



# **Dissertação de Mestrado**

**Edleusa Marques Lima Batista**

**A interação entre os sistemas glutamatérgico e  
endocanabinóide promove neuroproteção em cultura  
primária de neurônios corticoestriatais**

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Instituto de Ciências Biológicas (ICB)

Belo Horizonte/MG, janeiro de 2016

# **Dissertação de Mestrado**

**Edleusa Marques Lima Batista**

## **A interação entre os sistemas glutamatérgico e endocanabinóide promove neuroproteção em cultura primária de neurônios corticoestriatais**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Neurociências, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiola M. Ribeiro

Co-Orientador: Prof. Dr. Fabrício A. Moreira

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Instituto de Ciências Biológicas (ICB)

Belo Horizonte/MG, janeiro de 2016

043

Batista, Edleusa Marques Lima.

A interação entre os sistemas glutamatérgico e endocanabinóide promove neuroproteção em cultura primária de neurônios corticoestriatais [manuscrito] / Edleusa Marques Lima Batista. – 2016.

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

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Mara Ribeiro. Co-orientador: Prof. Dr. Fabrício de Araujo Moreira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Neurociências - Teses. 2. Receptores metabotrópicos de glutamato - Teses. 3. Canabinóides - Teses. 4. Sobrevivência celular. 5. Neuroproteção. I. Ribeiro, Fabíola Mara. II. Moreira, Fabrício de Araujo. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

UFMG

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**A interação entre os sistemas glutamatérgico e endocanabinóide promove neuroproteção em cultura primária de neurônios corticoestriatais**

### EDLEUSA MARQUES LIMA BATISTA

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 28 de janeiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Fabíola Mara Ribeiro - Orientador  
UFMG

Pro(fa). Fabrício de Araújo Moreira  
UFMG

Prof(a). Cristina Guatimosim Fonseca  
UFMG

Prof(a). André Ricardo Massensini  
UFMG

Belo Horizonte, 28 de janeiro de 2016.

## **COLABORADORES**

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais)

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao meu amado esposo Batista e aos meus pais, Ana e Joaquim, pelo exemplo, amor incondicional e apoio ao longo desse percurso.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado força e perseverança para seguir em frente nesse caminho.

A minha orientadora profa. Fabiola por ter me recebido em seu laboratório, por me ensinar e orientar com dedicação e por ter depositado confiança em mim para desenvolver esse projeto. Você tornou possível este trabalho e a realização do meu sonho. Obrigada!

Ao meu Co-Orientador Fabrício, pela orientação auxílio e confiança.

A Flávia por ter me apresentado à Fabíola e me ajudado desde sempre. O seu apoio acelerou a minha entrada no Mestrado. Obrigada por tudo.

A Juliana, Isabella, Talita, Rafael, Jéssica, TonTon, Natália, Esther Paula, Isabel, Pedro e Túlio por serem colegas maravilhosos, com vocês aprendi muito, principalmente Flávia e Juju por ter me ensinado com muita paciência e carinho, fazer blot, cultura e ensaio de morte.

Ao Pedro Gobira, que colaborou auxiliando com as diluições das drogas e ideias de experimento para o meu projeto.

A Adriane pela amizade, muitas risadas, conversa e cuidado com os camundongos. Dri, você me cativou desde quando entrou no laboratório.

Aos colegas do Lab. RNAi e ao professor João Trindade pela convivência diária e auxílio.

Aos professores Antônio e Helton por nos ceder espaço em seu laboratório para os experimentos de cultura celular no início do meu mestrado.

Aos Professores André Massenssini e Cristina Guatimosim por me honrar com a presença na banca.

A profa. Luciene pelo carinho e paciência em assistir meus seminários e ajudar quando necessário.

Por fim, agradeço e dedico este trabalho a minha amada tia Clementina (*in memorian*), que cuidou de mim na minha infância, ela faleceu quando eu estava na graduação, mas nos deixou seu exemplo de amor, humildade, simplicidade e dedicação ao próximo.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1: Receptores glutamatérgicos.

Figura 2: Ação do receptor mGluR5.

Figura 3: Síntese dos endocanabinóides.

Figura 4: Ativação do receptor CB1.

Figura 5: Princípio do ensaio do teste de viabilidade celular.

Figura 6: Efeito de diferentes concentrações de AM251 na morte neuronal.

Figura 7: Efeito de diferentes concentrações de MPEP na morte neuronal.

Figura 8: Efeito do AM251 10nM em diferentes tempos na morte neuronal.

Figura 9: Efeito do MPEP 1 $\mu$ M em diferentes tempos na morte neuronal.

Figura 10: JZL184 Promove neuroproteção contra o insulto de glutamato em diferentes concentrações.

Figura 11: CDPPB, URB597 e JZL184 protegem os neurônios da morte induzida por glutamato.

Figura 12: A neuroproteção induzida por CPPB, URB597 e JZL184 é bloqueada por antagonistas do mGluR5 e CB1.

Figura 13: A neuroproteção induzida por agonistas canabinóides é revertida totalmente por AM251 e parcialmente por MPEP.

Figura 14: O tratamento com CDPPB, URB597 e JZL184 não altera a liberação de glutamato.

Figura 15: O tratamento com CDPPB, URB597 e JZL184 não modifica a concentração de Ca<sup>2+</sup> intracelular.

Figura 16: Fosforilação de ERK1/2 mediada por CDPPB, URB597 e JZL184 é dependente de mGluR5 e CB1.

Figura 17: Fosforilação de AKT mediada por CDPPB, URB597 e JZL184 é dependente de mGluR5 e CB1.

Figura 18: CDPPB, URB597 e JZL184 não são capazes de promover neuroproteção e ativar ERK1/2 e AKT em cultura de neurônios corticoestriatais mGluR5<sup>-/-</sup>.

Figura 19: A eletroporação com siRNA-CB1 reduz a expressão da proteína CB1.

Figura 20: CDPPB, URB597 e JZL184 não promovem neuroproteção nem ativam ERK1/2 e AKT em cultura primária de neurônios corticoestriatais CB1 Knockdown.

Figura 21: A neuroproteção induzida por CDPPB, URB597 e JZL184 é reduzida, mas não abolida em neurônios PI3KY<sup>-/-</sup>.

Figura 22: A neuroproteção induzida por CDPPB, URB597 e JZL184 é dependente da ativação de ERK1/2 e AKT.

Figura 23: CDPPB protege o sítio pós-sináptico enquanto que o JZL184 protege principalmente o pré-sináptico.

Figura 24: Modelo proposto: Os receptores mGluR5 e CB1, cooperativamente ativam vias de sinalização celular promovendo neuroproteção.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$ : microgramas

$\mu\text{L}$ : microlitros

$\mu\text{M}$ : micromolar

nM nanomolar

AMPA: Ácido aminopropiônico

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

CDPPB: 3-ciano-N-(1,3-difenil-1H-pirazol-5-il) benzamida

DA: Doença de Alzheimer

DAG: diacilglicerol

DH: Doença de Huntington

DP: Doença de Parkinson

ERK: Quinase regulada por sinais extracelulares

GPCR: Proteína G acoplada ao receptor metabotrópico

GTP: guanosina trifosfato

G $\alpha$ : Subunidade alfa da proteína G

HBSS: Solução Salina Tamponada com HEPES

IP3: Inositol tri-fosfato

M: molar

MAN: Modulador alostérico negativo

MAP: Modulador alostérico positivo

mGluR: Receptor metabotrópico glutamatérgico

mM: milimolar

MPEP: 2-metil-6 (feniletinil) piridina

nm: nanômetro

NMDA: N-metil d-aspartato

NMDAR: Receptor N-metil d-aspartado

PI: fosfatidilinositol

PI3K: Fosfatidilinositol-3-kinase

PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

PKC: Proteína quinase C

PLC: Fosfolipase C

RE: retículo endoplasmático

SNC: Sistema Nervoso Central

v/v: Volume por volume

FAAH: fatty acid amide hydrolase – Hidrolase amida de ácido graxo

Ca<sup>2+</sup>: Cálcio

Glu: glutamato

NC: Negative Control

siRNA: *small interfering RNA*

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	18
1.1 Doenças Neurodegenerativas e Excitotoxicidade .....	18
1.2 Receptores de glutamato .....	19
1.3 Drogas com ação no mGluR5.....	22
1.4 Sistema endocanabinóide.....	24
1.5 Síntese e liberação dos endocanabinóides.....	26
1.6 Drogas com ação no sistema endocanabinóides.....	28
1.7 Ativação de CB1 e neuroproteção .....	29
1.8 A importância da interação funcional entre o mGluR5 e o sistema endocanabinóide.....	30
2. OBJETIVOS .....	32
2.1 Objetivo Geral .....	32
2.2 Objetivos Específicos .....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Materiais .....	34
3.2 Métodos .....	35
3.2.1. Modelo de Camundongo .....	35
3.2.2 Cultura Primária de Neurônios .....	36
3.2.3. Experimento de ativação de AKT e ERK .....	36
3.2.4. Separação das amostras em gel SDS-PAGE, transferência para membrana de nitrocelulose e Western Blot. ....	37
3.2.5. Ensaio de morte celular.....	39
3.2.6. Experimento de liberação de Ca <sup>2+</sup> intracelular .....	41

3.2.7. Experimento de Liberação de glutamato .....	41
3.2.8. Transfecção com SiRNA através de eletroporação.....	42
3.2.9. Análise estatística .....	43
4. RESULTADOS .....	44
4.1. Efeito de diferentes concentrações de AM251 na morte neuronal .....	44
4.2. Efeito de diferentes concentrações de MPEP na morte neuronal .....	46
4.3. Efeito do AM251 em diferentes tempos na morte neuronal.....	47
4.4. Efeito do MPEP em diferentes tempos na morte neuronal.....	49
4.5. Determinação das concentrações do inibidor da hidrólise do 2-AG (JZL184) efetivas para o efeito neuroprotetor.....	50
4.6. CDPPB, URB597 e JZL184 protegem os neurônios da morte induzida por glutamato em um mecanismo dependente tanto de mGluR5 quanto de CB1 .....	52
4.7. A neuroproteção induzida por CPPB, URB597 e JZL184 é bloqueada por antagonistas do mGluR5 e CB1 .....	54
4.8. A neuroproteção induzida por agonistas canabinoide é totalmente revertida por AM251 e parcialmente por MPEP .....	56
4.9. O tratamento com CDPPB, URB597 e JZL184 não altera a liberação de glutamato em cultura de neurônios corticoestriatais .....	57
4.10. O tratamento com CDPPB, URB597 e JZL184 não modifica a concentração de Ca <sup>2+</sup> intracelular .....	60
4.11. CDPPB, URB597 e JZL184, aumentam a fosforilação de ERK1/2 em cultura de neurônios corticoestriatais.....	62
4.12 CDPPB, URB597 e JZL184, aumentam a fosforilação de AKT em cultura de neurônios corticoestriatais.....	64

4.13 CDPPB, URB597 e JZL184 não são capazes de promover neuroproteção e ativar ERK1/2 e AKT em cultura de neurônios corticoestriatais mGluR5 <sup>-/-</sup> .....	66
4.14. A eletroporação com siRNA-CB1 reduz a expressão da proteína CB1.....	68
4.15 CDPPB, URB597 e JZL184 não promovem neuroproteção nem ativam ERK1/2 e AKT em cultura Primária de neurônios corticoestriatais CB1 Knockdown.....	70
4.16 A neuroproteção induzida por CDPPB, URB597 e JZL184 é dependente da ativação de ERK1/2 e AKT.....	72
4.17 CDPPB protege o sítio pós-sináptico enquanto que o JZL184 protege principalmente o pré-sináptico.....	76
4.18 Modelo proposto para ativação das vias de sinalização que conduzem à neuroproteção.....	79
5. DISCUSSÃO .....	82
6. CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXOS.....	95

## ABSTRACT

The metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) is coupled to the  $G_{\alpha q}$  protein. Stimulation of mGluR5 leads to activation of cell signaling pathways important for survival, such as the activation of AKT and extracellular signal-regulated kinase (ERK) proteins. The cannabinoid receptor 1 (CB1) is coupled to the  $G_{\alpha i/o}$  protein and also leads to activation of ERK and AKT. Since previously published data indicate that there is a close relationship between the glutamatergic and cannabinoid systems, we investigated a possible link between the activation of CB1 and mGluR5 to promote neuroprotection of primary cultured corticostriatal neurons. Cell death was assessed in neurons incubated with glutamate in the presence or absence of URB597 and JZL184, which are inhibitors of enzymes that hydrolyze anandamida and 2-AG endocannabinoids, respectively, and the positive allosteric modulator of mGluR5, CDPPB. URB597, JZL184 or CDPPB promoted neuroprotection against neuronal cell death induced by glutamate. Surprisingly, the CB1 antagonist, AM251 reversed neuroprotection induced not only by URB597 and JZL184, but also by CDPPB. Furthermore, MPEP, which is an mGluR5 negative allosteric modulator, was also able to inhibit neuroprotection mediated by CDPPB, URB597 and JZL184. Moreover, CDPPB, URB597 and JZL184, in the presence or absence of glutamate, promoted activation of ERK1/2 and AKT above basal levels. However, MPEP and AM251 were both capable of blocking ERK1/2 and AKT activation mediated by CDPPB, URB597 and JZL184. In addition, neuroprotection and ERK1/2 and AKT activation mediated by the tested drugs could not be observed in either mGluR5 knockout or CB1 knockdown neurons. Thus, mGluR5 and CB1 appear to activate similar cell signaling pathways to trigger neuroprotection.

**Keywords:** Endocannabinoids, neuroprotection, glutamate and excitotoxicity

## RESUMO

O receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) é acoplado à proteína  $G_{\alpha q}$ . A estimulação do mGluR5 leva à ativação de vias de sinalização importantes para a sobrevivência celular, tais como a ativação das proteínas AKT e da quinase regulada por sinal extracelular (ERK). O Receptor canabinóide 1 (CB1) é acoplado à proteína  $G_{\alpha i/o}$  e também leva à ativação de ERK e AKT. Uma vez que dados da literatura indicam uma relação estreita entre os sistemas glutamatérgico e canabinóide, investigamos uma possível interação entre a ativação de CB1 e mGluR5 para promover neuroproteção em neurônios corticoestriatais em cultura primária. A morte celular neuronal foi avaliada em neurônios incubados com glutamato na presença ou ausência de URB597 e JZL184, que são inibidores das enzimas que hidrolisam os canabinóides anandamida e 2-AG, respectivamente, e o modulador alostérico positivo do mGluR5, CDPPB. URB597, JZL184 e CDPPB levaram à neuroproteção contra a morte celular neuronal induzida por glutamato. Surpreendentemente, o antagonista do CB1, AM251, reverteu a neuroproteção induzida não só por URB597 e JZL184, mas também por CDPPB. Por outro lado, MPEP, que é um modulador alostérico negativo do mGluR5, também foi capaz de inibir a neuroproteção induzida por CDPPB, URB597 ou JZL184. Além disso, CDPPB, URB597 e JZL184, na presença ou ausência de glutamato, promoveram a ativação de ERK1/2 e AKT acima dos níveis basais. Entretanto, MPEP e AM251 foram capazes de bloquear a ativação de ERK1/2 e AKT promovida por CDPPB, URB597 e JZL184. Além disso, a neuroproteção e a ativação de ERK1/2 e AKT estimuladas pelas drogas testadas não foram observadas em neurônios mGluR5 *knockout* ou CB1 *knockdown*. Assim, os receptores mGluR5 e CB1 parecem ativar vias de sinalização celular semelhantes, as quais conduzem à neuroproteção.

**Palavras-Chave:** Endocanabinóides, neuroproteção, glutamato e excitotoxicidade.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças Neurodegenerativas e Excitotoxicidade

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela perda neuronal progressiva de regiões específicas do cérebro, a qual promove sintomas característicos, de acordo com a região afetada. Por exemplo, no caso da doença de Parkinson (DP), ocorre a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra; já no caso da doença de Alzheimer (DA), ocorre a perda degenerativa de neurônios colinérgicos e serotonérgicos, na doença de Huntington (DH), ocorre a morte de neurônios GABAérgicos (Lorigados-Pedre; Bergado-Rosado, 2004).

A formação de agregados é considerada como uma das principais alterações neuropatológicas que ocorrem em algumas doenças neurodegenerativas. Tais agregados são formados por componentes protéicos anormais que se acumulam no cérebro, levando à perda neuronal. Acúmulo de  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ) nas placas senis e de proteína tau hiperfosforilada nos emaranhados neurofibrilares na DA, acúmulo da  $\alpha$ -sinucleína nos corpos de Lewy na DP, agregados da proteína huntingtina na DH; corpos de Pick na demência de Pick são alguns exemplos (Castellani et al., 2007; Mattson, 2004; Molina-Holgado et al., 2007). Um mecanismo comum no desenvolvimento de vários processos neurodegenerativos é a presença de alteração na conformação de proteínas por oxidação proteica ou dano oxidativo de RNA gerando estruturas intermediárias que formam oligômeros solúveis, considerados os mais tóxicos, que posteriormente agregam-se, formando protofibrilas e, por fim, fibrilas que são consideradas marcadores de neurodegeneração (Castellani et al., 2007; Mattson, 2004; Molina-Holgado et al., 2007).

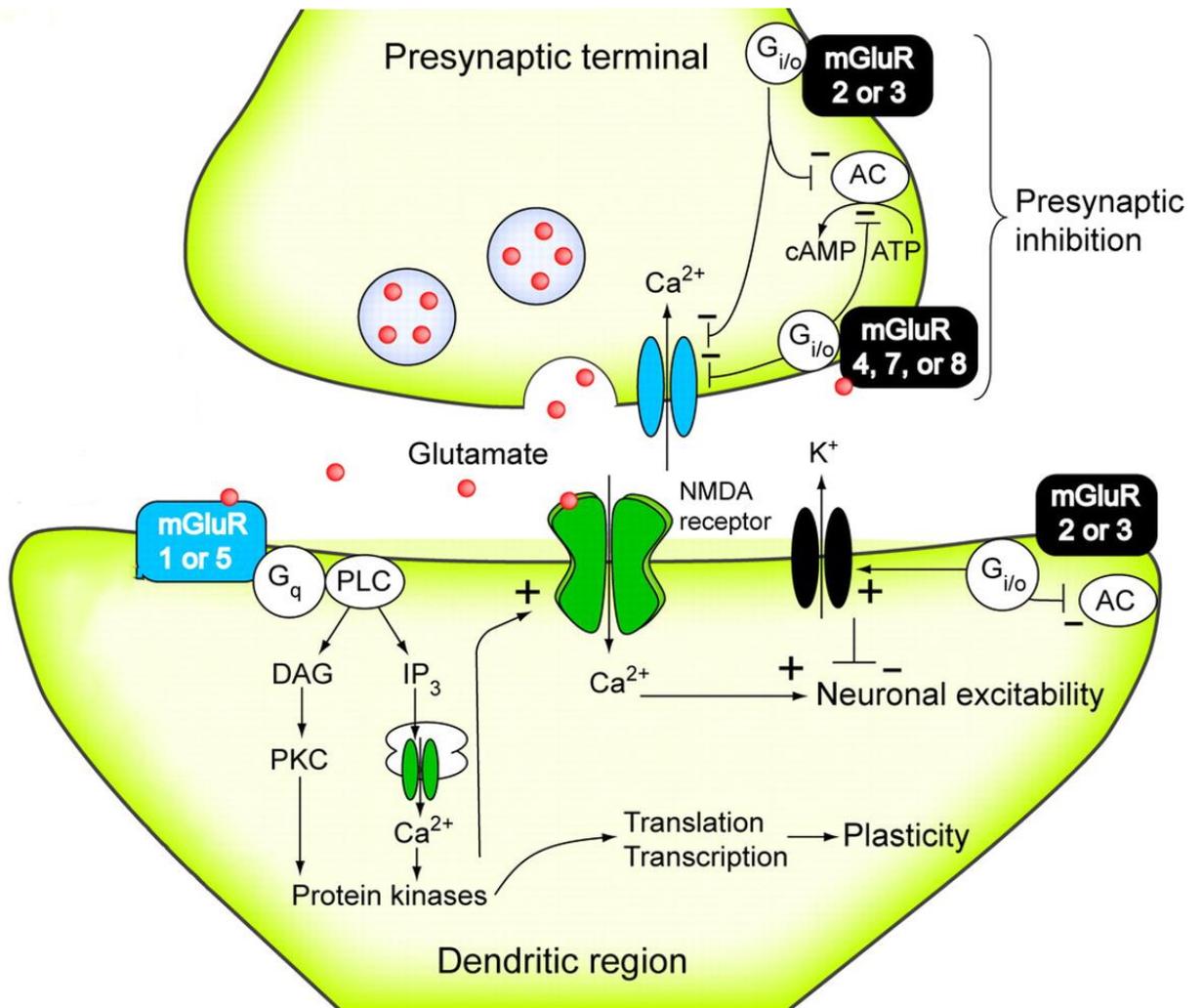
## 1.2 Transmissão Glutamatérgica

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do cérebro de mamíferos, sendo essencial para uma variedade de processos fisiológicos (Anborgh et al., 2005; Difiglia, 1990; Nakanishi; Masu, 1994). Entretanto, também desempenha um importante papel na morte neuronal excitotóxica (Anborgh et al., 2005; Difiglia, 1990; Nakanishi; Masu, 1994). Existem dois tipos de receptores de glutamato: os ionotrópicos e os metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos, receptores de NMDA (NMDAR) e de AMPA-Kainato, são canais iônicos, localizados principalmente no sítio pós-sináptico, os quais se abrem com a ligação do glutamato, permitindo o fluxo dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^{+}$  diretamente para o interior das células, mediando respostas neurotransmissoras rápidas (MASU et al., 1991). Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) são acoplados à proteína G (O'brien et al., 2003). O glutamato tem ação excitatória quando estimula receptores ionotrópicos. Quanto aos receptores metabotrópicos, sua ação é modulatória, podendo ser tanto excitatória quanto inibitória (MASU et al., 1991). Os oito receptores metabotrópicos de glutamato são subdivididos em três subgrupos (I, II e III), que se diferenciam entre si por sua sequência, farmacologia e mecanismo de transmissão de sinais (Anborgh et al., 2005; Conn et al., 2005; O'brien et al., 2003). Todos os subtipos dos mGluRs possuem um grande domínio amino-terminal, onde está presente o local de interação com o ligante, o glutamato (Conn; Pin, 1997; O'brien et al., 2003; O'hara et al., 1993).

Em condições fisiológicas, o glutamato liberado a partir de sítios pré-sinápticos age nos receptores pós-sinápticos e promove despolarização, levando ao desligamento do  $\text{Mg}^{2+}$  a partir dos NDMARs, permitindo a passagem de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio intracelular. Os receptores AMPA são comumente co-expressos com os

NMDARs nas sinapses, onde em conjunto, contribuem para o processo de plasticidade sináptica (Mehta et al., 2013). O processo pelo qual aminoácidos excitatórios, como por exemplo o glutamato, promovem neurodegeneração é chamado excitotoxicidade, sendo essa a principal causa de morte celular em muitas doenças agudas do sistema nervoso central (SNC), incluindo acidente vascular cerebral, traumatismo e epilepsia (Aarts; Tymianski, 2004; Nicholls, 2004). Além disso, o processo de excitotoxicidade ocorre também em doenças crônicas, como a esclerose amiotrófica lateral, DP, DA e DH. A liberação excessiva e recaptção ineficiente de neurotransmissores excitatórios promovem hiperatividade de seus receptores e, eventualmente, morte neuronal (Aarts; Tymianski, 2004; Nicholls, 2004).

Os mGluRs do grupo I (mGluR1 e 5) são acoplados à proteína  $G_{\alpha q}$ , promovendo ativação da fosfolipase C (PLC). Já os mGluRs dos grupos II (mGluR2 e 3) e III (mGluR4, 6, 7 e 8) são acoplados à proteína  $G_{\alpha i}$  e associados à uma redução da produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), sendo localizados principalmente na região pré-sináptica, onde regulam a liberação de neurotransmissores, como o glutamato (Conn; Pin, 1997; O'brien et al., 2003).



Disponível em: [www.neurology.org/content/70/12/964.figures-only](http://www.neurology.org/content/70/12/964.figures-only)

**Figura 1: Receptores glutamatérgicos.** A ligação do agonista ao receptor promove ativação da proteína G.  $G_{\alpha q}$  ao ser ativada promove ativação da fosfolipase C (PLC) que por sua vez catalisa a hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em diacilglicerol (DAG) que recruta a proteína quinase C (PKC) levando a ativação de algumas proteínas quinases.

Os mGluRs do grupo I estão localizados principalmente na região pós-sináptica do neurônio, e sua ativação é acoplada à via do fosfatidilinositol (PI). Nesta via, a ligação do agonista ao seu receptor de membrana promove a ativação da proteína  $G_{\alpha q}$ . Uma vez ativada, ou seja, ligada a guanosina trifosfato (GTP), a subunidade  $\alpha$  se desacopla das subunidades  $\beta\gamma$ , ativando a PLC que catalisa a hidrólise do lipídeo de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>)

em diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>). A DAG permanece na membrana plasmática e atua no recrutamento da proteína quinase C (PKC) dependente de Ca<sup>2+</sup> (Figura 1). O IP<sub>3</sub>, hidrossolúvel, se difunde pelo citoplasma e se associa a receptores presentes na membrana do retículo endoplasmático (RE). A ativação destes receptores de IP<sub>3</sub> leva à liberação de Ca<sup>2+</sup> presentes no RE para o citoplasma, onde esse íon participa da ativação da PKC e de várias outras proteínas (Masu et al., 1991; Ribeiro et al., 2010; Ritzen; Mathiesen; Thomsen, 2005). A estimulação dos receptores mGluR1/5 também leva à estimulação de outras vias de sinalização importantes para a proliferação e sobrevivência celular, tais como a ativação de proteínas quinases (Figura 1) tais como a proteína quinase B (AKT) e proteína quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) (Doria et al., 2015; Hwang et al., 2010; Mao et al., 2005; Masu et al., 1991; O'brien et al., 2003; Ritzen; Mathiesen; Thomsen, 2005).

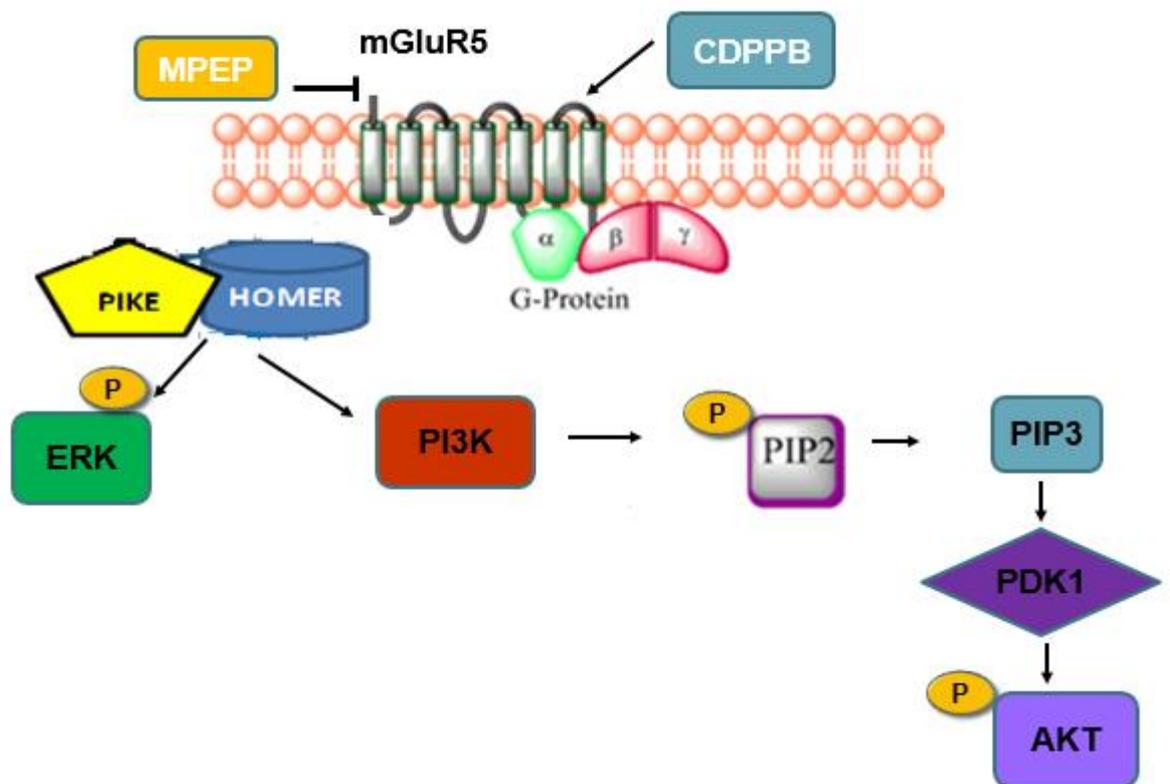
As proteínas AKT e ERK podem ser ativadas por meio da proteína Homer. A ativação do mGluR5 promove a formação de um complexo, que se liga e facilita a ativação da fosfatidilinositol-3-kinase (PI3K) (Doria et al., 2015; Guhan; Lu, 2004; Mao et al., 2005). A PI3K promove fosforilação de PIP<sub>2</sub> de membrana, formando PIP<sub>3</sub>, o qual recruta AKT e PDK1 para a membrana plasmática. Em seguida, a PDK1 promove a fosforilação e ativação da proteína AKT (Hou e Klann 2004; Rong et al., 2003).

### **1.3 Drogas com ação no mGluR5**

Muitos dos agonistas e antagonistas utilizados no estudo da função dos mGluRs foram desenvolvidos como análogos do glutamato e agem por meio da

ligação ao sítio ortostérico do ligante endógeno (glutamato) ou próximo dele, no domínio amino-terminal (O'brien et al., 2003).

Os moduladores alostéricos são substâncias que se ligam a um determinado receptor em uma região diferente daquela em que se liga o agonista endógeno (sítio ortostérico), e somente possuem atividade na presença do ligante endógeno ou agonista ortostérico, como o glutamato. O 2-metil-6 (feniletinil) piridina (MPEP), modulador alostérico negativo (MAN) seletivo do mGluR5, foi um dos primeiros compostos com ação antagonista para o mGluR5. Ele atua estabilizando a conformação do receptor na forma inativa, reduzindo a capacidade de o glutamato formar IP<sub>3</sub>, sem afetar a afinidade entre o glutamato e seu receptor (Lea; Faden, 2006). Ao contrário dos ligantes endógenos, os moduladores alostéricos positivos (MAPs) não requerem a presença de aminoácidos em sua estrutura. Estes aminoácidos são polares e carregados, necessitando serem transportados ativamente através da barreira hemato-encefálica (Ritzen; Mathiesen; Thomsen, 2005). Os MAPs são relativamente lipofílicos e não carregados, o que facilita a sua passagem através da barreira hemato-encefálica por meio de difusão passiva. A ligação do 3-ciano-N-(1,3-difenil-1H-pirazol-5-il) benzamida (CDPPB) ao receptor não altera a afinidade da ligação entre o mGluR5 e seu agonista, sendo assim, os efeitos modulatórios do CDPPB podem ser estudados sem alterar a ligação do agonista ao receptor (Ritzen; Mathiesen; Thomsen, 2005).



Adaptado de Dória et al., 2013

**Figura 2. Ação do receptor mGluR5.** A ligação do CDPPB ativa o mGluR5 que consequentemente ativa a proteína G desencadeando o recrutamento de PIKE e HOMER que ativam AKT e ERK. O MPEP ao se ligar ao mGluR5, inibe a ativação dessa cascata e assim, não leva à ativação de AKT e ERK.

#### 1.4 Sistema endocanabinóide

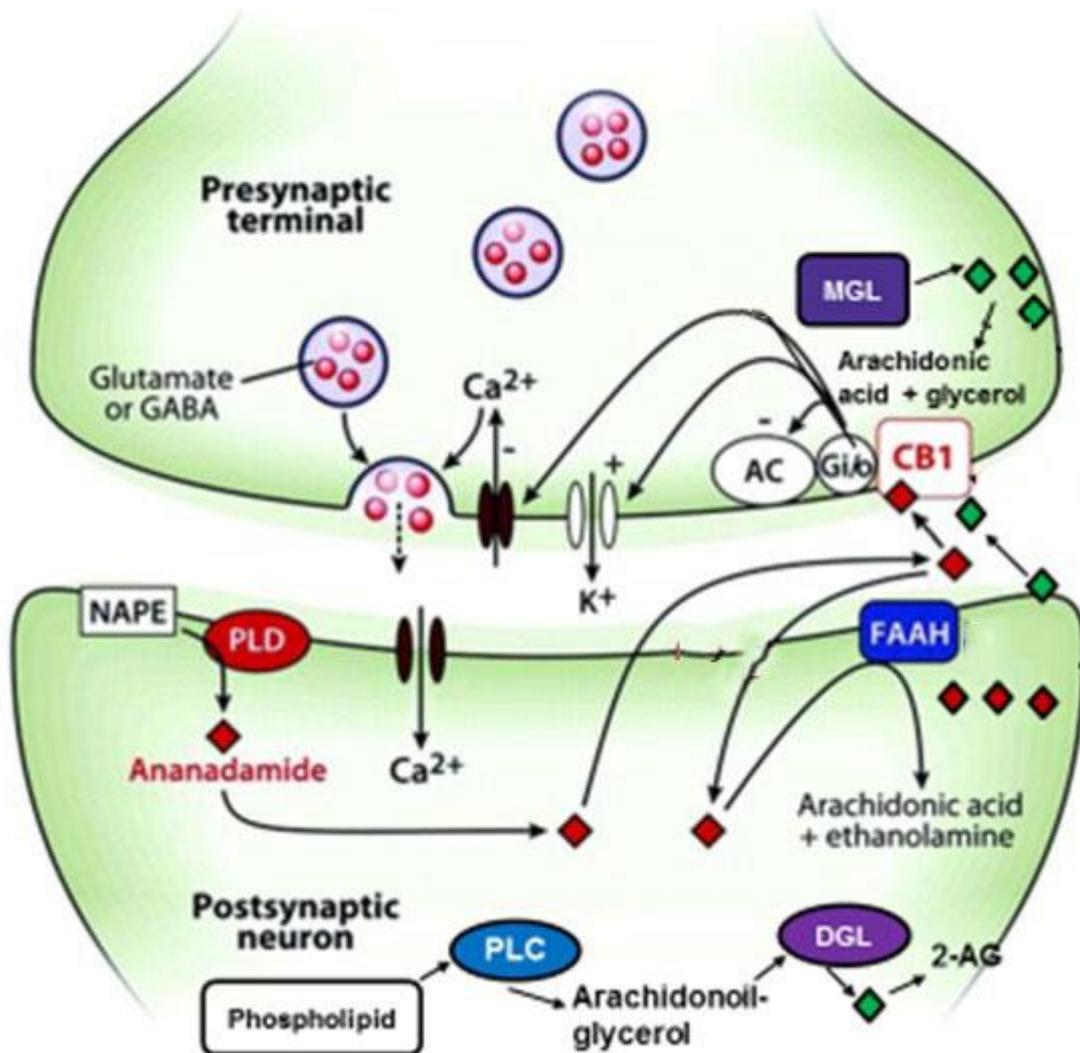
Os endocanabinóides são reguladores lipídicos, os quais se ligam aos receptores CB1 e CB2, realizando uma série de funções fisiológicas, inclusive apresentando potencial neuroprotetor contra excitotoxicidade e danos oxidativos (Simkins et al., 2012). Ambos são receptores acoplados à proteína G que, quando ativada, inibe a enzima adenilato ciclase, aumentando a atividade de canais de potássio e inibindo canais de cálcio (Piomelli, 2003).

O sistema canabinóide endógeno ou endocanabinóide é capaz de modular uma grande variedade de efeitos fisiológicos como coordenação motora, cognição e memória dentre outros (Di Marzo; Matias, 2005). Três compostos canabinóides endógenos já foram caracterizados, o primeiro é chamado de etanol amida do ácido araquidônico (anandamida), o segundo é o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG), um éster também derivado do ácido araquidônico e o terceiro, 2-araquidonoil-glicerol-éter. Há diferença entre suas concentrações no tecido nervoso, sendo a concentração de 2-AG cerca de 200 vezes maior que a da anandamida. Entretanto a distribuição deles no encéfalo é similar, pois ambos estão em maiores concentrações no tronco encefálico, estriado e hipocampo e em menores concentrações no córtex, diencéfalo e cerebelo (Di Marzo; Matias, 2005).

O receptor CB1 é um dos mais abundantes receptores acoplados à proteína G no cérebro de mamíferos e é altamente expresso no cerebelo, gânglios da base, córtex e sistema límbico (Blázquez et al., 2015; Katona e Freund, 2008). O CB1 é expresso em diferentes populações neuronais no cérebro de mamíferos, participando do processo de cognição e coordenação motora (Allen et al., 2009). Em neurônios GABAérgicos ou glutamatérgicos, o CB1 exerce várias funções. Sua função celular mais proeminente é a inibição retrógrada da liberação de neurotransmissores (Freund; Katona; Piomelli, 2003; Hashimoto et al.; Ohno-Shosaku; Kano, 2007). Assim, os receptores CB1 localizados pré-sinápticamente no terminal axonal dos neurônios espinhosos médios (MSNs) GABAérgicos estão envolvidos na modulação da liberação do GABA no corpo estriado (Allen et al., 2009; Steindel et al., 2013). Já os receptores CB1 presentes na região pré-sináptica de neurônios corticais que se projetam no corpo estriado, controlam a liberação de glutamato.

## **1.5 Síntese e liberação dos endocanabinóides**

Os endocanabinóides não são estocados e liberados através de vesículas como os neurotransmissores clássicos. Ao invés disso, eles são sintetizados e liberados rapidamente pelos neurônios em decorrência de atividade elétrica induzida por despolarização e consequente influxo de íons cálcio (Di Marzo et al., 1998). Além disso, há evidências de que a ativação de receptores metabotrópicos possa induzir à síntese neuronal de anandamida independentemente de influxo iônico (Giuffrida et al., 1999). Tanto a anandamida quanto o 2-AG são sintetizados a partir de fosfolípidios de membrana em neurônios pós-sinápticos, sendo o aumento de cálcio intracelular o fator desencadeante. Portanto, os endocanabinóides atuam “sob demanda”, modulando a atividade dos neurônios pré-sinápticos após a ativação pós-sináptica. Tanto a anandamida quanto o 2-AG têm a sua ação terminada pela captação pelos neurônios e posteriormente degradados na região pré-sináptica (Hillard; Jarrahian, 2003) (Figura 3).



Adaptado de: HumanPhysiology.Academy 2014-2015

**Figura 3. Síntese de endocanabinóides.** A síntese dos endocanabinóides ocorre a partir da clivagem de fosfolipídios de membrana, o fosfolipídio é clivado pela enzima fosfolipase D (PLD) em Anandamida. PIP 2 é hidrolisado pela PLC, formando DAG que é clivado pela DGL, formando o 2-AG. Anandamida e 2-AG são transportados para atuarem na região pré-sináptica, levando a ativação da proteína  $G_{i/o}$ , inibindo a enzima Adnilato Ciclase, reduzindo AMPc intracelular, ativando canais de  $K^+$  e inibindo canais de  $Ca^{2+}$ , reduzindo a liberação de neurotransmissores.

## 1.6 Drogas com ação no sistema endocanabinóide

Entre os inibidores seletivos da degradação de anandamida destaca-se o URB597, pertencente a uma classe recentemente desenvolvida de carbamatos que induzem uma inibição irreversível da enzima ácido graxo amida hidrolase (FAAH) (Tarzia et al., 2003). A inibição da FAAH induzida pelo URB597 leva a aumento da anandamida no cérebro (Kinsey et al., 2009). Além disso, dados recentes publicados pelos nosso grupo demonstraram que o URB597 foi capaz de evitar a morte de neurônios hipocampais sob o insulto de cocaína, sendo que essa neuroproteção foi abolida pelo antagonista CB1, o AM251 (Vilela et al., 2015).

A serina lipase monoacil glicerol lipase (MGL) catalisa a clivagem de 2-AG em glicerol e ácido araquidônico, o qual é, então, reciclado em fosfolipídeos de membrana ou transformado na família de mediadores lipídicos eicosanóides. A inibição da MGL pelo JZL84 é capaz de aumentar os níveis de 2-AG (Piomelli, 2014).

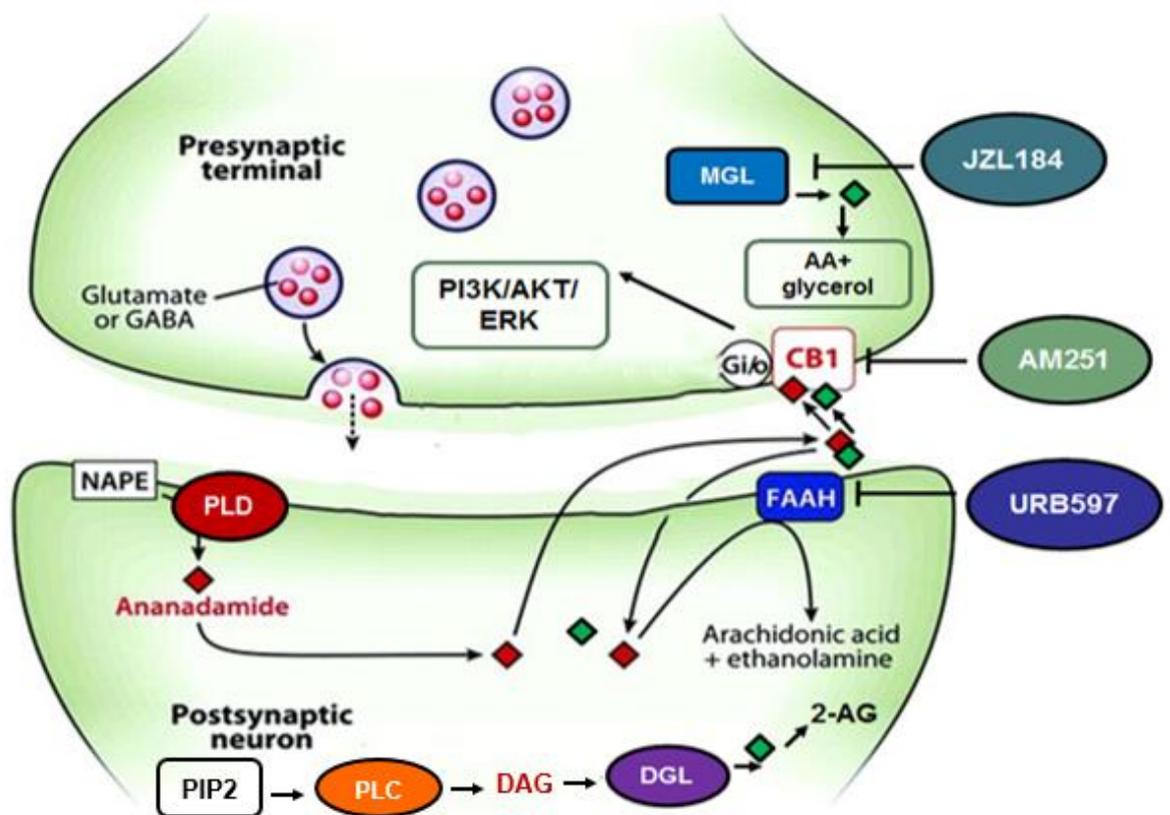
Além dos agonistas 2-AG e anandamida, tem-se ainda o arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA), o qual é um canabinóide sintético análogo à anandamida e que se liga ao CB1 com alta afinidade (Hillard et al., 1999). O agonista ACEA se mostrou neuroprotetor em modelos animais de lesão no SNC (Bahremand et al., 2009), sendo seu efeito neuroprotetor observado em regiões do cérebro afetadas por isquemia cerebral, promovendo ainda melhora do dano relacionada à atividade motora, e redução da degeneração, morte neuronal e perda dendrítica (Mauler et al., 2003; Youssef et al., 2007). A enzima FAAH pode metabolizar ACEA, assim como ocorre com a anandamida, mas devido ao ACEA ser um composto sintético, esse é mais estável que a anandamida e sua metabolização é mais lenta (Hanus et al., 2001; Pertwee et al., 2010).

## 1.7 Ativação de CB1 e neuroproteção

Há evidências que o sistema canabinóide possua potencial neuroprotetor. Estudos demonstraram a eficácia de agonistas canabinóides na isquemia cerebral, na epilepsia e também em modelos animais da DP e outras formas de doenças neurodegenerativas (Carlini, 2004; Makriyannis; Mechoulam; Piomelli, 2005).

Quando os endocanabinóides se ligam ao receptor CB1, desencadeiam uma série de mecanismos intracelulares tais como: inibição da adenilato ciclase, levando à redução de AMPc intracelular e de proteínas quinase A (PKA) e à estimulação de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitogéno (MAP quinase) (Figura 3) (Lutz, 2002). Estudos *in vitro* demonstraram que os canabinóides podem induzir ativação da ERK, uma vez que a administração do canabinóide THC promoveu uma ativação da ERK1/2 mediada pelo CB1 no corpo estriado e hipocampo (Daigle; Kearn; Mackie, 2008). Receptores de canabinóides também afetam a sobrevivência, diferenciação e sinalização através da ativação da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e Akt (Gomez et al., 2011). O receptor CB1 pode mediar a ativação de ERK e AKT através de um mecanismo dependente de proteína G, envolvendo a ativação da classe IB de PI3K (Galve-Roperh et al., 2002; Gómez del Pulgar et al., 2000).

Um dos efeitos neuroprotetores derivados da ativação das vias ERK e AKT via CB1 é o aumento dos níveis de BDNF (*brain derived-neurotrophic factor*) ref. O BDNF é uma neurotrofina abundante no hipocampo e córtex cerebral e tem efeito positivo sobre a sobrevivência dos neurônios e plasticidade sináptica. Além disso, a diminuição da expressão dessa proteína tem sido relacionada com o desenvolvimento de algumas doenças neurodegenerativas, tais como DH e DA (Zuccato; Cattaneo, 2007; Zuccato et al., 2001).



Adaptado de: HumanPhysiology.Academy 2014-2015

**Figura 4. Ativação do receptor CB1.** Após formação de Anandamida e 2-AG, ambos são transportados da região pós-sináptica para a pré-sináptica, se ligam e ativam o CB1. A inibição da enzima FAAH pelo URB597, inibe a degradação da Anandamida, e da MGL pelo JZL184 evita a degradação do 2-AG, dessa forma, há aumento de Anandamida e 2-AG para atuarem no CB1 levando a ativação das proteínas quinases AKT e ERK.

### 1.8 A importância da interação funcional entre o mGluR5 e o sistema endocanabinóide

Para que o 2-AG seja sintetizado e liberado, é necessário a ação de duas enzimas encontradas no pós-sináptico, PLC- $\beta$  e diacilglicerol lipase- $\alpha$  (DGL- $\alpha$ ) (Hashimotodani et al., 2005; Lafourcade et al., 2007; Stella et al., 1997). Em sinapses excitatórias, DGL- $\alpha$  co-localiza com o mGluR5 formando um complexo multiproteico que pode iniciar a sinalização canabinóide retrógrada. Este

complexo, chamado de 2-AG signalossoma, liga mGluR5, PLC- $\beta$  e DGL- $\alpha$  em uma única unidade funcional através da proteína Homer (Gregg et al., 2012; Jung et al., 2012; Piomelli, 2013). PLC- $\beta$  hidrolisa PIP<sub>2</sub> formando DAG que por sua vez é clivado pela DGL- $\alpha$ , dando origem ao 2-AG (Gregg et al., 2012; Jung et al., 2007; Piomelli, 2003). Assim, como as duas principais enzimas responsáveis pela síntese de 2-AG (PLC- $\beta$  e DGL- $\alpha$ ) fazem parte desse signalossoma e a PLC- $\beta$  pode ser ativada via mGluR5, a síntese de 2-AG tem um aumento robusto devido à estimulação de mGluR5. Além disso, a ativação da proteína G $\alpha_q$  pelo mGluR5 também pode promover um aumento da síntese de endocanabinóides por aumentar a liberação de íons cálcio dos reservatórios intracelulares, o qual facilita a síntese de endocanabinóides (Drew et al., 2009 e Mitchell et al., 2009). Por outro lado, endocanabinóides também podem modular a ativação de mGluR5 por regular a liberação de glutamato pré-sináptico (Drew et al., 2009). Interessantemente, essa inter-relação entre mGluR5 e CB1 é refletida na modulação de vários processos fisiológicos e patológicos, tais como nocicepção (Drew et al., 2009; Gregg et al., 2012; Nyilas et al., 2009), cognição e memória (Varga et al., 2012), adicção à cocaína (Yu et al., 2013), Síndrome do X frágil (TANG; ALGER, 2015) e ansiedade (Gregg et al., 2012; Moreira et al., 2008).

Como descrito anteriormente, já foi demonstrado que tanto o CB1 quanto o mGluR5 são importantes para a neuroproteção e ativação de vias de sobrevivência neuronal. Entretanto, não se sabe se esses dois receptores apresentam uma interação funcional para promover neuroproteção. Em vista disso, nesse trabalho, buscaremos estabelecer uma relação entre o efeito neuroprotetor ativado por CB1 e mGluR5.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Investigar a interação funcional entre os componentes dos sistemas endocanabinóide e glutamatérgico nos mecanismos de neuroproteção envolvendo a ativação de ERK1/2 e AKT através da utilização de neurônios em cultura primária.

### **2.2 Objetivos Específicos:**

- Avaliar o potencial neuroprotetor de ativadores canabinóides, tais como URB597 e JZL184, e do modulador alostérico do mGluR5, o CDPPB;
- Determinar se a neuroproteção promovida pelo CDPPB, URB597 e JZL184 ocorre através da modulação dos sistemas glutamatérgico e endocanabinóide e dos receptores CB1 e mGluR5;
- Avaliar, se CDPPB, URB597 e JZL184 são capazes de ativar vias neuroprotetoras como ERK1/2 e AKT;
- Determinar se a ativação de ERK e AKT é importante para o efeito neuroprotetor ativado por CDPPB, URB597 e JZL184;
- Avaliar se as drogas do sistema endocanabinóide e glutamatérgico são capazes de modular a liberação de glutamato em cultura de neurônios corticoestriatais e se essa modulação é importante para o mecanismo neuroprotetor;

- Avaliar se as drogas do sistema endocanabinóide e glutamatérgico são capazes de regular a liberação de cálcio em cultura de neurônios corticoestriatal, e, se esse efeito seria relevante para a neuroproteção.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais:

Ácido acético (Sigma Aldrich), ácido glutâmico- glutamato (Sigma Aldrich), ácido aminoacético – glicina (Synth), Acrilamida (Sigma Aldrich), anticorpo primário de coelho anti P Akt- Cell Signaling, anticorpo primário de coelho anti Akt (Cell Signalling), anticorpo primário de coelho anti P Akt (DB Biotech), anticorpo primário de coelho anti Akt (DB Biotech), anticorpo primário de coelho anti P ERK1/2 (Cell Signaling), anticorpo primário de coelho anti ERK1/2 (Cell Signalling), anticorpo primário de coelho anti Receptor CB1 (Calbiochem), anticorpo primário de coelho anti PSD95 (Life Technologies), anticorpo primário de camundongo anti Sintaxina (Santa Cruz), anticorpo primário de camundongo anti Actina (Santa Cruz), anticorpo secundário de coelho (Bio Rad Laboratories), anticorpo secundário de coelho Alexa Fluor 633, anticorpo Secundário de camundongo Alexa Fluor 546, Arachidonylethanolamide, AEA, Anandamida (Tocris Bioscience), Arachidonoyl 2'-Chloroethylamide- ACEA (Cayman Chemical), azida de sódio (Sigma Aldrich), azul de bromofenol (Sigma Aldrich), AM251 (Cayman Chemical), 2-Arachidonylglycerol-2-AG (Tocris Bioscience), 2-mercaptoetanol (Sigma Aldrich), Bis-acrilamida (Ludwig Biotech), B27 (Invitrogen), Albumina de Soro Bovino-BSA (Sigma Aldrich), Tris-HCl 0,5M, pH 6,8 (Sigma Aldrich), Tris-HCl 1,5M, pH 8,3 (Sigma Aldrich) CaCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich), 3-Cyano-*N*-(1,3-diphenyl-1*H*-pyrazol-5-yl) benzamide - CDPPB (Tocris Bioscience), corante Bradford (BioRad Laboratories), DAPI (Molecular Probes/Thermofisher Scientific /EUA), EGTA (Sigma Aldrich), eppendorffs 0,2; 0,6 e 1,5mL (Axygen / Kasvi), eppendorff 1,5 mL (Eppendorff), estreptomicina (Invitrogen), FURA 2-AM (Molecular Probes/Thermofisher Scientific /EUA), glicerol (Sigma Adrich), glucose (Sigma Aldrich), glutamax (Invitrogen), HCl (Synth), HEPES

(Sigma Aldrich), Inibidor de protease (Sigma Aldrich), JZL184 (Cayman Chemical), KCl (Sigma Aldrich), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich), lâmina 18mm (Pró cito Laboratórios/ Global Trade), leite em pó desnatado Molico (Nestlé), live/dead viability (Life Technologies, Foster City, CA, USA), 2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-4*H*-1-benzopyran-4-one hydrochloride-LY294002 (Sigma-Aldrich. St Louis, MO, USA), meio Neurobasal (Invitrogen/ USA), 2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine hydrochloride - MPEP (Tocris Bioscience), membrana de nitrocelulose (Bio Rad Laboratories), metanol (Sigma Aldrich/ Synth), MgSO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich), N<sub>2</sub> (Invitrogen) NaCl (Sigma Aldrich), NaOH (Sigma Aldrich), NaHCO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich), padrão de peso molecular Precision Plus protein standards All Blue (Biorad), padrão de peso molecular Precision Plus protein Standards Kaleidoscope (Biorad), PBS pH 7,4, TBS pH 7,4, 2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4*H*-1-benzopyran-4-one -PD98059 (Tocris Bioscience), penicilina (Invitrogen), persulfato de amônio (Sigma) poli-L-ornitina (Invitrogen), corante ponceau (Sigma Aldrich), Dodecil Sulfato de Sódio-SDS (HEXAPUR/ NEON/Sigma Aldrich), TRIS (Sigma Aldrich), TEMED (Sigma Aldrich) Triton X100 (Sigma Aldrich), Tween-20 (Sigma Aldrich / Synth), URB597 (Cayman Chemical).

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1. Modelo de camundongo**

O trabalho foi realizado com camundongos selvagens da linhagem C57/BL6 (25-30g), modelos transgênicos BL6 mGluR5<sup>-/-</sup> e WT (animais selvagens), obtidos do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) e PI3Kγ<sup>-/-</sup> presenteado pelo Dr. M. M. Teixeira (Russo et al., 2011). Os animais foram criados e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da

UFMG, em instalação própria para animais e mantidos a 23°C em um ciclo de luz 12h claro/escuro, com ração e água fornecidos *ad libitum*. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e a região utilizada foi o córtex e corpo estriado. Os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho estão de acordo com as normas e receberam aprovação do CETEA-UFMG (Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFMG), parecer nº 03/2011 (Anexo 1).

### **3.2.2. Cultura primária de neurônios**

As culturas neuronais foram preparadas a partir das regiões do córtex e corpo estriado do cérebro de embriões E15 de camundongos C57/BL6, ou transgênicos BL6 mGluR5<sup>-/-</sup> e WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Após a dissecação, o tecido foi submetido à digestão por tripsina, seguido 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 4 e/ou 12 poços previamente preparadas com poli-L-ornitina. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> ao longo de 9 a 12 dias *in vitro*, sendo o meio trocado a cada 4 dias.

### **3.2.3. Experimento de ativação da AKT e ERK1/2**

As culturas primárias de embriões E15 de camundongos C57/BL6, ou transgênicos BL6 mGluR5<sup>-/-</sup> e WT e PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> foram incubadas em HBSS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 5 mM, HEPES 20 mM, Glucose 11 mM, NaCl 116.35 mM, KCl 4.83 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM), durante 20 min a 37°C. As culturas foram estimuladas com CDPPB na concentração de 100 nM, URB597 na concentração de 1nM, JZL184 na concentração de 10 nM, AM251 na concentração de 10 nM, MPEP

na concentração de 1  $\mu\text{M}$  e glutamato na concentração de 50  $\mu\text{M}$ . Todos pelos tempos de 7,5 min a 37 °C. Os neurônios foram lisados em tampão RIPA: Tris-HCl 10 mM pH7,5; NaCl 140 mM; Non-idet P-40 1%; Sodium deoxycolate 1% e SDS 0,1%. A concentração proteica foi quantificada e 100  $\mu\text{g}$  de proteína celular total foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS PAGE), seguido de eletrotransferência para membranas de nitrocelulose. Em todos os experimentos utilizamos como grupo controle os neurônios não tratados com as drogas (NT).

#### **3.2.4. Separação das amostras em gel SDS-PAGE, transferência para membrana de nitrocelulose e Western Blot**

Para a quantificação da concentração de proteínas, foi utilizado o método descrito por (Bradford, 1976). Foi realizada eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida de acordo com (Laemmli e cols., 1970). O gel de concentração utilizado foi: 4% (v/v) de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p; Tris-HCl 0,5M, pH 6,8; SDS 0,1% (p/v); persulfato de amônio 0,1% e TEMED 0,005% (v/v). O gel de separação consistiu de 10% (v/v) de acrilamida/bisacrilamida 29:1 (p/p); Tris-HCl 1,5 M, pH 8,7; SDS 0,15% (p/v); Persulfato de amônia 0,1% e TEMED 0,005% (v/v). As amostras foram preparadas com tampão de amostra (composto de SDS 0,2% (p/v); glicerol 0,2% (v/v); 2-mercaptoetanol 0,32% (v/v); azul de bromofenol 0,0001% (p/v), Tris-HCl 12,5 mM, pH 6,8) e separadas no gel SDS-PAGE a 200V em tampão de corrida (Tris-HCl pH 8,7, NaCl e SDS 0,1% (p/v) pH 8,3). Ao término da eletroforese prosseguimos à transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose. Para tal, foi utilizado tampão de transferência (Tris 48 mM; glicina 39 mM; metanol 20% (v/v); 0,013 mM SDS) e um sanduíche composto de papéis filtro,

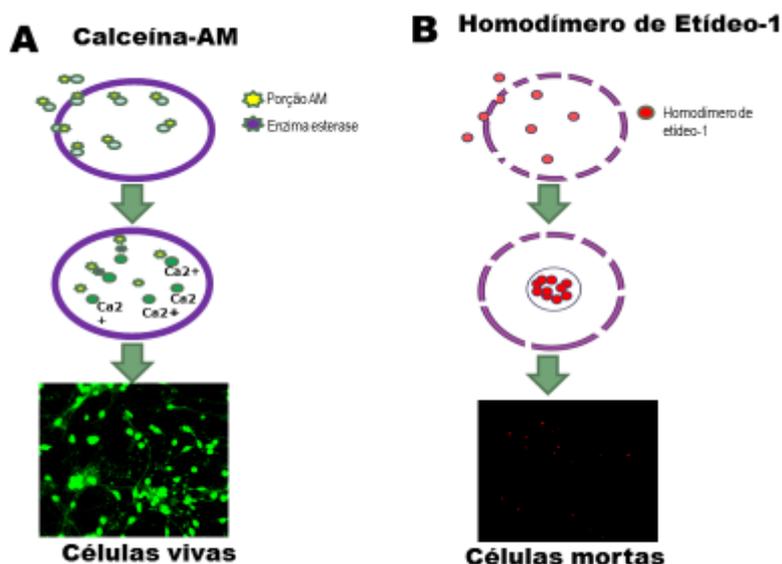
esponja e a membrana de nitrocelulose. Ao final da transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau S (1% (p/v) e ácido acético 10% (v/v)) em agitação constante para verificação da presença de bandas proteicas. O experimento de Western blot foi realizado como descrito por (Ribeiro et al., 2010). Para o experimento da AKT, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 10% em tampão de lavagem (150 mM de NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, e 0,05% de Tween-20™ durante 1 hora e, em seguida, incubadas com anticorpo primário anti- P AKT 1:1000, em tampão de lavagem contendo 3% leite desnatado overnight. As membranas foram então lavadas 3 vezes por 5 min com tampão de lavagem (TBS Tween 0,05%). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anticoelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:2500 em tampão de lavagem contendo 3% de leite em pó desnatado durante 1h. As membranas foram lavadas três vezes por 10 min com tampão de lavagem. A detecção dos imunoblots foi realizada pelo processo de quimioluminescência, utilizando o Kit ECL prime por 5 minutos e expostas ao Image Quant LAS 400. As membranas foram submetidas ao procedimento de *stripping* em tampão de *stripping* (TRIS pH 6,8 65 mM, SDS 2% e 2-mercaptoetanol 100 mM, adicionado fresco) e foram novamente bloqueadas. Em seguida, foram incubadas com anticorpo primário anti-AKT1:1000. Em seguida, foram lavadas e colocadas em anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase anti-IgG diluído 1:5000 em tampão de lavagem contendo 3% de leite em pó desnatado durante 1h. As membranas foram lavadas três vezes por 10 min com tampão de lavagem e submetidas ao ECL prime por 5 minutos e expostas ao Image Quant LAS 400. Para o experimento da ERK1/2, as membranas foram bloqueadas com BSA a 5% em tampão de lavagem (150 mM de NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, e 0,1% de Tween-20™ durante 1 hora e, em seguida, incubadas

com anticorpo primário anti- P ERK 1:1000 em tampão de lavagem contendo 5% de BSA overnight. As membranas foram então lavadas 3 vezes por 5 min com tampão de lavagem (TBS Tween 0,1%). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anticoelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:5000 em tampão de lavagem contendo 3% de leite desnatado durante 1h. As membranas foram lavadas três vezes por 10 min com tampão de lavagem. A detecção dos imunoblots foi realizada pelo processo de quimioluminescência, utilizando o Kit Immobilon Western Millipore por 5 minutos e expostas ao Image Quant LAS 400. As membranas foram submetidas ao procedimento de stripping em tampão de stripping (TRIS pH 6,8 65 mM, SDS 2% e 2-mercaptoetanol 100 mM, adicionado fresco) e foram novamente bloqueadas. Em seguida, incubadas com anticorpo primário anti-ERK 1:1000 overnight. Em seguida, foram lavadas e colocadas em anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase anti-IgG diluído 1:5000 em tampão de lavagem contendo 3% de leite em pó desnatado durante 1h. As membranas foram lavadas três vezes por 10 min com tampão de lavagem e submetidas ao kit Immobilon Western Millipore 5 minutos e expostas ao Image Quant LAS 400.

### **3.2.5. Ensaio de morte celular**

Para o ensaio de morte celular, foi utilizado o kit Live/Dead (Life Technologies). O Kit é composto pelos reagentes calceína-AM e homodímero de etídeo-1. O teste se baseia no princípio de que a calceína-AM é permeável à membrana celular, porém, após ser clivada por esterases contidas em células vivas, a mesma se torna incapaz de atravessar a membrana, permanecendo retida dentro da célula e levando a um aumento da fluorescência verde ao longo do corpo celular. O homodímero de etídeo-1 só é capaz de permear células que apresentem

membrana danificada, ou seja, em processo de morte. Após permear a membrana celular, o homodímero de etídeo-1 se liga aos ácidos nucléicos, emitindo fluorescência vermelha (Fig. 1). Os neurônios foram incubados por 4 horas na ausência de droga (NT) ou na presença das drogas com ou sem glutamato, são elas: CDPPB 100nM, MPEP 1 $\mu$ M, URB597 1nM, JZL184 10nM, e AM251 10nM. Após incubação, os neurônios foram marcados com calceína-AM (1  $\mu$ M) e homodímero de etídeo-1 (2  $\mu$ M), preparado em solução PBS 1X por 15 minutos na incubadora. Após este tempo, os neurônios foram lavados três vezes com PBS 1x aquecido a 37°C. As fotos foram obtidas por meio do microscópio FLOID (Life Technologies), utilizando o filtro 488 para as imagens verdes (calceína-AM) e 633 para as imagens vermelhas (homodímero de etídeo-1). Consideramos um número mínimo de 300 células por poço, utilizando o software Image J. O número de células mortas foi expresso como porcentagem do número total de células analisadas.



**Figura 5 :** Princípio do ensaio do teste de viabilidade celular. (A) A calceína-AM, ao atravessar a membrana celular, é clivada pela enzima esterase, tornando-se incapaz de deixar o interior celular, o que promove um aumento da emissão de fluorescência verde (células vivas) ao longo do corpo

celular. **(B)** O homodímero de etídeo-1 ao atravessar membranas comprometidas, se liga aos ácidos nucléicos e emite fluorescência vermelha (células mortas).

### **3.2.6. Experimento de liberação de Ca<sup>2+</sup> intracelular**

Neurônios em cultura primária obtidos a partir de embriões E15 de camundongos C57 foram plaqueados em placas de 96 poços tratados com poli-L-ornitina por 1 h na concentração de 7,5%. Os neurônios foram marcados com 0,2 µM de Fura-2 AM durante 20 min a 37°C. Os neurônios foram lavados em meio Krebs (124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM glicose, 25 mM HEPES, CaCl<sub>2</sub> 1 mM pH 7.4) e estimulados com as drogas: CDPPB 100 nM, URB597 1 nM, JZL184 10 nM, MPEP 1 µM, AM251 10 nM e glutamato 50 µM, e a liberação de Ca<sup>2+</sup> promovida por cada droga foi quantificada por fluorescência, através de luz alternada 340-380 nm, e emissão de 510 nm utilizando um espectrofluorímetro (Synergy 2, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, EUA). No final de cada experimento, dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (0,1% final) foi adicionado para se obter R<sub>max</sub> seguido por 3,0 M de Tris + 400,0 mM de EGTA (pH 8,6) para R<sub>min</sub>. O aumento na [Ca<sup>2+</sup>] foram expressos como porcentagem, tendo como 100% [Ca<sup>2+</sup>] dos neurônios estimulados com 50 µM de glutamato. Todos os experimentos foram realizados em triplicada para cada condição.

### **3.2.7. Experimento de Liberação de glutamato**

Neurônios oriundos de cultura primária obtidos a partir de embriões E15 de camundongos C57 foram plaqueados em placas de 96 poços, tratados com poli-L-ornitina por 1 h na concentração de 7,5%. O glutamato liberado pelos neurônios da cultura primária foi medido de forma indireta pelo aumento de fluorescência devido à

produção de NADPH na presença da enzima glutamato desidrogenase do tipo II e de NADP<sup>+</sup>. A cultura foi incubada com CaCl<sub>2</sub> 1 mM e NADP<sup>+</sup> em HBSS e analisadas em um espectrofluorímetro (Synergy 2, BioTek® Instruments, Inc, Winooski, EUA). Após 5 minutos, foram adicionadas 50 unidades por poço de glutamato desidrogenase e a leitura foi retomada até a fluorescência atingir o equilíbrio (cerca de 5 minutos). Posteriormente, as culturas neuronais foram estimuladas durante 5 minutos com as drogas. As curvas de calibração foram realizadas em paralelo através da adição de quantidades conhecidas de glutamato (5 nM/μl) ao meio de reação. Os dados experimentais foram expressos como percentagem, tendo o glutamato liberado pelos neurônios estimulados com 10 μM de glutamato como 100%. Os experimentos foram realizados em duplicata por poço, para cada condição a 37° C, por 30-50 minutos, com comprimento de onda de excitação de 360 nm e de emissão de 450 nm.

### **3.2.8. Transfecção com siRNA através de eletroporação**

Durante o processo de preparação da cultura primária, os neurônios foram submetidos à eletroporação usando o kit para transfecção mouse neuron nucleofector (Lonza, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Antes de serem plaqueadas, um total de 2X10<sup>6</sup> células de neurônios corticoestriatais foram incubadas com 30 pmol de siRNA controle negativo ou siRNA CB1 (Santa Cruz, USA) e colocadas em cubetas próprias para eletroporação. A eletroporação foi feita usando o aparato Amaxa Nucleofector II Device, programação O-005. Após, as células foram ressuspensas em neurobasal e transferidas para placas tratadas com poli-L-ornitina por 1 h na concentração de 7,5%. Após 4 horas foi retirado todo o

meio neurobasal e adicionado um neurobasal novo e, então, as células foram incubadas nas mesmas condições que as células não eletroporadas.

### **3.2.9. Análise estatística**

Bandas não saturadas de AKT, ERK, CB1 e  $\beta$  actina foram quantificadas por sistema de densitometria óptica utilizando o Software *Image J* (National Institute of Mental Health). Os valores obtidos para AKT e ERK-fosforiladas foram normalizados pelos valores da AKT e ERK total, e CB1 foram corrigidas pela  $\beta$  actina. A média e o erro padrão foram calculados para o número de experimentos independentes, como indicados nas legendas das figuras. O programa GraphPad PRISM (versão 5 GraphPad Software Inc.) foi utilizado para as análises estatísticas, que foi determinada pelo método ANOVA de uma via e os mesmos foram considerados estatisticamente diferentes para valores de  $p < 0,05$ .

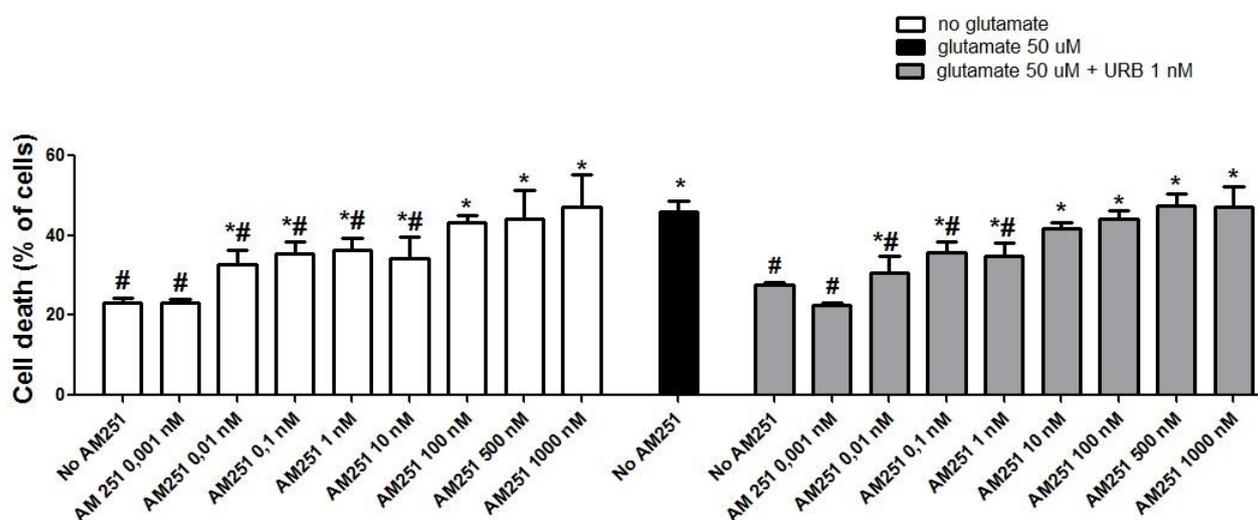
As imagens obtidas no ensaio de morte neuronal foram analisadas utilizando o Software *Image J*® (National Institute of Mental Health). A média e o erro padrão foram calculados para o número de 4 ou mais experimentos independentes, como indicados nas legendas das figuras. O programa Graph Pad PRISM (versão 5 Graph Pad Software Inc.) foi utilizado para as análises estatísticas, que foi determinada pelo método ANOVA, seguido de teste (post-hoc) Bonferroni, sendo que os resultados foram considerados estatisticamente diferentes para valores de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito de diferentes concentrações de AM251 na morte neuronal

Dados publicados por nosso grupo de pesquisa indicam que o sistema endocanabinóide exerce funções neuroprotetoras contra vários insultos (Vilela et al., 2015). Dessa forma, levantamos a hipótese de que a inibição das enzimas que promovem a degradação de endocanabinóides poderia exercer efeito neuroprotetor por aumentar os níveis de anandamida e 2-AG. Assim, resolvemos investigar a neuroproteção induzida por inibidores das enzimas FAAH e MGL, URB597 e JZL184 respectivamente, frente ao insulto de glutamato. Para tal, após o período de incubação com as drogas, culturas de neurônios corticoestriatais obtidas a partir de embriões E15 de camundongos foram incubadas com calceína-AM (marcador de células vivas) e homodímero de etídeo-1 (marcador de células mortas) por 15 minutos e avaliados em microscópio de fluorescência, sendo que a morte foi determinada como o percentual de células mortas. Quando a cultura de neurônios foi incubada por 20 h com 50  $\mu$ M de glutamato, observou-se morte neuronal entre 45-50% (Fig. 6). Interessantemente, a morte neuronal induzida por glutamato foi prevenida quando os neurônios foram incubados com glutamato na presença de 1 nM de URB597 (Fig. 6). Esses dados indicam que o URB597 apresenta potencial neuroprotetor contra o insulto de glutamato. Com o intuito de avaliar a concentração do AM251 capaz de reverter a neuroproteção induzida pelo URB597 contra o insulto de glutamato, mas que não causasse morte neuronal elevada na ausência de glutamato, a cultura de neurônios corticoestriatais foi incubada com AM251 nas concentrações de 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 500 nM e 1000 nM, na presença ou na ausência de glutamato 50  $\mu$ M e URB597 1 nM por 20 horas. Foi observado que na ausência de glutamato algumas concentrações de AM251

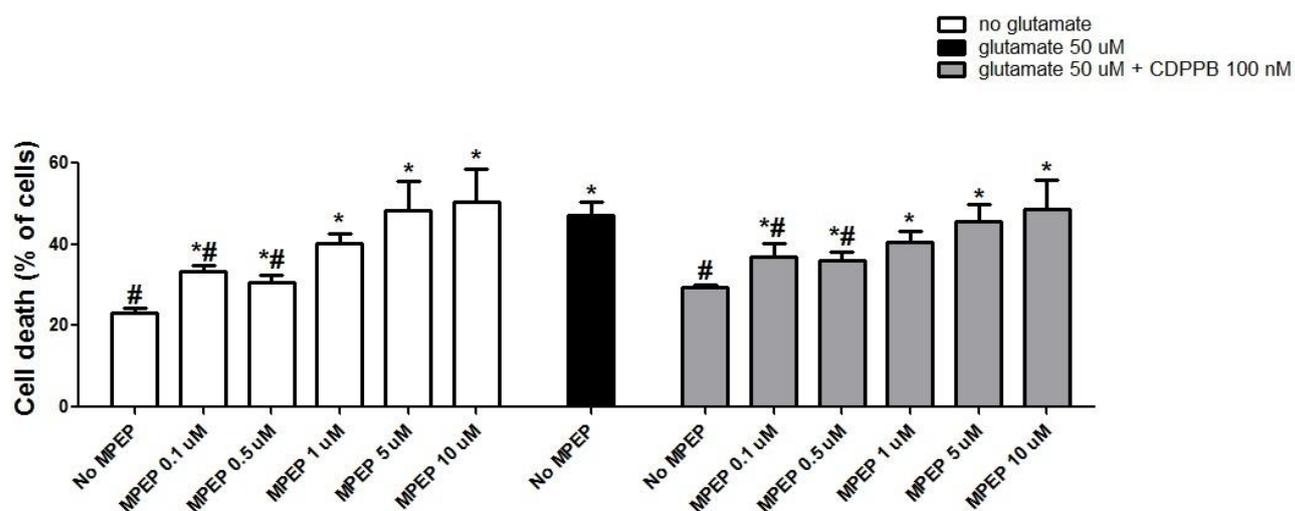
foram capazes de causar morte acima dos níveis basais, sendo que 100, 500 e 1000 nM de AM251 levaram à morte neuronal a níveis tão elevados quanto o glutamato e por isso não foram implementadas em estudos posteriores (Fig. 6). As concentrações de 10 nM, 100 nM, 500 nM e 1000 nM de AM251 reverteram a neuroproteção induzida pelo URB597 (Fig. 6). Assim, em estudos posteriores utilizamos a concentração de AM251 de 10 nM, visto que foi a única dose que se mostrou eficiente em reverter a neuroproteção promovida por URB597, porém sem causar morte neuronal semelhante ao glutamato.



**Fig. 6. Efeito de diferentes concentrações de AM251 na morte neuronal.** O gráfico mostra a porcentagem de morte celular de neurônios tratados com AM251 0,001 nM, 0,01 nM, 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 500 nM e 1000 nM na presença ou na ausência de glutamato 50  $\mu$ M e URB597 1nM. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. # indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. \* indica diferenças significativas em comparação à morte basal ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

## 4.2. Efeito de diferentes concentrações de MPEP na morte neuronal

Já está bem estabelecido na literatura que os MAPs do mGluR5, tais como CDPPB, podem ativar vias neuroprotetoras, levando à ativação de AKT e ERK, e que o MAN MPEP, que atua como antagonista do mGluR5, pode inibir esse efeito (Doria et al., 2015; Hou, 2004; Rong et al., 2003). A fim de avaliar a concentração do MPEP que revertesse a neuroproteção induzida por CDPPB contra o insulto de glutamato, mas que não causasse morte neuronal a níveis tão altos quanto o próprio glutamato, a cultura de neurônios corticoestriatais foi incubada com MPEP 0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M, na presença ou na ausência de glutamato 50  $\mu$ M e CDPPB 100 nM por 20 horas. Foi observado que na ausência de glutamato, algumas concentrações de MPEP podem causar morte acima dos níveis basais, e que seu efeito é concentração dependente (Fig. 7). Foi observado ainda que as concentrações de MPEP de 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M revertem a neuroproteção induzida pelo CDPPB, porém causam tanta morte quanto o glutamato (Fig. 7). Em vista disso, a concentração de MPEP utilizada em estudos posteriores foi de 1  $\mu$ M por ser a menor concentração capaz de reverter a neuroproteção promovida pelo CDPPB.

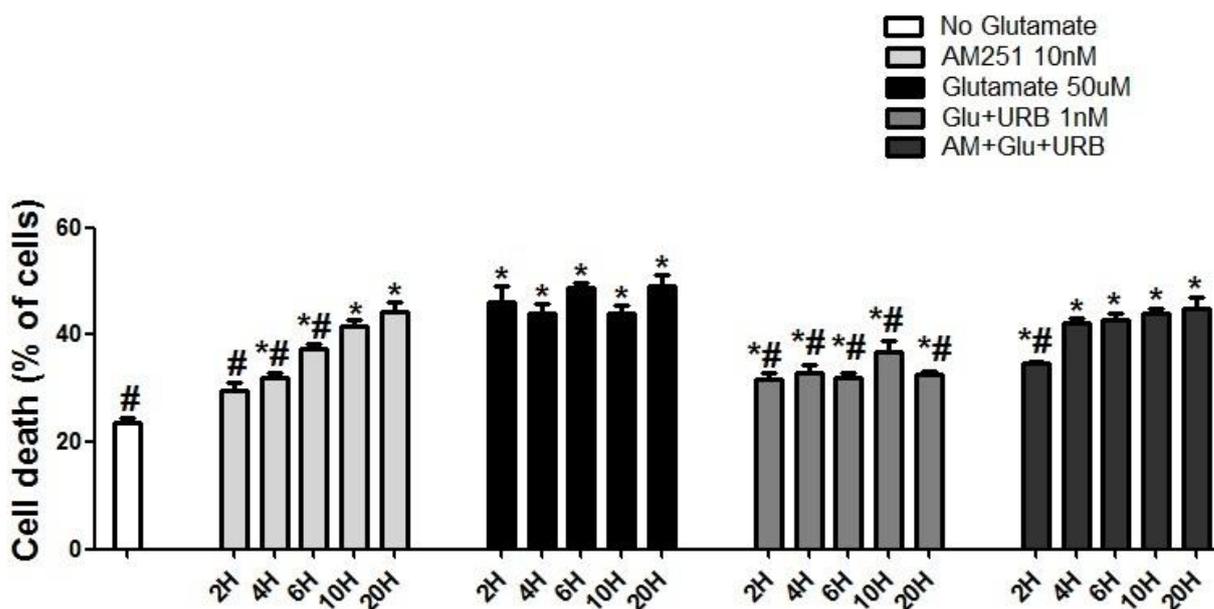


**Fig. 7. Efeito de diferentes concentrações de MPEP na morte neuronal.** O gráfico mostra a porcentagem de morte celular de neurônios tratados com MPEP 0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M na presença ou na ausência de glutamato 50  $\mu$ M e CDPPB 100 nM. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. # indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. \* indica diferenças significativas em comparação à morte basal ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

#### 4.3. Efeito do AM251 em diferentes tempos na morte neuronal

Durante os experimentos de concentração resposta, foi observado que o AM251 causa morte neuronal acima dos níveis basais e que esse efeito era concentração dependente. Com o objetivo de diminuir o efeito tóxico do AM251, foi realizada uma curva de tempo. Para tal, culturas neuronais foram incubadas com AM251 10 nM, na presença ou na ausência de glutamato 50  $\mu$ M e URB597 1 nM por 2, 4, 6, 10 e 20 horas. Foi observado que a morte neuronal causada pelo AM251 é tempo dependente (Fig. 8). No tempo de 4 horas, o AM251 se mostrou capaz de reverter o efeito neuroprotetor induzido por URB597, sendo que a morte neuronal

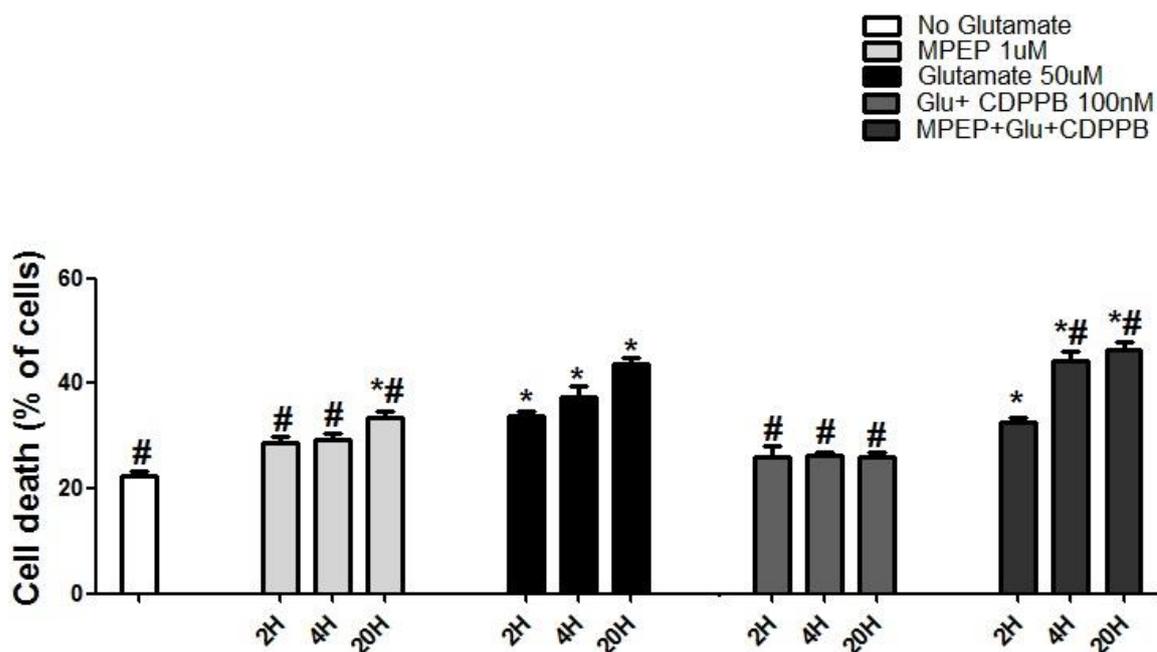
induzida pelo AM251 na ausência de glutamato e URB597 nesse tempo de incubação foi bem menor do que nos outros tempos analisados e inferior à induzida por glutamato (Fig. 8). Com 2 horas, o AM251 não causa morte acima do basal, porém não é capaz de anular o efeito neuroprotetor do URB597. Para todos os tempos testados o glutamato causa morte acima do nível basal (Fig. 8).



**Fig. 8. Efeito do AM251 10 nM em diferentes tempos na morte neuronal.** O gráfico mostra a porcentagem de morte celular de neurônios tratados com AM251 10 nM, na presença ou na ausência de glutamato 50  $\mu$ M e URB597 1 nM pelos tempos de 2, 4, 6, 10 e 20 horas. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. # indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. \* indica diferenças significativas em comparação à morte basal ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

#### **4.4. Efeito do MPEP sobre a morte neuronal em diferentes tempos**

Similar ao que ocorreu com o AM251, o MPEP também causa morte neuronal acima dos níveis basais e esse efeito também é dose dependente. Para testar em qual tempo o MPEP reverteria a neuroproteção induzida por CDPPB contra o insulto de glutamato e não causaria morte acima dos níveis basais, culturas neuronais foram incubadas com MPEP 1  $\mu$ M, na presença ou na ausência de glutamato 50  $\mu$ M e CDPPB 100 nM, por 2, 4 e 20 horas. Foi observado que no tempo de 4 horas, o efeito neuroprotetor induzido por CDPPB era revertido pelo MPEP (Fig. 9). Além disso, no tempo de 4 horas o MPEP, na ausência de glutamato e CDPPB, não promoveu morte neuronal acima dos níveis basais. No tempo de 2 horas, o MPEP não causa morte acima do basal, porém não anula o efeito neuroprotetor do CDPPB. Para todos os tempos testados o glutamato causa morte acima do nível basal (Fig. 9). Em vista disso, escolheu-se o tempo de 4 h para a incubação dos neurônios com as drogas testadas.

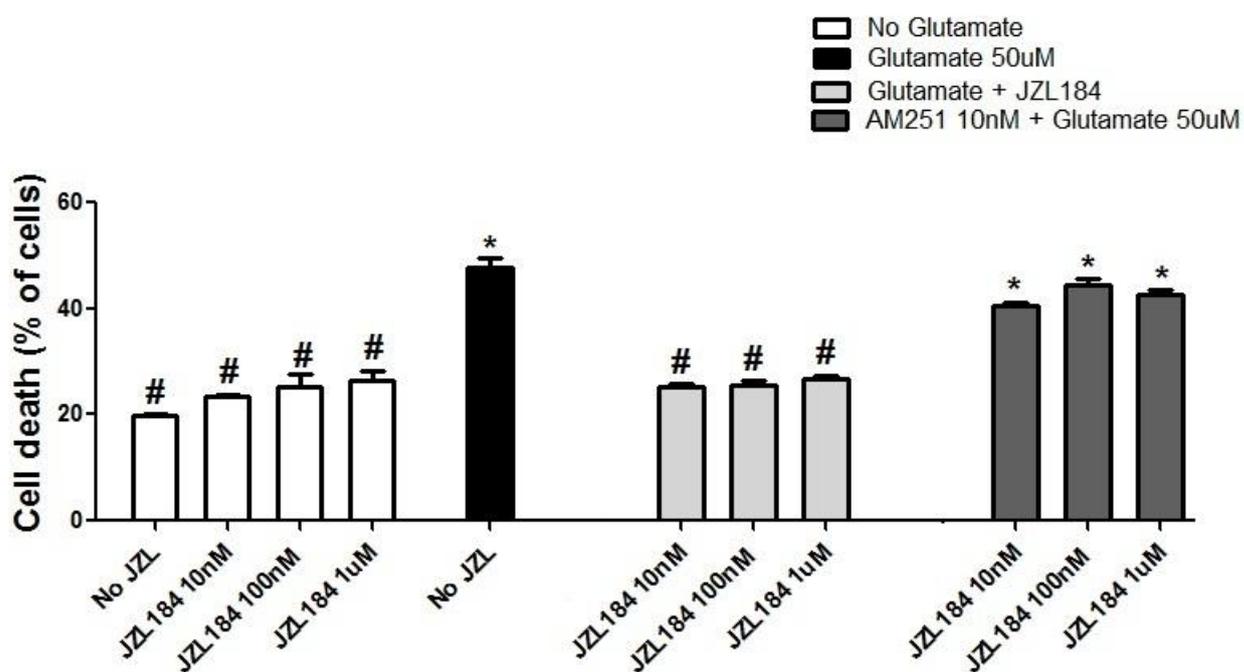


**Fig. 9. Efeito do MPEP 1  $\mu$ M em diferentes tempos na morte neuronal.** O gráfico mostra a porcentagem de morte celular de neurônios tratados com MPEP 1  $\mu$ M, na presença ou na ausência de glutamato 50  $\mu$ M e CDPPB 100 nM pelos tempos de 2, 4 e 20 horas. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. # indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. \* indica diferenças significativas em comparação à morte basal ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

#### **4.5. Determinação das concentrações do inibidor da hidrólise do 2-AG (JZL184) efetivas para a indução do efeito neuroprotetor**

Trabalhos anteriores publicados por nosso grupo já haviam estabelecido que as doses de 100 nM de CDPPB e 1 nM de URB597 eram ideais para a promoção de neuroproteção em cultura primária de neurônios estriatais e hipocâmpais (Doria et al., 2013; Vilela et al., 2015). Devido a participação do mGluR5 na síntese e

liberação do 2-AG através do complexo signalossoma (Gregg et al., 2012; Piomelli, 2013), resolvemos investigar o papel neuroprotetor do 2-AG através da inibição de sua hidrólise pela MGL. Para tal, incubamos a cultura de neurônios corticoestriatais com 10 nM, 100 nM e 1  $\mu$ M de JZL184, na presença ou na ausência de glutamato 50  $\mu$ M e AM251 10 nM por 4 horas. Pode-se observar que o JZL184 não se mostrou tóxico em nenhuma das concentrações testadas, pois o mesmo não levou à morte neuronal acima dos níveis basais (Fig. 10). Quando adicionado junto ao glutamato, o JZL184 reduziu a morte induzida por insulto de glutamato (Fig. 10). Além disso, o AM251 10 nM foi eficiente em anular o efeito neuroprotetor do JZL184 (Fig.11), indicando que a neuroproteção é dependente de CB1.

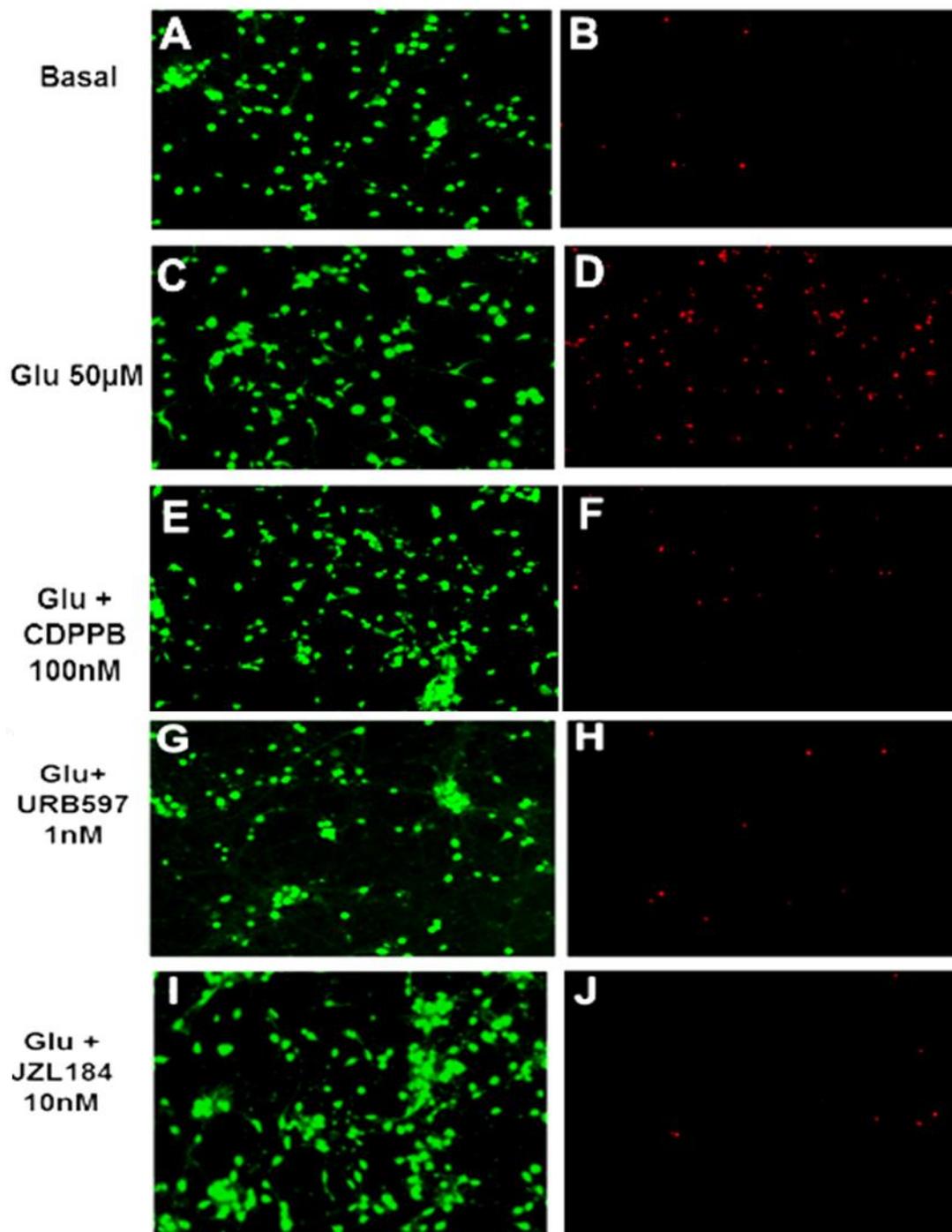


**Fig. 10. JZL184 Promove neuroproteção contra o insulto de glutamato em diferentes concentrações.** O gráfico mostra a porcentagem de morte celular de neurônios tratados com JZL184

10 nM, JZL184 100 nM, JZL184 1 $\mu$ M na presença ou na ausência de glutamato 50  $\mu$ M e AM251 10 nM. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. # indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. \* indica diferenças significativas em comparação à morte basal ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

#### **4.6. CDPPB, URB597 e JZL184 protegem os neurônios da morte induzida por glutamato em um mecanismo dependente tanto de mGluR5 quanto de CB1**

Sabendo-se que as drogas estudadas possuem potencial neuroprotetor, incubamos a cultura primária de neurônios corticoestriatais com CDPPB 100 nM, URB597 1 nM e JZL184 10 nM na presença de 50  $\mu$ M de glutamato por 4 horas. Foi observado que CDPPB, URB597 e JZL184 promovem proteção contra a morte induzida por glutamato, visto que o número de células mortas (vermelho) foi radicalmente diminuído quando os neurônios foram incubados com glutamato na presença das drogas neuroprotetoras (Fig. 11).



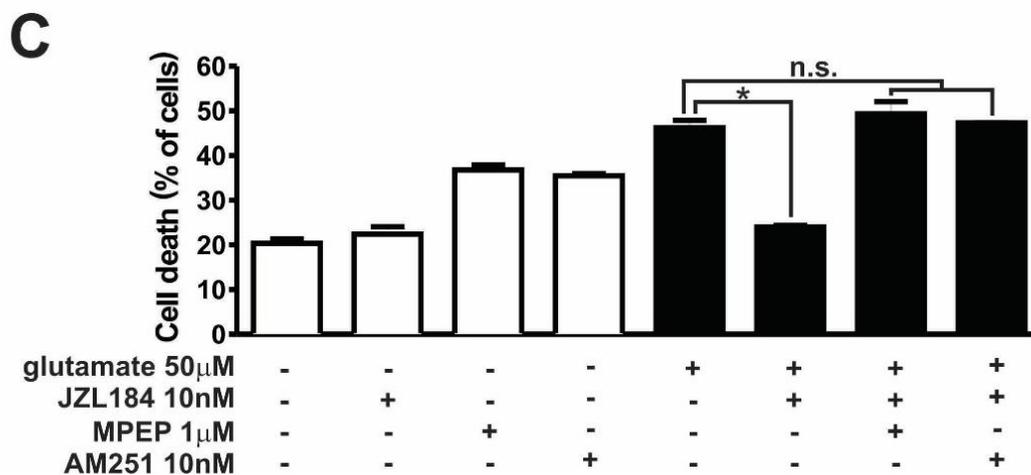
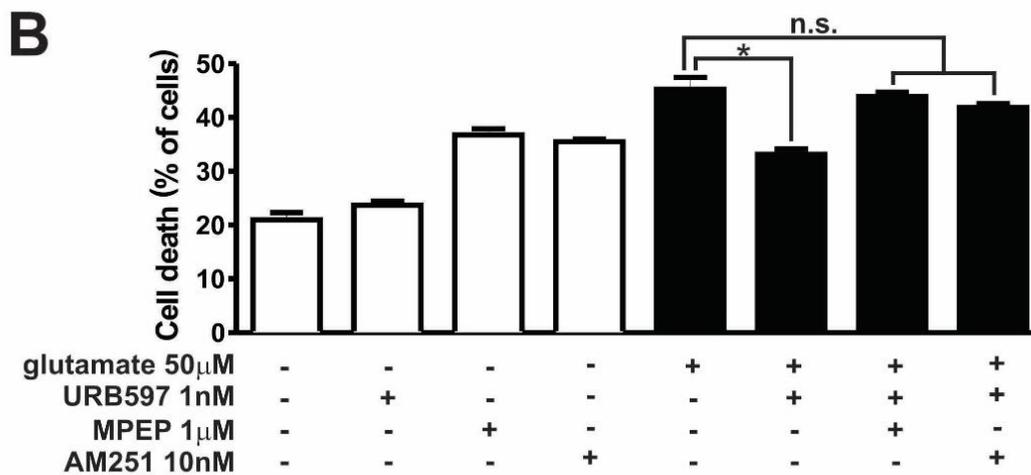
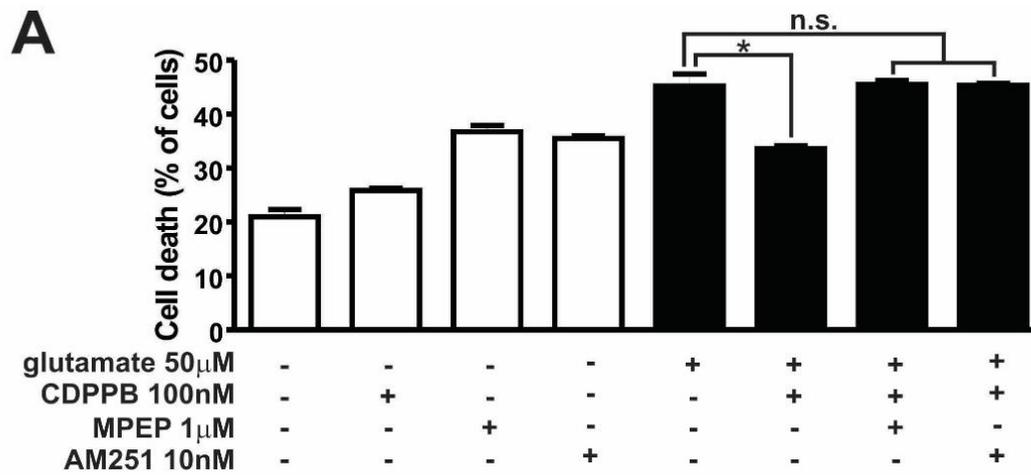
**Fig. 11. CDPPB, URB597 e JZL184 protegem os neurônios da morte induzida por glutamato.** (A, C, E, G e I). Imagem representativa de neurônios corticoestriatais marcados com Calceína-AM (células vivas, verde). (B, D, F, H e J). Neurônios corticoestriatais marcados com homodímero de etídeo1 (células mortas, vermelho). As figuras A e B mostram a morte basal destes neurônios. As figuras C e D mostram a morte neuronal por insulto de 50  $\mu$ M de glutamato. As figuras E e F mostram a morte neuronal induzida por glutamato 50  $\mu$ M na presença de CDPPB 100 nM; G e H mostram a

morte neuronal induzida por glutamato 50  $\mu$ M na presença de URB597 1 nM e I e J mostram a morte neuronal induzida por glutamato 50  $\mu$ M na presença de JZL184 10 nM, n=4.

#### **4.7. A neuroproteção induzida por CDPPB, URB597 e JZL184 é bloqueada por antagonistas do mGluR5 e CB1**

Foi demonstrado por (Doria et al., 2015) que o PAM do mGluR5, CDPPB, é neuroprotetor em cultura primária de neurônios estriatais. Corroborando esses resultados, foi observado que CDPPB 100 nM preveniu a morte de neurônios corticoestriatais causada pelo insulto de glutamato (Fig. 12A). Ao bloquear o mGluR5 com MPEP 1  $\mu$ M, o efeito neuroprotetor do CDPPB foi anulado (Fig. 13A). Para avaliar a função do receptor CB1 na neuroproteção mediada por CDPPB, a cultura foi tratada com AM251. 10 nM de AM251 suprimiu o efeito neuroprotetor do CDPPB (Fig. 12A). Isso indica que a neuroproteção via CDPPB é dependente não só de mGluR5, mas também de CB1. A degradação de anandamida e 2-AG pelas enzimas FAAH e MGL pode ser prevenida por URB597 e JZL184, respectivamente, aumentando os níveis desses endocanabinóides (Kathuria et al., 2003; Long et al., 2009). Para testar se o aumento dos níveis de anandamida e 2-AG através do bloqueio de FAAH e MGL iria promover neuroproteção contra o insulto de glutamato 50  $\mu$ M, a cultura foi incubada com URB597 1 nM e JZL184 10 nM. Tanto URB597 (Fig. 9B) quanto JZL184 (Fig. 12C) foram capazes de proteger as células da morte induzida pelo glutamato. A neuroproteção foi dependente do receptor CB1, porque o AM251 foi eficaz em bloquear a sobrevivência neuronal mediada por URB597 (Fig. 13B) e JZL184 (Fig. 12C). No entanto, MPEP também foi capaz de anular a neuroproteção mediada por URB597 (Fig. 12B) e JZL184 (Fig. 12C). O mGluR5 é importante para a síntese de endocanabinóides e seu bloqueio pode levar à redução

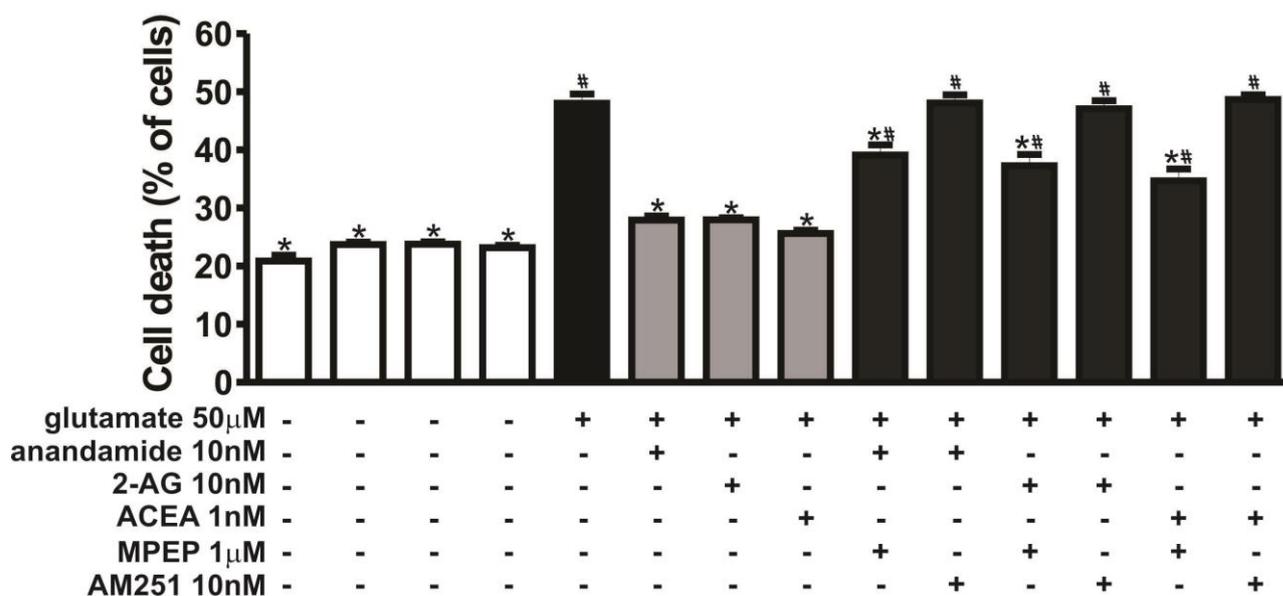
dos níveis dos endocanabinóides (Jung et al., 2007), o que poderia explicar porque o bloqueio do mGluR5 através do MPEP levaria a uma diminuição da neuroproteção induzida por URB597 e JZL184.



**Fig. 12. A neuroproteção induzida por CPPB, URB597 e JZL184 é bloqueada por antagonistas do mGluR5 e CB1.** (A) o gráfico mostra a morte celular de neurônios corticoestriatais em cultura primária, não tratados (-) ou tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, MPEP 1  $\mu$ M, AM251 10 nM, (A) CDPPB 100 nM, (B) URB597 1 nM, e (C) JZL184 10 nM por 4 h. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. \* indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

#### **4.8. A neuroproteção induzida por agonistas canabinóides é totalmente revertida por AM251 e parcialmente por MPEP**

Anandamida, 2-AG e arachidonyl-2'-chloroethylamide (ACEA) são agonistas diretos dos receptores canabinóide e, portanto, seu efeito neuroprotetor deveria ser independente de mGluR5, caso a ativação desse receptor só seja importante para aumentar os níveis de endocanabinóides através de síntese. Para testar essa hipótese, incubamos culturas de neurônios com anandamida, 2-AG ou ACEA, na presença ou na ausência de glutamato, AM251 e MPEP. Os três agonistas canabinóides testados foram capazes de prevenir a morte neuronal induzida pelo insulto de glutamato (Fig. 13). O AM251 foi eficaz em bloquear esse efeito, no entanto, o bloqueio do mGluR5 pelo MPEP apenas propiciou uma reversão parcial da neuroproteção promovida pela anandamida, 2-AG e ACEA (Fig. 13). Esses dados indicam que o mGluR5 pode ser importante não só para a síntese de endocanabinóides, visto que a reversão da neuroproteção foi apenas parcial, mas que também possa ser importante como agente neuroprotetor direto, cooperando com o CB1 para a sobrevivência neuronal.



**Fig. 13. A neuroproteção induzida por agonistas canabinóides é revertida totalmente por AM251 e parcialmente por MPEP.** (A) o gráfico mostra a morte celular de neurônios corticoestriatais em cultura primária, não tratados (-) ou tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, anandamida 10 nM, 2-AG 10nM, ACEA 1nM, MPEP 1  $\mu$ M, AM251 10 nM por 4 h. Os dados representam a média de seis experimentos independentes. \* indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$ .

#### **4.9. O tratamento com CDPPB, URB597 e JZL184 não altera a liberação de glutamato em cultura de neurônios corticoestriatais**

A diminuição da liberação de glutamato por terminais pré-sinápticos glutamatérgicos é um dos mecanismos neuroprotetores propostos induzidos pela ativação de CB1 (Marsicano et al., 2003; Shen et al., 1996). Então, testamos se as drogas neuroprotetoras testadas poderiam reduzir a liberação de glutamato e assim promover neuroproteção. Na ausência do insulto de glutamato, nenhuma das drogas testadas, CDPPB, URB597, JZL184, MPEP e AM251, alteraram a liberação de

glutamato, quando comparado com os níveis basais (Fig. 14). Além disso, na presença de glutamato, CDPPB (Fig. 14A), URB597 (Fig. 14B) e JZL184 (Fig. 14C) também não foram eficientes para alterar os níveis de glutamato extracelular. A literatura relata que os endocanabinóides podem diminuir a liberação de glutamato. Mas como o insulto usado para provocar morte celular é o próprio glutamato, é provável que diminuir a liberação de glutamato não tenha um papel importante no mecanismo neuroprotetor.

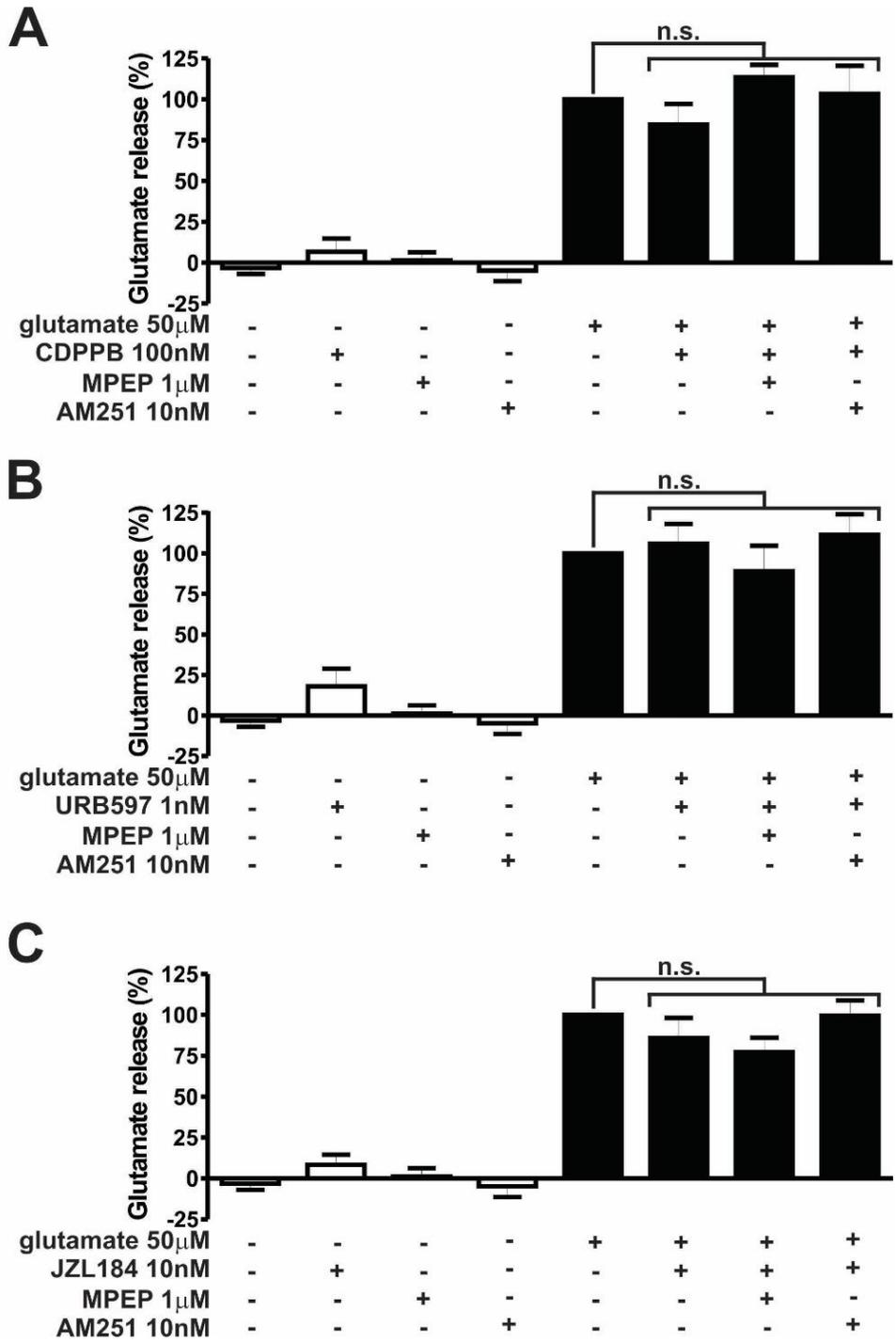
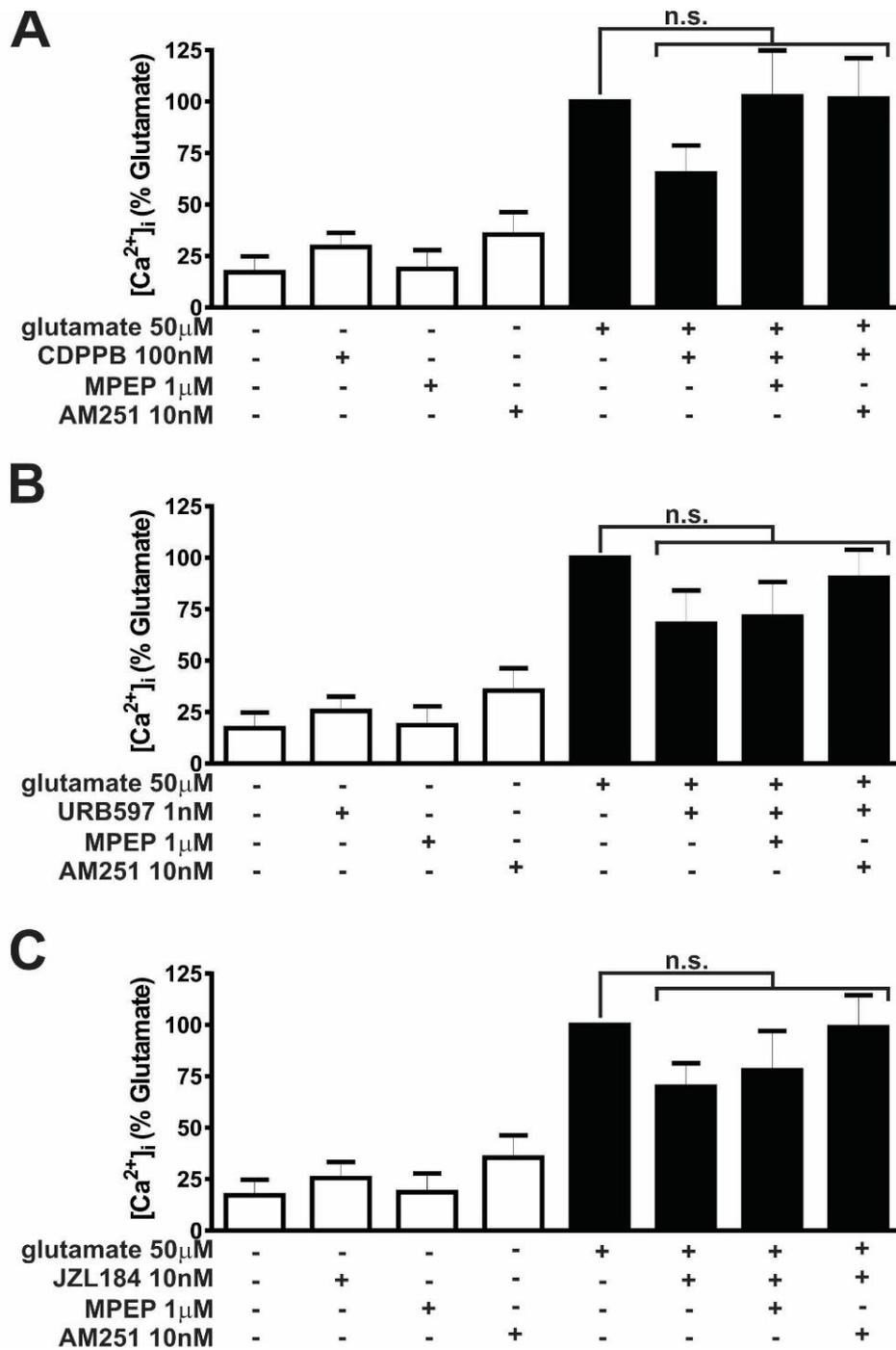


Figure 14. O tratamento com CDPPB, URB597 e JZL184 não altera a liberação de glutamato. O gráfico mostra os níveis de liberação de glutamato em cultura primária de neurônios corticoestriatais, não tratados (-) ou tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, MPEP 1  $\mu$ M, AM251 10 nM, **(A)** CDPPB 100 nM, **(B)** URB597 1 nM e **(C)** JZL184 10 nM por 5 minutos. Os dados representam a média de seis

experimentos independentes. \* indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. ( $p < 0.05$ ),  $n=6$ .

#### **4.10. O tratamento com CDPPB, URB597 e JZL184 não modifica a concentração de $Ca^{2+}$ intracelular**

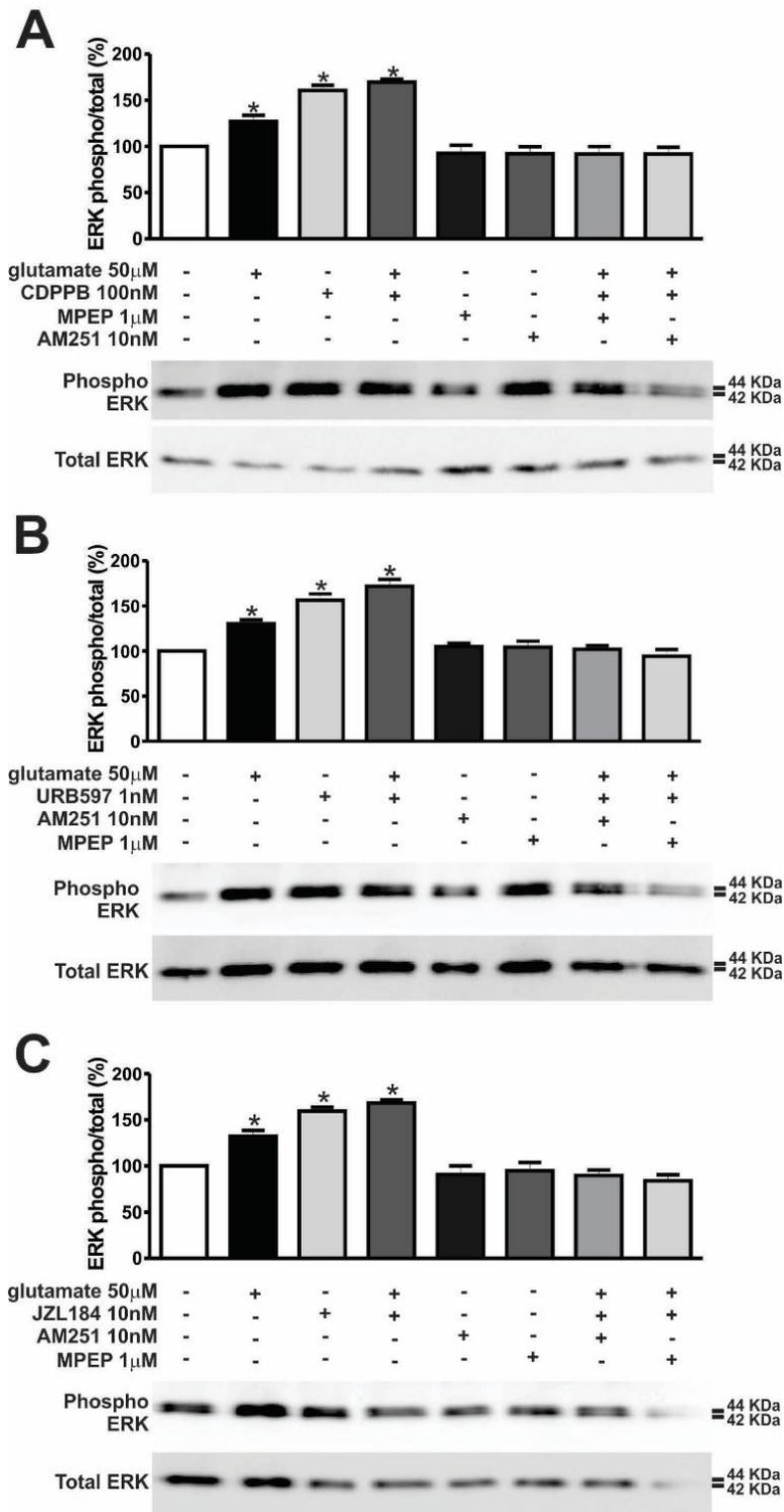
Também avaliamos os níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular em culturas neuronais, pois um possível mecanismo de sobrevivência celular seria diminuir os níveis intracelulares deste íon. Na ausência de glutamato, nenhuma das drogas testadas aumentou o  $Ca^{2+}$  intracelular acima dos níveis basais. Ao estimular a cultura com glutamato, os níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular aumentaram significativamente (Fig. 15), o que poderia contribuir para a excitotoxicidade neuronal. No entanto, CDPPB (Fig. 15A), URB597 (Fig. 15B) e JZL184 (Fig. 15C) não foram eficazes em diminuir o aumento dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular induzido por glutamato. Portanto, o mecanismo de sobrevivência celular induzida por CDPPB, URB597 e JZL184 em neurônios sob o insulto de glutamato não parece envolver a redução da liberação de glutamato ou diminuição dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular.



**Figure 15: O tratamento com CDPPB, URB597 e JZL184 não modifica a concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular.** O gráfico mostra os níveis de concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular em cultura primária de neurônios corticoestriatais, não tratados (-) ou tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, MPEP 1  $\mu$ M, AM251 10 nM, (A) CDPPB 100 nM, (B) URB597 1 nM e (C) JZL184 10 nM por 5 minutos. Os dados representam a média de seis experimentos independentes. \* indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. ( $p < 0.05$ ),  $n = 6$ .

#### **4.11. CDPPB, URB597 e JZL184, aumentam a fosforilação de ERK1/2 em cultura de neurônios corticoestriatais**

A literatura relata que os receptores mGluR5 e CB1 podem ativar vias de sobrevivência celular semelhantes, por exemplo, MEK/ERK1/2 e PI3K/AKT (Hou e Klann 2004; Rong et al., 2003; Gómez del Pulgar et al., 2000; Ribeiro et al., 2010; Galve-Roperh et al., 2002). Por isso, investigamos se a ativação da proteína ERK1/2 pode estar envolvida no mecanismo neuroprotetor ativado pelo mGluR5/CB1. Ao estimular a cultura primária de neurônios corticoestriatais com CDPPB, este foi capaz de fosforilar e assim ativar a ERK1/2 acima dos níveis basais na ausência ou presença de glutamato (Fig. 16A). O tratamento prévio com AM251 ou MPEP preveniu essa ativação (Fig. 16A). URB597 e JZL184 também foram eficazes em ativar ERK1/2 acima dos níveis basais. Semelhante ao que ocorreu com o CDPPB, AM251 e MPEP também bloqueou a ativação da ERK1/2 mediada por URB597 e JZL184 (Fig. 16B e 16C).

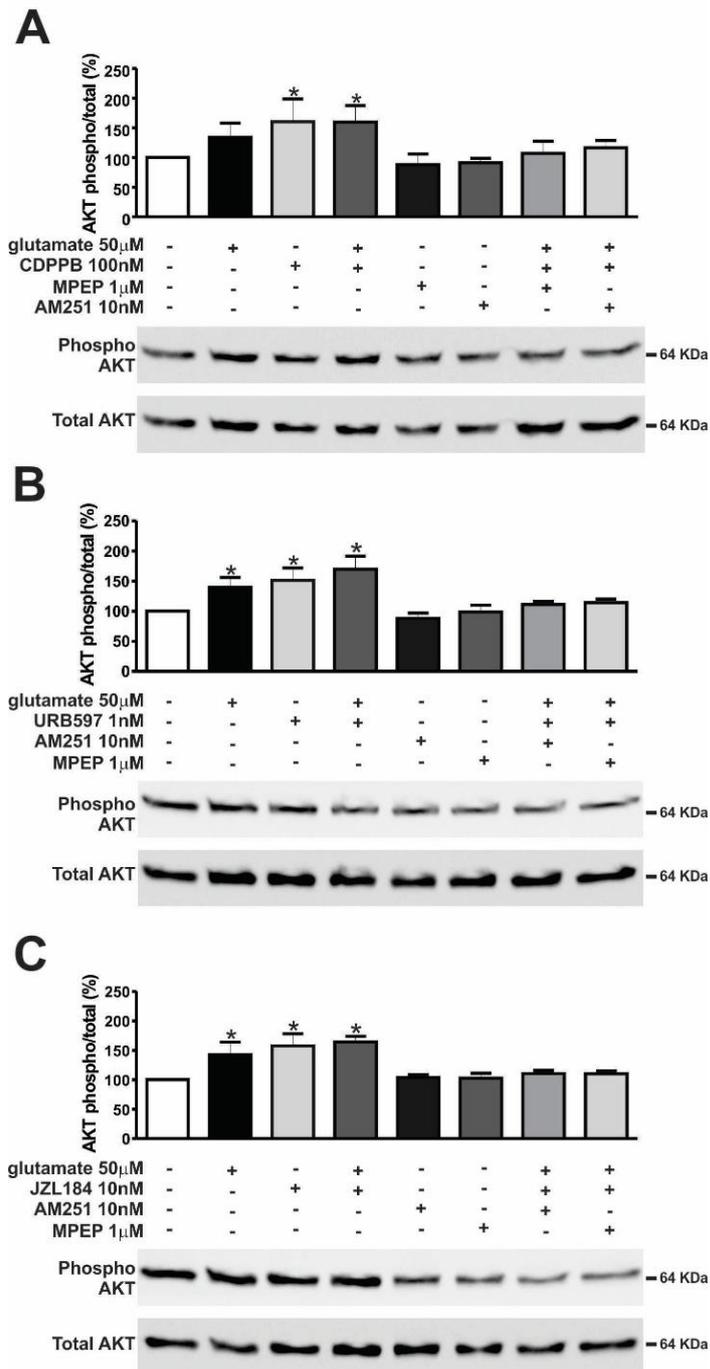


**Fig. 16. Fosforilação de ERK1/2 mediada por CDDPB, URB597 e JZL184 é dependente de mGluR5 e CB1.** São mostrados imunoblots representativos da expressão de fosfo-ERK1/2 (painel superior) e total-ERK1/2 (painel inferior) e os gráficos ilustram a análise densitométrica de fosfo-

ERK1/2 normalizados pela expressão de total-ERK1/2 em neurônios corticoestriatais em cultura primária que não receberam tratamento (-) ou que foram tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, MPEP 1  $\mu$ M, AM251 10 nM, (A) CDPPB100 nM, (B) URB597 1 nM, e (C) JZL184 10 nM por 7,5 min. 100  $\mu$ g de lisado celular foi utilizado para cada amostra. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. \* indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

#### **4.12 CDPPB, URB597 e JZL184 aumentam a fosforilação de AKT em cultura de neurônios corticoestriatais**

Assim como ocorre com a ERK1/2, a AKT também pode ser ativada por CB1 e mGluR5 (Hou e Klann 2004; Rong et al., 2003; Gómez del Pulgar et al., 2000; Ribeiro et al., 2010; Galve-Roperh et al., 2002). Para investigar se a ativação da proteína AKT pode estar envolvida no mecanismo neuroprotetor mGluR5/CB1, estimulamos culturas primárias de neurônios corticoestriatais com CDPPB. Esse MAP do mGluR5 foi capaz de fosforilar e assim ativar a AKT acima dos níveis basais na ausência ou presença de glutamato (Fig. 17A). O tratamento prévio com AM251 ou MPEP preveniu essa ativação (Fig. 18A). URB597 (Fig. 18B) e JZL184 (Fig. 17C) também foram eficazes, ativando AKT acima dos níveis basais. Semelhante ao que ocorreu com o CDPPB, AM251 e MPEP também bloquearam a ativação da AKT induzida por URB597 e JZL184 (Fig. 17B e 17C). Esses dados sugerem que mGluR5 e CB1 trabalham cooperativamente para a ativação de vias de sinalização que promovem sobrevivência neuronal.



**Fig. 17. Fosforilação de AKT mediada por CDPPB, URB597 e JZL184 é dependente de mGluR5 e CB1.** São mostrados imunoblots representativos da expressão de fosfo-AKT (painel superior) e total-AKT (painel inferior) e os gráficos ilustram a análise densitométrica de fosfo-AKT normalizados pela expressão de total-AKT em neurônios corticoestriatais em cultura primária que não receberam tratamento (-) ou que foram tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, MPEP 1  $\mu$ M, AM251 10 nM, (A)

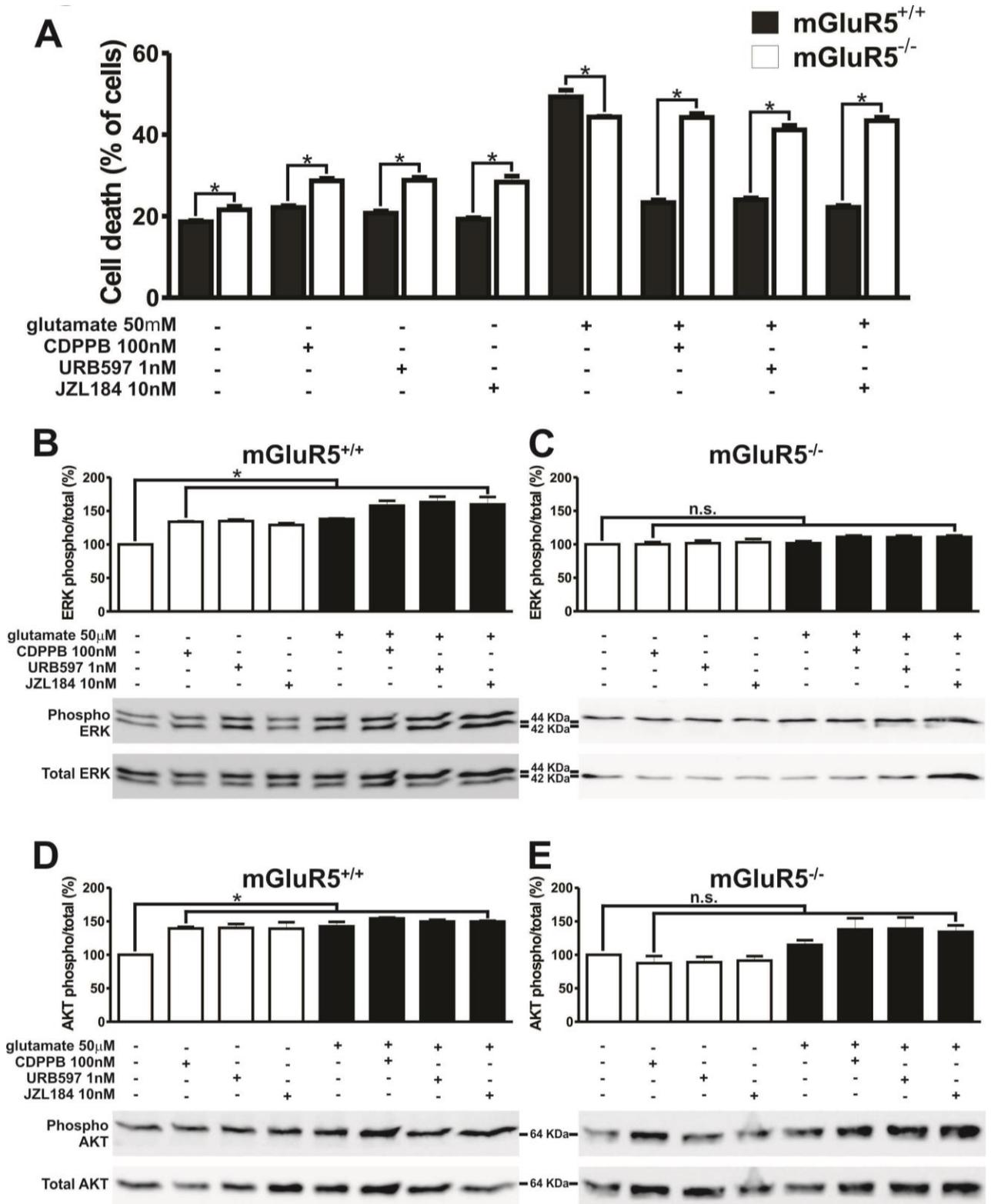
CDPPB100 nM, (B) URB597 1 nM, e (C) JZL184 10 nM por 7,5 min. 100 µg de lisado celular foi utilizado para cada amostra. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes.

\* indica diferença significativa em comparação ao grupo tratado com glutamato. ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

#### **4.13 CDPPB, URB597 e JZL184 não são capazes de promover neuroproteção e ativar ERK1/2 e AKT em cultura primária de neurônios corticoestriatais mGluR5<sup>-/-</sup>**

Para determinar se o resultado obtido com o bloqueio farmacológico dos receptores poderia ser reproduzido por *knockout* genético, usamos neurônios corticoestriatais em cultura primária obtidos a partir de embriões mGluR5<sup>-/-</sup> e incubamos com as drogas neuroprotetoras sob as mesmas condições dos experimentos anteriores, por 4 horas, na ausência e na presença de glutamato. Foi possível observar que no caso dos neurônios mGluR5<sup>-/-</sup>, a morte celular basal foi já mais elevada quando comparada com a morte de neurônios mGluR5<sup>+/+</sup>. Além disso, o tratamento com CDPPB, URB597 e JZL184 na ausência de glutamato, provocou níveis mais elevados de morte celular dos neurônios mGluR5<sup>-/-</sup> do que no caso dos neurônios mGluR5<sup>+/+</sup>. No entanto, o insulto de glutamato aumentou mais a morte celular neuronal no mGluR5<sup>+/+</sup> do que nos neurônios mGluR5<sup>-/-</sup>. Podemos ressaltar que esses achados reforçam a importância do mGluR5 como um receptor importante para a modulação de mecanismos de morte celular. Embora CDPPB, URB597 e JZL184 tenham promovido neuroproteção contra o insulto de glutamato em neurônios mGluR5<sup>+/+</sup> (Fig. 18A), estas drogas não foram capazes de promover a sobrevivência de neurônios mGluR5<sup>-/-</sup> (Fig. 18A). Além disso, CDPPB, URB597 e JZL184 só foram capazes de ativar ERK1/2 (Fig. 18B) e AKT em neurônios

mGluR5<sup>+/+</sup> (Fig. 14D), e não ativou essas vias importantes para a sobrevivência celular em neurônios mGluR5<sup>-/-</sup> (Fig. 18C e 18E).

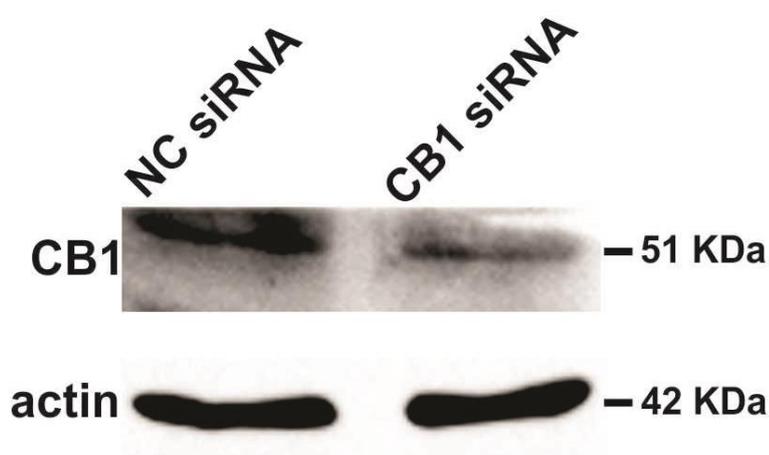


**Fig. 18. CDPPB, URB597 e JZL184 não são capazes de promover neuroproteção e ativar ERK1/2 e AKT em cultura de neurônios corticoestriatais mGluR5<sup>-/-</sup>.** (A) o gráfico mostra a morte celular de neurônios corticoestriatais em cultura primária, não tratados (-) ou tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, CDPPB 100 nM, URB597 1 nM e JZL184 10 nM por 4 h. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. \* indica diferença significativa em comparação com os grupos mGluR5<sup>+/+</sup>. São mostrados imunoblots representativos da expressão de fosfo-ERK1/2 (painel superior) e total-ERK1/2 (painel inferior) e os gráficos ilustram a análise densitométrica de fosfo-ERK1/2 normalizados pela expressão de total-ERK1/2 em neurônios corticoestriatais em cultura primária obtidos a partir de embriões de camundongos mGluR5<sup>+/+</sup> (B) e mGluR5<sup>-/-</sup> (C) que não receberam tratamento (-) ou que foram tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, CDPPB 100 nM, URB597 1 nM, e JZL184 10 nM por 7,5 min. Também é mostrado imunoblots representativos da expressão de fosfo-AKT (painel superior) e total-AKT (painel inferior) e os gráficos ilustram a análise densitométrica de fosfo-AKT normalizados pela expressão de total-AKT em neurônios corticoestriatais em cultura primária obtidos a partir de embriões de camundongos mGluR5<sup>+/+</sup> (D) e mGluR5<sup>-/-</sup> (E) que não receberam tratamento (-) ou que foram tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, CDPPB100 nM, URB597 1 nM, e JZL184 10 nM por 7,5 min. 100  $\mu$ g de lisado celular foi utilizado para cada amostra. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. \* indica diferença significativa em comparação com neurônios não tratados. (p<0.05), n=4.

#### **4.14. A eletroporação com siRNA-CB1 reduz a expressão da proteína CB1**

siRNAs são moléculas sintéticas de RNA de dupla fita de 19 a 30 pb, que atuam por meio de pareamento a sequências complementares ao RNA mensageiro alvo, causando sua degradação e, portanto, silenciamento específico do gene (França et al., 2010). O silenciamento do gene-alvo possibilita a obtenção de informações sobre a função exercida na célula pela proteína codificada por esse gene (França et al., 2010). Utilizando tal metodologia, foi feito um knockdown em neurônios corticoestriatais através da eletroporação de siRNA-CB1. Também foi usado siRNA controle negativo (siRNA-NC), o qual não tem como alvo nenhum mRNA murino.

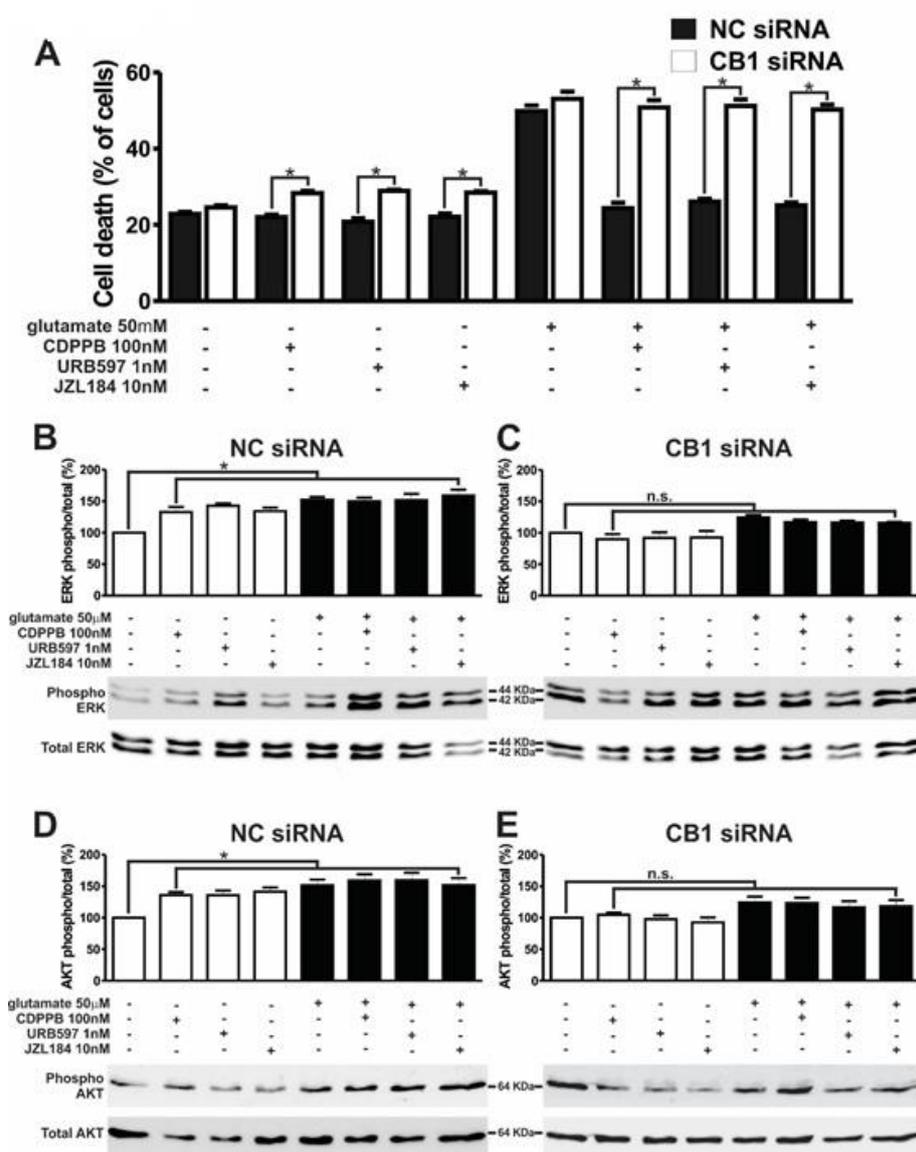
Com o intuito de avaliar o resultado da eletroporação, após 12 dias, os neurônios corticoestriatais em cultura primária foram lisados com tampão ripa e o imunoblot foi feito de acordo com protocolo adaptado de (Ferreira-Vieira et al., 2014). Foi observado que a expressão da proteína CB1 foi reduzida em cerca de 65% nos neurônios que foram eletroporados com siRNA-CB1, quando comparado à expressão de CB1 em neurônios eletroporados com siRNA-NC (Fig. 19).



**Fig. 19. A eletroporação com siRNA-CB1 reduz a expressão da proteína CB1.** São mostrados imunoblots representativos da expressão de CB1 (painel superior) e da  $\beta$ -actina (painel inferior) em neurônios corticoestriatais em cultura primária eletroporados com siRNA-NC ou siRNA-CB1. Os imunoblots são representativos de 3 experimentos independentes, n=3.

#### **4.15 CDPPB, URB597 e JZL184 não promovem neuroproteção nem ativa ERK1/2 e AKT em cultura primária de neurônios corticoestriatais CB1 Knockdown**

Para avaliar se a manipulação genética da expressão de CB1 poderia influenciar na neuroproteção mediada por CB1 e mGluR5, avaliamos a morte celular de neurônios transfectados com siRNA-CB1 ou siRNA-NC. A morte neuronal basal não foi diferente quando se comparou os neurônios transfectados com siRNA-CB1 ou siRNA-NC. No entanto, o tratamento dos neurônios com CDPPB, URB597 e JZL184, na ausência de glutamato, desencadeou níveis mais elevados de morte celular em neurônios CB1 knockdown, quando comparado com o controle (Fig. 16A). Esses dados indicam que alterações na expressão de CB1 podem tornar os neurônios mais sensíveis aos efeitos tóxicos das drogas, sustentando a premissa de que o CB1 desempenha um papel essencial nos mecanismos de sobrevivência celular. A morte celular provocada pelo insulto de glutamato nos neurônios eletroporados com siRNA NC ou CB1 foi semelhante (Fig. 20A). Assim como ocorreu no caso dos neurônios mGluR5<sup>-/-</sup>, CDPPB, URB597 e JZL184 não foram capazes de proteger neurônios CB1 knockdown contra o insulto de glutamato, embora estas drogas tenham sido eficientes em proteger os neurônios contra o insulto de glutamato em neurônios WT (Fig. 20A). Além disso, CDPPB, URB597 e JZL184 só foram capazes de ativar a ERK1/2 e AKT em neurônios controle (Fig. 20B e 20D), não sendo eficazes em ativar essas quinases em neurônios CB1 knockdown (Fig. 20C e 20E). Estes dados apoiam a hipótese de que mGluR5 e CB1 agem de maneira cooperativa para ativar vias de sinalização celular que levam à neuroproteção.



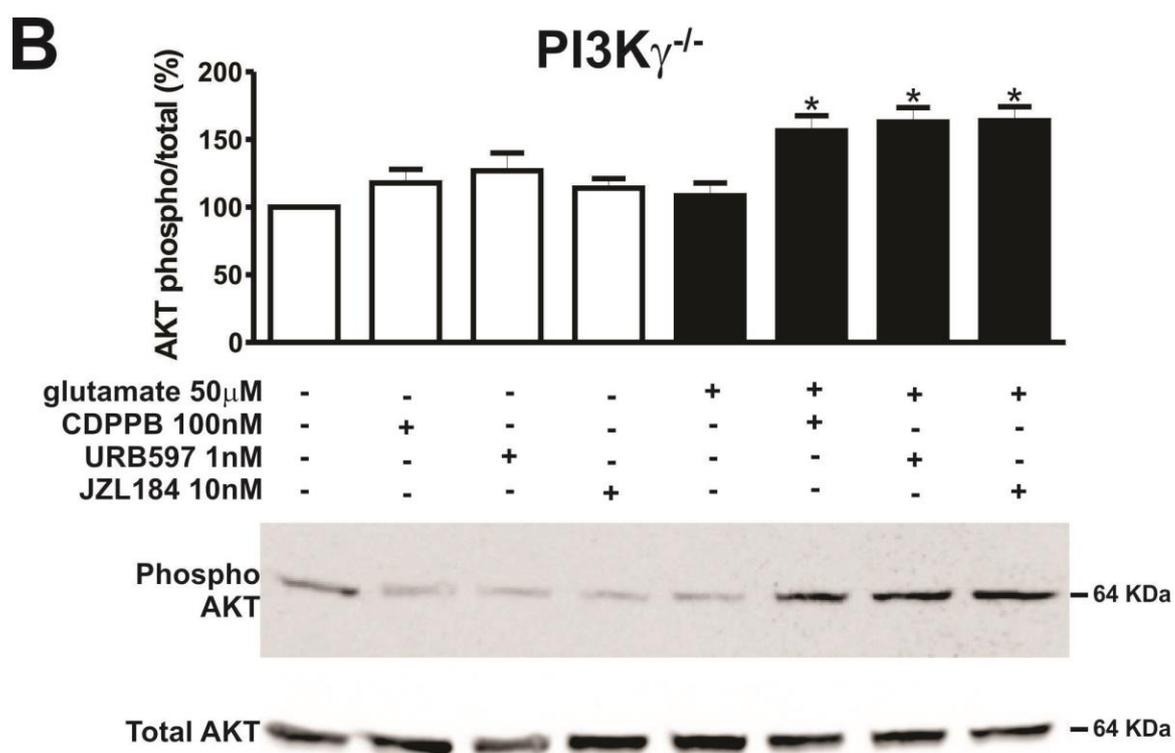
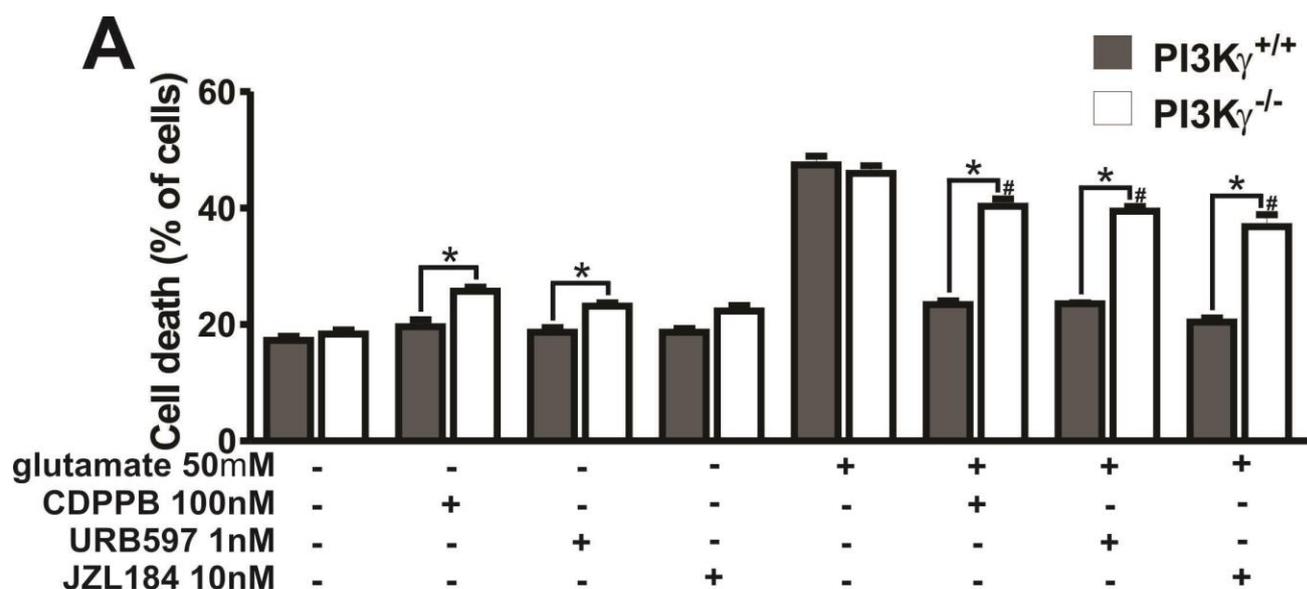
**Fig. 20. CDDPB, URB597 e JZL184 não promovem neuroproteção nem ativam ERK1/2 e AKT em cultura primária de neurônios corticoestriatais CB1 Knockdown.** A) o gráfico mostra a morte celular de neurônios corticoestriatais em cultura primária que foram eletroporados com siRNA-NC ou siRNA-CB1, não tratados (-) ou tratados (+) com glutamato 50 µM, CDDPB 100 nM, URB597 1 nM e JZL184 10 nM por 4 h. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. \* indica diferença significativa em comparação com o grupo controle, eletroporado com siRNA-NC. São mostrados imunoblots representativos da expressão de fosfo-ERK1/2 (painel superior) e total-ERK1/2 (painel inferior) e os gráficos ilustram a análise densitométrica de fosfo-ERK1/2 normalizados pela expressão de total-ERK1/2 em neurônios corticoestriatais em cultura primária obtidos a partir de

embriões de camundongos C57 selvagem que foram eletroporados com siRNA-NC (B) ou siRNA-CB1 (C) que não receberam tratamento (-) ou que foram tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, CDPPB 100 nM, URB597 1 nM, e JZL184 10 nM por 7,5 min. Também é mostrado imunoblots representativos da expressão de fosfo-AKT (painel superior) e total-AKT (painel inferior) e os gráficos ilustram a análise densitométrica de fosfo-AKT normalizados pela expressão de total-AKT em neurônios corticoestriatais em cultura primária obtidos a partir de embriões de camundongos C57 selvagem que foram eletroporados com siRNA-NC (D) ou siRNA-CB1 (E) que não receberam tratamento (-) ou que foram tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, CDPPB 100 nM, URB597 1 nM, e JZL184 10 nM por 7,5 min. 100  $\mu$ g de lisado celular foi utilizado para cada amostra. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. \* indica diferença significativa em comparação com neurônios não tratados. ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

#### **4.16 A neuroproteção induzida por CDPPB, URB597 e JZL184 é dependente da ativação de ERK1/2 e AKT.**

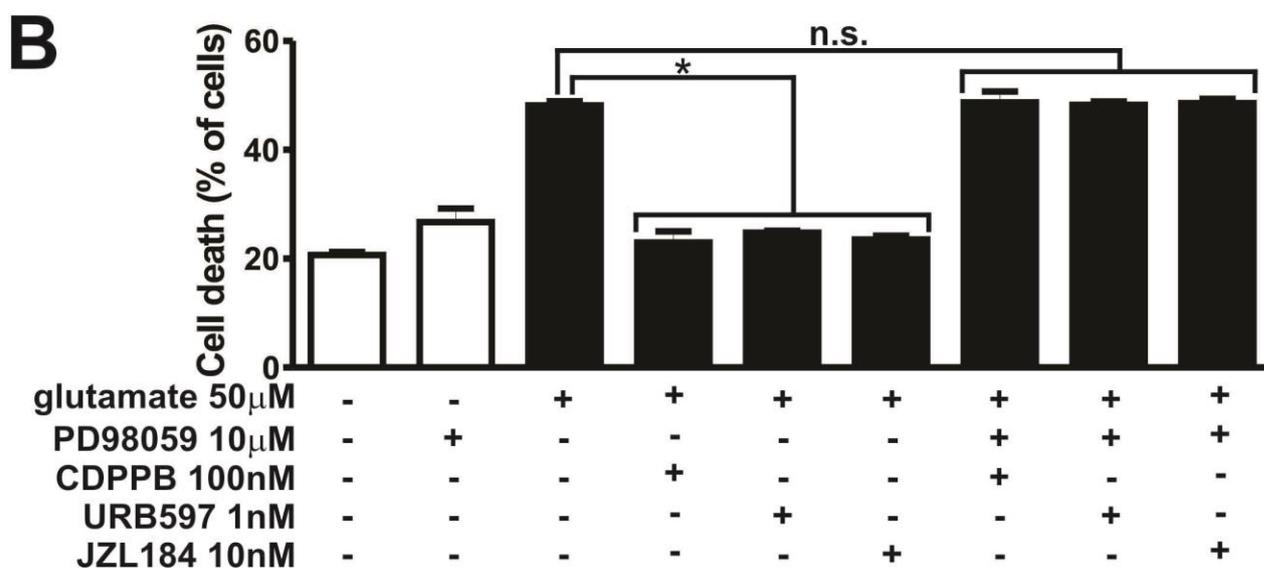
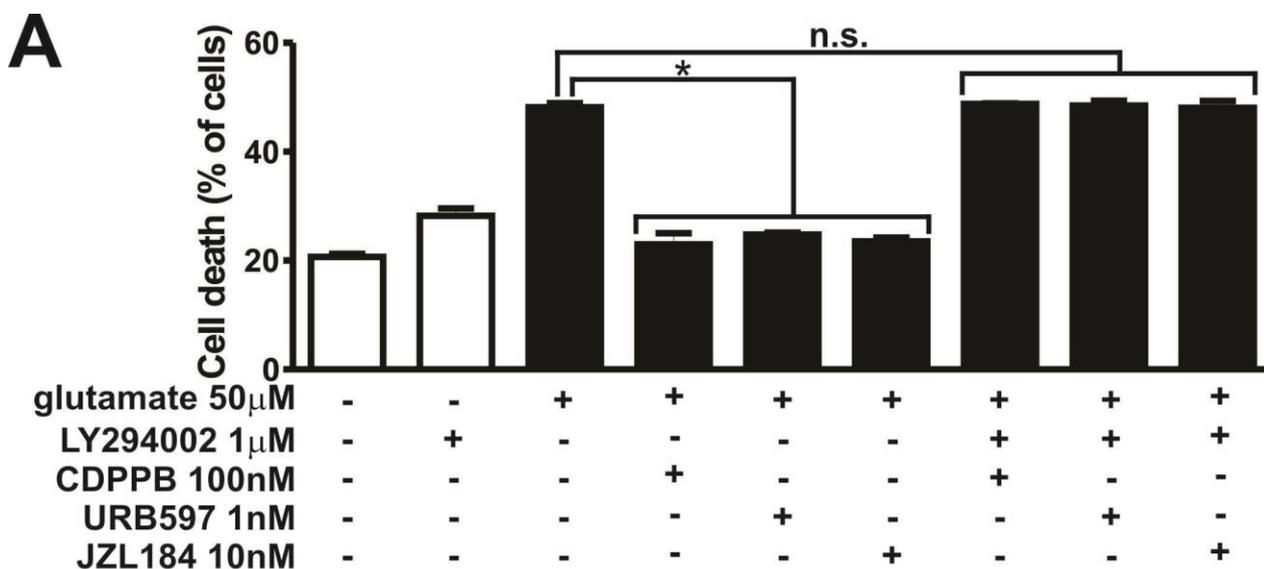
Para determinar se a AKT é de fato necessária para a neuroproteção mediada por CB1 e mGluR5, realizamos experimentos de morte celular em neurônios corticoestriatais obtidos de camundongos *knockouts* para a PI3K $\gamma$  (PI3K $\gamma^{-/-}$ ). Na ausência de glutamato, neurônios PI3K $\gamma^{-/-}$  incubados com CDPPB e URB597 exibiram níveis mais elevados de morte celular que os neurônios não estimulados (Fig. 21A), possivelmente porque o knockout da PI3K $\gamma$  diminui a ativação de vias de sobrevivência celular fazendo com que os neurônios fiquem mais propensos à toxicidade. Embora CDPPB, URB597 e JZL184 tenham promovido neuroproteção contra o insulto de glutamato em neurônios PI3K $\gamma^{+/+}$ , a neuroproteção induzida por estas drogas foi parcialmente anulada em neurônios PI3K $\gamma^{-/-}$  incubados com glutamato (Fig. 21A). CDPPB, URB597 e JZL184 não promoveram ativação da AKT em neurônios PI3K $\gamma^{-/-}$  (Fig. 21B). No entanto, na presença de glutamato, CDPPB,

URB597 e JZL184 aumentaram os níveis de fosforilação da AKT em neurônios PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup> (Fig. 21B), o que indica que, possivelmente, outras isoformas de PI3K, além da PI3K $\gamma$ , possam ativar a AKT quando os neurônios são estimulados com as drogas testadas na presença de glutamato, o que poderia explicar porque a neuroproteção não foi completamente eliminada em neurônios PI3K $\gamma$ <sup>-/-</sup>. Em vista disso, decidimos utilizar um inibidor de PI3K capaz de inibir todas as isoformas dessa quinase e assim investigar mais profundamente o papel da ativação de AKT promovendo neuroproteção mediada por CDPPB, URB597 e JZL184. Para tal, nós pré-incubamos os neurônios corticoestriatais de camundongos selvagens com LY294002 1  $\mu$ M, o qual inibe todas as isoformas de PI3K que são relevantes para os mecanismos neuroprotetores (Vlahos et al., 1994). LY294002 aboliu completamente a neuroproteção induzida por CDPPB, URB597 e JZL184 (Fig. 22A), indicando fortemente que a via PI3K/AKT é necessária para a neuroproteção mediada por CB1 e mGluR5. Além disso, a inibição de MEK/ERK1/2 usando um inibidor de MEK, PD98059 10  $\mu$ M, também eliminou a neuroproteção via CDPPB, URB597 e JZL184 (Fig. 22B). Estes dados indicam fortemente que a neuroproteção mediada pelos receptores CB1 e mGluR5 é dependente das vias PI3K/AKT e MEK/ERK.



**Fig. 21. A neuroproteção induzida por CDDPB, URB597 e JZL184 é reduzida, mas não abolida em neurônios PI3K $\gamma^{-/-}$ .** (A) o gráfico mostra os níveis de morte celular de neurônios corticoestriatais que não foram tratados (-) ou que foram tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, CDDPB 100 nM, URB597 1 nM e JZL184 10 nM por 4 h (Fig. 17A). Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. \* indica diferença significativa em comparação com neurônios PI3K $\gamma^{+/+}$  tratados.

( $p < 0.05$ ). É mostrado imunoblots representativos da expressão de fosfo-AKT (painel superior) e total-AKT (painel inferior) e o gráfico ilustra a análise densitométrica de fosfo-AKT normalizada pela expressão de total-AKT em neurônios corticoestriatais em cultura primária que não receberam tratamento (-) ou que foram tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, CDPPB100 nM, URB597 1 nM e JZL184 10 nM por 7,5 min (Fig. 17B). 100  $\mu$ g de lisado celular foi utilizado para cada amostra. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. \* indica diferença significativa em comparação aos neurônios tratados. ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

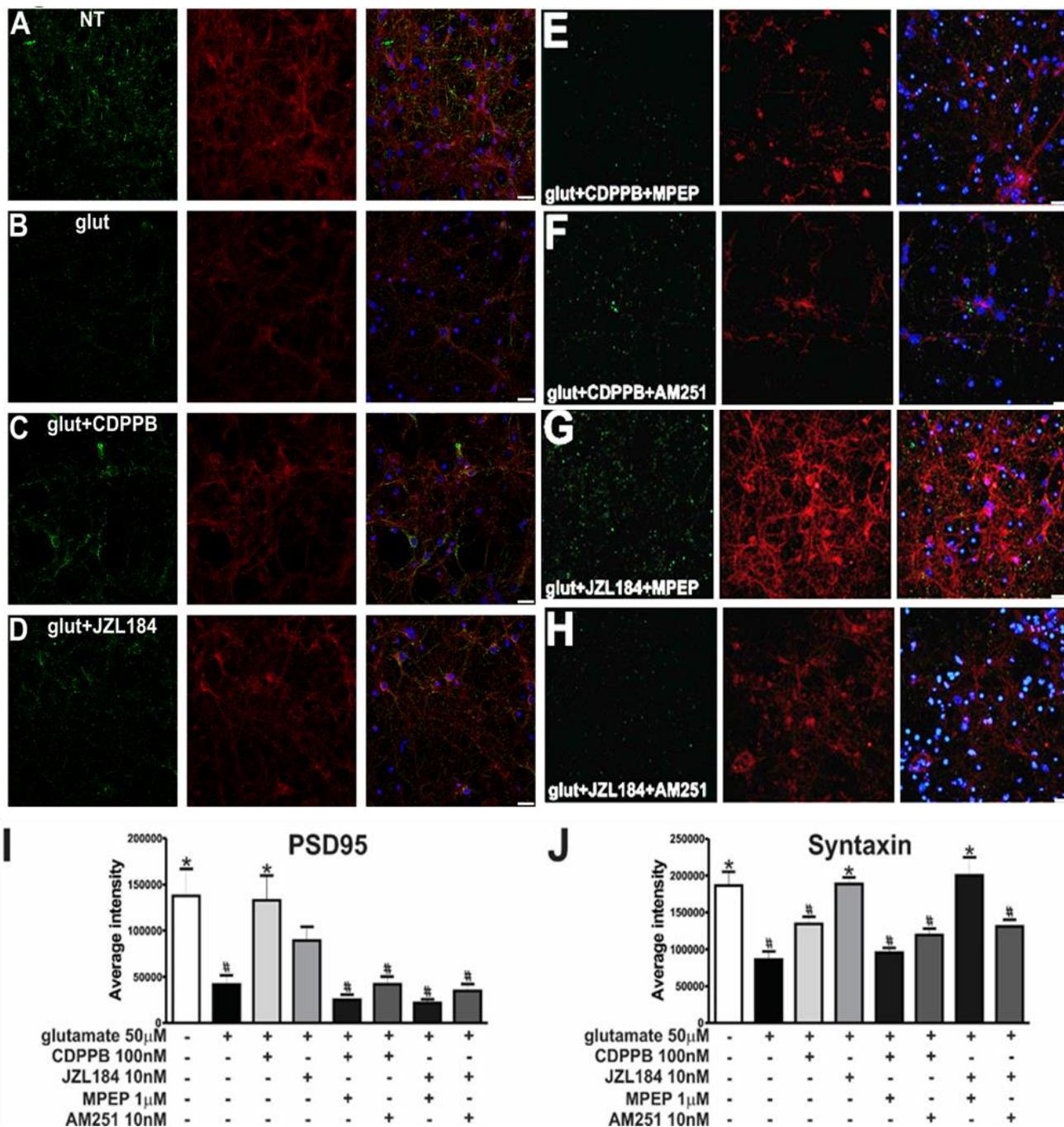


**Fig. 22. A neuroproteção induzida por CDPPB, URB597 e JZL184 é dependente da ativação de ERK1/2 e AKT.** (A) Os gráficos mostram os níveis de morte celular de neurônios corticoestriatais que não foram tratados (-) ou que foram tratados (+) com glutamato 50  $\mu$ M, CDPPB 100 nM, URB597 1 nM e JZL184 10 nM, LY294002 1  $\mu$ M (B) e PD98059 10  $\mu$ M (C) por 4 h. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. \* indica diferença significativa quando comparado os neurônios tratados com glutamato ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

#### **4.17 CDPPB protege o sítio pós-sináptico enquanto que o JZL184 protege principalmente o pré-sináptico.**

Uma das características mais importantes nas doenças neurodegenerativas é a perda de terminais sinápticos, por exemplo, na DA, a perda de sinapses se correlaciona mais com o declínio da função cognitiva que a morte de neurônios (Gylys et al., 2004; Masliah; Miller; Terry, 1993). mGluR5 é principalmente expresso no sítio pós-sináptico e CB1 no pré-sináptico (Katona et al., 1999; Shigemoto et al., 1993). Portanto, decidimos investigar se a ativação de mGluR5 e CB1 poderia prevenir a perda de sítios pré e/ou pós-sinápticos do insulto de glutamato. Para testar isso, os neurônios foram tratados com as drogas previamente testadas e realizou-se experimentos de Imunofluorescência, utilizando para marcar o pós-sináptico, a proteína de densidade pós-sináptica, PSD95, e o marcador pré-sináptico, sintaxina 1A, e, foi quantificado os níveis de perda pós e pré-sináptica. 50  $\mu$ M de glutamato causou uma redução significativa na marcação de PSD95 e sintaxina 1A (Fig 23B 23E e 23F), em comparação com neurônios não tratados (Fig. 23A, 23E e 23F), estes resultados demonstram que o glutamato pode levar a perda de ambos os terminais pós e pré-sinápticos. Quando os neurônios foram incubados com glutamato na presença de CDPPB, houve resgate da perda da marcação de

PSD95 (Figura 23C e 23E). Embora CDPPB tenha aumentado os níveis de sintaxina, este aumento não foi significativamente diferente dos neurônios incubados com glutamato (Figura 19C e 19F). MPEP e AM251 eliminaram o resgate de sítios pós-sinápticos mediado por CDPPB (Figura 23E e 23F). Estes dados indicam que CDPPB foi mais eficiente para proteger os sítios pós-sinápticos e que esta neuroproteção é dependente de mGluR5 e CB1. JZL184 foi mais eficiente em prevenir a redução da marcação de sintaxina induzida pelo glutamato (Fig. 23D e 23F). Além disso, JZL184 foi parcialmente eficaz em evitar a perda de sítios pós-sinápticos, embora, a marcação de PSD95 de neurônios incubados com JZL184 na presença de glutamato não foi diferente dos neurônios não tratados (Fig. 23D e 23E). No entanto, a marcação de PSD95 não foi diferente quando comparado os neurônios incubados com glutamato na presença ou ausência de JZL184 (Figura 23D e 23E). AM251 eliminou a proteção de ambos os terminais pré e pós-sinápticos mediado por JZL184. No entanto, MPEP só foi capaz de bloquear o resgate mediado por JZL184 nos terminais pós-sinápticos, não tendo nenhum efeito sobre os níveis de sintaxina (Figura 23G e 23H). Estes dados indicam que o 2-AG foi mais importante em promover neuroproteção nos sítios pré-sinápticos e que CB1 e mGluR5 tem papéis distintos, dependendo do sítio sináptico investigado.

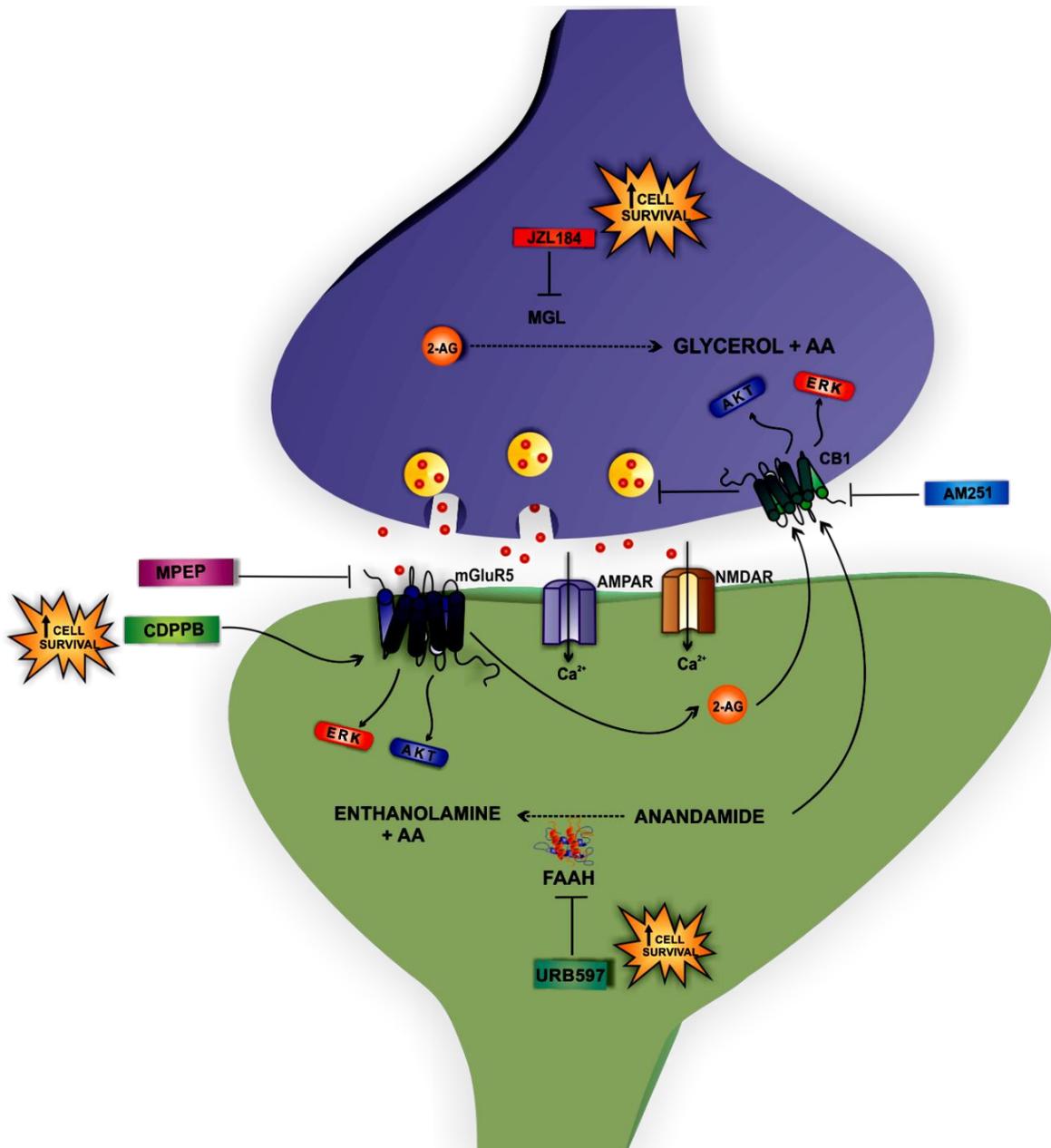


**Fig. 23. CDPPB protege o sítio pós-sináptico enquanto que o JZL184 protege principalmente o pré-sináptico.** As imagens de microscopia confocal mostram os processos de neurônios imunomarcadas para PSD95 (verde), anti-sintaxina 1A (vermelho) e DAPI (azul), não tratados (NT) (A) ou tratados com 50 mM glutamato (B) na ausência ou na presença de 100 nM CDPPB (C) e 10 nM JZL184 (D) durante 4 h. Barra de escala = 20  $\mu$ m. Os gráficos mostram a intensidade média dos níveis de pixels de PSD95 (I) e sintaxina 1A (J), obtidos a partir de, pelo menos, cinco imagens feitas

em quatro experimentos independentes. Neurônios não tratados (-) ou tratados (+) com 50  $\mu$ M de glutamato, 100 nM CDPBB, 10 nM JZL184, MPEP 1  $\mu$ M ou 10 nM AM251, durante 4 h. Os dados representam a média de 4 experimentos independentes. \* Indica diferença significativa em relação neurônios tratados com glutamato e # indica diferença significativa em comparação com neurônios não tratados. ( $p < 0.05$ ),  $n = 4$ .

#### **4.18 Modelo proposto para ativação das vias de sinalização que conduzem à neuroproteção.**

De acordo com os resultados mostrados nesse trabalho, os receptores mGluR5 e CB1 trabalham cooperativamente para ativar vias de sinalização celular e promover neuroproteção. A figura abaixo explica o modelo proposto para ativação dessas vias através dos sistemas glutamatérgico e endocanabinóide, onde mGluR5 e CB1 atuam cooperativamente para prevenir a morte neuronal contra o insult de glutamato e ainda proteger os sítios pré e pós-sinápticos. Figura 24.



**Fig. 24. Os receptores mGluR5 e CB1, cooperativamente ativam vias de sinalização celular promovendo neuroproteção.** A liberação de glutamato desencadeia a ativação do receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), aumentando os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, e do receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5), o qual ativa várias vias de sinalização celular. mGluR5 está presente no sítio pós-sináptico e pode ser estimulado por CDPPB, levando à ativação de diferentes efetores neuroprotetores, tais como a quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) e AKT. Além disso, o mGluR5 faz parte de um complexo sinalossoma, que contém as duas enzimas chave para a síntese de 2-araquidonoilglicerol (2-AG) e, assim, a ativação do mGluR5 pode aumentar os níveis de 2-AG.

No entanto, tanto MPEP, um bloqueador do mGluR5, quanto AM251, um antagonista de CB1, podem bloquear a ativação de ERK 1/2 e AKT mediada por mGluR5 e, assim, a neuroproteção. O receptor canabinoide 1 (CB1), que está presente no sítio pré-sináptico, é estimulado por 2-AG e anandamida (AEA), que conduz à ativação da quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2) e AKT. A ativação de CB1 também pode inibir a liberação de glutamato no pré-sináptico e, conseqüentemente, diminuir a ativação do mGluR5 por glutamato. JZL184 e URB597, que são inibidores das enzimas monoacilglicerol lipase (MGL) e amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH), respectivamente, aumentam os níveis de 2-AG e anandamida, o que leva a ativação de ERK 1/2 e AKT promovendo neuroproteção. No entanto, este efeito pode ser bloqueado por MPEP e AM251. Portanto, mGluR5 e CB1 participam da mesma via de sinalização celular, trabalhando cooperativamente para desencadear a ativação de ERK 1/2 e AKT e promover a neuroproteção.

AA = ácido araquidônico

## 5. DISCUSSÃO

Uma vez que a morte neuronal parece ser a principal causa e o fator comum entre as doenças neurodegenerativas tais como DA, DP e DH (Lorigados-Pedre; Bergado-Rosado, 2004), faz-se necessário o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que sejam eficientes no manejo ou tratamento dessas doenças. Já foi demonstrado que o mGluR5 apresentou efeito neuroprotetor em cultura de neurônios estriatais (Doria et al., 2013; Doria et al 2015). Além disso, a ativação de receptores CB1 tem sido apontada como ferramenta neuroprotetora em diversos modelos de neurotoxicidade (Mato *et al.*, 2003). Foi encontrado nesse trabalho que as drogas CDPBB, URB597 e JZL184 promovem a neuroproteção de neurônios corticoestriatais sob o insulto de glutamato (Fig. 8). Entretanto, a neuroproteção observada em cultura de neurônios corticoestriatais é dependente de mGluR5 e CB1 pois o bloqueio farmacológico através dos antagonistas MPEP ou AM251 ou a manipulação genética, *knockout* no caso do mGluR5 e *knockdown* no caso do CB1, anulam o efeito neuroprotetor induzido por CDPBB, URB597 ou JZL184 contra o insulto de glutamato (Fig.8A, 8B e 8C; 14 A e 15A). Isso fortalece a hipótese de que haja uma interação entre esses dois receptores para ativar vias neuroprotetoras (Jung et al., 2007, 2012; Katona, 2006; Mátyás et al., 2008).

O CB1 pode modular vias envolvidas no controle de sobrevivência celular, ativando as vias PI3K/AKT e ERK1/2 (Blázquez et al., 2015). Por outro lado, a estimulação do mGluR5 também leva à ativação de vias importantes para a sobrevivência celular e proliferação, tais como ERK1/2 e AKT (Hou e Klann 2004; Mao et al., 2005; Rong et al., 2003). Os resultados desse trabalho indicam que as proteínas AKT e ERK1/2 são ativadas tanto pelo mGluR5 quanto pelo CB1 e que antagonistas de qualquer um dos receptores podem bloquear essa ativação (Figs.

13 e 14), pois quando bloqueamos mGluR5 e CB1 através dos antagonistas MPEP ou AM251 ou quando foi feito *knockout* do mGluR5 ou *knockdown* do CB1 não há ativação das quinases ERK1/2 e AKT (Figs. 12A, 12B, 12C; 13A, 13B, 13C; 14C, 14E, 15C e 15E). A AKT tem sido apontada como um componente muito importante das vias de sinalização pró sobrevivência celular e sua ação anti-apoptótica parece ser mediada pela fosforilação e inativação de fatores de transcrição Forkhead, Bad, e caspase-9, dentre outros (Gómez del Pulgar et al., 2000). Uma importante via responsável por sua ativação é mediada pelos produtos lipídicos provenientes da fosforilação via PI3K (Gómez del Pulgar et al., 2000). A PI3K promove fosforilação de PIP2 de membrana, formando PIP3, o qual recruta AKT e PDK1 para a membrana plasmática. Em seguida, PDK1 promove a fosforilação e ativação da proteína AKT (Hou e Klann 2004; Rong et al., 2003). As proteínas AKT e ERK podem ser ativadas por meio da interação Homer-mGluR5 (Rong et al., 2003; Doria et al., 2015; Guhan e Lu, 2004; Mao et al., 2005). A proteína Homer é importante para o acoplamento do mGluR5 aos receptores de IP3 e pela ativação de várias outras vias de sinalização ativadas por esse receptor (Mao et al., 2005; Tu et al., 1998). Assim, a estimulação do mGluR5 pode ativar a AKT e diminuir a morte celular (Rong et al., 2003). O nosso grupo demonstrou que MAPs do mGluR5, incluindo o CDPPB, pode promover a ativação de ERK1/2 e AKT (Doria et al., 2013 e Doria et al., 2015). Já o CB1 pode ativar a AKT através da proteína  $G_{i/o}$  porque as subunidades  $\beta\gamma$  da proteína G ativam a PI3K classe IB (Gómez del Pulgar et al., 2000). Além disso, a ativação de ERK1/2 por CB1 ocorre através da ativação da proteína  $G_{i/o}$ , a qual ativa a PI3K classe IB (PI3K $\gamma$ ) que ativa ERK1/2 (Galve-Roperh et al., 2002).

Apesar de o mGluR5 e o CB1 ativarem ERK e AKT através de mecanismos diferentes, nossos dados indicam que o bloqueio ou do mGluR5 ou do CB1 é capaz de eliminar a ativação dessas quinases, bem como da neuroproteção estimulada por esses receptores. No caso do mGluR5, a neuroproteção promovida pelo CDPBB foi eliminada quando os neurônios foram incubados com AM251 (Fig. 8, 12 e 13). Esses dados sugerem que um dos mecanismos neuroprotetores ativados por mGluR5 é a ativação de CB1. Como vários trabalhos indicam que o mGluR5 participa da síntese de endocanabinóides (Drew et al., 2009; Gregg et al., 2012; Jung et al., 2007; Mitchell et al., 2009; Piomelli, 2003), hipotetizamos que esse seja o mecanismo de ativação de CB1 via mGluR5. Já no caso do receptor canabinóide, é possível que a ativação de erk e AKT e da neuroproteção por CB1 via URB597 e JZL184 seja dependente do aumento de síntese dos canabinóides estimulado por mGluR5. Dessa forma, quando o mGluR5 é bloqueado através do MPEP, a síntese de endocanabinóides diminui e apenas a inibição das vias de degradação de endocanabinóides via URB597 e JZL184 não é suficiente para elevar os endocanabinóides a níveis necessários para a ativação de vias neuroprotetoras. Para testar essa hipótese, utilizamos agonistas diretos do CB1, incluindo 2-AG, anandamida e ACEA. Interessantemente, a neuroproteção via 2-AG, anandamida e ACEA só foi parcialmente bloqueada por MPEP (Fig. 9). Esses resultados reforçam a nossa hipótese de que o mGluR5 seria importante para a síntese de endocanabinóides, o que não seria necessária na presença de agonistas diretos do CB1. Por outro lado, boa parte da neuroproteção ativada por agonistas direto CB1 foi eliminada na presença de MPEP. Esses dados indicam que a ativação de vias neuroprotetoras através do mGluR5 também são importantes para a sobrevivência neuronal. Como a maioria dos receptores CB1 encontram-se no pré-sináptico (Allen

et al., 2009; Steindel et al., 2013) e grande parte do mGluR5 no pós-sináptico (Conn e Pin, 1997; O'brien et al., 2003; O'brien et al., 2004) , é possível que a ativação de vias neuroprotetoras nesses dois compartimentos seja necessária para que se promova uma neuroproteção efetiva. Experimentos futuros serão importantes para determinar se a ativação do CB1 e do mGluR5 seria mais importante para a proteção de terminais pré- e/ou pós-sinápticos.

A via da PI3K é importante para a neuroproteção mediada por mGluR5 e CB1 em cultura de neurônios corticoestriatais porque quando tratamos neurônios de camundongos PI3K $\gamma^{-/-}$ , a qual faz parte da classe IB de PI3Ks (Castellano e Downward, 2011; Foster et al., 2012; Jean e Kiger, 2014), com CDPBB, URB597 e JZL184 a neuroproteção foi reduzida significativamente, quando comparado a neurônios selvagens. Entretanto, apesar de não observarmos ativação de AKT quando os neurônios PI3K $\gamma^{-/-}$  foram estimulados com CDPBB, URB597 e JZL184 na ausência de glutamato, a ativação de AKT ocorreu quando os neurônios foram estimulados com as drogas neuroprotetoras na presença de glutamato. É possível que outras isoformas de PI3K possam ter sido ativadas por causa do estímulo com glutamato na presença de drogas neuroprotetoras, o que explicaria uma diminuição apenas parcial da neuroproteção induzida pelas drogas neuroprotetoras. Por exemplo, já foi demonstrado que a PI3K classe I $\beta$  pode ser ativada por vários receptores acoplados à proteína G (Foster et al., 2012; Guillermet-Guibert et al., 2008; Jean e Kiger, 2014). Assim, é possível que outras isoformas possam ser ativadas por CB1 e mGluR5 ou mesmo pelo glutamato através da ativação de outros receptores de glutamato. O LY249002 é capaz de inibir todas as isoformas de PI3K responsáveis por fosforilar e ativar a AKT e promover neuroproteção (Rong et al., 2003). Quando tratamos previamente os neurônios

com LY249002 e, posteriormente, com CDPPB, URB597 e JZL184, o efeito neuroprotetor foi perdido completamente (Fig. 17A). Assim, esses dados indicam que mais de uma isoforma de PI3K parece ser importante para promover a neuroproteção dependente de CB1 e mGluR5 e que a ativação da AKT é essencial para o mecanismo neuroprotetor. Por outro lado, a ativação da via MEK/ERK também se mostrou essencial para o mecanismo neuroprotetor ativado por CDPPB, URB597 e JLZ184. Esses dados indicam que a neuroproteção mediada por CB1 e mGluR5 é dependente da ativação das vias PI3K/AKT e MEK/ERK1/2.

Juntos, esses dados deixam claro que há uma interação funcional entre os sistemas glutamatérgico e endocanabinóide, que mGluR5 e CB1 exercem um papel importante na ativação de vias neuroprotetoras e que quando há inibição de um dos sistemas, a neuroproteção é abolida.

## **6. CONCLUSÃO**

Nesse trabalho foi demonstrado que há uma estreita relação entre os sistemas glutamatérgico e endocanabinóide, pois quando o CB1 ou o mGluR5 estão inibidos, seja farmacologicamente ou por manipulação genética, CDPPB, URB597 e JZL184 são incapazes de evitar a morte celular contra o insulto de glutamato e, ainda, não ativam as proteínas ERK1/2 e AKT. Esses dados deixam claro que os sistemas endocanabinóide e glutamatérgico possuem um papel muito importante para ativar essas vias neuroprotetoras.

## REFERÊNCIAS

AARTS, M. M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 2, p. 137–147, mar. 2004.

ALLEN, K. L. et al. Cannabinoid (CB(1)), GABA(A) and GABA(B) receptor subunit changes in the globus pallidus in Huntington's disease. **Journal of chemical neuroanatomy**, v. 37, n. 4, p. 266–81, 2009.

ANBORGH, P. H. et al. Inhibition of metabotropic glutamate receptor signaling by the huntingtin-binding protein optineurin. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 41, p. 34840–34848, out. 2005.

BAHREMAND, A. et al. Involvement of nitrenergic system in the anticonvulsant effect of the cannabinoid CB(1) agonist ACEA in the pentylene-tetrazole-induced seizure in mice. **Epilepsy research**, v. 84, n. 2-3, p. 110–119, abr. 2009.

BLÁZQUEZ, C. et al. The CB1 cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 10, p. 1618–1629, 2015.

CARLINI, E. A. The good and the bad effects of (-) trans-delta-9-tetrahydrocannabinol (Delta 9-THC) on humans. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 461–467, set. 2004.

CASTELLANI, R. J. et al. Iron: the Redox-active center of oxidative stress in Alzheimer disease. **Neurochemical research**, v. 32, n. 10, p. 1640–1645, out. 2007.

CASTELLANO, E.; DOWNWARD, J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 3, p. 261–274, 2011.

CONN, P. J. et al. Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 10, p. 787–798, 2005.

CONN, P. J.; PIN, J. P. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 37, p. 205–237, 1997.

DAIGLE, T. L.; KEARN, C. S.; MACKIE, K. Rapid CB1 cannabinoid receptor desensitization defines the time course of ERK1/2 MAP kinase signaling. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 36–44, 2008.

DI MARZO, V. et al. Endocannabinoids: Endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. **Trends in Neurosciences**, v. 21, n. 12, p. 521–528, 1998.

DI MARZO, V.; MATIAS, I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. **Nature neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 585–589, maio 2005.

DIFIGLIA, M. Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. **Trends in neurosciences**, v. 13, n. 7, p. 286–289, jul. 1990.

DORIA, J. G. et al. Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 169, n. 4, p. 909–921, 2013.

DORIA, J. G. et al. The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPBB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease. **Neurobiology of disease**, v. 73, p. 163–173, jan. 2015.

DREW, G. M.; LAU, B. K.; VAUGHAN, C. W. Substance P drives endocannabinoid-mediated disinhibition in a midbrain descending analgesic pathway. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 29, n. 22, p. 7220–7229, 2009.

FERREIRA-VIEIRA, T. H. et al. A role for the endocannabinoid system in exercise-induced spatial memory enhancement in mice. **Hippocampus**, v. 24, n. 1, p. 79–88, jan. 2014.

FOSTER, J. G. et al. Inhibition of PI3K signaling Spurs new therapeutic opportunities in inflammatory/autoimmune diseases and hematological malignancies. **Pharmacological Reviews**, v. 64, n. 4, p. 1027–1054, 2012.

FRANÇA, N. R. DE et al. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, p. 695–702, 2010.

FREUND, T. F.; KATONA, I.; PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. **Physiological reviews**, v. 83, n. 3, p. 1017–1066, 2003.

GALVE-ROPERH, I. et al. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB1 cannabinoid receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 1385–1392, 2002.

GIUFFRIDA, A. et al. Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. **Nature neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 358–363, abr. 1999.

GÓMEZ DEL PULGAR, T. et al. The CB1 cannabinoid receptor is coupled to the activation of protein kinase B/Akt. **The Biochemical journal**, v. 347, n. Pt 2, p. 369–73, 2000.

GOMEZ, O. et al. Cannabinoid receptor agonists modulate oligodendrocyte differentiation by activating PI3K/Akt and the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways. **British journal of pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1520–32, 2011.

GREGG, L. C. et al. Activation of Type 5 Metabotropic Glutamate Receptors and Diacylglycerol Lipase- Initiates 2-Arachidonoylglycerol Formation and Endocannabinoid-Mediated Analgesia. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 28, p. 9457–9468, 2012.

GUHAN, N.; LU, B. Homer-PIKE complex: a novel link between mGluR1 and PI 3-kinase. **Trends in neurosciences**, v. 27, n. 11, p. 645–648, nov. 2004.

GUILLERMET-GUIBERT, J. et al. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 24, p. 8292–7, 2008.

GYLYS, K. H. et al. Synaptic Changes in Alzheimer ' s Disease Accompanied by Decreased PSD-95 Fluorescence. v. 165, n. 5, p. 1809–1817, 2004.

HANUS, L. et al. 2-arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB1 receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of**

**the United States of America**, v. 98, p. 3662–3665, 2001.

HASHIMOTODANI, Y. et al. Phospholipase C $\beta$  Serves as a Coincidence Detector through Its Ca<sup>2+</sup> Dependency for Triggering Retrograde Endocannabinoid Signal. **Neuron**, v. 45, n. 2, p. 257–268, 2005.

HASHIMOTODANI, Y.; OHNO-SHOSAKU, T.; KANO, M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. **The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 13, n. 2, p. 127–137, abr. 2007.

HILLARD, C. J. et al. Synthesis and Characterization of Potent and Selective Agonists of the Neuronal Cannabinoid Receptor (CB1). **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, n. 3, p. 1427–1433, 1999.

HILLARD, C. J.; JARRAHIAN, A. Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. **British journal of pharmacology**, v. 140, n. 5, p. 802–808, 2003.

HOU, L. Activation of the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt-Mammalian Target of Rapamycin Signaling Pathway Is Required for Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Long-Term Depression. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 28, p. 6352–6361, 2004.

HWANG, J. et al. Enhancement of endocannabinoid signaling by fatty acid amide hydrolase inhibition: a neuroprotective therapeutic modality. **Life sciences**, v. 86, n. 15-16, p. 615–23, 2010.

JEAN, S.; KIGER, A. A. Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. **Journal of cell science**, v. 127, n. 5, p. 923–8, 2014.

JUNG, K. et al. A Key Role for Diacylglycerol Lipase- $\alpha$  in Metabotropic Glutamate Receptor-Dependent Endocannabinoid Mobilization. **Molecular pharmacology**, v. 72, n. 3, p. 612–621, 2007.

JUNG, K. M. et al. 2-Arachidonoylglycerol signaling in forebrain regulates systemic energy metabolism. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 299–310, 2012.

KATHURIA, S. et al. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. **Nature medicine**, v. 9, n. 1, p. 76–81, jan. 2003.

KATONA, I. et al. Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 11, p. 4544–4558, 1999.

KATONA, I. Molecular Composition of the Endocannabinoid System at Glutamatergic Synapses. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 21, p. 5628–5637, 2006.

KATONA, I.; FREUND, T. F. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. **Nature medicine**, v. 14, n. 9, p. 923–930, set. 2008.

KINSEY, S. G. et al. Blockade of endocannabinoid-degrading enzymes attenuates neuropathic pain. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 330, n. 3, p. 902–10, 2009.

LAFOURCADE, M. et al. Molecular components and functions of the

endocannabinoid system in mouse prefrontal cortex. **PLoS ONE**, v. 2, n. 8, p. 1–11, 2007.

LEA IV, P. M.; FADEN, A. I. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 antagonists MPEP and MTEP. **CNS Drug Reviews**, v. 12, n. 2, p. 149–166, 2006.

LONG, J. Z. et al. Selective blockade of 2-arachidonoylglycerol hydrolysis produces cannabinoid behavioral effects. **Nat Chemical Biol.**, v. 5, n. 1, p. 37–44, 2009.

LORIGADOS-PEDRE, L.; BERGADO-ROSADO, J. Nerve growth factor in neurodegeneration and neurorestorative therapy. **Revista de neurologia**, v. 38, n. 10, p. 957–971, maio 2004.

LUTZ, B. Molecular biology of cannabinoid receptors. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 66, n. 2-3, p. 123–142, 2002.

MAKRIYANNIS, A.; MECHOULAM, R.; PIOMELLI, D. **Therapeutic opportunities through modulation of the endocannabinoid system.** *Neuropharmacology* England, jun. 2005.

MAO, L. et al. The scaffold protein Homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 10, p. 2741–2752, mar. 2005.

MARSICANO, G. et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 302, n. 5642, p. 84–88, out. 2003.

MASLIAH, E.; MILLER, A.; TERRY, R. D. The Synaptic Organization Alzheimer ' s Disease of the Neocortex in. p. 334–340, 1993.

MASU, M. et al. Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. **Nature**, v. 349, n. 6312, p. 760–765, fev. 1991.

MATTSON, M. P. Metal-catalyzed disruption of membrane protein and lipid signaling in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1012, p. 37–50, 2004.

MÁTYÁS, F. et al. Identification of the sites of 2-arachidonoylglycerol synthesis and action imply retrograde endocannabinoid signaling at both GABAergic and glutamatergic synapses in the ventral tegmental area. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 95–107, 2008.

MAULER, F. et al. Neuroprotective and brain edema-reducing efficacy of the novel cannabinoid receptor agonist BAY 38-7271. **Brain research**, v. 989, n. 1, p. 99–111, out. 2003.

MEHTA, A. et al. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **European journal of pharmacology**, v. 698, n. 1-3, p. 6–18, jan. 2013.

MITCHELL, V. A.; KAWAHARA, H.; VAUGHAN, C. W. Neurotensin inhibition of GABAergic transmission via mGluR-induced endocannabinoid signalling in rat periaqueductal grey. **The Journal of physiology**, v. 587, n. Pt 11, p. 2511–20, 2009.

MOLINA-HOLGADO, F. et al. Metals ions and neurodegeneration. **BioMetals**,

v. 20, n. 3-4, p. 639–654, 2007.

MOREIRA, F. A. et al. Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 1, p. 141–150, jan. 2008.

NAKANISHI, S.; MASU, M. Molecular diversity and functions of glutamate receptors. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 23, p. 319–348, 1994.

NICHOLLS, D. G. Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. **Current molecular medicine**, v. 4, n. 2, p. 149–177, mar. 2004.

NYILAS, R. et al. Molecular architecture of endocannabinoid signaling at nociceptive synapses mediating analgesia. **The European journal of neuroscience**, v. 29, n. 10, p. 1964–78, 2009.

O'BRIEN, J. A. et al. A Family of Highly Selective Allosteric Modulators of the Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 5. **Molecular pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 731–740, 2003.

O'BRIEN, J. A. et al. A novel selective allosteric modulator potentiates the activity of native metabotropic glutamate receptor subtype 5 in rat forebrain. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 309, n. 2, p. 568–577, 2004.

O'HARA, P. J. et al. The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. **Neuron**, v. 11, n. 1, p. 41–52, 1993.

PERTWEE, R. G. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXIX . Cannabinoid Receptors and Their Ligands : Beyond CB 1 and CB 2. **Pharmacological reviews**, v. 62, n. 4, p. 588–631, 2010.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 873–884, 2003.

PIOMELLI, D. More surprises lying ahead: The endocannabinoids keep us guessing. **Neuropharmacology**, v. 18, n. 9, p. 1199–1216, 2014a.

PIOMELLI, D. More surprises lying ahead. The endocannabinoids keep us guessing. **Neuropharmacology**, v. 76 Pt B, p. 228–234, jan. 2014b.

RIBEIRO, F. M. et al. Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 1, p. 316–324, 2010.

RITZEN, A.; MATHIESEN, J. M.; THOMSEN, C. Molecular Pharmacology and Therapeutic Prospects of Metabotropic Glutamate Receptor Allosteric Modulators. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 97, p. 202–213, 2005.

RONG, R. et al. PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. **Nature neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 1153–1161, nov. 2003.

SHEN, M. et al. Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 16, n. 14, p. 4322–34, 1996.

SHIGEMOTO, R. et al. Immunohistochemical localization of a metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in the rat brain. **Neuroscience letters**, v. 163, n. 1, p. 53–57, nov. 1993.

SIMKINS, T. J. et al. Comparison of the D2 receptor regulation and neurotoxicant susceptibility of nigrostriatal dopamine neurons in wild-type and CB1/CB2 receptor knockout mice. **Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on Neuroimmune Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 533–8, 2012.

STEINDEL, F. et al. Neuron-type specific cannabinoid-mediated G protein signalling in mouse hippocampus. **Journal of neurochemistry**, v. 124, n. 6, p. 795–807, 2013.

STELLA, N.; SCHWEITZER, P.; PIOMELLI, D. A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. **Nature**, v. 388, n. 6644, p. 773–778, ago. 1997.

TANG, A.-H.; ALGER, B. E. Homer Protein-Metabotropic Glutamate Receptor Binding Regulates Endocannabinoid Signaling and Affects Hyperexcitability in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 9, p. 3938–3945, 2015.

TARZIA, G. et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of alkylcarbamic acid aryl esters, a new class of fatty acid amide hydrolase inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 46, n. 12, p. 2352–2360, jun. 2003.

TU et al. Homer Binds a Novel Proline-Rich Motif and Links Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors with IP3 Receptors. **Neuron**, v. 21, n. 4, p. 717–726, 1998.

VARGA, B.; KASSAI, F.; GYERTYAN, I. Interactions of CB1 and mGlu5 receptor antagonists in food intake, anxiety and memory models in rats. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 103, n. 2, p. 425–430, dez. 2012.

VILELA, L. R. et al. Enhancement of endocannabinoid signaling protects against cocaine-induced neurotoxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 286, n. 3, p. 178–187, ago. 2015.

VLAHOS, C. J. et al. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 7, p. 5241–5248, 1994.

YOUSSEF, F. F. et al. Cannabinoid modulation of neuronal function after oxygen/glucose deprivation in area CA1 of the rat hippocampus. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 6, p. 1327–1335, maio 2007.

YU, F. et al. Metabotropic glutamate receptor I (mGluR1) antagonism impairs cocaine-induced conditioned place preference via inhibition of protein synthesis. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 7, p. 1308–21, 2013.

ZUCCATO, C. et al. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5529, p. 493–498, jul. 2001.

ZUCCATO, C.; CATTANEO, E. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. **Progress in neurobiology**, v. 81, n. 5-6, p. 294–330, abr. 2007.

# ANEXOS

## Anexo 1 CETEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 3/2011**, relativo ao projeto intitulado "*Investigação da função de receptor MGLUR5 na ativação da quinase AKT e de sua sinalização subsequente, em conexão com a patologia da doença de huntington (DH)*", que tem como responsável(is) **Fabiola Mara Ribeiro**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **27/ 04/2011**.

Este certificado expira-se em **27/ 04/ 2016**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 3/2011**, related to the project entitled "*na identification of mGluR5 receptor's role for activation of Akt kinase and subsequent signaling thereof, connected with a pathology of Huntington's disease (HD)*", under the supervisors of **Fabiola Mara Ribeiro**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 27, 2011**.

This certificate expires in **April 27, 2016**.

Belo Horizonte, 2 de Maio de 2011.

**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
Coordenadora do CETEA/UFMG

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) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/etica](http://www.ufmg.br/bioetica/etica) - [cetea@prpc.ufmg.br](mailto:cetea@prpc.ufmg.br)

(Mod. Cert. v1.0)