



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**AValiação DO EFEITO NEUROPROTETOR DA LECTINA  
DE *Canavalia brasiliensis* (ConBr) FRENTE A  
NEUROTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA**

**MICHAEL ANDERSON RUSSI**

Florianópolis, novembro de 2010.



MICHAEL ANDERSON RUSSI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA LECTINA  
DE *Canavalia Brasiliensis* (ConBr) FRENTE À  
NEUROTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA**

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  
Co-orientadora: Profa. Dra. Carla Inês Tasca

Florianópolis, novembro de 2010.



## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida...

Aos meus pais por sempre acreditar em mim, pelo amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao Professor Dr. Rodrigo Leal, pelo voto de confiança, pela oportunidade de participar de seu grupo, pelos ensinamentos científicos e amizade que foram de grande valia durante o mestrado.

À Profa. Dra. Carla Tasca, por permitir a utilização de sua estrutura, pelas dicas e orientações necessárias ao desenvolvimento deste projeto.

À querida amiga Ana Paula Costa, pela sua dedicação e grande ajuda durante os experimentos, imprescindíveis para a realização deste projeto.

Ao meu grande amigo Samuel, pela ajuda e por me ensinar com paciência todos os detalhes da cirurgia estereotáxica, dos experimentos comportamentais, por acompanhar de perto e me apoiar durante a maioria dos experimentos.

À minha querida amiga Débora, pela amizade e parceria, com muito bom humor sempre me colocando “pra cima,” obrigado pela grande ajuda, fundamental para a concretização deste trabalho.

Ao meu grande amigo Fabrício pela amizade sólida de longa data, hospedagem e pelas dicas acadêmicas.

Ao meu amigo Fabiano, pela amizade construída ao longo da pós-graduação, pelas risadas e por compartilhar conosco sua experiência.

À minha noiva Talita pelo seu amor, compreensão e dedicação em todos os momentos.

Á minha filha por tornar a minha vida mais feliz!

A todos os meus amigos do laboratório e aos professores da pós-graduação o meu muito obrigado.



## LISTA DE ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclase  
AMPA: ácido alfa amino-3-hidróxi-5-metilisoxazole-propiónico  
AMPc: adenosina-5'-monofosfato cíclico  
ANOVA: análise de variância  
Ala: alanina  
Asp: aspartato  
BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro  
BSA: albumina sérica bovina  
CABO: lectina extraída das sementes de *Canavalia bonariensis*  
CaM: calmodulina  
CaMK-II e CaMK-IV: proteína cinase cálcio calmodulina dependente II e IV  
CBP: proteína de ligação ao CREB  
CFL: lectina extraída das sementes de *Cratylia floribunda*  
ConA: lectina concanavalina A  
ConBr: lectina extraída das sementes de *Canavalia brasiliensis*  
DAG: diacil glicerol  
DGuiL: lectina extraída das sementes de *Dioclea guianensis*  
Dviol: lectina extraída das sementes de *Dioclea violacea*  
GMPc: guanosina de monofosfato cíclico  
Gcs: Guanilato ciclase  
HEPES: ácido n-2-hidroxiethylpiperazina  
i.c.v.: intracerebroventricular  
i.p.: intraperitoneal  
MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno  
MAPKK: proteína cinase da MAPK  
mg: miligrama  
min: minuto  
ug: micrograma  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
nmol: nanomol  
NO: óxido nítrico  
NOS: óxido nítrico sintase  
PDE: fosfodiesterase  
PKA: proteína cinase A  
PKC: proteína cinase C  
PLC: fosfolipase C  
s.c.: subcutâneo  
SNC: sistema nervoso central  
TNF: teste do nado forçado



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01</b> - Estrutura global do tetrâmero de ConBr e a localização das quatro subunidades.....	20
<b>FIGURA 02</b> – Possível mecanismo de ação de ConBr envolvendo o sistema glutamatérgico no efeito antidepressivo observado no TNF.....	22
<b>FIGURA 03</b> - Representação esquemática de uma subunidade do receptor NMDA.....	25
<b>FIGURA 04</b> - Topologia transmembrana de receptores glutamatérgicos inonotrópicos (iGluR) .....	26
<b>FIGURA 05</b> - Classificação dos principais tipos de oligossacarídeos ligados a asparagina em receptores glutamatérgicos .....	27
<b>FIGURA 06</b> - Atividade anticonvulsivante da lectina ConBr no modelo de convulsões induzida pelo ácido quinolínico em camundongos.....	46
<b>FIGURA 07</b> - Escala de severidade, duração das convulsões e latência para o início da primeira crise convulsiva.....	47
<b>FIGURA 08</b> - Avaliação do potencial neuroprotetor da lectina ConBr desnaturada e da lectina ConBr-bloqueada com manose frente as convulsões produzidas pela administração de AQ.....	49
<b>FIGURA 09</b> - Comparação do efeito neuroprotetor entre as lectinas ConBr e ConA no modelo de convulsões induzida pelo AQ em camundongos.....	50
<b>FIGURA 10</b> - ConBr protege a morte celular induzida pelo AQ... ..	52
<b>FIGURA 11</b> - Fosforilação dos sítios de serina 845 e 831 da subunidade GluR1 do receptor AMPA em resposta ao AQ e reversão desse efeito por ConBr.....	54
<b>FIGURA 12</b> - Avaliação do efeito neuroprotetor de ConBr frente a neurotoxicidade do glutamato em modelo in vitro de fatias de hipocampo.....	55
<b>TABELA 1.</b> Escala quantitativa utilizada para se avaliar a severidade das crises induzidas pelo ácido.....	38



## RESUMO

Lectinas são proteínas com capacidade de ligação reversível a carboidratos ou glicoconjugados. No sistema nervoso central de mamíferos, lectinas com afinidade para manose/glicose ou galactose podem modular diversos aspectos da comunicação celular. ConBr, uma lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis* apresentou efeito antidepressivo no teste do nado forçado (TNF) em camundongos, envolvendo, pelo menos em parte, o sistema monoaminérgico. O presente estudo buscou investigar os efeitos neuroprotetores da lectina ConBr em modelos animais de toxicidade glutamatérgica. Os resultados demonstraram que ConBr (10µg/sítio, i.c.v) reduziu as crises tônico-clônicas induzidas pelo agonista de receptores NMDA, ácido quinolínic (AQ), produzindo um percentual de proteção de 58%. Adicionalmente, ConBr foi capaz de diminuir significativamente a severidade das convulsões, sem no entanto alterar a latência para a primeira convulsão nem o tempo de duração da crise convulsiva. O AQ produziu um aumento significativo na fosforilação dos sítios Ser-831 e Ser-845 da subunidade GluR1 de receptores AMPA, sendo essa ação bloqueada pelo pré-tratamento com ConBr. O efeito neuroprotetor de ConBr foi dependente de sua integridade estrutural bem como da sua capacidade de ligação à resíduos de oligossacarídeos. Os efeitos observados são aparentemente específicos desde que ConA, uma lectina que tem alta homologia com ConBr, não foi capaz de produzir atividade neuroprotetora. O AQ além de induzir convulsões também causa intensa morte celular no hipocampo 24 h após sua administração, medida pela incorporação de iodeto de propídio e o pré-tratamento com ConBr também bloqueou essa ação do AQ. A viabilidade celular também foi avaliada em um modelo *in vitro* de fatias hipocampais expostas a concentrações tóxicas de glutamato (1 e 10 mM) e medida através da redução do MTT. Neste modelo o glutamato reduz em cerca de 30% a viabilidade celular. O pré-tratamento com ConBr foi capaz de prevenir a queda de viabilidade, sendo a atividade neuroprotetora máxima observada na concentração de 10µg/ml e o IC50 de 7,2 µM. Em conjunto os dados sugerem que a lectina ConBr é capaz de exercer uma ação modulatória sobre receptores NMDA, inibindo sua atividade e dessa forma produzindo neuroproteção. Adicionalmente os dados corroboram com estudos anteriores que demonstram ação antidepressiva de ConBr no TNF via inibição de receptores NMDA.



## ABSTRACT

Lectins are proteins capable of reversible binding to carbohydrates or glycoconjugates. In the central nervous system of mammals, lectins with affinity for mannose/glucose or galactose can modulate several aspects of cellular communication. ConBr, a lectin isolated from seeds of *Canavalia brasiliensis* showed antidepressant effect in the forced swimming test in mice involving, at least in part, the monoaminergic system. This study investigates the neuroprotective effects of lectin ConBr in animal models of glutamatergic toxicity. The ConBr (10 µg/site, icv) showed a neuroprotective activity in the model of seizures induced by quinolinic acid (QA), with a percentage of protection around 58%. In this model ConBr was able to significantly decrease the severity of the seizures, but without changes in the latency to first convulsion and the duration of the seizures. This effect was dependent on the structural integrity of the protein and its binding capacity and recognition of residues of oligosaccharides. The lectin ConA on this model showed no neuroprotective activity. Besides protecting mice from QA-induced seizures, ConBr was able to protect hippocampal cell death caused by QA, which was measured by propidium iodide incorporation. Cell viability was also assessed in a model of slices exposed to toxic concentrations of glutamate and measured by MTT reduction. In this model, glutamate was able to reduce cell viability around 30%. Pretreatment with ConBr was able to reverse the decline in viability to values around 88%. A maximum neuroprotective concentration obtained was 10 µg/ml and the lectin presented an IC<sub>50</sub> of 7.2 mM. In the model of seizures induced by QA, ConBr was able to prevent the phosphorylation sites in serine 845 and 831 on AMPA GLUR1 subtype receptor. These data suggest that the lectin ConBr is able to exert a modulatory action on NMDA receptors in order to inhibit its activity, this effect may also be involved in the mechanism of antidepressant action of ConBr in the forced swimming test.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 LECTINAS.....	17
1.1.1 Lectina das sementes .....	19
1.2 TRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA.....	23
1.2.1 Glicosilação de receptores glutamatérgicos.....	25
1.2.2 Morte celular e excitotoxicidade.....	29
1.2.3 Ácido Quinolínico.....	30
1.2.4 Fosforilação de receptor tipo AMPA .....	32
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	34
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 OBJETIVO GERAL .....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
4.1 ANIMAIS .....	36
4.2 DROGAS E REAGENTES .....	36
4.3 PURIFICAÇÃO DAS LECTINAS E PRODUÇÃO DA CONBR DESNATURADA E CONBR CONJUGADA À MANOSE .....	37
4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	37
4.5 CONVULSÕES COM ÁCIDO QUINOLÍNICO.....	38
4.6 OBTENÇÃO DOS HIPOCAMPOS .....	39
4.7 PREPARO DE FATIAS HIPOCAMPAIS.....	39
4.8 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR UTILIZANDO O IODETO DE PROPÍDIO.....	39
4.9 DETERMINAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR FRENTE À TOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA <i>IN</i> <i>VITRO</i> .....	40
4.10 PREPARO DOS HOMOGENATOS.....	41
4.11 DOSAGEM DE PROTEÍNAS .....	41
4.12 “WESTERN BLOT”.....	42
4.12.1 Separação de proteínas (eletroforese) .....	42
4.12.2 Eletrotransferência .....	43
4.12.3 Imunodeteção .....	43
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
<b>5 RESULTADOS</b> .....	45
5.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA LECTINA CONBR NO MODELO DE CONVULSÕES INDUZIDA PELO ÁCIDO QUINOLÍNICO EM CAMUNDONGOS .....	45

5.3 AÇÕES DA LECTINA CONBR DESNATURADA E CONJUGADA À MANOSE NO MODELO DE CONVULSÕES INDUZIDA PELO ÁCIDO QUINOLÍNICO EM CAMUNDONGOS.....	48
5.4 COMPARAÇÃO DO EFEITO DAS LECTINAS CONBR E CONA NO MODELO DE CONVULSÕES INDUZIDA PELO ÁCIDO QUINOLÍNICO EM CAMUNDONGOS .....	49
5.5 QUANTIFICAÇÃO DE MORTE CELULAR EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO MODELO DE CONVULSÃO INDUZIDA PELO ÁCIDO QUINOLÍNICO .....	51
5.6 ANÁLISE DA FOSFORILAÇÃO DOS SÍTIOS DE SERINA 845 E 831 DA SUBUNIDADE GLUR 1 DO RECEPTOR TIPO AMPA DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM AQ E MODULAÇÃO POR CONBR.....	53
5.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E CURVA DOSE-RESPOSTA DA LECTINA FRENTE À TOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA EM FATIAS DE HIPOCAMPO.....	54
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>

## INTRODUÇÃO

Estima-se que uma proporção de 0,5 a 1% do genoma de mamíferos traduzido participa na produção e/ou função de oligossacarídeos. Isso representa um comprometimento genômico com a biossíntese de glicoconjugados similar ao envolvido na fosforilação de proteínas, o que nos permite dimensionar a importância biológica desse processo. Em eucariotos, são observadas alterações no padrão de glicosilação de proteínas e lipídeos durante o desenvolvimento e diferenciação celular, além disso, também tem sido bem documentada a ocorrência de modificações desse processo em numerosos estados patológicos (Varki et al, 1999).

Em adição ao importante papel desempenhado pelos polissacarídeos e oligossacarídeos como reserva energética (amido, glicogênio) ou como componente estrutural (celulose, quitina, peptidoglicanos), estas moléculas também podem ser consideradas carreadores de informação, servindo de marcadores para algumas proteínas e também como mediadores de interações celulares específicas e interações entre as células e a matriz extracelular (Gahmberg & Tolvanen, 1996).

Carboidratos são responsáveis pela modulação de uma variedade de processos biológicos incluindo, desenvolvimento, diferenciação celular, interações patógeno-hospedeiro e a progressão de muitas doenças inclusive o câncer, (Uchiyama et al, 2008, Gabius, 2009).

Vivemos em uma era pós-genômica e no decorrer de uma demanda crescente por avanços no campo da glicômica, de evolução vagarosa quando comparada a genômica e a proteômica, devido à notável complexidade e diversidade presente nos oligossacarídeos de glicoproteínas e glicolipídeos (Katlíř 2010, Gabius, 2000).

### 1.1 Lectinas

Lectinas são proteínas que apresentam pelo menos um sítio de ligação não catalítico, pelo qual se ligam de forma reversível e específica a mono ou oligossacarídeos, sendo este sítio denominado domínio lectínico (Sharon & Lis, 1995).

Essa categoria de proteínas é amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontradas em animais, plantas e microorganismos. Nos animais e microorganismos elas podem servir para mediar o reconhecimento biológico de diversos eventos relacionados à comunicação celular, desenvolvimento, defesa, metástase tumoral, inflamação, etc (Cavada *et al.*, 2001). Além disso, em mamíferos, lectinas endógenas possuem a capacidade de regular funções neurais importantes (Cebo *et al.*, 2002; Endo, 2005; Lekishvili *et al.*, 2006).

Lectinas de plantas têm sido largamente utilizadas no estudo de mecanismos moleculares relacionado à fisiologia celular animal (Cavada *et al.*, 2001; Fay and Bowie, 2006) como produção de óxido nítrico e mecanismos de apoptose e proliferação celular (Andrade *et al.*, 1999; Cavada *et al.*, 2001).

Entre as lectinas de plantas mais estudadas estão as da família Leguminosae, principalmente aquelas isoladas de sementes da subtribo Diocleinae incluindo os gêneros *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*. Observa-se que as lectinas dessa família representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos (Cavada *et al.*, 2001).

A Concanavalina A (ConA), obtida das sementes de *Canavalia ensiformis* (Família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae), foi a primeira lectina a ser isolada, seqüenciada e teve sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raio-x. ConA é uma lectina D-glicose/D-manose específica e seu monômero contém 237 resíduos de aminoácidos (Cavada *et al.*, 2001).

ConA tem sido muito estudada e caracterizada quanto a sua estrutura e efeitos biológicos sobre diferentes sistemas. No sistema nervoso central (SNC) essa lectina tem sido utilizada como ferramenta no isolamento de glicoproteínas (Helmlolz *et al.*, 2003), e 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; Tasca *et al.*, 1999); neurexinas (Boehm & Huck, 1998); receptores nicotínicos (Kirpekar & Prat, 1978). Além disso, aspectos neuroquímicos e eletrofisiológicos envolvidos na neurotransmissão e da plasticidade do SNC também tem sido estudadas utilizando a lectina ConA (Lin & Levitan, 1991; Scherer & Udin, 1994; Boehm & Huck, 1998).

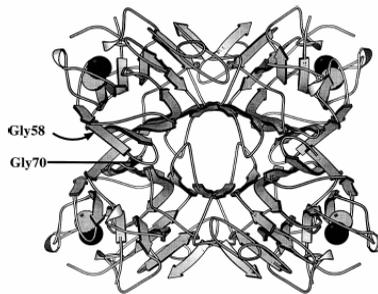
A partir do isolamento de ConA, várias outras lectinas com propriedades físicas similares têm sido purificadas e parcialmente caracterizadas de outras espécies da subtribo Diocleinae incluindo as lectinas de: *Canavalia brasiliensis*,

ConBr (Moreira & Cavada, 1984), *Canavalia bonariensis*, CABO (Cavada *et al.*, 1996), *Cratylia floribunda*, CFL (Oliveira *et al.*, 1991), *Dioclea guianensis*, DGuIL (Vasconcelos *et al.*, 1991), *Dioclea violacea*, DVioL (Moreira *et al.*, 1996), entre outras. Várias evidências têm demonstrado que apesar de terem alta homologia, ConA e as outras lectinas desta mesma subtribo apresentam importantes variações em seus efeitos biológicos (Cavada *et al.*, 2001). Isso tem sido relatado em relação a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos e produção de interferon- $\gamma$  (Barral-Netto *et al.*, 1992), estimular macrófagos peritoneais e reações de inflamação (Rodríguez *et al.*, 1992), induzir edema de pata e migração de células peritoneais em ratos (Bento *et al.*, 1993) e na promoção da liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos (Gomes *et al.*, 1994).

### 1.1.1 Lectina das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

ConBr, a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*, tem sua estrutura cristalográfica definida, apresentando 99% da seqüência de aminoácidos idêntica a de ConA e a mesma especificidade por glicose/manose (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997). Em tecidos periféricos os efeitos biológicos da ConBr incluem a estimulação da produção de NO por macrófagos (Andrade *et al.*, 1999), ativação ou produção de apoptose em linfócitos (Barbosa *et al.*, 2001) e estimulação da liberação de histamina em mastócitos (Lopes *et al.*, 2005).

Tem sido sugerido que substituições de aminoácidos fora do sítio de união de carboidratos podem ser responsáveis pela diferença na afinidade de ligação a açúcares e atividades biológicas das lectinas Diocleinae (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997; Grangeiro *et al.*, 1997). A estrutura cristalográfica de ConBr é representada abaixo (Figura 1) e mostra os resíduos de aminoácidos que variam em relação a ConA. Apenas dois resíduos de aminoácidos são substituídos e nenhum destes resíduos está próximo do sítio de ligação de carboidratos das lectinas (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997; Grangeiro *et al.*, 1997).



**FIGURA 1 - Estrutura global do tetrâmero de ConBr e a localização das quatro subunidades.** As posições dos resíduos de Gly 58 e Gly 70 em ConBr são substituídas por Asp e Ala em ConA, respectivamente. As esferas cinza e preta representam os metais de transição, Mn<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup>, respectivamente (Adaptado de Sanz-Aparicio et al., 1997).

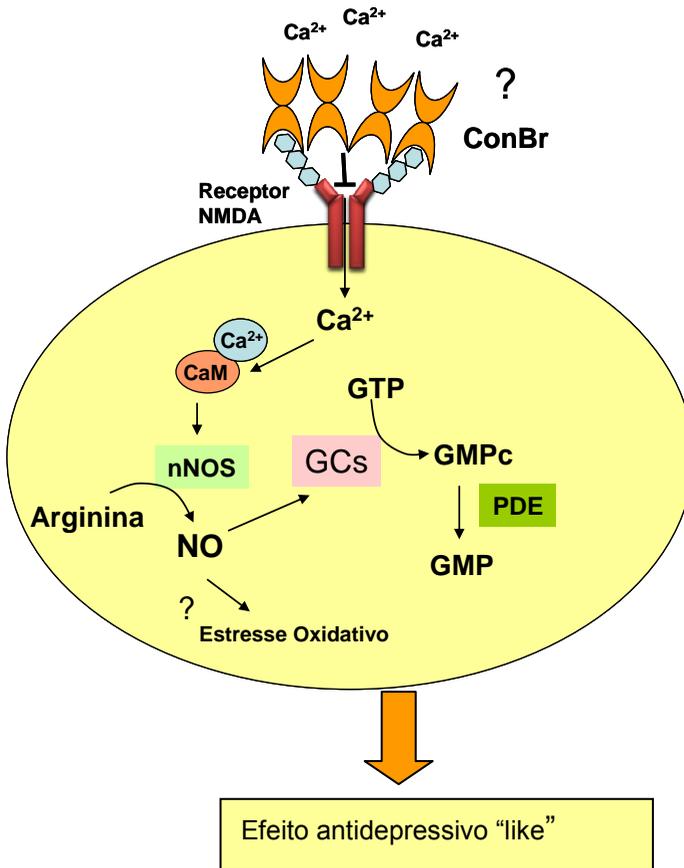
No que tange a modulação do sistema nervoso central (SNC) observamos em estudos prévios (Barauna et al., 2006) que ConBr (mas não ConA) é capaz de produzir uma modulação comportamental preditiva de ação antidepressiva em camundongos (avaliada através dos teste do nado forçado; TNF) quando injetada intracerebralmente (no ventrículo lateral). A ação de ConBr foi dependente da ativação dos sistemas serotoninérgicos (via 5HT1 e 5HT2), adrenérgico (via  $\alpha$ -adrenérgico) e dopaminérgico (via receptor tipo D2). Entretanto, estudos mais recentes (Costa et al, 2010; dados não publicados) também evidenciaram uma dependência do sistema glutamatérgico no mecanismo de ação antidepressivo de ConBr, baseado nas seguintes observações: 1) o pré-tratamento de camundongos com NMDA ou D-serina (agonistas dos receptores glutamatérgicos NMDA) reverteu a ação antidepressiva de ConBr no TNF; 2) a administração consecutiva de MK-801 (antagonista de receptor NMDA) e ConBr, ambos em doses sub-efetivas, produziram atividade antidepressiva; 3) o pré-tratamento com L-arginina (precursor de NO via a enzima NOS) ou Sildenafil (inibidor da PDE5, que acarreta aumento de GMPC) reverteu a ação antidepressiva de ConBr; 4) a administração consecutiva de ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel) e ConBr, ambos em doses sub-efetivas, produziram atividade antidepressiva; 5) nenhum dos tratamentos causou alteração na atividade

locomotora dos animais (medida através do teste do campo aberto).

Em conjunto estes resultados indicaram que o efeito antidepressivo de ConBr, verificado no TNF, poderia envolver a inibição de receptores NMDA, desencadeando uma diminuição do influxo de cálcio e portanto um inibição da via  $\text{Ca}^{2+}$ /NOS/NO/GMPc em resposta a lectina (ver figura 2). Na literatura existem vários exemplos em que a ativação dessa via está relacionada com a patogenia da depressão (Harkin et al., 1999; Sanacora et al, 2008).

Portanto, baseado nesse conjunto de evidências, desenvolvemos o presente estudo para caracterizar a possível modulação de receptores NMDA por ConBr mas agora utilizando um modelo diferente, o de convulsões induzida pelo ácido quinolínic, que é um potente agonista de receptores tipo NMDA.

Um outro aspecto demonstrado recentemente foi uma atividade analgésica de ConBr, quando administrada por via oral em camundongos, sendo este efeito aparentemente relacionado a sua ação sobre receptores opióides no sistema nervoso central (Pires, 2010) Dessa forma pode-se verificar múltiplas ações de ConBr sobre o SNC convergindo para modulação de diversos alvos da superfície celular.



**FIGURA 2.** Possível mecanismo de ação de ConBr envolvendo o sistema glutamatérgico no efeito antidepressivo observado no TNF. ConBr administrada i.c.v. foi capaz de exercer efeito antidepressivo no teste do nado forçado, possivelmente via inibição de receptores NMDA. Como consequência ConBr inibe o influxo de  $Ca^{2+}$ , a atividade de oxido nítrico sintase (NOS) e a produção de NO e GMPc.

## 1.2 Transmissão glutamatérgica

O aminoácido glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC de mamíferos (Attwell, 2000; Meldrum, 2000; Tapiero et al., 2002; Tzschentke, 2002). Muitos estudos realizados ao longo dos últimos anos têm comprovado o papel da transmissão glutamatérgica no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica fisiológica (fundamental nos processos de aprendizado e memória), bem como na neuroplasticidade patológica (envolvendo reorganização sináptica e morte celular) observados em processos como: isquemia, hipoglicemia, epilepsia, doenças neurodegenerativas, dependência e tolerância a drogas, dor neuropática, ansiedade e depressão (Meldrum, 2000; Ottersen & Mathisen, 2000).

As ações do glutamato são mediadas por duas classes de receptores: 1) ionotrópicos, que formam canais iônicos; 2) metabotrópicos, acoplados às proteínas G. Os receptores metabotrópicos são subdivididos em 3 grupos e podem agir através da ativação da fosfolipase C ou por modulação da enzima adenilato ciclase (Obrenovitch & Urenjak, 1997).

Os receptores ionotrópicos possuem propriedades farmacológicas e fisiológicas que os subdividem em três populações distintas farmacológica e funcionalmente: os ativados por N-metil-D-aspartato (NMDA), os que respondem ao ácido caínico (KA), e os sensíveis ao ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) (Michaelis, 1998).

Aos receptores AMPA e cainato é atribuída a neurotransmissão excitatória rápida e os canais formados por estes receptores são permeáveis primariamente aos íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ).

Os receptores NMDA consistem de um canal iônico central e diversos sítios de modulação pelos quais neurotransmissores e drogas podem interagir e afetar a atividade do receptor (McBain et al., 1994). Os receptores NMDA existem, primariamente, como complexos tetraméricos formados por duas subunidades NR1 e duas subunidades regulatórias NR2 ou NR3. Existem pelo menos oito variantes de “splicing” da subunidade NR1, quatro genes para a subunidade NR2 (NR2A, 2B, 2C e 2D) e dois genes para as subunidades NR3 (NR3A e NR3B). A combinação entre as subunidades determina as propriedades funcionais e vias de sinalização moduladas pelos receptores NMDA (Foster et al., 2010). No cérebro a composição NR1/NR2A ou NR1/NR2B são as mais abundantes. O sítio de

união para o glutamato encontra-se na subunidade NR2 enquanto o sítio para os co-agonistas glicina e D-serina encontram-se na subunidade NR1 (Sanacora et al, 2008).

A figura 3 mostra um modelo de uma subunidade do receptor NMDA que possui três segmentos transmembrana (M1, M2, M3), uma porção que forma uma reentrância na membrana (loop P), uma porção extracelular amino-terminal (DAT) e uma porção intracelular carboxi-terminal (DCT). A região extracelular de reconhecimento do agonista é composta pelos segmentos S1 e S2 da cadeia protéica (Stern-Bach et al, 1994). Adicionalmente observa-se um domínio amino-terminal composto por aproximadamente 400 resíduos de aminoácidos implicado na união das subunidades (Perez & Otano, et al 2001) e na modulação do receptor por prótons, poliaminas e zinco (Zheng et al., 2001; Furukawa e Gouaux, 2003).

No potencial de repouso, o canal do receptor NMDA é bloqueado pelo íon magnésio. Durante a transmissão sináptica, a ativação dos receptores NMDA requer a união de glutamato e seus co-agonistas em combinação com a despolarização do potencial de membrana para permitir a liberação do íon de magnésio para a abertura do canal (Cull-Candy et al., 2001; Waxman et al., 2005). Portanto, os receptores NMDA respondem mais lentamente ao glutamato, contribuindo com o componente lento das correntes pós-sinápticas excitatórias e sendo altamente permeáveis aos íons  $Ca^{2+}$ . Devido a essas propriedades, os receptores NMDA são implicados como responsáveis pelos processos que envolvem plasticidade, como aprendizado e memória. Além disso, em situações patológicas em que o glutamato se acumula no espaço extracelular os receptores NMDA são implicados na neurotoxicidade glutamatérgica, conhecida como excitotoxicidade (Meldrum, 2000).



**FIGURA 3** – Representação esquemática de uma subunidade do receptor NMDA. (Adaptado de Furukawa e Gouaux, 2003).

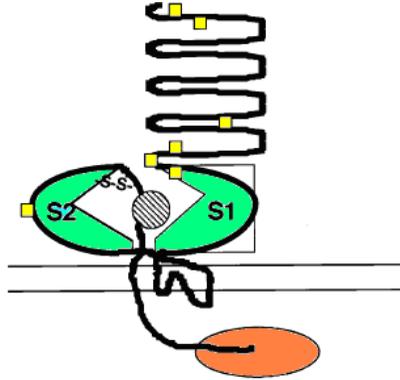
### 1.2.1 Glicosilação de receptores glutamatérgicos

Rambourg & Leblond (1967), afirmam que as sinapses são locais ricos em carboidratos, além disso, foi demonstrado que glicoproteínas presentes nesta região estariam potencialmente envolvidas na regulação da atividade sináptica no SNC (Mahler, 1979; Gurd, 1989; Wing, 1993). Nesse sentido estudos de união, utilizando lectinas como ferramentas, demonstraram que cadeias de oligossacarídeos associadas à glicoproteínas estão localizadas na fenda sináptica (Matus et al, 1973).

Os receptores presentes na superfície das células, incluindo os receptores para neurotransmissores, são em sua maioria glicoproteicos. A composição e a extensão dos oligossacarídeos presentes nestes receptores variam amplamente.

Os receptores glutamatérgicos são complexos macromoleculares glicoproteicos, compostos por subunidades distintas e que possuem em sua estrutura um percentual de glicosilação que varia de 8 a 24 % do total da massa molecular do

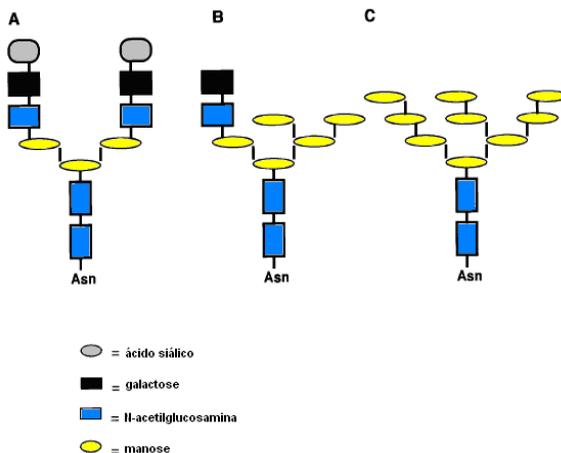
receptor (Hulebroek & Hampson, 1992). Na porção extracelular N-terminal, existem entre 4 e 12 sítios de glicosilação, os quais também contêm elementos essenciais para formação da região de interação com o ligante (Standley & Baudry, 2000).



**FIGURA 4.** Topologia transmembrana de receptores glutamatérgicos inotrópicos (iGluR). Os sítios de glicosilação estão indicados pelos quadrados em amarelo. (Adaptado de Standley & Baudry, 2000).

O tipo primário de glicosilação presente em todas as formas de iGluRs é ligado ao aminoácido asparagina e ocorre em uma sequência consenso universal de NX(S/T), onde N é o aminoácido asparagina, X um aminoácido qualquer (exceto prolina) e S/T serina ou treonina (Standley & Baudry, 2000).

Existem três categorias de cadeias laterais de carboidratos nos receptores glutamatérgicos, baseadas na composição de oligossacarídeos contituíntes: (a) cadeias complexas; (b) cadeias híbridas; (c) cadeias simples, com alta quantidade de manose (Fig. 5) (Jenkins et al, 1996; Standley & Baudry, 2000).



**FIGURA 5.** Classificação dos principais tipos de oligossacarídeos ligados a asparagina em receptores glutamatérgicos. As 3 principais classificações são: (A) complexa, (B) híbrida e (C) simples com alta quantidade de manose. (Adaptado de Standley & Baudry, 2000)

A glicosilação é capaz de influenciar diversas propriedades dos receptores glutamatérgicos, incluindo a atividade do canal e sua modulação por lectinas. Os receptores do tipo AMPA possuem entre quatro e seis, enquanto os receptores tipo kainato possuem entre oito a dez sítios de glicosilação.

A interação de ConA com resíduos de oligossacarídeos ligados a asparagina de receptores glutamatérgicos tipo AMPA tem sido bem demonstrada (Hullebroeck & Hampson, 1992; Partin et al., 1993; Vyklícky et al., 1991) e sugere que o bloqueio da dessensibilização destes receptores seja por um mecanismo capaz de estabilizar sua configuração aberta, bem como pela ligação cruzada da lectina com proteínas de membrana, além de sua estrutura heteromérica quaternária (Mayer & Vyklícky, 1989; Hullebroeck and Hampson, 1992). Além disso, observa-se que a dessensibilização de receptores glutamatérgicos pode ser bloqueada por lectinas como a aglutinina de gérmen de trigo (WGA) e ConA em células musculares de gafanhoto (Mathers & Usherwood, 1976), neurônios de invertebrados (Kehoe, 1978) e neurônios de mamíferos (Mayer & Vyklícky, 1989). A potencialização das correntes excitatórias sobre receptores glutamatérgicos nativos (Mathers, 1976; Mayer, 1989; Huettner,

1990; Wong, 1993; Thio 1993) e recombinantes (Geoffroy 1989; Yue 1995; Partin 1993), com uma pronunciada seletividade para receptores tipo kainato comparado aos receptores tipo AMPA também tem sido relatada.

Em membranas de cérebros de rato, ConA foi capaz de aumentar o “binding” de glutamato sobre receptores tipo AMPA. A magnitude deste aumento variou de 15% no córtex até 70% no hipocampo e diminuiu significativamente entre 3 semanas e 6 meses de idade. A lectina succinilada, condição em que se apresenta em sua forma dimérica, não aumentou o binding sobre receptores AMPA, este efeito também não foi observado quando utilizado receptores AMPA solubilizados. Neste mesmo estudo o aumento no binding não foi obtido em membranas purificadas de linhagens celulares de HEK293 expressando receptores AMPA em sua forma homomérica. Estes dados indicam que lectinas com especificidade para manose podem aumentar o binding por um mecanismo dependente da ligação cruzada de receptores AMPA ou da ligação destes receptores a proteínas específicas do cérebro (Hoffman, 1998).

No caso dos receptores tipo NMDA tem sido referido que a glicosilação é ainda mais extensa quando comparada aos outros tipos de iGluRs. Do total de 120 kDa da subunidade NR1 e 180 kDa da subunidade NR2B, cerca de 20 kDa se refere a resíduos de oligossacarídeos. No caso das outras subunidades NR2 10 kDa consistem de cadeias oligossacarídicas (Kawamoto et al., 1995; Laurie et al., 1997).

O papel da glicosilação sobre os receptores NMDA tem sido destacado em alguns estudos que demonstraram que o tratamento com um composto inibidor da N-glicosilação protéica (tunicamicina) foi capaz de reduzir a amplitude das correntes excitatórias para menos de 1% (Everts et al, 1997). Estes mesmos autores afirmam que a tunicamicina é capaz de abolir as correntes evocadas pelo glutamato. Em outro estudo foi concluído que o efeito da tunicamicina estava relacionado à interferência com a função do receptor (Chazot et al, 1995). Esses achados sugerem que a glicosilação desempenha importante papel na função do canal (Dingledine et al, 1999).

Alguns estudos têm sido realizados no sentido de caracterizar as cadeias de açúcares presentes nas subunidades de receptores NMDA. Nesse sentido, tem sido indicado que as subunidades NR1, bem como as subunidades NR2A/NR2B possuem alta quantidade de manose na sua porção extracelular (Huh, & Wenthold, 1999; Standley & Baudryb, 2000), sendo esse aspecto importante para a atividade do canal e sua modulação por lectinas (Machaidze & Mikeladze, 2001).

Clark e colaboradores (1998) demonstraram o isolamento de receptores tipo AMPA e também das subunidades NR2A, NR2B e NR1A de receptores NMDA a partir de junções sinápticas (SJs) e densidades pós-sinápticas (PSD) de cérebros de ratos, utilizando técnicas de cromatografia de afinidade por ConA. Esses dados confirmam a capacidade de ligação de ConA sobre esses receptores. Entretanto apesar de todas essas demonstrações deve também ser destacado que os efeitos envolvendo a modulação de receptores tipo NMDA pela ConA são contraditórios, sob esse aspecto vale ressaltar que as diferenças existentes na magnitude da potencialização de receptores NMDA devem-se a diferentes métodos de estudo (Yue, 1995; Geoffroy, 1989). No entanto Everts e colaboradores (1997), utilizando como modelo oócitos de sapo e receptores recombinantes, através de registros eletrofisiológicos demonstraram que a potencialização das correntes excitatórias em receptores tipo NMDA por ConA variava em função da subunidade estudada bem como de subtipos derivados de splicing alternativo.

Portanto, podemos observar na literatura um conjunto de trabalhos consistentes indicando a ligação e modulação de receptores glutamatérgicos por lectinas, especialmente ConA que tem alta afinidade por manose, como já citado anteriormente. Adicionalmente, dentre os receptores glutamatérgicos, pode-se claramente observar a modulação de receptores NMDA por ConA.

### **1.2.2 Morte celular e excitotoxicidade**

Excitotoxicidade pode ser definida como a morte celular resultante das ações tóxicas de aminoácidos excitatórios. Em virtude de o glutamato ser o principal neurotransmissor excitatório no SNC, a excitotoxicidade geralmente se refere ao dano e a morte de neurônios decorrente de exposição ao glutamato e associada ao influxo excessivo de  $Ca^{2+}$  para o interior da célula (Berliocchi et al, 2005). Este fenômeno é um fator comum a vários distúrbios neurológicos, incluindo acidente vascular cerebral (AVC), epilepsia, traumatismo crânio encefálico (TCE) e doenças neurodegenerativas (Obrenovitch &

Urenjak, 1997). O glutamato pode ser neurotóxico agindo em receptores NMDA, AMPA e, também em seus receptores metabotrópicos (Meldrum, 2000). No entanto, devido a sua elevada permeabilidade ao cálcio e incompleta dessensibilização o receptor NMDA é considerado o principal mediador da excitotoxicidade glutamatérgica (Olney, 1969; Choi, 1992; Rothstein, 1996).

A lesão excitotóxica resulta do excesso de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^{+}$  na célula através dos canais iônicos e pela ação suplementar da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos reservatórios intracelulares, levando a um aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Choi, 1987). Este  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ativa uma série de enzimas como proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintase e endonucleases que contribuem para a morte celular (Meldrum, 2000).

Portanto, a excitotoxicidade se refere a um processo no qual a célula nervosa responde inapropriadamente a concentrações elevadas de glutamato na fenda sináptica culminando com morte celular (Lynch et al., 2002). Essa morte pode ser de dois tipos: apoptótica ou necrótica (Bonfoco et al, 1995). Basicamente a apoptose é caracterizada por condensação citoplasmática e nuclear, clivagem do ácido desoxirribonucleico (DNA) intranuclear e subsequente fagocitose. Já a necrose é um processo no qual ocorre tumefação da mitocôndria e do retículo endoplasmático com ruptura celular e geração de resposta inflamatória (Hickey & Chesselet, 2003).

### 1.2.3 Ácido Quinolínico

O ácido quinolínico (AQ), metabólito endógeno do triptofano, encontra-se na natureza em muitos organismos, desde bactérias até humanos (Gholson, 1966; Isquith & Moat, 1966). Este composto tem sua origem na via das quinureninas e foi inicialmente estabelecido como um intermediário na síntese do ácido nicotínico e da nicotinamida adenina dinucleotídeo (Stone, 2001).

A sua importância no SNC foi inicialmente reconhecida quando o bioquímico russo Izyaslav Lapin (1978) realizou um experimento no qual seis quinureninas, DL-quinurenina, ácido quinolínico, ácido 3-hidroxi-antranílico, ácido xanturênico, ácido

picolínico, e o ácido nicotínico foram injetadas individualmente no ventrículo lateral de camundongos. Lapin observou que todas essas substâncias produziram excitação motora e/ou convulsões clônicas e dentre elas o metabólito com ação mais potente era o AQ. Posteriormente, Trevor Stone e Martin Perkins (1981) analisaram a ação excitatória do AQ e de seus análogos injetados em diferentes regiões do SNC e foram os primeiros a indicar a existência do subtipo de receptor hoje conhecido como NMDA. Estudos eletrofisiológicos revelaram que o AQ pode se unir aos sítios de união de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), principalmente no receptor NMDA, sendo um agonista excitatório (Stone & Perkins, 1981).

O mecanismo de toxicidade do AQ tem sido implicado em diversas condições patológicas do SNC, como as doenças de Huntington e Parkinson (Stone, 2001), na demência associada à infecção com HIV e na etiologia da epilepsia em humanos (Heyes et al, 1989; Heyes et al, 1990).

A convulsão causada pelo AQ deve-se a sua ação sobre os receptores NMDA, particularmente aqueles que contêm subunidades NR2B (Moroni, 1999; Schwarcz & Pellicciari, 2002). Os efeitos da ativação dos receptores NMDA envolvem o desequilíbrio da homeostase do íon cálcio intracelular e disfunção mitocondrial com redução dos níveis de ATP intracelular (Stone & Darlington, 2002; Naredo et al, 2005). Além disso, a toxicidade promovida pelo AQ pode envolver mecanismos de estresse oxidativo (Naredo et al., 2005). Alguns desses mecanismos incluem a formação de complexos entre o AQ e o íon ferro ( $Fe^{2+}$ ) que medeiam a geração de EROS, alteração do perfil de alguns antioxidantes endógenos, aumento da produção de espécies reativas de nitrogênio, com conseqüente peroxidação lipídica e carbonilação protéica (Santamaria et al, 2003; Metere et al, 2006;).

Além da atuação direta sobre os receptores NMDA, o AQ pode sobrecarregar o sistema glutamatérgico pela modulação do transporte de glutamato, desde que o AQ pode inibir a captação de glutamato tanto em preparações de vesículas sinápticas (Tavares et al, 2000) quanto em astrócitos em cultura (Tavares et al, 2002). Além disso, em sinaptossomas, AQ promove um aumento na liberação vesicular de glutamato (Tavares et al., 2002) e em animais submetidos à convulsões com AQ foi observado um aumento na captação e acúmulo de glutamato em vesículas sinápticas (Tavares et al., 2008). Desta forma, tem-se demonstrado que o AQ também pode ser utilizado como uma modelo de exacerbação do sistema glutamatérgico, o que está diretamente relacionado à sua excitotoxicidade.

### 1.2.4 Fosforilação de receptores tipo AMPA

O fenômeno conhecido como LTP, potenciação de longo prazo, é uma forma de plasticidade sináptica que tem sido muito estudada como um modelo eletrofisiológico envolvido na formação da memória em mamíferos (Cooke e Bliss, 2006). Este fenômeno resulta em um aumento da eficiência sináptica, que pode permanecer por horas, dias ou meses dependendo dos parâmetros e da frequência do estímulo (Meador, 2006). A LTP envolve a ativação de receptores NMDA. A despolarização do neurônio pós-sináptico libera o magnésio do receptor NMDA e então o glutamato pode ativar o receptor resultando no influxo de sódio e principalmente de  $\text{Ca}^{2+}$ . O íon cálcio combinado a calmodulina (CaM) pode ativar a proteína cinase cálcio calmodulina-dependente II (CaMKII). Além disso, o complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM pode ativar algumas isoformas de adelinato ciclase o que induz aumento do cAMP com ativação de proteína cinase A (PKA). Essas cinases por sua vez podem fosforilar o receptor AMPA, evento importante na fase inicial da LTP (Carvalho et al, 2000; Meador, 2006). Nesse sentido tem sido descrito que a subunidade GluR1 de AMPA pode ser fosforilada em 3 resíduos de serina localizados na porção intracelular C-terminal: serina 831, por PKC e CAMKII (Roche et al., 1996; Mammen et al. 1997), serina 818 por PKC (Boehm et al, 2006) e a serina 845 por PKA. Tem sido sugerido que a fosforilação das serinas 831 e 845 seriam responsáveis por mediar a expressão do fenômeno de LTP (Barria et al., 1997; Lee et al., 2000; Esteban et al., 2003). O uso de anticorpos específicos contra os sítios fosforilados Ser-831 e Ser-845 da subunidade GluR1 de AMPA demonstraram que ambos os sítios são fosforilados na indução da LTP na região CA1 do hipocampo (Lee et al., 2000). Da mesma forma quando a ativação de PKA está associada com estimulação dos receptores NMDA ocorre um aumento na incorporação dos receptores AMPA nas sinapses e indução de LTP (Oh et al., 2006). Estas evidências sugerem ser a fosforilação dos sítios de serina 845 e 831 da subunidade GluR1 de AMPA importantes para a inserção de AMPA na membrana plasmática e seu deslocamento até a região sináptica (Oh et al., 2006). Adicionalmente, tem sido bem documentado que a fosforilação da subunidade GluR1 pode também aumentar a condutância e probabilidade de abertura do canal contribuindo para a potenciação da sinapse (Derkach et al., 1999; Banke et al, 2000).

O aumento persistente da força da sinapse também pode ocorrer de forma patológica na epileptogênese ou como resultante do estado epiléptico, condição na qual o cérebro permanece em estado constante de crise convulsiva (Chen e Wasterlain, 2006). O desequilíbrio entre os mecanismos de controle inibitórios e excitatórios responsáveis pela manutenção sustentada da crise envolve uma diversidade de elementos sinápticos e de sinalização celular. Um destes elementos pode ser a ativação persistente de PKA e conseqüente aumento de fosforilação de Ser-845 da subunidade GluR1 de AMPA (Carvalho et al, 2000). Um estudo recente, utilizando o modelo de estado epiléptico induzido pela pilocarpina, demonstrou forte relação entre o estado epiléptico, aumento na atividade de PKA e fosforilação de Ser-845 sugerindo um possível envolvimento desse mecanismo com o estabelecimento de uma neuroplasticidade patológica nesse caso (Bracey, 2009).

## 2 Justificativa

Nos últimos anos estudos utilizando lectinas com alvos específicos para receptores presentes no SNC têm demonstrado resultados promissores em modelos experimentais e estratégias direcionadas ao reparo do dano cerebral e a neuroproteção frente à toxicidade glutamatérgica (Machaidze e Mikelaze, 2006; Sakaguchi et al, 2008;).

Na literatura está bem estabelecido que lectinas da família leguminosae com afinidade por manose/glicose podem ligar e modular a atividade de receptores glutamatérgicos em virtude da presença de cadeias de oligossacarídeos na porção extracelular destes receptores (Mayer & Vyklicky, 1989). Sabe-se que ConA, lectina com 99% de homologia a ConBr, é capaz de se ligar e alterar a atividade de receptores glutamatérgicos tipo NMDA, potencializando ou inibindo sua dessensibilização (Yue, 1995; Geoffroy, 1989).

Adicionalmente, ConBr compartilha mecanismo de ação similar a antidepressivos clássicos, dependente dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico (Baraúna et al, 2006). Além disso, dados não publicados de nosso grupo sugerem que o sistema glutamatérgico também poderia estar envolvido na ação tipo antidepressiva de ConBr. Nesse sentido salienta-se que o sistema glutamatérgico é reconhecido por possuir um papel importante na neurobiologia da depressão bem como em diversas condições patológicas agudas e crônicas no SNC (Sanacora et al, 2008)

Portanto, baseado em todo conjunto de evidências demonstrando que lectinas manose/glicose específicas podem modular o sistema glutamatérgico foi desenvolvido o presente estudo para analisar o potencial neuroprotetor de ConBr sobre a neurotoxicidade glutamatérgica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Investigar a ação neuroprotetora da lectina ConBr em modelos de neurotoxicidade glutamatérgica *in vivo* e *in vitro* em camundongos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- 1) Verificar o eventual efeito neuroprotetor da lectina ConBr frente às convulsões induzidas pelo ácido quinolínico;
- 2) Verificar a dependência da integridade estrutural de ConBr bem como do sítio de ligação a oligossacarídeos (CRD) para o efeito neuroprotetor;
- 3) Comparar o potencial neuroprotetor entre as lectinas ConA e ConBr no modelo de convulsões induzida pelo AQ;
- 4) Verificar se a infusão i.c.v. de ConBr é capaz de proteger a morte celular produzida pelo AQ sobre o hipocampo;
- 5) Verificar a capacidade de ConBr em reverter os efeitos do AQ sobre a fosforilação dos sítios de serina 845 e 831 da subunidade GluR1 de AMPA;
- 6) Avaliar o efeito neuroprotetor de ConBr frente à toxicidade glutamatérgica em modelo *in vitro*.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss com idade aproximada de 50 dias, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos a 21-22°C com água e comida à vontade, em ciclo claro/escuro de 12:12 h (iluminação das 7:00 às 19:00h), sendo manipulados e sacrificados de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pela CEUA/UFSC (PP0345).

### **4.2 Drogas e Reagentes**

Acrilamida, bis-acrilamida, ácido bórico, 2-mercaptoetanol, comassie blue R-250, kit de ECL, glicina, membrana de nitrocelulose, padrão de peso molecular, persulfato de amônia, ponceau, SDS, TEMED, Tris, Tween-20 e anticorpos secundários (anti-mouse e anti-rabbit) conjugados à peroxidase, foram obtidos da Amersham Pharmacia Biotech®. Álcool metílico, ácido acético, EDTA e sacarose foram obtidos da Nuclear®. Glicerol, Hidrato de Cloral e Paraformaldeído foram obtidos da Vetec®. Hidróxido de sódio foi adquirido da Merck®. Anticorpos anti-fosfo AMPA, Reagente de Folin, albumina de soro bovina (BSA), foram obtidos da Sigma. Soluções fixadora e reveladora para filmes de raio-x (GBx) e filmes radiográficos (ECL) para quimiluminescência foram obtidos da KODAK®.

### **4.3 Purificação das Lectinas e Produção da ConBr desnaturada e ConBr conjugada à Manose**

A lectina ConBr (Moreira e Cavada, 1984) e a lectina ConA (Summer e Howell, 1936) foram isoladas por cromatografia de afinidade. A diluição de ConBr ou ConA (2mg/ml) era realizada em tampão tampão HEPES-salina (124mM de NaCl, 4mM de KCl, 1,2mM de MgSO<sub>4</sub>, 25mM de HEPES e 1mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) e mantida a -20°C por até cerca de um mês. Para bloquear o sítio de ligação a açúcar, ConBr já diluída em tampão HEPES-salina foi incubada com manose (concentração final 100mM) durante 30 min a 37°C. Para produzir ConBr desnaturada, um microtubo (1,5 ml), contendo a solução de uso da lectina foi mantido por 5 min a temperatura de 100°C em banho fervente.

### **4.4 Procedimento Cirúrgico**

Os animais foram anestesiados com hidrato cloral a 7% administrado por via intraperitoneal (i.p.) (0,1ml/10g de peso por animal) e uma cânula guia foi implantada para infusão intracerebroventricular (i.c.v.) (Schmidt et al, 2000). Atingido o plano anestésico necessário para o procedimento, avaliado através da perda dos reflexos e relaxamento muscular, com o auxílio de um estereotáxico a pele do crânio foi removida e uma cânula guia de 30 G/7 mm foi implantada a 1 mm posterior ao bregma, 1 mm á direita da linha mediana, 1,5 mm abaixo do ventrículo lateral e fixada com cimento acrílico. Os experimentos foram realizados 72h após a realização da cirurgia. Para a verificação da localização correta da cânula guia e local de injeção das lectinas, após os experimentos, os animais receberam uma dose de corante (azul de metileno, 4 ul) via i.c.v e posteriormente foram decapitados, o cérebro retirado e seccionado no ponto de inserção da cânula guia para confirmação do local através de inspeção visual.

#### 4.5 Convulsões com Ácido Quinolínico

Para os experimentos relacionados à neuroproteção de ConBr in vivo, 72h após a implantação da cânula foi administrado i.c.v. 5 µl salina ou ConBr (1 ou 10 µg) através de uma agulha de 30 G/8 mm, introduzida pela cânula com o auxílio de uma microseringa. Após 15 min os animais receberam 4 µl ácido quinolínico (AQ; 9,2 mM ou seja, 36,8 nmol/sítio) ou salina. Os animais foram colocados em caixas de acrílico e observados por 10 min. A severidade das convulsões foi definida de acordo com escala desenvolvida por Vandresen-Filho e colaboradores (dados não publicados). (Tabela 1). A latência e duração das crises convulsivas tônicas ou clônico-tônicas também foram avaliadas.

Os animais pré-tratados com ConBr que não apresentaram as convulsões foram considerados protegidos. Os animais retornaram para a sua respectiva caixa e permaneceram por 24h para os estudos neuroquímicos e de viabilidade celular.

0	Sem resposta
1	Imobilidade + grooming e arranhadura excessiva
2	Andar em círculos e rearing
3	Wild running (“corrida selvagem”)
4	Jumping e Failing (saltos e quedas)
5	Contrações das patas com hipertonia da cauda
6	Convulsão tônico-clônica generalizada
7	Convulsão tônica generalizada e morte

**Tabela 1. Escala quantitativa utilizada para se avaliar a severidade das crises induzidas pelo ácido quinolínico.** Veículo ou ConBr (pré-tratamento) foi administrado via i.c.v 15 minutos antes da administração de ácido quinolínico. Os animais foram observados por 10 min para verificar a ocorrência de alterações comportamentais. Uma pontuação era atribuída de acordo com o comportamento mais severo observado.

#### 4.6. Obtenção dos Hipocampos

As estruturas foram dissecadas e mantidas a 4°C em solução isomolar de sacarose 0,32M diluída em Tampão Fosfato (PBS; 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,6 mM KCl, pH 7,4). Para a dissecação dos hipocampos, os cérebros foram colocados sobre uma placa de Petri invertida (4°C) recoberta com papel filtro umedecido com tampão. Em seguida os cérebros foram seccionados longitudinalmente e os hipocampos foram removidos com o auxílio de pincéis finos de pelo de marta.

#### 4.7. Preparo de fatias hipocampais

As fatias hipocampais foram preparadas conforme Leal et al., 1997 e Cordova et al., 2004. Após a retirada dos cérebros, os hipocampos foram dissecados e fatiados na espessura de 400µm, utilizando um fatiador de tecidos de McIlwain. As fatias foram isoladas, delicadamente, em tampão de dissecação (120mM de NaCl, 2mM de KCl, 10mM de MgSO<sub>4</sub>, 26mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1,18mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11mM de glicose, 200mM de sacarose e 1mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) utilizando pincéis. A seguir as fatias foram pré-incubadas durante 30min em tampão Krebs/Bicarbonato (120mM de NaCl, 2mM de KCl, 10mM de MgSO<sub>4</sub>, 26mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1,18mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11mM de glicose e 1mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) devidamente gaseificado com mistura carbogênica (95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>).

#### 4.8 Avaliação de morte celular utilizando o Iodeto de Propídio

O iodeto de propídio (IP) é um composto polar que entra apenas em células mortas ou com a membrana plasmática bastante danificada. Uma vez dentro das células, o PI complexa-se com o DNA e induz uma intensa fluorescência vermelha (630 nm) que é excitada por luz verde (495 nm) (Boeck *et. al.*, 2004).

Após o período de 1 hora de pré-incubação as fatias hipocampais foram incubadas por 30 minutos com IP (7 µg/ml) à 37° C e depois lavadas uma vez com o tampão KRB para a subsequente análise em microscópio de epifluorescência invertido, com filtro de rodamina. As fotos foram tiradas utilizando-se uma máquina fotográfica. As imagens foram capturadas e então analisadas usando um software Scion Image (<http://www.scioncorp.com>). A área fluorescente pela incorporação do IP (transformada em pixels) foi detectada e analisada usando a opção “density slice” do software Scioncorp através da divisão da fluorescência do IP pela área total da fatia. A intensidade do IP, determinando morte celular, foi expressa como porcentagem de fluorescência: % morte celular =  $Fd/F0 \times 100$ , onde Fd e a área da fatia hipocampal onde ha fluorescência pela captação do IP e F0 e a área total de cada fatia hipocampal (Frozza et al 2008).

#### **4.9 Determinação de viabilidade celular frente à toxicidade glutamatérgica *in vitro***

Este experimento foi realizado em placas de 24 poços, cada poço contendo uma fatia de hipocampo em volume final de 500µl. As fatias foram prepradas como descrito anteriormente e após a pré-incubação de 30 min em tampão Krebs/Bicarbonato as fatias hipocampais foram incubadas por 6 h em meio de incubação (120mM de NaCl, 2mM de KCl, 1,19mM de MgSO<sub>4</sub>, 26mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1,18mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 11mM de glicose e 1mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4, devidamente gaseificado em mistura carbogênica) /DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - low glucose, D5523 Sigma-Aldrich®) (diluição 1:1) e gentamicina (100µg/ml), conforme descrito por Molz et al,( 2008).

Os tratamentos foram divididos em fatias expostas ao veículo (tampão PBS; controle), glutamato (10mM; Glu), ConBr (10µg/ml; ConBr) e glutamato (10mM) juntamente com ConBr (10µg/ml) (Glu+ConBr). Após os tratamentos as fatias foram incubadas com MTT (brometo de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium= “Thiazolyl blue”; 0,5 mg/ml em tampão HEPES-salina) por 30 min a 37°C. O MTT é um sal de tetrazólio solúvel em água, o qual é convertido em um formazam púrpura por desidrogenases mitocondriais (LIU et al., 1997). O formazam

é solubilizado com a adição de dimetil sulfóxido (DMSO), formando um composto colorido cuja densidade óptica é medida em leitor de ELISA ( $\lambda=540$  nm). A atividade mitocondrial (viabilidade celular) é diretamente proporcional à capacidade redutora sobre o MTT (produção de cromógeno).

#### **4.10 Preparo dos Homogenatos**

Para preparo das amostras para avaliação de proteínas por western blotting os hipocampos foram homogeneizadas individualmente. Cada homogeneizado foi preparado a partir de um animal controle ou tratado com ConBr (n= 4–6) seguindo basicamente o protocolo descrito por Calloni et al, 2005. Resumidamente, os hipocampos foram homogeneizados em microtubos de polipropileno (volume de 1,5 ml) com pistilo de teflon utilizando tampão de homogeneização (50 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 2 $\mu$ g/ml de Aprotinina, 2mM de benzamidina, 0,1 mM de PMSF, 2 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100 mM de NaF, pH 7,0), na relação de 0,15 g de tecido/ml de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 rpm, por 10 min, 4°C, utilizando microcentrífuga refrigerada. O sobrenadante foi coletado e o “pellet” descartado. Alíquotas de 10 $\mu$ l foram recolhidas para dosagem de proteínas. O sobrenadante foi solubilizado em tampão de eletroforese relação (v/v) de 1/1 (concentração final – 4% de SDS, 50 mM de Tris, 100 mM de EDTA e 8% de - mercaptoetanol, pH 6,8) e a seguir mantido em banho fervente por 3 minutos. Posteriormente foi adicionada uma solução de glicerol (40% de glicerol, 25 mM de Tris e Azul de Bromofenol; pH 6,8) numa proporção de (v/v) 25  $\mu$ l solução de glicerol/100 $\mu$ l solução de amostra.

#### **4.11 Dosagem de Proteína**

O conteúdo protéico dos homogeneizados de hipocampo foi determinado pelo método de Peterson (1977). Resumidamente,

sobre alíquotas de 3 µl das amostras foram adicionados 397 µl de água e 400 µl do Reagente de Lowry (0,2 N de NaOH, 2,5 % de SDS, 5 % de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,2 % de CuSO<sub>4</sub> e 0,1 % de tartarato duplo de sódio e potássio). Após 10 minutos foi adicionado 40 µl do Reagente de Folin 0,4 N e as proteínas incubadas por 30 minutos. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro com um comprimento de onda de 750 nm, utilizando albumina de soro bovino (BSA) para a construção da curva padrão.

## 4.12 “Western Blot”

### 4.12.1 Separação de Proteínas (eletroforese)

As proteínas (60 µg/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (375 mM de Tris, 0,1 % de SDS, 0,06 % de TEMED e 0,036 % de persulfato de amônia; pH 8,8) e gel de entrada com 4 % de acrilamida/bis-acrilamida (125 mM de Tris, 0,1 % de SDS, 0,05 % de TEMED e 0,1 % de persulfato de amônia; pH 6,8) (Cordova *et al.*, 2004).

Para o preparo dos géis foi utilizado um sistema de eletroforese em mini-gel Amershan Pharmacia Biotech®, na espessura de 1 mm, contendo 10 poços.

Em cada placa adicionou-se o gel de separação e após a polimerização foi adicionado o gel de entrada. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 15 mA por placa e voltagem máxima de 140 V durante aproximadamente 2,5 h, em temperatura ambiente. Foram utilizados 250 ml de tampão superior por cuba (190 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1 % de SDS; pH 8,3) e 800 ml de tampão inferior (50 mM de Tris; pH 8,3). Após a corrida, foi realizada eletrotransferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose.

#### 4.12.2 Eletrotransferência

A eletrotransferência foi realizada através de uma cuba horizontal semi-dry da Amershan Pharmacia, modelo TE-70. Após a eletroforese o gel foi equilibrado em tampão de pré-transferência (25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 10 % de metanol e 10 % de SDS) sob agitação durante 30 min. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose, utilizando um “sanduíche” montado por papel filtro embebidos em tampão de transferência (25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 10 % de metanol), gel, membrana de nitrocelulose e novamente papel filtro embebidos em tampão de transferência. A eletro-transferência foi realizada em temperatura ambiente com uma corrente de 1,2 mA/cm<sup>2</sup> de gel e voltagem máxima de 40 V (Bjerrum e Heegaard, 1988).

Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com solução de Ponceau (solução 0,5% de Ponceau e 1% de ácido acético) para controle da eficiência da transferência (Cordova *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2002).

#### 4.12.3 Imunodeteção

Ao final da eletrotransferência as membranas foram lavadas com TBS (10 mM de Tris, 150 mM de NaCl; pH 7,5) durante 5 min para retirar a coloração do ponceau. As membranas foram então bloqueadas por 1h com leite desnatado Molico® 5 % em TBS à temperatura ambiente. (Bobrovskaya *et al.*, 2001; Cordova *et al.*, 2004). Após as membranas foram incubadas com os anticorpos primários sob agitação contínua. Anti-fosfo AMPA (ser845) (Sigma), 1:1.000 (40C , 12 h); anti-fosfo AMPA (ser831) (Sigma), 1:1.000 (40C , 12 h) após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) por 1h sob agitação e temperatura ambiente. Cada etapa foi seguida por lavagem com TBS-T (0,05 % de Tween-20, 10 mM de Tris, 150 mM de NaCl; pH 7,5), 3 vezes de 5 min cada . Os complexos imunes foram revelados através de kit ECL (quimiluminescência). A quantificação do imunocontéudo das proteínas foi realizada

através de densitometria com o auxílio do software Scion Image versão Beta 3.

#### **4.13 Análise Estatística**

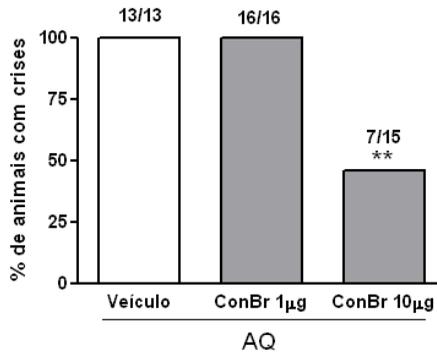
Os resultados obtidos foram avaliados através do teste de Fisher e ANOVA de uma via, seguida do teste de Newman-Keuls, quando apropriado. Os resultados foram considerados significativos quando obtido um valor de  $p < 0,05$ .

## 5 Resultados

### 5.1 Avaliação da atividade anticonvulsivante da lectina ConBr no modelo de convulsões induzida pelo ácido quinolínico em camundongos

Os camundongos, previamente canulados, receberam via intracerebroventricular (i.c.v) ConBr (nas doses de 1 e 10  $\mu\text{g/sítio}$ ) ou veículo (tampão HEPES sem glicose), 15 minutos antes da administração de ácido quinolínico (AQ). Após este período os animais foram colocados em uma caixa de acrílico e observados por 10 minutos para verificar a ocorrência de mudanças comportamentais (“jump”, “wild running”, convulsão tônico-clônica). Os animais que não apresentaram convulsões tônico-clônicas foram considerados protegidos.

Os resultados (Figura 6) mostram que o AQ promoveu convulsões tônico-clônicas em 100% dos animais pré-tratados com veículo (tampão HEPES sem glicose). Entretanto, o pré-tratamento com ConBr, na dose de 10  $\mu\text{g/sítio}$ , proporcionou uma redução significativa no número de animais que apresentavam convulsões tônico-clônicas em resposta ao AQ. A porcentagem de proteção foi de 58%, sendo um efeito significativo conforme avaliação através do teste exato de Fisher ( $p=0.006$ ). ConBr na dose de 1  $\mu\text{g/sítio}$  não exerceu efeito protetor contra as convulsões tônico-clônicas induzidas pelo AQ. Além disso, não foram observadas alterações comportamentais aparentes em resposta a administração de ConBr isoladamente (1 ou 10  $\mu\text{g/sítio}$ ) (dados não mostrados).



**Figura 06. Atividade anticonvulsivante da lectina ConBr no modelo de convulsões induzida pelo ácido quinolínico em camundongos.** Veículo ou ConBr (pré-tratamento) foi administrado via i.c.v 15 minutos antes da administração de ácido quinolínico (AQ). Os animais foram observados por 10 min para verificar a ocorrência de convulsão tônico-clônica. Os resultados representam o percentual de animais que convulsionam. \*\* $p < 0,01$  comparado com o grupo controle (veículo) avaliado pelo teste exato de Fischer.

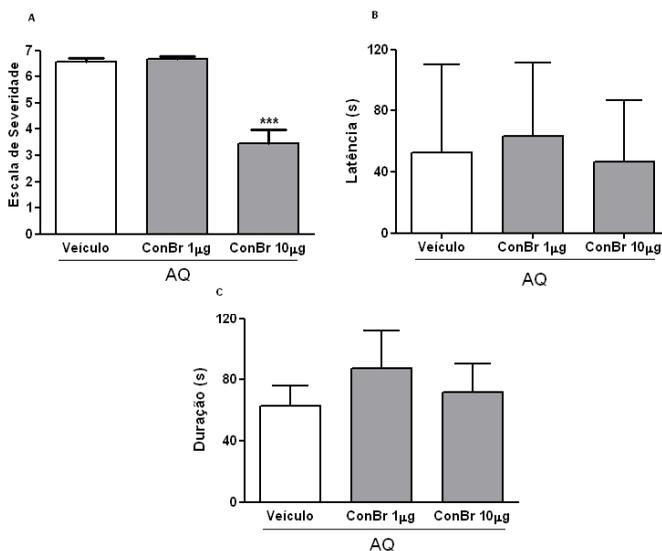
## 5.2 Avaliação dos efeitos da lectina ConBr sobre a severidade, latência e duração das convulsões induzida pelo ácido quinolínico em camundongos

Para obter uma avaliação mais precisa do efeito neuroprotetor da lectina ConBr utilizamos uma escala pré estabelecida de severidade das convulsões (Vandresen-Filho et al. 2010). Dessa forma, logo após a administração de AQ os animais foram observados por 10 minutos. Durante este período o comportamento era registrado e uma pontuação de 0 a 7 era atribuída de acordo com a severidade da crise convulsiva.

Na figura 7A é mostrado que o AQ sempre produzia convulsões tônico-clônicas em escala 6 ou 7. Este efeito não foi alterado pelo pré-tratamento com ConBr 1 µg/sítio. Entretanto, o pré-tratamento com ConBr 10 µg/sítio causou redução significativa na escala de severidade das crises que foram reduzidas para 0 (sem alteração comportamental) ou até no máximo 4. Observa-se que essa ação de ConBr foi significativa

$p < 0,001$  avaliado pela ANOVA de uma via, seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls.

Um outro parâmetro avaliado nos animais que apresentaram convulsões tônico-clônicas (escala 6) foi o tempo de latência para o aparecimento da primeira crise (Figura 7B) e o tempo de duração da crise convulsiva (Figura 7C). Os resultados mostram que não houve diferença entre os tratamentos tanto na latência quanto na duração da crise convulsiva.

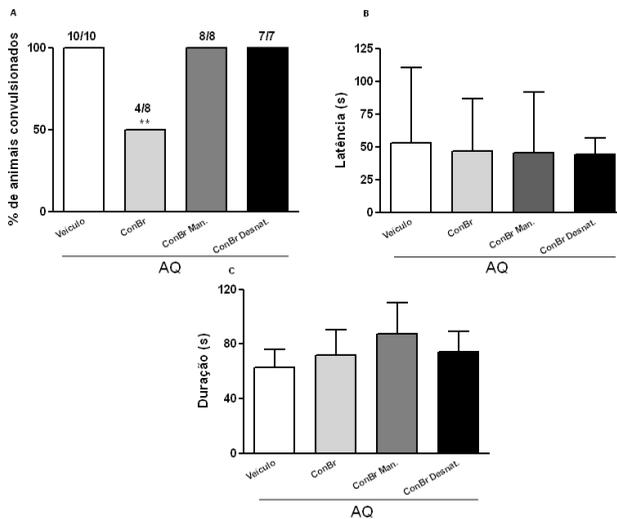


**Figura 07. Escala de severidade, duração das convulsões e latência para o início da primeira crise convulsiva.** Veículo ou ConBr (pré-tratamento) foi administrado via i.c.v 15 minutos antes da administração de ácido quinolínico. Os animais foram observados por 10 min para verificar a ocorrência de alterações comportamentais. (A) mostra a severidade das convulsões; (B) mostra o tempo em segundos de latência para o aparecimento de crise convulsiva tônico-clônica em escala 6; (C) mostra o tempo de duração da crise convulsiva tônico-clônica em escala 6. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão; \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o grupo veículo.

### **5.3 Ações da Lectina ConBr desnaturada e conjugada a manose no modelo de convulsões induzida pelo ácido quinolínico em camundongos**

Com o intuito de verificar a dependência da integridade da estrutura terciária e quaternária de ConBr na produção de seu efeito neuroprotetor, ConBr foi mantida durante 5 min a 90°C, afim de promover a sua desnaturação. A figura 8 mostra que ConBr desnaturada não foi capaz de proteger os animais das convulsões induzidas pelo ácido quinolínico.

Adicionalmente, foi testado a dependência do sítio de ligação a carboidrato (CRD) para o efeito neuroprotetor de ConBr frente as convulsões induzidas pelo AQ. Para isso foi utilizado ConBr conjugada ao açúcar ligante manose (ConBr-man). A administração de 10 µg/sítio de ConBr-man, da mesma forma que ConBr desnaturada, não foi capaz de proteger os animais frente as convulsões induzidas pelo ácido quinolínico. Portanto, o efeito neuroprotetor de ConBr no modelo de convulsões induzida pelo AQ depende da integridade estrutural da lectina e da disponibilidade do sítio de ligação a carboidrato (CRD).



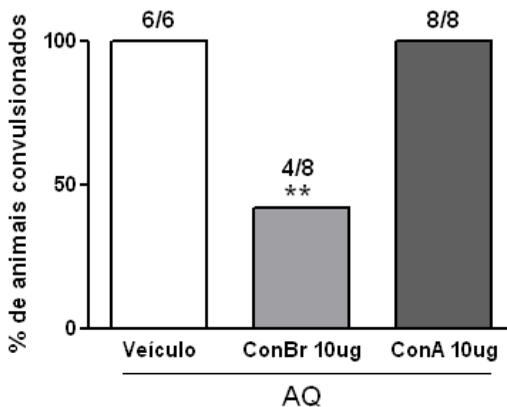
**Figura 08. Avaliação do potencial neuroprotetor da lectina ConBr desnaturada e da lectina ConBr-bloqueada com manose frente as convulsões produzidas pela administração de AQ.** Veículo, ConBr, ConBr bloqueada ou ConBr desnaturada com manose (pré-tratamento) foi administrado via i.c.v 15 minutos antes da administração de AQ. Os animais foram observados por 10 min para verificar a ocorrência de alterações comportamentais. (A) mostra a ocorrência de convulsão tônico-clônica e os valores representam o percentual de animais que convulsionam; (B) mostra o tempo de latência para o aparecimento de crise convulsiva tônico-clônica em escala 6; (C) mostra o tempo de duração da crise convulsiva tônico-clônica em escala 6. \*\* $p < 0,01$ ; comparado com os grupos tratados com ConBr bloqueada ou ConBr desnaturada.

#### 5.4 Comparação do efeito das Lectinas ConBr e ConA no modelo de convulsões induzida pelo ácido quinolínico em camundongos

Lectinas pertencentes à subtribo Diocleinae apresentam similaridades em suas estruturas multiméricas (Sanz-Aparicio et

al., 1997), adicionalmente a lectina de *Canavalia Ensiformis*, ConA, possui a capacidade de se ligar e modular a atividade de receptores do tipo NMDA, sendo que os efeitos dessa modulação podem variar em função da subunidades estudadas (Everts, 1997). Portanto, também foi investigado os efeitos da lectina ConA frente as convulsões induzidas pelo AQ. Os resultados demonstraram que diferentemente de ConBr, a lectina ConA não produziu atividade neuroprotetora, tendo em vista que não foi capaz de proteger os animais testados das convulsões produzidas pelo AQ (Figura 9).

Apesar de terem alta homologia, vários trabalhos demonstram que ConA e outras lectinas desta mesma subtribo apresentam importantes variações em termos de atividade biológica (Cavada et al., 2001).



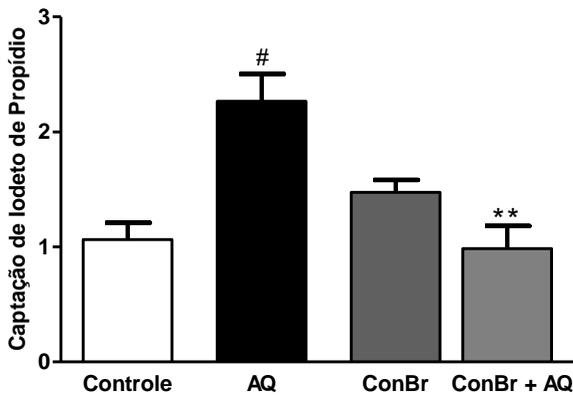
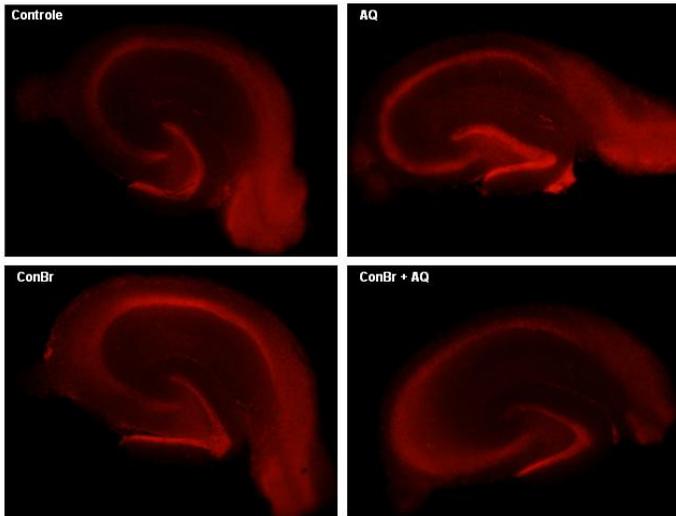
**Figura 09. Comparação do efeito neuroprotetor entre as lectinas ConBr e ConA no modelo de convulsões induzida pelo AQ em camundongos.** ConBr ou ConA foram administradas 15 minutos antes dos testes via i.c.v. Os resultados representam o percentual de animais que convulsionam. \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo tratado com ConA e avaliado pelo teste exato de Fischer.

## **5.5 Quantificação de morte celular em fatias de hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida pelo ácido quinolínico**

Atualmente, sabe-se que a administração intracerebro ventricular de AQ causa convulsões através da ação sobre os receptores NMDA, particularmente, aqueles que contêm subunidades NR2B (Moroni, 1999; Schwarcz & Pellicciari, 2002), nos quais se observa convulsões tônico-clônicas e morte neuronal nas diversas regiões hipocampais (Schmidt et al, 2000; Ganzella et al, 2006), sendo a necrose o tipo de lesão mais prevalente (Ferrer, 2001; Boeck et al, 2004).

Com o objetivo de verificar a possível capacidade da lectina ConBr em proteger as células hipocampais da morte celular induzida por AQ foi realizado o teste de incorporação de iodeto de propídio sobre fatias hipocampais. Nesse protocolo os animais eram pré-tratados com veículo ou com ConBr (10 µg/sítio) seguido (15 min após) da administração de AQ. Após isso os animais foram observados por 10 min e a seguir os mesmos retornaram para as caixas onde permaneceram por 24h. Nas células que ocorre perda da integridade da membrana celular existe maior entrada do iodeto de propídio o qual complexa-se com o DNA e emite fluorescência observável por microscopia.

Na figura 10 observa-se que o pré-tratamento com ConBr foi capaz de proteger a morte celular induzida pelo ácido quinolínico. Além disso, pode ser verificado que ConBr isoladamente não alterou a viabilidade das células hipocampais 24 h após sua administração.



**Figura 10. ConBr protege a morte celular induzida pelo AQ.** Os animais receberam ConBr 15min antes do AQ. Após 24h os hipocampus foram retirados, fatiados e incubados com iodeto de propídeo (IP). As imagens capturadas foram analisadas utilizando Scion Image software. A área fluorescente pelo IP foi determinada por análise densitométrica.

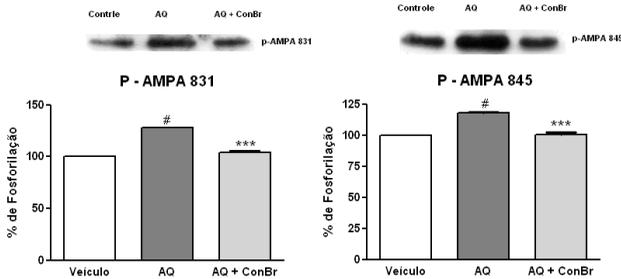
Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. #  $p < 0,01$  comparado ao controle; \*\* $p < 0,01$  comparado com o grupo tratado somente com AQ (N= 5-6).

### **5.6 Análise da fosforilação dos sítios de serina 845 e 831 da subunidade GluR1 do receptor tipo AMPA de camundongos submetidos ao tratamento com AQ e modulação por ConBr**

Atualmente sabe-se que a administração de AQ através de sua ação específica sobre os receptores NMDA aumenta o influxo de cálcio e é capaz de ativar diversas vias de sinalização que podem culminar com morte celular.

Portanto foi analisado a fosforilação dos sítios de serina 845 e 831, da subunidade GluR1 de AMPA, fenômeno este que ocorre em função da ativação de enzimas cinases como PKA, CaMKII e PKC, em resposta ao influxo de  $Ca^{2+}$  via NMDA, estando envolvido em fenômenos fisiológicos de neuroplasticidade, bem como em eventos patológicos relacionados a alterações da resposta sináptica e morte celular.

Nossos resultados (Figura 11) demonstram que a infusão i.c.v de AQ foi capaz de aumentar a fosforilação dos sítios de serina 845 e 831, e o teste ANOVA de uma via revelou que o pré-tratamento com a ConBr foi capaz de reverter de forma significativa este efeito especificamente sobre os animais protegidos, que não apresentaram convulsões tônico-clônicas.



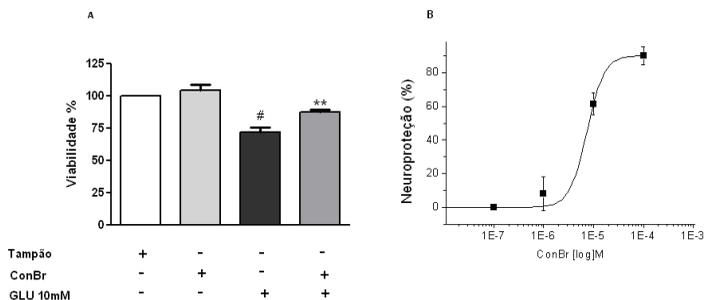
**Figura 11. Fosforilação dos sítios de serina 845 e 831 da subunidade GluR1 do receptor AMPA em resposta ao AQ e reversão desse efeito por ConBr.** Os animais receberam infusão de ConBr 15 min antes do AQ. O comportamento foi avaliado durante 10 minutos para a ocorrência de alterações comportamentais. Após 24h os animais foram sacrificados para a retirada dos hipocampos e análise da fosforilação dos sítios de serina 831 e 845 da subunidade GluR1 de AMPA. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*\*\* $P < 0,01$  comparado com o grupo tratado somente com AQ. #  $p < 0,01$  comparado ao grupo veículo. (N=5-6).

### 5.7 Avaliação da viabilidade celular e curva dose-resposta da lectina frente à toxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo

Em virtude do papel neuroprotetor *in vivo* de ConBr frente às convulsões induzidas pelo AQ, resolvemos confirmar seu efeito citoprotetor em um modelo *in vitro* de toxicidade glutamatérgica, expondo fatias de hipocampo a concentrações tóxicas de glutamato conforme descrito por Molz et al., (2008).

Os resultados demonstraram que o glutamato (10 mM) diminuiu a viabilidade das fatias em cerca de 28%, quando administrado isoladamente (Figura 12). ConBr (0,1-100  $\mu\text{g/ml}$ ) isoladamente não modificou a viabilidade celular (dados não mostrados). Entretanto a incubação das fatias com glutamato em presença de ConBr (0,1, 1,0 e 10  $\mu\text{g/ml}$ ) revelou que a lectina foi capaz de reverter de forma significativa a citotoxicidade produzida pelo glutamato *in vitro* (Figura 12B). A figura 12

mostra o efeito neuroprotetor máximo obtido com a ConBr neste modelo que foi na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ), além disso mostra uma curva dose-resposta da neuroproteção por ConBr em que o  $\text{IC}_{50}$  da lectina foi de 7,2  $\mu\text{M}$  ( $\approx 1 \mu\text{g/ml}$ ).



**Figura 12. Avaliação do efeito neuroprotetor de ConBr frente a neurotoxicidade do glutamato em modelo in vitro de fatias de hipocampo.** Após a pré-incubação por 40min em meio Krebs/Bicarbonato as fatias hipocampais foram incubadas durante 6h em meio Krebs/DMEM contendo veículo (tampão), ConBr, glutamato 10mM ou glutamato 10mM em presença de ConBr. (A) Avalia a viabilidade das fatias hipocampais medida pelo MTT e mostra que a queda de viabilidade produzida pelo glutamato 10mM é revertida por ConBr (10  $\mu\text{g/ml}$ ). (B) Mostra uma curva dose-resposta em relação a neuroproteção produzida por ConBr 1, 10 e 100  $\mu\text{M}$  frente a neurotoxicidade glutamatérgica. Os Valores são expressos em percentagem em relação ao controle (considerado 100%) e representam a média  $\pm$  erro padrão. **\*\*** $P < 0,01$  comparado com o grupo tratado somente com glutamato; **#**  $P < 0,01$  comparado ao controle.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos (figura 6) demonstram a capacidade de ConBr em prevenir convulsões tônico-clônicas em pelo menos 50% dos animais estudados. A taxa de proteção observada com a ConBr foi similar a outros agentes neuroprotetores utilizados neste modelo como o pré-condicionamento com NMDA (Vandresen-Filho, 2007), atorvastatina (Piermartiri et al, 2009) e guanosina (Shimidt, 2000). A atividade neuroprotetora de ConBr também foi avaliada através de uma escala de severidade de convulsões previamente estabelecida (tabela 1) (Vandresen-Filho et al., 2010). O ácido quinolínico produziu convulsões tônico-clônicas em 100% dos animais sendo que cerca de 50% destes vinham a óbito após as crises. Por outro lado os animais considerados protegidos, 58% (16/29), não apresentaram convulsões tônico-clônicas, embora fosse possível observar algumas pequenas alterações comportamentais em cerca de 70% desses animais, decorrentes dos potentes efeitos excitatórios da infusão intracerebroventricular de AQ. Nos animais pré-tratados com a lectina que apresentaram convulsões tônico-clônicas não foi verificado alteração na latência para a ocorrência da primeira convulsão nem alteração no tempo de duração das crises quando comparado com o grupo tratado somente com ácido quinolínico.

O efeito neuroprotetor de ConBr foi dependente da integridade da estrutura terciária/quartenária da lectina, visto que a desnaturação de ConBr pela alta temperatura (90°C por 5 min) tornou ConBr inativa em termos de sua atividade neuroprotetora. Da mesma forma, a lectina ConBr bloqueada com o açúcar de seu reconhecimento, D-manose (ConBr/Man), não foi capaz de proteger os animais das convulsões. Em conjunto essas observações demonstram que o efeito de ConBr está relacionado a sua capacidade de reconhecimento e ligação a glicocjugados. Estes achados corroboram com estudos prévios realizados em nosso laboratório em que a atividade antidepressiva de ConBr foi também dependente da integridade estrutural e do sítio de ligação a carboidrato (CRD) (Baraúna et al, 2006).

Os receptores NMDA são amplamente expressos pelos neurônios no SNC. Além disso, é bem documentado que a excessiva estimulação desses receptores pelo glutamato representa um ponto chave nos mecanismos de dano neuronal. Esse fato se deve a sua alta permeabilidade ao íon  $Ca^{2+}$  e suas propriedades de condutância, intrínsecas a este subtipo de

receptor (Rothstein, 1996). A contínua ativação de receptores tipo NMDA (especialmente os de composição NR1/NR2B) leva a um aumento excessivo no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular disparando uma cascata de eventos que levam a uma morte celular apoptótica ou necrótica (Ndountse e Chan, 2009). Estes efeitos incluem despolarização da membrana mitocondrial com sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intramitocondrial, ativação de enzimas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentes (ex. calpaína, nNOS), ativação de caspases, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio conduzindo um processo de toxicidade e morte celular (Fan, 2007; Jung, 2009). Portanto, o influxo prolongado de  $\text{Ca}^{2+}$  através destes receptores pode representar uma via comum para a morte de células neuronais.

Alguns estudos demonstram que a morte necrótica é a lesão predominante na administração intracerebral do glutamato ou seus análogos (Cole 1993; Bem-Ari, 2000; Olney, 1979; Schwarcz, 1984). No caso do AQ foi demonstrado que a injeção intracortical desse composto em ratos, causou fragmentação do DNA nuclear, mas sem evidências de incremento de caspase-3 ativa (Ferrer et al, 1995). Além disso, um estudo utilizando camundongos em que foi avaliada morte celular no hipocampo (através da medida de incorporação de iodeto de propídio; IP), foi mostrado dano celular 4h após administração i.c.v de AQ que permaneceu constante por até 72h (Ganzela et al, 2006). Nossos resultados (figura 10), mostraram que a lectina ConBr foi capaz de prevenir de forma significativa a morte celular de neurônios hipocámpais decorrente da administração de AQ, sendo que a incorporação de IP nos animais pré-tratados por ConBr e que receberam o AQ se manteve ao nível do controle. Da mesma forma, nos estudos *in vitro*, utilizando o teste de redução do MTT como parâmetro de viabilidade celular, foi observado que a pré-incubação de fatias de hipocampo com a lectina ConBr foi capaz de reverter o dano celular causado por concentrações tóxicas de glutamato (10 mM). O efeito neuroprotetor máximo de ConBr foi obtido na concentração de 100  $\mu\text{M}$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ) e o IC50 da lectina foi de 7,2  $\mu\text{M}$  ( $\approx$ 1  $\mu\text{g/ml}$ ).

A ação neuroprotetora de ConBr (*in vivo* ou *in vitro*) foi anulada pelo bloqueio do sítio de ligação a açúcar (CRD) com manose. Isso demonstra claramente que a ação de ConBr foi dependente de sua interação com resíduos de açúcar.

Os resultados *in vivo* e *in vitro*, utilizando AQ e glutamato, respectivamente, como agente neurotóxico reforçam a hipótese de que a lectina ConBr atua sobre receptores NMDA, por mecanismo dependente da interação com açúcar, modulando a atividade do receptor possivelmente por inibir as correntes

excitatórias pós-sinápticas ou por interferir na ligação do agonista com o receptor.

No que tange a estrutura dos receptores NMDA deve ser salientado que as subunidades NR1 e NR2 possuem diversos sítios de glicosilação na face extracelular contendo oligossacarídeos do tipo manose (Machaidze & Mikeladze, 2001; Standley & Baudryb, 2000). Além disso, a interação de lectinas como ConA com receptores glutamatérgicos tem sido bem documentada (Clark et al, 1998., Mayer et al, 1989., Mathers, 1976., Huettner, 1990., Thio et al, 1993). Nesse sentido foi demonstrado que ConA foi capaz de potencializar a atividade de receptores NMDA, sugerindo que alguns dos sítios desse receptor, preferencialmente ricos em manose, seja necessário para a modulação do canal por lectinas (Machaidze & Mikeladze, 2001). Adicionalmente, estudos utilizando eletrofisiologia a fim de mensurar alterações nas correntes excitatórias pós-sinápticas indicam que ConA possui a capacidade de potencializar estas correntes através da inibição da dessensibilização, efeito este observado na maioria dos receptores glutamatérgicos, inclusive receptores tipo NMDA (Everts et al, 1997).

ConA também pertence à subtribo Diocleinae sendo uma lectina que apresenta alta homologia com ConBr (Sanz-Aparicio et al., 1997; Cavada et al., 2001). Para investigar uma possível similaridade na ação de ConA em relação ao efeito obtido com ConBr no modelo de convulsões induzida pelo ácido quinolínico, a lectina ConA foi administrada nas mesmas condições de ConBr. Os resultados mostraram que ConA (10µg/sítio) não foi capaz de induzir qualquer alteração no comportamento dos animais submetidos ao modelo, com relação a severidade, latência e duração das convulsões. Portanto, ConA não apresentou atividade neuroprotetora no modelo estudado. Salienta-se que ConA também não apresentou efeito antidepressivo no teste do nado forçado (Baraúna et al., 2006).

Portanto, nossos achados apontam diferenças na atividade biológica sobre o SNC entre ConBr e ConA, apesar de apresentarem alta homologia e afinidade pelos mesmos resíduos de açúcar (glicose/manose) (Sanz-Aparicio et al., 1997; Cavada et al., 2001). Em relação a isso é importante considerar que apesar das lectinas Diocleinae apresentarem estruturas multiméricas muito similares, compostas de monômeros de 25.5 KDa, requererem íons divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ) para atividade biológica completa (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997), apresentarem especificidade de reconhecimento pelos mesmos carboidratos (D-manose e D-glicose), elas podem exibir diferenças na característica de equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH

(Cavada *et al.*, 2001). Existem várias evidências demonstrando que apesar de terem alta homologia, ConA e outras lectinas desta mesma subtribo, incluindo ConBr, apresentam importantes variações em termos de atividade biológica (Cavada *et al.*, 2001) no que se refere a capacidade de: a) estimular a proliferação de linfócitos e produção de interferon (Barral-Netto *et al.*, 1992); b) estimular macrófagos peritoneais e reações de inflamação (Rodríguez *et al.*, 1992); c) induzir edema de pata em ratos e migração de células peritoneais (Bento *et al.*, 1993); d) promover a liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos (Gomes *et al.*, 1994).

Outros estudos têm demonstrado que lectinas com afinidade por galactose também podem se ligar diretamente a receptores NMDA e dessa forma podem modular sua atividade, através da interação com resíduos de oligossacarídeos presentes na subunidade NR1 do receptor (Danysz & Wroblewski, 1995; Yue *et al.*, 1995; Everts *et al.*, 1997). Além disso, lectinas de plantas com afinidade por galactose inibem a ligação do glutamato ao receptor NMDA (Machaidze & Mikeladze, 2001). Adicionalmente, foi demonstrado que galectina-1, uma lectina endógena presente no cérebro de mamíferos, secretada por astrócitos e com afinidade por  $\beta$ -galactosídeos, apresenta atividade neuroprotetora frente à toxicidade glutamatérgica por um mecanismo desconhecido, mas que envolve o aumento de expressão da subunidade NR1A (Lekishvili *et al.*, 2006). Portanto tem sido sugerido que alguns dos sítios de NMDA, preferencialmente ricos em manose, sejam necessários para a modulação do canal por lectinas e outros sítios, provavelmente ricos em galactose, estejam envolvidos na modulação da interação ligante/receptor (Machaidze & Mikeladze, 2001).

Portanto, ainda necessitamos de uma avaliação mais aprofundada para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes ao efeito neuroprotetor de ConBr e sua ação específica sobre as subunidades dos receptores glutamatérgicos e sobre o sistema glutamatérgico como um todo. Um ponto interessante seria avaliar o efeito de ConBr sobre o receptor NMDA através de métodos eletrofisiológicos, como o "patchclamp" e através de métodos bioquímicos de medidas de binding de agonistas sobre o receptor. Dessa forma, poderia ser determinado a possível modulação de ConBr sobre a condutância do canal e/ou sobre a afinidade e interação de agonistas ou antagonistas com o receptor. Dentro dessa linha de abordagem, um estudo piloto desenvolvido por nosso grupo junto ao Departamento de Farmacologia da Universidade Autónoma de Madrid (UAM) indicaram que ConBr pode inibir correntes de

$\text{Ca}^{2+}$  através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem dependentes e diminuir a exocitose de catecolaminas em células cromafins. Dessa forma é possível que ConBr possa também exercer efeito similar sobre a condutância de receptores NMDA. Entretanto como já mencionado essas possibilidades terão de ser testadas.

No nosso estudo a infusão i.c.v de ácido quinolínico foi capaz de aumentar a fosforilação dos sítios de serina 845 e 831 da subunidade GluR1 de AMPA, efeito semelhante já descrito em outros modelos de indução de estado epiléptico (Bracey, 2009). De forma interessante não foi observado aumento na fosforilação dos sítios de serina 845 e 831 dos animais considerados protegidos pelo pré-tratamento com ConBr, sendo que estes animais também não apresentaram convulsões, o que sugere que a fosforilação dos sítios de serina 845 e 831 da subunidade GluR1 de AMPA neste modelo foi dependente das convulsões tônico-clônicas induzidas pela hiperexcitabilidade glutamatérgica pelo AQ e possivelmente via receptores NMDA.

Portanto, baseado neste conjunto de evidências, podemos concluir que ConBr, uma lectina de origem vegetal, pode inibir a atividade de receptores glutamatérgicos tipo NMDA de maneira dependente de ligação com resíduos de oligossacarídeos. A inibição de receptores tipo NMDA pode justificar a redução pela ConBr na severidade das convulsões produzidas pelo AQ, bem como pela reversão da queda da viabilidade e da morte celular dependente de AQ. Além disso, o pré-tratamento com ConBr reverteu o aumento de fosforilação dos sítios de serina 831 e 845 da subunidade GluR1 de AMPA induzida pelo AQ.

Por fim nossos resultados corroboram com outros estudos que demonstram que apesar de terem alta homologia e a mesma especificidade de ligação a açúcar (manose/glicose) ConBr e ConA possuem diferenças importantes em termos de atividade biológica.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que a administração i.c.v da lectina ConBr (10 $\mu$ g/sítio) apresenta efeito neuroprotetor no modelo de convulsões induzida pelo AQ. ConBr foi capaz de inibir de forma significativa a severidade das convulsões sem alterar a latência para a primeira convulsão e a duração da crise convulsiva. O efeito neuroprotetor da lectina ConBr depende de sua integridade estrutural. Além disso, depende do sítio de ligação a oligossacarídeos (CRD), visto que seu bloqueio por manose anulou o efeito neuroprotetor de ConBr.

A lectina ConA, diferentemente de ConBr, não foi capaz de proteger as convulsões com AQ, isso demonstra que embora similares ConA e ConBr podem produzir efeitos biológicos diversos.

A administração i.c.v da lectina ConBr (10 $\mu$ g/sítio) é capaz de proteger da morte celular induzida pelo AQ. Além disso, o efeito neuroprotetor apresentado pela lectina no modelo de convulsões com AQ impede o aumento de fosforilação dos sítios de serina 831 e 845 da subunidade GluR1 de AMPA observado 24 h após a administração de AQ.

ConBr também é capaz de reverter de forma significativa a citotoxicidade do glutamato in vitro, sendo o efeito neuroprotetor máximo na concentração de 10  $\mu$ g/ml (100  $\mu$ M) e o IC50 da lectina de aproximadamente 1  $\mu$ g/ml (7,2 $\mu$ M).

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade JL, Arruda S, Barbosa T, Paim L, Ramos MV, Cavada BS, Barral-Netto M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunol** 194:98-102, 1999.

Attwell, D. Brain uptake of glutamate: food for thought. **Journal of Nutrition** 130, 1023S–1025S, 2000.

Banke TG, Bowie D, Lee H, Haganir RL, Schousboe A, Traynelis SF. Control of GluR1 AMPA receptor function by cAMP-dependent protein kinase. **J Neurosci** 20:89–102, 2000.

Barauna, S.C. Kaster MP., Heckert BT., do Nascimento KS., Rossi FM., Teixeira EH., Cavada BS., Rodrigues AL., Leal RB. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacol. Biochem. Behavior**, 85:160-169, 2006.

Barbosa T. Arruda S., Cavada B., Granjeiro TB., de Freitas LA., Barral Netto M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribo. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 96:673 –678, 2001.

Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. **Science** 276:2042–2045, 1997.

Berliocchi L, Bano D, Nicotera P. Ca<sup>2+</sup> signals and death programmes in neurons. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 360: 2255–8, 2005.

Berton, O.; Nestler, E.J. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat. Rev. Neurosc.* 7:137-151, 2006.

Beuth J, Stoffel B, Pulverer G. Inhibition of bacterial adhesion and infection by lectin blocking. **Adv Exp Med Biol.** ;408:51-6, 1996.

Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Haganir RL, Malinow R. Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. **Neuron** 51: 213–225, 1996.

Boehm, S.; Huck, S. Presynaptic inhibition by concavalin A: Are  $\alpha$ -latrotoxin receptors involved in action potential – dependent transmitter release? **J. Neurochem.** 71:2421 – 2430, 1998.

Bonfoco, E.; Krainc, D. Ankrakrona, M. D.; Nicotera, P.; Lipton, S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 92, p. 7162-7166, 1995.

Bracey J.M., Jonathan E. Kurzb, Brian Lowc, Severn B. Churna. Prolonged seizure activity leads to increased Protein Kinase A activation in the rat pilocarpine model of status epilepticus. **Brain Research**, 2009.

Calloni, G.W. et al. Congenital hypothyroidism alters the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK in the hippocampus of neonatal rats. **Dev. Brain. Res.** 154:141-145, 2005.

Carobrez. Glutamatergic transmission as molecular target in anxiety. **Rev Bras Psiquiatria**; 25(Supl II):52-8, 2003.

Carvalho AL, Duarte CB, Carvalho AP. Regulation of AMPA receptors by phosphorylation. **Neurochem Res** 25:1245– 1255, 2000.

Caçada, B.S., Barbosa T., Arruda S., Granjeiro TB., Barral-Netto M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptides Science**, 2:1-13, 2001.

Cebo, C., Vergoten J., Zanetta JP. Lectin activities of cytokines: functions and putative carbohydrate-recognition domains. **Biochim Biophys Acta** 19:422–434, 2002.

Cedeno N., Urbina M., Obregon F., Lima L. Characterization of serotonin transporter in blood lymphocytes of rats. Modulation by in vivo administration of mitogens. **J Neuroimmunol** 159:31 – 40, 2005.

Chazot PL, Miroslav C and Stephenson FA. An investigation into

the role of N-glycosylation in the functional expression of a recombinant heteromeric NMDA receptor. **Mol Membr Biol** 12:331–337, 1995.

Chen, J.W., Wasterlain, C.G. Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. **Lancet Neurol.** 5,246–256, 2006.

Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* ; 23:1261-1276. [**PubMed: 1361523**],2006.

Choi, D. W. Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. **J. Neurosci.** 7(2): 369-379, 1987.

Clark R. A. C., Gurd, N. Bissoon, tN. Tricaud tE. Molnar, S. E. Zamze, R. A. Dwek, tR. A. J. McIlhinney, and D. R. Wing. Identification of Lectin-Purified Neural Glycoproteins, GPs 180 , 116, and 110, with NMDA and AMPA Receptor Subunits: Conservation of Glycosylation at the Synapse. **J. Neurochem.** 70, 2594—2605, 1998.

Cooke SF, Bliss TV. Plasticity in the human central nervous system. **Brain.** 2006 Jul;129(Pt 7):1659-73, 2006.

Cordova, F.M.,Rodrigues AL. Giacomelli MB., Oliveira CS., Posser T., Dunkley PR., Leal RB. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. **Brain Res.** 998:65-72, 2004.

Cull-Candy, S.; Brickley, S.; Farrant, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. **Curr Opin Neurobiol.**, v.11, p.327.335, 2001.

Derkach V, Barria A, Soderling TR. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II enhances channel conductance of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5 methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 96:3269–3274, 1999.

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

Esteban JA, Shi SH, Wilson C, Nuriya M, Haganir RL, Malinow R. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity. **Nat Neurosci** 6:136–143, 2003.

Everts, I.; Villmann, C.; Hollmann, M. N-glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. **Molecular Pharmacology**, v 52,p.861-873, 1997.

Fay, AM, Bowie, D. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. **J Physiol.** 572:201-213, 2006.

Gabius, H.- J. Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. **Naturwissenschaften** 87, 108– 121,2000.

Gahmberg, C.G. & Tolvanen, M. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. **Trends Biochem. Sci.** 21, 308–311, 1996.

Geoffroy, M., Lambolez, B., Calvalho, L. P. d., Rossier, J., and Stinnakre, J. Concanavalin A potentiates NMDA-evoked responses in the *Xenopus* oocyte expression system. **Eur. J. Pharmacol.** 166: 355–356, 1989.

Golson, R K. The pyridine nucleotide cycle. **Nature** 212:933-934, 1966.

Gomes, J.C.; Ferreira, R.R., Cavada, B.S., Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v 41, p. 132-135, 1994.

Greengard, P., Jen, J., Nairn, A.C., Stevens, C.F., Enhancement of the glutamate response by cAMP-dependent protein kinase in hippocampal neurons. **Science** 253, 1135–1138,1991.

Gurd J. W. Glycoproteins of the synapse in Neurobiology of Glycoconjugates, **Plenum Press**, pp. 219—242, 1994.

Helmholz H.; Cartellieri S.; He L.; Thiesen P.; Niemeyer B. Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. **Journal of Chromatography A**, v 1006, p.127-135, 2003.

Heyes M.P., Rubinow D., Lane C., Markey S. P. Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. *Ann Neurol.* v. 26, p. 275-277, 1989.

Heyes, M.P.; Wyler, A.R.; Devinsky, O.; Yergey, J.A.; Markey, S.P.; Nadi, N.S. Quinolinic acid concentrations in brain and cerebrospinal fluid of patients with intractable complex partial seizures. *Epilepsia*, v.31, p. 172-177, 1990.

Hickey, M. A.; Chesselet, M. F. Apoptosis in Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, v. 27, p. 255-265, 2003.

Hoffman, K.B; Kessler, M.; Ta, J.; Lam, L.; Lynch, G. Mannose specific lectins modulate ligand binding to AMPA-type glutamate receptors. *Brain Res.*, v 795, p.105-111, 1998.

Huettner, J. E. Glutamate receptor channels in rat DRG neurons: Activation by kainate and quisqualate and blockade of desensitization by Con A. *Neuron* 5: 255–266, 1990.

Huh K. and Wenthold R. Turnover analysis of glutamate receptors identifies a rapidly degraded pool of the N-methyl-D aspartate receptor subunit, NR1, in cultured cerebellar granule cells. *J. Biol. Chem* 274: 151–1, 1999.

Hullebroeck M. F. and Hampson D. R. Characterization of the oligosaccharide side chains on kainate binding proteins and AMPA receptors. *Brain Res.* 590: 187–192, 1992.

Isquith A.G. & Moat A.J. Biosynthesis of nicotinic acid by *Clostridium Butyricum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22:565-571, 1966.

Jaroslav Katrlirk; Juraj Svitel, Peter Gemeiner, Tibor Kozar, and Jan Tkac. Glycan and Lectin Microarrays for Glycomics and medicinal Applications. *Wiley InterScience*, 2010.

Jenkins N., Parekh R. B. and James D. C. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. *Nat. Biotech.* 14: 975–981, 1996.

Kaster, M.P. et al. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Brain Res Bull** 30:53–61, 2005.

Kawamoto S., Hattori S., Sakimura K., Mishina M. and Okuda K. N-Linked glycosylation of the AMPA-selective glutamate receptor channel  $\alpha 2$  subunit is essential for the acquisition of ligand-binding activity. **J Neurochem**, Mar;64(3):1258–66, 1995.

Kehoe, J.S., Transformation by concanavalin A of the response of molluscan neurons to L-glutamate, **Nature** 274, 866, 1978.

Kim, W.H., Park W.B., Gao B., Jung M.H. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. **Mol Pharmacol**. 66:1383–96, 2004.

Lapin, I. P. Stimulant and convulsive effects of kynurenes injected into brain ventricles in mice. **J Neural Transm.**, v.42, p.37–43, 1978.

Laurie DJ, Bartke I, Schoepfer R, Naujoks K and Seeburg PH Regional, developmental and interspecies expression of the four NMDAR2 subunits examined using monoclonal antibodies. **Mol Brain Res** 51:23, 1997.

Lee HK, Barbarosie M, Kameyama K, Bear MF, Huganir RL Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. **Nature** 405:955–959, 2000.

Lekishvili, T.; Hesketh, S.; Brazier, M.W.; Brown, D.R. Mouse galectin-1 inhibits the toxicity of glutamate by modifying NR1 NMDA receptor expression. **Eur J Neurosci**. 24:3017–3025, 2006.

Lin, S.S.; Levitan, I.B. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. **Trends Neurosci** 14:273–7, 1991.

Liu, F.T.; Rabinovich, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer** 5:29–41, 2005.

Liu, Y., Peterson DA., Kimura H., Shubert D., Mechanism of 3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J. Neurochem.** 69:581-593, 1997.

Lopes, F.C., Cavada BS., Pinto VP., Sampaio AH., Gomes JC. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins on the histamine release induced by plant lectins. **Braz J Med Biol Res** 38:935 – 41, 2005.

Lynch D.R.; Guttman, R. P. Excitotoxicity: perspectives based on NMDA receptor subtypes. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 300, p. 717.723, 2002.

Machaidze, G.G. & Mikeladze, D. Different effects of lectins on the ligand binding of the NMDA receptors and sigma sites in rat brain hippocampus synaptic membranes. **Neurochem. Res.**, 26, 457–462, 2001.

Mammen AL, Kameyama K, Roche KW, Haganir RL. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5 methylisoxazole4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. **J Biol Chem.** 272:32528-25533, 2005.

Marschal P. et al. Carbohydrate and glycoprotein specificity of two endogenous cerebellar lectins. **Biochimie** 71:645 –653, 1989.

Masanori Sakaguchia, Tetsuro Shingoc, Takuya Shimazakia, Hirotaka James Okanoa, Mieko Shiwad, Satoru Ishibashie, Hideyuki Ogurof, Mikiko Ninomiya, g,h, Toshihiko Kadoyai, Hienori Horiej, Akira Shibuyab, Hidehiro Mizusawae, Françoise Poirierk, Hiromitsu Nakauchif, Kazunobu Sawamotoa,h, and Hideyuki Okano. A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. **PNAS**, 103:7112–7117, 2006.

Mathers, D.A. and P.N.R. Usherwood. Concanavalin A blocks desensitization of glutamate receptors on insect muscle fibres, **Nature** 259: 409, 1976.

Matus A. I., DePetris S., and Raff M. C. Mobility of concanavalin A receptors in myelin and synaptic membranes. **Nat. New Biol.** 244, 278—280, 1973.

Mayer, M.L. and L. Vyklicky Jr, Concanavalin A selectively reduces desensitiation of mammalian neuronal quisqualate receptors, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86, 1411, 1989.

McBain CJ, Mayer ML. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. **Physiol Rev** 74:723–760, 1994.

Mc-Donald, J.W. & Johnston, M.V.; Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. **Brain Research Reviews**, v 15, p. 41-70, 1990.

Meador K. How to image memory in epilepsy. **Epilepsy Curr.** Nov-Dec;6(6):189-91, 2006.

Meldrum, B. S. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of **Physiology and Pathology. J. Nutr.** 130: 1007S 1015S, 2000.

Meldrum, B.S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. **Neurology** 44, S14–S23, 1994.

Metera, A.; Mallozzi, C.; Minetti, M.; Domenici, M. R.; Pezzola, A.; Popoli, P.; Di Stasi, A. M. Quinolinic acid modulates the activity of src family kinases in rat striatum: in vivo and in vitro studies. **J Neurochem**, v. 97, p.1327.1336, 2006.

Michaelis, E. K. Molecular Biology of Glutamate Receptors in the Central Nervous System and their Role in Excitotoxicity, Oxidative Stress and Aging. **Progress in Neurobiology** 54: 369 415, 1998.

Molz, S. Decker H., Dal-Cim T., Cremoez C., Córdova FM., Leal RB., Tasca CI. Glutamate-induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and p38MAPK signaling. **Neurochemical Research**, 33, 27–36, 2007.

Moreira R.A. & Cavada B.S. Lectin from Canavalia brasiliensis: Isolation, characterization and behavior during germination, **Biologia Plantarum** (Praha) 26, 113-120, 1984.

Moreira, R.A.; Cordeiro, E.F.; Grangeiro, T.B.; Martins, J.L.; Ramos, M.V.; Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S. **Rev. Bras. Fisiol. Vegetal**, v 8, p. 23-29, 1996.

- Moroni, F. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. **Eur J Pharmacol**, v. 375, p. 87-100, 1999.
- Naredo, I V.; Poeggeller, B.; Sanches, V. S.; Caballero, B.; Zapico, C.T.; Garcia, O. A.; Tolivia, D.; Colunga, M. R.; Montes, A. C. Melatonin neutralizes neurotoxicity induced by quinolinic acid in brain tissue culture. **J Pineal Res.**, v. 39, p. 266-275, 2005.
- Obrenovitch, T. P. & Urenjak, J. Altered Glutamatergic Transmission in Neurological Disorders: From High Extracellular Glutamate to Excessive Synaptic Efficacy. **Progr. Neurobiol.** 51: 39-87, 1997.
- Oh MC, Derkach VA, Guire ES, Soderling TR. Extrasynaptic membrane trafficking regulated by GluR1 serine 845 phosphorylation primes AMPA receptors for long-term potentiation. **J Biol Chem** 281:752–758, 2009.
- Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda*. **Revta brasil Bot**, v 14, p. 61-66, 1991.
- Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Glutamate. In: Björklund A, Hökfelt T, eds. **Handbook of chemical neuroanatomy**. Vol 18. Amsterdam: Elsevier; 2000.
- Partin, K.M., D.K. Patneau, C.A. Winters, M.L. Mayer and A. Buonanno et al. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. **Neuron**, 11:1069-1082, 1993.
- Perez-Otano, I., Schulteis, C.T., Contractor, A., Lipton, S.A., Trimmer, J.S., Sucher, N.J. and Heinemann, S.F. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A containing NMDA receptors. **J. Neurosci.**, 21, 1228±1237, 2001.
- Peterson, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.*, which is more generally applicable. **Anal. Biochem.** 83:346-356, 1977.
- Pires, Alana de Freitas. Atividade antinociceptiva de uma lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. / Alana de Freitas Pires. **Dissertação** (Mestrado Acadêmico em Ciências

Fisiológicas) Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Fortaleza, 2007.

Rambourg A. and Leblond C. P. Electron microscope observations on the carbohydrate-rich cell coat present at the surface of cells in the rat. *J. Cell Biol.* 32, 27—53, 1967.

Raymond D Dlingedine, Karin Borges, Derek Bowei, F. Traynelis. The Glutamate Receptor Ion Channels. **PHARMACOLOGICAL REVIEWS**. Vol. 51, No. 1, 1999.

Roche KW, O'Brien RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Huganir RL Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16:1179–1188, 1996.

Rostock, M. Huber G., Winters CA., Mayer ML., Buonano A., Anticancer activity of a lectin-rich mistletoe extract injected intratumorally into human pancreatic cancer xenografts. *Anticancer Res* 25:1969-1975, 2005.

Rothstein JD. Excitotoxicity hypothesis. *Neurology* 4 (4 Suppl 2): S19–25, 1996.

S. Standley, and M. Baudry. The role of glycosylation in ionotropic glutamate receptor ligand binding, function, and trafficking CMLS, *Cell. Mol. Life Sci.* 57 1508–1516, 2000.

Sanacora G., Zarate CA., Krystal JH., Manji HK., Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008.

Santamaria, A.; Salvatierra-Sanchez, R.; Vazquez-Roman, B.; Santiago-Lopez, D.; Villeda-Hernandez, J.; Galvan-Arzate, S.; Jimenez-Capdeville, M. E.; ALI, S.F. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem.*, v.86, p. 479.488, 2003.

Sanz-Aparicio, J. Hermoso J., Granjeiro TB., Calvette JJ., Cavada BS. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Letters* 405:114-118, 1997.

Schwarcz, R.; Pellicciari, R. Manipulation of brain kynurenes: glial targets neuronal effects, and clinical opportunities. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 303, p. 1-10, 2002.

Stern-Bach, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P.O., O'Hara, P.J. and Heinemann, S.F. Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid binding proteins. **Neuron**, 13, 1345±1357, 1994

Stone, T. W.; Darlington, L. G. Endogenous Kynurenes as targets for drug discovery and development. **Nat Rev Drug Discov**, v.1, p. 609-620, 2002.

Stone, T.W., Perkins, M.N., Quinolinic acid: a potent, endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. **Eur J Pharmacol.**, v. 72, p. 411-412, 1981.

Stone, T.W. Kinurenes in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. **Progress in Neurobiology**. 64:185-218, 2001.

Tapiero, H., Mathe, G., Couvreur, P., Tew, K.D. Glutamine and glutamate. **Biomedicine and Pharmacotherapy** 56, 446-457, 2002

Tavares, R. G.; Tasca, C. I.; Santos, C.; Alves, L.B.; Porciuncula, L.O.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. **Neurochem Int.**, v.40, p. 621- 627, 2002.

Tavares, R. G.; Tasca, C. I.; Santos, C.; Wagner, M.; Souza, D. O.; Dutra Filho, C. Quinolinic acid inhibits glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain. **Neuroreport**, v.11, p. 249-253, 2000.

Gabius HJ, editor. The Sugar Code Fundamentals of glycosciences. Weinheim: **Wiley-VCH**; 2009.

Thio, L. L., Clifford, D. B., and Zorumski, C. F. Concanavalin A enhances excitatory synaptic transmission in cultured rat hippocampal neurons. **Synapse** 13: 94-97, 1993.

Tzschentke, T.M. Glutamatergic mechanisms in different disease states: overview and therapeutic implications – an introduction. **Amino Acids** 23, 147-152, 2002.

Uchiyama N, Kuno A, Tateno H, Kubo Y, Mizuno M, Noguchi M, Hirabayashi J. Optimization of evanescent-field fluorescence assisted lectin microarray for high-sensitivity detection of monovalent oligosaccharides and glycoproteins. **Proteomics** 8:3042–3050, 2008.

Ajit Varki, Richard D Cummings, Jeffrey D Esko, Hudson H. Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R Bertozzi, Gerald W Hart, and Marilyn E Etzler. *Essentials of Glicobiology*. **Cold Spring Harbor laboratory Press**, 1999.

Vyklicky Jr., L., D.K. Patneau and M.L. Mayer. Modulation of excitatory synaptic transmission by drugs that reduce desensitization at AMPA/kainate receptors, **Neuron**, 1991.

Waxman EA, Lynch DR. N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. **Neuroscientist**;11:37–49, 2005.

Wing D. R. Glycoprotein specificity and diversity, in *Glycobiology and the Brain* (Nicolini M. and Zatta P. F., eds), pp 97–121. **Pergamon Press**, Oxford, 1993.

Wong, L. A., and Mayer, M. L. Differential modulation by cyclothiazide and concanavalin A of desensitization at native\_ amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid preferring and kainate-preferring glutamate receptors. **Mol. Pharmacol.** 44: 504–510, 1993.

Yue, K. T., MacDonald, J. F., Pekhletski, R., and Hampson, D. R. Differential effects of lectins on recombinant glutamate receptors. **Eur. J. Pharmacol. Mol.** 291: 229–235, 1995.

Zheng, F., Errenger, K., Low, C.M., Banke, T.G., Lee, C.J., Conn, P.J. and Traynelis, S.F. Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand-binding domain of NR2A. **Nat. Neurosci.**, 4, 894±901, 2001.