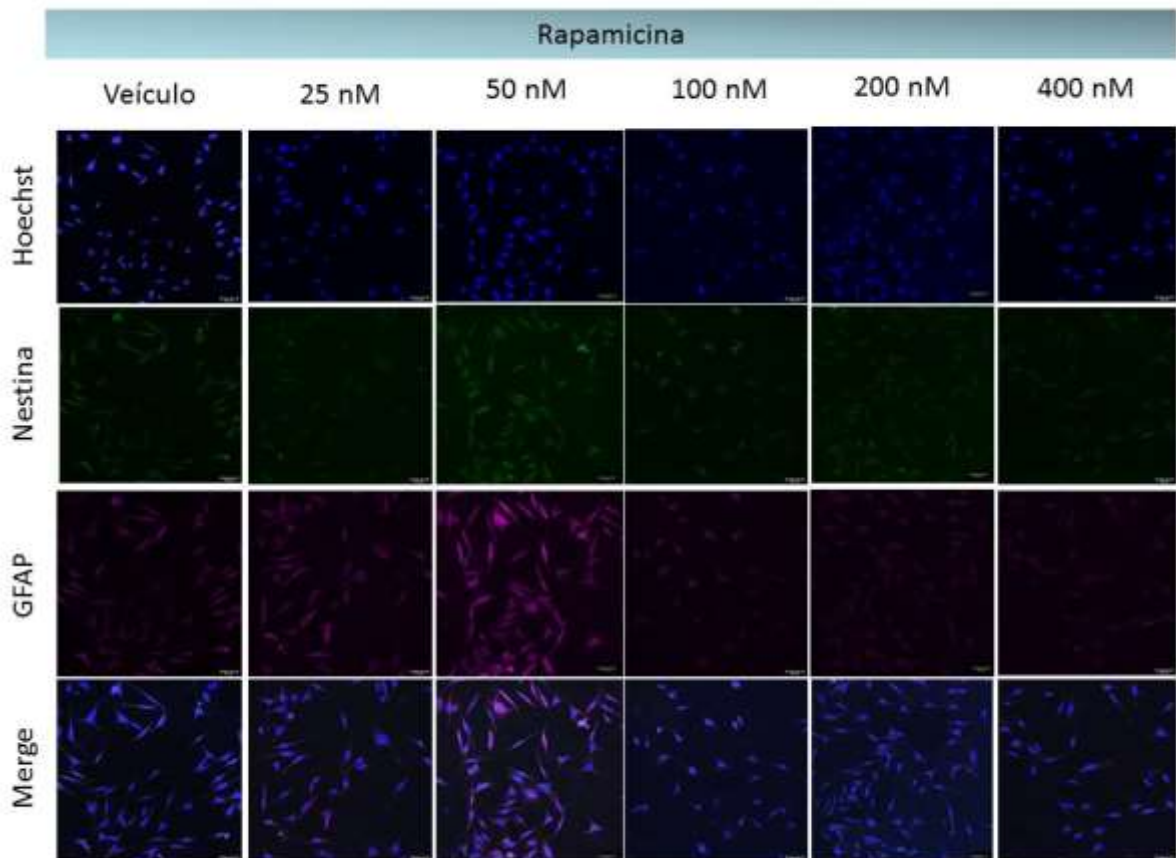


Figura 1: % de células HiB5 GFAP⁺ e Nestina⁺ quando tratadas com diferentes concentrações de Canabidiol. Após o tratamento com 100, 250, 500 e 1000 nM de CBD, as células foram analisadas conforme a expressão concomitante de GFAP e Nestina (n=1 por grupo; 4 campos/poço). Valores estão representados como Média \pm EPM e foram normalizados pelo veículo.



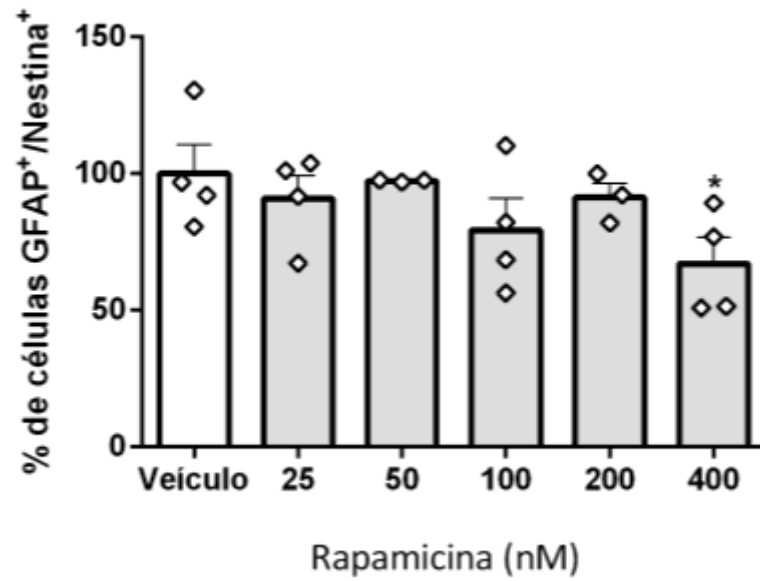
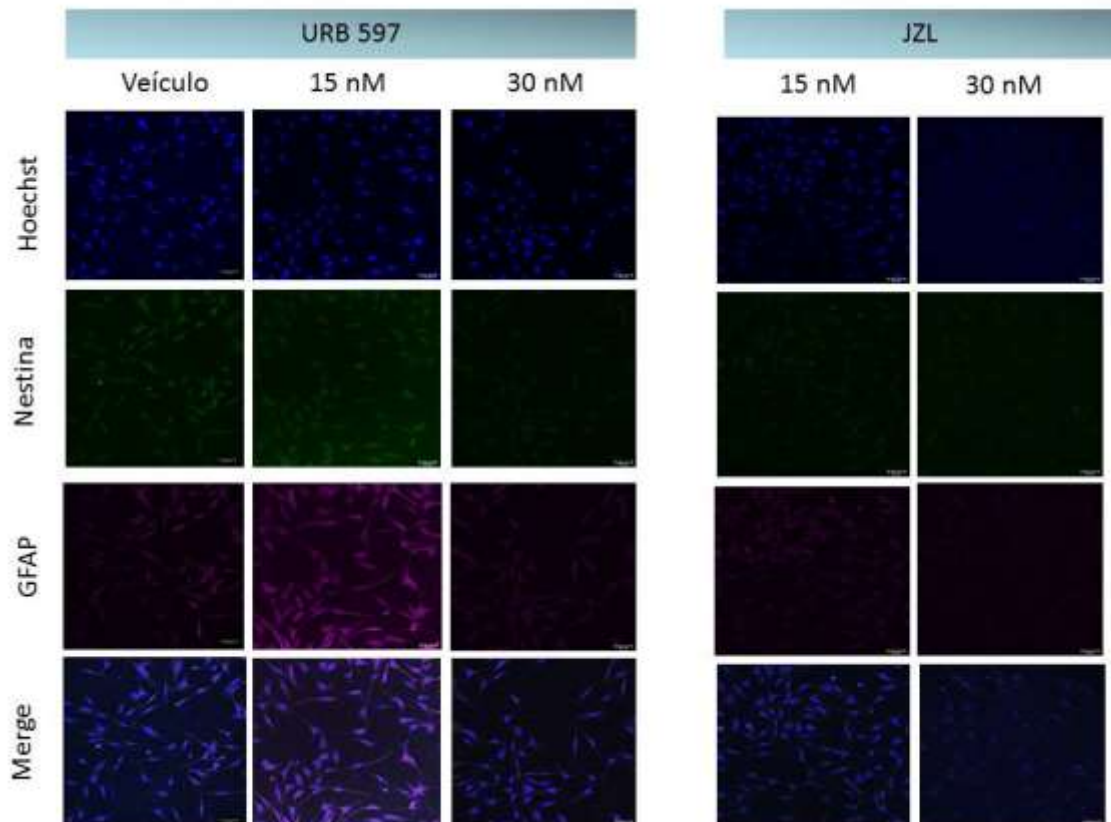


Figura 2: % de células HiB5 GFAP⁺ e Nestina⁺ quando tratadas com diferentes concentrações de Rapamicina. Após o tratamento com 25, 50, 100, 200 e 400 nM de Rapamicina, as células foram analisadas conforme a expressão de GFAP e Nestina (n=1 por grupo; 4 campos/poço). Valores estão representados como Média ± EPM e foram normalizados pelo veículo. ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Dunnett. (*) Indica p<0.05 em relação ao grupo Veículo. ($F_{(5,16)} = 1.847$, p = 0.055).



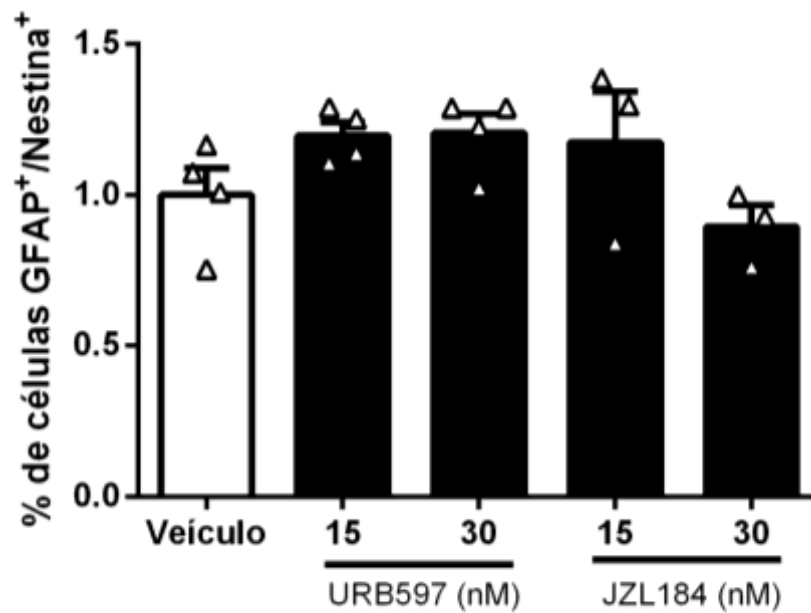


Figura 3: % de células HiB5 GFAP⁺ e Nestina⁺ quando tratadas com diferentes concentrações de URB597 e JZL184. Após o tratamento com 15 e 30 nM de URB597 e JZL184, as células foram analisadas conforme a expressão de GFAP e Nestina (n=1 por grupo; 4 campos/poço). Valores estão representados como Média ± EPM e foram normalizados pelo veículo.

4.2 - EXPERIMENTO 2: EFEITO DO CBD, RAPAMICINA E URB SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR

Inicialmente, para analisar os efeitos da exposição das células HiB5 a CBD, Rapamicina e URB597 sobre a proliferação celular foi plotado um gráfico do tratamento pelo número de células BrdU positivas, como demonstrado pela Figura 1. Nela está representado o efeito do tratamento com Canabidiol (100 e 250 nM), Rapamicina (250 e 500 nM) e URB597 (50 nM) por 24h sobre a proliferação celular, demarcado pela quantidade de células BrdU⁺. A concentração de 100 nM de CBD sugere uma diminuição do número de células em proliferação, revertida pela concentração de 250 nM desta mesma droga. Houve uma tênue diferença entre as concentrações de 250 e 500 nM de Rapamicina, com a última mostrando um leve aumento de células em proliferação; a dose de 50 nM de URB597 sugere a diminuição do número de células se proliferando, uma vez que houve uma diminuição significativa quando comparado ao veículo. O experimento foi realizado em quadruplicata.

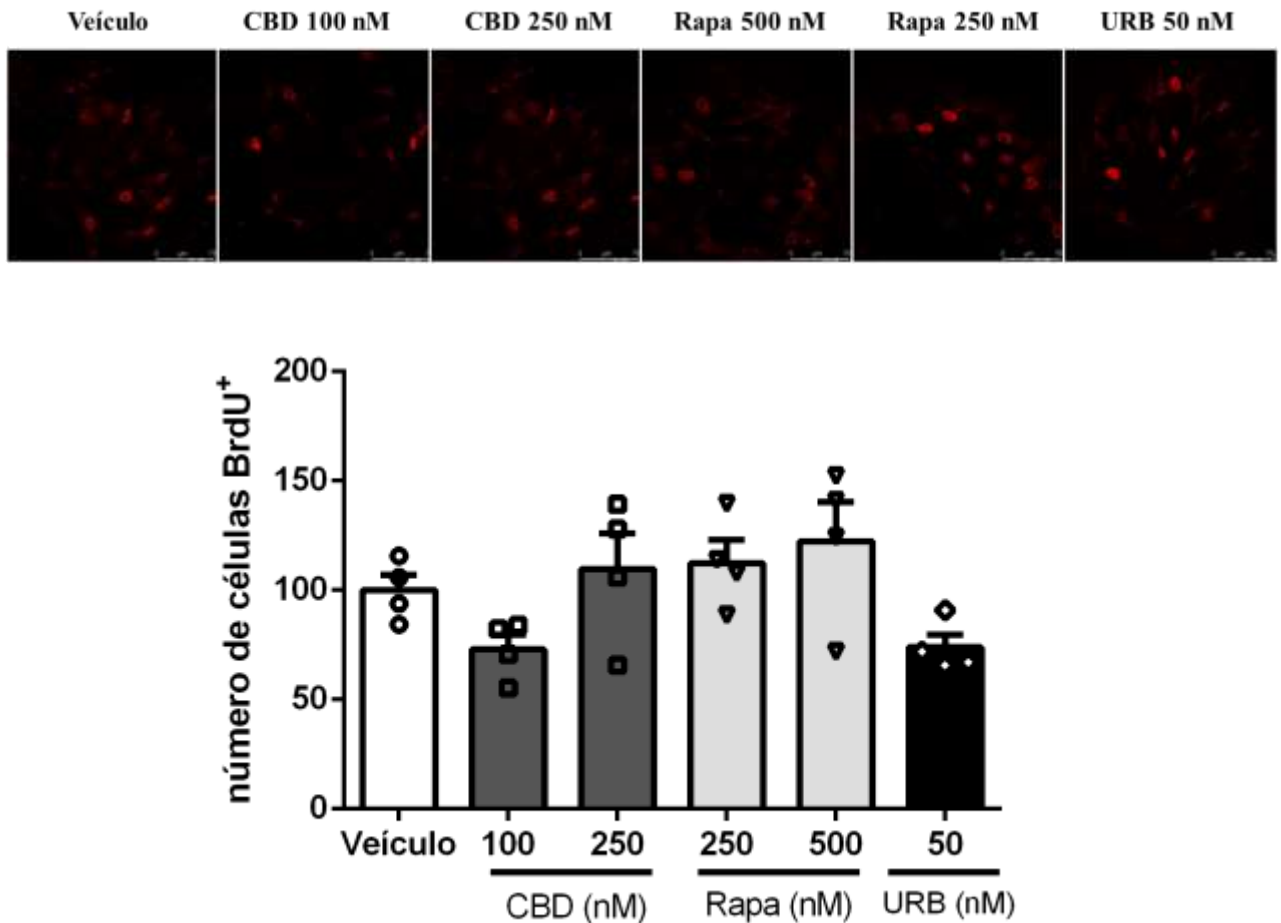


Figura 4: Número de células HiB5 que expressam BrdU quando tratadas com diferentes drogas. Após o tratamento com Canabidiol (100 e 250 nM), Rapamicina (250 e 500 nM) e URB597 (50 nM), as células foram analisadas perante a expressão de BrdU (n=1 por grupo; 4 campos/poço). Valores estão representados como Média \pm EPM e foram normalizados pelo veículo.

4.3 - EXPERIMENTO 3 – EFEITO DO CBD, RAPAMICINA e URB597 SOBRE O PROCESSO AUTOFÁGICO.

Para analisar os efeitos da exposição das células HiB5 a CBD, Rapamicina e URB597 sobre a via autofágica, foi plotado um gráfico do número de células LC3b⁺, um marcador de incorporação ao autofagossomo, pelo respectivo tratamento, administrado por 24h. O Canabidiol foi utilizado nas concentrações de 100, 250, 500 e 1000 nM; Rapamicina, nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 nM; URB597e JZL 184 nas concentrações de 15, 30 e 60 nM. As Fguras 5, 6 e 7 mostram a relação entre as células LC3b⁺ e o respectivo tratamento. As imagens foram obtidas através do microscópio confocal TSC-Leica no aumento de 40x e quantificadas no programa Image J.

O tratamento com CBD sugere que nas concentrações de 100 e 250 nM houve um aumento do número de células HiB5, enquanto que a concentração de 1000 nM tendeu a reverter este processo. A concentração de 25 e 50 nM de Rapamicina demonstraram pouco efeito sobre a via autofágica, em relação as concentrações de 100, 200 e 400 nM, as quais triplicaram (200 e 400 nM) ou quadriplicaram (100 nM) o número de células LC3b⁺, como era esperado, já que a Rapamicina é uma droga indutora de autofagia. No tratamento das células com URB597, a concentração de 15 nM sugere uma diminuição do número de células LC3b⁺, sendo provavelmente revertido na concentração de 60 nM. Na concentração de 30 nM de JZL184, também houve uma diminuição do número de células LC3b⁺. Na concentração de 500 nM de CBD e 30 nM de URB597 não haviam células no poço, certamente por um erro de manuseio durante a execução da técnica.

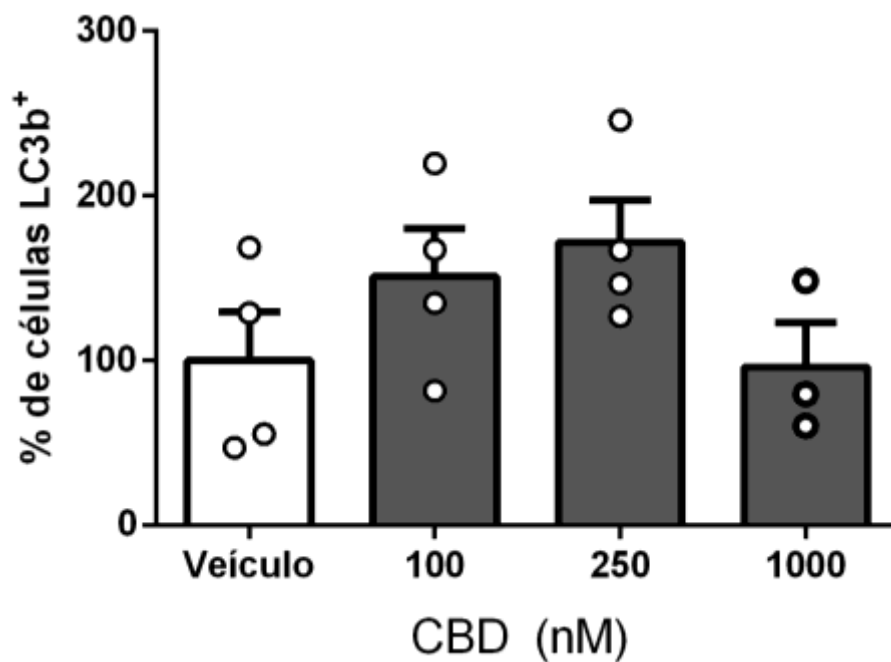


Figura 5: % de células HiB5 LC3b⁺ quando tratadas com diferentes concentrações de Canabidiol. Após o tratamento com 100, 250 e 1000 nM de CBD, as células foram analisadas conforme a expressão do marcador autofágico LC3b (n=1 por grupo; 4 campos/poço). Valores estão representados como Média ± EPM e foram normalizados pelo veículo.

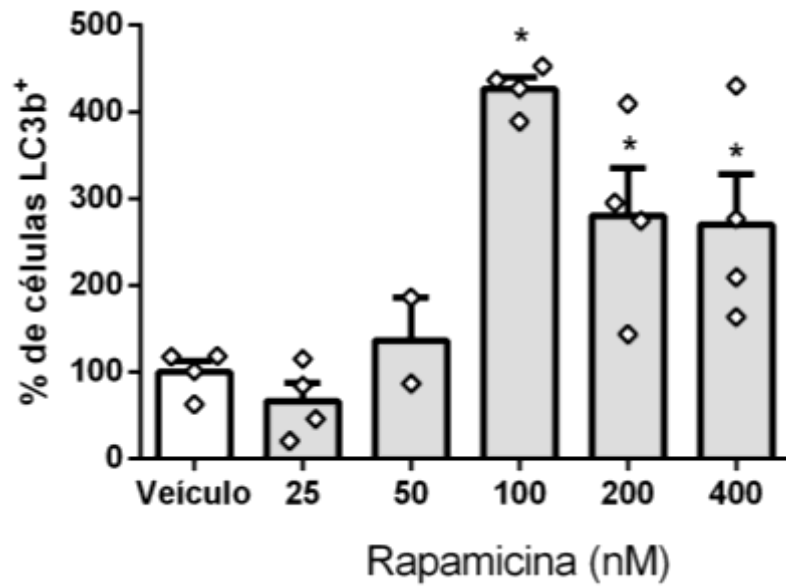


Figura 6: % de células HiB5 LC3b⁺ quando tratadas com diferentes concentrações de Rapamicina. Após o tratamento com 25, 50, 100, 200 e 400 nM de CBD, as células foram analisadas conforme a expressão do marcador autofágico LC3b (n=1 por grupo; 4 campos/poço). Valores estão representados como Média ± EPM e foram normalizados pelo veículo. ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Duncan e Dunnett. (*) indica $p < 0.05$ em relação ao grupo veículo ($F_{(5,16)} = 12.745$, $p = 0.001$).

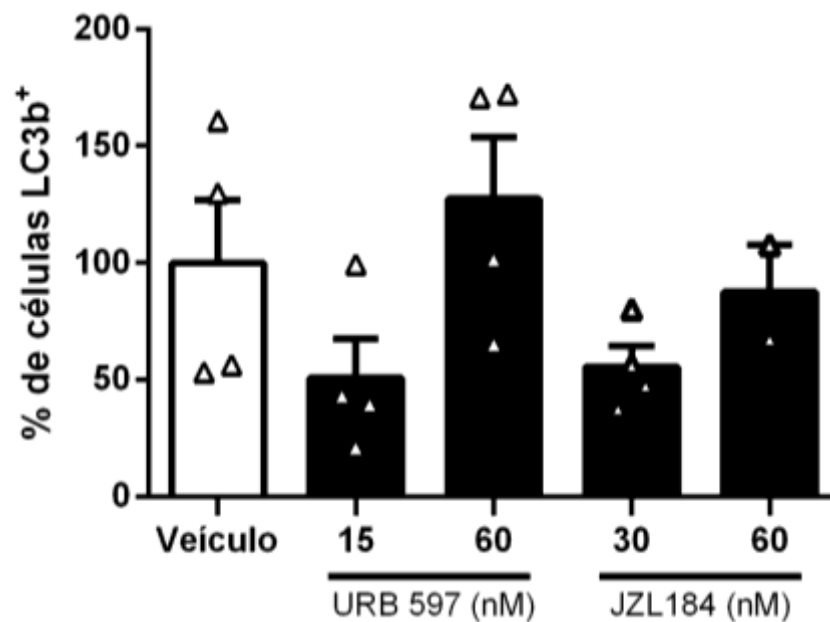


Figura 7: % de células HiB5 LC3b⁺ quando tratadas com diferentes concentrações de URB597 e JZL184. Após o tratamento com 15 e 60 nM de URB597 e 30 e 60 nM de JZL184, as células foram analisadas conforme a expressão do marcador autofágico LC3b (n=1 por grupo; 4 campos/poço). Valores estão representados como Média ± EPM e foram normalizados pelo veículo. ANOVA de uma via seguido de *post-hoc* de Duncan e Dunnett.

4.4. EXPERIMENTO 4 – EFEITO DO TRATAMENTO COM CBD, RAPAMICINA E URB NA EXPRESSÃO DE MEDIADORES DO PROCESSO AUTOFÁGICO

4.4.1 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTEICA DE MTOR E SUA FORMA FOSFORILADA

Através da técnica de *Western Blot*, foi possível avaliar o perfil de expressão da proteína mTOR e de sua forma fosforilada no resíduo 473, importante para o fluxo autofágico uma vez que a inibição desta leva ao início da autofagia, perante o tratamento com Canabidiol (250 nM), Rapamicina (250 nM) e URB597 (50 nM) durante 5', 30', 1h, 2h e 24h. A Figura 2 demonstra que o tratamento com CBD na concentração de 250 nM aumentou, em todos os tempos, a taxa pmTOR/mTOR, ao passo em que a Rapamicina foi capaz de diminuí-la. Ainda, o tratamento com URB597 teve um considerável aumento após 2h o tratamento.

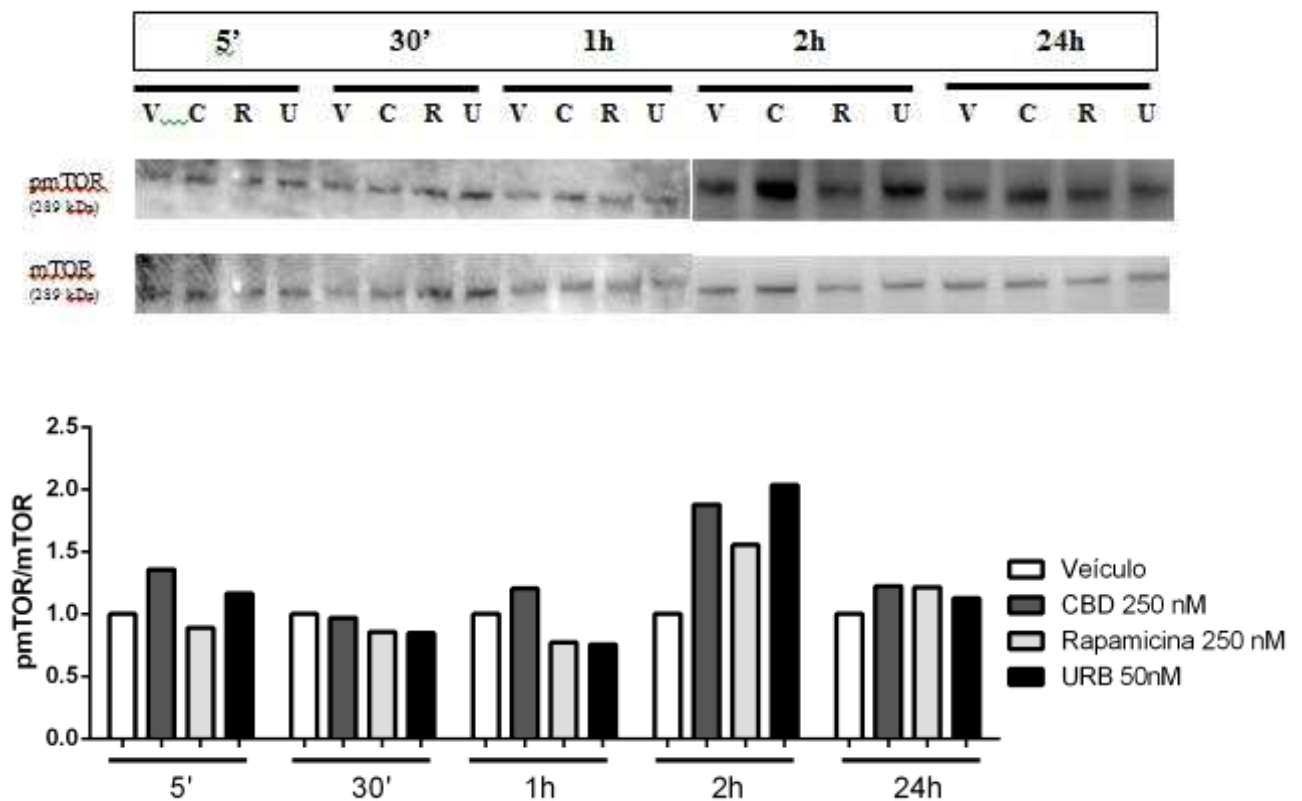


Figura 2: Expressão relativa dos níveis de pmTOR e mTOR em cultura de células HiB5. Após o tratamento com CBD (250 nM), Rapamicina (250 nM) e URB597 (50 nM) por 5', 30' 1h, 2h e 24h, avaliou-se o perfil de expressão destas proteínas através da relação entre elas. (n=1 por experimento). V significa Veículo; C, Canabidiol; R, Rapamicina e U, URB 597.

4.4.2. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO PROTEICA DE LC3B

Também pela técnica de WB, avaliou-se o nível de expressão da proteína LC3b, importante marcador autofágico por associar-se ao autofagossomo, sobre os mesmos tratamentos de Canabidiol (250 nM), Rapamicina (250 nM) e URB597 (50 nM) durante 5', 30' 1h, 2h e 24h. A Figura 3 demonstra a diminuição do nível de expressão de LC3b em todos os tempos após o tratamento com CBD 250 nM, sugerindo que nesta concentração, não há expressão significativa de LC3b. O tratamento com Rapamicina, na concentração de 250 nM se manteve alto a partir de 30 minutos e se mostrou expressivo após 2h do tratamento, sendo este o pico de expressão. O URB597, por sua vez, mostrou aumentar os níveis de expressão de LC3b 30 minutos e 24h após o tratamento.

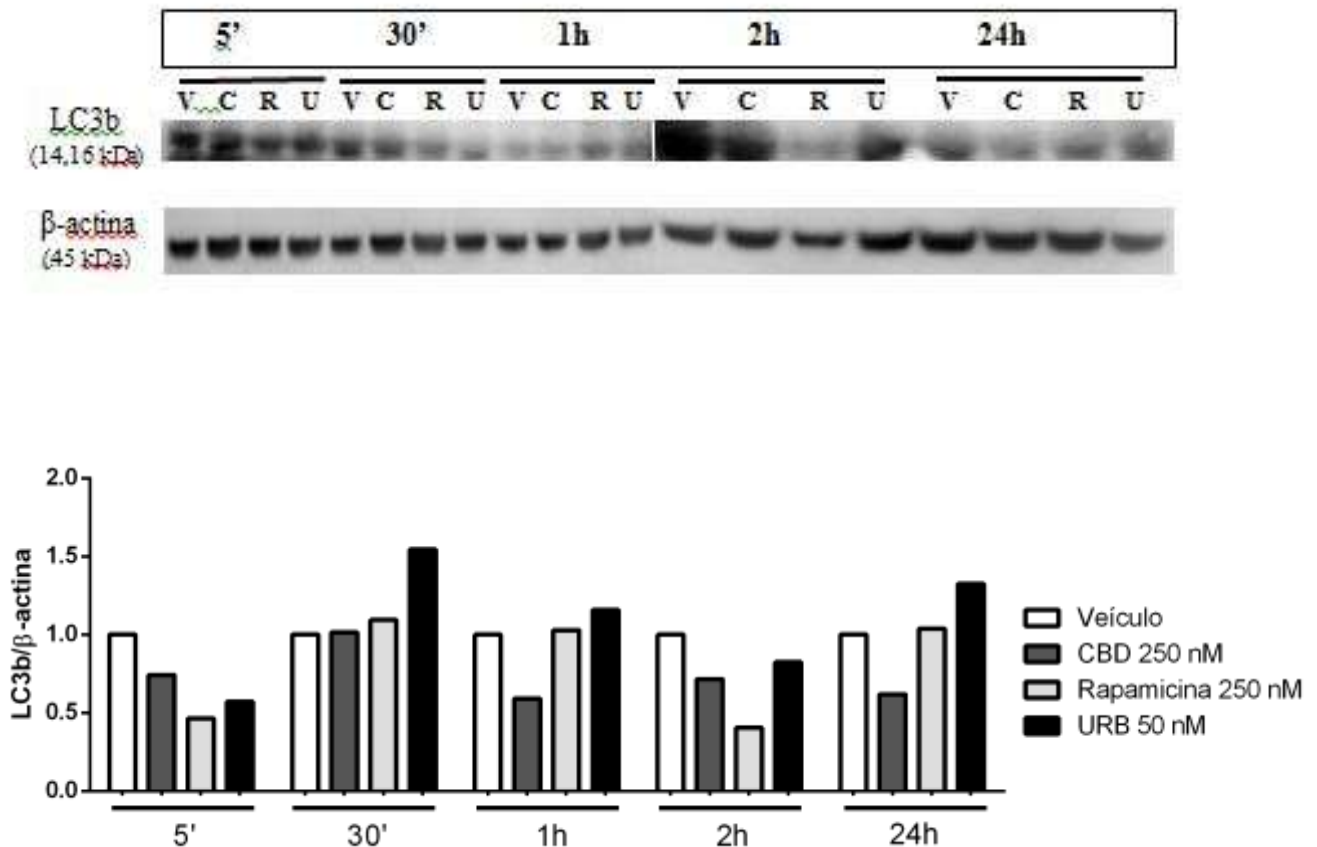


Figura3: Expressão relativa dos níveis de LC3b em cultura de células HiB5. Após o tratamento com CBD (250 nM), Rapamicina (250 nM) e URB597 (50 nM) por 5', 30' 1h, 2h e 24h, avaliou-se o perfil de expressão desta proteína. (n=1 por experimento). V significa Veículo; C, Canabidiol; R, Rapamicina e U, URB 597.

4.5. EXPERIMENTO 5 – VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM HIB5 APÓS EXPOSIÇÃO AO CBD, RAPAMICINA E URB.

A figura 4 mostra o efeito do tratamento de células HiB5 em meio contendo Canabidiol, Rapamicina e URB597. A análise dos dados pela ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do tratamento sobre a sobrevivência das células ($F_{5,66}=19,128$, $p<0,05$). O teste post hoc de Dunnet mostrou que a Rapamicina nas concentrações de 250 e 500 nM, e URB597 na concentração de 50 nM reduziram significativamente a sobrevivência das células HiB5 comparadas com as células tratadas com veículo.

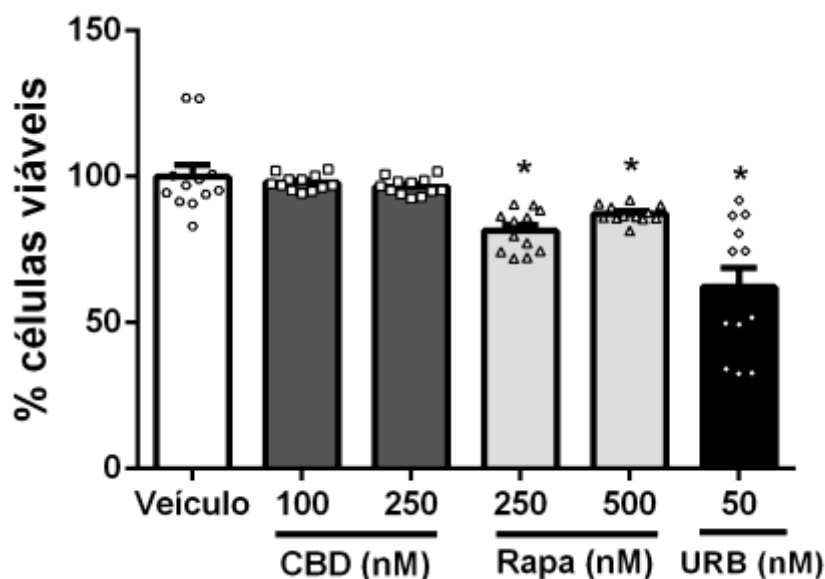


Figura 4: % de células HiB5 viáveis sobre o tratamento com diferentes drogas. Usando diferentes concentrações de Canabidiol, Rapamicina e URB597, avaliou-se o perfil de sobrevivência das células HiB5 (n=1 por grupo; 4 campos/poço). Valores estão representados por Média±EPM e estão normalizados pelo controle. O experimento foi realizado em quadruplicata. (*) indica $p<0.05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA de uma via, seguido de post-hoc de Dunnet).

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o tratamento *in vitro* com CBD na concentração de 100 nM aumentou a relação de células GFAP⁺/Nestina⁺, sugerindo que uma porcentagem maior de células permaneceu na fase 1, a qual há a expressão exclusiva de GFAP, e não prosseguiu para a fase 2a, caracterizada pela expressão de Nestina, que é expressa tanto na fase 1 quanto na fase 2a. Além disso, nesta mesma concentração de CBD, houve diminuição do número de células BrdU positivas, demonstrando a diminuição da proliferação celular nesta concentração, ao mesmo tempo que a quantidade de células viáveis não se alterou. Dessa maneira, estes dados sugerem que esta concentração de CBD não é capaz de gerar o processo neurogênico. Na concentração de 250 nM de CBD, houve um aumento da porcentagem de células BrdU positivas, demarcando um aumento na proliferação celular ao mesmo tempo em que a viabilidade celular e a relação GFAP⁺/Nestina⁺ se aproximou do veículo.

Normalmente, o que se espera de um tratamento com uma droga é que ela possua uma dose (modelo *in vivo*) ou uma concentração (*in vitro*) que exiba seu efeito máximo. A partir de uma determinada dose/concentração, a droga atinge um platô que não corresponde mais ao ganho terapêutico proporcional, como a farmacodinâmica indica. O sistema endocanabinoide, como demonstrado pelo tratamento com CBD, não segue este perfil. Observando os experimentos de imunocitoquímica (com marcação para GFAP e Nestina, para LC3b e para BrdU), percebe-se que, nas concentrações empregadas, há o perfil de “U invertido”, sugerindo, portanto, esta associação. Para ratificar esta possível associação, deve-se realizar um ensaio de viabilidade celular com as mesmas concentrações de CBD empregadas nos experimentos anteriores (100, 250, 500 e 1000 nM), bem como repetir os próprios experimentos, para verificar se este efeito volta a ocorrer.

Estudos feitos por Campos et al (2013) demonstraram que um possível mecanismo para os efeitos pró-neurogênicos do CBD seria facilitar a neurotransmissão canabinoide mediada pelos receptores CB1 e CB2. Dessa forma, o tratamento das células progenitoras neurais com os respectivos antagonistas destes receptores aboliram o aumento da proliferação celular induzida pelo CBD (Campos et al., 2013; Fogaça, 2016). Ainda, os receptores CB1 e CB2 parecem modular a proliferação e diferenciação de neurônios, sendo que agonistas de receptores CB1, como anandamida, induziram aumento da proliferação neuronal e

neurogênese em estudos *in vivo* e *in vitro* (Jiang et al., 2007; Aguado et al., 2005; 2007; Marchalant et al., 2009); e a ativação de receptores CB2 *in vitro* promoveu a proliferação de células progenitoras neurais (Palazuelos et al., 2006; Molina-Holgado et al., 2007). Alguns desses efeitos foram abolidos em animais *knockout* para esses receptores (Aguado et al., 2005; 2006; 2007; Palazuelos et al., 2006). Entretanto, a literatura reporta resultados contraditórios principalmente em se tratando de receptores CB1, indicando que o papel do sistema endocanabinoide na neurogênese hipocampal adulta parece ocorrer de uma forma distinta e complexa (Galve-Roperh et al., 2008). Além disso, Aguado e colaboradores demonstraram que o CBD, bem como os endocanabinoides, podem promover seus efeitos proliferativos através da via da PI3K/Akt/mTOR (Aguado et al., 2005). Assim a influência do sistema endocanabinoide nos diferentes estágios da neurogênese necessita ser mais bem elucidado (Fogaça, 2016).

Além dos possíveis mecanismos descritos, resultados *in vitro* indicam que o CBD inibe a enzima FAAH (Bisogno et al., 2001; De Petrocellis et al., 2011) e aumenta os níveis endógenos de endocanabinóides como a anandamida no hipocampo de camundongos estressados (Campos et al., 2013). Considerado que os efeitos pró-neurogênicos do CBD dependem da ativação de receptores CB1 e CB2 e que o CBD apresenta baixa afinidade por esses receptores (Thomas et al., 2007), o presente estudo buscou investigar se os efeitos da droga poderiam ser indiretos, mediados pela inibição da enzima FAAH com o consequente aumento de endocanabinoides. As células HiB5 foram tratadas com a droga URB597, inibidor da enzima FAAH, na concentração de 50 nM por 24h e os resultados da imunocitoquímica e do MTT demonstraram que houve diminuição do número de células BrdU⁺, bem como da % de células viáveis. Esta concentração de URB597 parece exercer um efeito tóxico sobre as células, uma vez que com a inibição da FAAH há um consequente aumento dos níveis do endocanabinoide anandamida, que é capaz de se ligar não só a receptores CB1, mas também a receptores de potencial transiente vaniloides do tipo 1 (TRPV1), exercendo citotoxicidade (Cernak et al., 2004). Apesar do mecanismo de ação do CBD, bem como dos endocanabinoides, ainda não estar totalmente elucidado (Cordeiro et al., 2014), é provável que eles possam se ligar e modular vários receptores concomitantemente, como exemplo de alguns os TRPV1, TRPV2, TRPA, nos quais atuam como agonista (Costa et al., 2004). Essa amplitude de potenciais alvos moleculares do CBD é dependente da concentração, cujo efeito poderá ser de inibição/bloqueio ou aumento da atividade de alguns dos tipos de receptores (Devinsky et al., 2014). O *knockout* do receptor CB1 em animais tratados com URB597

demonstrou a depleção do processo neurogênico (Gonçalves et al., 2008) ao mesmo tempo em que a inibição da enzima FAAH promove a proliferação celular (Palazuelos et al., 2006).

Ainda visando o estudo dos efeitos pró-neurogênicos dos endocanabinoides, as células foram tratadas com URB597 nas concentrações de 15, 30 e 60 nM. Nas duas primeiras concentrações, houve aumento “espelhado” da taxa de células GFAP⁺/Nestina⁺. Este resultado demonstra que as concentrações de 15 e 30 nM parecem não exercer efeito significativo sobre as HIB5. Além disso, as células HiB5 foram tratadas com JZL184, um inibidor da enzima MAGL, nas concentrações de 15, 30 e 60 nM, sendo a concentração de 30 nM sugestiva a promover os efeitos pró-neurogênicos, já que houve, ao contrário das demais concentrações, uma diminuição da relação GFAP⁺/Nestina⁺. Tendo em vista que a ativação de receptores CB1 e CB2 recruta vias proteicas importantes, investigamos se os efeitos do CBD poderiam envolver cascatas intracelulares que modulam os processos de proliferação. Uma das vias que parece estar bastante envolvida neste processo é a da mTOR, a qual pode ser modulada por meio da atividade de diversas quinases, como a Akt. Por outro lado, a ativação da mTOR resulta na inibição da autofagia, processo importante para assegurar a sobrevivência celular. Recentemente, estudos sugerem que a autofagia exerce um papel importante na neuroproteção no SNC (Fogaça, 2016) e é necessária para o remodelamento de dendritos e axônios, bem como para a manutenção da plasticidade no SNC (Komatsu et al., 2007; Pickford et al., 2008; Wang et al., 2006).

Neste trabalho, os experimentos de *Western Blot* visaram avaliar a expressão da razão pmTOR/mTOR perante o tratamento com CBD, Rapamicina e URB597 durante 5 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 24 horas. O tratamento com CBD 250 nM levou ao aumento dos níveis da razão pmTOR/mTOR ao longo do tempo, com a maior expressão após 2h de tratamento. Em contrapartida, os dados acerca da expressão de LC3b, proteína que participa da formação do autofagossomo se mostraram opostos, com a diminuição da expressão com o decorrer do tempo. Este resultado parece indicar que o tratamento com CBD induz neuroproteção, uma vez que esta droga também é capaz de aumentar os níveis de expressão da proteína Beclin-1 (Fogaça, 2016), a qual controla o início da autofagia e apresenta um papel crítico na manutenção da homeostase (Salminen et al., 2013). Para verificar este fato, necessitamos de avaliar o perfil de Beclin-1 nas mesmas condições de tratamento e tempo, a fim de melhor elucidar a sua participação no processo neurogênico.

É bem conhecido que os canabinoides, via ativação de receptores CB1 e CB2 modulam a macroautofagia por meio de cascatas intracelulares envolvendo mTOR ou diretamente estabilizando o lisossomo (Hiebel e Behl, 2015). Animais *knockout* para receptores CB1 apresentam um aumento na formação do autofagossomo, provavelmente como um mecanismo compensatório à diminuição da capacidade de degradação lisossomal (Piyanova et al., 2013). Provavelmente este efeito pode ser obtido *in vitro*, mas com uma concentração maior que 250 nM de CBD, uma vez que os resultados encontrados na técnica de WB, para essa concentração, não foram capazes de indicar este achado.

Este trabalho avaliou o efeito da Rapamicina, um macrolídeo capaz de inibir a proteína mTOR e facilitar o fluxo autofágico, sobre a proliferação e a viabilidade celular. As concentrações utilizadas, que foram 250 e 500 nM, demonstraram que há um leve e significativo declínio na viabilidade celular, sobretudo na concentração de 500 nM, enquanto houve uma tendência à significância para o aumento do número de células BrdU⁺ nesta mesma concentração. Estes dados indicam que a autofagia, nestas concentrações, pode participar do processo pro-proliferativo *in vitro* de células tronco neurais. Ainda foi avaliado o perfil de expressão de LC3b nas células HiB5 em decorrência do tratamento com diferentes concentrações de CBD, Rapamicina, URB597 e JZL184. Nas concentrações de 100 e 250 nM de CBD, houve aumento do número de células LC3b⁺, sugerindo, junto a análise da quantidade de células BrdU⁺ para o mesmo tratamento, também aumentada, que pode haver uma correlação entre o processo neurogênico e o processo autofágico. Os dados apresentados pelo WB se mostram contrários ao que a imunocitoquímica demonstrou e, por isso, é necessário refazer os experimentos afim de se obter um n amostral maior e, consequentemente, fazer uma análise estatística.

A concentração de 60 nM de URB597 demonstrou um aumento na porcentagem de células LC3b positivas, mas, em associação com os achados na técnica de MTT e na imunocitoquímica para BrdU⁺, pode haver uma forte ligação entre o processo autofágico como facilitador da morte neuronal. A execução da técnica de TUNEL se faz necessária para averiguar se realmente está acontecendo o processo de morte celular por apoptose, bem como seria possível realizar a técnica de WB para proteínas como Bcl-2, Bax e Caspases. Finalmente, o tratamento com as concentrações de 30 e 60 nM de JZL184 sugere uma diminuição na quantidade de células LC3b positivas, se afastando dos achados da imunocitoquímica para GFAP⁺/Nestina⁺.

Finalmente, o tratamento com URB597 50 nM, como discutido anteriormente, possivelmente provocou toxicidade às células HiB5, com a técnica de WB corroborando tal possibilidade, uma vez que há um expressivo aumento da expressão de LC3b 30 minutos e, novamente, 24h após o tratamento com esta droga. Este resultado sugere que as células podem ter usado o processo autofágico não para a sobrevivência celular, mas sim para a degradação celular, fato este que pode ser corroborado pelo aumento na expressão da razão pmTOR/mTOR após 2h do tratamento.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o tratamento com CBD adicionam inconclusões sobre os efeitos do CBD, rapamicina, URB e JZL sobre a proliferação das células HIB5. Dentro dessa perspectiva novos experimentos são necessários em condições experimentais mais controladas além de testar os possíveis mecanismos sinérgicos dos canabinóides e a rapamicina (concentrações inefetivas). Devemos ainda estudar o envolvimento dos receptores CB1 e CB2 além de inibidores da macroautofagia, como o 3-metiladenina (3-MA) e a cloroquina.

Necessário ressaltar que no decorrer do desenvolvimento desse projeto, assim como em vários outros, enfrentamos problemas experimentais decorrentes da experimentação científica. Por esse motivo, sugerimos aos leitores desse trabalho que interpretem com cuidado os achados desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- Aguado T, Monory K, Palazuelos J, Stella N, Cravatt B, Lutz B, Marsicano G, Kokaia Z, Guzmán M, Galve-Roperh I. The endocannabinoid system drives neural progenitor proliferation. *FASEB J.* 19(12):1704-6, 2005.
- Altman, J., and Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 724, 319-336.
- Altman J, Das GD (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol.* 1965 Jun;124(3):319-35.
- Altman J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol.* 1969 Jul;136(3):269-93.
- Altman J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 1969 Dec;137(4):433-57.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P. The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). World Health Organization. Neuroscience of psychoactive substance use and dependence. *Prog Brain Res*, 2007; 163:3-22.
- Azari H, Reynolds BA. In Vitro Models for Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2016;8(6):a021279.
- Bayer, S. A. (1980). Development of the hippocampal region in the rat. I. Neurogenesis examined with PH]thymidine autoradiography. *J. Comp. Neural.* 190, 87-114.

Boya P, Mellén M A, de la Rosa E J. How autophagy is related to programmed cell death during the development of the nervous system. *Biochem Soc Trans.* 2008 Oct;36(Pt 5):813-7.

Cameron, H.A.; Woolley, C.S.; MCewen, B.S.; Gould, E. (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neurosci*, 56:337-344.

Campolongo, P., Roozendaal, B., Trezza, V., Hauer, D., Schelling, G., McGaugh, J. L., et al. (2009). Endocannabinoids in the rat basolateral amygdala enhance memory consolidation and enable glucocorticoid modulation of memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4888–4893.

Campolongo, P., Trezza, V., Ratano, P., Palmery, M., & Cuomo, V. (2011). Developmental consequences of perinatal cannabis exposure: Behavioral and neuroendocrine effects in adult rodents. *Psychopharmacology (Berlin)*, 214(1), 5–15.

Campos, A. C.; Fogaça, M. V.; Sonogo, A. B.; Guimarães, F. S. Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric. *Pharmacological Reserarch.* 2016 Oct; 112:119-127.

Cordeiro Pedrazzi, J. F.; De Castro Issy Pereira, A. C.; Gomes, F. V.; Del Bel, E. Perfil antipsicótico do canabidiol. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2014, 47, 112.

Costa L, Amaral C, Teixeira N, Correia-da-Silva G, Fonseca BM. Cannabinoid-induced autophagy: Protective or death role? *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2016 Jan;122:54-63. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2015.12.006. Epub 2015 Dec 28.

Costa B, Giagnoni G, Franke C, Trovato AE, Colleoni M. Vanilloid TRPV1 receptor mediates the antihyperalgesic effect of the nonpsychoactive cannabinoid, cannabidiol, in a rat model of acute inflammation. *British Journal of Pharmacology.* 2004;143(2):247-250.

Damme M, Suntio T, Saftig P, Eskelinen EL. Autophagy in neuronal cells: general principles and physiological and pathological functions. *Acta Neuropathol.* 129(3):337-62, 2015.

Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA (2003). Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460:563–72.

DEVANE, W.A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R.G., STEVENSON, L.A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A. & MECHOULAM, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, 258, 1946–1949

Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. (2008). Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*; 18:108 –15.

Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313–1317

Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisén J. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. 2014 Feb 27;156(5):1072-83.

Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna GI, Latina V, De Filippis D, Cipriano M, Carratù M.R, Iuvone T, Steardo L. Cannabidiol reduces A-induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPARinvolvement. *PLoS One*. 6(12): e28668, 2011.

Fernandez-Ruiz, J., Berrendero, F., Hernandez, M. L., & Ramos, J. A. (2000). The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends in Neurosciences*, 23(1), 14–20.

Fogaça, M. V. Mecanismos envolvidos nos efeitos comportamentais e pró-neurogênicos da administração repetida do canabidiol em camundongos submetidos ao estresse crônico variável. *Dissertação Universidade de São Paulo*, 2016.

Galve-Roperh I, Palazuelos J, Aguado T, Guzmán M. The endocannabinoid system and the regulation of neural development: potential implications in psychiatric disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2009 Oct;259(7):371-82. Epub 2009 Jul 9.

Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience*, 1999; 2:260-265.

Guo-li Ming and Hongjun Song. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*. 2011 May 26; 70(4): 687–702.

Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci*. 2007;25:81–86.

Hosseinzadeh M, Nikseresht S, Khodaghali F, Naderi N, Maghsoudi N. Cannabidiol Post- Treatment Alleviates Rat Epileptic-Related Behaviors and Activates Hippocampal Cell Autophagy Pathway Along with Antioxidant Defense in Chronic Phase of Pilocarpine- Induced Seizure. *J Mol Neurosci*. [Epub ahead of print], 2016.

Huang W-J, Chen W-W, Zhang X. Endocannabinoid system: Role in depression, reward and pain control (Review). *Molecular Medicine Reports*. 2016;14(4):2899-2903.

Jack A Prenderville, Áine M Kelly, and Eric J Downer. The role of cannabinoids in adult neurogenesis *Br J Pharmacol*. 2015 Aug; 172(16): 3950–3963.

Jiang S, Fu Y, Williams J, Wood J, Pandarinathan L, Avraham S, Makriyannis A, Avraham S, Avraham HK. Expression and function of cannabinoid receptors CB1 and CB2 and their cognate cannabinoid ligands in murine embryonic stem cells. *PLoS One*. 2(7):e641, 2007.

Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27:447–452.

Kempermann, G., Song, H. e and Gage, F. H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Hardor Perspectives in Biology*, 7 (9).

Knowles, W.D. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J Clin Neurophysiol*.1992; 9(2):252-63.

Koay LC, Rigby RJ, Wright KL. Cannabinoid-induced autophagy regulates suppressor of cytokine signaling-3 in intestinal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 307(2):G140-8, 2014.

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature.* 2006 Jun 15;441(7095):880-4. Epub 2006 Apr 19.

Kornack DR, Rakic P. (1999). Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5768–5773

Kronenberg G, Reuter K, Steiner B, Brandt MD, Jessberger S, Yamaguchi M, Kempermann G.(2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol*; 467: 455–63

Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH.(1997) Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17:5820–5829.

Lange C.; Mix E.; Frahm J.; Glass A.; Muller J.; Schmitt O.; Schmole A. C.; Klemm K.; Ortinau S.; Hubner R.; Frech M. J.; Wree A.; Rolfs A. (2011) Small molecule GSK-3 inhibitors increase neurogenesis of human neural progenitor cells. *Neurosci. Lett.* 488, 36–40.

Laplane, M. and Sabatini, DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012 Apr 13;149(2):274-93.

Martin BR, Mechoulam R & Razdan RK (1999). Discovery and characterization of endogenous cannabinoids. *Life Sciences*, 65: 573-595.

Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev.* 18(4):423-34, 2004.

Morena, M.; Campolongo, P. *Neurobiology of Learning and Memory* 112 (2014) 30–43

M Yazdankhah, S Farioli-Vecchioli, AB Tonchev, A Stoykova and F Cecconi. The autophagy regulators Ambra1 and Beclin 1 are required for adult neurogenesis in the brain subventricular zone. *Cell Death and Disease* (2014) 5, e1403;

Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo L M, Quintanilla-Vega B, Pappa A, Panayiotidis M I, Franco R. (2014) Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Jul 1;21(1):66-85

Nikoletopoulou V, Papandreou M E, Tavernarakis N. (2015). Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death Differ*. 2015 Mar;22(3):398-407. doi: 10.1038/cdd.2014.204. Epub 2014 Dec 19.

Onaivi, E. S., Ishiguro, H., Gong, J. P., Patel, S., Perchuk, A., Meozzi, P. A., et al. (2006).

Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1074, 514–536.

Palazuelos J, Aguado T, Egia A, Mechoulam R, Guzmán M, Galve-Roperh I. Non-psychoactive CB2 cannabinoid agonists stimulate neural progenitor proliferation. *FASEB J*. 20(13):2405-7, 2006.

Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donzé O, Lin TA, Lawrence JC Jr, Sonenberg N. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*. 371(6500):762-7, 1994.

Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacological Reviews*. 2010;62(4):588-631.

Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992 Mar 27;255(5052):1707-10.

Renfranz PJ, Cunningham MG, McKay RD. Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell*. 1991 Aug 23;66(4):713-29.

Ryskalin, L.; Limanaqi, F.; Biagioni, F.; Frati, A.; Esposito, V.; Teresa Calierno, M.A.; Lenzi, P.; Fornai, F. (2016). The emerging role of m-TOR up-regulation in brain Astrocytoma. *Histology and histopathology*, 2016. 32. 11835.

Saitoh M, Pullen N, Brennan P, Cantrell D, Dennis PB, Thomas G. Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site. *J Biol Chem*. 277(22):20104-12, 2002.

Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ*. 2008 Aug;15(8):1318-29.

Seki T, Arai Y. (1993) Highly polysialylated neural cell adhesion molecule (NCAM-H) is expressed by newly generated granule cells in the dentate gyrus of the adult rat. *J Neurosci* 13:2351–2358.

Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 2001; 410:372-376.

Shrivastava A, Kuzontkoski PM, Groopman JE, Prasad A. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther*. 2011 Jul;10(7):1161-72. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-1100. Epub 2011 May 12.

Song, Juan; Kimberly. Modification of hippocampal circuitry by adult neurogenesis. *Developmental neurobiology*. 2012. Jul 1;72 (7): 1032–1043.

Stella, N.; Schweitzer, P.; Piomelli, D.; A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 388. 1997, Aug: 773-778.

Sugiura T1, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Oct 4;215(1):89-97.

Szabo B, Schlicker E. Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol*. 2005;(168):327-65.

Teixeira, LCM. Exercício físico, neurogênese e memória. Dissertação Universidade de São Paulo, 2013.

Todde V, Veenhuis M, J Ida, der Klei V. Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. V. 1792, Issue 1, January 2009, Pages 3-13.

Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 2002; 415:1030-1034.

Van Sickle, M. D., Duncan, M., Kingsley, P. J., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K., et al. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science*, 310(5746), 329–332.

Xi Y, Dhaliwal J S, Ceizar M, Vaculik M, Kumar K L, Lagace D C. (2016) Knockout of Atg5 delays the maturation and reduces the survival of adult-generated neurons in the hippocampus. *Cell Death Dis*. 2016 Mar 3;7:e2127.

Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci*. 2015 Dec;72(24):4721-57

Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296: 678-682

Wolf SA, Bick-Sander A, Fabel K, Leal-Galicia P, Tauber S, Ramirez-Rodriguez G, Müller A, Melnik A, Waltinger TP, Ullrich O, Kempermann G. Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cell Commun Signal*. 8:12, 2010.

Yang Y P, Liang Z Q, Gu Z L, Qin Z H. (2005) Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin*. 2005 Dec;26(12):1421-34.

Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH.(2006) Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*. 26:3–11.