

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Neurociências**

Luan Alves Pereira

**EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE O REGULADOR DE CRESCIMENTO  
NEURONAL 1 E O RECEPTOR METABOTRÓPICO DE GLUTAMATO 5 SOBRE A  
SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO E A SOBREVIVÊNCIA NEURONAL**

Belo Horizonte

2025

Luan Alves Pereira

**EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE O REGULADOR DE CRESCIMENTO  
NEURONAL 1 E O RECEPTOR METABOTRÓPICO DE GLUTAMATO 5 SOBRE A  
SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO E A SOBREVIVÊNCIA NEURONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiola Mara Ribeiro

Coorientadora: Dra. Jennifer Diniz Guimarães

Belo Horizonte

2025

043

Pereira, Luan Alves.

Efeitos da interação entre o Regulador de Crescimento Neuronal 1 e o Receptor Metabotrópico de Glutamato 5 sobre a sinalização de cálcio e a sobrevivência neuronal [manuscrito] / Luan Alves Pereira. – 2025.

71 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiola Mara Ribeiro. Coorientadora: Dra. Jennifer Diniz Guimarães.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Receptor de Glutamato Metabotrópico 5. 3. Fatores de Crescimento Neural. 4. Cálcio. I. Ribeiro, Fabiola Mara. II. Guimarães, Jennifer Diniz Soares. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Efeitos da interação entre o Regulador de Crescimento Neuronal 1 e o Receptor Metabotrópico de Glutamato 5 sobre a sinalização de cálcio e a sobrevivência neuronal**

**LUAN ALVES PEREIRA**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS BÁSICAS.

Aprovada em 07 de março de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Jennifer Diniz Soares Guimarães  
UFMG

Profa. Juliana Alves da Silva  
UFMG

Profa. Luciene Bruno Vieira  
UFMG

Profa. Fabiola Mara Ribeiro - Orientadora  
UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Jennifer Diniz Soares Guimarães, Usuária Externa**, em 14/04/2025, às 14:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola Mara Ribeiro, Professora do Magistério Superior**, em 14/04/2025, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Luciene Bruno Vieira, Professora do Magistério Superior**, em 14/04/2025, às 16:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Alves da Silva, Professora do Magistério Superior**, em 14/04/2025, às 17:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4134486** e o código CRC **8310641C**.

---

Dedico este trabalho a todas as crianças cientistas que assim como eu sonham em desvendar o Universo.

## AGRADECIMENTOS

É uma tarde de verão, eu me sento e permito vir à tona toda emoção que é concluir esse trabalho. Essa dissertação é a materialização de muitas lágrimas, sorrisos, superação e realizações. Eu saio depois dela uma nova pessoa. Aprendi muito nesse período, chorei e fui feliz. Agora, com lágrimas nos olhos, quero dizer o quão grato eu sou por essa conquista. Foram dois anos de muito crescimento pessoal e profissional. Eu, um simples menino do interior que sonhou com tudo isso, agora realizo o sonho de ser cientista. Agradeço a mim e a essa criança cujos olhos brilhavam ao entender a natureza. Hoje sou biólogo e mestre em Neurociências, estamos orgulhosos do que nos tornamos. Agradeço também à minha família que sempre forneceu o apoio que precisei. Obrigado, papai, mamãe e irmãozinho. Agradeço também os incontáveis tios e primos. Agradeço muito aos meus amigos, sem os quais a vida seria insuportável. Não vou nomeá-los para não correr o risco de deixar alguém de fora, mas vocês estão marcados em meu coração. Agradeço à UFMG e ao nosso laboratório (Neurobioquímica e RNAi) pelo apoio material e ótima convivência nesse tempo. Vivemos muita coisa juntos e conheci pessoas incríveis. Agradeço também à professora Fabíola Ribeiro, por ter topado essa aventura comigo. Em especial, quero agradecer a cada professor que passou pela minha vida, vocês me inspiraram. Ao escrever essa seção, vem à memória incontáveis pessoas pelas quais sou grato, mas não é possível mencionar todos. A vocês, meu agradecimento!

Sonho e escrevo em letras grandes de  
novo. Pelos muros do país.

João, o tempo andou mexendo com a  
gente, sim.

Comentário a respeito de John - Canção  
de Belchior (1978)

## RESUMO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central de mamíferos. Ele atua sobre os receptores ionotrópicos (iGluRs) e os metabotrópicos (mGluRs). O mGluR do tipo 5 (mGluR5), por meio da ativação da proteína Gαq/11-βγ, promove a liberação de Ca<sup>2+</sup> dos estoques intracelulares levando à ativação da quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2), que é importante para a sobrevivência neuronal. A NEGR1 é uma molécula de adesão celular fundamental para arborização e maturação neuronal e é capaz de ativar ERK1/2. Nosso grupo de pesquisa demonstrou a interação física entre mGluR5 e NEGR1. Este trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da interação entre mGluR5 e NEGR1 sobre a sinalização de Ca<sup>2+</sup> e a sobrevivência neuronal dependentes de receptores glutamato. Para isso, culturas primárias de neurônios de camundongos C57/Bl6 foram transduzidos com lentivírus contendo shControle ou shNEGR1, que promove o *knockdown* de NEGR1. A variação da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> foi avaliada mediante estímulo com agonista seletivo para mGluR5, (DHPG, 10 μM) ou glutamato (50 μM). O DHPG promoveu aumento da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, porém não houve diferença entre neurônios shControle e shNEGR1. Mediante estímulo de glutamato, a resposta de Ca<sup>2+</sup> foi significativamente menor em neurônios shNEGR1 comparado ao shControle. O receptor de N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) é um iGluR permeável a Ca<sup>2+</sup>. Por esse motivo, foram utilizados o modulador alostérico negativo de mGluR5, CTEP e o antagonista de NMDAR, MK-801. O CTEP e o MK-801, individualmente ou combinados, anulam a diferença da [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> observada entre neurônios shNEGR1 e shControle. Estes resultados sugerem que a NEGR1 participa na sinalização de Ca<sup>2+</sup> dependente de mGluR5 e NMDAR quando ambos estão simultaneamente ativos, porém não interfere na ativação seletiva de mGluR5. A fim de avaliar a sobrevivência neuronal, os neurônios foram submetidos a um insulto de glutamato (50 μM) por 24 horas, mimetizando uma condição de excitotoxicidade. Houve um aumento de morte celular de neurônios em shNEGR1 comparado ao shControle. Experimentos complementares foram realizados em cultura neuronal primária mGluR5<sup>-/-</sup>. Em neurônios shNEGR1 o aumento de morte neuronal foi significativamente maior comparado ao shControle, o que demonstra que tal diferença independe de mGluR5. Os dados apresentados sugerem que a NEGR1 é capaz de modular receptores de

glutamato, a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  e a morte neuronal. O efeito observado tem participação de mGluR5 e NMDAR. Portanto, a NEGR1 se apresenta como potencial alvo de investigação para o entendimento da homeostase e disfunções relacionadas ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Mais estudos são cruciais a fim de elucidar as consequências intracelulares da interação de NEGR1 sobre receptores de glutamato.

Palavras-chave: mGluR5; NEGR1; glutamato; cálcio; sobrevivência neuronal.

## ABSTRACT

Glutamate is the primary excitatory neurotransmitter in the central nervous system of mammals. It acts on ionotropic (iGluRs) and metabotropic (mGluRs) receptors. Type 5 metabotropic glutamate receptor (mGluR5), through the activation of the Gαq/11-βγ protein, promotes the release of Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores, leading to the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2), which is essential for neuronal survival. NEGR1 is a cell adhesion molecule crucial for neuronal arborization and maturation and is capable of activating ERK1/2. Our research group has demonstrated the physical interaction between mGluR5 and NEGR1. This study aims to evaluate the effects of the interaction between mGluR5 and NEGR1 on Ca<sup>2+</sup> signaling and neuronal survival dependent on glutamate receptors. For this purpose, primary cultures of C57/Bl6 mouse neurons were transduced with lentivirus containing either shControl or shNEGR1, which promotes NEGR1 knockdown. The variation in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was assessed upon stimulation with a selective mGluR5 agonist, (DHPG, 10 μM) or glutamate (50 μM). DHPG promoted an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, but no difference was observed between shControl and shNEGR1 neurons. Upon glutamate stimulation, the Ca<sup>2+</sup> response was significantly lower in shNEGR1 neurons compared to shControl. The N-Methyl-D-Aspartate receptor (NMDAR) is an iGluR permeable to Ca<sup>2+</sup>. For this reason, the negative allosteric modulator of mGluR5, CTEP, and the NMDAR antagonist, MK-801, were used. CTEP and MK-801, individually or in combination, abolished the difference in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> observed between shNEGR1 and shControl neurons. These results suggest that NEGR1 participates in Ca<sup>2+</sup> signaling dependent on mGluR5 and NMDAR when both are simultaneously active but does not interfere with the selective activation of mGluR5. To evaluate neuronal survival, neurons were subjected to a glutamate insult (50 μM) for 24 hours, mimicking an excitotoxicity condition. An increase in cell death was observed in shNEGR1 neurons compared to shControl. Complementary experiments were performed in mGluR5<sup>-/-</sup> primary neuronal cultures. In shNEGR1 neurons, the increase in neuronal death was significantly higher compared to shControl, demonstrating that this difference is independent of mGluR5. The data presented suggest that NEGR1 can modulate glutamate receptors, Ca<sup>2+</sup> signaling, and neuronal death. The observed effect involves mGluR5 and NMDAR. Therefore, NEGR1 emerges as a potential target for investigating Ca<sup>2+</sup> homeostasis and related

dysfunctions. Further studies are crucial to elucidate the intracellular consequences of NEGR1 interaction with glutamate receptors.

**Keywords:** mGluR5; NEGR1; glutamate; calcium; neuronal survival.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato e as subunidades que os compõem.

Figura 2 - Principais vias de sinalização celular ativadas por mGluR5.

Figura 3 - Estrutura química da NEGR1.

Figura 4 - Painel representativo da interação entre mGluR5 e NEGR1 em lisados de córtex e hipocampo.

Figura 5 - Genotipagem de camundongos knockout para o gene mGluR5.

Figura 6 - Níveis de RNAm de NEGR1 em neurônios shControle e shNEGR1.

Figura 7 - A variação da  $[Ca^{2+}]_i$  mediante estímulo com DHPG não difere entre shControle e shNEGR1.

Figura 8 - O estímulo de glutamato promove menor variação da  $[Ca^{2+}]_i$  na condição *knockdown* de NEGR1.

Figura 9 - O estímulo de glutamato promove aumento de morte celular em culturas *knockdown* para NEGR1.

Figura 10 - Fotomicrografias representativas do resultado do experimento de morte celular.

Figura 11 - O estímulo de glutamato promove aumento de morte celular em neurônios shNEGR1 em cultura knockout para mGluR5.

Figura 12 - Imagem representativa do resultado do experimento de morte celular em cultura knockout para mGluR5.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Iniciadores utilizados no PCR convencional para mGluR5.

Tabela 2 - Iniciadores utilizados no experimento de PCR em tempo real.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAM10: proteína contendo domínios de desintegrina e metaloproteinase

AKT: proteína quinase B

AMPA: receptor do ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazol propiônico

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico

ARC/ARG3.1: proteína regulada por atividade e associada ao citoesqueleto

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

CREB: proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc)

CTEP: 2-cloro-4- [2- [2,5-dimetil-1- [4- (trifluorometoxi) fenil] imidazol-4-il] etinil] piridina

DA: doença de Alzheimer

DAG: 1,2,-diacilglicerol

DHPG: (S)-3,5-dihidroxifenilglicina

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNA: ácido desoxirribonucleico

ERK1/2: quinase regulada por sinais extracelulares

FGFR2: receptor do fator de crescimento de fibroblastos 2

GDP: difosfato de guanosina

GPI: glicosilfosfatidilinositol

GTP: trifosfato de guanosina

G $\alpha$ - $\beta$  $\gamma$ : subunidade alfa, beta e gama da proteína G

Hek 293T: Human embryonic kidney 293T

iGluR: receptor ionotrópico de glutamato

IP3: inositol 1,4,5 trifosfato

IP3: inositol 1,4,5 trifosfato

LSAMP: Proteína de Membrana Associada ao Sistema Límbico

MAC: Molécula de Adesão Celular

MAC: moléculas de adesão celular

MAPKs: proteínas quinases ativadas por mitógenos

mGluR: receptor metabotrópico de glutamato

mGluR5: receptor metabotrópico glutamato do tipo 5

mTOR: alvo mamífero da rapamicina

NEGR1: Regulador de crescimento neuronal 1

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMDAR: receptor de N-metil-D-aspartato

NTM: Neurotrimina

OPCMC ou OBCAM:

PDK1/2: proteína quinase-1/2 dependente de proteína 3-fosfoinositida

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase

PIKE: propulsor fosfoinositídeo 3-quinase

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol-trifosfato

PKC: proteína quinase C

PLA2: fosfolipase A2

PLC: fosfolipase C

PLD: fosfolipase D

PP2B: fosfatase 2B

PSD-95: proteína pós-sináptica 95

RE: retículo endoplasmático

RNA: ácido ribonucleico

RNAm: ácido ribonucleico mensageiro

SNC: sistema nervoso central

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1 Sinalização de cálcio dependente de receptores de glutamato .....	18
1.2 Receptor metabotrópico de Glutamato do tipo 5 .....	21
1.3 Regulador de Crescimento Neuronal 1 .....	24
1.4 Interação entre NEGR1 e mGluR5 .....	26
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>28</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
4.1 Modelos animais .....	29
4.2 Genotipagem .....	30
4.2.1 Extração de DNA.....	30
4.2.2 Amplificação de DNA para identificação do mGluR5.....	30
4.3 Cultura primária de neurônios.....	32
4.4 Produção de vetores lentivirais.....	32
4.5 Transformação e crescimento de bactérias .....	33
4.6 Extração de DNA plasmidial .....	34
4.7 Cultivo e transfecção de células HEK 293T.....	35
4.8 Purificação.....	35
4.9 Transdução.....	36
4.10 RT-PCR quantitativo (RT-qPCR) .....	36
4.11 Quantificação da $[Ca^{2+}]_i$ .....	38
4.12 Quantificação da morte celular.....	39
4.13 Análise estatística.....	40
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
5.1 O knockdown de NEGR1 não afeta a sinalização de cálcio induzida pela ativação de mGluR5 por DHPG.....	40
5.2 O knockdown de NEGR1 diminui a sinalização de cálcio mediante estímulo de glutamato em alta concentração .....	42
5.3 O knockdown de NEGR1 promove aumento da morte celular mediante administração de glutamato .....	43
5.4 O mGluR5 não contribui para o aumento da morte neuronal induzida por insulto de glutamato em neurônios shNEGR1 .....	45
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>
<b>ANEXO I - Certificado da Comissão ética no uso de animais (CEUA)</b> .....	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

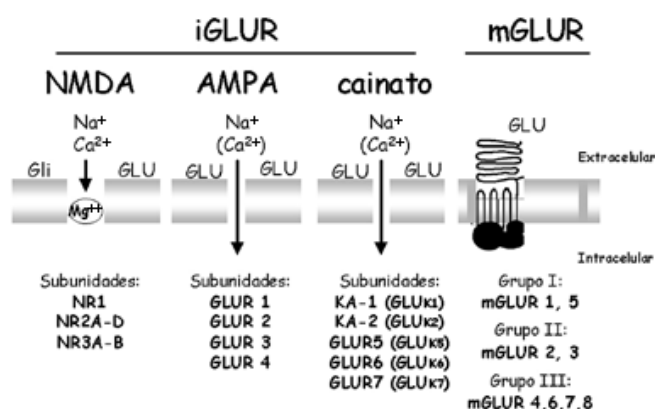
### 1.1 Sinalização de cálcio dependente de receptores de glutamato

O íon  $\text{Ca}^{2+}$  é essencial para a atividade celular, pois é um reconhecido segundo mensageiro. Em neurônios ele atua em processos como sinalização elétrica, liberação de neurotransmissores e regulação de enzimas (Augustine et al., 2003; Kawamoto et al., 2012; Simons, 1988; Toth et al., 2016). Os níveis citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  no repouso são mantidos em torno de 0,1 a 0,5  $\mu\text{M}$ , enquanto que no meio extracelular sua concentração é de aproximadamente 1 mM (Kawamoto et al., 2012). Esse nível basal é mantido por proteínas que se ligam ao  $\text{Ca}^{2+}$  ou pelo retículo endoplasmático e mitocôndria que sequestram  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol (Tymianski & Tator, 1996). O aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em contexto fisiológico é rapidamente revertido pela inativação dos receptores e a ativação do trocador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Mody, 1995). Em neurônios, receptores de membrana são especializados em transportar  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da célula, como por exemplo, os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de neurotransmissores, incluindo alguns receptores de glutamato (Traynelis et al., 2010; Woll & Van Petegem, 2022a).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (Hollmann & Heinemann, 1994; Monaghan et al., 1989). Ele é sintetizado a partir da glicose (via ciclo do ácido cítrico) em astrócitos e transportado para os neurônios ou pode ser o produto da hidrólise da glutamina pela enzima glutaminase (Hertz et al., 1999; Schousboe et al., 1997). Uma vez sintetizado, ele é armazenado em vesículas na região pré-sináptica e liberado na fenda sináptica em resposta a um potencial de ação. A concentração do glutamato na fenda sináptica é controlada por mecanismos de recaptção de glutamato pela célula pré-sináptica e células da glia (Danbolt, 2001; Hertz et al., 1999; Schousboe et al., 1997).

O glutamato atua sobre receptores classificados em 2 famílias (Figura 1): os receptores ionotrópicos (iGluRs) e receptores metabotrópicos (mGluRs) (Kim et al., 2020). Os receptores ionotrópicos de glutamato, mediante ativação, sofrem alteração

conformacional e abrem seu respectivo poro possibilitando a passagem de íons. O receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR), os de alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e os de cainato são alguns exemplos. O NMDAR possui maior permeabilidade a  $\text{Ca}^{2+}$ , mas também é permeável a  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (Wollmuth & Sakmann, 1998), enquanto que AMPAR possui maior permeabilidade a  $\text{Na}^+$ , embora também seja permeável a  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , a depender das subunidades que o compõem o receptor (Biedermann et al., 2021). Já os receptores de cainato são permeáveis principalmente a  $\text{Na}^+$ , mas também a  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (Weiss & Sensi, 2000). AMPAR e cainato estão relacionados ao disparo do potencial de ação, enquanto que NMDAR atua como detector de sincronização neuronal, promovendo plasticidade sináptica, processo dependente da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  (Traynelis et al., 2010).



**Figura 1 - Receptores ionotrópicos e metabotrópicos de glutamato e as subunidades que os compõem.** Os iGluR incluem NMDA, AMPA e cainato, permitindo a entrada de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ . Já os mGluR são acoplados à proteína G e divididos em três grupos: Grupo I (mGluR 1, 5), Grupo II (mGluR 2, 3) e Grupo III (mGluR 4, 6, 7, 8), que atuam via segundo mensageiros. Fonte: Carobrez, 2003.

A alta liberação de glutamato na fenda sináptica e a ativação prolongada de NMDAR promovem aumento exagerado de  $\text{Ca}^{2+}$  acima da capacidade de regulação do neurônio e geram estresse celular. Esse fenômeno é conhecido como excitotoxicidade e desencadeia uma cascata de sinalização prejudicial (Armada-Moreira et al., 2020; J. Olney, 2003; J. W. Olney, 1969). Como consequência, ocorre estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, alterações no metabolismo energético e na pressão osmótica da célula, podendo ocasionar morte neuronal (Choi, 1988; Neves et al., 2023; Tymianski & Tator, 1996). O fenômeno de excitotoxicidade compõe a fisiopatologia de diversas desordens do SNC, como isquemia, epilepsias, e doenças

neurodegenerativas como as Doenças de Alzheimer (DA) e de Huntington (DH) (Choi, 1988).

Além dos iGluRs, alguns mGluRs também impactam a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  no neurônio. Os mGluRs são compostos de três partes principais: Um domínio extracelular (amino-terminal), onde se encontra o sítio de ligação ao glutamato e a outros agonistas. Após a porção amino terminal, há um domínio rico em cisteínas (80 resíduos e 9 cisteínas), fundamental para o modo de ativação do receptor e que permite a formação de dímeros por pontes dissulfeto. Em seguida, 7 alças transmembrana acoplam o receptor à membrana plasmática e fazem a conexão entre a porção intracelular e extracelular. A região extracelular interage com o ligante endógeno (glutamato) ou agonistas exógenos (como por exemplo o (S)-3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) agonista seletivo dos mGluRs do grupo I) causando mudanças conformacionais do receptor que promovem ou inibem vias de sinalização intracelular. Por fim, uma porção intracelular (c-terminal), que é capaz de interagir com a proteína G $\alpha$  e outras proteínas que promovem a transdução de sinais intracelulares (Kim et al., 2020; Kniazeff et al., 2011; Koehl et al., 2019; Willard & Koochekpour, 2013). Uma vez que o glutamato se liga a eles, a proteína G $\alpha$  sofre alteração conformacional, o difosfato de guanosina (GDP) acoplado é substituído por trifosfato de guanosina (GTP) e a subunidade G $\alpha$  é liberada do complexo proteico. A proteína G $\alpha$  atua como unidade efetora capaz de interagir com outras proteínas celulares gerando uma cascata de sinalização que provoca a modulação de diversas vias intracelulares (Masu et al., 1991; Willard & Koochekpour, 2013). Além da subunidade G $\alpha$ , as subunidades  $\beta\gamma$  da proteína G também realizam funções que variam com o tipo de mGluR. As subunidades  $\beta\gamma$  de mGluRs do grupo I podem inibir a atividade do NMDAR, por exemplo (Bertaso et al., 2010). Em mGluRs do grupo II e III, as subunidades  $\beta\gamma$  inibem a adenilato ciclase e regulam canais iônicos e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (Hámor et al., 2023; Niswender & Conn, 2010).

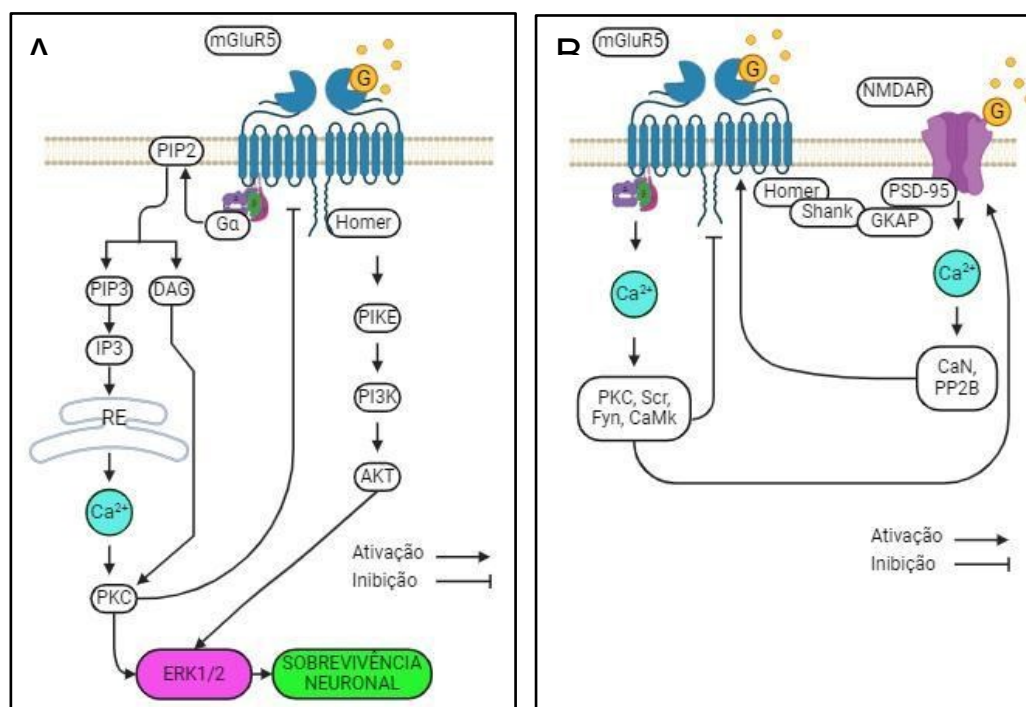
Existem 8 mGluRs, os quais são divididos em três grandes grupos: I (mGluR1 e mGluR5), II (mGluR2 e mGluR3) e III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8). A classificação dos receptores é feita com base em sua localização, função e homologia. A expressão dos mGluRs do grupo I é mais proeminente nos terminais pós-sinápticos (Luján et al., 1996), enquanto que os grupos II e III são mais expressos na porção pré-sináptica (Luján et al., 1996; Ribeiro et al., 2017; Shigemoto et al., 1997). Estudos

demonstram que os mGluRs dos grupo II e III regulam a liberação de neurotransmissores enquanto os mGluRs do grupo I modulam a atividade do neurônio pós-sinápticos. Os mGluRs estão envolvidos em processos como memória, plasticidade sináptica e desenvolvimento neuronal. Por exemplo, os mGluRs do grupo I favorecem a LTP ou LTD a depender do contexto, por outro lado, o mGluR3 modula a memória de trabalho (Ayala et al., 2009; Jin et al., 2018). A regulação desses processos se dá pela ativação de vias intracelulares que modulam a atividade de outros receptores de membrana, culminando num ajuste fino da homeostase celular. (De Souza et al., 2020; de Souza et al., 2022; Ribeiro et al., 2017)

## 1.2 Receptor metabotrópico de Glutamato do tipo 5

O mGluR5 interage em sua porção intracelular com a proteína  $G\alpha q/11-\beta\gamma$ . Uma vez que o mGluR5 foi ativado pelo glutamato (Figura 2), a proteína  $G\alpha q/11-\beta\gamma$  desacopla e ativa a proteína fosfolipase C (PLC), que por sua vez hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) da membrana celular em 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) (Sladeczek et al., 1985; Sugiyama et al., 1987; Willard & Koochekpour, 2013). O IP3, uma vez formado, se liga aos receptores de IP3 localizados na membrana do retículo endoplasmático (RE), que possui alta concentração de  $Ca^{2+}$  em seu lúmen. O receptor de IP3 é um canal permeável a  $Ca^{2+}$  e, após a sua ativação, o poro aberto permite o fluxo de íons  $Ca^{2+}$  do RE para o citoplasma (Woll & Van Petegem, 2022b). O DAG e a sinalização de  $Ca^{2+}$  promovidos pelo mGluR5 ativam a proteína quinase C (PKC) (Ribeiro et al., 2017) que leva ao recrutamento de outras proteínas importantes, tais como: fosfolipase A2 (PLA2), fosfolipase D (PLD), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e a quinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) (Gereau & Heinemann, 1998; Ribeiro et al., 2017; Sengmany et al., 2017). A sinalização de mGluR5 modula elementos importantes para a neuroproteção. A ERK1/2 é importante para a sobrevivência neuronal, ela regula a expressão gênica por meio da fosforilação de CREB (proteína de ligação ao elemento responsivo a monofosfato de adenosina (AMPC)). O CREB é capaz de regular a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), uma neurotrofina importante para o desenvolvimento e sobrevivência neuronal, e a

proteína regulada por atividade e associada ao citoesqueleto (ARC/ARG3.1), um gene que promove proteção contra a neurodegeneração. Tanto BDNF quanto ARC/ARG3.1 são dependentes da ativação de mGluR5 (Choe & Wang, 2001; Doria et al., 2018).



**Figura 2 - Principais vias de sinalização celular ativadas por mGluR5. A: Vias ativadas por mGluR5. A:** ligação do agonista ao receptor o ativa e promove o desacoplamento das subunidades da proteína  $G\alpha_q/11-\beta\gamma$ , levando à ativação da PLC, que hidrolisa PIP2 em DAG e IP3, promovendo liberação de  $Ca^{2+}$  dos estoques intracelulares e ativando a PKC. A PKC é capaz de ativar várias proteínas, entre elas a ERK1/2 e também atua em um feedback negativo dessensibilizando o mGluR5. A porção intracelular do mGluR5 (C-terminal) interage com Homer e favorece a ativação de AKT via PI3K que aumenta a ativação de ERK1/2. AKT e ERK1/2, contribuem para a ativação de fatores de transcrição no núcleo. A transcrição também é promovida pela ativação de CaMk induzida pelo aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular. Fonte: elaboração própria (criado em biorender.com). **B:** Modulação mútua entre mGluR5 e NMDAR. A ativação de mGluR5 promove sinalização de  $Ca^{2+}$  que ativa quinases, estas, fosforilam e potencializam NMDAR. O influxo de  $Ca^{2+}$  promovido pela ativação de NMDAR promove ativação de CaN e PP2B, que inibem a dessensibilização de mGluR5, potencializando o receptor. Fonte: elaboração própria (criado em biorender.com).

A PKC é uma proteína chave na sinalização de mGluR5, pois ela atua em feedback negativo sobre mGluR5, fosforilando e dessensibilizando o receptor (Gereau & Heinemann, 1998; Ribeiro et al., 2017; Sengmany et al., 2017). É por meio da PKC e de outras quinases dependentes de  $Ca^{2+}$  como as Scr quinases e a proteína quinase dependente de cálcio  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CaMk) que o mGluR5 potencializa (por fosforilação) o NMDAR (Figura 2) (Ribeiro et al., 2017; Sladeczek et al., 1985;

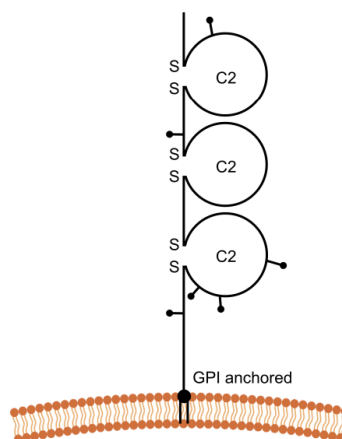
Sugiyama et al., 1987; H. Wang et al., 2009; Willard & Koochekpour, 2013). Por outro lado, o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  promovido pelo NMDAR ativa calcineurina (CaN) e fosfatase 2B (PP2B), que desfosforilam e inibem a dessensibilização de mGluR5 (Alagarsamy et al., 1999, 2005). Além da via de IP3, o mGluR5 também pode afetar a resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  modulando positivamente o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de voltagem do tipo L (Kato et al., 2012).

Além da via promovida pela ativação da proteína  $\text{G}\alpha$ , outras vias são ativadas por proteínas parceiras. O Homer, por exemplo, é uma proteína de ancoragem que favorece a interação do mGluR5 com receptores de IP3 e também compõe uma plataforma de proteínas: mGluR5, Homer, Shank, a proteína pós-sináptica 95 (PSD 95) e NMDAR (Thomas, 2002; Tu et al., 1998). Homer também é capaz de promover a ativação de ERK1/2 de forma independente de  $\text{Ca}^{2+}$ , por meio da  $\beta$ -arrestina 2 (Mao et al., 2005; Stoppel et al., 2017). A via do Homer também é capaz de prevenir a neurodegeneração pela ativação da proteína quinase B (AKT). O glutamato promove aumento da associação entre Homer e o propulsor fosfoinosítido 3-quinase (PIKE) aumentando a atividade de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que converte fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) da membrana em fosfatidilinositol-trifosfato (PIP3). O PIP3 atua sobre a proteína quinase-1/2 dependente de proteína 3-fosfoinosítida (PDK1/2), capaz de fosforilar AKT, promovendo ativação do alvo mamífero da rampamicina (mTOR), culminando na síntese proteica (Figura 2) (Doria et al., 2013; Rong et al., 2003).

O mGluR5 também é importante no contexto patológico, como por exemplo, na Doença de Alzheimer (DA). A DA é uma doença neurodegenerativa progressiva que caracterizada pela morte neuronal e acúmulo de placas amiloide-beta ( $\text{A}\beta$ ) e emaranhados neurofibrilares intracelulares (compostos por agregados da proteína tau hiperfosforilada). Na DA, oligômeros de beta-amiloide interagem com mGluR5, ativando a Fyn, uma proteína quinase que fosforila NMDAR e Tau, contribuindo para estresse celular e dano neuronal. A modulação de mGluR5 por meio de moduladores alostéricos pode mitigar esses processos. O CDPPB, modulador alostérico positivo de mGluR5, foi capaz de evitar neurodegeneração e recuperar os déficits de memória característicos da DA em modelo murino (Grant et al., 1992; Prybylowski et al., 2005; Um et al., 2013; Carvalho et al., 2019).

### 1.3 Regulador de Crescimento Neuronal 1

Moléculas de adesão celular (MAC) são fundamentais para o crescimento, sobrevivência e migração neuronal, além da manutenção de sinapses (S.-H. Lee et al., 2013; Samanta & Almo, 2015; Takeichi, 1995). As IgLON são MAC pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, sendo elas: a Proteína de Ligação a Opioides/Semelhante a Molécula de Adesão Celular (OPCML ou OBCAM), Proteína de Membrana Associada ao Sistema Límbico (LSAMP), Neurotrimina (NTM), Reguladora de Crescimento Neuronal 1 (NEGR1) e IgLON5 (Salluzzo et al., 2023). Essas proteínas são fundamentais no desenvolvimento do SNC. Caracterizada por Funatsu e colaboradores (1999), a NEGR1 (outrora conhecida como Kilon) é uma proteína de 46 kDa ancorada à membrana por uma alça de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e possui três domínios semelhantes à imunoglobulina e seis sítios preditos de glicosilação (Figura 3) (Funatsu et al., 1999; Miyata et al., 2000).



**Figura 3 - Estrutura da NEGR1.** GPI é a alça que ancora a proteína à membrana. Os pontos são os sítios preditos de glicosilação e C2 são os domínios Imunoglobulina-like, fechados em loop por pontes dissulfeto. Fonte: Singh et al., 2019.

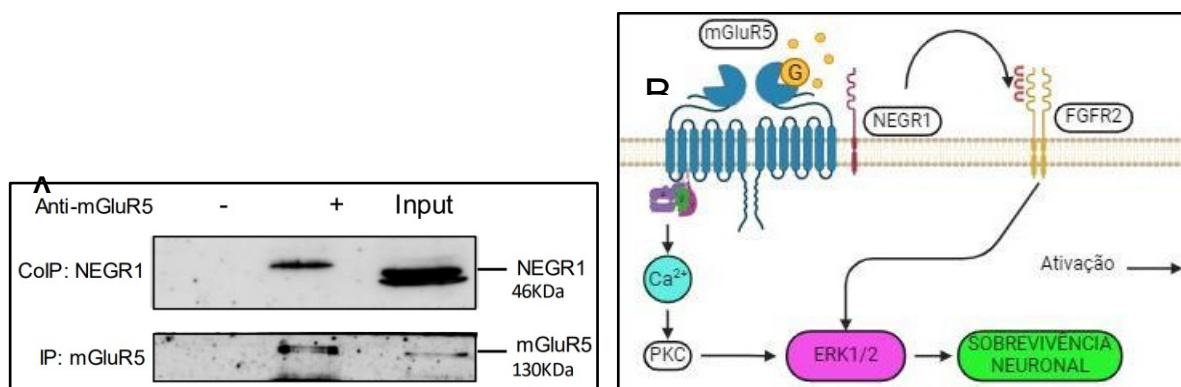
A NEGR1 pode formar homo ou heterodímeros e pode atuar em cis sobre proteínas parceiras na membrana, mas também pode atuar em trans através de sua forma solúvel (Pischedda & Piccoli, 2016; Ranaivoson et al., 2019; Salluzzo et al., 2023; Venkannagari et al., 2020). A NEGR1 é clivada em sua forma solúvel pela

proteína contendo domínios de desintegrina e metaloproteinase (ADAM10). Experimentos demonstraram que a NEGR1 solúvel é essencial para regular a arborização neuronal durante o desenvolvimento (Pischedda et al., 2014; Sanz et al., 2015). O tratamento com GI 254023X, inibidor de ADAM10, diminui o número de neuritos em cultura de neurônios. Por outro lado, o tratamento com NEGR1 exógena em cultura neuronal com *knockdown* de NEGR1, promoveu arborização semelhante à condição controle (Pischedda & Piccoli, 2016). Além disso, Pischedda e Piccoli (2016) também demonstraram que essa regulação da morfologia neuronal provocada pela NEGR1 solúvel é dependente da ativação do receptor do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGFR2), que promove a fosforilação de ERK1/2 (Figura 4). Tanto a inibição de FGFR2 quanto da via de ERK1/2 (via inibição por siRNA e farmacológica por U0126 100 nM) levam à redução da complexidade da árvore de neuritos. Os estudos Dai e colaboradores (2024) também demonstraram o papel de NEGR1 para a fosforilação de PI3K e AKT, que compõem a sinalização não canônica de mGluR5. O *knockdown* de NEGR1 promoveu aumento da fosforilação de PI3K e AKT, sem promover aumento da expressão total das respectivas proteínas em células tumorais.

O papel de NEGR1 vem sendo revelado por estudos que relacionam esta proteína à saúde do SNC (Noh et al., 2020). O trabalho de Noh et al. (2019) com animais NEGR1<sup>-/-</sup> mostrou que estes animais apresentam piora nos escores para teste de comportamento tipo ansioso e depressivo em comparação a animais NEGR1<sup>+/+</sup>. Também foi relatado que a neurogênese hipocampal e a transmissão sináptica ficam prejudicadas em animais NEGR1<sup>-/-</sup> (Noh et al., 2020). Singh e colaboradores (2019) também demonstraram que em camundongos NEGR1<sup>-/-</sup> houve significativas alterações morfológicas no encéfalo, como diminuição no volume total, aumento no volume dos ventrículos laterais e do terceiro ventrículo. além de diminuição do volume do corpo caloso e do hipocampo, o que sugere uma redução do volume das áreas corticais e subcorticais. Além das alterações morfológicas também foi observado que a interação social em animais NEGR1<sup>-/-</sup> é prejudicada. No teste de sociabilidade em 3 câmaras, os animais NEGR1<sup>-/-</sup> passam significativamente menos tempo na câmara com animal estranho em comparação a animais NEGR1<sup>+/+</sup> (Singh et al., 2019). Além disso, a NEGR1 se mostra relevante em transtornos neurológicos e psiquiátricos como esquizofrenia (Karis et al., 2018), autismo (Szczyrkowska et al., 2018), DA (Ni et al., 2018) e o transtorno de depressão maior (Maccarrone et al., 2013).

#### 1.4 Interação entre NEGR1 e mGluR5

Como descrito anteriormente, o mGluR5 é bastante relevante para a fisiologia neuronal e sua função é afetada pelas proteínas com as quais ele interage. Recentemente, nosso grupo realizou experimentos de espectrometria de massa em imunoprecipitados de mGluR5 a fim de identificar proteínas que interagem com o receptor (Carvalho, 2022). Foi observado que 21 proteínas se mostraram enriquecidas nos imunoprecipitados, como por exemplo Homer 1 e proteína G, conhecidas por sua interação com mGluR5 (Tu et al., 1999). A NEGR1 foi uma dessas proteínas enriquecidas no imunoprecipitado de mGluR5. Dessa forma, experimentos de co-imunoprecipitação foram realizados a fim de se confirmar a interação de NEGR1 com mGluR5, visto que NEGR1 é expressa nas mesmas regiões cerebrais que mGluR5 (Cheon et al., 2021). Carvalho (2022) observou que tanto em lisados de córtex e hipocampo, quanto em cultura primária de neurônios, a NEGR1 é co-imunoprecipitada com o mGluR5 de maneira específica (Figura 4). O *knockdown* de NEGR1 não alterou a presença de mGluR5 na membrana ou sua expressão total (Carvalho, 2022). No entanto, a NEGR1 desempenha um papel na fosforilação de ERK1/2 e na regulação de genes regulados por mGluR5. Os níveis de ERK1/2 fosforilada mediante estímulo com DHPG foram menores em neurônios que sofreram *knockdown* de NEGR1. Um aspecto interessante é que NEGR1 em sua forma secretada aumenta a expressão da ARC/ARG3.1, um gene regulado por mGluR5 e que promove proteção contra neurodegeneração (Doria et al., 2018). Além disso, o tratamento farmacológico de mGluR5 com o seu modulador alostérico negativo, CTEP (2-cloro-4- [2- [2,5-dimetil-1- [4- (trifluorometoxi) fenil] imidazol-4-il] etinil] piridina inibiu esse efeito (Carvalho 2022). As evidências apresentadas trazem à tona a possibilidade de utilizar a NEGR1 como modulador da função de mGluR5.



**Figura 4 - Interação entre NEGR1 em mGluR5. A:** Painel representativo da interação entre mGluR5 e NEGR1 em lisados de córtex e hipocampo. O painel mostra um imunoblot representativo para mGluR5 (Ip) na presença de antimGluR5 (+) ou Anti-AKT (-) (Painel inferior) e o imunoblot para co-imunoprecipitação (Coip) de NEGR1 (Painel superior) realizado em amostras de hipocampo ou córtex. Fonte: Carvalho, 2022. **B:** Sinalização de NEGR1 e sua influência sobre mGluR5. A ligação da NEGR1 solúvel ao FGFR2 ativa ERK1/2. A interação mGluR5 modula vias dependentes de mGluR5, como por exemplo a via da ERK1/2. Fonte: Elaboração própria (criado em biorender.com).

## 2. JUSTIFICATIVA

O mGluR5 é fundamental para a regulação da atividade neuronal e a NEGR1 é fundamental para o correto desenvolvimento do SNC, sendo amplamente expressos nas mesmas regiões cerebrais. Além disso, é descrito o efeito do knockdown de NEGR1 na modulação de proteínas reguladas por mGluR5 (Carvalho, 2022). Ambas as proteínas são relevantes também no contexto patológico. A sinalização de mGluR5 é alterada em doenças neurodegenerativas como DA e em modelos animais mGluR5<sup>-/-</sup> alterações comportamentais são descritas. A NEGR1, por sua vez, é crucial para o crescimento correto dos neuritos, assim como para sua arborização e, em animais NEGR1<sup>-/-</sup>, observa-se alterações morfofuncionais do SNC assim como alterações comportamentais. A interação de mGluR5 com outras proteínas é capaz de alterar sua ativação. Dessa forma a NEGR1 poderia promover modulação da sinalização de mGluR5. O estudo de tal interação pode promover melhor entendimento da sinalização de mGluR5, da fisiologia neuronal, mas também da fisiopatologia e de possíveis e alvos terapêuticos para doenças do SNC. O presente trabalho, portanto, tem como foco avaliar a influência da NEGR1 sobre a sinalização celular de cálcio e sobrevivência neuronal em cultura primária de neurônios de camundongos C57Bl/6.

### 3. OBJETIVO

Investigar as consequências da interação entre NEGR1 e mGluR5 sobre a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  e a sobrevivência neuronal em cultura primária de neurônios de camundongos C57/Bl6.

#### 3.1 Objetivos específicos

Quantificar a variação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  decorrente da ativação de mGluR5 por DHPG em cultura neuronal C57/Bl6 após silenciamento (knockdown) de NEGR1;

Quantificar a variação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  decorrente da ativação de outros receptores de glutamato em cultura neuronal C57/Bl6 após knockdown de NEGR1;

Quantificar a variação da morte celular induzida por altas concentrações de glutamato em cultura neuronal C57/Bl6 após knockdown de NEGR1;

Quantificar a variação da morte celular induzida por altas concentrações de glutamato em cultura neuronal mGluR5<sup>-/-</sup> após knockdown de NEGR1.

### 4. MATERIAL E MÉTODOS

O (S)-3,5-dihidroxifenilglicina (DHPG) foi adquirido da TOCRIS, enquanto o 2-cloro-4-((2,5-dimetil-1-(4-(trifluorometoxi)fenil)-1H-imidazol-2-íli)etil)piridina (CTEP) foi obtido da Axon Medchem. Os reagentes como 2-propanol, solução de Betaína, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), etanol, NaCl, paraformaldeído, proteinase K, solução de Tris (hidroximetil) aminometano-hidroclorídrico (Tris HCl), solução de Tris (hidroximetil) aminometano - ácido etilenodiamino tetra-acético (Tris-EDTA), poli-L-ornitina e albumina sérica bovina

(BSA) foram todos adquiridos da Sigma Aldrich®. Tubos do tipo eppendorff e ponteiras de micropipetas foram fornecidos pela Axygen Brasil. Os dNTPs, o kit Power SYBR® Green PCR Master Mix, o SYBR® Safe, o Reagente Suplemento N2 100X e o TRIzol® foram obtidos da Thermo Scientific®. A água Nuclease-free foi comprada da Ambion®. Os iniciadores utilizados nas reações de PCR e qPCR estão descritos na tabela 1 e foram adquiridos da Síntese Biotecnologia.

As placas de 96 poços são da Greiner Bio-One. O Suplemento B27 50X (#0080085SA), a Penicilina/Streptomicina, o meio neurobasal (#21103-049), o Opti-MEM® 1x (#31985-3062), o DMEM em pó, alta glicose (#12100046) e o GlutaMAX (35050-061) são da Gibco. A triptona (#7351C), o ágar (#7178<sup>a</sup>) e o extrato de levedura (#7184c) são da Acumedia. O cloridrato de polietilenoimina linear (MW 40.000) (PEI MAX) é da Polysciences (#24765-1), enquanto o Polietileno Glicol 8000 (PEG-8000) é da Affymetrix (#19959). O kit para extração de DNA plasmidial de bactérias utilizado é o QIAGEN Plasmid Midi Kit (#12143).

#### 4.1 Modelos animais

O experimento foi conduzido utilizando-se camundongos das linhagens mGluR5 knockout, especificamente C57/Bl6;129-Grm5tm1Rod/J (mGluR5<sup>-/-</sup>) e WT (*wild type*), obtidos do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA). Os animais foram criados e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, em ciclo de 12 horas claro/escuro, com temperatura constante de 23°C, recebendo água e ração *ad libitum*. As culturas primárias de neurônios foram obtidas a partir de embriões de camundongos E15 (15 dias de gestação) da linhagem C57-Bl6, adquiridos do Biotério Central/UFMG, ou a partir de embriões E15 mGluR5<sup>-/-</sup> ou mGluR5<sup>+/-</sup> provenientes de cruzamentos entre camundongos heterozigotos (mGluR5<sup>+/-</sup>) dessa colônia. Os procedimentos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pelo CEUA-UFMG (Comitê de Ética no Uso de Animais – UFMG), protocolo nº 50/2021 (Anexo 1).

## 4.2 Genotipagem

### 4.2.1 Extração de DNA

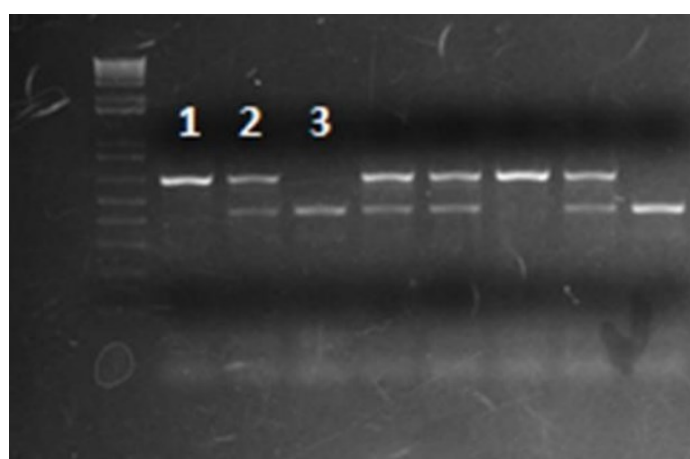
A extração do DNA foi realizada a partir de tecidos de camundongos da colônia mGluR5<sup>-/-</sup>. As amostras foram adicionadas a 500 µL de solução de extração (H<sub>2</sub>O, SDS 10%, Tris-EDTA, NaCl, Proteinase K) e incubadas overnight em banho-maria a 55°C. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novos tubos Eppendorf contendo 500 µL de isopropanol, seguido de homogeneização (10x) e nova centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado, e os tubos foram deixados abertos e invertidos para secar por pelo menos 1 hora. Depois disso, foram adicionados 200 µL de solução TE 0,5X (Tris HCl 1M, EDTA 0,5M, H<sub>2</sub>O), e os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por no mínimo 1 hora. As amostras de DNA foram armazenadas a 4°C.

### 4.2.2 Amplificação de DNA para identificação do mGluR5

Os iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase (PCR) para identificar as linhagens homocigotas mutantes (mGluR5<sup>-/-</sup>), heterocigotas (mGluR5<sup>+/-</sup>) e homocigotas selvagens (mGluR5<sup>+/+</sup>) foram adquiridos do Jackson Laboratory e desenvolvidos com base na sequência depositada no GenBank, identificada pelo número NM\_001081414.2. A reação foi conduzida utilizando a técnica de Multiplex PCR, permitindo a identificação simultânea das diferentes linhagens em uma única reação de PCR. As características dos iniciadores, incluindo suas sequências e o tamanho dos amplicons gerados, estão descritas na Tabela 1, enquanto um exemplo da identificação dos genótipos está ilustrado na Figura 4.

Nome no estoque	Sequência	Amplicon	%CG
Primer comum	CACATGCCAGGTGACATCAT		50
Selvagem-reverso	CCATGCTGGTTGCAGAGTAA	442	50
Mutante-reverso	CACGAGACTAGTGAGACGTG	650	55

**Tabela 1 - Iniciadores utilizados no PCR convencional para mGluR5.**



**Figura 5 - Genotipagem de camundongos knockout para o gene mGluR5.** O amplicon gerado pelos iniciadores da linhagem mGluR5<sup>-/-</sup> possui 650 pb (Canaleta 1), da linhagem mGluR5<sup>+/-</sup> possui 650 e 442 pb (Canaleta 2) e da linhagem mGluR5<sup>+/+</sup> possui 442 pb.

As reações de PCR foram realizadas com 0,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen); 2,00 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de dNTPs; 1,00 μM de cada iniciador (descritos na Tabela 1) e 500 ng de DNA genômico, completando um volume final de 12 μL utilizando o tampão fornecido pelo fabricante diluído a 1X. O programa de amplificação no termociclador incluiu uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos. A amplificação foi finalizada com uma etapa de extensão a 72°C por 2 minutos.

Após a amplificação, 12 μL do produto de PCR, juntamente com 3 μL de tampão de amostra 5x, foram aplicados em gel não desnaturante de 2% de agarose contendo

SYBR® Safe (Life Technologies) e tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X. O gel foi colocado em uma cuba de eletroforese horizontal contendo TAE 0,5X e submetido a uma corrente de 100 volts por 30 minutos. A visualização dos resultados foi feita usando o sistema ImageQuant LAS 4000. Neste estudo foram utilizados apenas os camundongos homocigotos mGluR5<sup>+/+</sup> e mGluR5<sup>-/-</sup>.

### 4.3 Cultura primária de neurônios

Seguindo o protocolo utilizado por (Doria et al., 2013), as culturas neuronais foram preparadas a partir da região corticoestriatal do cérebro de embriões E15 C57/BI6 ou oriundos da colônia de animais mGluR5<sup>+/-</sup>. Quando provenientes da colônia mGluR5<sup>+/-</sup>, foi realizada uma extração de DNA a partir da secção da cauda dos embriões para determinação do genótipo por PCR convencional.

As fêmeas prenhes foram eutanasiadas por deslocamento cervical e os embriões coletados em HBSS gelado para dissecação. Após a dissecação do tecido corticoestriatal, procedeu-se à digestão por tripsina, seguida de dissociação celular utilizando uma pipeta-Pasteur polida no fogo. As células foram adicionadas ao meio Neurobasal suplementado com N2 e B27, 2 mM de GlutaMAX, 50 µg/ml penicilina, e 50 µg/ml estreptomicina e em seguida plaqueadas em placas de 96 poços (6,4 x 10<sup>4</sup> células por poço) previamente preparadas com poli-L-ornitina. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> ao longo de 9 dias in vitro (DIV9), sendo o meio trocado a cada 2 dias. Após esse período, as células foram utilizadas para experimentos de Ca<sup>2+</sup>, experimentos de morte e co-imunoprecipitação. Dessa forma obtivemos uma cultura 99,5% pura para neurônios (Olmo et al., 2018).

### 4.4 Produção de vetores lentivirais

O *knockdown* de NEGR1 foi realizado por meio de short hairpin RNA (shRNA) utilizando vetores lentivirais como ferramenta de entrega do shRNA. O shNEGR1

possui uma sequência que tem como alvo o RNA mensageiro (RNAm) da NEGR1, e quando se liga ao seu alvo, promove sua degradação. O shControle possui a mesma estrutura, porém é uma sequência *scramble* que não tem como alvo nenhum RNAm murino, servindo como controle (Sliva & Schnierle, 2010).

Os plasmídeos utilizados neste estudo foram selecionados, sintetizados e clonados no Laboratório de Biologia da Sinapse da Universidade de Trento, na Itália, e gentilmente cedidos pelo Dr. Giovanni Piccoli. As sequências para silenciamento de NEGR1 (5'-CACCCCTTTGATGCTCCATCTT-3') ou controle (5'-CTGGAGGCTGTAGTCTCTT-3') foram inseridas no plasmídeo pLVTH (Addgene: #12262), que expressa GFP sob o controle do promotor da subunidade  $\alpha$  do fator de alongação eucariótico 1 (EEF1A1).

O vetor lentiviral de terceira geração foi produzido utilizando-se os plasmídeos empacotadores, os quais possuem informações para produção das proteínas Gag e Pol, responsáveis pela montagem do capsídeo e produção de enzimas virais: pCMV-dR8.2 dvpr (addgene: #8455); o plasmídeo Rev: 40 pRSV-Rev (addgene #12253) e o plasmídeo envelope: pMD2.G (addgene #12259) (Pischedda et al., 2014).

#### **4.5 Transformação e crescimento de bactérias**

Para a obtenção de plasmídeos em larga escala, foi realizada a transformação bacteriana utilizando 25 ng de DNA de cada construção plasmidial e 50  $\mu$ L de bactérias competentes DH5 $\alpha$ , previamente descongeladas a 4°C. Os tubos foram incubados em banho de gelo por 30 minutos e, em seguida, submetidos a um banho seco a 42°C por 1 minuto. Após esse período, os tubos retornaram ao banho de gelo por mais 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 400  $\mu$ L de meio LB 1X sem antibiótico (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) e as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora.

Após a incubação, 100  $\mu$ L dessa mistura foram utilizados para plaqueamento em meio LB-ágar (1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, 1,5% ágar) contendo

ampicilina (50 µg/mL). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. Controles de crescimento das bactérias competentes não transformadas foram realizados em placas de LB-ágar na presença e ausência de ampicilina. Colônias selecionadas aleatoriamente foram multiplicadas em um pré-inóculo de 6 mL de meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL) e incubadas em tubos plásticos de 50 mL em um agitador (Shaker Superohm G-25, Brasil) a 37°C por 16 horas, com agitação de 180 rpm.

Após o crescimento bacteriano, uma alíquota de 750 µL foi retirada para estoque, e o restante foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 2 L contendo 200 mL de meio LB com antibiótico, sendo incubado novamente no agitador por 16 horas a 37°C, sob agitação de 180 rpm.

#### **4.6 Extração de DNA plasmidial**

O DNA foi extraído utilizando o kit *QIAGEN Plasmid Midi*, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, após centrifugação a 6000 g por 15 minutos a 4°C, o precipitado bacteriano foi ressuspenso em 4 mL de tampão de ressuspensão (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA; 100 µg/mL RNase A). Em seguida, 4 mL de solução de lise (0,2 M NaOH; 1% SDS) foram adicionados, e a mistura foi homogeneizada em um vórtex. Após a lise, foi adicionado 4 mL do tampão de neutralização (3,0 M de acetato de potássio, pH 5,5), seguido de centrifugação a 15000 g por 30 minutos a 4°C.

O sobrenadante clarificado foi então aplicado em uma coluna de resina de troca iônica para a ligação do DNA plasmidial. Os plasmídeos foram eluídos da coluna utilizando 5 mL de tampão de eluição (1,25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 15% isopropanol) e precipitados pela adição de 3,5 mL de isopropanol à temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 15000 g por 30 minutos a 4°C. Após a precipitação, o DNA foi lavado com etanol 70% e novamente centrifugado a 15000 g por 10 minutos. O DNA precipitado foi ressuspendido em tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) e armazenado a -20°C.

#### 4.7 Cultivo e transfecção de células HEK 293T

As células Human Embryonic Kidney 293T (HEK 293T) foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-Glutamina e 1% de Penicilina/Estreptomicina, e mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Um dia antes da transfecção, 3,8 x 10<sup>6</sup> células foram plaqueadas em placas de 10 cm de diâmetro e, ao atingirem aproximadamente 70% de confluência, foram utilizadas para a transfecção.

As células foram transfectadas com os seguintes plasmídeos nas proporções indicadas: 4 µg de pVLTH (shRNA-NEGR1 ou shRNA-Controle), 4 µg de pCMV-dR8.2 dvpr, 1 µg de pRSV-Rev e 1,2 µg de pMD2.G. Todos os DNAs plasmidiais foram diluídos em meio Opti-MEM® 1X. O reagente de transfecção PEI MAX foi preparado em uma concentração de 1 µg/µL e adicionado à mistura de DNA na proporção de 1:5 (DNA:PEI), seguido por uma incubação de 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, 1 mL dessa solução foi adicionada a cada placa de 10 cm contendo as células.

Após 16 horas, o meio de cultura foi trocado normalmente. O sobrenadante contendo as partículas virais foi coletado 48 e 72 horas após a transfecção e armazenado a 4°C até o momento da purificação.

#### 4.8 Purificação

Os sobrenadantes contendo os lentivírus para shRNA-NEGR1 ou shRNA-controle foram inicialmente centrifugados a 800 g por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos de 50 mL, aos quais foi adicionada a solução concentradora PEG-8000 (40% (P/V) PEG-8000 e 1,2 M NaCl) na proporção de 1:3 (PEG-8000).

Após a homogeneização da mistura, ela foi incubada sob agitação constante a 60 RPM por 16 horas a 4°C. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 1600 g por 60 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi então ressuspensionado em solução tampão fosfato salino (PBS) 1X estéril.

#### **4.9 Transdução**

Os neurônios primários corticoestriatais foram transduzidos com partículas lentivirais contendo shRNA-NEGR1 ou shRNA-controle em quantidades equivalentes no DIV4. A expressão de GFP foi monitorada nos dias seguintes por meio de um microscópio *Fluor*<sup>TM</sup> *Cell Imaging Station*. No DIV9, os neurônios foram utilizados para a realização de experimentos.

#### **4.10 RT-PCR quantitativo (RT-qPCR)**

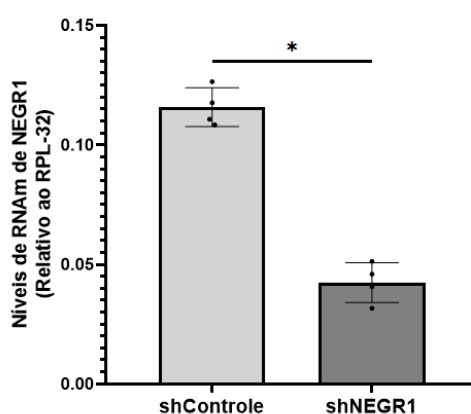
O RNA total das amostras provenientes das culturas primárias de neurônios cortico-estriatais foi isolado pelo método utilizando TRIzol® (Invitrogen, Burlington, EUA), segundo instruções do fabricante. O RNA foi ressuspensionado em 10 µL de água livre de nucleases, tendo sua concentração e qualidade analisadas por espectrofotômetro (NanoDrop–ThermoScientific, Wilmington, USA) e eletroforese em gel de agarose, respectivamente. Os cDNAs foram preparados a partir de 2 µg de RNA total em 20 µL de reação de transcrição reversa.

O PCR quantitativo (qPCR) foi realizado utilizando o kit Power SYBR® Green PCR Master Mix, segundo protocolo do fabricante. Para isso, foram utilizadas as plataformas de PCR em tempo real StepOnePlus<sup>TM</sup> Real-Time PCR Systems e QuantStudio<sup>TM</sup> 6 & 7 Flex Real-Time PCR System. A reação de qPCR foi realizada a fim de quantificar os níveis de mRNA dos genes descritos na tabela 2. Os iniciadores dos respectivos genes foram desenhados com o auxílio do software Primer3plus (tabela 2).

Gene	Sequência	Amplicon	%CG
<b>NEGR1 (R)</b>	GGCTGTACTTGGAGGGTTGA	188	50,00
<b>NEGR1 (F)</b>	ACAGTGACCAATGTGACGCA		55,00
<b>RPL32 (R)</b>	TGACTGGTGCCTGATGAACT	98	50,00
<b>RPL32 (F)</b>	GCTGCCATCTGTTTTACGG		52,60

**Tabela 2 - Iniciadores utilizados no experimento de PCR em tempo real.**

Os iniciadores foram checados utilizando a ferramenta Primer-BLAST para avaliação *in silico* da sua especificidade para com seus alvos. As amostras foram preparadas em triplicatas e as variações da expressão gênica foram determinadas pelo método do  $\Delta$ Ct utilizando o gene de RPL32 ou HPRT como gene constitutivo normalizador. Todas as reações de RT-qPCR mostraram boa qualidade de amplificação e a eficiência dos iniciadores foi testada pelo método de diluição seriada. A Figura 6 é representativa do RT-qPCR para RNAm de NEGR1 relativo ao RPL-32 e confirma o *knockdown* de NEGR1 provocado pelo shNEGR1 em comparação ao shControle.



**Figura 6 - Níveis de RNAm de NEGR1 em neurônios shControle e shNEGR1.** O gráfico mostra os níveis de RNAm de NEGR1 através de RT-qPCR relativos ao RPL-32 em cultura primária de neurônios mGluR5<sup>+/+</sup>. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. \* Indicam que  $p < 0,05$ . Mann Whitney test:  $p = 0,0286$ .

#### 4.11 Quantificação da $[Ca^{2+}]_i$

A quantificação da  $[Ca^{2+}]_i$  foi realizada utilizando o fluoróforo sensível ao íon  $Ca^{2+}$ , o FURA 2-AM. Após entrar no citoplasma celular, o FURA 2-AM é convertido em sua forma ativa pela ação de esterases, permitindo sua ligação ao  $Ca^{2+}$ . O FURA 2 ligado ao  $Ca^{2+}$  possui um pico de excitação máxima em aproximadamente 340 nm, enquanto o FURA 2 livre apresenta um pico em torno de 380 nm. Ambas as excitações promovem emissão na faixa de 508 nm (Molecular Probes, [s.d.]). A partir da proporção entre as fluorescências emitidas pelo FURA 2 ligado e não ligado ao  $Ca^{2+}$ , é possível estimar a  $[Ca^{2+}]_i$  e suas variações ao longo do tempo.

Durante os experimentos, os neurônios foram mantidos em meio Krebs-Ringer-Henseleit) (KRH: NaCl 224 mM; KCl 4 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; CaCl<sub>2</sub> 1 mM; Glicose 10 mM; HEPES 25 mM pH ajustado para cerca de 7,4) aquecido a 37°C. O protocolo consiste nos seguintes passos: primeiro, removeu-se o meio neurobasal dos neurônios, os poços foram lavados com meio KRH e adicionou-se 50 µL de uma solução de FURA 2 a 5 µM e ácido plurônico a 0,05% em meio KRH, seguido de incubação por 60 minutos a 37°C. Após esse período, a solução de FURA 2-AM em KRH foi substituída por 50 µL de KRH por mais 30 minutos, que posteriormente foi substituído por 100 µL de KRH. O nível basal de  $Ca^{2+}$  (Leitura 1) de todos os poços foi então medido por 10 minutos (1 leitura a cada 43 segundos, totalizando 14 pontos de leitura no total). Em seguida, os estímulos foram aplicados às células, e o aumento da  $[Ca^{2+}]_i$  em resposta aos estímulos foi imediatamente medido (Leitura 2: 1 leitura a cada 3 segundos totalizando 14 pontos de leitura) poço a poço. A área sob a curva decorrente de cada condição foi utilizada como medida indireta da  $[Ca^{2+}]_i$ . A segunda leitura foi feita imediatamente após a aplicação do estímulo por 60 segundos, poço a poço. Como estímulos, foram utilizados glutamato 50 µM e DHPG (agonista de mGluR1 e mGluR5). Quando utilizados, os antagonistas de mGluR5 e NMDAR, respectivamente CTEP 10 µM e MK-801 50 µM foram previamente aplicados ao meio por 5 minutos a fim de garantir o bloqueio dos receptores.

A fim de quantificar ao longo do tempo a variação  $[Ca^{2+}]_i$  decorrente dos estímulos, foi feito um cálculo de porcentagem, tomando-se o valor basal como 100% e a área sob a curva de corrente de cada estímulo foi calculada em relação ao basal,

medindo, portanto, quanto a curva de fluorescência de  $\text{Ca}^{2+}$  da leitura 2 é maior em relação à leitura 1. A média da resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  dos poços decorrente de cada estímulo foi calculada para cada repetição do experimento, essa média foi considerada como um n experimental. Os experimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  foram realizados no equipamento Cytation 5, pertencente ao CAPI-UFMG. O protocolo foi adaptado de (Batista et al., 2016).

#### 4.12 Quantificação da morte celular

Os experimentos de morte foram realizados utilizando-se o kit live and dead de (Life Technologies) composto por 2 fluoróforos: a calceína-AM (excitação/emissão~495/~515 nm) e o homodímero de etídeo (excitação/emissão~495/~635 nm). A calceína-AM, uma vez que atravessa a membrana, é clivada por esterases em calceína livre, permanecendo assim confinada ao citoplasma. Dessa forma, somente células vivas são marcadas. O homodímero de etídeo interage com material genético. Uma vez que membrana celular e nuclear são danificadas, os homodímeros de etídeo, acessam o material genético da célula e emitem fluorescência em vermelho, marcando, portanto, as células mortas.

Os neurônios foram incubados por 24 horas com glutamato 50  $\mu\text{M}$ . Após incubação os neurônios foram marcados com os fluoróforos conforme Doria e colaboradores (2018). O protocolo consiste nos seguintes passos: primeiro, removeu-se o meio neurobasal dos neurônios e adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de Calceína AM (2  $\mu\text{M}$ ) e etídeo (2  $\mu\text{M}$ ) em meio KRH a 37°C, seguido de incubação por 15 minutos a 37°C. Após esse período, a solução de fluoróforos foi retirada e os poços lavados três vezes com 50  $\mu\text{L}$  de KRH e foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de KRH novo a 37°C.

As fotos foram obtidas por meio do microscópio *Fluorimetry Cell Imaging Station*. Foram realizadas duas fotos por poço, sempre na porção média do raio do poço: uma foto na emissão da calceína e outra foto para a emissão dos homodímero de etídeo referente à mesma área. Foi realizada a contagem das células utilizando software Image J. A quantificação da morte decorrente das intervenções foi feita usando o seguinte cálculo:

$$\left( \frac{n^{\circ} \text{ de células mortas}}{n^{\circ} \text{ de células mortas} + n^{\circ} \text{ de células vivas}} \right) * 100$$

#### 4.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software Graph Pad PRISM 8.0.1. Todos os conjuntos de dados foram testados quanto à sua normalidade. Os resultados foram expressos em média +- SEM (erro padrão da média). Os dados normais foram analisados por ANOVA de duas vias e pós teste Sidak a fim de verificar o efeito do *knockdown* de NEGR1 sobre os resultados. Conjuntos de dados que não apresentam distribuição normal foram analisados pelo teste Mann Whitney. Para todos os testes estatísticos, um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativamente estatístico.

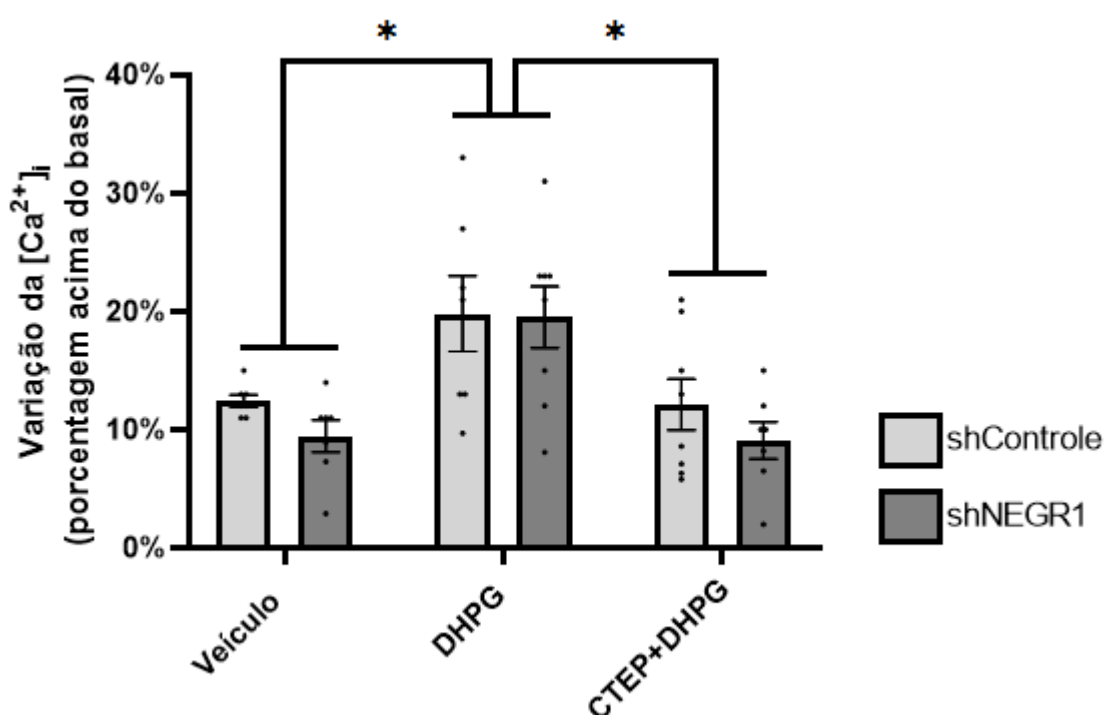
### 5. RESULTADOS

#### 5.1 O *knockdown* de NEGR1 não afeta a sinalização de $\text{Ca}^{2+}$ induzida pela ativação de mGluR5 por DHPG

Foi demonstrado por Carvalho (2022) que a fosforilação de ERK1/2 é alterada quando ocorre o *knockdown* de NEGR1. Considerando a interação física entre NEGR1 e mGluR5 previamente demonstrada, foi hipotetizado que tal interação poderia afetar a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de mGluR5. Por esse motivo, foram realizados experimentos a fim de mensurar a capacidade de NEGR1 de modular a ativação de mGluR5 e a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Para tal, culturas primárias de neurônios de camundongos C57/Bl6 foram transduzidos com lentivírus shControle ou lentivírus shNEGR1, que promove o *knockdown* de NEGR1. Observou-se que na condição shControle houve aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  decorrente da estimulação com DHPG 10  $\mu\text{M}$  por 40 segundos ( $19,81 \pm 3,19\%$

acima do basal), o que foi significativamente ( $p=0,0013$ ) maior em comparação ao estímulo com veículo ( $12,43 \pm 0,53\%$  acima do basal) e ao estímulo com DHPG na presença do bloqueador de mGluR5, CTEP  $50 \mu\text{M}$  ( $12,10 \pm 2,16\%$  acima do basal). Na condição shNEGR1 a resposta foi semelhante: houve aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  decorrente da estimulação com DHPG ( $19,51 \pm 2,60\%$  acima do basal) que foi significativamente ( $p=0,0013$ ) maior em comparação ao estímulo com veículo ( $9,44 \pm 1,34\%$  acima do basal) e estímulo com DHPG na presença de CTEP ( $9,10 \pm 1,56\%$  acima do basal) (Figura 7).



**Figura 7 - A variação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  mediante estímulo com DHPG não difere entre shControle e shNEGR1.** O gráfico mostra a variação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  expressa em porcentagem acima do basal decorrente da aplicação de Veículo (meio KRH), DHPG  $10 \mu\text{M}$  e CTEP  $10 \mu\text{M}$  + DHPG  $10 \mu\text{M}$ . Controle: condição controle, shNEGR1: condição *knockdown* de NEGR1. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. \* Indicam que  $p < 0,05$ . ANOVA:  $p=0,0013$ .

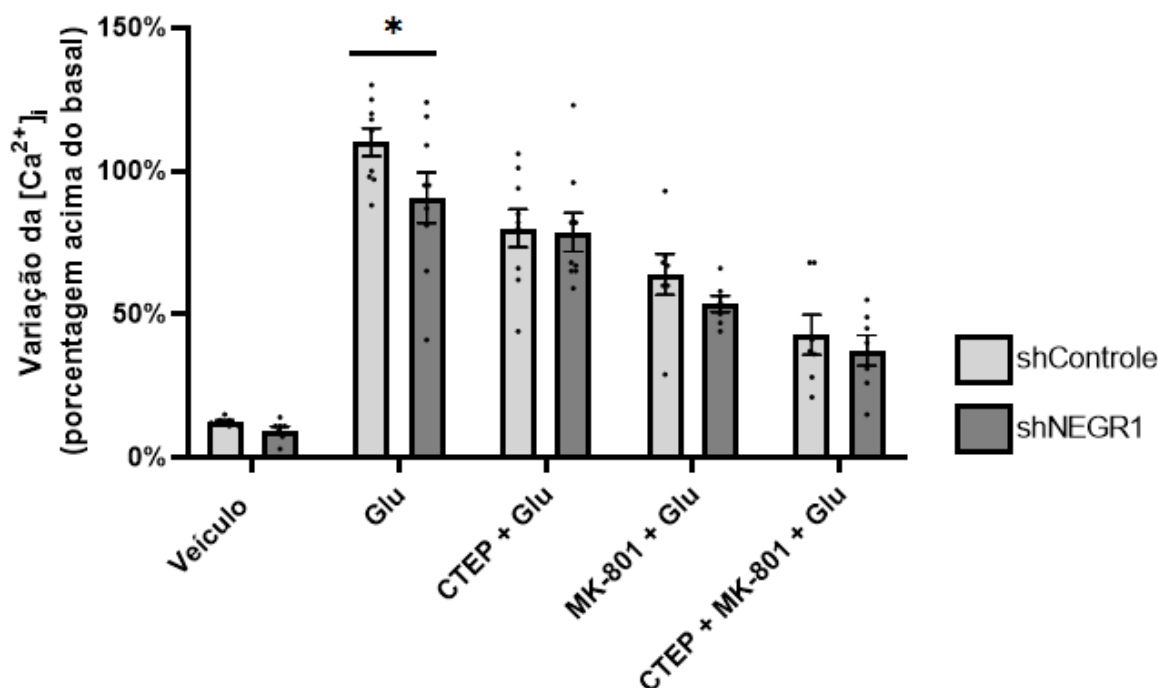
No entanto, não houve diferença na resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  decorrente do estímulo de DHPG entre as condições shControle e shNEGR1. O tratamento prévio com CTEP (5 minutos) reduziu a resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  a níveis semelhantes ao do estímulo veículo (controle). Tais resultados sugerem que a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  decorrente da ativação de mGluR5 por DHPG não é afetada pelo *knockdown* de NEGR1.

## 5.2 O *knockdown* de NEGR1 diminui a sinalização de cálcio mediante estímulo de glutamato em alta concentração

Além da resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por DHPG, via mGluR5, outros receptores de membrana são permeáveis a  $\text{Ca}^{2+}$ , como por exemplo o NMDAR e o AMPAR (Traynelis et al., 2010). Durante a padronização dos experimentos, o glutamato, utilizado como controle positivo, promoveu uma resposta menor em neurônios shNEGR1 em comparação a neurônios shControle. Por esse motivo, experimentos exploratórios foram realizados para investigar o papel de NEGR1 na resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  decorrente de outros receptores de glutamato.

Foram utilizados neurônios de camundongos C57/BI6 em cultura primária transduzidos com lentivírus shControle ou lentivírus shNEGR1, que promove o *knockdown* de NEGR1. Foi observado que o estímulo com glutamato 50  $\mu\text{M}$  por 60 segundos promoveu um aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Contudo, os neurônios que expressam níveis reduzidos de NEGR1 (shNEGR1) exibem uma variação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  significativamente menor ( $90,67 \pm 8,76\%$  acima do basal), quando comparado à resposta exibida por neurônios shControle ( $110,00 \pm 4,86\%$  acima do basal) ( $p=0,0182$ ) (Figura 8). O estímulo de glutamato posterior ao bloqueio de mGluR5 (CTEP 50  $\mu\text{M}$ ), e de NMDAR (MK-801 50  $\mu\text{M}$ ), bem como do bloqueio simultâneo de ambos receptores (CTEP+MK-801), promoveu, respectivamente,  $80,00 \pm 6,62\%$ ,  $63,86 \pm 7,17\%$  e  $42,71 \pm 6,98\%$  de variação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  acima do basal na condição shControle. Na condição shNEGR1 o estímulo de glutamato posterior ao bloqueio de mGluR5 (CTEP), NMDAR (MK-801) ou de ambos receptores (CTEP+MK-801) promoveu, respectivamente,  $78,56 \pm 6,77\%$ ,  $53,57 \pm 2,79\%$ ,  $37,28 \pm 5,30\%$  de variação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  acima do basal. A aplicação prévia de CTEP e MK-801, isoladamente ou em combinação (por 5 minutos), antes do estímulo com glutamato eliminou a diferença na resposta ao glutamato anteriormente observada entre as condições shControle e shNEGR1 (Figura 8), indicando que ambos receptores precisam estar simultaneamente ativados para que tal diferença ocorra. A adição de veículo não promoveu variação significativa da resposta de  $\text{Ca}^{2+}$ . Os resultados

apresentados indicam que a NEGR1 afeta a resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  decorrente do estímulo de glutamato, o que sugere uma interação física e/ou funcional entre a NEGR1 e o NMDAR.

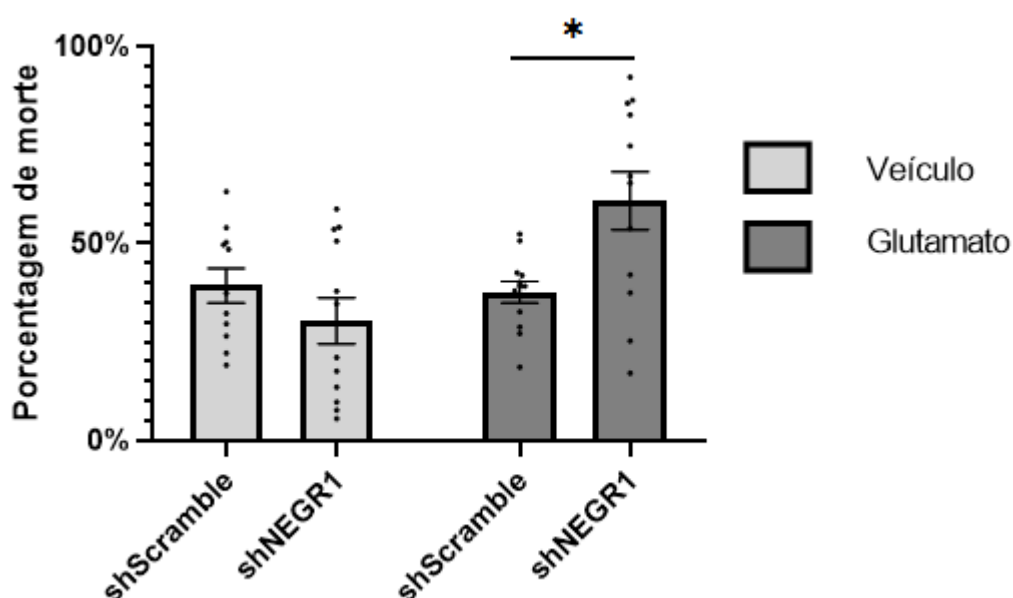


**Figura 8 - O estímulo de glutamato promoveu menor variação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em neurônios shNEGR1.** O gráfico mostra a variação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  em porcentagem acima do basal decorrente da aplicação de Veículo (meio KRH), CTEP 10  $\mu\text{M}$  + Glutamato 50  $\mu\text{M}$ , CTEP 10  $\mu\text{M}$  + MK-801 50  $\mu\text{M}$  + Glutamato 50  $\mu\text{M}$ , Glutamato 50  $\mu\text{M}$ . shControle: condição controle, shNEGR1: condição *knockdown* de NEGR1. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. \* Indicam que  $p < 0,05$ . ANOVA:  $p = 0,0182$

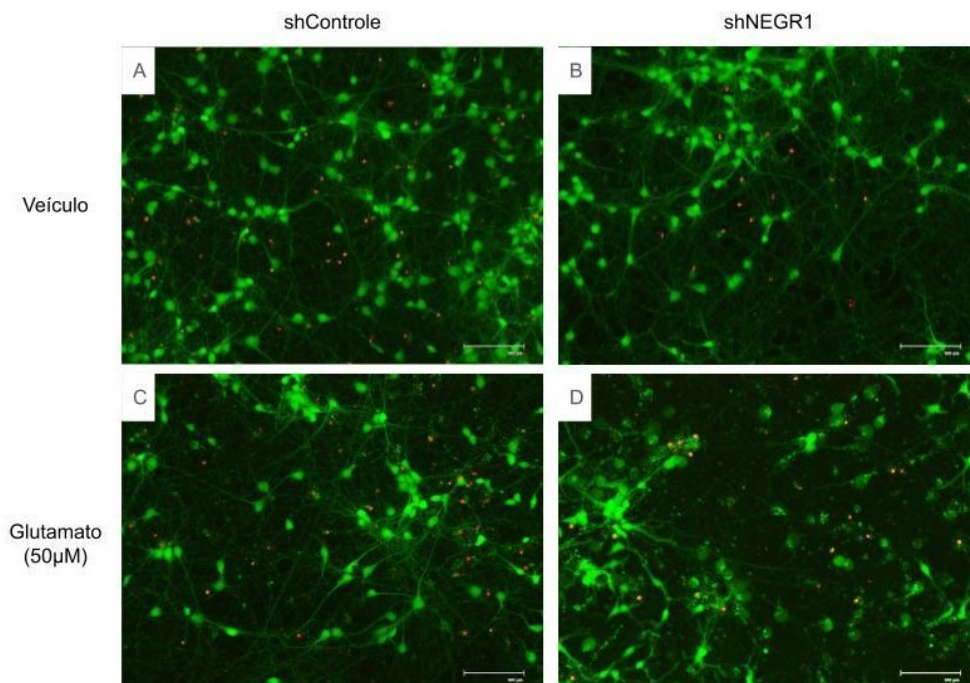
### 5.3 O *knockdown* de NEGR1 promove aumento da morte celular mediante administração de glutamato

Os receptores de glutamato estão ligados a mecanismos de sobrevivência, mas também em fenômenos envolvendo morte neuronal, como por exemplo a excitotoxicidade. Anteriormente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que ERK1/2, ARC/ARG3.1 e BDNF (promotores de sobrevivência neuronal), estão diminuídos em

neurônios shNEGR1 (Carvalho, 2022). Além disso, altas concentrações de glutamato promovem ativação prolongada de NMDAR, gerando excitotoxicidade (Choi, 1988; Neves et al., 2023; Tymianski & Tator, 1996). A fim de se verificar a influência de NEGR1 sobre a sobrevivência neuronal, foram realizados experimentos de morte celular. O modelo usado para os experimentos de morte é um modelo subcrônico de excitotoxicidade e o objetivo é mimetizar o que acontece no cérebro em processos neurodegenerativos crônicos. Para tal, neurônios em cultura primária, infectados com lentivírus shControle ou lentivírus shNEGR1, foram incubados com solução veículo ou glutamato 50  $\mu$ M por 24 horas. Foi verificado que não houve diferença na porcentagem de morte celular entre shControle (39,31  $\pm$  4,38%) e shNEGR1 (30,37  $\pm$  5,82%) após aplicação do veículo. No entanto, o insulto de glutamato promoveu um aumento de morte celular significativamente maior ( $p=0,0059$ ) na condição shNEGR1 (60,77  $\pm$  7,33%) em comparação à condição shControle (37,59  $\pm$  2,77%) (Figura 9). Os dados apresentados demonstram que NEGR1 promove proteção aos neurônios frente ao insulto de glutamato, indicando sua importância para a sobrevivência neuronal.



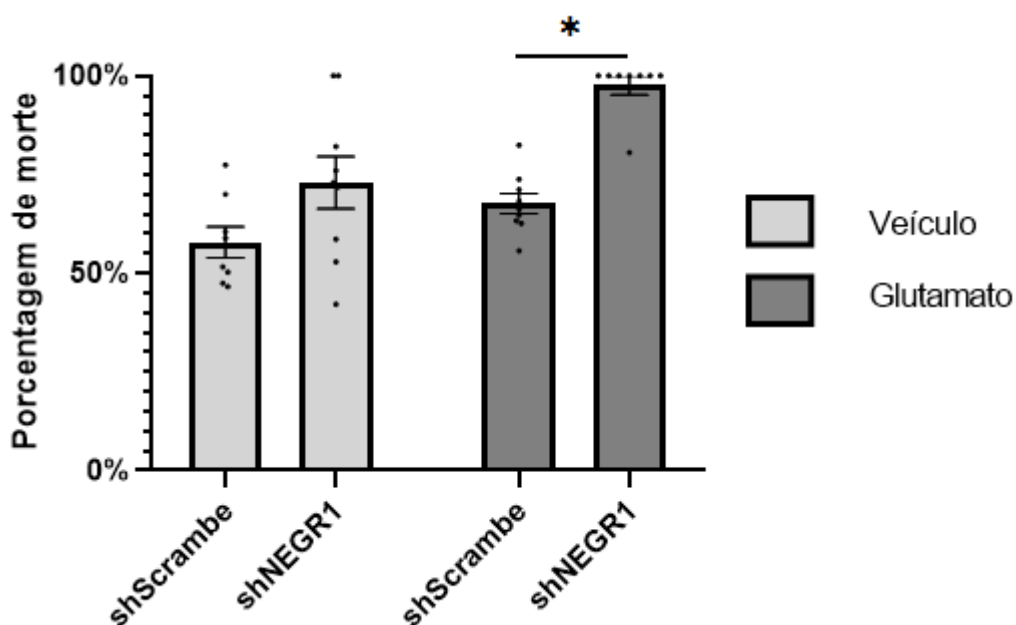
**Figura 9 - O estímulo de glutamato promoveu aumento de morte celular em culturas *knockdown* para NEGR1.** O gráfico mostra a porcentagem de morte celular em cultura decorrente da aplicação de Glutamato 50  $\mu$ M por 24 horas. shControle: condição controle, shNEGR1: condição *knockdown* de NEGR1. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. \* Indicam que  $p < 0,05$ . Mann Whitney test:  $p=0,0056$ .



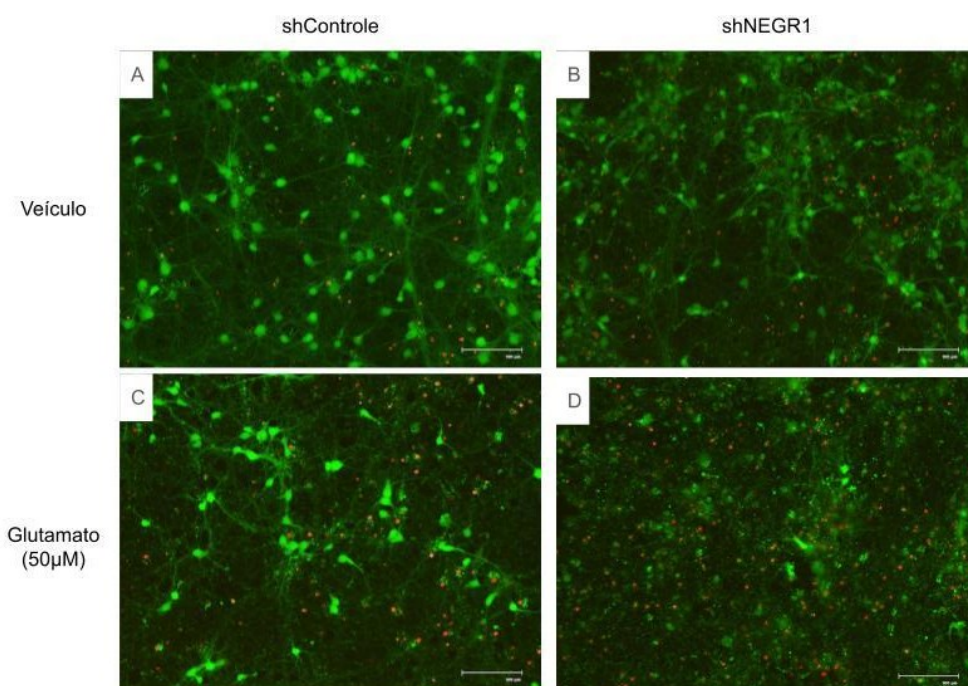
**Figura 10 - Fotomicrografias representativas do resultado do experimento de morte celular.** shControle: condição controle, shNEGR1: condição *knockdown* de NEGR1. A marcação em verde corresponde a células vivas, enquanto a marcação em vermelho corresponde a células mortas. **A e B:** morte neuronal basal em neurônios shControle e shNEGR1, respectivamente. **C e D:** Morte neuronal induzida por insulto de glutamato 50  $\mu$ M em neurônios shControle e shNEGR1 respectivamente.

#### **5.4 O mGluR5 não contribui para o aumento da morte neuronal induzida por insulto de glutamato em neurônios shNEGR1**

O *knockdown* de NEGR1 se mostrou prejudicial frente ao insulto de glutamato promovendo aumento expressivo de morte celular em comparação ao shControle. A fim de elucidar o papel do mGluR5 nessa resposta, o experimento anterior foi reproduzido em cultura neuronal mGluR5<sup>-/-</sup>. Interessantemente, o fenômeno observado é semelhante ao visto em cultura mGluR5<sup>+/+</sup>: o estímulo com veículo promoveu na condição shControle e shNEGR1,  $57,84 \pm 3,94\%$  e  $72,95 \pm 6,58\%$  de morte celular respectivamente. Em shNEGR1, o insulto de glutamato (50uM) por 24 horas promove morte celular ( $97,57 \pm 2,42\%$ ) maior em comparação ao controle ( $67,59 \pm 2,54\%$ ) (Figura 11) ( $p=0,0002$ ). Assim, o *knockdown* de NEGR1, mesmo na ausência de mGluR5 promove alterações nos níveis de morte celular mediante insulto de glutamato, indicando que a NEGR1 atua em mecanismos de morte independentes de mGluR5.



**Figura 11 - O estímulo de glutamato promove aumento de morte celular em neurônios shNEGR1 em cultura neuronal mGluR5<sup>-/-</sup>.** O gráfico mostra a porcentagem de morte celular decorrente da aplicação de Glutamato 50  $\mu$ M por 24 horas em cultura mGluR5<sup>-/-</sup>. O knockout de mGluR5 não reverteu a diferença observada no experimento similar realizado em animais mGluR5<sup>+/+</sup>. Os dados representam a média  $\pm$  SEM. \* Indicam que  $p < 0,05$ . Mann Whitney test:  $p = 0,0002$ .



**Figura 12 - Fotomicrografias representativas do resultado do experimento de morte celular em neurônios mGluR5<sup>-/-</sup>.** shControle: condição controle, shNEGR1: condição *knockdown* de NEGR1. A marcação em verde corresponde a células vivas, enquanto a marcação em vermelho corresponde a células mortas. **A** e **B**: morte neuronal basal em

neurônios shControle e shNEGR1, respectivamente. **C** e **D**: Morte neuronal induzida por insulto de glutamato 50  $\mu$ M em neurônios shControle e shNEGR1 respectivamente.

## 6. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados indicam que a NEGR1 tem um papel relevante para a ativação de vias de sinalização mediada por receptores de glutamato. Anteriormente, Carvalho (2022) demonstrou que vias de sinalização dependentes da resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  promovida por mGluR5 são alteradas em neurônios shNEGR1. Diante disso, levantou-se a hipótese de que essas alterações poderiam estar relacionadas a modificações na sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  via mGluR5. A estimulação neuronal com DHPG (Figura 7) resultou em uma mobilização de  $\text{Ca}^{2+}_i$  superior à observada com veículo ou com CTEP+DHPG, em ambas as condições experimentais (shControle e shNEGR1). Mesmo o estímulo veículo promoveu leve resposta de  $\text{Ca}^{2+}$ , provavelmente resultante do tempo do experimento, no qual o neurônio foi submetido a estresse. O fato de não haver diferença entre o estímulo CTEP+DHPG e o veículo confirma que a resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  é decorrente da ativação de mGluR5. É amplamente descrito na literatura que o DHPG promove sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  (Maiese et al., 1999; Rae & Irving, 2004). No entanto, não houve diferença de resposta ao DHPG entre as condições shControle e shNEGR1. Uma possível explicação para isso é que a variação da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  decorrente do estímulo de DHPG é sutil em comparação à resposta decorrente do estímulo de glutamato (Kudo & Ogura, 1986; Randall & Thayer, 1992). Os resultados sugerem que apesar dessa interação física, NEGR1 não é capaz de modular a resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  via mGluR5 especificamente.

Além de mGluR5, outros receptores de membrana promovem a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  dependente de glutamato (Traynelis et al., 2010). A NEGR1 interagindo com o mGluR5 poderia afetar indiretamente a ativação de outros receptores modulados por mGluR5. O DHPG não promoveu resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  diferente entre neurônios shControle e shNEGR1, porém o estímulo de glutamato promoveu resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  menor em neurônios shNEGR1 em comparação ao shControle (Figura 8). Essa diferença promovida pelo *knockdown* de NEGR1 vai ao encontro de outros trabalhos que demonstram a importância de MACs para a homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$ . (Sheng et al.,

2013). N-caderinas e beta Integrinas, por exemplo, são capazes de afetar a homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  e canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem (Monier-Gavelle & Duband, 1997). Além disso, trabalhos já demonstraram que proteínas que promovem adesão celular são capazes de modificar a ativação de NMDAR (Hammond et al., 2006; C.-Y. Wang et al., 2006). É importante ressaltar que a adição de bloqueadores farmacológicos para receptores de glutamato nos experimentos realizados não extingue completamente a resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  uma vez que ela é mediada por outros receptores e canais dependentes de glutamato, além de mGluR5 e NMDAR.

O trabalho de Lee (2021) com animais  $\text{NEGR1}^{-/-}$  demonstrou que processos dependentes da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ , como a taxa de salivação, foram alterados. A  $\text{NEGR1}$  se mostrou relevante na regulação de canais BK, canais de potássio ativados pela sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  e despolarização celular (Romanenko et al., 2010). A atividade do canal BK é maior em camundongos  $\text{NEGR1}^{-/-}$ , promovendo aumento da corrente decorrente da ativação do receptor. Além disso, foi observado que a corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por carbacol nessas células (receptor colinérgico muscarínico) foi reduzida em células de animais  $\text{NEGR1}^{-/-}$  (J. Lee, 2021). Tal evidência corrobora o papel de  $\text{NEGR1}$  em regular receptores de membrana, o potencial de membrana e a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$ . Experimentos complementares avaliando a ativação e/ou bloqueio seletivo de outros receptores e canais envolvidos na resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  podem contribuir para esclarecer o papel individual de cada receptor na diferença de sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  entre neurônios  $\text{shNEGR1}$  e  $\text{shControle}$ .

Os receptores mGluR5 e NMDAR, além de interagirem fisicamente pela plataforma de proteínas mGluR5-Homer-Shank-GKAP-PSD95-NMDAR, interagem funcionalmente por meio de vias intracelulares, regulando-se mutuamente (Abd-Elrahman & Ferguson, 2022; Challiss et al., 1994; Fitzjohna et al., 1996; Harvey & Collingridge, 1993; Lüthi et al., 1994). A sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula é dependente de muitas vias e receptores, dessa forma é difícil afirmar por qual via e por qual receptor a diferença entre  $\text{shControle}$  e  $\text{shNEGR1}$  acontece. É possível se questionar, por exemplo, se essa resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  reduzida em  $\text{shNEGR1}$  poderia promover alteração na atividade de quinases e fosfatases que regulam a ativação de NMDAR (Challiss et al., 1994; Lüthi et al., 1994; Sladeczek et al., 1985; Sugiyama et al., 1987; Willard & Koochekpour, 2013). A influência de  $\text{NEGR1}$  parece ser sobre ambos os receptores (mGluR5 e NMDAR), uma vez que tanto o bloqueio de mGluR5 (por CTEP)

quanto o bloqueio de NMDAR (por MK-801) eliminaram a diferença da resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  entre shControle e shNEGR1. Isso sugere que, para que a diferença da resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  vista entre a condição shControle e shNEGR1 apareça, é fundamental que ambos os receptores estejam ativados. No entanto, não estão claros todos os pontos afetados por shNEGR1.

Além dessa interação direta entre duas proteínas (NEGR1-mGluR5), é plausível que a NEGR1 exerça um papel mais complexo, interagindo diretamente com o receptor por meio de ligações em cis ou em trans ou em sua forma solúvel (Pischedda & Piccoli, 2016) com outros receptores de glutamato. Caso a NEGR1 seja capaz de interagir fisicamente com o NMDAR, isso seria uma explicação para a diferença na sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  observada entre neurônios shControle e shNEGR1. Além disso, existe a possibilidade de NEGR1 compor uma plataforma de proteínas (NEGR1-mGluR5-NMDAR ou mGluR5-NEGR1-NMDA). Nesse sentido, a NEGR1 modularia mGluR5, que é capaz de modular NMDAR (Sladeczek et al., 1985; Sugiyama et al., 1987; Willard & Koochekpour, 2013), ou ela atuaria como intermediário, seja fisicamente ou funcionalmente. No entanto, essas hipóteses precisam ser testadas em experimentos que avaliem outras possíveis interações de NEGR1 e vias afetadas por ela. Experimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando glutamato como estímulo em um modelo mGluR5<sup>-/-</sup> podem ajudar a esclarecer o papel de mGluR5 na diferença de resposta observada, assim como experimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  utilizando NMDA e Glicina como estímulo, a fim de verificar a ativação específica de NMDAR.

Os experimentos de  $\text{Ca}^{2+}$  demonstram a diferença de resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  em um período curto de tempo. Para entender como a diminuição da resposta de  $\text{Ca}^{2+}$  decorrente do estímulo com glutamato na condição shNEGR1 pode afetar a homeostase neuronal a longo prazo e também elucidar o papel de shNEGR1 em respostas dependentes de NMDAR, foram realizados experimentos de morte celular induzida por glutamato. Foi observado que na condição shControle que sofreu insulto de glutamato, não foi observado aumento de morte em relação ao veículo, o que vai contra o esperado. Outros trabalhos demonstram um aumento de até 60% de morte decorrente do estímulo com glutamato (Batista et al., 2016; Cheung et al., 1998; Diemert et al., 2012; Doria et al., 2018). Vale ressaltar também que o processo de transdução por vetor viral é por si só estressante para os neurônios, o que explicaria porque a morte celular mesmo no veículo é alta. Outros experimentos de morte celular

em neurônios que não sofreram transdução apresentam taxa de morte em torno de 20% quando não estimulados (Batista et al., 2016; Doria et al., 2013). Os resultados dos experimentos de morte demonstram também que o insulto de glutamato em neurônios shNEGR1 é mais danoso (Figura 9 e 10). Os resultados dos experimentos de morte e de  $Ca^{2+}$  parecem conflitantes, visto que o estímulo de glutamato promove resposta menor de  $Ca^{2+}$  em função da diminuição da expressão de NEGR1. Entretanto, é válido destacar que a diminuição da  $[Ca^{2+}]_i$  em função da NEGR1 é pequena e talvez insuficiente para conter o processo de excitotoxicidade. Além disso, o experimento de morte analisa o resultado de um insulto de 24h, ou seja, um estímulo bem mais prolongado. Assim, hipotetizamos que esse efeito mais danoso produzido pelo insulto de glutamato em neurônios shNEGR1 poderia ser devido ao fato que a presença da NEGR1 promoveria maior resiliência ao insulto de glutamato. Por exemplo, a diminuição da ativação de ERK1/2 em neurônios shNEGR1 (Carvalho, 2022) poderia explicar porque o insulto de glutamato é mais agressivo na condição shNEGR1. Também foi demonstrado que o *knockdown* de NEGR1 diminui a expressão de BDNF e ARC/ARG3.1, genes regulados por mGluR5 que promovem a sobrevivência neuronal. A NEGR1, portanto, poderia atuar como neuroprotetora, promovendo vias de sobrevivência neuronal via mGluR5 ou até mesmo por outros receptores, como o FGFR2. No entanto, essas vias de proteção não foram diretamente analisadas no presente trabalho no contexto da morte induzida por glutamato. O trabalho de Singh 2018 demonstrou maior susceptibilidade de animais NEGR1<sup>-/-</sup> a convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). O PTZ é um antagonista dos receptores A do ácido gama-aminobutírico (GABA), e suprime a atividade de sinapses inibitórias, culminando em maior excitação neuronal que promove convulsões (Shimada & Yamagata, 2018; Squires et al., 1984; Tourov et al., 1996). Embora o PTZ atue sobre outra classe de receptores, esses resultados são uma evidência de que a excitabilidade neuronal está alterada em animais NEGR1<sup>-/-</sup>. Tal efeito poderia contribuir para a diferença de resposta observada entre shControle e shNEGR1 após estímulo com glutamato, tanto na resposta de  $Ca^{2+}$  quanto na resposta de morte neuronal.

Além da função ionotrópica de NMDAR, sua função não ionotrópica vem sendo desvendada por experimentos recentes. O NMDAR forma agregados na membrana e a composição e localização desses agregados, assim como a difusão do receptor na

membrana plasmática, promovem um ajuste fino da excitabilidade neuronal, por uma ativação tônica do receptor. As interações proteicas de NMDAR são capazes de promover ou inibir esses fenômenos, alterando a homeostase neuronal. Vale lembrar que a função iônica do receptor não é alterada nesses casos (Dupuis et al., 2023). A encefalopatia anti-NMDAR, por exemplo é uma doença autoimune na qual auto-anticorpos se ligam à subunidade GluN1 do NMDAR (Gleichman et al., 2012; Hughes et al., 2010) e sem alterar suas propriedades de canal, desregula a difusão e a organização do conteúdo de NMDAR sináptico (Dean et al., 2022; Kellermayer et al., 2018). Como resultado, aparecem sintomas psicóticos, discinesia e convulsões (Dalmau et al., 2007).

Com base nos resultados de morte celular apresentados, podemos nos questionar se a NEGR1, como proteína parceira, poderia modular a composição, localização e difusão de NMDAR nos agregados na sinapse, alterando a sua atividade não ionotrópica. Experimentos como a avaliação da expressão de NMDAR na região sináptica de neurônios shNEGR1 poderia ajudar a responder essa pergunta. Caso seja confirmado que NEGR1 modula a atividade não iônica de NMDAR, a NEGR1 se mostraria como excelente alvo terapêutico para doenças que envolvem excitotoxicidade em sua fisiopatologia, como epilepsias e doenças neurodegenerativas (DA e DH). Os experimentos de morte celular com animais mGluR5<sup>-/-</sup> demonstram que o aumento da morte induzida por glutamato na condição shNEGR1 é independente de mGluR5, reforçando que outros receptores atuam nessa resposta.

Os efeitos do *knockdown* de NEGR1 apontam para sua relevância para a homeostase do neurônio, mas também para a fisiopatologia de distúrbios do sistema nervoso. As respostas de Ca<sup>2+</sup> e o glutamato são importantes no contexto de doenças neurológicas como a DA e outros receptores de glutamato vêm sendo estudados como alvo terapêutico para doenças neurológicas. Com base nos resultados apresentados e na literatura corrente, a NEGR1 supostamente poderia atuar como modulador alostérico endógeno de receptores de glutamato. Experimentos adicionais devem ser realizados a fim de esclarecer quais receptores são afetados e por qual mecanismo.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados evidenciam a função da NEGR1 em modular receptores de glutamato. Observamos que a sinalização de  $Ca^{2+}$  decorrente do estímulo de glutamato é diminuída quando se faz o *knockdown* de NEGR1. Apesar disso, um insulto prolongado de glutamato, é significativamente mais mais danoso quando o *knockdown* de NEGR1 é realizado, sugerindo uma função neuroprotetora da NEGR1. O efeito de NEGR1 sobre a sinalização de cálcio e sobrevivência celular em neurônios não havia sido descrito na literatura. O mecanismo pelo qual esses fenômenos acontecem não está elucidado. No entanto, além da interação entre NEGR1 e mGluR5 fica evidente o papel de NEGR1 sobre a ativação de NMDAR, um achado inédito na literatura. Portanto, a NEGR1 se apresenta como uma possível moduladora endógena de mGluR5 e NMDAR. Dessa forma, o estudo sobre a NEGR1 é relevante para a compreensão da fisiologia neuronal e da fisiopatologia de doenças do SNC.

## REFERÊNCIAS

- Abd-Elrahman, K. S., & Ferguson, S. S. G. (2022). Noncanonical Metabotropic Glutamate Receptor 5 Signaling in Alzheimer's Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 62(1), 235–254. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-021821-091747>
- Alagarsamy, S., Marino, M. J., Rouse, S. T., Gereau, R. W., Heinemann, S. F., & Conn, P. J. (1999). Activation of NMDA receptors reverses desensitization of mGluR5 in native and recombinant systems. *Nature Neuroscience*, 2(3), 234–240. <https://doi.org/10.1038/6338>
- Alagarsamy, S., Saugstad, J., Warren, L., Mansuy, I. M., Gereau, R. W., & Conn, P. J. (2005). NMDA-induced potentiation of mGluR5 is mediated by activation of protein phosphatase 2B/calcineurin. *Neuropharmacology*, 49, 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.05.005>
- Armada-Moreira, A., Gomes, J. I., Pina, C. C., Savchak, O. K., Gonçalves-Ribeiro, J., Rei, N., Pinto, S., Morais, T. P., Martins, R. S., Ribeiro, F. F., Sebastião, A. M., Crunelli, V., & Vaz, S. H. (2020). Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 90. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00090>
- Augustine, G. J., Santamaria, F., & Tanaka, K. (2003). Local Calcium Signaling in Neurons. *Neuron*, 40(2), 331–346. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00639-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00639-1)
- Ayala, J. E., Chen, Y., Banko, J. L., Sheffler, D. J., Williams, R., Telk, A. N., Watson, N. L., Xiang, Z., Zhang, Y., Jones, P. J., Lindsley, C. W., Olive, M. F., & Conn, P. J. (2009). mGluR5 Positive Allosteric Modulators Facilitate both Hippocampal LTP and LTD and Enhance Spatial Learning.

*Neuropsychopharmacology*, 34(9), 2057–2071.

<https://doi.org/10.1038/npp.2009.30>

Batista, E. M. L., Doria, J. G., Ferreira-Vieira, T. H., Alves-Silva, J., Ferguson, S. S. G., Moreira, F. A., & Ribeiro, F. M. (2016). Orchestrated activation of mGluR5 and CB1 promotes neuroprotection. *Molecular Brain*, 9(1), 80.

<https://doi.org/10.1186/s13041-016-0259-6>

Bertaso, F., Roussignol, G., Worley, P., Bockaert, J., Fagni, L., & Ango, F. (2010). Homer1a-Dependent Crosstalk Between NMDA and Metabotropic Glutamate Receptors in Mouse Neurons. *PLoS ONE*, 5(3), e9755.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009755>

Biedermann, J., Braunbeck, S., Plested, A. J. R., & Sun, H. (2021). Nonselective cation permeation in an AMPA-type glutamate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(8), e2012843118.

<https://doi.org/10.1073/pnas.2012843118>

Carobrez, A. D. P. (2003). Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 25(suppl 2), 52–58.

<https://doi.org/10.1590/S1516-44462003000600012>

Carvalho, T. G. de. (2022). *Investigação do interactoma do receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 (mGluR5): Enfoque no fator de crescimento neuronal 1 (NEGR1)*. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

Challiss, R. A. J., Mistry, R., Gray, D. W., & Nahorski, S. R. (1994). Modulatory effects of NMDA on phosphoinositide responses evoked by the metabotropic glutamate receptor agonist 1 S ,3 R -ACPD in neonatal rat cerebral cortex.

*British Journal of Pharmacology*, 112(1), 231–239.

<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1994.tb13057.x>

- Cheon, Y., Yoo, A., Seo, H., Yun, S.-Y., Lee, H., Lim, H., Kim, Y., Che, L., & Lee, S. (2021). Na/K-ATPase beta1-subunit associates with neuronal growth regulator 1 (NEGR1) to participate in intercellular interactions. *BMB Reports*, *54*(3), 164–169. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2021.54.3.116>
- Cheung, N. S., Pascoe, C. J., Giardina, S. F., John, C. A., & Beart, P. M. (1998). Micromolar l-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones. *Neuropharmacology*, *37*(10–11), 1419–1429. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(98\)00123-3](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(98)00123-3)
- Choe, E. S., & Wang, J. Q. (2001). Group I metabotropic glutamate receptor activation increases phosphorylation of cAMP response element-binding protein, Elk-1, and extracellular signal-regulated kinases in rat dorsal striatum. *Molecular Brain Research*, *94*(1–2), 75–84. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00217-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00217-0)
- Choi, D. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, *1*(8), 623–634. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90162-6](https://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90162-6)
- Dai, S., Zhuang, H., Li, Z., Chen, Z., Chai, Y., & Zhou, Q. (2024). miR-122/NEGR1 axis contributes colorectal cancer liver metastasis by PI3K/AKT pathway and macrophage modulation. *Journal of Translational Medicine*, *22*(1), 1060. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05901-5>
- Dalmau, J., Tüzün, E., Wu, H., Masjuan, J., Rossi, J. E., Voloschin, A., Baehring, J. M., Shimazaki, H., Koide, R., King, D., Mason, W., Sansing, L. H., Dichter, M. A., Rosenfeld, M. R., & Lynch, D. R. (2007). Paraneoplastic anti-*N*-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma. *Annals of Neurology*, *61*(1), 25–36. <https://doi.org/10.1002/ana.21050>

- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65(1), 1–105.  
[https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00067-8)
- De Souza, J. M., Abd-Elrahman, K. S., Ribeiro, F. M., & Ferguson, S. S. G. (2020). mGluR5 regulates REST/NRSF signaling through N-cadherin/ $\beta$ -catenin complex in Huntington's disease. *Molecular Brain*, 13(1), 118.  
<https://doi.org/10.1186/s13041-020-00657-7>
- de Souza, J. M., Ferreira-Vieira, T. H., Maciel, E. M. A., Silva, N. C., Lima, I. B. Q., Doria, J. G., Olmo, I. G., & Ribeiro, F. M. (2022). mGluR5 ablation leads to age-related synaptic plasticity impairments and does not improve Huntington's disease phenotype. *Scientific Reports*, 12(1), 8982.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-13029-z>
- Dean, C. A., Metzbower, S. R., Dessain, S. K., Blanpied, T. A., & Benavides, D. R. (2022). Regulation of NMDA Receptor Signaling at Single Synapses by Human Anti-NMDA Receptor Antibodies. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 940005. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.940005>
- Diemert, S., Dolga, A. M., Tobaben, S., Grohm, J., Pfeifer, S., Oexler, E., & Culmsee, C. (2012). Impedance measurement for real time detection of neuronal cell death. *Journal of Neuroscience Methods*, 203(1), 69–77.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.09.012>
- Doria, J., De Souza, J. M., Silva, F. R., Olmo, I. G., Carvalho, T. G., Alves-Silva, J., Ferreira-Vieira, T. H., Santos, J. T., Xavier, C. Q. S., Silva, N. C., Maciel, E. M. A., Conn, P. J., & Ribeiro, F. M. (2018). The mGluR5 positive allosteric modulator VU0409551 improves synaptic plasticity and memory of a mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 147(2), 222–239.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.14555>

- Doria, J., Silva, F., de Souza, J., Vieira, L., Carvalho, T., Reis, H., Pereira, G., Dobransky, T., & Ribeiro, F. (2013). Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease. *British Journal of Pharmacology*, *169*(4), 909–921. <https://doi.org/10.1111/bph.12164>
- Dupuis, J. P., Nicole, O., & Groc, L. (2023). NMDA receptor functions in health and disease: Old actor, new dimensions. *Neuron*, *111*(15), 2312–2328. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.05.002>
- Fitzjohnna, S. M., Irving, A. J., Palmer, M. J., Harvey, J., Lodge, D., & Collingridge, G. L. (1996). Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters*, *203*(3), 211–213. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12301-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12301-6)
- Funatsu, N., Miyata, S., Kumanogoh, H., Shigeta, M., Hamada, K., Endo, Y., Sokawa, Y., & Maekawa, S. (1999). Characterization of a Novel Rat Brain Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein (Kilon), a Member of the IgLON Cell Adhesion Molecule Family. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(12), 8224–8230. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.8224>
- Gereau, R. W., & Heinemann, S. F. (1998). Role of Protein Kinase C Phosphorylation in Rapid Desensitization of Metabotropic Glutamate Receptor 5. *Neuron*, *20*(1), 143–151. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80442-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80442-0)
- Gleichman, A. J., Spruce, L. A., Dalmau, J., Seeholzer, S. H., & Lynch, D. R. (2012). Anti-NMDA Receptor Encephalitis Antibody Binding Is Dependent on Amino Acid Identity of a Small Region within the GluN1 Amino Terminal Domain. *The Journal of Neuroscience*, *32*(32), 11082–11094. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0064-12.2012>

- Hammond, M. S. L., Sims, C., Parameshwaran, K., Suppiramaniam, V., Schachner, M., & Dityatev, A. (2006). Neural Cell Adhesion Molecule-associated Polysialic Acid Inhibits NR2B-containing N-Methyl-d-aspartate Receptors and Prevents Glutamate-induced Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(46), 34859–34869. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602568200>
- Hámor, P. U., Knackstedt, L. A., & Schwendt, M. (2023). The role of metabotropic glutamate receptors in neurobehavioral effects associated with methamphetamine use. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 168, p. 177–219). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2022.10.005>
- Harvey, J., & Collingridge, G. L. (1993). Signal transduction pathways involved in the acute potentiation of NMDA responses by 1 S ,3 R -ACPD in rat hippocampal slices. *British Journal of Pharmacology*, *109*(4), 1085–1090. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb13733.x>
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A., & Robinson, S. R. (1999). Astrocytes: Glutamate producers for neurons. *Journal of Neuroscience Research*, *57*(4), 417–428. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990815\)57:4<417::AID-JNR1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990815)57:4<417::AID-JNR1>3.0.CO;2-N)
- Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned Glutamate Receptors. *Annual Review of Neuroscience*, *17*(1), 31–108. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.17.030194.000335>
- Hughes, E. G., Peng, X., Gleichman, A. J., Lai, M., Zhou, L., Tsou, R., Parsons, T. D., Lynch, D. R., Dalmau, J., & Balice-Gordon, R. J. (2010). Cellular and Synaptic Mechanisms of Anti-NMDA Receptor Encephalitis. *The Journal of Neuroscience*, *30*(17), 5866–5875. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0167-10.2010>

- Jin, L. E., Wang, M., Galvin, V. C., Lightbourne, T. C., Conn, P. J., Arnsten, A. F. T., & Paspalas, C. D. (2018). mGluR2 versus mGluR3 Metabotropic Glutamate Receptors in Primate Dorsolateral Prefrontal Cortex: Postsynaptic mGluR3 Strengthen Working Memory Networks. *Cerebral Cortex*, *28*(3), 974–987. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhx005>
- Karis, K., Eskla, K.-L., Kaare, M., Täht, K., Tuusov, J., Visnapuu, T., Innos, J., Jayaram, M., Timmusk, T., Weickert, C. S., Väli, M., Vasar, E., & Philips, M.-A. (2018). Altered Expression Profile of IgLON Family of Neural Cell Adhesion Molecules in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Schizophrenic Patients. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *11*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00008>
- Kato, H. K., Kassai, H., Watabe, A. M., Aiba, A., & Manabe, T. (2012). Functional coupling of the metabotropic glutamate receptor, InsP3 receptor and L-type Ca<sup>2+</sup> channel in mouse CA1 pyramidal cells. *The Journal of Physiology*, *590*(13), 3019–3034. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.232942>
- Kawamoto, E. M., Vivar, C., & Camandola, S. (2012). Physiology and Pathology of Calcium Signaling in the Brain. *Frontiers in Pharmacology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00061>
- Kellermayer, B., Ferreira, J. S., Dupuis, J., Levet, F., Grillo-Bosch, D., Bard, L., Linares-Loyez, J., Bouchet, D., Choquet, D., Rusakov, D. A., Bon, P., Sibarita, J.-B., Cognet, L., Sainlos, M., Carvalho, A. L., & Groc, L. (2018). Differential Nanoscale Topography and Functional Role of GluN2-NMDA Receptor Subtypes at Glutamatergic Synapses. *Neuron*, *100*(1), 106-119.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.012>
- Kim, J.-H., Marton, J., Ametamey, S. M., & Cumming, P. (2020). A Review of

- Molecular Imaging of Glutamate Receptors. *Molecules*, 25(20), 4749.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25204749>
- Kudo, Y., & Ogura, A. (1986). Glutamate-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in isolated hippocampal neurones. *British Journal of Pharmacology*, 89(1), 191–198. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1986.tb11135.x>
- Lee, J. (2021). *The regulation of calcium signal and ion channels in salivary gland*.  
[https://dcollection.snu.ac.kr/public\\_resource/pdf/000000168471\\_20250122110927.pdf](https://dcollection.snu.ac.kr/public_resource/pdf/000000168471_20250122110927.pdf)
- Lee, S.-H., Shim, J., & Kaang, B.-K. (2013). The role of cell adhesion molecules (CAMs) in defining synapse-specific function and plasticity. *Animal Cells and Systems*, 17(1), 1–6. <https://doi.org/10.1080/19768354.2013.769898>
- Luján, R., Nusser, Z., Roberts, J. D. B., Shigemoto, R., & Somogyi, P. (1996). Perisynaptic Location of Metabotropic Glutamate Receptors mGluR1 and mGluR5 on Dendrites and Dendritic Spines in the Rat Hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 8(7), 1488–1500.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1996.tb01611.x>
- Lüthi, A., Gähwiler, B. H., & Gerber, U. (1994). Potentiation of a metabotropic glutamatergic response following NMDA receptor activation in rat hippocampus. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 427(1–2), 197–202. <https://doi.org/10.1007/BF00585965>
- Maccarrone, G., Ditzen, C., Yassouridis, A., Rewerts, C., Uhr, M., Uhlen, M., Holsboer, F., & Turck, C. W. (2013). Psychiatric patient stratification using biosignatures based on cerebrospinal fluid protein expression clusters. *Journal of Psychiatric Research*, 47(11), 1572–1580.

<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.07.021>

Maiese, K., Ahmad, I., TenBroeke, M., & Gallant, J. (1999). Metabotropic glutamate receptor subtypes independently modulate neuronal intracellular calcium.

*Journal of Neuroscience Research*, 55(4), 472–485.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990215\)55:4<472::AID-JNR7>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990215)55:4<472::AID-JNR7>3.0.CO;2-Q)

Mao, L., Yang, L., Tang, Q., Samdani, S., Zhang, G., & Wang, J. Q. (2005). The Scaffold Protein Homer1b/c Links Metabotropic Glutamate Receptor 5 to Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase Cascades in Neurons. *Journal of Neuroscience*, 25(10), 2741–2752.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4360-04.2005>

Masu, M., Tanabe, Y., Tsuchida, K., Shigemoto, R., & Nakanishi, S. (1991).

Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature*, 349(6312), 760–765. <https://doi.org/10.1038/349760a0>

Miyata, S., Funatsu, N., Matsunaga, W., Kiyohara, T., Sokawa, Y., & Maekawa, S. (2000). Expression of the IgLON cell adhesion molecules kilon and OBCAM in hypothalamic magnocellular neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 424(1), 74–85. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20000814\)424:1<74::AID-CNE6>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20000814)424:1<74::AID-CNE6>3.0.CO;2-5)

Mody, I. (1995). NMDA receptor-dependent excitotoxicity: The role of intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16(10), 356–359.

[https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)89070-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)89070-7)

Molecular Probes. ([s.d.]). *Fura-2, AM, cell permeant*.

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/br/pt/F1221>

Monaghan, D. T., Bridges, R. J., & Cotman, C. W. (1989). The Excitatory Amino Acid

- Receptors: Their Classes, Pharmacology, and Distinct Properties in the Function of the Central Nervous System. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 29(1), 365–402.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pa.29.040189.002053>
- Monier-Gavelle, F., & Duband, J.-L. (1997). Cross Talk between Adhesion Molecules: Control of N-cadherin Activity by Intracellular Signals Elicited by  $\beta 1$  and  $\beta 3$  Integrins in Migrating Neural Crest Cells. *The Journal of Cell Biology*, 137(7), 1663–1681. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.7.1663>
- Neves, D., Salazar, I. L., Almeida, R. D., & Silva, R. M. (2023). Molecular mechanisms of ischemia and glutamate excitotoxicity. *Life Sciences*, 328, 121814. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121814>
- Ni, H., Xu, M., Zhan, G.-L., Fan, Y., Zhou, H., Jiang, H.-Y., Lu, W.-H., Tan, L., Zhang, D.-F., Yao, Y.-G., & Zhang, C. (2018). The GWAS Risk Genes for Depression May Be Actively Involved in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64(4), 1149–1161. <https://doi.org/10.3233/JAD-180276>
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), 295–322.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533>
- Noh, K., Park, J.-C., Han, J.-S., & Lee, S. J. (2020). From Bound Cells Comes a Sound Mind: The Role of Neuronal Growth Regulator 1 in Psychiatric Disorders. *Experimental Neurobiology*, 29(1), 1–10.  
<https://doi.org/10.5607/en.2020.29.1.1>
- Olmo, R. P., Ferreira, A. G. A., Izidoro-Toledo, T. C., Aguiar, E. R. G. R., De Faria, I. J. S., De Souza, K. P. R., Osório, K. P., Kuhn, L., Hammann, P., De Andrade,

- E. G., Todjro, Y. M., Rocha, M. N., Leite, T. H. J. F., Amadou, S. C. G., Armache, J. N., Paro, S., De Oliveira, C. D., Carvalho, F. D., Moreira, L. A., ... Marques, J. T. (2018). Control of dengue virus in the midgut of *Aedes aegypti* by ectopic expression of the dsRNA-binding protein Loqs2. *Nature Microbiology*, 3(12), 1385–1393. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0268-6>
- Olney, J. (2003). Excitotoxicity, apoptosis and neuropsychiatric disorders. *Current Opinion in Pharmacology*, 3(1), 101–109. [https://doi.org/10.1016/S1471-4892\(02\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4892(02)00002-4)
- Olney, J. W. (1969). Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. *Science*, 164(3880), 719–721. <https://doi.org/10.1126/science.164.3880.719>
- Pischedda, F., & Piccoli, G. (2016). The IgLON Family Member Negr1 Promotes Neuronal Arborization Acting as Soluble Factor via FGFR2. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00089>
- Pischedda, F., Szczurkowska, J., Cinaru, M. D., Giesert, F., Vezzoli, E., Ueffing, M., Sala, C., Francolini, M., Hauck, S. M., Cancedda, L., & Piccoli, G. (2014). A Cell Surface Biotinylation Assay to Reveal Membrane-associated Neuronal Cues: Negr1 Regulates Dendritic Arborization. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(3), 733–748. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031716>
- Rae, M. G., & Irving, A. J. (2004). Both mGluR1 and mGluR5 mediate Ca<sup>2+</sup> release and inward currents in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuropharmacology*, 46(8), 1057–1069. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.02.002>
- Ranaivoson, F. M., Turk, L. S., Ozgul, S., Kakehi, S., Von Daake, S., Lopez, N., Trobiani, L., De Jaco, A., Denissova, N., Demeler, B., Özkan, E., Montelione,

- G. T., & Comoletti, D. (2019). A Proteomic Screen of Neuronal Cell-Surface Molecules Reveals IgLONs as Structurally Conserved Interaction Modules at the Synapse. *Structure*, 27(6), 893-906.e9.  
<https://doi.org/10.1016/j.str.2019.03.004>
- Randall, R., & Thayer, S. (1992). Glutamate-induced calcium transient triggers delayed calcium overload and neurotoxicity in rat hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, 12(5), 1882–1895.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-05-01882.1992>
- Ribeiro, F. M., Vieira, L. B., Pires, R. G. W., Olmo, R. P., & Ferguson, S. S. G. (2017). Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, 115, 179–191.  
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.11.013>
- Romanenko, V., Thompson, J., & Begenisich, T. (2010). Ca<sup>2+</sup>-activated K channels in parotid acinar cells: The functional basis for the hyperpolarized activation of BK channels. *Channels*, 4(4), 278–288.  
<https://doi.org/10.4161/chan.4.4.12197>
- Rong, R., Ahn, J.-Y., Huang, H., Nagata, E., Kalman, D., Kapp, J. A., Tu, J., Worley, P. F., Snyder, S. H., & Ye, K. (2003). PI3 kinase enhancer–Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. *Nature Neuroscience*, 6(11), 1153–1161. <https://doi.org/10.1038/nn1134>
- Salluzzo, M., Vianello, C., Abdullatef, S., Rimondini, R., Piccoli, G., & Carboni, L. (2023). The Role of IgLON Cell Adhesion Molecules in Neurodegenerative Diseases. *Genes*, 14(10), 1886. <https://doi.org/10.3390/genes14101886>
- Samanta, D., & Almo, S. C. (2015). Nectin family of cell-adhesion molecules: Structural and molecular aspects of function and specificity. *Cellular and*

*Molecular Life Sciences*, 72(4), 645–658. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1763-4>

Sanz, R., Ferraro, G. B., & Fournier, A. E. (2015). IgLON Cell Adhesion Molecules Are Shed from the Cell Surface of Cortical Neurons to Promote Neuronal Growth. *Journal of Biological Chemistry*, 290(7), 4330–4342. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.628438>

Schousboe, A., Westergaard, N., Waagepetersen, H. S., Larsson, O. M., Bakken, I. J., & Sonnewald, U. (1997). Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia*, 21(1), 99–105.

Sengmany, K., Singh, J., Stewart, G. D., Conn, P. J., Christopoulos, A., & Gregory, K. J. (2017). Biased allosteric agonism and modulation of metabotropic glutamate receptor 5: Implications for optimizing preclinical neuroscience drug discovery. *Neuropharmacology*, 115, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.001>

Sheng, L., Leshchyns'ka, I., & Sytnyk, V. (2013). Cell adhesion and intracellular calcium signaling in neurons. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-94>

Shigemoto, R., Kinoshita, A., Wada, E., Nomura, S., Ohishi, H., Takada, M., Flor, P. J., Neki, A., Abe, T., Nakanishi, S., & Mizuno, N. (1997). Differential Presynaptic Localization of Metabotropic Glutamate Receptor Subtypes in the Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 17(19), 7503–7522. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-19-07503.1997>

Shimada, T., & Yamagata, K. (2018). Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model. *Journal of Visualized Experiments*, 136, 56573. <https://doi.org/10.3791/56573-v>

- Simons, T. J. B. (1988). Calcium and neuronal function. *Neurosurgical Review*, 11(2), 119–129. <https://doi.org/10.1007/BF01794675>
- Singh, K., Jayaram, M., Kaare, M., Leidmaa, E., Jagomäe, T., Heinla, I., Hickey, M. A., Kaasik, A., Schäfer, M. K., Innos, J., Lilleväli, K., Philips, M.-A., & Vasar, E. (2019). Neural cell adhesion molecule Negr1 deficiency in mouse results in structural brain endophenotypes and behavioral deviations related to psychiatric disorders. *Scientific Reports*, 9(1), 5457. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41991-8>
- Sladeczek, F., Pin, J.-P., Récasens, M., Bockaert, J., & Weiss, S. (1985). Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature*, 317(6039), 717–719. <https://doi.org/10.1038/317717a0>
- Sliva, K., & Schnierle, B. S. (2010). Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA. *Virology Journal*, 7(1), 248. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-248>
- Squires, R. F., Saederup, E., Crawley, J. N., Skolnick, P., & Paul, S. M. (1984). Convulsant potencies of tetrazoles are highly correlated with actions on GABA/benzodiazepine/picrotoxin receptor complexes in brain. *Life Sciences*, 35(14), 1439–1444. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(84\)90159-0](https://doi.org/10.1016/0024-3205(84)90159-0)
- Stoppel, L. J., Auerbach, B. D., Senter, R. K., Preza, A. R., Lefkowitz, R. J., & Bear, M. F. (2017).  $\beta$ -Arrestin2 Couples Metabotropic Glutamate Receptor 5 to Neuronal Protein Synthesis and Is a Potential Target to Treat Fragile X. *Cell Reports*, 18(12), 2807–2814. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.075>
- Sugiyama, H., Ito, I., & Hirono, C. (1987). A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid metabolism. *Nature*, 325(6104), 531–533. <https://doi.org/10.1038/325531a0>

- Szczurkowska, J., Pischedda, F., Pinto, B., Managò, F., Haas, C. A., Summa, M., Bertorelli, R., Papaleo, F., Schäfer, M. K., Piccoli, G., & Cancedda, L. (2018). NEGR1 and FGFR2 cooperatively regulate cortical development and core behaviours related to autism disorders in mice. *Brain*.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awy190>
- Takeichi, M. (1995). Morphogenetic roles of classic cadherins. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(5), 619–627. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80102-2](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80102-2)
- Thomas, U. (2002). Modulation of synaptic signalling complexes by Homer proteins. *Journal of Neurochemistry*, 81(3), 407–413. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00869.x>
- Toth, A. B., Shum, A. K., & Prakriya, M. (2016). Regulation of neurogenesis by calcium signaling. *Cell Calcium*, 59(2–3), 124–134.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.02.011>
- Tourov, A., Ferri, R., Del Gracco, S., Elia, M., Musumeci, S. A., & Stefanini, M. C. (1996). Spike morphology in PTZ-induced generalized and cobalt-induced partial experimental epilepsy. *Functional Neurology*, 11(5), 237–245.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., Hansen, K. B., Yuan, H., Myers, S. J., & Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, 62(3), 405–496.  
<https://doi.org/10.1124/pr.109.002451>
- Tu, J. C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J. P., Petralia, R. S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V. K., Lanahan, A. A., Sheng, M., & Worley, P. F. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 Complexes by the Shank Family of Postsynaptic Density Proteins. *Neuron*, 23(3), 583–592. <https://doi.org/10.1016/S0896->

6273(00)80810-7

- Tu, J. C., Xiao, B., Yuan, J. P., Lanahan, A. A., Leoffert, K., Li, M., Linden, D. J., & Worley, P. F. (1998). Homer Binds a Novel Proline-Rich Motif and Links Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors with IP3 Receptors. *Neuron*, *21*(4), 717–726. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80589-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80589-9)
- Tymianski, M., & Tator, C. H. (1996). Normal and Abnormal Calcium Homeostasis in Neurons: A Basis for the Pathophysiology of Traumatic and Ischemic Central Nervous System Injury. *Neurosurgery*, *38*(6), 1176–1195. <https://doi.org/10.1097/00006123-199606000-00028>
- Venkannagari, H., Kasper, J. M., Misra, A., Rush, S. A., Fan, S., Lee, H., Sun, H., Seshadrinathan, S., Machius, M., Hommel, J. D., & Rudenko, G. (2020). Highly Conserved Molecular Features in IgLONs Contrast Their Distinct Structural and Biological Outcomes. *Journal of Molecular Biology*, *432*(19), 5287–5303. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.07.014>
- Wang, C.-Y., Chang, K., Petralia, R. S., Wang, Y.-X., Seabold, G. K., & Wenthold, R. J. (2006). A Novel Family of Adhesion-Like Molecules That Interacts with the NMDA Receptor. *The Journal of Neuroscience*, *26*(8), 2174–2183. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3799-05.2006>
- Wang, H., Fukushima, H., Kida, S., & Zhuo, M. (2009). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase IV Links Group I Metabotropic Glutamate Receptors to Fragile X Mental Retardation Protein in Cingulate Cortex \*. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(28), 18953–18962. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.019141>
- Weiss, J. H., & Sensi, S. L. (2000). Ca<sup>2+</sup>–Zn<sup>2+</sup> permeable AMPA or kainate receptors: Possible key factors in selective neurodegeneration. *Trends in Neurosciences*, *23*(8), 365–371. <https://doi.org/10.1016/S0166->

2236(00)01610-6

- Willard, S. S., & Koochekpour, S. (2013). Glutamate, Glutamate Receptors, and Downstream Signaling Pathways. *International Journal of Biological Sciences*, 9(9), 948–959. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6426>
- Woll, K. A., & Van Petegem, F. (2022a). Calcium-release channels: Structure and function of IP<sub>3</sub> receptors and ryanodine receptors. *Physiological Reviews*, 102(1), 209–268. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2020>
- Woll, K. A., & Van Petegem, F. (2022b). Calcium-release channels: Structure and function of IP<sub>3</sub> receptors and ryanodine receptors. *Physiological Reviews*, 102(1), 209–268. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2020>
- Wollmuth, L. P., & Sakmann, B. (1998). Different Mechanisms of Ca<sup>2+</sup> Transport in NMDA and Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA Glutamate Receptor Channels. *The Journal of General Physiology*, 112(5), 623–636. <https://doi.org/10.1085/jgp.112.5.623>

## ANEXO I - Certificado da Comissão ética no uso de animais (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Análises de proteômica do mGluR5: foco na proteína reguladora do crescimento neuronal 1 (NEGR1) e em processos neurodegenerativos.", protocolo do CEUA: 50/2021 sob a responsabilidade de Fabiola Mara Ribeiro que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 26/04/2021.

Considerações posteriores:

26/04/2021	Aprovado na reunião extraordinária emergencial on-line do dia 26/04/2021. Validade: 26/04/2021 à 25/04/2026
------------	---

Belo Horizonte, 20/05/2021.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)