

Filipe Marques Gonçalves

VML, UMA LECTINA COM AFINIDADE POR GALACTOSE  
ISOLADA DAS SEMENTES DE *Vatairea macrocarpa*, PODE  
INDUZIR RESPOSTAS NEUROTÓXICAS

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Bioquímica do  
Centro de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina como parte dos requisitos  
para obtenção do grau de Mestre em  
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy  
Leal.

Florianópolis  
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do  
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gonçalves, Filipe Marques

VML, UMA LECTINA COM AFINIDADE POR GALACTOSE ISOLADA  
DAS SEMENTES DE VATAIREA MACROCARPA, PODE INDUZIR  
RESPOSTAS NEUROTÓXICAS [dissertação] / Filipe Marques  
Gonçalves ; orientador, Rodrigo Bainy Leal - Florianópolis,  
SC, 2013.

80 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. I. , Rodrigo Bainy Leal. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. III. Título.

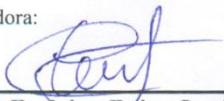
**“VML, uma lectina com afinidade por galactose  
isolada das sementes de *Vatairea macrocarpa*,  
pode induzir respostas neurotóxicas”**

por

**FILIPE MARQUES GONÇALVES**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 10/PPGBQA/2013) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

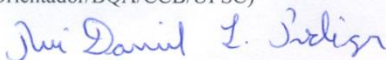
Banca Examinadora:



---

**Prof(a) Dr(a) Rodrigo Bány Leal**

(Orientador/BQA/CCB/UFSC)



---

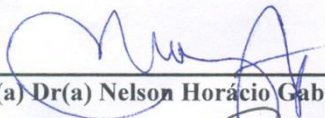
**Prof(a) Dr(a) Rui Daniel Schröder Prediger**

(FMC/CCB/UFSC)




---

**Prof(a) Dr(a) Carlos Peres Silva** (BQA/CCB/UFSC)



---

**Prof(a) Dr(a) Nelson Horácio Gabilan** (BQA/CCB/UFSC)



---

**Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2013.



## AGRADECIMENTOS

Ao final dessa jornada, fica evidente o quão importante foi o apoio de todos para a conclusão dessa etapa. Essas palavras não serão suficientes para expressar a gratidão que tenho por todos!

A minha família: Meus pais e minhas irmãs. Com certeza foram muito importantes para o meu crescimento pessoal e profissional. Mas principalmente por sempre me ajudarem a ter o equilíbrio entre a vida profissional e espiritual. Respeito e amo profundamente vocês.

O restante da minha família, minhas avós sempre me acolheram e foram muito importantes para mim. Minhas tias Céia e Rose, e minha prima Daiany pelo apoio e pelo incentivo que me forneceram. Os meus tios e tias e primos do outro lado da família, muito obrigado!

Aqueles amigos que forneceram sempre excelentes momentos de diversão! Juliana e Marcos (e mais dois!!) pela amizade que dura tantos anos. Júnior, Denize, Marcelo, Cássia, Amanda, Andressa, Bianca, Júlia, Deyvid, Julliana, Ana Paula, pela excelente parceria!

Aos colegas do laboratório de Neuroquímica III. Daniela, Mariana, Ana Paula, Sabrina, Helena, Amanda e Aline pela ajuda direta ou indireta nesse trabalho. Mark pela amizade que já vem desde a graduação, monografia, TCE, TCD... A Débora por toda ajuda que me forneceu, mesmo estando longe nessa etapa final. Juliana pela excelente companhia e ajuda. Tanara por tudo: experimentos, projetos, correções, compartilhar as angústias, e por contribuir diretamente em todo o trabalho!

Ao Professor Rodrigo Bainy Leal, por possibilitar esse trabalho e orientação. Por todos os conselhos e oportunidades. Muito obrigado por acreditar no meu trabalho e sempre incentivar o meu crescimento profissional

Ao laboratório de Neurobiologia da Depressão e a professora Ana Lúcia pela ajuda nos testes comportamentais. Andiara por toda a ajuda em todas as etapas!

A todos os colegas do PPGBQA e Departamento de Bioquímica. Profa. Alexandra Latini pelos ensinamentos durante a iniciação científica, e demais colegas.

Ao laboratório 33 da UFRGS, ao professor Carlos Alberto e Ana Carolina, pela realização dos experimentos.

Ao Biotério Central, pela ajuda e bom trabalho.

Ao Professor Benildo S. Cavada e a equipe do BioMol Lab, pelas lectinas.

A secretaria do PPGBQA, e ao Ronaldo pela ajuda fornecida.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos

Principalmente a Jeová Deus. Por me proporcionar a vida, por esta etapa e pelo privilégio de servir como sua testemunha.

## RESUMO

Lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos presentes em glicoconjugados podendo regular diversas funções celulares em eventos fisiológicos e patológicos. No sistema nervoso central, galectina-1 uma lectina com afinidade por  $\beta$ -galactosídeos, pode mediar diversas funções neurais importantes e produzir neuroproteção. Lectinas isoladas de plantas tem sido aplicadas como ferramentas no estudo da função neural. VML é uma lectina isolada das sementes de *Vatairea macrocarpa*, que similar a galectina-1 possui afinidade por galactose. Contudo o efeito de VML sobre o SNC é desconhecido. O objetivo desse estudo foi verificar se VML é capaz de alterar a função neural, modulando parâmetros comportamentais, bem como a expressão de proteínas gliais e pró-inflamatórias em camundongos. VML administrada por via intracerebroventricular (i.c.v) aumentou o tempo de imobilidade de camundongos adultos no teste do nado forçado (TNF), 1 e 24 h após a administração da lectina. Este efeito foi dependente das interações entre a lectina com carboidratos e da estrutura tridimensional nativa de VML. VML aumentou o conteúdo de COX-2, GFAP e S100B no hipocampo dos animais 1 h após a administração da lectina. Contudo, essas alterações não foram encontradas 24 h após. Entretanto, neste período tardio foi observado um aumento na fosforilação de p38<sup>MAPK</sup>. A fosforilação de ERK1/2, JNK1/2/3, AKT e GSK-3 $\beta$  no hipocampo não foram alteradas 1, 6 ou 24 h após a administração da lectina. Desta forma, pode-se verificar que VML é capaz de induzir um comportamento do tipo depressivo e aumentar a expressão de proteínas relacionadas à inflamação. Em conjunto, esses resultados indicam efeitos potencialmente tóxicos de VML no hipocampo de camundongos, aparentemente envolvendo respostas neuroinflamatórias. Esses achados comparados às ações neuroprotetoras descritas para galectina-1, sugerem um papel duplo de lectinas com afinidade por galactose na função neural.

**Palavras-chave** Lectina, VML, Cérebro, Neuroinflamação, Teste do nado forçado..





## ABSTRACT

Lectins are carbohydrate-binding proteins that can recognize glycoconjugates, regulating many cell functions, and physiopathological events. In the central nervous system (CNS) galectin-1, a  $\beta$ -galactoside-binding lectin, can mediate many neural functions and induce neuroprotection. Lectins isolated from plants have been applied as a tool to study neural function. VML is a galactose-binding lectin isolated from *Vaitairea macrocarpa* seeds that have  $\beta$ -galactose-binding activity like galectin-1. However, VML effects on the CNS are largely unknown. The aim of this study was to verify that VML is able to alter the neural function, evaluating behavior parameters and glial and inflammatory proteins in adult mice hippocampus. VML administered by intracerebroventricular route induces an increase in the immobility time in the Forced-Swimming-Test 1 and 24 h after injection of lectin and that effect was dependent on protein-carbohydrate interaction and native VML tridimensional structure. VML induces the enhancement of COX-2, GFAP expression in mice hippocampus 1 h after i.c.v administration. However, 24 h after, no changes were found after VML i.c.v. administration. By the way, in the same time was observed an increase in p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation. The ERK1/2, JNK1/2/3, AKT and GSK-3 $\beta$  phosphorylation in hippocampus were no change after lectin administration. These results reported here demonstrated that the lectin from *V. macrocarpa* seeds was able to induce a depressive-like behavior and increase inflammatory proteins expression. VML may exert some neurotoxic effects in the mice hippocampus and appears to be involved with neuroinflammatory responses. These findings compared the neuroprotective actions described for galectin-1, suggest a dual role for  $\beta$ -galactoside-binding lectins in neural function.

**Keywords:** Lectin, VML, Brain, Neuroinflammation, Forced swimming test.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema ilustrativo das principais respostas neuroinflamatórias.....	24
<b>Figura 2.</b> Vias de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) .....	27
<b>Figura 3.</b> Vias de sinalização da PI3K/AKT.....	29
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática da metodologia utilizada para eletroforese, eletrotransferência e de imunodeteção.....	36
<b>Figura 5.</b> Efeito de VML no tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado e número de cruzamentos no teste do campo aberto.....	39
<b>Figura 6.</b> Efeito de VML na sua forma bloqueada ou desnaturada no Teste do Nado forçado e teste do campo 1 h após a administração i.c.v de VML.....	41
<b>Figura 7.</b> Avaliação por Western-blotting do imunocontéudo de COX-2 no hipocampo de camundongos, 1 h após administração de VML .....	42
<b>Figura 8.</b> Avaliação do imunocontéudo medido por ELISA de GFAP e S100B no hipocampo do camundongos 1 h após a administração i.c.v de VML .....	43
<b>Figura 9.</b> Avaliação por Western Blot da fosforilação de ERK 1/2, JNK 1/2/3, p38 <sup>MAPK</sup> , AKT, e GSK-3 $\beta$ , no hipocampo de camundongos 1 h após a administração i.c.v de VML.....	45
<b>Fig. 10.</b> Avaliação por Western Blot da fosforilação de ERK 1/2, JNK 1/2/3, p38 <sup>MAPK</sup> , AKT e GSK-3 $\beta$ , no hipocampo de camundongos 6 horas após a administração i.c.v de VML .....	46
<b>Figura 11.</b> Efeito de VML no tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado, e numero de cruzamentos no Teste do Campo Aberto, 24 horas após da administração da lectina.....	47
<b>Figura 12.</b> Efeito de VML na sua forma bloqueada ou desnaturada no teste do nado forçado e teste do campo 1 h após a administração i.c.v de VML .....	49
<b>Figura 13.</b> Avaliação do imunocontéudo medido por ELISA de GFAP e S100B no hipocampo, 24 horas após a administração i.c.v de VML.....	50
<b>Figura 14.</b> Avaliação por Western Blot da fosforilação de ERK 1/2, JNK 1/2/3, p38 <sup>MAPK</sup> , AKT e GSK-3 $\beta$ no hipocampo de camundongos 24 horas após a administração i.c.v de VML .....	51
<b>Figura 15</b> Avaliação da viabilidade celular de fatias hipocampais expostas a VML .....	53



## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico  
AMPc - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
ANOVA - análise de variância  
BBL: Lectina extraída das sementes de *Bauhinia bauhinoides*  
BDNF: Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro  
BHE: Barreira Hematoencefálica  
BSA: Albumina sérica bovina  
ConA: Lectina Concanavalina A  
ConBr: Lectina extraída das sementes de *Canavalia brasiliensis*  
COX- Ciclooxygenase  
CRD: Domínio de Ligação com Carboidrato  
CREB - proteína de ligação responsiva ao AMP cíclico  
Dviol: Lectina extraída das sementes de *Dioclea violacea*  
D.O.: Densidade óptica  
Gal-1: Galectina-1  
GFAP: Proteína Glial Fibrilar Ácida  
GMPc: guanosina de monofosfato cíclico  
GSK-3 $\beta$  - glicogênio sintase cinase-3 $\beta$   
HEPES: ácido n-2-hidroxiethylpiperazina  
IDO: indolamina-2,3-dioxigenase  
IL: Interleucina  
MAPK: Proteína cinase ativada por mitógenos  
MAPKK: Cinase da MAP cinase  
MAPKKK: Cinase da cinase das MAP cinases  
NMDA: N-metil D-aspartato  
PI3K: Fosfatidil-inositol 3- cinase  
PKA: proteína cinase A  
PKC: proteína cinase C  
PKG: proteína cinase G  
RSK (ribossomal 6 cinase)  
SDS Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS  
SNC: sistema nervoso central  
TNF: Teste do nado forçado  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral alfa  
5-HT: Serotonina  
VML: Lectina isolada das sementes de *Vatairea macrocarpa*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1.1 Lectinas .....	17
1.2 Lectinas presentes nos mamíferos .....	17
1.3 Lectinas de plantas. ....	19
<b>1.3.1 VML .....</b>	<b>20</b>
1.4 Neuroinflamação .....	22
1.5 Astrócitos .....	24
1.6 MAPK's .....	25
1.7 PI3K/AKT (PKB) .....	27
1.8 Teste do nado forçado .....	30
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 Objetivos Gerais .....	32
3.2 Objetivos específicos .....	32
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>33</b>
4.1 Animais .....	33
4.2 Isolamento de lectinas .....	33
4.3 Tratamento dos animais .....	33
4.4 Teste do Nado Forçado .....	34
4.5 Teste do campo aberto .....	34
4.6 Western Blotting .....	34
<b>4.6.1 Preparo das amostras .....</b>	<b>34</b>
<b>4.6.2 Eletroforese e Eletrotransferência .....</b>	<b>35</b>
<b>4.6.3 Imunodeteção .....</b>	<b>35</b>
4.7 Elisa para GFAP e S100B .....	37
4.8 Preparo de fatias hipocâmpais para avaliação in vitro .....	37
4.9 Análise Estatística .....	38
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>

5.1 Comportamento do tipo depressivo induzido 1 h após a administração i.c.v. de VML .....	39
5.2 Efeito do bloqueio do CRD ou da desnaturação protéica no comportamento tipo depressivo induzido pela VML .....	40
5.3 Avaliação do conteúdo de COX-2 no hipocampo 1 h após a administração de VML.....	41
5.4 Avaliação do Conteúdo de GFAP e S100B no hipocampo de camundongos 1 h após a administração de VML.....	42
5.5 Modulação de MAPKs, AKT e GSK-3 $\beta$ após 1 e 6 h após a administração de VML. ....	43
5.4 Comportamento do tipo depressivo induzido 24 h após a administração i.c.v. de VML.....	47
5.5 Efeito do bloqueio do CRD, ou da desnaturação proteica no comportamento do tipo depressivo induzido 24 h após a administração i.c.v. de VML. ....	48
5.6 Avaliação do Conteúdo de GFAP e S100B no hipocampo de camundongos 24 h após a administração i.c.v de VML.....	49
5.7 Modulação de MAPKs, AKT e GSK-3 $\beta$ , 24 h após a administração de VML. ....	50
5.8 Avaliação da viabilidade celular em fatias expostas a VML in vitro. ....	52
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>60</b>
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>10 APÊNDICE .....</b>	<b>76</b>





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Lectinas

Lectinas representam um grupo de proteínas de origem não imune que contém pelo menos um domínio não catalítico que reconhece e liga seletivamente, de forma reversível, a açúcares específicos sobre glicoconjugados, (Gorelik et al., 2001; Minko, 2004, Dube & Bertozzi, 2005)

A identificação e caracterização das lectinas pode ser realizada de diferentes maneiras, porém a capacidade de hemaglutinação é amplamente utilizada. A observação dessa propriedade no final do século XIX levou a identificação de proteínas que tinham a capacidade de aglutinar células. Estas proteínas foram denominadas “hemaglutininas” ou “fitoaglutininas”, pelo fato de terem sido primeiramente identificadas em extratos de plantas. Já em 1948, foi evidenciado que algumas dessas hemaglutininas possuíam seletividade ao aglutinar determinados grupos sanguíneos. Tal seletividade levou a introdução do termo lectina (do latim *legere* que significa escolher) na denominação dessas proteínas. Mais tarde em 1952, foi finalmente estabelecido que as propriedades aglutinantes das lectinas são baseadas na sua capacidade de ligação com carboidratos. (Sharon & Lis, 2004).

As proteínas dessa família estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em animais, plantas e microrganismos. Nos animais as lectinas estão envolvidas no reconhecimento biológico de diversos eventos relacionados à comunicação celular, participando de diferentes processos biológicos como o desenvolvimento, metástase tumoral e inflamação (Cavada et al., 2001). Além disso, lectinas endógenas em mamíferos possuem a capacidade de regular funções neurais importantes, como neurogênese, diferenciação astrocitária e promover respostas neuroprotetoras (Endo, 2005; Lekishvili et al., 2006).

## 1.2 Lectinas presentes nos mamíferos

No sistema nervoso central podem ser encontradas lectinas com afinidade por manose/glicose ou galactose (Marschal et al., 1989; Almkvist & Karlsson, 2004; Endo, 2005; Dani & Broadie, 2011). Contudo, atualmente as lectinas com afinidade por galactose tem se destacado como importantes moléculas moduladoras da função neural

(Sakaguchi et al., 2011; Starossom et al., 2012). As galectinas são as lectinas com afinidade por galactose, mais estudadas até o momento. Esta família de lectinas, compostas por 15 proteínas hidrossolúveis, é caracterizada por possuir em sua estrutura um domínio responsável pela interação da proteína com carboidratos, permitindo o reconhecimento e ligação com moléculas de  $\beta$ -galactosídeos, especialmente N-acetil-lactosamina. Este domínio é denominado “Domínio de Reconhecimento de Carboidratos” (CRD), sendo também conhecido como domínio lectínico (Yang et al., 2008; Rabinovich & Toscano, 2009). Recentes estudos têm demonstrado peculiaridades específicas de algumas dessas proteínas na ligação com carboidratos (Rabinovich & Croci, 2012).

No Sistema Nervoso Central, a galectina-1 (gal-1) destaca-se como uma molécula com potencial atividade neuroprotetora. Gal-1 é uma pequena proteína de 14 kDa, que predominantemente está sob a forma dimérica. A manutenção da estrutura dimérica (que ocorre quando a proteína está na sua forma reduzida) é crucial para interação da lectina com os carboidratos, e direciona a sua atividade biológica (Horie & Kadoya, 2004; Di Lella et al., 2010). Por outro lado, a perda da capacidade de ligação aos carboidratos não implica em perda da atividade biológica. A capacidade de regeneração axonal tem sido atribuída à gal-1 oxidada, porém a atividade lectínica não está envolvida nesse efeito (Horie & Kadoya, 2004).

Gal-1 na sua forma dimérica e com capacidade de ligação a carboidratos, tem sido largamente estudada pelos seus efeitos no SNC (Kajitani, 2009, Qu et al., 2010; Qu et al., 2011). Após isquemia focal cerebral ocorre aumento na expressão de gal-1, e nessas condições a administração dessa lectina conduz a uma série de respostas neuroprotetoras como: recuperação motora dos animais, produção de BDNF, diminuição da perda neuronal, estímulo da neurogênese e inibição da astrogliose (Ishibashi et al., 2007; Qu et al., 2010; Qu et al., 2011). Estudos utilizando culturas primárias de astrócitos mostraram que galectina-1 pode induzir a expressão de BDNF estimular a diferenciação astrocitária. A expressão de gal-1 principalmente por astrócitos e células progenitoras neurais parece estimular a neurogênese (Sakaguchi et al., 2006; Sakaguchi et al., 2007; Kajitani et al., 2009). Além disso, gal-1 apresentou atividade neuroprotetora contra a neurotoxicidade produzida por glutamato em cultura de neurônios cerebelares, efeito esse envolvendo alterações na expressão e composição de receptores glutamatérgicos (Lekishvili et al., 2006). Tem sido observada a participação de gal-1 na ativação da microglia em algumas doenças neurodegenerativas como a esclerose múltipla

(Starossom et al., 2012). Em animais geneticamente modificados (*Knockout*) a deficiência de gal-1 causou prejuízos cognitivos envolvendo a função de memória hipocampal (Sakaguchi, 2011).

Os mecanismos envolvidos nos diversos efeitos neuroprotetores promovidos ou mediados por gal-1 ainda não estão elucidados. Entretanto, a participação de receptores de  $\beta$ -integrina, glicoproteínas ricas em  $\beta$ -galactosídeos na sua estrutura, parece estar envolvida nas repostas celulares promovidas por gal-1 (Sakaguchi et al., 2010).

### 1.3 Lectinas de plantas.

Lectinas obtidas de plantas têm sido muito utilizadas como ferramentas no estudo de mecanismos moleculares relacionados à fisiologia e patologia celular animal (Cavada et al., 2001; Fay & Bowie, 2006). Lectinas da família Fabaceae (Leguminosae) possuem a capacidade potencial de modular alvos moleculares que dentro do SNC poderiam estar envolvidos na regulação comportamental, na neuroplasticidade, ou mesmo na resposta a determinadas drogas de ação central (Lin & Levitan, 1991; Scherer & Udin, 1994; Boehm & Huck; 1998, Cavada et al., 2001; Russi et al., 2012). Essas lectinas são um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. Na subtribo Diocleinae observam-se os gêneros, *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*, dos quais lectinas têm sido isoladas e caracterizadas, sendo muitas de origem brasileira, como as extraídas de: *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Dioclea grandiflora* (DGL), *Dioclea violacea* (DVioL) entre outras (Cavada et al., 2001). Todas as lectinas Diocleanae apresentam estruturas multiméricas compostas de monômeros de 25,5 kDa, além de exibirem a característica de equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH (Calvete et al., 1999). Nessa família as lectinas apresentam como especificidade principal de reconhecimento os carboidratos D-manose e D-glicose (Cavada et al., 2001).

A lectina Concanavalina A (ConA) obtida das sementes de *Canavalia ensiformis* (Família Fabaceae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae), foi a primeira lectina a ser purificada, seqüenciada e cuja estrutura tridimensional foi resolvida por cristalografia de raio-x. ConA apresenta uma estrutura tetramérica, em que cada um dos seus monômeros contém 237 resíduos de aminoácidos (Cavada et al., 2001). Tal lectina apresenta afinidade pelos monossacarídeos D-glicose e D-manose.

ConA tem sido uma importante ferramenta nos estudos de glicobiologia no SNC. Esta lectina pode ser utilizada no estudo da função de diversos receptores, incluindo receptores glutamatérgicos AMPA e Kainato (Partin et al., 1993; Yue, et al., 1995; Everts et al., 1997; Hoffman et al., 1998; Fay & Bowie, 2006). Além disso, ConA tem sido utilizada no estudo de alguns aspectos neuroquímicos e eletrofisiológicos envolvidos na neurotransmissão e da plasticidade do SNC (Fay & Bowie, 2006).

A partir do isolamento de ConA, várias outras lectinas com propriedades físicas similares têm sido purificadas e caracterizadas, como a lectina ConBr isolada a partir de sementes de *Canavalia brasiliensis*. A sequência e estrutura cristalográfica de ConBr revela 99% de homologia com ConA e especificidade por manose/glicose (Grangeiro et al., 1997; Cavada et al., 2001). Contudo a diferença de dois aminoácidos na estrutura primária entre as lectinas, implica em diferenças marcantes na estrutura tridimensional entre ConA e ConBr (Grangeiro et al., 1997; Sanz-Aparicio et al., 1997).

Diferentes atividades biológicas já foram atribuídas a ConBr. Em relação ao SNC, nosso grupo já relatou algumas ações promovidas pela administração de ConBr. Baraúna et al., (2006) demonstra que ConBr (mas não ConA) apresentou uma atividade antidepressiva em camundongos, avaliada através do teste do nado forçado (TNF) quando injetada por via intracerebroventricular (i.c.v). A ação de ConBr foi dependente da ativação dos sistemas serotoninérgicos (via 5HT1 e 5HT2), adrenérgico (via  $\alpha$ 1-adrenérgico) e dopaminérgico (via receptor tipo D2). Além disso, ConBr apresentou ação neuroprotetora em modelos de neurotoxicidade induzida pelo ácido quinolínico, provavelmente por inibição da transmissão glutamatérgica (Russi et al., 2012). Por fim, demonstramos que ConBr pode prevenir a morte celular induzida por glutamato em fatias hipocámpais por mecanismo dependente da via PI3K/Akt (Jacques et al., 2013).

### 1.3.1 VML

VML é um glicoproteína tetramérica, com quatro subunidades idênticas de 26 kDa cada, isolada das sementes de *Vatairea macrocarpa*. Essa lectina induz aglutinação de hemácias de carneiro e humanas – caracterizando seu efeito lectínico – sendo que tal efeito é bloqueado na presença de galactose e N-acetilglicosamina, ressaltando a afinidade da proteína por tais carboidratos (Cavada, et al., 1998, Ramos et al., 2000).

Estudos de cromatografia de afinidade revelaram que VML pode reconhecer sequências não reduzidas de N-acetil-lactosamina, possibilitando a utilização desta lectina no estudo e isolamento de glicoproteínas contendo sequências de N-acetil-lactosamina. (Ramos et al., 2000). A análise por eletroforese SDS-PAGE revela que a estrutura de VML consiste uma banda dupla de 32 e 34 kDa, correspondente a cadeia alfa da proteína e duas bandas menores de 22 e 13 kDa, que correspondem às cadeias betas e gama respectivamente (Cavada et al., 1998).

No sistema renal, VML demonstrou afinidade pelos carboidratos ali presentes, aumentando a pressão de perfusão e a resistência vascular renal, fluxo urinário e taxa de filtração glomerular, sendo o domínio lectínico essencial para estes efeitos (Martins et al., 2005). Porém, alguns efeitos promovidos por VML independem da interação desta com moléculas glicídicas. Em microrganismos da espécie *Rhizobium tropici*, essa lectina causou a alteração no potencial de membrana da bactéria, elevando a concentração extracelular de sódio em cerca de 700%. Este efeito não se mostrou dependente da interação lectina-carboidrato, uma vez que persistiu na presença de galactose (Martinez et al., 2004).

As lectinas são proteínas com importantes funções nos eventos decorrentes do processo inflamatório. A adesão no endotélio e migração leucocitária observada na resposta inflamatória é mediada, pelo menos em parte, por interações de proteínas com carboidratos, envolvendo a participação de lectinas (Tedder et al., 1995; Alencar et al., 2004). Nesse sentido foi demonstrada que VML foi capaz de induzir em alguns modelos animais, respostas inflamatórias periféricas. Dessa forma, a administração intraperitoneal de VML induziu a migração de neutrófilos para essa região, sendo que a interação entre a proteína e carboidratos está envolvida nesse efeito (Alencar et al., 2003). Essa atividade pró-inflamatória, envolveu alguns mecanismos indiretos mediados por células residentes da cavidade peritoneal, provavelmente macrófagos. Entretanto, metabólitos da ciclooxigenase e lipooxigenase parecem não estar envolvidos nesse processo. Contudo, o pré-tratamento com dexametasona e talidomida (inibidor seletivo de TNF- $\alpha$ ) diminuem a migração de neutrófilos, indicando a participação de citocinas pró-inflamatórias nesse efeito (Alencar et al., 2003). VML também estimulou a ativação de macrófagos, com a liberação de fatores quimiotáticos (Alencar et al., 2007). Por fim, VML também demonstrou a capacidade de induzir em ratos edema de pata com marcante infiltração leucocitária (Alencar et al., 2004)

## 1.4 Neuroinflamação

Presente em todos os vertebrados, a inflamação é um processo complexo e altamente dinâmico, combinando a resposta de diferentes tipos celulares, sinais químicos e vias de sinalização celular. A resposta inflamatória visa manter ou recuperar a homeostase do tecido, e requer uma associação íntima entre o tecido afetado e alguns elementos da resposta imune. A inflamação pode ser encontrada em algumas situações fisiológicas e patológicas, onde pode ser útil no processo de recuperação e regeneração do tecido. Contudo, quando a resposta inflamatória é persistente e exacerbada, pode conduzir a um marcante dano tecidual (Medzhitov, 2008; Jacobs & Tavitian, 2012).

A inflamação envolve, principalmente, os seguintes fatores: 1) alterações na permeabilidade vascular; 2) ativação e infiltração de células do sistema imune; 3) produção de citocinas. No SNC esse processo é denominado neuroinflamação, apresentando características específicas devido a sua localização anatômica (proteção pelo crânio e meninges), e a proteção oferecida pela barreira hematoencefálica (Jacobs & Tavitian, 2012). A resposta neuroinflamatória ocorre em decorrência de infecções no sistema nervoso central, ou em algumas doenças neurológicas e psiquiátricas como Alzheimer, Parkinson, esquizofrenia e depressão. As células do sistema imune, especificamente os neutrófilos e linfócitos, tem um pequeno papel na resposta inflamatória no SNC. Dessa forma, nos casos das doenças neurológicas e psiquiátricas, a resposta ocorre principalmente pela ativação da microglia, fato este que tem levado muitos autores a substituir o termo de neuroinflamação por ativação da microglia ou ativação microglial (Graeber et al., 2011; Jacobs e Tavitian, 2012).

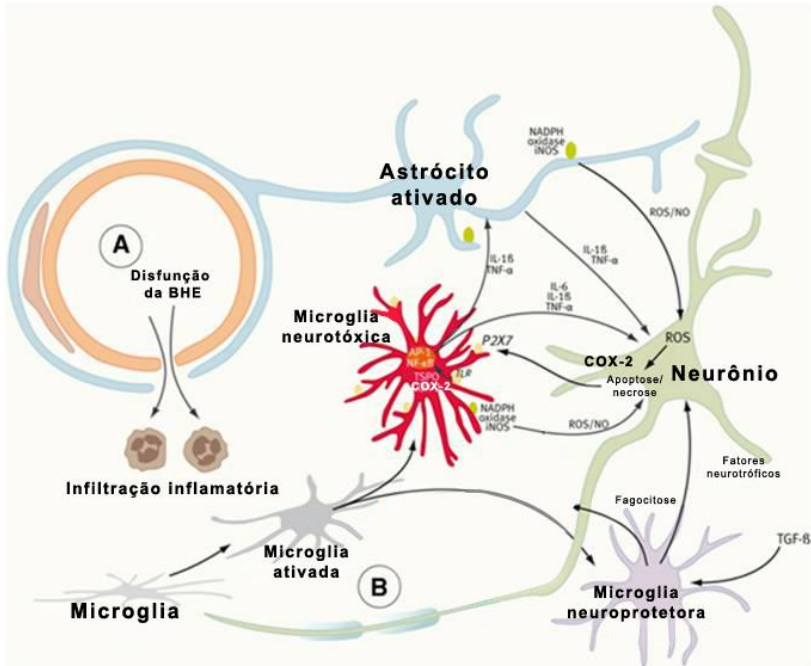
Os mecanismos exatos decorrentes da neuroinflamação ainda não estão totalmente elucidados. Nos casos de infecções no SNC, pode ser observada uma disfunção da barreira hematoencefálica com infiltração de células inflamatórias. Na neuroinflamação observada em doenças como a depressão, essa disfunção da barreira não ocorre, sendo que neste caso a microglia exibe papel chave nesse processo (Neumann et al., 2009; Amor, et al, 2010, Graeber et. al 2011). Alguns dos principais eventos envolvidos na neuroinflamação são esquematizados na figura 1.

A microglia consiste nas células de defesa do cérebro, com uma função análoga aos macrófagos. São essenciais para o funcionamento correto do cérebro por estarem envolvidas em alguns processos como: diferenciação neuronal, crescimento axonal, proliferação dos astrócitos e angiogênese. Quando ativadas elas podem exibir atividade

neuroprotetora por estarem envolvidas, por exemplo, no reparo tecidual. Em situações que são ativadas em excesso, podem participar da neurodegeneração (podendo ser denominadas como microglia neurotóxica) observada em algumas doenças, pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, indução de enzimas pro-inflamatórias (por exemplo, COX-2) e ativação astrocitária (Graeber et. al 2011; Amor, et al, 2010; Jacobs & Tavitian, 2012).

A ciclooxigenase (COX) é a enzima envolvida na conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas. Duas isoformas foram identificadas, a COX-1 e a COX-2. A enzima COX-1 é expressa constitutivamente em grande parte dos tecidos enquanto COX-2 tem sua expressão acentuada em tecidos com resposta inflamatória presente (Seibert et al., 1995; O'Banion, 1999).

A COX-2 é encontrada de maneira constitutiva no cérebro principalmente no hipocampo, amígdala e córtex cerebral, sendo expressa por neurônios, micróglia e astrócitos (Yamagata et al., 1993). COX-2 está relacionada com diferentes processos cerebrais como regulação do sono/vigília, aprendizado e memória (Hayaishi & Matsumura, 1995; Rall et. al 2003). Contudo o aumento na expressão de COX-2 pode ocorrer de maneira marcante em situações de neuroinflamação como doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e esclerose lateral amiotrófica (Andreasson, 2010). Recentemente tem sido considerado um possível papel da COX-2 na fisiopatologia da depressão (Akhondzadeh et.al. 2009; Borre et al., 2012; Johansson, 2012). Modelos animais de estresse podem induzir o aumento na expressão de COX-2 (Madrigal et al., 2003, Cassano et al., 2006). Além disso, estudos clínicos demonstraram que a utilização celecoxib (um inibidor seletivo de COX-2) é eficaz como tratamento adjuvante na depressão (Akhondzadeh et.al. 2009).



**Figura 1.** Esquema ilustrativo das principais respostas neuroinflamatórias (adaptado de Jacobs & Tavitian, 2012). Em A, temos a infiltração de células inflamatórias devido à disfunção da Barreira Hematoencefálica (BHE) associada normalmente a infecções do SNC. Já em B pode ser observada as situações inflamatórias que podem ocorrer em algumas doenças neurodegenerativas, que envolvem respostas da microglia. Essas células podem ser ativadas e exercer atividades neuroprotetoras, ou ativadas em excesso, conduzindo a microglia a respostas tóxicas como a secreção de citocinas com atividade pró-inflamatória principalmente interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), e expressão de COX-2. Essa resposta neurotóxica conduz a ativação dos astrócitos e a degeneração neuronal.

### 1.5 Astrócitos

Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC (Gee & Keller, 2006). Inicialmente foi atribuído a essas células unicamente uma função de suporte metabólico para os neurônios (Perea e Araque, 2005; Volterra e Medolesi, 2005). Realmente os astrócitos estocam glicogênios e fornecem lactato para os neurônios, além de promover o equilíbrio dos íons extracelulares (Simard e Nedergaard, 2004; Brown e



Ranson, 2007). Contudo, atualmente reconhece-se que estas células podem participar de diferentes processos incluindo: desenvolvimento do SNC, metabolismo de neurotransmissores e transmissão sináptica. Nesse sentido, a sinapse tem sido definida como um processo tripartite dependente dos astrócitos além dos terminais neuronais pré- e pós-sináptico (Perea e Araque, 2005). Durante o desenvolvimento do SNC, os astrócitos participam da formação das sinapses através da síntese de proteínas de matriz celular e produção de fatores neurotróficos. Essas células também participam da formação da barreira hematoencefálica (Wang & Bordey, 2008), da síntese de glutatona e da captação de neurotransmissores como glutamato e GABA (Shih et al., 2006; Wang & Bordey, 2008). Por fim, os astrócitos participam da resposta imune e inflamatória no cérebro (Sofroniew, 2009).

A proteína glial fibrilar ácida (GFAP), é uma proteína de 50 kDa que compõe os filamentos intermediários do tipo III do citoesqueleto astrocitário. GFAP tem sido utilizada como uma importante ferramenta na identificação e estudo da função dos astrócitos, por ser um dos antígenos mais específicos para estas células. O aumento do conteúdo desta proteína pode ser interpretado como sinal de ativação glial e/ou astrogliose em condições de dano cerebral (Eng et al., 2000).

Outras proteínas têm sido utilizadas no estudo da função astrocitária, como a proteína ligante de cálcio S100B. S100B consiste numa proteína de 21 kDa que faz parte da família de proteínas S100 (que são solúveis em solução concentrada de sulfato de amônia), possuindo domínios de ligação ao cálcio do tipo EF-hand. S100B é expressa e secretada principalmente por astrócitos, e tem sido relatadas alterações na sua expressão em diversas condições de dano cerebral (Gonçalves et al., 2008; Donato et al., 2009). A quantificação de S100B pode ser utilizada na identificação dos estágios e severidade da neuroinflamação e como um possível marcador da ativação glial em alguns transtornos psiquiátricos (Rothermundt et al., 2003; Falcone, et al., 2010; Schroeter et al., 2011).

## 1.6 MAPKs

A ativação dos receptores de membrana, que em sua grande maioria são de natureza glicoproteica, podem modular direta ou indiretamente enzimas intracelulares como as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Sweatt, 2001). As MAPKs são serina-treonina cinases mediadoras de várias respostas celulares, como proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, morte e transformação celular

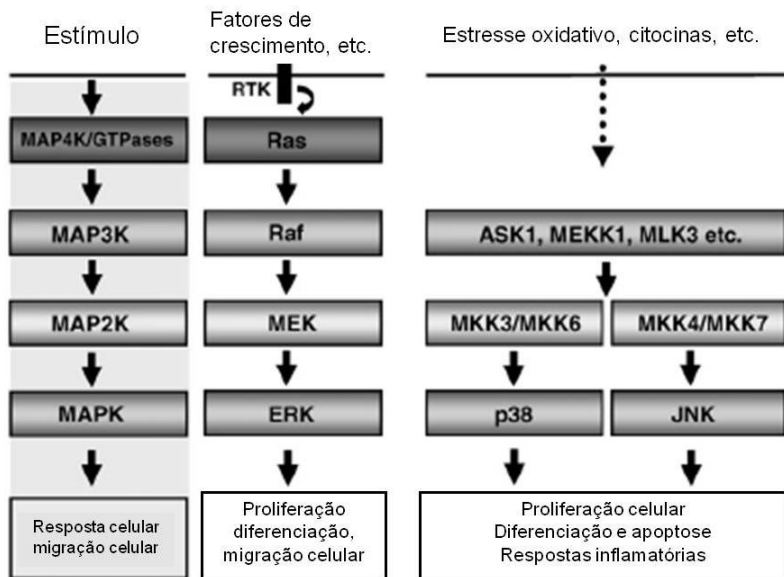
(Kim & Choi, 2010). As três principais MAPKs identificadas são as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), c-Jun N-terminal cinases (JNKs) e as p38MAPK (Chang & Karin, 2001; Thomas e Haganir, 2004; Waetzig & Herdegen, 2004). Todas as vias operam em forma de cascata (Figura 2), com uma MAP cinase cinase cinase (MAPKKK) ativando por fosforilação uma MAP cinase cinase (MAPKK) que por sua vez fosforila e ativa a MAP cinase (MAPK).

As proteínas ERK1/2 estão envolvidas em respostas celulares a fatores de crescimento e outros mitógenos, exercendo ações regulatórias sobre mecanismos de proliferação e diferenciação (Thomas & Haganir, 2004). As ERKs também participam de processos de memória hipocampal e da plasticidade sináptica (Sweatt, 2004). ERK1/2 são translocadas do citosol para o núcleo, onde via RSK (ribossomal 6 cinase) ativam fatores de transcrição como CREB (“cAMP response element binding protein”), regulando a transcrição gênica. Sua via de sinalização é iniciada por diversos estímulos extracelulares, capazes de ativar receptores tirosina cinase (RTK), que através de um proteína adaptadora, como Grb2 (“growth factor receptor-binding protein 2”)/SOS (“son of sevenless”) pode ativar Ras, uma proteína G solúvel. Ras recruta Raf (MAP3K), uma serina-treonina cinase, que ativa MEK (cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular; MAP2K) que por sua vez fosforila ERK num resíduo de treonina e de tirosina, ativando-a (ver esquema ilustrado na Figura 2) (Kim & Choi, 2010).

JNK1/2/3 e p38<sup>MAPK</sup>, também conhecidas como proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs), são proteínas ativadas por citocinas e insultos citotóxicos, estando frequentemente relacionadas a estresse e morte celular e processos inflamatórios (Mielke e Herdegen, 2000; Cowan e Storey, 2003). Entre os diversos alvos destas cinases podem ser citados fatores de transcrição (por exemplo, c-Jun), enzimas, proteínas de choque térmico (por exemplo, Hsp27) e proteínas relacionadas à morte ou sobrevivência celular (Mielke e Herdegen, 2000; Harper e Lograsso, 2001; Raivich e Behrens, 2006;). A via da JNK consiste de uma MAPKKK tal como ASK1 (cinase reguladora de sinais apoptóticos), MEKK1 ou cinase de linhagem mista (MLK) ativando uma MAPKK como MKK4 ou MKK7 (Figura 2) (Kim & Choi, 2010). As JNKs estão amplamente distribuídas nos tecidos dos mamíferos e apresentam funções biológicas relevantes para o cérebro em desenvolvimento e em processos de neurodegeneração e ativação microglial (Waetzig e Herdegen, 2004)

As p38<sup>MAPK</sup> são ativadas por diversos estímulos, incluindo hormônios, ligantes de receptores acoplados a proteínas G e estresses.

Estão envolvidas em processos inflamatórios e apoptóticos em diferentes tipos celulares, incluindo neurônios (Mielke & Herdegen, 2000; Molz et al., 2008).



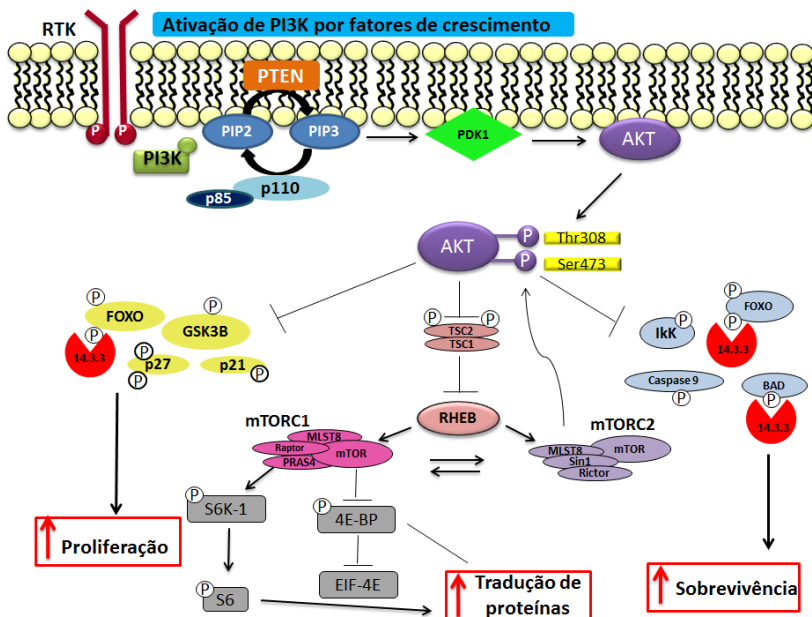
**Figura 2.** Vias de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). MAPKs medeiam a sinalização intracelular iniciada por fatores extracelulares ou intracelulares. Todas as vias operam em forma de cascata. MAPKKKs, que podem ser ativadas tanto por MAP4Ks ou proteínas G, fosforilam MAPKKs que por sua vez fosforilam e ativam as MAPKs. Uma vez ativadas, MAPKs fosforilam vários substratos, incluindo fatores de transcrição e outras enzimas cinases, regulando uma variedade de atividades celulares (ex. proliferação, diferenciação, migração, respostas inflamatórias e morte celular). Em mamíferos, destacam-se na família de MAPKs as enzimas ERK, p38MAPK e JNK. Adaptado de Kim e Choi (2010).

### 1.7 PI3K/AKT (PKB)

A via da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K)/AKT (ou PKB) pode ser ativada por fatores de crescimento, e sua ativação tem papel central no controle do crescimento, proliferação, metabolismo e sobrevivência celular e na neuroplasticidade (Hanada et al., 2004; Brazil et al., 2004; Van Der Heide et al., 2006), para visualização esquemática dessa via ver a Figura 3. Dessa forma, considera-se que processos neuroquímicos

relacionados ao desenvolvimento do SNC, à neuroplasticidade, à sobrevivência e morte celular e ao aparecimento de doenças neurodegenerativas podem ser modulados pela atividade dessa via de sinalização sobre diversas proteínas alvo, como fatores de transcrição, proteínas apoptóticas, produção de fatores neurotróficos (Van Der Heide et al., 2006).

Akt/PKB é uma serina/treonina cinase que fosforila e regula a função de muitas proteínas celulares envolvidas em processos relacionados ao metabolismo, apoptose, proliferação e neuroplasticidade incluindo GSK-3 $\beta$  (Song et al., 2005), (ver Figura 3). Akt/PKB contém dois sítios regulatórios de fosforilação, o Thr308 no domínio catalítico e Ser473 no domínio regulatório C-terminal (Song et al., 2005). GSK-3 $\beta$  é uma serina/treonina cinase multifuncional que possui uma importante atividade reguladora da síntese de glicogênio, transcrição de genes, plasticidade sináptica e apoptose (morte celular) (Jope & Roh, 2006, Jope, 2003). Além disso, GSK-3 tem um papel importante no controle do comportamento, através da modulação de diferentes alvos celulares como o fator de transcrição  $\beta$ -catenina, receptores glutamatérgicos, e neurotransmissão serotoninérgica (Beaulieu et al., 2007). As modulações destes alvos estão envolvidas na fisiopatologia de várias doenças neurológicas e psiquiátricas. Recentemente, alguns estudos têm demonstrado que inibidores da GSK-3 $\beta$  poderiam constituir uma nova classe de fármacos antidepressivos (Rosa et al., 2008).



**Figura 3.** Via de sinalização dependente de PI3K/AKT. A ativação de Akt/PKB, via fosforilação dos sítios Thr308 e Ser474, pode proteger as células da apoptose pela fosforilação e consequente inibição de mediadores pró-apoptóticos como Bad, fatores de transcrição como FOXO e GSK-3 $\beta$ . Além disso, AKT pode fosforilar e ativar o fator de transcrição NF $\kappa$ B. Adaptado de Hanada et al., 2004.

## 1.8 Teste do nado forçado

Os testes comportamentais são uma importante ferramenta no estudo do mecanismo de ação e de possíveis alvos de compostos que atingem o SNC. O Teste do nado forçado (TNF), que foi utilizado neste estudo, é uma importante ferramenta na busca de novas drogas com ação antidepressiva. Além disso, esse teste permite o estudo dos mecanismos associados a transtornos tipo depressivos (Budni et al., 2007; Budni, et al., 2013).

O teste do nado forçado é realizado baseado no método descrito originalmente por Porsolt e colaboradores (1977). É utilizado um cilindro vertical com um volume de água suficiente para o animal nadar ou boiar sem encostar as patas ou a cauda no fundo do recipiente. O tempo correspondente ao que o animal faz pequenos movimentos somente para manter a cabeça acima do nível da água pode ser quantificado como o tempo total de imobilidade. Nesse teste, o tempo de imobilidade diminuído indica um efeito antidepressivo.

Muitas hipóteses têm sido desenvolvidas para explicar a imobilidade do animal observada neste teste. Atualmente postula-se que o animal “perde a esperança de escapar” de tal situação, ou seja, a falta de persistência em escapar é percebida como uma desistência. Tal situação é refletida em tempo de imobilidade que pode ser indicativo de um estado tipo depressivo (Cryan & Mombereau, 2004). Substâncias antidepressivas revertem esse quadro diminuindo assim o tempo de imobilidade (Porsolt et al., 1977, Baraúna et. al., 2006, Budni et al., 2013).

Contudo as conclusões obtidas com o teste do nado forçado podem ir além da observação da diminuição do tempo de imobilidade e efeito antidepressivo. Após a administração de determinadas drogas pode ser observada um aumento no tempo de imobilidade, sinalizando um efeito pró-depressivo (Cryan et al., 2003; O’Reilly et al., 2006; Kaster et al., 2012). Por exemplo, Brocado et al (2007), demonstra que a administração do pesticida malation provoca um aumento no tempo de imobilidade neste teste, indicando um efeito pró-depressivo.

Para validar as alterações no teste do nado forçado como indicativas de comportamento do tipo depressivo, deve-se excluir a possibilidade de alteração na atividade locomotora nos animais. Desta maneira, o teste do campo aberto permite uma avaliação da atividade estimulante dos animais, sendo que o número de cruzamentos com as quatro patas entre as divisões do campo refletem se a substância que foi

administrada estaria exercendo ou não atividade estimulante (Rodrigues et al., 2006).

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando a existência em mamíferos de lectinas com afinidade por  $\beta$ -galactosídeos e a relativa facilidade de purificação de lectinas de plantas com afinidade por esses mesmos carboidratos, vislumbra-se a possibilidade da aplicação de lectinas de plantas como ferramentas para estudo relacionadas às possíveis respostas biológicas advindas desse tipo de interação.

Estudos realizados no nosso grupo já demonstraram que lectinas de plantas com afinidade para resíduos de glicose/manose são capazes de interferir na função neural alterando sistemas de neurotransmissão, produzindo neuroproteção e regulando a produção de neurotrofinas. A lectina ConBr com afinidade por manose/glicose já demonstrou atividade do tipo antidepressiva (Baraúna et al., 2006) e além disso, ConBr apresentou ação neuroprotetora em modelos de neurotoxicidade induzida pelo ácido quinolínico (Russi et al., 2012), e foi capaz de prevenir a morte celular induzida por glutamato em fatias hipocâmpais por mecanismo dependente da via PI3K/Akt (Jacques et al., 2013).

Na literatura é bastante evidente que gal-1, uma lectina endógena com afinidade por  $\beta$ -galactosídeos, estimula a produção de neurotrofinas e a neurogênese (Kajitani, 2009; Qu et al 2010, Qu et al., 2011). Todos esses elementos estão associados à neuroplasticidade, evento fundamental na atividade fisiológica cerebral e cuja alteração está relacionada a eventos fisiológicos (ex. aprendizado, memória, neurodesenvolvimento) e patológicos que incluem distúrbios comportamentais, depressão, déficits cognitivos, excitotoxicidade e neurodegeneração.

Tendo em vista os efeitos biológicos das lectinas em diversos modelos celulares e sua propriedade de ligação (com alta especificidade) com resíduos de carboidratos presentes em receptores e transportadores de neurotransmissores, parece promissor avaliar sua ação como uma ferramenta no estudo da neurotransmissão. Embora os animais possuam diversas lectinas no SNC capazes de regular funções neurais importantes, poucas delas foram caracterizadas funcionalmente. Lectinas obtidas de plantas têm sido muito utilizadas como ferramentas no estudo de mecanismos moleculares relacionados à fisiologia e patologia celular animal. Desta maneira o estudo dos eventos

comportamentais e moleculares decorrentes da administração de VML – lectina com especificidade para galactose e  $\beta$ -galactosídeos – pode auxiliar na compreensão do papel da interação de lectinas com afinidade por galactose e  $\beta$ -galactosídeos no SNC.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos Gerais

Caracterizar os possíveis efeitos de neuroproteção ou neurotoxicidade in vivo e in vitro promovido pela lectina obtida de planta isolada das sementes de *V. macrocarpa* (VML).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Determinar o efeito de VML no teste do nado forçado (TNF) e teste de locomoção no campo aberto, 1 e 24 h após a administração i.c.v. Avaliar o papel do domínio lectínico e da estrutura tridimensional da proteína nesse efeito.

- Avaliar por Western-blotting nos tempos de 1, 6 e 24 h após a administração i.c.v. de VML os seguintes parâmetros: fosforilação de MAPK's (p38<sup>MAPK</sup>, ERK-1/2, e JNK-1/2), AKT e GSK 3 $\beta$  no hipocampo de camundongos adultos. Avaliar o imunoconteúdo de COX-2, 1 h após a administração de VML.

- Avaliar por ELISA nos tempos de 1 e 24 h após a administração i.c.v. de VML o imunoconteúdo de GFAP e S100B no hipocampo de camundongos adultos

- Avaliar em modelo in vitro de fatias hipocampais a viabilidade celular, frente à exposição de VML (0,1-100  $\mu$ g/ml) e co-tratamento com glutamato.



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss adultos machos, pesando entre 35 e 45 g e mantidos a 21°C ±1 com livre acesso a água e comida, em ciclo claro/escuro 12:12 h (7:00-19:00 h). Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no biotério setorial nas mesmas condições. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (número de processo: PP0345) e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais.

### 4.2 Isolamento de lectinas

A lectina obtida das sementes de *Vatairea macrocarpa* foi isolada de acordo com os métodos já estabelecidos na literatura, no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol) coordenado pelo Prof. Dr. Benildo Cavada. VML foi isolada em coluna de Guar gel e sua pureza foi avaliada por SDS-PAGE (Calvete et al., 1998a,b; Cavada et al., 1998).

A lectina foi dissolvida de forma estéril em solução de NaCl 0,9%. Para verificar o papel do domínio lectínico na atividade de VML, esta lectina foi dissolvida também de forma estéril em solução de galactose 0,1 M (para obtenção da lectina bloqueada) (Alencar et al., 2004). A desnaturação da proteína foi realizada por aquecimento a 100°C por 10 min.

### 4.3 Tratamentos dos animais

A lectina foi administrada por via intracerebroventricular (i.c.v) nas doses de 0,3, 1,5 e 3,0 µg/sítio, num volume fixo de 5 µL em cada administração. A administração i.c.v. foi realizada utilizando uma agulha de 0,4 mm de diâmetro conectada por uma cânula de propileno a uma seringa Hamilton de 25 µl. A agulha foi inserida perpendicularmente no crânio, diretamente no ventrículo lateral, utilizando-se o bregma como referência (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma, com uma perfuração de 2,4 mm de profundidade). A fim de se verificar o local exato da injeção, os animais foram dissecados e analisados macroscopicamente após os testes. Os animais que apresentassem qualquer sinal que indicasse hemorragia e/ou formação

de coágulo, ou que não indicasse de forma clara que a injeção i.c.v. foi bem sucedida, foram excluídos das análises. (Laursen & Belknap, 1986; Maurice et al., 1996; Brocardo et al., 2008; Bicca et al., 2011; Kaster et al., 2012).

#### 4.4 Teste do Nado Forçado

O teste foi realizado em um cilindro plástico (altura de 24 cm, diâmetro 10 cm) contendo 19 cm de água a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O tempo de imobilidade foi cronometrado durante 6 min, conforme método originalmente descrito por Porsolt et al. (1977), com pequenas modificações (Budni et al., 2007; Freitas et al., 2010; Budni, et al., 2013). O camundongo foi considerado imóvel quando flutuava ou fazia movimentos necessários apenas para manter a cabeça acima da água. Os antidepressivos clássicos reduzem o tempo de imobilidade nesse teste (Porsolt et al., 1977).

#### 4.5 Teste do campo aberto

Para excluir a possibilidade de que a os efeitos observados no TNF fossem devidos a um eventual efeito psicoestimulante, ou seja, apenas um aumento na atividade locomotora, os camundongos foram submetidos a uma sessão no teste do campo aberto, durante 6 min, como descrito por Rodrigues et al. (1996). O teste foi realizado utilizando uma caixa de madeira (medindo 40 x 60 x 50 cm), com chão dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com todas as patas foi o parâmetro usado para avaliar a atividade locomotora do animal. Após o término do Teste do Campo Aberto, os animais foram submetidos imediatamente ao Teste do Nado Forçado.

#### 4.6 Westerns Blotting

##### 4.6.1 Preparo das amostras

Após os tratamentos, os animais que não foram submetidos a testes comportamentais foram eutanaziados, os hipocampos rapidamente dissecados ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e a seguir colocados em nitrogênio líquido, para armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de preparação dos homogenatos. As amostras foram preparadas como descrito por Lopes et al. (2012). Resumidamente, os hipocampos foram homogeneizados mecanicamente em 400  $\mu\text{L}$  do tampão de homogeneização (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA

1 mm, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e Cocktail inibidor de proteases). Estes lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10 min, a 4°C) visando eliminação de restos celulares. Os sobrenadantes foram diluídos na proporção de 1/1 (v/v) em solução de Tris 100 mM (pH 6,8), EDTA 4mM e SDS 8%, e aquecidos a 100°C por 5 min. A dosagem de proteínas foi determinada pelo método de Lowry modificado descrito por Peterson (1977). Finalmente, foram adicionados nas amostras “tampão de diluição” (40% glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) na proporção 1:4 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final 8%).

#### **4.6.2 Eletroforese e Eletrotransferência**

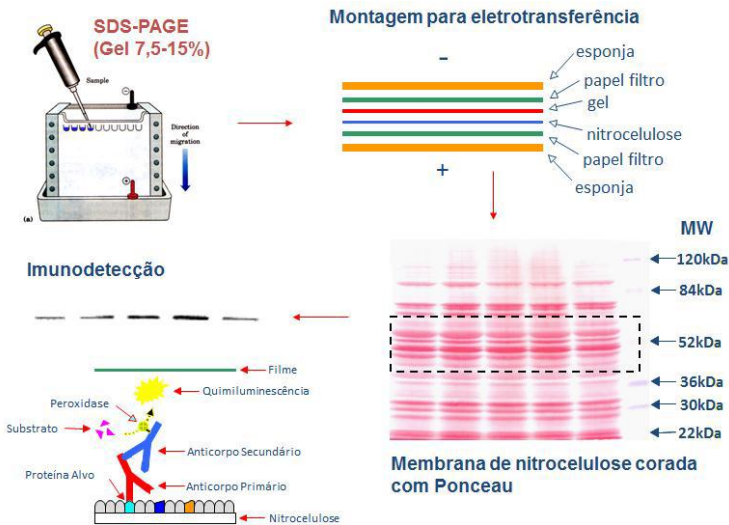
As proteínas foram isoladas através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando gel de separação com concentração de 10% e gel de entrada na concentração de 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 15 mA/placa e voltagem máxima de 150 V durante aproximadamente 2 h. Após a eletroforese, os géis foram submetidos ao processo de eletrotransferência usando um sistema semi-dry (1,2 mA/cm<sup>2</sup>; 1,5 h) para que as proteínas fossem transferidas para membranas de nitrocelulose. Para verificar a eficiência processo de transferência, os géis foram corados com Coomassie blue e as membranas com Ponceau Stain (Lopes et al., 2012).

#### **4.6.3 Imunodeteccção**

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,5) por 1 h e após 3 lavagens de 5 min cada com TBS-T, (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) as membranas foram incubadas “overnight” (4°C) com os anticorpos específicos para as formas fosforiladas e totais das seguintes proteínas: ERK1/2, p38MAPK, JNK1/2/3, AKT e GSK-3β. Os anticorpos foram diluídos em TBS-T contendo BSA 2% nas seguintes diluições: 1:1000 (anti-fosfo-JNK1/2/3, anti-fosfo-AKT e anti-total-AKT, anti-fosfo-GSK-3β e anti-total- GSK-3β), 1: 2000 (anti-fosfo-ERK1/2), 1:5000 (anti-total-JNK1/2), 1:10000 (anti-fosfo-p38MAPK anti-total-p38MAPK) e 1:40000 (anti-total-ERK1/2). Além disso, foram detectadas as proteínas COX-2 (diluição do anticorpo 1:1000) e α-actina (diluição do anticorpo 1:2000). Para a deteção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpo

secundário anti-IgG de coelho ou camundongo (ligado à peroxidase) e reveladas por quimiluminescência, através do sistema LumiGLO® (Cell Signaling), e utilizando filmes autorradiográficos. O nível de fosforilação das MAPKs, AKT e GSK-3 $\beta$  foi determinado pela razão entre a D.O da banda fosforilada e a D.O da banda total. O imunoc conteúdo de COX-2 foi determinado pela razão entre a D.O da amostra e D.O de  $\beta$ -actina. As bandas foram quantificadas utilizando o software Scion Image®.

Os anticorpos contra as formas totais e fosforiladas de ERK1/2 detectam duas bandas, uma de aproximadamente 44 kDa e a segunda com cerca de 42 kDa, respectivamente para as isoformas ERK1 e ERK2. Anti-p38<sup>MAPK</sup> forma total e fosforilada detecta uma única banda de aproximadamente 40 kDa, enquanto anti-JNK1/2/3 forma total e fosforilada detecta duas bandas, uma de aproximadamente 54 kDa (JNK2/3, denominada nesse trabalho de apenas JNK2) e a segunda com aproximadamente 46 kDa (JNK1). Anti-AKT total e anti-fosfo-AKT-Ser473 detecta uma única banda de aproximadamente 60 kDa, anti-COX-2 detecta uma banda com peso molecular aparente de 74 kDa, enquanto o anticorpo anti- $\beta$ -actina detecta uma única banda de aproximadamente 45 kDa. A figura 4 ilustra resumidamente todo o processo de Western-Blotting.



**Figura 4.** Representação esquemática da metodologia utilizada para eletroforese, eletrotransferência e imunodeteção de proteínas.

#### 4.7 ELISA para GFAP e S100B

Para a realização dos ensaios imunoenzimático (ELISA), os hipocampos foram homogeneizados em Tampão Fosfato de Sódio 0,1 M com PMSF 1mM e EGTA 1 mM. Para a detecção de S100B, as placas de 96 poços foram incubadas por 24 h com anticorpo anti-S100B (SH-B1). 50 µL de amostra mais 50 µL de tampão Tris foram adicionados nessas placas, seguida de incubação em 37°C por 2 h. Após esse período o anticorpo policlonal anti-S100B, juntamente com o anticorpo secundário conjugado à peroxidase, foi adicionado e uma nova incubação de 30 min foi realizada. Entre cada etapa, foram realizadas três lavagens com 200 µL de solução de lavagem (tampão fosfato de sódio 0,1M com ovoalbumina 0,2% e 0,05% de Tween 20). Uma reação colorimétrica com ortofenilenodiamina (OPD) foi utilizada para a detecção, e absorbância lida em 492nm. Para quantificação uma curva padrão de S100B foi realizada nas concentrações de 0,019 até 10 ng/mL.

O ELISA para GFAP foi realizado incubando primariamente a placa com 100 µL de amostras contendo 30 µg de proteína por 24 h a 4°C. A incubação com anticorpo policlonal anti-GFAP por 2 h foi seguida pela incubação com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1 h, em temperatura ambiente. Entre cada etapa, foram realizadas três lavagens com 200 µL de solução de lavagem Da mesma forma que a detecção de S100B, uma reação colorimétrica com OPD foi realizada. A curva padrão de GFAP foi realizada nas concentrações de 0,1 até 10 ng/mL (Leite et al., 2008; Tramontina, 2007).

#### 4.8 Preparo de fatias hipocampais para avaliação in vitro.

Os animais foram eutanaziados por decapitação e os cérebros foram imediatamente retirados a 4°C. Os hipocampos foram dissecados e fatiados na espessura de 400 µm, utilizando um fatiador de tecidos de McIlwain. Após a separação das fatias seguiu-se uma pré-incubação de 30 minutos à temperatura ambiente visando à recuperação metabólica das fatias no tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB; composto por NaCl 122 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glicose 10 mM) gaseificado com carbogênio (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) para atingir o pH 7,4 (Molz et al., 2008).

Após a pré-incubação as fatias foram incubadas 6 h na presença ou não de lectina (0,1-100 µg/ml), além da co-incubação de VML (10 µg/ml) com glutamato 10 mM. Para isso as fatias foram mantidas em um

meio de incubação composto por 50% de KRB (NaCl 122 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glicose 10 mM), 50% de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), 20 mM de HEPES e 100 µg/ml de gentamicina. As fatias foram incubadas individualmente em placa de cultura de 24 poços, contendo 1 ml de meio de incubação/poço, durante 6 h a 37°C e em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico que mede a redução do MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium) adicionado às fatias hipocámpais após o período de incubação (Liu et al., 1997). Este reagente é convertido nas células vivas e viáveis, em cristais azuis insolúveis (formazana) por diversas desidrogenases (especialmente a enzima mitocondrial succinato desidrogenase). A formazana foi solubilizada pelo dimetil sulfóxido (DMSO), formando um composto colorido cuja densidade óptica (DO) foi medida em leitor de microplacas ( $\lambda=540$  nm).

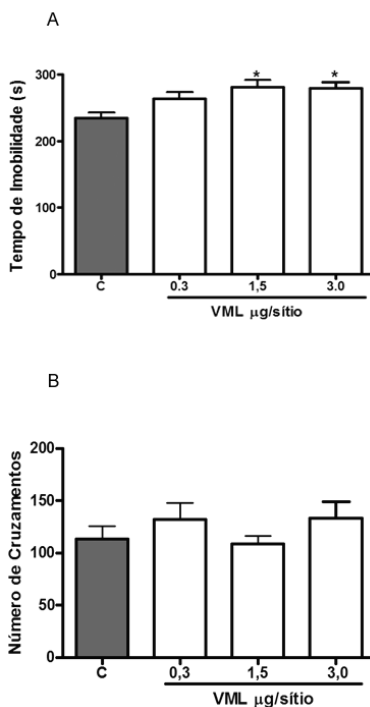
#### 4.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através do teste estatístico ANOVA de uma, seguido do teste post hoc de Tukey ou Duncan, quando apropriado. A análise estatística foi feita no programa STATISTICA 5.1 e os gráficos preparados no programa GraphPad Prism 4.0. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Comportamentos do tipo depressivo induzido 1 h após a administração i.c.v. de VML

Os resultados mostrados na figura 5 demonstram que VML foi capaz de aumentar significativamente o tempo de imobilidade dos animais no teste do nado forçado [F(3,24)=3.95,  $p < 0.05$ ] realizado 1 h após a administração i.c.v., indicando que a lectina induziu um comportamento do tipo depressivo nos camundongos. Adicionalmente, conforme visualizado na figura 1B, VML não provocou alterações na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto [F(3,24)=0.88,  $p = 0,47$ ].



**Figura 5.** Efeito de VML no tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (A), e número de cruzamentos no teste do campo aberto (B). Valores estão expressos como média  $\pm$  E.P. ( $n=5-8$ ). \* $p < 0.05$  quando comparado ao grupo controle (Teste de Tukey).

## 5.2 Efeito do bloqueio do CRD ou da desnaturação proteica no comportamento tipo depressivo induzido pela VML.

Com o intuito de verificar a dependência da integridade da estrutura tridimensional de VML nos efeitos observados no TNF, a lectina foi desnaturada termicamente (aquecimento por 10 min a 100°C). A figura 6A demonstra que VML na sua forma desnaturada não provocou alterações no tempo de imobilidade dos animais submetidos ao TNF. Adicionalmente, foi testada a dependência do sítio de ligação a carboidrato (CRD) nas alterações induzidas pela lectina. Para isso foi utilizado VML na sua forma bloqueada. O bloqueio do CRD foi realizado utilizando uma solução de galactose 0,1M. Desta forma, com os CRD bloqueados com este açúcar a interação da lectina com os resíduos glicídicos presentes na superfície celular fica impedida. A figura 6A demonstra que VML na sua forma bloqueada não foi capaz de induzir alterações nos testes comportamentais, diferentemente da lectina com sua estrutura nativa que foi efetiva nessa ação [F(4,31)=3,27, p<0,05]. A lectina nativa, desnaturada ou bloqueada não causa alterações no teste do campo aberto (Figura 6B).



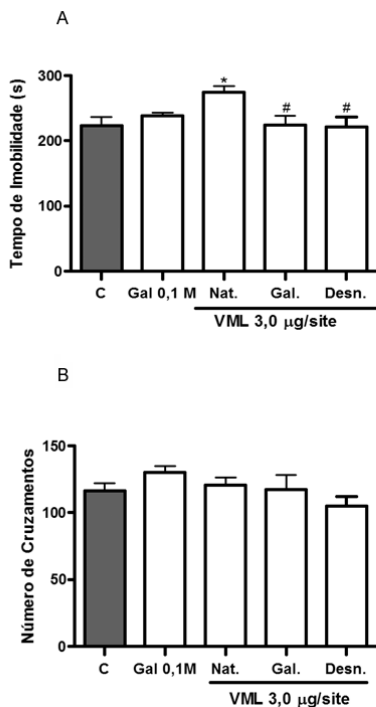


Figura 6: Efeito de VML na sua forma bloqueada ou desnaturada no teste do nado forçado (A) e teste do campo (B) 1 h após a administração i.c.v de VML. Valores expressos em média  $\pm$  E.P (n=5-8). \* $p < 0.05$  quando comparado com o grupo controle; # $p < 0.05$  quando comparado com VML na sua estrutura nativa (Teste de Tukey). NAT: VML na sua estrutura nativa; VML Gal 0.1: VML bloqueada com galactose 0,1 M; VML desn: VML com estrutura desnaturada; GAL 0.1: Galactose 0.1 solução salina estéril.

### 5.3 Avaliação do conteúdo de COX-2 no hipocampo 1 h após a administração de VML.

Para verificar se VML foi capaz de alterar alguma resposta inflamatória no hipocampo dos camundongos adultos, o imunoc conteúdo da enzima COX-2 foi avaliado por western-blotting. Figura 7 mostra que 1 h após a administração de VML, ocorreu um aumento de cerca de 30% no conteúdo de COX-2 no hipocampo [ $F(3,17) = 3.58, p < 0,05$ ].

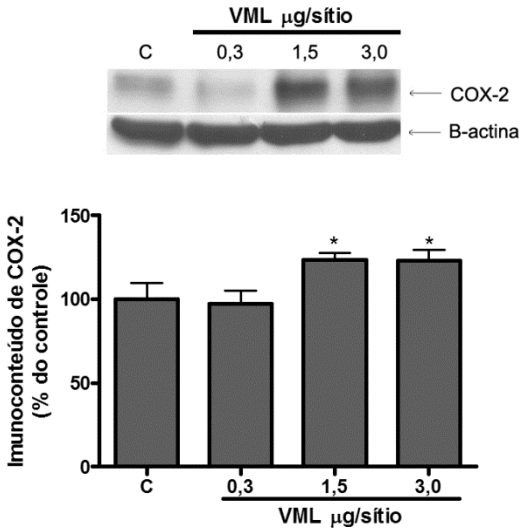


Figura 7. Avaliação por Western-blotting do imunoconteúdo de COX-2 no hipocampo de camundongos, 1 h após administração de VML. A quantificação de COX-2 determinada pela razão entre a D.O. Da banda de COX-2 e D.O da banda de B-actina. Dados expressos em percentual do controle. Média  $\pm$  E.P (n=5-6) \* $p < 0,05$ , quando comparado ao grupo controle (Teste de Duncan).

#### 5.4 Avaliação do Conteúdo de GFAP e S100B no hipocampo de camundongos 1 h após a administração de VML.

A ativação astrocitária, pode estar associada a condições de neuroinflamação e algumas doenças neurodegenerativas (Jacobs & Tavittann, 2012). Neste sentido, conforme demonstrado na figura 8, VML foi capaz de induzir o aumento significativo no conteúdo de GFAP [ $F(3,19)=4.22$ ,  $p < 0,05$ ] e S100B [ $F(3,20)=3.11$ ,  $p < 0,05$ ] 1 h após a administração i.c.v. da lectina.

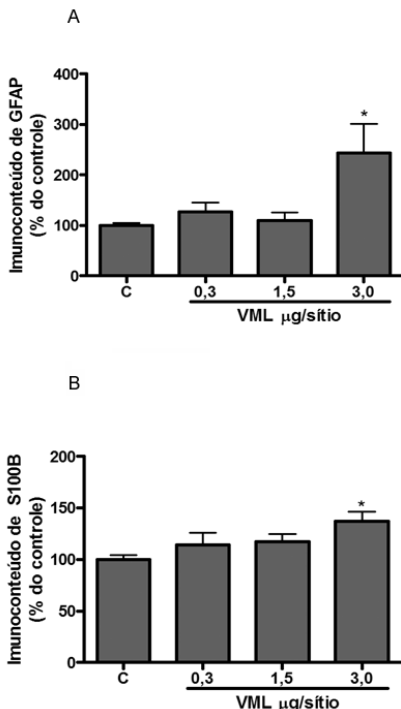


Figura 8. Avaliação do imunoconteúdo medido por ELISA de GFAP (A) e S100B (B) no hipocampo dos camundongos 1 h após a administração i.c.v de VML. Valores expressos em percentual do controle. (Média  $\pm$  EP, n=5-6). \*p<0.05, quando comparado ao grupo controle (Teste de Duncan).

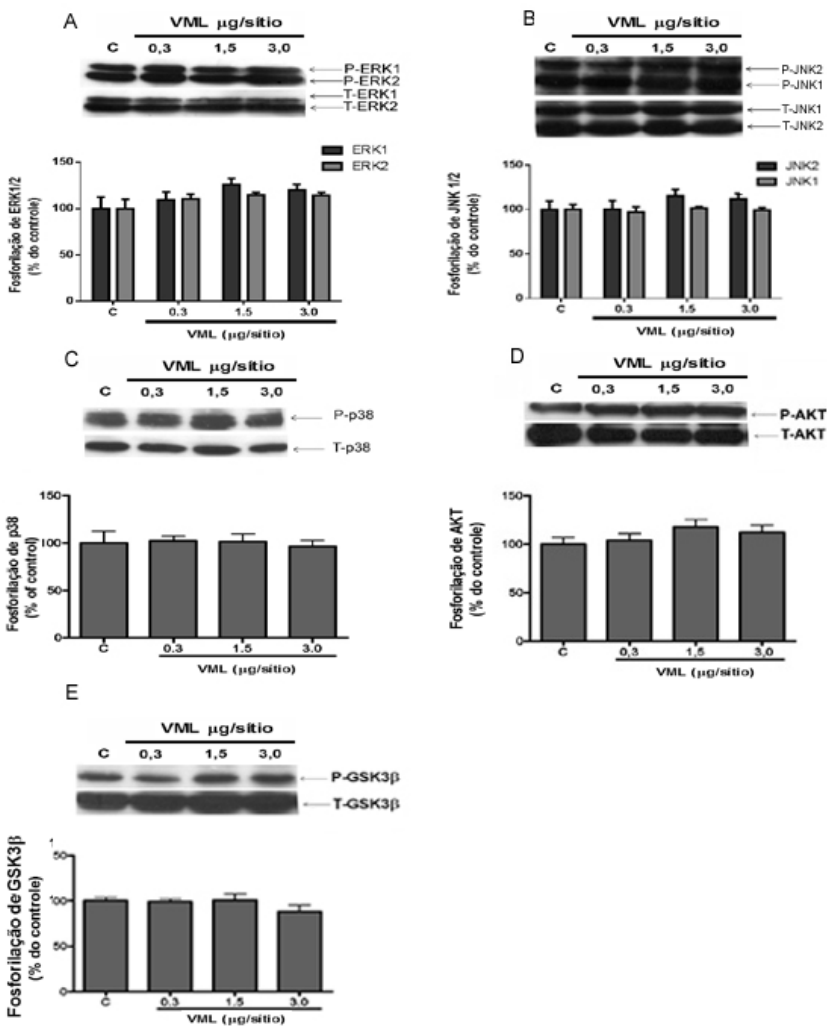
### 5.5 Modulação de MAPKs, AKT e GSK-3 $\beta$ após 1 e 6 h após a administração de VML.

Uma vez que as modulações de MAPKs ou de AKT/GSK-3 $\beta$  podem conduzir a respostas de morte ou sobrevivência celular (Thomas and Haganir; 2004; Kim & Choi, 2010; Galeotti & Ghelardini, 2011), foi investigado se VML poderia induzir alterações na fosforilação dessas enzimas de sinalização em diversos tempos após sua administração.

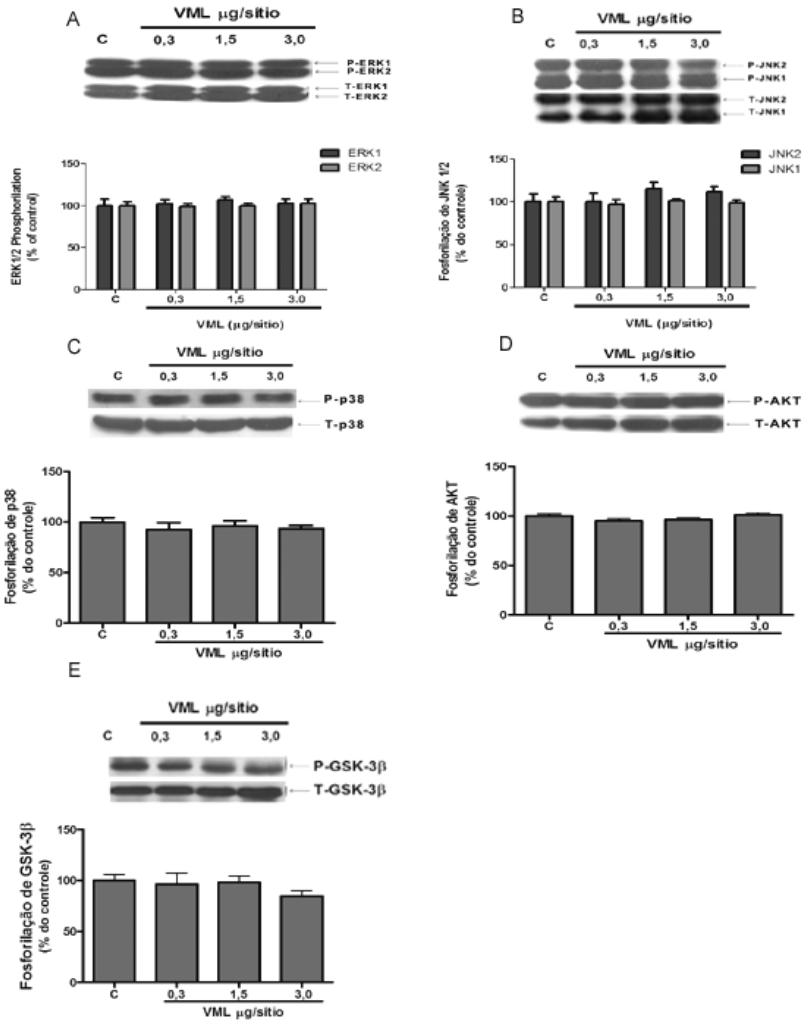
A figura 9 mostra a fosforilação de ERK 1/2 (A), JNK 1/2/3 (B), p38MAPK (C), AKT (D) e GSK-3 $\beta$  (E), avaliada por Western-Blotting, 1 h após a administração de VML. Nesse período, não foram verificadas alterações significativas na fosforilação das enzimas: p38MAPK  $F(3,20)=0,082$ ,  $p=0,97$ ] JNK1  $[F(3,18)=0,20$ ,  $p=0,90]$ , JNK2/3

[F(3,28)=0.97, p=0,97], ERK1 [F(3,16)=1.76, p=0,20], ERK2 [F(3,16)=1.29, p=0,31], Akt [F(3,12) = 3,3, p=0,057] e GSK-3 $\beta$  [F(3,16) =1.16, p=0,35].

Da mesma forma a fosforilação das enzimas não foi alterada de forma significativa 6 h após a administração de VML (figura 10): ERK 1 [F(3,12) = 0,331; p=0,81]; ERK2 [F(3,12) = 0,1785; p=0,2316]; JNK 1 [F(3,18) = 0,2035; p=0,90]; JNK2 [F(3,18) = 0,9767; p=0,4526]; p38MAPK [F(3,19) = 0,4009; p=0,76]; AKT [(3,15) = 1,644; p=0,24]; GSK-3 $\beta$  [F(3,15) = 0,8803; p=0,48].



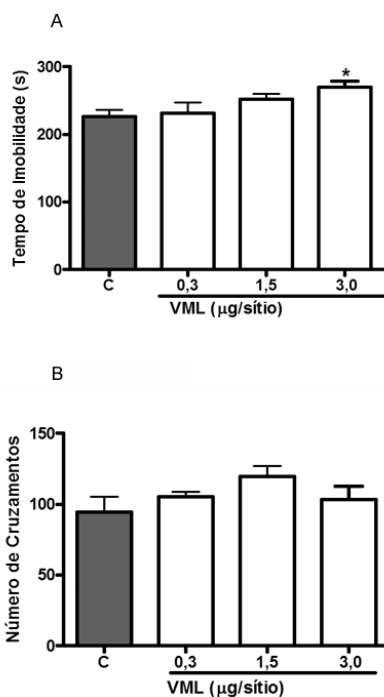
**Figura 9.** Avaliação por Western Blot da fosforilação de ERK 1/2 (A), JNK 1/2/3 (B), p38<sup>MAPK</sup> (C), Akt (D) e GSK-3β (E) no hipocampo de camundongos 1 h após a administração i.c.v de VML. A fosforilação de cada proteína foi determinada pela razão entre a D.O. da banda fosforilada e D.O. da banda total e os dados estão expressão em percentual do controle. Média ± E.P (n=5-6).



**Figura 10.** Avaliação por Western Blot da fosforilação de ERK 1/2 (A), JNK 1/2/3 (B), p38<sup>MAPK</sup> (C), Akt (D) e GSK-3 $\beta$  (E) no hipocampo de camundongos 6 h após a administração i.c.v de VML. A fosforilação de cada proteína foi determinada pela razão entre a D.O. da banda fosforilada e D.O da banda total e os dados estão expressão em percentual do controle. Média  $\pm$  E.P (n=5-6).

#### 5.4 Comportamento do tipo depressivo induzido 24 h após a administração i.c.v. de VML.

Os resultados mostrados na figura 11A demonstram que o comportamento do tipo depressivo induzido por VML foi observado também 24 h após a administração i.c.v. da lectina. [F(3,24) =3.86,  $p < 0.05$ ,]. Além disso, conforme visualizado na figura 11B, VML não provocou alterações na atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto [F(3,24) =1.56,  $p = 0,23$ ].

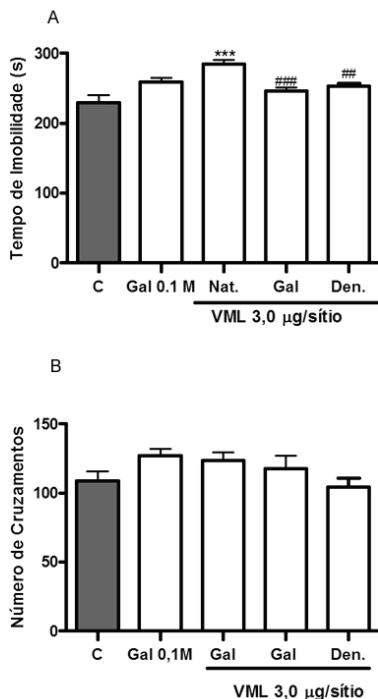


**Figura 11.** Efeito de VML no tempo de imobilidade no Teste do Nado Forçado (A), e número de cruzamentos no teste do campo aberto (B), 24 horas após da administração da lectina. Valores estão expressos como média  $\pm$  E.P. (n=5-8). \* $p < 0.05$  quando comparado ao grupo controle (Teste de Tukey).

5.5 Efeito do bloqueio do CRD, ou da desnaturação proteica no comportamento do tipo depressivo induzido 24 h após a administração i.c.v. de VML.

As alterações comportamentais promovidas pela lectina também foram dependentes da estrutura tridimensional e da capacidade de ligação do CRD da lectina, 24 h após a administração de VML. Conforme visualizado na figura 12A, a lectina tanto na sua forma desnaturada ou bloqueada com 0,1M de galactose, não provocou alterações no teste do nado forçado, enquanto que a lectina na sua forma nativa manteve sua atividade pró-depressiva [ $F(4,27) = 10.68, P < 0.001$ ]. Além disso, não foram verificadas alterações na atividade locomotora dos animais promovidas por VML na sua forma nativa, bloqueada ou desnaturada [ $F(4,27) = 1.34, P = 0.25$ ] figura 12B.

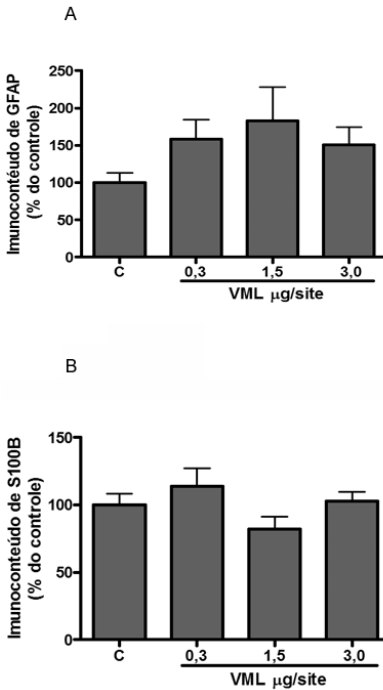




**Figura 12.** Efeito de VML na sua forma bloqueada ou desnaturada no teste do nado forçado (A) e teste do campo (B) 24 h após a administração i.c.v de VML. Valores expressos em média  $\pm$  E.P (n=5-8). \*\*\*p<0.001 quando comparado com o grupo controle; ###p<0.01, ###p<0,001 quando comparado com VML na sua estrutura nativa (Teste de Tukey). NAT: VML na sua estrutura nativa; VML Gal 0.1: VML bloqueada com galactose 0,1M; VML desn: VML com estrutura desnaturada; GAL 0,1M: Galactose 0,1M solução salina estéril.

### 5.6 Avaliação do Conteúdo de GFAP e S100B no hipocampo de camundongos 24 h após a administração i.c.v de VML.

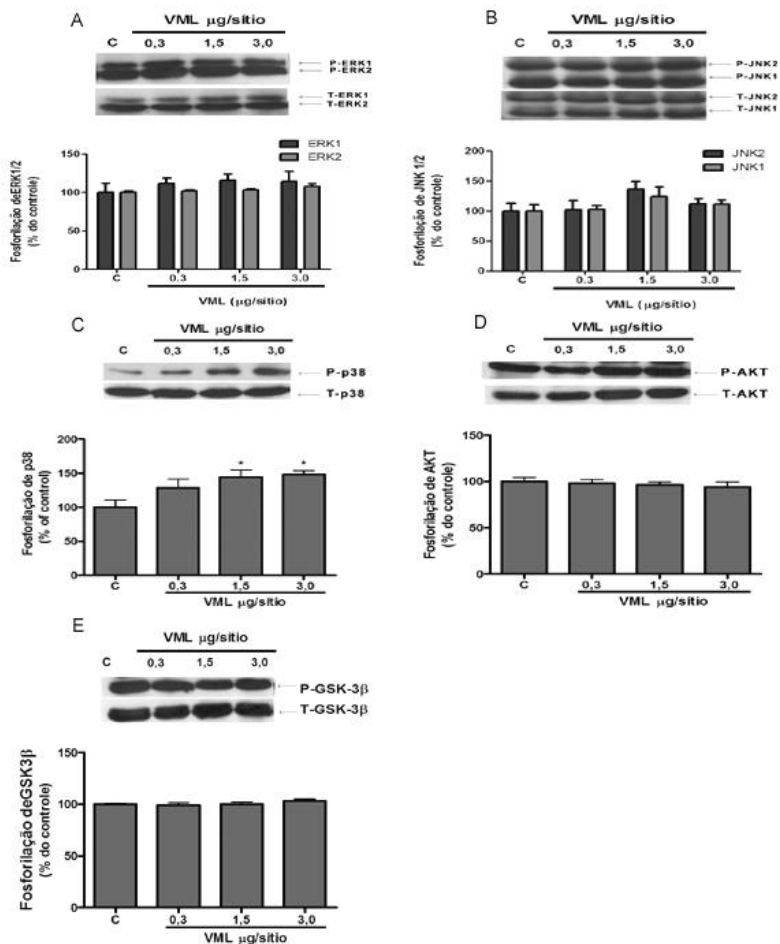
VML induziu o aumento no conteúdo hipocampal de GFAP e S100B 1 h após sua administração (Figura 8), contudo, 24 h após a administração de VML o conteúdo de GFAP [F(3,20)=1,4, p=0,29] e S100B [F(3,20)=1,8, p=0,18] foi similar ao controle (Figura 13). Estes achados sugerem um efeito transitório de VML sobre esses parâmetros.



**Figura 13.** Avaliação do imunoc conteúdo medido por ELISA de GFAP e S100B no hipocampo, 24 h após a administração i.c.v de VML. Valores expressos em percentual do controle. (Média  $\pm$  EP, n=5-6)

### 5.7 Modulação de MAPKs, AKT e GSK-3 $\beta$ , 24 h após a administração de VML.

Conforme demonstrado na figura 14, a fosforilação de ERK 1/2 (A), JNK 1/2/3 (B), p38MAPK (C), AKT (D) e GSK-3 $\beta$  (E) foi também avaliada 24 h após a administração de VML. Os resultados mostram que nesse período VML induziu um aumento de cerca de 40% na fosforilação de p38MAPK [F(3,12) = 4,766,  $p < 0,05$ ; Figura 14C]. A fosforilação das demais enzimas, como já observado em tempos anteriores (1 e 6 h), se manteve sem alteração em resposta ao tratamento com VML: ERK 1 [F(3,12) = 0,5057;  $p = 0,69$ ]; ERK2, [F(3,12) = 1,891;  $p = 0,1849$ ]; JNK 1 [F(3,12) = 1,054;  $p = 0,41$ ]; JNK2, [F(3,15) = 1,755;  $p = 0,21$ ]; AKT [F(3,12) = 0,3359;  $p = 0,80$ ]; GSK-3 $\beta$  [F(3,12) = 0,9086;  $p = 0,47$ ].



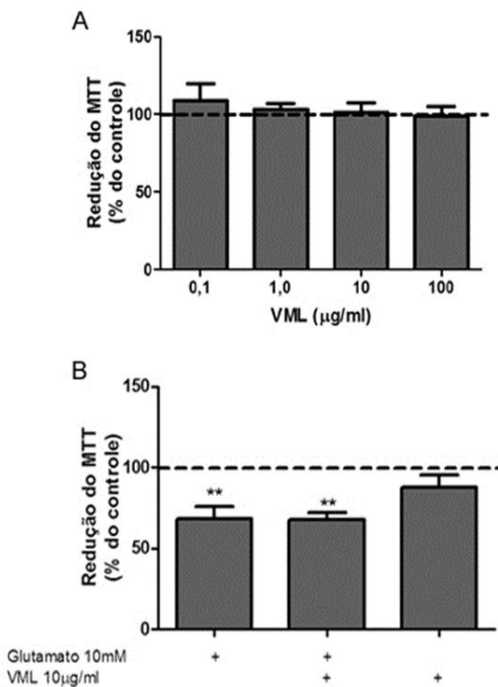
**Figura 14.** Avaliação por Western Blot da fosforilação de ERK 1/2 (A), JNK 1/2/3 (B), p38<sup>MAPK</sup> (C), AKT (D) e GSK-3 $\beta$  (E) no hipocampo de camundongos 24 horas após a administração i.c.v de VML. A fosforilação de cada proteína foi determinada pela razão entre a D.O. da banda fosforilada e D.O da banda total e os dados estão expressão em percentual do controle. Média  $\pm$  E.P (n=3-4). \* $p < 0,05$  em relação ao controle quando comparado ao grupo controle (Teste de Duncan).

### 5.8 Avaliação da viabilidade celular em fatias expostas a VML *in vitro*.

A utilização de fatias cerebrais é uma importante ferramenta no estudo de compostos com atividade neurotóxica ou neuroprotetora. O modelo de fatias mantém as conexões neuronais e com células da glia, além das interações dessas células a matriz extracelular de maneira muito similar aquelas observadas *in vivo*. Dados prévios de nosso grupo demonstraram que ConBr tem uma possível atividade neuroprotetora (Jacques et al., 2013).

A lectina VML (nas concentrações de 0,1-100µg/ml) não modificou a viabilidade celular de fatias hipocámpais expostas a essa lectina por um período de 6 h incubação (Figura 9) [F(4,34)=0,3440; p=0,85].

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório encontrado no SNC (Molz et. al., 2008). A exposição de fatias de hipocampo a concentrações altas desse aminoácido induz a morte celular, sendo que inibição deste efeito pode ser utilizada para caracterização de compostos com ação neuroprotetora. A incubação de fatias hipocámpais com glutamato (10 mM), produziu uma queda da viabilidade dessas fatias [F(3,23)=7,762; P<0,01], contudo VML não alterou a queda de viabilidade induzida pelo aminoácido.



**Figura 15.** Avaliação da viabilidade celular de fatias hipocâmpais expostas a VML. Em A é demonstrado o efeito de VML em diferentes concentrações (0,1-10 $\mu\text{g/ml}$ ) sobre a viabilidade das fatias, enquanto em B é demonstrado o efeito da lectina frente à excitotoxicidade glutamatérgica. \*\*= $p < 0,01$ . Resultados expressos em percentual do controle  $\pm$  E.P quando comparado ao grupo controle (Teste de Duncan).

## 6 DISCUSSÃO

Os carboidratos presentes nos glicoconjugados sobre a superfície celular têm sido amplamente reconhecidos como elementos fundamentais na comunicação celular. Entretanto, a compreensão dos mecanismos moleculares acionados pela interação dessas moléculas com ligantes específicos no SNC tem sido pouco estudada.

As lectinas são proteínas capazes de reconhecer resíduos específicos de carboidratos e dessa forma podem auxiliar na modulação de uma diversidade de respostas biológicas como neurogênese ou inflamação (Kleene & Schachner, 2004; Dube & Bertozzi, 2005; Ishii et al, 2007). No SNC dos mamíferos são encontradas lectinas com alta afinidade por  $\beta$ -galactosídeos, como a galectina-1, sendo que algumas respostas neuroprotetoras tem sido atribuída a essa lectina (Qu et al 2010; Qu et. al 2011).

As lectinas estão distribuídas em uma diversidade de organismos vivos, sendo muito abundantes nas plantas. Lectinas de plantas podem ser consideradas importantes ferramentas nos estudos de glicobiologia (Fay & Bowie, 2006). ConBr, uma lectina vegetal com especificidade para manose/glicose, foi capaz de promover atividade antidepressiva, inibir as convulsões induzidas por ácido quinolínico e proteger a morte celular *in vitro* induzida por glutamato em fatias hipocâmpais (Baraúna et. al, 2006; Russi et al., 2012; Jacques et al., 2013). No presente trabalho foi avaliada a atividade biológica sobre o SNC de VML, uma lectina vegetal com afinidade por  $\beta$ -galactosídeos similar a lectina cerebral galectina-1. Nossos resultados demonstraram de forma inédita que VML pode exercer efeitos potencialmente neurotóxicos embora tendo afinidade similar a uma lectina cerebral endógena que tem sido reconhecida pelo potencial neuroprotetor.

O teste do nado forçado é uma importante ferramenta no estudo dos compostos com atividade antidepressiva, uma vez que esses compostos diminuem o tempo de imobilidade dos animais, sinalizando o potencial efeito antidepressivo da substância estudada (Porsolt et al., 1977). Contudo, estudos recentes tem demonstrado que o teste do nado forçado também pode indicar comportamento do tipo depressivo, evidenciado pelo aumento do tempo de imobilidade, em resposta a uma diversidade de tratamentos (Cryan et al., 2003; O'Reilly et al., 2006; Brocardo et al., 2007). Nesse sentido, Kaster et al (2012) demonstraram que a administração i.c.v do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) pode induzir um comportamento do tipo depressivo, verificado pelo aumento

do tempo de imobilidade no TNF, efeito que ocorreu 1 h após a administração i.c.v. da citocina. No presente estudo verificamos que a administração i.c.v. de VML promoveu um aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado, sem alterar a atividade locomotora dos animais. Este efeito ocorreu 1 h após a administração da lectina e se manteve 24 h após (figuras 5 e 11). Desta maneira, VML induz um comportamento do tipo depressivo nos camundongos, indicando uma possível atividade deletéria sobre a função neural. No que tange a ação de lectinas no TNF, observa-se que ConBr uma lectina com afinidade por glicose/manose pode exercer um efeito do tipo antidepressivo (Baraúna et al., 2006), oposto ao observado em resposta a VML.

As lectinas formam uma classe distinta de proteínas pela sua capacidade de se ligarem a carboidratos e gliconjugados (Gorelik et al., 2001; Minko, 2004; Dube & Bertozzi, 2005). Galectina-1 é uma lectina expressa no SNC que apresenta efeitos neuroprotetores relacionados com a sua capacidade de reconhecer  $\beta$ -galactosídeos (Qu et al. 2010), uma vez que essa lectina pode reconhecer especificamente porções de N-acetilactosamina presentes em gliconjugados (Rabinovichi & Croci, 2012). Por sua vez, VML é definida como uma lectina que reconhece porções de galactose/N-acetilgalactosamina, mas que pode se ligar a porções de N-acetilactosamina (Ramos et. al., 2000), de maneira similar a galectina-1. Quando VML é dissolvida em solução de galactose 0,1 M os CRDs de VML ficam bloqueados com este açúcar, não estando disponíveis para ligação com seus alvos celulares (Alencar et al., 2004). As figuras 6 e 12 demonstram que as interações entre VML e carboidratos são essenciais para sua atividade biológica, uma vez que a administração i.c.v. de VML bloqueada com galactose não foi capaz de induzir alterações comportamentais em ambos os tempos estudados (1 e 24 h). Além disso, a perda da estrutura tridimensional nativa de VML também implica em perda da sua atividade biológica. Desta forma, o comportamento do tipo depressivo induzido por VML é dependente da sua conformação tridimensional nativa e da interação da lectina com carboidratos. Estes achados, comparados aos efeitos neuroprotetores promovidos por galectina-1, sugerem um possível papel duplo de lectinas com afinidade por galactose na função neural.

Estudos prévios demonstraram que a administração intraperitoneal de VML promove a migração de neutrófilos e que esta lectina tem a capacidade de ativar macrófagos a liberarem fatores quimiotáticos (Alencar et al., 2003; Alencar et. al 2007). Estes efeitos pró-inflamatórios parecem estar associados a atividade de certas

citocinas, como TNF- $\alpha$  e aparentemente não envolvem metabólitos produzidos pela enzima ciclooxigenase (Alencar et al., 2003; Alencar et al., 2007). Ciclooxigenase (COX) é uma importante enzima envolvida na resposta inflamatória tendo em vista que catalisa uma reação limitante na síntese prostaglandinas (Seibert et al., 1995). O aumento na expressão de COX-2 no SNC pode estar associado a neuroinflamação (Borre et al., 2012). Além disso, a excitotoxicidade glutamatérgica pode induzir a expressão dessa enzima em neurônios e células gliais (Borre et al., 2012). No que tange as doenças associadas ao comportamento depressivo, tem sido relatado um importante papel de COX-2 na fisiopatologia desses processos (Madrigal et al., 2003; Akhondzadeh et al. 2009; Cassano et al., 2006; Borre et al., 2012; Li et al., 2013). Nesse sentido, tem sido observado aumento na atividade desta enzima em modelos animais de estresse (Madrigal et al., 2003), e o uso de inibidores seletivos de COX-2 se mostrou eficiente, como tratamento adjuvante, para depressão (Akhondzadeh et al. 2009). No nosso estudo foi verificado um aumento significativo (cerca de 30%) na expressão de COX-2 no hipocampo 1 h após a administração i.c.v. de VML (Figura 7). Desta maneira, pode ser sugerida uma ação pró-inflamatória de VML via COX-2. Tendo em vista que aumento na atividade de COX-2 pode estar envolvida na neurobiologia da depressão, pode ser sugerido que as respostas inflamatórias mediadas por COX-2 poderiam mediar, pelo menos em parte, às alterações comportamentais observadas. Contudo, essa hipótese terá de ser confirmada em experimentos futuros. Além disso, para comprovar a atividade pró-inflamatória de VML, será importante a quantificação de citocinas como TNF- $\alpha$  e Interferon- $\gamma$  no hipocampo dos animais após administração de VML. Essa possível ação pró-inflamatória de VML tanto em tecidos periféricos como sobre o SNC é um achado relevante, pois algumas lectinas de leguminosas podem exercer efeitos distintos de acordo com a via de administração ou tipo de tecido exposto a lectina. ConBr, por exemplo, aparentemente não foi capaz de causar resposta neuroinflamatório, mas produziu uma atividade neuroprotetora sobre o hipocampo quando administrada por via i.c.v. (Russi et al., 2012). Por outro lado ConBr pode induzir respostas pró-inflamatórias quando administrada por via intraperitoneal (Bento et al., 1993).

Outro aspecto observado em nosso estudo é que VML estimulou a expressão de COX-2 no hipocampo, ação essa que difere do efeito de VML observado em resposta a administração intraperitoneal que pode desencadear um processo inflamatório de maneira independente da atividade de COX-2 (Alencar et al., 2003; Alencar et al., 2007). Desta



forma, os mecanismos envolvidos na resposta inflamatória promovida por VML podem ser diferentes no tecido cerebral quando comparados com seus efeitos em tecidos periféricos.

A neuroinflamação pode estar acompanhada de astrogliose, principalmente pela ativação dos astrócitos. A astrogliose é identificada pela hipertrofia e mudanças na morfologia dessas células, que irão depender da severidade do insulto (Sofroniew, 2009). O aumento na expressão de GFAP, um marcador específico dos astrócitos, pode ser interpretado como indicativo de astrogliose (Eng et al., 2000). Aumento na expressão de GFAP pode ser encontrado em doenças neurodegenerativas que cursam com neuroinflamação, como a doença de Alzheimer (Costa et al., 2012). Por outro lado, nos transtornos depressivos o seu conteúdo parece estar diminuído (Cotter et al., 2001; Rajkowska & Miguel-Hidalgo, 2007). Contudo, não se sabe se a degeneração da glia é causa ou consequência nesses processos (Hashioka, 2011). Além disso, antidepressivos, como a fluoxetina e venlafaxina, podem diminuir a astrogliose observada em condições neuroinflamatórias (Jin et al., 2009; Vollmar et al., 2009; Hashioka, 2011). Na dose de 3,0 µg/sítio, VML induziu um aumento significativo no conteúdo de GFAP medido por ELISA no hipocampo de camundongos adultos. Desta maneira a astrogliose observada após a administração de VML, pode ser um evento associado às respostas inflamatórias que a lectina pode induzir no hipocampo dos animais.

VML também induziu um aumento no conteúdo de S100B 1 h após a administração da lectina. De maneira similar, Ye et al. (2011) demonstraram que o comportamento do tipo depressivo induzido pelo estresse crônico (modelo animal de depressão) foi acompanhado pelo aumento da expressão de S100B. Adicionalmente, níveis séricos elevados de S100B são encontrados em pacientes com distúrbios de humor e em diversas doenças neurodegenerativas (Falcone, et al., 2010; Schroeter et al., 2011). S100B é capaz de estimular calcineurina, uma importante proteína fosfatase envolvida na regulação de diversas atividades neuronais e gliais (Leal, 2004). Nesse sentido, já foi demonstrado que a ativação de calcineurina pode estar envolvida na resposta inflamatória e ativação de astrócitos observada em doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (Norris et al, 2005). Portanto, um aumento na expressão de GFAP e S100B, poderia corroborar com a hipótese da resposta inflamatória induzida por VML.

Por outro lado, 24 h após a administração i.c.v. de VML, não foram encontradas alterações no conteúdo de S100B e GFAP no hipocampo dos camundongos tratados. Esses dados sugerem uma

alteração transitória nos níveis de S100B e GFAP promovida por VML. Entretanto, será fundamental avaliar nesse período de 24 horas, outros parâmetros relacionados à morte celular (ex. ativação de caspases) que poderiam indicar de forma conclusiva uma ação neurotóxica de VML.

Neste contexto, deve ser considerado que eventos de sobrevivência/morte celular, alterações comportamentais e respostas inflamatórias são em grande parte regulados por vias de sinalização dependentes das MAPKs (ERKs, JNKs e p38MAPKs) além de AKT/GSK (Thomas & Haganir, 2004; Kim & Choi, 2010, Galeotti & Ghelardini, 2011). As MAPKs, por exemplo, estão envolvidas na expressão do comportamento no teste do nado forçado (Galeotti & Ghelardini, 2011). Além disso, a fosforilação de GSK-3 $\beta$  pode estar associada com a expressão de COX-2 no hipocampo (Su et al, 2012). Nos períodos de 1 e 6 h após a administração de VML, não foram encontradas alterações na fosforilação de nenhuma dessas enzimas. Contudo a participação dessas vias de sinalização no efeito promovido por VML não pode ser totalmente excluída, pois as alterações dessas vias poderiam ocorrer em período inferior a 1 h. Apesar dessa possibilidade, observa-se que 24 h após a administração i.c.v de VML foi encontrado um aumento na fosforilação de p38<sup>MAPK</sup>. A fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> está frequentemente relacionada a estresse e morte celular e processos inflamatórios (Mielke & Herdegen, 2000; Cowan e Storey, 2003). Contudo visto que este efeito ocorreu em um período tardio, após a expressão de proteínas inflamatórias, não se pode afirmar que a fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> é responsável pelas respostas inflamatórias observadas. Nessa situação, a fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> poderia ser um efeito secundário pela liberação de mediadores inflamatórios e /ou neurodegeneração que pode ocorrer após a administração i.c.v de VML.

VML não reduziu a viabilidade de fatias hipocâmpais expostas *in vitro* a lectina. Apesar das vantagens desse modelo (Molz et al, 2008; Jacques et al., 2013), observa-se que no mesmo, a avaliação da viabilidade celular pode ser realizada após um período máximo de 6 h de incubação, o que poderia não ser suficiente para a detecção de queda na viabilidade celular VML-dependente. Além disso, a incubação das fatias com 10mM de glutamato induziu a queda da viabilidade, efeito este não alterado por VML.

## 7 CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstra de forma inédita que VML é capaz de induzir um comportamento do tipo depressivo e aumentar a expressão de proteínas relacionadas à inflamação e reatividade glial. Em conjunto podemos sugerir efeitos potencialmente tóxicos de VML sobre o hipocampo de camundongos, aparentemente envolvendo respostas neuroinflamatórias. Esses achados comparados às ações neuroprotetoras descritas para galectina-1, uma lectina com afinidade similar a VML, sugerem um papel duplo de lectinas com afinidade por  $\beta$ -galactosídeos na função neural.

## 8 PERSPECTIVAS

- Avaliar por técnicas de imunoistoquímica os aspectos morfológicos dos astrócitos no hipocampo 1 hora após o tratamento com VML.
- Realizar a quantificação de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e Interferon-Gama, no hipocampo de camundongos submetidos à administração i.c.v. de VML.
- Verificar o efeito de inibidores específicos da COX-2, e do efeito de citocinas inflamatórias no comportamento do tipo depressivo induzido por VML.
- Avaliar por técnicas de imunoistoquímica, a marcação com caspase-3 clivada, para verificar se VML pode induzir morte celular.
- Avaliação do efeito de VML na expressão de GFAP em fatias hipocámpais.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHONDZADEH, S.; JAFARI, S.; RAISI, F. et al. Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. *Depression and Anxiety*, v. 26, n. 7, p. 607–611, 2009.

ALENCAR, N. M. .; ASSREUY, A. M. .; ALENCAR, V. B. et al. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, n. 12, p. 1674–1681, 2003.

ALENCAR N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; CRIDDLE, D.N.; et al. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leucocyte infiltration. *Protein and Peptide Letters* v. 11, n. 2, p. 1-6, 2004.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; A.H.; BENEVIDES, R.G.; et al. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 374, p. 275-282, 2007.

ALMKVIST, J.; KARLSSON, A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J*, v. 19, p.575-581, 2004.

AMOR, S.; PUENTES, F.; BAKER, D.; VAN DER VALK, P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, v. 129, n. 2, p. 154–169, 2010.

ANDREASSON, K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. *Analysis and Function of Lipid Mediators in the Nervous System*, v. 91, n. 3–4, p. 104–112, 2010.

BARAUNA, S. C.; KASTER, M. P.; HECKERT, B. T. et al. Antidepressant- like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 85, n. 1, p. 160–169, 2006.

BEAULIEU, J.M. Not only lithium: regulation of glycogen synthase kinase-3 by antipsychotics and serotonergic drugs. *Int J Neuropsychopharmacol*, v.10, p. 3–6, 2007.

BENTO, C.A.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.; et al. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. *Agents Actions*. v.38, n.1-2, p. 48-54, 1993.

BICCA, M. A.; FIGUEIREDO, C. P.; PIERMARTIRI, T. C. et al. The selective and competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, (-)-6-phosphonomethyl-deca-hydroisoquinoline-3-carboxylic acid, prevents synaptic toxicity induced by amyloid- $\beta$  in mice. *Neuroscience*, v. 192, n. 0, p. 631–641, 2011.

BOEHM, S.; HUCK, S. Presynaptic Inhibition by Concanavalin A: Are  $\alpha$ -Latrotoxin Receptors Involved in Action Potential-Dependent Transmitter Release? *Journal of Neurochemistry*, v. 71, n. 6, p. 2421–2430, 1998.

BORRE, Y.; LEMSTRA, S.; WESTPHAL, K. G. C. et al. Celecoxib delays cognitive decline in an animal model of neurodegeneration. *Behavioural Brain Research*, v. 234, n. 2, p. 285–291, 2012.

BRAZIL, D. P.; YANG, Z.-Z.; HEMMINGS, B. A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 29, n. 5, p. 233–242, 2004.

BROCARDO, P. S.; ASSINI, F.; FRANCO, J. L. et al. Zinc Attenuates Malathion-Induced Depressant-like Behavior and Confers Neuroprotection in the Rat Brain. *Toxicological Sciences*, v. 97, n. 1, p. 140–148, 2007.

BROCARDO, P. DE S.; BUDNI, J.; LOBATO, K. R.; KASTER, M. P.; RODRIGUES, A. L. S. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *European Journal of Pharmacology*, v. 598, n. 1–3, p. 37–42, 2008.

BROWN, A. M.; RANSOM, B. R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, v. 55, n. 12, p. 1263–1271, 2007.

BUDNI, J.; GADOTTI, V.M.; KASTER, M.P.; et al. Role of different types of potassium channels in the antidepressant-like effect of

agmatine in the mouse forced swimming test. *European Journal of Pharmacology*, v 575, n.1, p.87–93, 2007.

BROWN, A. M.; RANSOM, B. R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, v. 55, n. 12, p. 1263–1271, 2007.

BUDNI, J.; ZOMKOWSKI, A. D.; ENGEL, D. et al. Folic acid prevents depressive-like behavior and hippocampal antioxidant imbalance induced by restraint stress in mice. *Experimental Neurology*, v. 240, p. 112–121, 2013.

CALVETE, J. J.; SANTOS, C. F.; MANN, K. et al. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of *Vatairea macrocarpa* seeds. *FEBS Letters*, v. 425, n. 2, p. 286–292, 1998a.

CALVETE, J. J.; SANTOS, C. F.; MANN, K. et al. Primary structure and post-translational processing of *Vatairea macrocarpa* seed lectin. *Journal of Protein Chemistry*, v. 17, p. 545–547. 1998b

CALVETE, J.J.; THOLE, H.H.; RAIDA, M.; et al. Molecular characterization and crystalization of Diocleinae lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1430, p. 367 – 375, 1999.

CAVADA, B.S.; SANTOS, C.F.; GRANGEIRO, T.B.; et al. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* duke. *Phytochemistry*. 1998; 49(3):675–80, 2010.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA S, GRANGEIRO T.B.; et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr Protein Pept Sci* v.2, p. 123-135, 2001.

CASSANO, P.; HIDALGO, A.; BURGOS, V.; ADRIS, S.; ARGIBAY, P. Hippocampal upregulation of the cyclooxygenase-2 gene following neonatal clomipramine treatment (a model of depression). *Pharmacogenomics J*, v. 6, n. 6, p. 381–387, 2006.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, v. 410, n. 6824, p. 37–40, 2001.

COSTA, A. P.; TRAMONTINA, A. C.; BIASIBETTI, R. et al. Neuroglial alterations in rats submitted to the okadaic acid-induced model of dementia. *Behavioural Brain Research*, v. 226, n. 2, p. 420–427, 2012.

COWAN, K. J.; STOREY, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *Journal of Experimental Biology*, v. 206, n. 7, p. 1107–1115, 2003.

CRYAN, J. F.; HOYER, D.; MARKOU, A. Withdrawal from chronic amphetamine induces Depressive-Like behavioral effects in rodents. *Biological Psychiatry*, v. 54, n. 1, p. 49–58, 2003.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry*, v. 9, n. 4, p. 326–357, 2004.

COTTER, D.; MACKAY, D.; LANDAU, S.; et al. Reduced glial cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*; v. 58, n.6, p.545-53, 2001.

DANI, N.; BROADIE, K. Glycosylated synaptomatrix regulation of trans-synaptic signaling. *Developmental Neurobiology*, v. 72, n. 1, p. 2–21, 2012.

, M. A.; CROCI, D. O. et al. Linking the Structure and Thermal Stability of  $\beta$ -Galactoside-Binding Protein Galectin-1 to Ligand Binding and Dimerization Equilibria. *Biochemistry*, v. 49, n. 35, p. 7652–7658, 2010.

DONATO, R.; SORCI, G.; RIUZZI, F. et al. S100B's double life: Intracellular regulator and extracellular signal. 10th European Symposium on Calcium, v. 1793, n. 6, p. 1008–1022, 2009.

DUBE, D. H.; BERTOZZI, C. R. Glycans in cancer and inflammation potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov*, v. 4, n. 6, p. 477–488, 2005.



ENDO, T. Glycans and glycan-binding proteins in brain: galectin-1-induced expression of neurotrophic factors in astrocytes. *Curr Drug Targets*, v.6, p.427-436, 2005.

ENG LF, GHIRNIKAR RS, LEE YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res*, v.25 p.1439–51, 2000.

EVERTS I, VILLMANN C, HOLLMANN M. N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Mol Pharmacol*, v.52 p. 861-873, 1997.

FALCONE, T.; FAZIO, V.; LEE, C.; et al., Serum S100B: A Potential Biomarker for Suicidality in Adolescents? *PLoS ONE*,; v.5, n.6, p. e11089, 2010.

FAY, A.-M. L.; BOWIE, D. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. *The Journal of Physiology*, v. 572, n. 1, p. 201–213, 2006.

FREITAS, A. E.; BUDNI, J.; LOBATO, K. R. et al. Antidepressant-like action of the ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 34, n. 2, p. 335–343, 2010.

GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C. Regionally selective activation and differential regulation of ERK, JNK and p38 MAP kinase signalling pathway by protein kinase C in mood modulation. *Int J Neuropsychopharmacol* v. 15 p.781-793, 2011.

GEE, J. R.; KELLER, J. N. Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein E. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 37, n. 6, p. 1145–1150, 2005.

GONÇALVES CA, LEITE MC, NARDIN P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clin Biochem*, v. 41, p.755–63, 2008.

GORELİK, E.; GALILI, U.; RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, v. 20, p. 245-277, 2001.

GRAEBER, M. B.; LI, W.; RODRIGUEZ, M. L. Role of microglia in CNS inflammation. *Autoimmunity: Rheumatoid Arthritis & Multiple Sclerosis*, v. 585, n. 23, p. 3798–3805, 2011.

GRANGEIRO, T. B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J. J. et al. Molecular Cloning and Characterization of ConBr, the Lectin of *Canavalia Brasiliensis* Seeds. *European Journal of Biochemistry*, v. 248, n. 1, p. 43–48, 1997.

HANADA, M.; FENG, J.; HEMMINGS, B. A. Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *IPK'2003. Inhibitors of protein kinases and Workshop: Phosphoryl-transfer mechanisms*, v. 1697, n. 1–2, p. 3–16, 2004.

HARPER, S.J.; LOGRASSO, P. Signalling for survival and death in neurones: the role of stress-activated kinases, JNK and p38. *Cellular Signalling*, v. 13, n.5, p.299–310, 2001.

HASHIOKA S. Antidepressants and Neuroinflammation: Can Antidepressants Calm Glial Rage Down? *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 11, p. 555-564, 2011.

HAYAISHI O, MATSUMURA H. Prostaglandins and sleep. *Adv Neuroimmunol*. 1995; 5(2):211-6.

HORIE, H.; KADOYA, T. Galectin-1 plays essential roles in adult mammalian nervous tissues. Roles of oxidized galectin-1. *Glycoconj J*. v. 19 p. 79-89, 2004.

HOFFMAN, K. B.; KESSLER, M.; TA, J.; LAM, L.; LYNCH, G. Mannose-specific lectins modulate ligand binding to AMPA-type glutamate receptors. *Brain Research*, v. 795, n. 1–2, p. 105–111, 1998.

ISHII, A.; IKEDA, T.; HITOSHI, S.; Fujimoto I, Torii T, Sakuma K, Nakakita S, Hase S, Ikenaka K. Developmental changes in the expression of glycogenes and the content of N-glycans in the mouse cerebral cortex. *Glycobiology*, v.17 p.261-276, 2007.

ISHIBASHI, S.; KUROIWA, T.; SAKAGUCHI, M. et al. Galectin-1 regulates neurogenesis in the subventricular zone and promotes functional recovery after stroke. *Exp Neurol*, v. 207, n. 2, p. 302 – 313, 2007.

JACOBS, A. H.; TAVITIAN, B. Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 32, n. 7, p. 1393–1415, 2012.

JACQUES, A.V.; RIEGER, D.K.; MAESTRI, M.; et al. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. Artigo aceito para publicação no periódico *Neurochemistry International*, 2013.

JIN, Y.; LIM, C.M.; KIM, S.W.; et al. Fluoxetine attenuates kainic acid-induced neuronal cell death in the mouse hippocampus. *Brain Res*, v. 128, p.108-116, 2009.

JOHANSSON, D.; FALK, A.; MARCUS, M. M.; SVENSSON, T. H. Celecoxib enhances the effect of reboxetine and fluoxetine on cortical noradrenaline and serotonin output in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 39, n. 1, p. 143–148, 2012.

JOPE, R. S. Lithium and GSK-3: one inhibitor, two inhibitory actions, multiple outcomes. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 24, n. 9, p. 441–443, 2003.

JOPE, R.S.; ROH, M.S; Glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in psychiatric diseases and therapeutic interventions. *Curr Drug Targets*, v. 7, n. 11, p. 1421-34, 2006.

KAJITANI, K.; NOMARU, H.; IFUKU, M. et al. Galectin-1 promotes basal and kainate-induced proliferation of neural progenitors in the dentate gyrus of adult mouse hippocampus. *Cell Death Differ*, v. 16, n. 3, p. 417 – 427, 2009.

KASTER, M. P.; GADOTTI, V. M.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S. Depressive-like behavior induced by

tumor necrosis factor- $\alpha$  in mice. *Anxiety and Depression*, v. 62, n. 1, p. 419–426, 2012.

KIM, E. K.; CHOI, E.-J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1802, n. 4, p. 396–405, 2010.

KLEENE, R.; SCHACHNER, M. Glycans and neural cell interactions. *Nat Rev Neurosci*, v. 5 p. 195–208, 2004.

LAURSEN, S.E.; BELKNAP, J.K. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J Pharmacol Methods*. v.16, n. 4, p. 355–7. 1986.

LEAL, R. B.; FRIZZO, J. K.; TRAMONTINA, F. et al. S100B protein stimulates calcineurin activity. *NeuroReport*, v. 15, n. 2, 2004.

LEITE, M. C.; GALLAND, F.; BROLESE, G. et al. A simple, sensitive and widely applicable ELISA for S100B: Methodological features of the measurement of this glial protein. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 169, n. 1, p. 93–99, 2008.

LEKISHVILI, T.; HESKETH, S.; BRAZIER, M. W.; BROWN, D. R. Mouse galectin-1 inhibits the toxicity of glutamate by modifying NR1 NMDA receptor expression. *European Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 11, p. 3017–3025, 2006.

LI, Y.-C.; SHEN, J.-D.; LI, J. et al. Chronic treatment with baicalin prevents the chronic mild stress-induced depressive-like behavior: Involving the inhibition of cyclooxygenase-2 in rat brain. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 40, n. 0, p. 138–143, 2013.

LIN, S. S.; LEVITAN, I. B. Concanavalin a: a tool to investigate neuronal plasticity. *Trends in Neurosciences*, v. 14, n. 7, p. 273–277, 1991.

LOPES, M.W.; MAHATMA, F.S.S.; MELLO, N.; et al. Time-Dependent Modulation of Mitogen Activated Protein Kinases and AKT in Rat Hippocampus and Cortex in the Pilocarpine Model of Epilepsy. *Neurochem Res*, v. 37, p. 1868–1878, 2012.

MADRIGAL, J. L. M.; MORO, M. A.; LIZASOAIN, I. et al. Induction of Cyclooxygenase-2 Accounts for Restraint Stress-Induced Oxidative Status in Rat Brain. *Neuropsychopharmacology*, v. 28, n. 9, p. 1579–1588, 2003.

MARSCHAL, P.; REEBER, A.; NEESER, J.-R.; VINCENDON, G.; ZANETTA, J.-P. Carbohydrate and glycoprotein specificity of two endogenous cerebellar lectins. *Biochimie*, v. 71, n. 5, p. 645–653, 1989.

MARTÍNEZ, C.R.; CHANWAY, C.P.; ALBERTINI, A.V.; et al. The interaction of *Vatairea macrocarpa* and *Rhizobium tropici*: net H<sup>+</sup> efflux stimulus and alteration of extracellular Na<sup>+</sup> concentration. *FEMS Microbiol Lett*, v. 238, n. 1, p. 17-22, 2004.

MARTINS, A.M.C.; MONTEIRO, A.M.O.; HAVT, A.; et al. Renal effects induced by the lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 10, p. 1329-1334, 2005.

MAURICE, T.; LOCKHART, B. P.; PRIVAT, A. Amnesia induced in mice by centrally administered  $\beta$ -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. *Brain Research*, v. 706, n. 2, p. 181–193, 1996.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MIELKE, K.; HERDEGEN, T. JNK and p38 stress kinases — degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, v. 61, n. 1, p. 45–60, 2000.

MINKO, T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv Drug Deliv Rev*. v. 56, p. 491-509, 2004.

MOLZ S, DECKER H, DAL-CIM T. Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38 MAPK signaling. *Neurochem Res*, v. 33, p. 27-36, 2008.

NEUMANN, H.; KOTTER, M. R.; FRANKLIN, R. J. M. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*, v. 132, n. 2, p. 288–295, 2009.

NORRIS, C. M.; KADISH, I.; BLALOCK, E. M. et al. Calcineurin Triggers Reactive/Inflammatory Processes in Astrocytes and Is Upregulated in Aging and Alzheimer's Models. *The Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 18, p. 4649–4658, 2005.

O'BANION, M.K. Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*, v. 13, n.1, p. 45-82, 1999.

O'REILLY, K. C.; SHUMAKE, J.; GONZALEZ-LIMA, F.; LANE, M. A.; BAILEY, S. J. Chronic Administration of 13-Cis-Retinoic Acid Increases Depression-Related Behavior in Mice. *Neuropsychopharmacology*, v. 31, n. 9, p. 1919–1927, 2006.

PARTIN, K. M.; PATNEAU, D. K.; WINTERS, C. A.; MAYER, M. L.; BUONANNO, A. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron*, v. 11, n. 6, p. 1069–1082, 1993.

PEREA, G.; ARAQUE, A. Glial calcium signaling and neuron–glia communication. *Frontiers in calcium signalling*, v. 38, n. 3–4, p. 375–382, 2005.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther*, v. 229, p. 327-336, 1977.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* v. 83, p.346-356, 1977.

QU, W.-S.; WANG, Y.-H.; WANG, J.P.; et al. Galectin-1 enhances astrocytic BDNF production and improves functional outcome in rats following ischemia. *Neurochem Res*, v. 35, p. 1716-1724, 2010

QU, W.-S.; WANG, Y.-H.; MA, J.-F. et al. Galectin-1 attenuates astroglial-associated injuries and improves recovery of rats following focal cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*, v. 116, n. 2, p. 217–226, 2011.

RABINOVICH, G.A.; TOSCANO, M.A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol*, v. 9, p. 338-352, 2009.

RABINOVICH, G. A.; CROCI, D. O. Regulatory Circuits Mediated by Lectin-Glycan Interactions in Autoimmunity and Cancer. *Immunity*, v. 36, n. 3, p. 322-335, 2012.

RAIVICH, G.; BEHRENS, A. Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Progress in Neurobiology*, v. 78, n. 6, p. 347-363, 2006.

RAJKOWSKA, G.; MIGUEL-HIDALGO, J.J. Gliogenesis and glial pathology in depression. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, v. 6, p. 219-233, 2007.

RALL, J.M.; MACH, S.A.; DASH, P.K. Intrahippocampal infusion of a cyclooxygenase-2 inhibitor attenuates memory acquisition in rats. *Brain Research*, v. 968, n.2, p. 273-6, 2003.

ROSA, A. O.; KASTER, M. P.; BINFARÉ, R. W. et al. Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 32, n. 6, p. 1549-1556, 2008.

RAMOS, M.V.; BOMFIM, L.R.; CAVADA, B.S., et al. Further characterization of the glycan-binding specificity of the seed lectin from *Vatairea macrocarpa* and its dependence of pH. *Protein and Peptide Letters*, v. 7, p. 241-248, 2000.

RODRIGUES, A.L.; ROCHA, J.B.; MELLO, C.F. et al. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. *Pharmacol Toxicol*, v.79, p. 150-156, 1996.

ROTHERMUNDT, M.; PETERS, M.; PREHN, J. H. M.; AROLT, V. S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microscopy Research and Technique*, v. 60, n. 6, p. 614-632, 2003.

RUSSI, M.A.; VANDRESEN-FILHO, S.; RIEGER, D.K.; et al. ConBr, a Lectin from *Canavalia brasiliensis* Seeds, Protects Against

Quinolinic Acid-Induced Seizures in Mice. *Neurochem Res*, v. 37, p. 288-297, 2012.

SAKAGUCHI, M.; SHINGO, T.; SHIMAZAKI, T. et al. A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 103, n. 18, p. 7112 – 7117, 2006.

SAKAGUCHI, M.; IMAIZUMI, Y.; OKANO, H. Expression and function of galectin-1 in adult neural stem cells. *Cell Mol Life Sci*, v. 64, n. 10, p. 1254 – 1258, 2007.

SAKAGUCHI, M.; IMAIZUMI, Y.; SHINGO, T. et al. Regulation of adult neural progenitor cells by Galectin-1/beta1 Integrin interaction. *J Neurochem*, v. 113, n. 6, p. 1516 – 1524, 2010.

SAKAGUCHI, M.; ARRUDA-CARVALHO, M.; KANG, N. H. et al. Impaired spatial and contextual memory formation in galectin-1 deficient mice. *Molecular Brain*, v. 4, n. 1, p. 33, 2011.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANGEIRO, T. B.; CALVETE, J. J.; CAVADA, B. S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Letters*, v. 405, n. 1, p. 114–118, 1997.

SCHERER, W. J.; UDIN, S. B. Concanavalin A reduces habituation in the tectum of the frog. *Brain Research*, v. 667, n. 2, p. 209–215, 1994.

SCHROETER, M. L.; STEINER, J.; MUELLER, K. Glial pathology is modified by age in mood disorders — A systematic meta-analysis of serum S100B in vivo studies. *Journal of Affective Disorders*, v. 134, n. 1–3, p. 32–38, 2011.

SEIBERT, K.; MASFERRER, J.; ZHANG, Y.; Gregory S, Olson G, Hauser S, Leahy K, Perkins W, Isakson P. Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2. *Agents Actions Suppl*, v. 46, p. 41-50, 1995.



SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, v. 14, n. 11, p. 53R–62R, 2004.

SHIH, A. Y.; ERB, H.; SUN, X. et al. Cystine/Glutamate Exchange Modulates Glutathione Supply for Neuroprotection from Oxidative Stress and Cell Proliferation. *The Journal of Neuroscience*, v. 26, n. 41, p. 10514–10523, 2006.

SIMARD, M.; NEDERGAARD, M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Brain Water Homeostasis*, v. 129, n. 4, p. 877–896, 2004.

SOFRONIEW, M. V. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, v. 32, n. 12, p. 638–647, 2009.

SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 9, n. 1, p. 59–71, 2005.

STAROSSOM, S. C.; MASCANFRONI, I. D.; IMITOLA, J. et al. Galectin-1 Deactivates Classically Activated Microglia and Protects from Inflammation-Induced Neurodegeneration. *Immunity*, v. 37, n. 2, p. 249–263, 2012.

SU, H.-C.; MA, C.-T.; YU, B.-C. et al. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates anti-inflammatory property of fluoxetine. *International Immunopharmacology*, v. 14, n. 2, p. 150–156, 2012.

SWEATT, J. D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *Journal of Neurochemistry*, v. 76, n. 1, p. 1–10, 2001.

TEDDER, T. F.; STEEBER, D. A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. *The FASEB Journal*, v. 9, n. 10, p. 866–873, 1995.

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, v. 5, n. 3, p. 173–183, 2004.

TRAMONTINA, F., LEITE, M.C.; CERESER, K.; et al. Immunoassay for glial fibrillary acidic protein: Antigen recognition is affected by its phosphorylation state. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 162, n.1–2, p. 282–6, 2007..

VAN DER HEIDE, L. P.; RAMAKERS, G. M. J.; SMIDT, M. P. Insulin signaling in the central nervous system: Learning to survive. *Progress in Neurobiology*, v. 79, n. 4, p. 205–221, 2006.

VOLLMAR, P.; NESSLER, S.; KALLURI, S.R.; et al. The antidepressant venlafaxine ameliorates murine experimental autoimmune encephalomyelitis by suppression of proinflammatory cytokines. *Int. J. Neuropsychopharmacol*, v. 12, n. 4, 525-536, 2007.

VOLTERRA, A.; MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*, v. 6, n. 8, p. 626–640, 2005.

WAETZIG, V.; HERDEGEN, T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Festschrift dedicated to Prof. Manfred Zimmermann on the occasion of his 70th birthday*, v. 361, n. 1–3, p. 64–67, 2004.

WANG, D. D.; BORDEY, A. The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology*, v. 86, n. 4, p. 342–367, 2008.

YAMAGATA, K.; ANDREASSON, K.I.; KAUFMANN, W.E.; et al. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, v. 11, n. 2, p. 371-86, 1993.

YANG, R. Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*, v. 10, p. e17, 2008.

YE, Y.; WANG, G.; WANG, H.; et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression. *Neurosci Lett*, v. 26, n. 503 p. 15-19, 2011.

YUE, K.T.; MACDONALD, J.F.; PEKHLETSKI, R.; et al.  
Differential effects of lectins on recombinant glutamate receptors. *Eur J Pharmacol*, v. 291, p.229-235, 1995.

## 10 APÊNDICE

Artigo Científico submetido ao periódico Neurochemical Research

VML, a galactose-binding lectin extracted from *Vatairea macrocarpa* seeds, can induces neurotoxic effects.

Filipe Marques Gonçalves, Andiará Espíndola de Freitas, Tanara Vieira Peres, Débora Rieger Venske, Juliana Ben, Mariana Maestri, Ana Paula Costa, Ana Carolina Tramontina, Carlos Alberto Saraiva Gonçalves, Ana Lúcia Severo Rodrigues, Kyria S. Nascimento, Benildo Sousa Cavada and Rodrigo Bainy Leal.