



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

*MODULAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO CREB E EFEITO ANTIDEPRESSIVO DA
LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* (ConBr) NO TESTE DO NADO FORÇADO EM
CAMUNDONGOS*

Sara Cristiane Barauna

Florianópolis, 2006.



*MODULAÇÃO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO CREB E EFEITO
ANTIDEPRESSIVO DA LECTINA DE *Canavalia brasiliensis* (ConBr) NO TESTE DO
NADO FORÇADO EM CAMUNDONGOS*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Rodrigo Bainy Leal

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Severo Rodrigues

Florianópolis, 2006.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial aos meus pais por estarem sempre ao meu lado, acreditando e confiando. Obrigada pelo apoio, incentivo e amor em todos os momentos.

Dedico esta conquista a vocês.

Aos meus “manos”, Samara e Allan por sempre me incentivarem e me ouvirem.

Ao meu namorado, Ramon, por estar todo este tempo ao meu lado compartilhando minhas agunias, desesperos e felicidades. Um imenso obrigada pelo companheirismo e por me apoiar em absolutamente tudo.

A minha amiga Kathy, pela amizade, ajuda e companheirismo, pelos momentos de risadas que compartilhamos neste período. Ao seu noivo, Dudu, pelas dicas e esclarecimentos de dúvidas. Obrigada a vocês por todas as nossas conversas e pelos momentos de descontração.

A amiga Manú, parceira de experimentos, pela sua grande ajuda neste trabalho, mas principalmente pela disponibilidade e “estórias” contadas.

A amiga Bettina, por toda a ajuda e colaboração, pelos “bafões” e principalmente pela sua constante alegria e empolgação. Obrigada Bett pela amizade.

As meninas do lab., Cami, Ana, Thaís e Cris por terem tornado os dias de trabalho mais empolgantes e alegres, pelas cervejas, pelos dias de praia. Agradeço de coração a vocês meninas pela amizade e por toda a ajuda, especialmente pelas dicas do tampão superior, concentrado? diluído? 5X?.

As mais “novinhas” do lab., Daiane, Ana e Ilza pelo apoio e paciência nesta etapa final.

Ao Francesco pela ajuda e interesse no trabalho e pelas horas cedidas no esclarecimento de dúvidas.

Aos professores Carla e Nelson pela ajuda, companheirismo e valiosos ensinamentos.

Ao professor Benildo Sousa Cavada e sua equipe por ter colaborado em grande parte com este trabalho por ceder-nos gentilmente as lectinas.

A todos os professores da Pós Graduação em Neurociências por todos os conhecimentos transmitidos.

Ao secretário da Pós-Graduação, Nivaldo, pela paciência, dedicação e por sempre resolver nossos “pepinos”.

A minha co-orientadora, Ana Lúcia, muito obrigada pela orientação, pela sua dedicação e seus ensinamentos.

Ao meu orientador, Rodrigo, muito obrigada pela oportunidade de trabalhar em seu grupo, pela sua disponibilidade, amizade, ajuda e pelos conhecimentos compartilhados.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	8
RESUMO	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 LECTINAS	12
1.1.1 Lectina das sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr).....	14
1.2 DEPRESSÃO	15
1.2.1 MODELOS ANIMAIS PREDITIVOS DE DROGAS COM AÇÃO ANTIDEPRESSIVA.....	20
1.2.2 Tratamentos	20
1.3 SINALIZAÇÃO CELULAR.....	22
1.3.1 Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs).....	23
1.3.2 Proteína de Ligação ao Elemento Responsivo ao AMPc (CREB).....	26
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 ANIMAIS	32
4.2 DROGAS E REAGENTES	32
4.3 PURIFICAÇÃO DAS LECTINAS E PRODUÇÃO DA CONBR MARCADA COM FITC E CONBR CONJUGADA A MANOSE.....	33
4.4 TRATAMENTO.....	34
4.5 TESTES COMPORTAMENTAIS.....	35
4.5.1 Teste do Nado Forçado.....	35
4.5.2 Atividade Locomotora no Campo Aberto	36
4.6 ANÁLISE DO MECANISMO DE AÇÃO ATRAVÉS DE ESTUDOS FARMACOLÓGICOS IN VIVO.....	36
4.6.1 Influência do Sistema Serotoninérgico	36
4.6.2 Influência dos Sistemas Dopaminérgico e Noradrenérgico.....	37
4.7 OBTENÇÃO DOS CÓRTICES E HIPOCAMPOS.....	38
4.8 PREPARO DOS HOMOGENEIZADOS.....	38
4.9 DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	39
4.10 “WESTERN BLOT”	39
4.10.1 Separação de Proteínas (eletroforese).....	39
4.10.2 Eletrotransferência	40
4.10.3 Imunodeteção.....	41
4.11 HISTOLOGIA	41
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5 RESULTADOS	43
5.1 CURVA DOSE RESPOSTA DAS LECTINAS CONBR E CONA SOBRE O TESTE DO NADO FORÇADO (TNF) E ATIVIDADE LOCOMOTORA NO CAMPO ABERTO EM CAMUNDONGOS	43
6 DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÕES.....	71
8 PERSPECTIVAS	73
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXO	84

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclase

AMPc: adenosina de 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*

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*

CRE: elemento responsivo ao AMPc

CREB: proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc

DAG: diacil glicerol

DGuiL: lectina extraída das sementes de *Dioclea guianensis*

Dviol: lectina extraída das sementes de *Dioclea violacea*

ECT: terapia eletroconvulsiva

EGF: fator de crescimento endotelial

ELK: fator de transcrição

ERK1/2: proteína cinase regulada por sinal extracelular Gly: glicina

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GMPc: guanosina de monofosfato cíclico

HEPES: ácido n-2-hidroxietilpiperazina

i.c.v.: intracerebroventricular

i.p.: intraperitoneal

IP₃: fosfatidil inositol

JNK: proteína cinase c-Jun NH₂-terminal

MAO: monoamina oxidase

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

MAPKK: proteína cinase da MAPK

mg: miligrama

min: minuto

µg: micrograma

NMDA: N-metil D-aspartato

nmol: nanomol

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

OMS: organização mundial de saúde

PDGF: fator de crescimento derivado do pâncreas

PKA: proteína cinase A

PKC: proteína cinase C

PLC: fosfolipase C

s.c.: subcutâneo

SNC: sistema nervoso central

TNF: teste do nado forçado

5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT_{7A}: subtipos de receptores para serotonina

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura 01. Estrutura cristal da lectina de ConBr.....	15
Tabela 01. Resumo geral das drogas antagonistas dos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico.....	37
Figura 02. Mecanismo neurotrófico da depressão.....	19
Figura 03. Cascata de sinalização das MAPKs.....	23
Figura 04. Algumas vias de transdução do sinal intracelular envolvidas na regulação do CREB.....	28
Figura 05. Corte histológico coronal do cérebro de camundongo demonstrando o local da injeção via i.c.v. no ventrículo lateral.....	34
Figura 06. Esquema da administração da lectina e das drogas.....	35
Figura 07. Efeito das lectinas ConBr e ConA sobre o Teste do Nado Forçado (TNF) e atividade locomotora no campo aberto em camundongos.....	44
Figura 08. Imagem representativa da distribuição da ConBr – FITC no cérebro de camundongos.....	46
Figura 09. Efeito da curva de tempo da lectina ConBr sobre o Teste do Nado Forçado (TNF) e atividade locomotora no campo aberto em camundongos.....	47
Figura 10. Efeito da lectina ConBr desnaturada e da lectina ConBr-man sobre o Teste do Nado Forçado (TNF) e atividade locomotora no campo aberto.....	49
Figura 11. Efeito do tratamento com doses sub-ativas de fluoxetina e ConBr no Teste do Nado Forçado (TNF)	50
Figura 12. Efeito do pré-tratamento com os antagonistas dos sistemas serotoninérgico, NAN-190, pindolol e cetanserina; dopaminérgico, sulpirida e SCH 23390; noradrenérgico, ioimbina e prazosim.....	52
Figura 13. Efeito da lectina ConBr sobre a fosforilação da proteína ERK1/2 e do fator de transcrição CREB no hipocampo de camundongos injetados com a lectina.....	55
Figura 14. Efeito da fluoxetina sobre a fosforilação da proteína ERK1/2 e do fator de transcrição CREB no hipocampo de camundongos injetados com este antidepressivo.....	58
Figura 15. Efeito da lectina ConBr sobre a fosforilação da proteína ERK1/2 e do fator de transcrição CREB no córtex pré-frontal de camundongos injetados com a lectina.....	60

Figura 16. Efeito da fluoxetina sobre a fosforilação de ERK1/2 e do fator de transcrição CREB no córtex pré-frontal de camundongos tratados com este antidepressivo.....62

Figura 17. Hipótese do mecanismo pelo qual a ConBr pode levar a ativação do resíduo ser-133 de CREB.....70

RESUMO

As lectinas são um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas, presentes em animais, plantas e microorganismos. Algumas lectinas isoladas das sementes da *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e da *Canavalia ensiformes* (ConA) apresentam sua estrutura cristal e alguns efeitos biológicos em células de mamíferos caracterizados. Este estudo investiga a ação da administração central das lectinas ConBr e ConA no teste do nado forçado (TNF) e o envolvimento da proteína ERK1/2 e CREB no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos. A ConBr (1 – 50 µg/sítio, i.c.v.), mas não a ConA, produziu uma diminuição no tempo de imobilidade no TNF (efeito observado de 15 min até 120 min após a injeção), sem alterar a atividade locomotora nas doses de 1 – 10 µg/sítio, sendo que na dose de 50 µg/sítio, houve um aumento na locomoção no teste do campo aberto. O efeito de ConBr no TNF foi dependente da integridade da estrutura terciária/quartenária da proteína e da sua capacidade de reconhecimento e ligação a resíduos de açúcares. ConBr (0,1 µg/sítio, i.c.v.) causou uma potencialização da ação da fluoxetina. O efeito de ConBr sobre o TNF (10 µg/sítio, i.c.v.) foi revertido pelo pré-tratamento dos camundongos com pindolol (32 mg/Kg, um bloqueador β-adrenérgico com atividade antagonista 5-HT_{1A}/5-HT_{1B}), NAN-190 (0,5 mg/Kg, um antagonista 5-HT_{1A}), cetanserina (5 mg/Kg, um antagonista 5-HT_{2A/2C}), sulpirida (50 mg/Kg, um antagonista dopaminérgico D₂) ou ioimbina (1 mg/Kg, um antagonista α₂-adrenérgico), mas não com SCH 23390 (0,05 mg/Kg, um antagonista dopaminérgico D₁) ou prazosim (62,5 µg/Kg, antagonista α₁-adrenérgico). A ConBr (10 µg/sítio, i.c.v.) promoveu um aumento na fosforilação de CREB, mas não de ERK1/2 no hipocampo de camundongos. A fluoxetina (1 nmol/sítio) aumentou a fosforilação de CREB e ERK1/2 no hipocampo. Nenhuma alteração foi observada após o tratamento com ConBr (10 µg/sítio, i.c.v.) ou fluoxetina (1 nmol/sítio) na fosforilação de CREB e ERK1/2 no córtex pré-frontal. Estes resultados indicam que o efeito de ConBr em diminuir o tempo de imobilidade dos animais no TNF é dependente da sua interação com os sistemas serotoninérgico (via 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}), noradrenérgico (via receptor α₂-adrenérgico) e dopaminérgico (via receptores D₂) e está relacionado com a fosforilação do fator de transcrição CREB no hipocampo. Considerando a presença de lectinas endógenas no cérebro de humanos e baseado nestes resultados, será importante investigar um possível papel destas lectinas endógenas na modulação das funções do sistema nervoso central.

ABSTRACT

Glycan binding proteins (lectins) are structurally heterogeneous group of reversible carbohydrate-binding proteins, ubiquitous in animals, plants and microorganisms. The crystal structure and some biological effects of lectins isolated from *Canavalia brasiliensis* seeds (ConBr) and from *Canavalia ensiformes* seeds, Concanavalin A (ConA), on mammalian cells, have been well characterized. This study investigates the action of the central administration of ConBr and ConA lectins in the forced swimming test (FST) in mice and the involvement in ERK1/2 and CREB phosphorylation in mice hippocampus and pre-frontal cortex. ConBr (1 – 10 µg/site, i.c.v.), but not ConA, produced a decreased in the immobility time in the FST (observed at the time points 15, 30, 60 and 120 min after the injection), without changing the locomotor activity in the open-field test. The effect of ConBr in the FST was dependent on its protein structure integrity and carbohydrate-binding property. ConBr (0,1 µg/site, i.c.v.) caused a potentiation of the action of fluoxetine, a selective 5-HT reuptake inhibitor, in the FST. The anti-immobility effect elicited by ConBr (10 µg/site, i.c.v.) in the FST was prevented by the pretreatment of mice with pindolol (32 mg/Kg, a 5-HT_{1A/1B} receptor/β-adrenoceptor antagonist), NAN-190 (0,54 mg/Kg, a 5-HT_{1A} receptor antagonist), ketanserin (5 mg/Kg, a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist), sulpiride (50 mg/Kg, a D₂ receptor antagonist) or yohimbine (1 mg/Kg, an α₂-adrenoceptor antagonist), but not with SCH 23390 (0,05 mg/Kg, a D₁ receptor antagonist) or prazosin (1 mg/Kg, an α₁-adrenoceptor antagonist). ConBr (10 µg/site, i.c.v.) increased CREB phosphorylation, but not ERK1/2 phosphorylation in mice hippocampus. Fluoxetine (1 nmol/site) increased CREB and ERK1/2 phosphorylation in mice hippocampus. ConBr (10 µg/site, i.c.v.) or fluoxetine (1 nmol/site) treatment did not improve CREB and ERK1/2 phosphorylation in mice pre-frontal cortex. These results indicate that the antidepressant-like effect of ConBr in the FST is dependent on its interaction with the serotonergic (via 5-HT_{1A} and 5-HT₂), noradrenergic (via α₂-adrenoceptors) and dopaminergic (via D₂ receptors) systems and is likely dependent on CREB phosphorylation in hippocampus. Considering the presence of lectins in the brain and based on the results, it will be important to determine a possible role of endogenous lectins in the modulation of central nervous system function.

1.1 Lectinas

Toxinas animais e vegetais têm sido freqüentemente utilizadas no estudo do sistema nervoso central (SNC), pois são ferramentas extremamente úteis na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiologia e patologia do SNC (Gutman e Lazarovici, 1997; Lineal *et al.*, 1998).

Carboidratos, isoladamente ou associados a proteínas e lipídios, atuam como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos, regulando diferenciação, proliferação e interações entre células em condições fisiológicas e patológicas (Liu e Rabinovich, 2005).

As informações presentes na estrutura dos oligossacarídeos, normalmente conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células, podem ser reconhecidas por um grupo especializado de proteínas, as lectinas (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997; Liu e Rabinovich, 2005). Portanto, as lectinas representam um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas ligadoras de carboidratos ou glicoconjugados, sendo encontradas em plantas, animais e microorganismos. Nas células animais as lectinas podem modular a comunicação celular, regulando diversos eventos relacionados ao desenvolvimento, diferenciação e proliferação celular, bem como inflamação e metástase tumoral (Cavada *et al.*, 2001). Apesar de sua abundância em muitas plantas, as lectinas vegetais não possuem sua verdadeira função fisiológica claramente definida. Entre algumas funções propostas para lectinas de plantas estão incluídas: armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes, inibição do crescimento de fungos ou alimentação de insetos (Trigueiros *et al.*, 2003).

Algumas das classes mais conhecidas de lectinas têm sido isoladas de plantas da família Leguminosae. Lectinas provenientes dessa família representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. Na subtribo Diocleinae observa-se pelo menos 13 gêneros, incluindo *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*, dos quais lectinas têm sido isoladas e caracterizadas (Cavada *et al.*, 2001).

A Concanavalina A (ConA), lectina proveniente das sementes de *Canavalia ensiformis* (subtribo Diocleinae), tem sido muito estudada e caracterizada quanto a sua estrutura e efeitos biológicos sobre células de mamíferos. Entretanto, outras lectinas, com similaridade estrutural em relação à ConA, têm sido isoladas das sementes de outras espécies da subtribo Diocleinae. Entre estas se destacam: ConBr extraída da semente de *Canavalia brasiliensis* (Moreira e Cavada, 1984); Dviol, extraída da semente de *Dioclea violacea* (Moreira *et al.*, 1996); CABO, extraída da semente de *Canavalia bonariensis* (Cavada *et al.*, 2001); CFL, extraída da semente de *Cratylia floribunda* (Oliveira *et al.*, 1991); DGuiL, extraída da semente de *Dioclea guianensis* (Vasconcelos *et al.*, 1991). Embora tenham similaridade estrutural e na afinidade por determinados açúcares, as lectinas podem apresentar efeitos biológicos diferenciados (Cavada *et al.*, 2001).

Algumas lectinas pertencentes à subtribo Diocleinae são metaloproteínas que necessitam dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} para exibir sua atividade completa, uma vez que apresentam em sua estrutura sítios de ligação para estes íons divalentes. Cada subunidade apresenta uma cavidade hidrofóbica que parece estar envolvida com o transporte de fitohormônios em plantas (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997). As lectinas Diocleinae apresentam estruturas multiméricas compostas de monômeros de 25,5 kDa e são específicas no reconhecimento dos carboidratos D-glicose e D-manose (Cavada *et al.*, 2001).

No SNC a lectina ConA têm sido utilizada como ferramenta no isolamento de glicoproteínas (Helmholz *et al.*, 2003), no estudo de receptores glutamatérgicos, especialmente AMPA e Cainato (Partin *et al.*, 1993; Yue, *et al.*, 1995; Everts *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 1998), na determinação do papel de neurexinas na liberação de transmissores (Boehm e Huck, 1998) e da própria plasticidade no SNC (Lin e Levitan, 1991; Scherer e Udin, 1994). Apesar destas evidências não existe determinação dos mecanismos moleculares pelos quais estes eventos podem ser modulados.

Os mamíferos apresentam uma grande variedade de proteínas cerebrais (endógenas) ligadoras de glicanos (lectinas) (Cebo *et al.*, 2002). Entretanto, apenas um pequeno número têm sido isolado e caracterizado quanto aos possíveis papéis fisiológicos (Cebo, *et al.*, 2002; Endo, 2005). Entre as lectinas isoladas do cérebro de mamíferos salientam-se as Galectinas (lectinas ligadoras de galactose), lectinas ligadoras de manose e as Siglec (superfamília de lectinas imunoglobulinas ligadoras do ácido siálico). As galectinas desempenham um importante papel durante o desenvolvimento cerebral, incluindo o crescimento de neuritos, diferenciação de astrócitos, aumentando a liberação de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) de astrócitos diferenciados. As lectinas ligadoras de manose estão envolvidas em processos de adesão, migração neuronal e na sinaptogênese, tendo sido isoladas principalmente de cerebelo (Endo, 2005). Já as Siglecs estão envolvidas na formação da bainha de mielina (Endo, 2005).

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

A lectina extraída das sementes da *Canavalia brasiliensis*, ConBr, apresenta muitas similaridades em relação à lectina da *Canavalia ensiformes*, ConA. Estas duas lectinas da subtribo Diocleinae apresentam 99% de similaridade na seqüência de aminoácidos e a

mesma especificidade por glicose/manose e seus derivados. Apenas dois aminoácidos são diferentes na estrutura de ConBr em relação à ConA, sendo que nenhum destes está próximo ao sítio de ligação a carboidratos em ambas lectinas (Fig. 1). Entretanto, as lectinas Dioclainae podem apresentar diferenças em relação à afinidade de ligação aos açúcares, devido a substituições de aminoácidos fora do sítio de ligação aos carboidratos (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997).

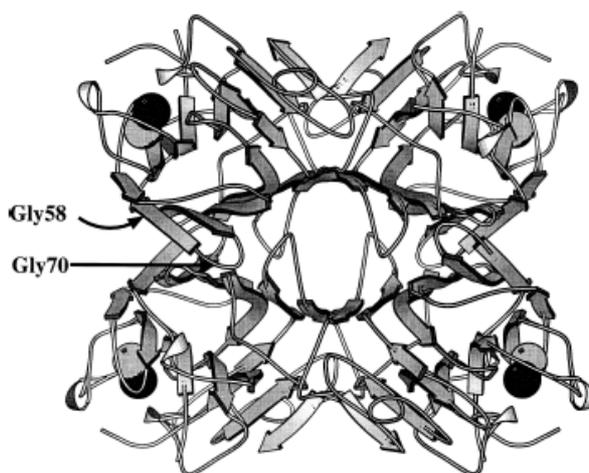


Figura 1. Estrutura cristalográfica da lectina de ConBr. As posições dos resíduos de Gly 58 e Gly 70 em ConBr são substituídas por Asp e Ala em ConA. As esferas cinza e pretas representam os sítios de ligações dos metais de transição Mn^{2+} e Ca^{2+} , respectivamente. (Adaptado de Sanz-Aparicio *et al.*, 1997).

ConA e ConBr apresentam comportamento de oligomerização diferentes, enquanto ConA é um tetrâmero, ConBr exibe uma mistura de dímeros (31%) e tetrâmeros (69%), em pH 7,0. Nas formas dimérica e tetramérica, a ligação de lectinas sobre as células leva à ligação cruzada dos receptores de membrana, a qual pode estar associada com uma variedade de processos de transdução de sinal (Cavada *et al.*, 2001).

1.2 Depressão

A depressão é uma doença severa e crônica que muitas vezes pode levar ao suicídio. Ela se caracteriza como sendo um transtorno do humor com vários sintomas, os quais

incluem alterações somáticas e cognitivas como humor deprimido; anedonia (perda de interesse ou satisfação em quase todas as atividades); perda ou ganho de peso ou de apetite; insônia ou hipersônia; retardo ou agitação psicomotora; fadiga ou perda de energia; sentimentos de desvalia ou culpa; diminuição da concentração e pensamentos recorrentes de morte ou suicídio. Para o diagnóstico de um episódio depressivo é necessária a constatação de no mínimo cinco entre estes nove sintomas, sendo um deles obrigatoriamente humor deprimido ou anedonia, presentes na maior parte do tempo, com uma duração mínima de duas semanas (American Psychiatric Association, 1994).

Os transtornos de humor estão entre as formas mais prevalentes de doenças psiquiátricas em todo o mundo. De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde) cerca de 15% da população mundial é atingida pelo transtorno depressivo em pelo menos um momento da vida, sendo que metade desses precisará de tratamento contínuo. Afeta duas vezes mais mulheres do que homens, com uma expectativa de que 10% a 30% das mulheres e de 7% a 15% dos homens sofrerão de depressão durante a vida (Nestler *et al.*, 2002; Malberg e Blendy, 2005).

A depressão maior não tem uma causa identificável na maioria dos casos. Entretanto, existem fatores de risco que podem desencadear um episódio depressivo em determinadas pessoas. Cerca de 40% a 50% dos casos de depressão apresenta um componente genético (Fava e Kendler, 2000). Os genes relacionados a este processo não são conhecidos, talvez porque a depressão é um fenômeno complexo com muitos genes envolvidos. Um estudo recente tem apontado canais de K^+ do tipo TREK-1 (que podem ser regulados por serotonina), como um dos possíveis alvos moleculares envolvidos no processo depressivo (Heurteaux *et al.*, 2004).

A vulnerabilidade a depressão inclui também fatores não genéticos, como estresse e trauma emocional (Akiskal, 2000). Além disso, diversas condições patológicas como distúrbios endócrinos, doença de Parkinson, câncer, asma e diabetes podem gerar um quadro depressivo. A depressão não deve ser vista como uma única doença, mas uma síndrome que compreende numerosas doenças de distintas causas e patofisiologias (Nestler, *et al.*, 2002).

A depressão resulta da disfunção de vários sistemas de neurotransmissores ou sistemas metabólicos. Os primeiros fármacos com efeitos comprovadamente benéficos sobre o humor agiam primariamente sobre o sistema monoaminérgico, como inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO), ou inibidores da recaptção de monoaminas (Nemeroff e Owens, 2002). Esta constatação sugeriu que os antidepressivos atuassem por aumento da transmissão serotoninérgica e noradrenérgica, compensando um possível estado de deficiência de neurotransmissores. Assim surgiu a Hipótese Monoaminérgica da Depressão, que postula que a depressão resulta de uma deficiência de serotonina ou noradrenalina, ou ainda de receptores deficientes (Mann *et al.*, 1996; Wong e Licínio, 2001). Esta hipótese é evidenciada por diversos fatores como o aumento na concentração de serotonina ou noradrenalina na fenda sináptica durante o tratamento com antidepressivos, devido ao bloqueio da recaptção destes neurotransmissores (Baldessarini, 1996); baixos níveis plasmáticos de serotonina observados em pacientes com depressão maior (Nestler *et al.*, 2002); reduzido nível do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), um metabólito da serotonina, encontrado no líquido de pacientes com depressão (Ricci e Wellmen, 1990). No entanto esta hipótese é bastante simplista e falha ao não explicar a ação de alguns antidepressivos que não agem sobre o sistema monoaminérgico além da discrepância temporal entre o aumento na concentração de monoaminas logo após o início

do tratamento com fármacos antidepressivos e os efeitos clínicos dos mesmos, que são bem mais tardios (Baldessarini, 1996).

Atualmente outras hipóteses têm sido postuladas tais como a hipótese Neurotrófica da Depressão, a qual sugere que uma deficiência nas neurotrofinas cerebrais pode contribuir para uma alteração hipocampal e desenvolvimento da depressão. Um dos mais abundantes fatores neurotróficos do cérebro adulto, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), apresenta níveis diminuídos no hipocampo e giro denteado após um período de estresse crônico ou agudo (Smith *et al.*, 1995). O tratamento crônico com antidepressivos aumenta a expressão de BDNF nestas regiões (Chen *et al.*, 2001). A indução de BDNF mediada pelo tratamento com antidepressivos é parcialmente mediada via o fator de transcrição CREB (Figura 2).

O mecanismo celular preciso das alterações estruturais em transtornos depressivos não está completamente compreendido, porém a caracterização de cascatas de transdução de sinais que controlam a atrofia neuronal, morte celular programada e a neuroplasticidade tem contribuído para a compreensão deste processo ao nível molecular (Bailey *et al.*, 2004).

Alterações morfológicas têm sido apontadas em regiões específicas do SNC durante a depressão. Estudos de imagem de pacientes com depressão têm demonstrado alterações no fluxo sanguíneo de algumas regiões do cérebro como os córtices pré-frontal e cingulado, hipocampo, estriado, amígdala e tálamo (Drevets, 2001; Liotti e Mayberg, 2001). Os transtornos de humor têm sido associados com reduções regionais no volume do SNC e no número e tamanho das células gliais e neurônios em algumas áreas do cérebro (Manji *et al.*, 2001). Outros estudos *post-mortem* demonstram uma redução no tamanho do hipocampo

em indivíduos deprimidos, quando comparado ao hipocampo de indivíduos normais (Sheline *et al.*, 2003).

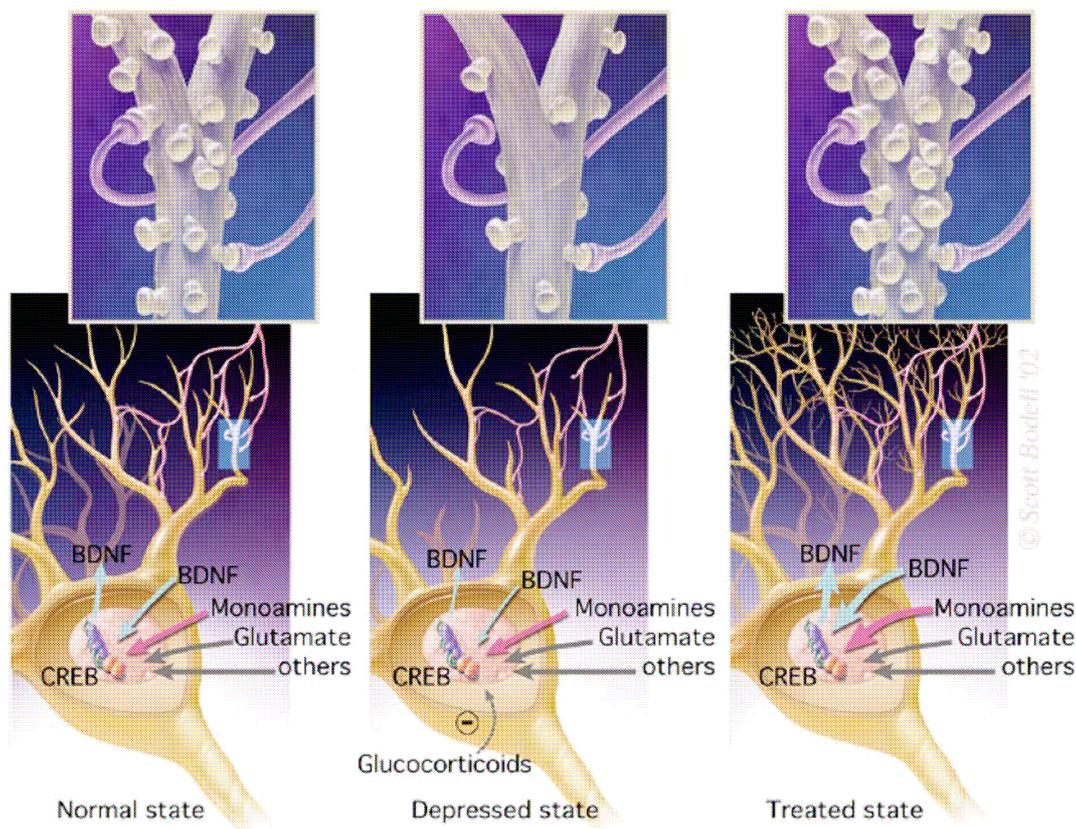


Figura 2. Mecanismo neurotrófico da depressão. A figura da esquerda está demonstrando um neurônio piramidal do hipocampo normal e sua inervação por neurônios glutamatérgicos, monoaminérgicos, além de sua regulação pelo BDNF. Os neurotransmissores e BDNF podem ativar o fator de transcrição CREB, que estimula a transcrição de diversos genes incluindo o de BDNF. Isso reforça os contatos sinápticos, favorecendo a manutenção de espinhas dendríticas. O estresse ou aumento na liberação de glicocorticóides interfere na ativação de CREB, levando à redução nos níveis de BDNF, diminuição da arborização dendrítica e contatos sinápticos (figura do meio). O tratamento com antidepressivos, ativa os sistemas de neurotransmissão, ativa CREB, reforçando a produção de BDNF e recuperando os contatos sinápticos e a arborização dendrítica (figura da direita) (Nestler *et al.*, 2002).

A função de algumas regiões do cérebro em condições normais indica a possível contribuição de cada uma delas nos diversos aspectos comportamentais e emocionais da depressão. O neocórtex e o hipocampo podem mediar aspectos cognitivos relacionados à

depressão, como déficit de memória e pensamentos suicidas. O estriado e a amígdala são importantes na memória emocional e poderiam estar envolvidos na anedonia, ansiedade e diminuição da motivação. Adicionalmente, tem sido especulado um papel do hipotálamo em relação aos sintomas neurovegetativos que incluem insônia ou hipersonia, alterações do apetite e diminuição do interesse sexual (Nestler *et al.*, 2002).

1.2.1 Modelos Animais Preditivos de Drogas com Ação Antidepressiva

Os modelos animais são ferramentas necessárias na identificação de novas drogas que possam atuar como antidepressivos. Existem diversos modelos comumente usados, mas o Teste do Nado Forçado (TNF), em particular, é muito útil pela facilidade de uso e por ser sensível ao tratamento agudo com antidepressivos. O TNF foi desenvolvido por Porsolt *et al.* (1977). Este modelo baseia-se no fato de que os animais submetidos ao estresse lutam inicialmente com movimentos orientados para a fuga, seguidos de períodos de postura imóvel quando colocados em um cilindro de água (Petit-Demouliere *et al.*, 2005). Os antidepressivos atuam através da diminuição do tempo de imobilidade dos animais neste modelo (Porsolt *et al.*, 1977).

1.2.2 Tratamentos

Em meados do século XX ocorreu uma grande inovação na pesquisa sobre o tratamento farmacológico para a depressão, quando foi verificado que a iproniazida, medicamento desenvolvido para o tratamento da tuberculose, elevava o humor em pacientes com tuberculose. Um ano depois, verificou-se que a iproniazida era capaz de inibir a enzima monoamino oxidase (MAO) (Delay *et al.*, 1952). Alguns anos mais tarde,

acidentalmente, foi verificada a ação antidepressiva da imipramina, um antidepressivo tricíclico (Kuhn, 1958).

Atualmente, apesar da limitada compreensão dos mecanismos envolvidos na depressão, o tratamento desta patologia tem sido aperfeiçoado e mostra uma relativa eficiência. Tanto a terapia eletroconvulsiva (ECT) quanto certas psicoterapias e medicamentos antidepressivos têm demonstrado alguma eficácia no tratamento da depressão (Nemeroff e Owens, 2002). Os antidepressivos também tem sido úteis na correção de outros distúrbios como, anorexia, bulimia, ansiedade, catalepsia, narcolepsia, déficit de atenção, hiperatividade, distúrbio obsessivo compulsivo, distúrbio do pânico, distúrbio do estresse pós-traumático, enurese, enxaqueca, tabagismo, náuseas (na quimioterapia) e dor crônica (Matos e Sousa, 1999).

Recentemente, as pesquisas sobre o mecanismo de ação dos antidepressivos têm identificado a modulação de proteínas de sinalização intracelular e de genes que podem contribuir na resposta ao tratamento (Duman et al., 2000; Wong e Licinio, 2001).

Os antidepressivos podem agir por mecanismos distintos. Alguns atuam inibindo a ação da MAO, outros sobre os sistemas de recaptação das monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina). Podem ainda ser inibidores seletivos da recaptação de serotonina. Outras drogas dotadas de ação antidepressiva atuam como agonistas de receptores 5-HT_{1A}, ou ainda como antagonistas de receptores 5-HT₂ e da substância P (Maubach, 1999). Os receptores N-metil D-aspartato (NMDA) e a via da L-arginina-óxido nítrico (NO) também estão implicados na patofisiologia da depressão. Antagonistas de receptores NMDA, como o MK-801, e compostos que reduzem a transmissão glutamatérgica apresentam propriedades antidepressivas (Skolnick et al., 1999; Petrie et al., 2000). Além disso, tem sido sugerido que o óxido nítrico está envolvido na regulação de vários processos

comportamentais e cognitivos, incluindo aprendizado, agressão, ansiedade e depressão (Harkin *et al.*, 2003). Inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS) apresentam efeito antidepressivo no teste do nado forçado (TNF) (da Silva *et al.*, 2000; Harkin *et al.*, 2003, Volke *et al.*, 2003).

1.3 Sinalização Celular

A sinalização celular é um evento onde um ligante externo (por exemplo, um neurotransmissor) é capaz de produzir uma resposta específica da célula. As células respondem a sinais extracelulares através de mecanismos como, transdução de sinais iniciados pela interação de ligantes extracelulares (hormônios, citocinas, neurotransmissores, fatores de crescimento e outras moléculas de sinalização) com receptores específicos ancorados principalmente na membrana plasmática, ou também no citoplasma ou núcleo. Os sinais são transduzidos da superfície celular para o interior da célula através da interação proteína-proteína ou pela geração de segundos mensageiros como o cálcio, diacilglicerol, inositol 1,4,5-trifosfato, AMPc e GMPc, que levam à ativação de proteínas cinases específicas. O resultado final da ativação de uma via de sinalização é a fosforilação de proteínas alvo específicas que alteram sua função modulando a função celular (Hunter, 2000; Greengard, 2001; Thomas e Huganir, 2004).

A fosforilação de proteínas é um mecanismo fundamental na regulação das diversas funções celulares em resposta aos sinais extracelulares via receptores (Greengard, 2001; Leal *et al.*, 2002). Um sistema de fosforilação consiste de uma proteína cinase, uma proteína fosfatase e uma proteína aceptora de fosfato (proteína substrato). A proteína substrato é convertida da forma defosforilada para a forma fosforilada pela proteína cinase, e o retorno para a forma defosforilada é realizado pela proteína fosfatase.

1.3.1 Proteínas Cinases Ativadas por Mitógeno (MAPKs)

Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) representam uma família de serina-treonina cinases que medeiam a transdução de sinal intracelular em resposta a diversos estímulos. As MAPKs regulam diversas atividades, incluindo respostas de estresse, alteração morfológica, diferenciação e proliferação celular, apoptose, transformação celular e regulação da plasticidade sináptica (Chang e Karin, 2001; Chen et al., 2001; Thomas e Huganir, 2004; Schenk *et al.*, 2005).

A ativação das MAPKs é dependente de outras cinases colocadas anteriormente a elas na via de sinalização, sendo chamadas cinases das MAPKs (MAPKK) (Hagemann e Blank, 2001). Desta forma, a fosforilação reversível das MAPKs sobre um resíduo de treonina e um resíduo de tirosina, conduz a sua ativação (Chang e Karin, 2001; Chen *et al.*, 2001). A cascata de sinalização das MAPKs está representada na figura 3.

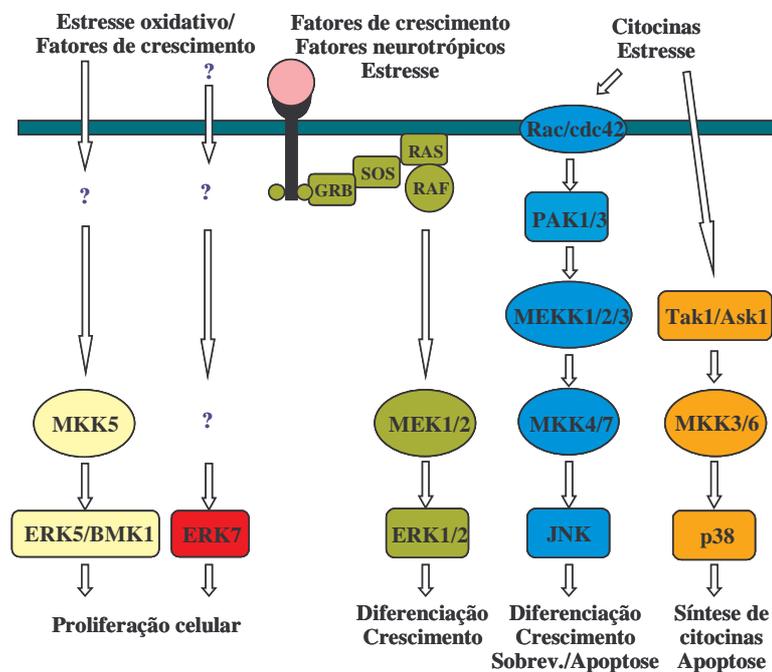


Figura 3. Cascata de sinalização das MAPKs.

Três MAPKs principais têm sido caracterizadas: proteína cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), c-Jun amino-terminal kinase (JNK) e p38^{MAPK}. JNK e p38^{MAPK} são ativadas por diversos estímulos ambientais de estresse e citocinas (Mielk e Herdegen, 2000; Nebreda e Porras, 2000), enquanto ERK1/2 estão geralmente envolvidas na resposta a fatores de crescimento (ex. PDGF, EGF, BDNF), mediando proliferação e diferenciação celular entre outras respostas (Wang e Bonner, 2000). As ERKs também participam da formação de memória hipocampal e da plasticidade sináptica (Sweatt, 2004; Thomas e Huganir, 2004). A JNK apresenta funções fisiológicas relevantes para o cérebro em desenvolvimento, tais como neurodegeneração e ativação microglial (Kuan *et al.*, 1999; Bonny *et al.*, 2005). As MAPKs possuem diversos alvos, como fatores de transcrição, entre estes destacam-se ELK, CREB, c-Jun, c-Fos (Chen *et al.*, 2001).

A ativação da ERK pode ocorrer por vias distintas. Quando um ligante se une ao receptor tirosina cinase, vários módulos de sinalização são ativados, incluindo a cascata das proteínas cinases, onde Ras, Raf, MEK e ERK são ativadas consecutivamente (Thomas e Huganir, 2004). Após a ativação de receptores acoplados a proteína G, ou em resposta a despolarização ou a estimulação de receptores glutamatérgicos ocorre um aumento da concentração intracelular de cálcio $[Ca^{2+}]_i$ que pode também induzir ativação de ERK1/2 (Dolmetsch *et al.*, 2001), possivelmente através de proteínas cinases Ca^{2+} /calmodulina dependentes. A resultante deste processo é a estimulação de genes que são essenciais à sobrevivência e plasticidade neuronal (Dolmetsch *et al.*, 2001).

Grande parte dos receptores, canais iônicos, proteínas de matriz extracelular e transportadores de neurotransmissores, são de natureza glicoprotéica e podem de forma direta ou indireta modular uma diversidade de cascatas de sinalização, incluindo as vias dependentes de MAPKs. Os resíduos de açúcar presentes são alvos potenciais de lectinas

(Partin *et al.*, 1993; Yue, *et al.*, 1995; Everts *et al.*, 1997; Hoffman *et al.*, 1998). Algumas evidências da ação das lectinas, especialmente ConA, sobre a via de MAPKs, têm sido demonstradas, tais como: estímulo de tirosina cinases e de ERK1/2 em neutrófilos (Ohta *et al.*, 1992); estímulo de JNK-1, através da modulação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em timócitos (Pani *et al.*, 2000); ativação de JNK na apoptose de células leucêmicas humanas (U937) (Park *et al.*, 2000); produção de ROS em neutrófilos (Liang *et al.*, 1990), que também pode modular as via de MAPKs, especialmente JNK e p38^{MAPK}. Apesar disso, existem poucos trabalhos na literatura que caracterizem a modulação das vias de MAPKs por lectinas. Recentemente, nosso grupo mostrou alguns efeitos de ConBr sobre a modulação de MAPK em sinaptossomas e em células de glioma da linhagem C6 que sugerem a possibilidade de sua aplicação como ferramenta de estudo e/ou detecção de novos alvos capazes de modular as vias dependentes de MAPKs (Pereira, 2005).

Vários estudos têm demonstrado uma relação na modulação de ERK1/2 com diversas drogas que apresentam efeito antidepressivo. A memantina, uma droga que, quando injetada em ratos e camundongos, apresenta ação antidepressiva no modelo do teste do nado forçado (TNF) (Rogóz *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2006), pode envolver a modulação da via de ERK1/2 (Almeida *et al.*, 2006). O lítio e o valproato, dois estabilizadores de humor, levam a um aumento da fosforilação de ERK1/2 no hipocampo e córtex frontal de ratos tratados cronicamente com doses terapêuticas destes compostos (Einat *et al.*, 2003). O valproato parece também aumentar os níveis de fosfo-ERK (p-ERK) em culturas de células (Yuan *et al.*, 2001). A exposição neonatal de ratos a clomipramina, um modelo animal de depressão, levou a uma diminuição nos níveis de p-ERK1/2 no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos adultos (Feng *et al.*, 2003). Outros trabalhos têm demonstrado uma diminuição na fosforilação de ERK1/2 no hipocampo de ratos após o

tratamento crônico com fluoxetina, enquanto que a imipramina, um antidepressivo tricíclico, não alterou os níveis de pERK1/2 no hipocampo e promoveu um aumento de pERK no córtex pré-frontal (Fumagalli *et al.*, 2005). Estudos *post-mortem* de pacientes com depressão e indivíduos suicidas demonstram uma diminuição nos níveis totais de ERK e aumentados níveis de CREB em pacientes que estavam fazendo uso de algum antidepressivo (Dwivedi *et al.*, 2001; D'Sa e Duman, 2002).

A ação de muitos antidepressivos está relacionada com receptores do tipo serotoninérgico, ou por aumentar a concentração de 5-HT na fenda ou por diminuir sua recaptação. A união de ligantes específicos as subunidades 5-HT_{2A} e 5-HT_{7A} do receptor serotoninérgico, acopladas a proteína Gq e Gs respectivamente, leva a um aumento na fosforilação de ERK1/2 dependente de Ca²⁺, em um modelo de cultura de células PC12 (Johnson-Farley *et al.*, 2005).

Vários antidepressivos que aumentam as concentrações sinápticas de 5-HT ou NA, parecem estimular a cascata de MAPK/ERK devido à ativação de um receptor acoplado à proteína G. A ativação de fatores de transcrição pela ERK, como CREB, pode levar ao aumento na expressão de BDNF, promovendo aumento da neurogênese, plasticidade sináptica e alterações comportamentais em modelos de depressão (Coyle e Duman, 2003).

1.3.2 Proteína de Ligação ao Elemento Responsivo ao AMPc (CREB)

CREB é um fator de transcrição, localizado no núcleo das células, sendo abundante no sistema nervoso. A modulação da atividade dos fatores de transcrição é crucial para que os estímulos sobre os receptores de membrana da célula causem alterações na expressão gênica, regulando a expressão de proteínas e com isso sejam capazes de produzir as alterações neurais, essenciais nos processos de modulação sináptica (Carlezon *et al.*, 2005).

A transcrição gênica mediada pelo CREB ocorre pela sua ligação ao CRE (elemento de resposta ao AMPc), na forma de dímero (Yamamoto *et al.*, 1988). Esta ligação ocorre sob condições basais, em um estado inativo. No processo de transdução de sinal intracelular os dímeros de CREB são fosforilados, por diversas proteínas cinases, e iniciam o processo de transcrição (Mayr e Montminy, 2001). CREB é ativado quando a fosforilação ocorre em um resíduo específico de serina, a serina 133 (Ser-133), promovendo a associação do CREB à CBP (proteína de ligação ao CREB) (Chrivia *et al.*, 1993).

Várias vias de sinalização envolvendo adenilato ciclase (AC) e AMPc, Ca^{2+} e MAPKs culminam com a ativação de CREB. A ativação de receptores noradrenérgicos e serotoninérgicos por antidepressivos pode aumentar os níveis intracelulares de AMPc. O AMPc leva à ativação da PKA devido à dissociação das subunidades catalíticas, que uma vez dissociadas entram no núcleo e fosforilam Ser-133 sobre CREB (Carlezon *et al.*, 2005). A fosforilação de CREB pode ocorrer também via Ca^{2+} -calmodulina cinase (CaMK)-II e -IV (Braun e Shulman, 1995). A fosforilação via CaMKs ocorre em alguns subtipos de receptores, como α -1 noradrenérgico e 5-HT₃ serotoninérgico, que são receptores acoplados ao fosfatidil inositol e canais iônicos seletivos a Na^+ e K^+ , respectivamente. Através do influxo de Ca^{2+} ocorre a ativação de CaMK (Sheng *et al.*, 1990). Além disso, outras vias como Ras-Raf-MEK-ERK podem fosforilar Ser-133 de CREB, via RSK 2 (Xing *et al.*, 1996) (Fig. 4).

Tem sido demonstrado que o tratamento com antidepressivos (inibidores seletivos da recaptação de serotonina ou os tricíclicos) produz efeitos neurotróficos/protetores contra vários insultos e pode modular diversos fatores envolvidos na sobrevivência e crescimento celular, tais como; fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), proteínas citoprotetoras, como a proteína antiapoptótica Bcl-2 (Manji *et al.*, 2000; D'Sa e Duman, 2002).

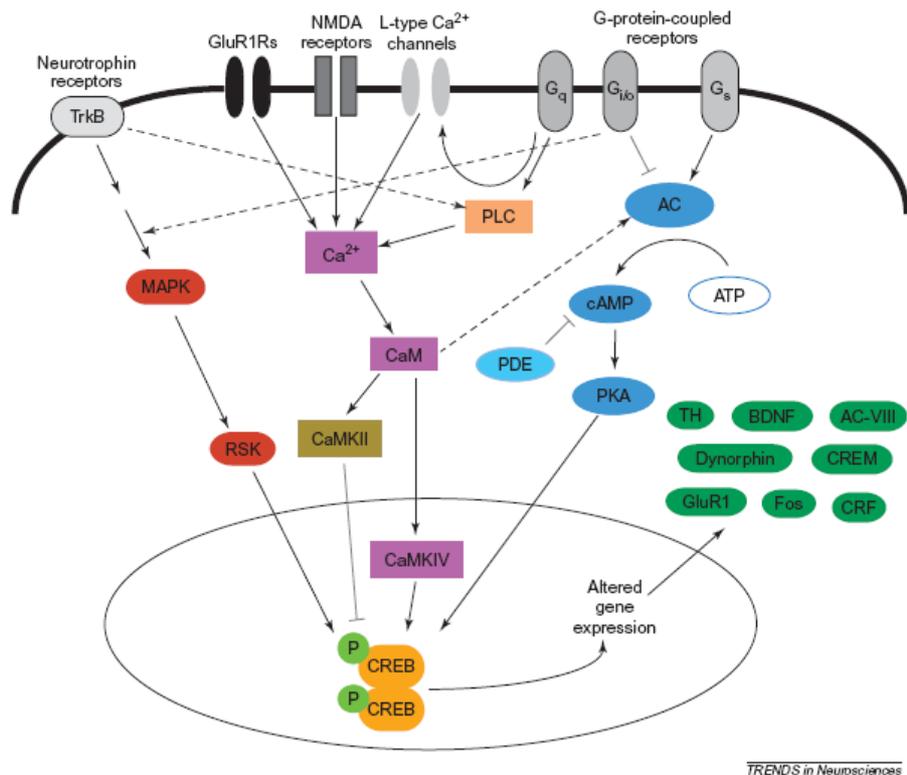


Figura 4. Algumas vias de transdução do sinal intracelular envolvidas na regulação do CREB. Alguns neurotransmissores e neurotrofinas agem em receptores localizados na membrana celular para desencadear a cascata de sinalização celular que culminam na fosforilação de CREB. A fosforilação de CREB no resíduo 133 de serina ativa a transcrição gênica mediada pelo CREB. As vias demonstradas na figura apontam para as diversas interações que ocorrem entre as cascatas de sinalização, demonstradas pelas linhas pontilhadas. As proteínas produtos de numerosos alvos de CREB são demonstradas em verde. As setas pretas indicam ativação e as cinzas inibição (Carlezon *et al.*, 2005).

Dependendo da região, aumento ou diminuição dos níveis de CREB pode apresentar diferentes efeitos. No hipocampo, um aumento na atividade de CREB parece estar relacionado com atividade antidepressiva (Chen *et al.*, 2001; Tiraboschi *et al.*, 2004). No núcleo accumbens, a atividade aumentada de CREB está envolvida com sintomas depressivos (Pandey *et al.*, 2003). A super-expressão de CREB no giro denteado de ratos diminui o tempo de imobilidade destes animais no teste do nado forçado (TNF), comportamento semelhante ao observado em animais tratados com antidepressivos. Na região CA1 do hipocampo ou no córtex pré-frontal o tempo de imobilidade dos animais no

TNF não é alterado (Chen *et al.*, 2001). No núcleo accumbens e na amígdala, a super-expressão de CREB produz efeitos semelhantes à depressão no TNF (Pliakas *et al.*, 2001; Wallace *et al.*, 2004).

O tratamento com diversos antidepressivos, como inibidores da recaptação de serotonina e de noradrenalina, aumentam a atividade de CREB no hipocampo (Thome, *et al.*, 2000). A fluoxetina, inibidor da recaptação de serotonina, parece aumentar a atividade de CREB no córtex pré-frontal e hipocampo de ratos, via CaMK IV e MEK/ERK (Tiraboschi *et al.*, 2004). Níveis aumentados de pCREB no hipocampo e córtex frontal de ratos foi observado após o tratamento crônico com doses terapêuticas de lítio e valproato, dois estabilizadores de humor utilizados frequentemente na clínica (Einat *et al.*, 2003). Um recente estudo demonstrou que a expressão de CREB não foi alterada no hipocampo de ratos que receberam tratamento crônico com fluoxetina, mas no córtex pré-frontal ocorre um aumento de pCREB (Lainfenfeld *et al.*, 2005). As variações nos níveis de pCREB após o tratamento com antidepressivos mencionados parecem ser dependentes do tipo de célula e da região do cérebro examinada, bem como o tempo para a coleta da amostra após o tratamento com antidepressivos (Blendy, 2006).

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a quantidade de efeitos biológicos das lectinas vegetais em diversos modelos e sua propriedade de ligação a resíduos de carboidratos, parece promissor avaliar sua ação como uma possível ferramenta no estudo da neurotransmissão envolvida com a depressão, buscando compreender os mecanismos moleculares envolvidos, incluindo as vias de sinalização implicadas nos efeitos comportamentais observados.

Devido a sua natureza glicoprotéica, várias proteínas de sinalização celular são alvos potenciais de ligações de lectinas. Dentre as vias de sinalização mais estudadas, a cascata das MAPKs merece especial atenção, uma vez que essas proteínas estão envolvidas em inúmeras atividades celulares, incluindo proliferação, diferenciação e respostas ao estresse.

Adicionalmente, considerando a existência de lectinas endógenas no cérebro de mamíferos, é pertinente o estudo da ação de lectinas de origem vegetal, sobre os sistemas neurais e de comunicação intracelular envolvidos em determinados comportamentos animais, como os relacionados à depressão.

3.1 Objetivo Geral

Investigar a ação antidepressiva da lectina ConBr em um modelo animal preditivo de atividade antidepressiva e seu efeito sobre a fosforilação da proteína MAPK/ERK1/2 e do fator de transcrição CREB.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar o eventual efeito antidepressivo da lectina ConBr no teste de nado forçado (TNF) e avaliar seu efeito sobre a atividade locomotora em camundongos;
- Comparar o efeito antidepressivo de ConBr com outras lectinas da mesma família com estrutura química similar;
- Investigar a participação dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico sobre os efeitos antidepressivos da lectina ConBr no TNF ;
- Caracterizar a modulação da proteína MAPK/ERK1/2 e do fator de transcrição CREB em resposta à ConBr;
- Verificar a distribuição intracerebral de ConBr, após a sua injeção via i.c.v.

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 22-27°C com água e comida *ad libidum*, em ciclo claro/escuro 12:12 hs (iluminação das 7:00 às 19:00h), sendo manipulados e mortos de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolos aprovados pelo CEUA (297/CEUA; Processo No. 23080.012517/2004-36).

4.2 Drogas e Reagentes

Acrilamida, bis-acrilamida, ácido bórico, B-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[®]. Anticorpos anti-fosfo CREB (rabbit) e anti-CREB (rabbit) foram obtidos da Cell Signaling[®]. Hidróxido de sódio foi adquirido da Merck[®]. Reagente de Folin, albumina de soro bovina (BSA), anticorpos anti-fosfo ERK (mouse) e anti-ERK (rabbit), Fluoxetina, Ioimbina, Prazosim, SCH 23390, Cetanserina, Pindolol, NAN-190, Sulpirida foram obtidos da Sigma[®]. Soluções fixadora e reveladora para filmes de raio-x (GBx) e filmes radiográficos (ECL) sensíveis à quimiluminescência eram da KODAK[®].

4.3 Purificação das Lectinas e Produção da ConBr Marcada com FITC e

ConBr Conjugada a Manose

A lectina ConBr (Moreira e Cavada, 1984) e a lectina ConA (Summer e Howell, 1936) foram isoladas por cromatografia de afinidade.

Para produzir a lectina ConBr conjugada a FITC, a lectina foi dissolvida separadamente em uma solução 0,1 M de α -metil-D-manose e então misturada com 2 ml de uma solução de conjugação (1,5 ml de tampão carbonato/bicarbonato de sódio 0,2 M, pH 9,3 com 0,5 ml de etileno glicol). Após agitação (vortex), 500 μ l da solução de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (0,05 mg dissolvido em etileno glicol) foi adicionada e o material foi submetido à agitação constante por 5 hs a 4°C no escuro. Depois da incubação o complexo lectina – FITC foi separado da FITC não conjugada por cromatografia de exclusão molecular com o uso de uma coluna P10 previamente equilibrada com água Milli-Q, saturada com 5 % de *n*-butanol mantida em fluxo constante. Logo após a cromatografia, 450 μ l de solução de equilíbrio foi adicionada à fração lectina – FITC e liberada da coluna. O complexo foi eluído com 3,5 ml de *n*-butanol, enquanto que a FITC não conjugada foi eluída com 10 ml.

Para produzir a lectina conjugada a seu açúcar específico (ConBr – Man), pesou-se a lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* em um tubo de ensaio e diluiu-se em tampão PBS-0,1M com NaCl 0,15M na proporção de 1:10 (p/v). Em seguida adicionou-se o açúcar específico (alfa-metil manosídeo) na concentração de 0,1M. Agitou-se a solução por 1 hora a 37°C, favorecendo dessa forma a conjugação. Após esse tempo a solução foi dialisada contra água destilada para a remoção do açúcar livre e depois liofilizada a fim de se obter o pó da lectina conjugada com o açúcar específico para ser utilizada nos ensaios biológicos.

4.4 Tratamento

Os animais foram anestesiados com éter etílico e então tratados com a lectina ConBr (0,5 – 50 $\mu\text{g/sítio}$, 5 μl) ou com a fluoxetina (0,1 nmol/sítio e 1 nmol/sítio), ambas diluídas em tampão HEPES-salina sem glicose, a mão livre via i.c.v. com uma agulha de 26G conectada à uma microseringa Hamilton no ventrículo lateral direito ou esquerdo (não foram observadas diferenças entre os dois) (Figura 5). Após 8 minutos do tratamento os animais foram avaliados no campo aberto e em seguida, no teste do nado forçado (TNF). O grupo controle foi tratado com tampão HEPES salina sem glicose (124mM de NaCl, 4mM de KCL, 1,2mM deMgSO₄, 25mM de HEPES, 1mM de CaCl₂, pH 7,4). Ao término dos experimentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os cérebros foram removidos para verificação do sítio de injeção. Os animais em que o sítio de injeção não foi claramente visível, ou não atingiu corretamente o ventrículo lateral, foram descartados.

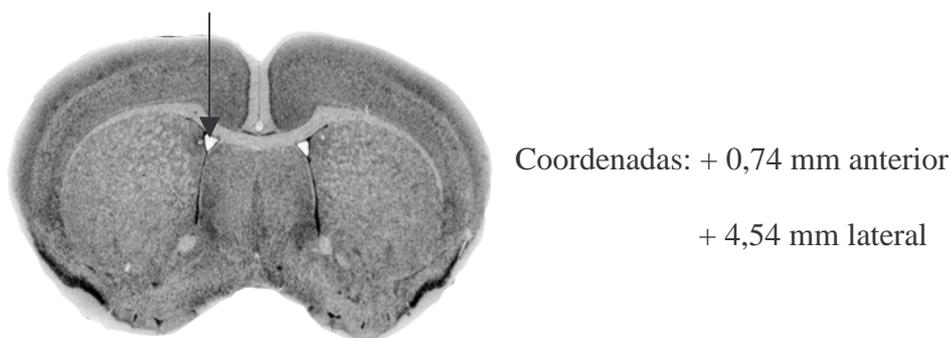


Figura 5. Corte histológico coronal do cérebro de camundongo demonstrando o local da injeção via i.c.v. no ventrículo lateral (seta).

Para avaliar a ação da lectina ConBr sobre receptores específicos, os animais foram pré-tratados com antagonistas de receptores monoaminérgicos via intraperitoneal (i.p.). Após 30 min receberam a lectina via i.c.v. (conforme especificado acima) e foram submetidos ao TNF (ver esquema geral dos tratamentos na Figura 6).

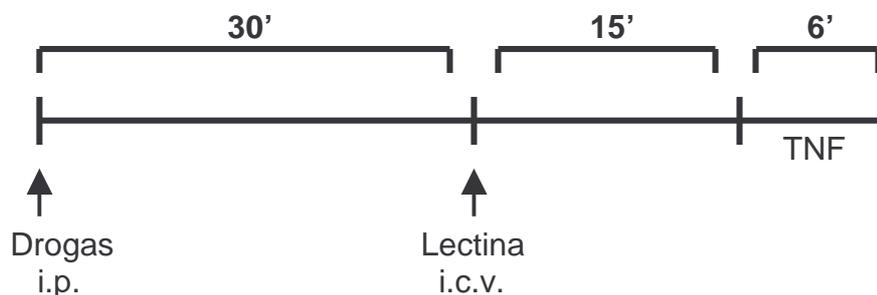


Figura 6. Esquema da administração da lectina e das drogas.

4.5 Testes Comportamentais

4.5.1 Teste do Nado Forçado

O TNF foi desenvolvido por Porsolt et al. (1977) para auxiliar a pesquisa com drogas antidepressivas. O objetivo era criar um modelo animal que reproduzisse comportamento semelhante à depressão e que fosse sensível a drogas clinicamente efetivas utilizadas no tratamento desta doença. O modelo se baseou na observação de que ratos e camundongos quando forçados ao nado numa situação da qual eles não poderiam escapar, após um período de agitação, adotam uma postura de imobilidade. Um camundongo é considerado imóvel quando ele flutua ou faz movimentos necessários apenas para manter a sua cabeça acima da água.

O teste foi realizado durante um período de 6 minutos em um cilindro plástico (altura 24 cm, diâmetro 10 cm) contendo 19 cm de água a 25°C. O tempo de imobilidade foi cronometrado, conforme descrito anteriormente (Eckeli et al., 2000; Zomkowski et al., 2004). Os antidepressivos reduzem o tempo de imobilidade neste teste (Porsolt et al., 1977).

4.5.2 Atividade Locomotora no Campo Aberto

A fim de excluir a possibilidade de que uma redução da imobilidade no teste do nado forçado (TNF) seja devida apenas a um aumento na atividade locomotora, os camundongos foram submetidos a uma sessão no teste do campo aberto, como descrito por Rodrigues et al. (1996). O teste foi realizado em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm altura, no qual o chão é dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com as quatro patas (cruzamentos) foi registrado em uma sessão de 6 minutos.

4.6 Análise do Mecanismo de Ação Através de Estudos Farmacológicos *in vivo*

De acordo com os resultados obtidos com a lectina ConBr foi analisado o mecanismo de ação utilizando ferramentas farmacológicas (agonistas e antagonistas específicos).

4.6.1 Influência do Sistema Serotoninérgico

Para investigar o envolvimento do sistema serotoninérgico na ação antidepressiva da lectina ConBr, os camundongos foram tratados com a fluoxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina. Foi injetada, via i.c.v., uma única injeção com doses subativas de ConBr (0,1 µg/sítio) e fluoxetina (0,1 nmol/sítio) ou veículo. Após 15 minutos os animais foram submetidos ao TNF.

A fim de investigar a participação de sub-tipos de receptores serotoninérgicos no efeito antidepressivo da droga em estudo, os camundongos foram pré-tratados com cetanserina (antagonista 5-HT_{2A}; 5 mg/Kg, i.p.), pindolol (bloqueador β-adrenérgico com atividade antagonista 5-HT_{1A}/5-HT_{1B}; 32 mg/Kg, i.p.) ou NAN-190 (antagonista 5-HT_{1A};

0,5 mg/Kg, i.p.) conforme descrito por Zomkowski et al. (2004). Após 30 minutos, os animais receberam uma injeção i.c.v de ConBr (10 µg/sítio) ou veículo e então (depois de 15 minutos) foram submetidos ao TNF (ver Tabela 1, onde é apresentado resumidamente os diversos antagonistas utilizados).

4.6.2 Influência dos Sistemas Dopaminérgico e Noradrenérgico

Os camundongos foram tratados com sulpirida (antagonista dopaminérgico D₂; 50 mg/Kg, i.p.), SCH 23390 (antagonista dopaminérgico D₁; 0,05 mg/Kg, s.c.), prazosim (antagonista α₁-adrenérgico; 62,5 µg/Kg, i.p.) e ioimbina (antagonista α₂-adrenérgico; 1 mg/Kg, i.p.) e após 30 minutos foram injetados por via i.c.v. (Rodrigues et al., 2002) com a lectina ConBr. Após 15 minutos da injeção i.c.v., os camundongos foram submetidos ao TNF (Tabela 1).

	DROGA	AÇÃO	DOSE
SIST. SEROTON.	CETANSERINA PINDOLOL NAN-190	ANTAG. 5-HT _{2A} ANTAG. 5-HT _{1A} ANTAG. 5-HT _{1A}	5 mg/Kg, i.p. 32 mg/Kg, i.p. 0,5 mg/Kg, i.p.
SIST. DOPAMIN.	SULPIRIDA SCH 23390	ANTAG. D ₂ ANTAG. D ₁	50 mg/Kg, i.p. 0,05 mg/Kg, s.c.
SIST. NORADREN.	PRAZOSIM IOIMBINA	ANTAG. α ₁ ANTAG. α ₂	62,5 µg/Kg, i.p. 1 mg/Kg, i.p.

Tabela 1. Resumo geral das drogas antagonistas dos sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico.

4.7 Obtenção dos Córtices e Hipocampos

As estruturas foram dissecadas e mantidas à 4°C em solução isosmolar de sacarose 0,32M diluída em Tampão Fosfato (PBS; 5 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 2,6 mM KCl, pH 7,4).

Para a dissecação dos hipocampos e córtices pré-frontal, os cérebros foram colocados sobre uma placa de Petri invertida (4°C) recoberta com papel filtro umedecido com tampão PBS (200 mM NaCl, 5 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄, 2,6 mM KCl, pH 7,4). Para retirada do córtice pré-frontal foi feita uma secção de cerca de 2 mm do córtex frontal com o auxílio de um bisturi, após prévia retirada dos bulbos olfatórios. Em seguida os cérebros foram seccionados longitudinalmente e os hipocampos foram removidos com o auxílio de pincéis finos de pêlo de marta. A seguir as estruturas foram homogeneizadas individualmente.

4.8 Preparo dos Homogeneizados

Cada homogeneizado foi preparado a partir de um animal controle ou tratado com ConBr (n= 4–11) seguindo basicamente o protocolo descrito por Calloni et al, 2005. Os córtices cerebrais e 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, 2µg/ml de Aprotinina, 2mM de benzamidina, 0,1 mM de PMSF, 2 mM de Na₃VO₄, 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 10µl 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 β -mercaptoetanol, pH 6,8) e a seguir fervido 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 μ l solução de glicerol/100 μ l solução de amostra.

4.9 Dosagem de Proteína

O conteúdo protéico dos homogeneizados de córtices e hipocampo foi determinado pelo método de Peterson (1977). Resumidamente, sobre alíquotas de 3 μ l das amostras foram adicionados 397 μ l de água e 400 μ l do Reagente de Lowry (0,2 N de NaOH, 2,5 % de SDS, 5 % de Na₂CO₃, 0,2 % de CuSO₄ e 0,1 % de tartarato duplo de sódio e potássio). Após 10 minutos foi adicionado 200 μ l 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.

4.10 “Western Blot”

4.10.1 Separação de Proteínas (eletroforese)

As proteínas (75 μ g/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE), usando gel de separação 10 % e gel de entrada com 4 % de acrilamida/bis-acrilamida (relação 37,5:1) (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 adicionava-se o gel de separação composto por 10 % de acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1; w/w), 375 mM de Tris, 0,1 % de SDS, 0,06 % de TEMED e 0,036 % de persulfato de

amônia; pH 8,8. Após a polimerização do gel de separação, era adicionado o gel de entrada composto por 4 % de acrilamida/bis-acrilamida (37,5:1; w/w), 125 mM de Tris, 0,1 % de SDS, 0,05 % de TEMED e 0,1 % de persulfato de amônia; pH 6,8. Após uma hora eram aplicadas as amostras para separação. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 20 mA por placa e voltagem máxima de 140 V durante aproximadamente 2h e 30 min, 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.

4.10.2 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 4 papéis filtro embebidos em tampão de transferência (25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 10 % de metanol), gel, membrana de nitrocelulose e novamente 4 papéis filtro embebidos em tampão de transferência. A eletro-transferência foi realizada em temperatura ambiente com uma corrente de 1,2 mA/cm² de gel e voltagem máxima de 40 V (Bjerrum e Heegaard, 1988). Após a eletrotransferência, as membranas e os géis foram coradas com solução de ponceau (solução 0,5% de Ponceau e 1% de ácido acético) e solução de comassie blue (comassie blue R-250 0,1%, ácido acético 7% e metanol 50%), respectivamente, para controle da eficiência da transferência (Cordova *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2002).

4.10.3 Imunodeteccção

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 e a seguir lavadas (três vezes de 5 min) com TBS-T (0,05 % de Tween-20, 10 mM de Tris, 150 mM de NaCl; pH 7,5). Após, era realizado um segundo bloqueio de 1h, com 2,5 % de gelatina em TBS, seguido de três lavagens (5 min) com TBS-T (Bobrovskaya *et al.*, 2001; Cordova *et al.*, 2004). Após as lavagens as membranas foram incubadas com os anticorpos primários sob agitação contínua. Anti-fosfo ERK1/2 (Cell Signaling), 1:1.000 (4°C , 12 h); anti-ERK1/2 (Sigma), 1:40.000 (temperatura ambiente; 2 h); anti-fosfo-CREB e anti-CREB (Cell Signaling), 1:1.000 (4°C, 48 h). Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram novamente lavadas com TBS-T por 3 vezes de 5 min cada e incubadas com o anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) por 1 h sob agitação e temperatura ambiente. Para a deteção as membranas foram lavadas com TBS-T (3 vezes de 5 min cada) seguidas da lavagem com TBS (2 vezes de 5 min cada). Os complexos imunes foram revelados através de kit ECL (quimiluminescência). A quantificação do imunociteúdo das proteínas foi realizada através de densitometria com o auxílio do software Scion Image versão Beta 3.

4.11 Histologia

Os camundongos foram injetados via i.c.v. com ConBr FITC ou veículo. Após 15 minutos os animais foram anestesiados via i.p. com hidrato de cloral (15% em salina, 20 µl/g) e perfundidos com salina, seguido por paraformaldeído 4% em PBS (50-100 ml). Os

cérebros foram retirados, pós-fixados por 24h em paraformaldeído 4%, crioprottegidos em sacarose 30% e congelados em gelo seco. Fatias de 40 μm foram obtidas em criostato e montadas em lâminas gelatinizadas. As lâminas foram montadas com PBS/glicerol 1:1 e observadas com um microscópio de epifluorescência.

4.12 Análise Estatística

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

5.1 Curva dose resposta das Lectinas ConBr e ConA sobre o Teste do Nado Forçado (TNF) e atividade locomotora no campo aberto em camundongos

Considerando que lectinas pertencentes à subtribo Diocleinae apresentam similaridades em suas estruturas multiméricas (Sanz-Aparicio et al., 1997), neste trabalho analisamos o efeito biológico de duas lectinas desta subtribo, ConBr e ConA, sobre o tempo de imobilidade de camundongos no TNF e sua atividade locomotora no campo aberto.

Os camundongos receberam, via intracerebroventricular (i.c.v.), doses de 1, 5, 10 e 50 µg/sítio da lectina ConBr ou ConA ou veículo (tampão HEPES sem glicose) 15 minutos antes da realização do TNF. O efeito das lectinas ConBr e ConA sobre o TNF e atividade locomotora de camundongos está apresentado na figura 7. O teste ANOVA de uma via revelou efeito significativo de ConBr sobre o tempo de imobilidade dos animais quando comparado ao grupo controle. As doses de 5, 10 e 50 µg/sítio foram mais efetivas na diminuição do tempo de imobilidade dos animais (Fig. 7 A). A lectina ConBr, nas doses de 1 – 10 µg/sítio não alterou significativamente a locomoção dos animais no campo aberto. Entretanto, a dose de 50 µg/sítio causou um aumento na locomoção dos animais quando comparado ao grupo controle, característico de um efeito psicostimulante (Fig. 7 B). A lectina ConA em todas as doses testadas (1 – 50 µg/sítio) não alterou de maneira significativa o tempo de imobilidade dos camundongos no TNF quando comparado com o controle (Fig. 7 C). Da mesma forma, no campo aberto, não ocorreram mudanças

significativas na locomoção dos animais nas doses testadas quando comparado com o grupo controle (Fig. 7 D).

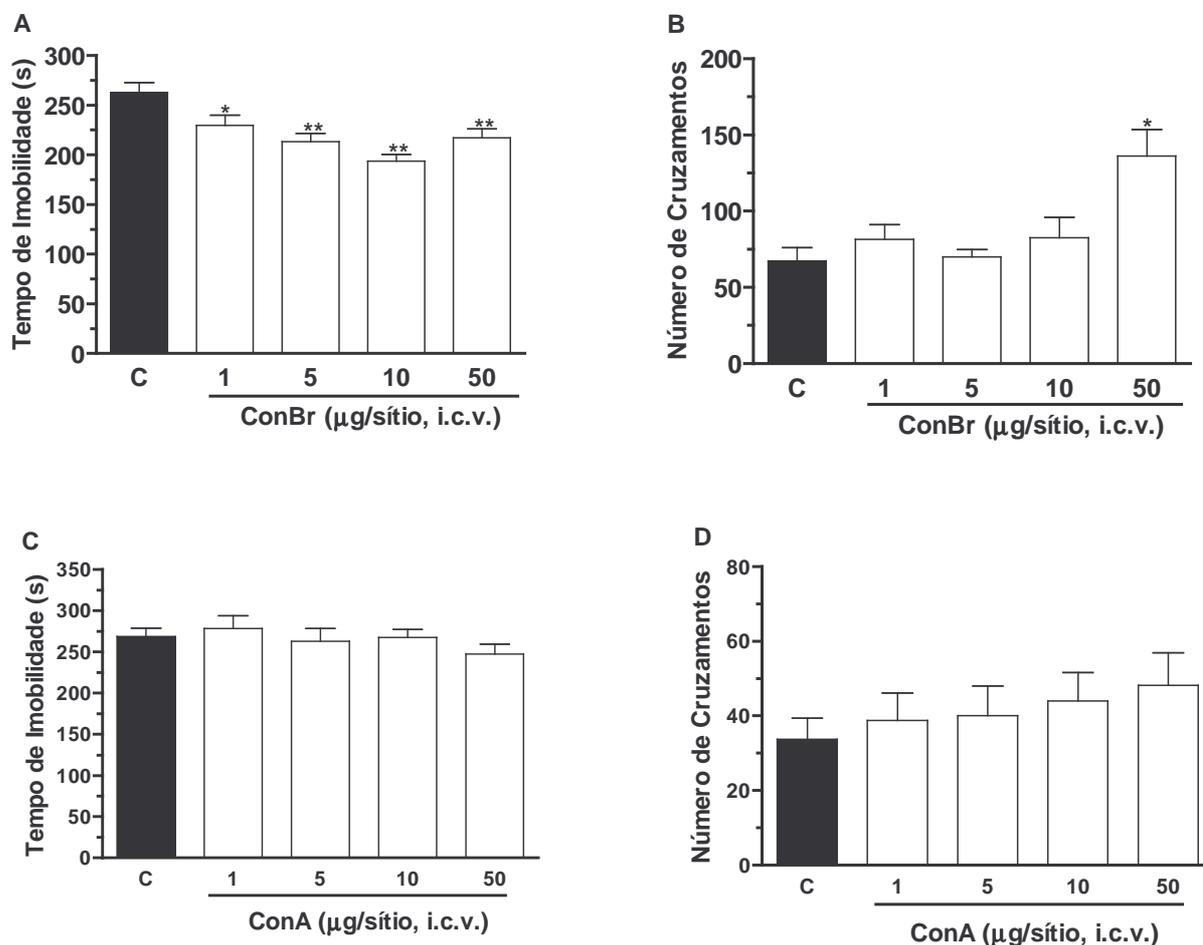


Figura 7. Efeito das lectinas ConBr e ConA sobre o Teste do Nado Forçado (TNF) (A, C) e atividade locomotora no campo aberto (B, D) em camundongos ($n=5 - 8$). ConBr e ConA foram administradas 15 minutos antes dos testes via i.c.v. Os resultados representam a média dos experimentos \pm erro padrão, * $p<0,05$; ** $p<0,01$ comparado com o grupo controle (C).

Várias evidências têm demonstrado que apesar de terem alta homologia, ConA e outras lectinas desta mesma subtribo apresentam importantes variações em termos de atividade biológica (Cavada et al., 2001).

5.2 Verificação da distribuição intracerebral da lectina ConBr marcada com fluorescente (FITC) em camundongos.

Com o objetivo de verificar o local da injeção (ventrículo lateral) e a distribuição cerebral da lectina após a mesma ser injetada via i.c.v., foi utilizada uma lectina conjugada a um fluoróforo, em particular FITC (isotiocianato de fluoresceína).

A figura 8 A mostra uma secção de cérebro ao nível do terceiro ventrículo ipsilateral a injeção da lectina, onde se pode claramente observar uma forte fluorescência localizada nas bordas do ventrículo. Uma coloração menos intensa foi observada também no ventrículo contralateral (dados não mostrados). Nenhuma fluorescência foi encontrada em animais injetados com veículo (Fig 8 B). As figuras 8 C (ConBr – FITC) e 8 D (veículo) mostram uma secção do mesmo animal da figura 8 A, ao nível do hipocampo dorsal.

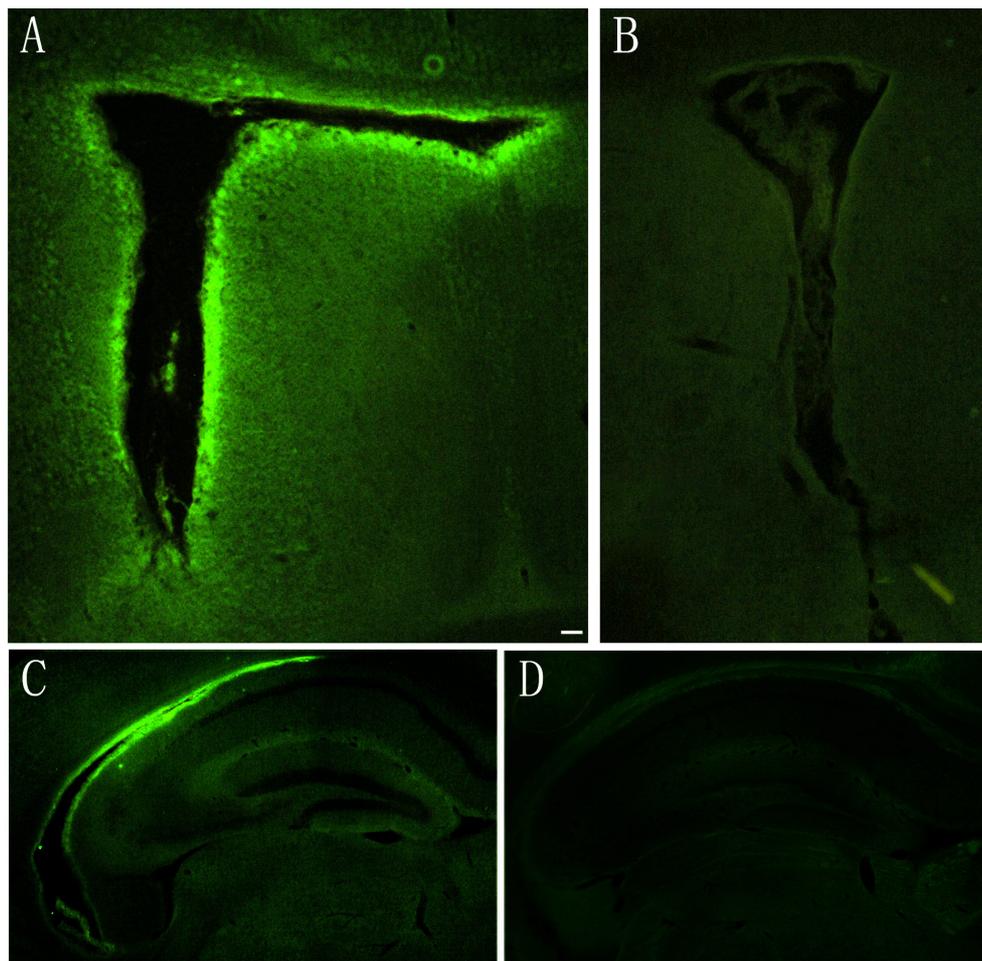


Figura 8. Imagem representativa da distribuição da ConBr – FITC no cérebro de camundongos ($n=3$). A lectina ConBr – FITC ou tampão HEPES – salina (veículo) foi injetado via i.c.v. e após 21 min os camundongos foram perfundidos. Fatias de 40 μm foram obtidas e observadas com um microscópio de epifluorescência. Secções cerebrais transversais a nível do ventrículo lateral dos camundongos injetados com ConBr – FITC (A) ou com veículo (B) e secções a nível do hipocampo (C – D). Escala = 40 μm e 100 μm .

5.3 Avaliação da curva de tempo da lectina ConBr sobre o teste do nado forçado (TNF) e atividade locomotora no campo aberto em camundongos.

Para verificar o tempo de permanência do efeito da lectina, realizamos uma curva de tempo da lectina ConBr sobre o TNF e atividade locomotora no campo aberto. Os animais receberam, via i.c.v., 10 $\mu\text{g/sítio}$ de ConBr. O TNF foi realizado 15, 30, 60 e 120 min após a administração da lectina. O teste ANOVA de duas vias revelou que em todos os

tempos testados (15 – 120 min) ocorreu diminuição significativa do tempo de imobilidade dos animais quando comparado com o grupo tratado com veículo (Fig. 9 A). Por outro lado, não houve mudanças significativas na locomoção dos camundongos nos tempos testados quando comparado ao grupo tratado com veículo (Fig. 9 B).

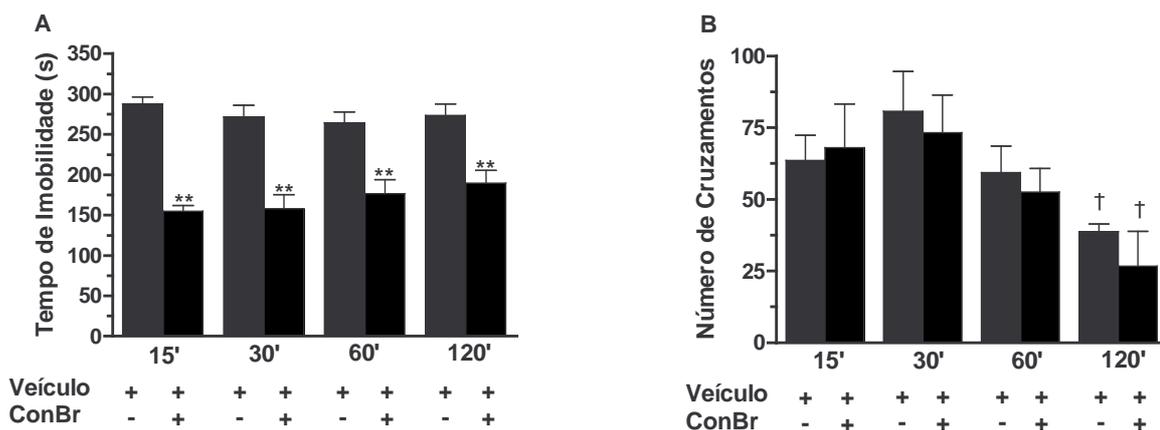


Figura 9. Efeito da curva de tempo da lectina ConBr sobre o Teste do Nado Forçado (TNF) (A) e atividade locomotora no campo aberto (B) em camundongos ($n=5 - 9$). ConBr (10 $\mu\text{g}/\text{sítio}$) foi administradas 15, 30, 60 e 120 minutos antes dos testes via i.c.v. Os resultados representam a média dos experimentos \pm erro padrão, $^\dagger p < 0,05$ comparado com os tempos de 15 e 30 min; $p < 0,01$ comparado com o grupo tratado com veículo (controle, C).**

Tendo em vista que diversos estudos da ação de antidepressivos têm realizado o TNF 15 min após a injeção via i.c.v. (Zomkowski et al., 2002 e Rosa et al., 2003), em nosso estudo optamos por realizar o TNF 15 min após a injeção da lectina ou veículo via i.c.v.

5.4 Ações da lectina ConBr desnaturada e da lectina ConBr conjugada à manose sobre o teste do nado forçado (TNF) e atividade locomotora no campo aberto em camundongos.

Com o intuito de verificar se o efeito produzido pela lectina ConBr sobre o TNF depende da integridade de sua estrutura terciária, a lectina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) foi mantida por 5 min

em água à temperatura de 90°C, afim de promover a sua desnaturação. O teste ANOVA de uma via revelou que a ConBr desnaturada (10 A) não foi capaz de causar alteração no tempo de imobilidade dos animais no TNF, sendo similar aos animais controle. Adicionalmente, foi testado a dependência do sítio de ligação a açúcar para o efeito de ConBr sobre o TNF. Para isso foi utilizado ConBr conjugada ao açúcar ligante manose (ConBr-man; 2 µg/µl). A administração de 10 µg/sítio de ConBr-man, não causou alteração significativa no tempo de imobilidade dos animais no TNF quando comparado com o controle (10 C). A lectina ConBr desnaturada ou conjugada à manose não mostrou alteração na atividade locomotora dos animais no campo aberto (Fig. 10 B e 10 D). Portanto, aparentemente a ação modulatória de ConBr sobre a mobilidade dos animais no TNF depende da integridade estrutural e do sítio de ligação a açúcar.

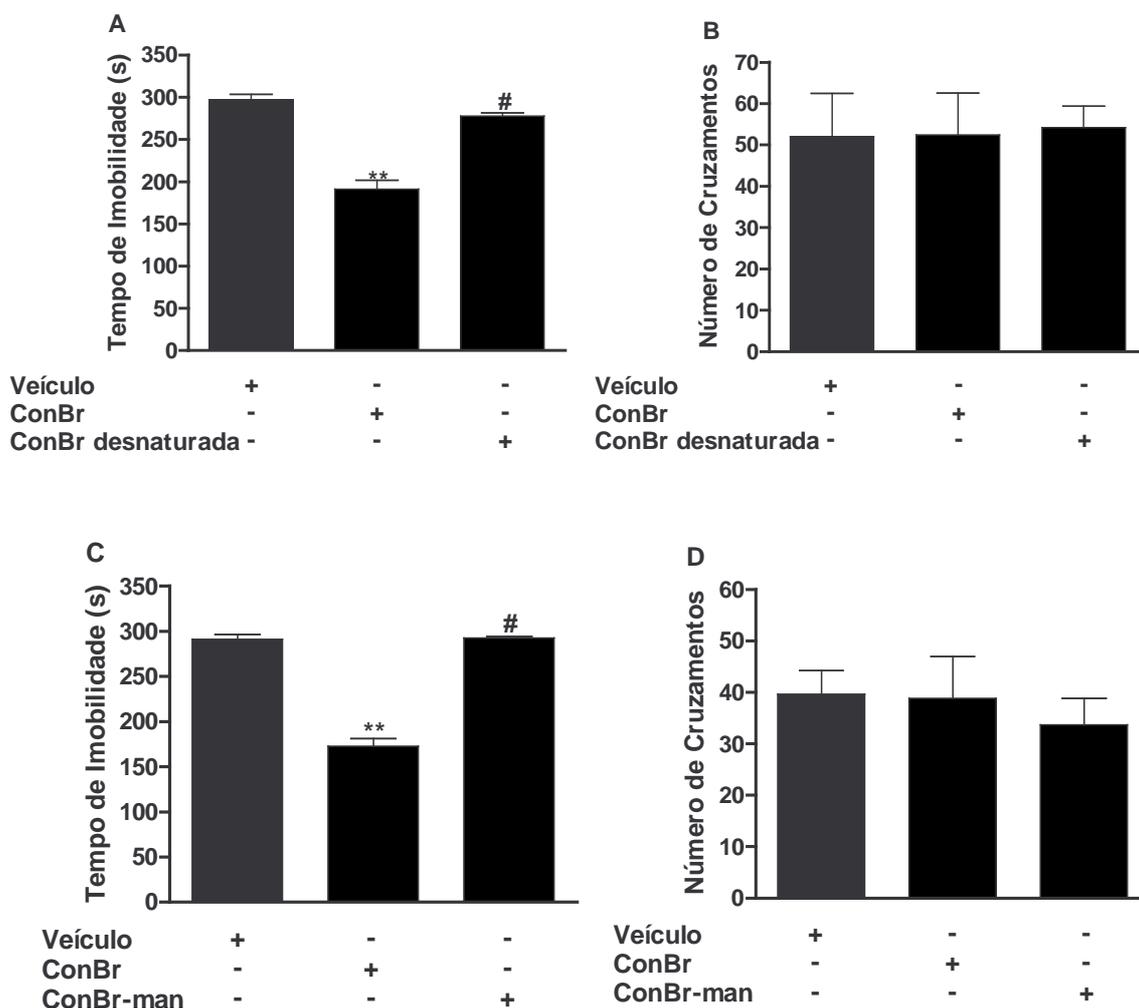


Figura 10. Efeito da lectina ConBr desnaturalada e da lectina ConBr-man sobre o Teste do Nado Forçado (TNF) (A, C) e atividade locomotora no campo aberto (B, D) ($n=5-6$). ConBr desnaturalada ou ConBr-man e ConBr foram administradas 15 minutos antes dos testes via i.c.v. Os resultados representam a média dos experimentos \pm erro padrão, * $p<0,05$; ** $p<0,01$ quando comparado com o grupo tratado com veículo; # reversão do efeito comparado com o grupo tratado com ConBr.

5.5 Efeito do co-tratamento com doses subativas de fluoxetina e ConBr no

Teste do Nado Forçado (TNF)

Com a proposta de investigar se o efeito antidepressivo de ConBr no TNF poderia estar associado ao sistema serotoninérgico e dessa forma interferir com a ação de antidepressivos clássicos que atuam neste sistema, os camundongos foram co-

administrados via i.c.v. com doses subativas de fluoxetina (0,1 nmol/sítio) e com doses subativas de ConBr (0,1 µg/sítio). Os resultados mostraram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade do grupo tratado com fluoxetina mais ConBr quando comparado com o grupo veículo (Fig. 11). Estes dados sugerem um efeito sinérgico entre a fluoxetina e a ConBr.

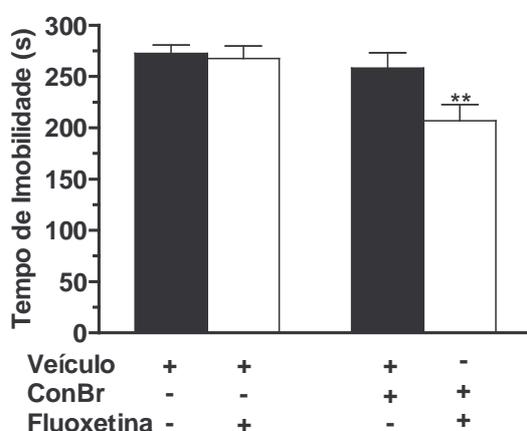
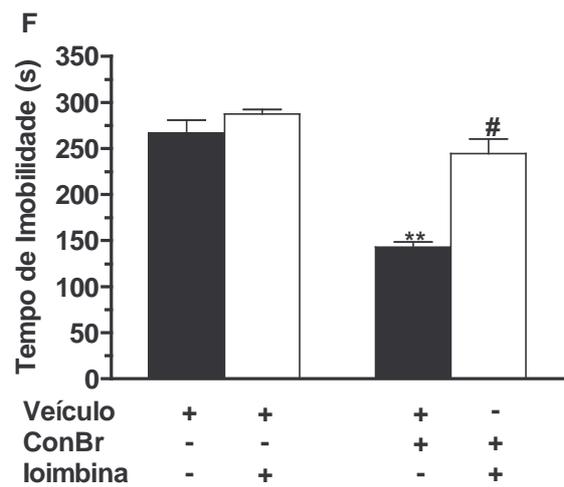
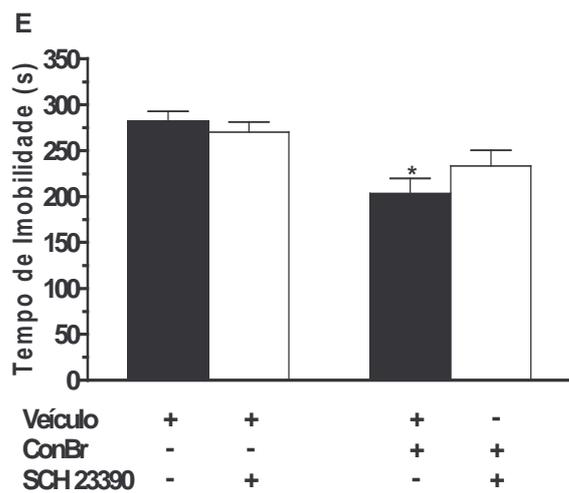
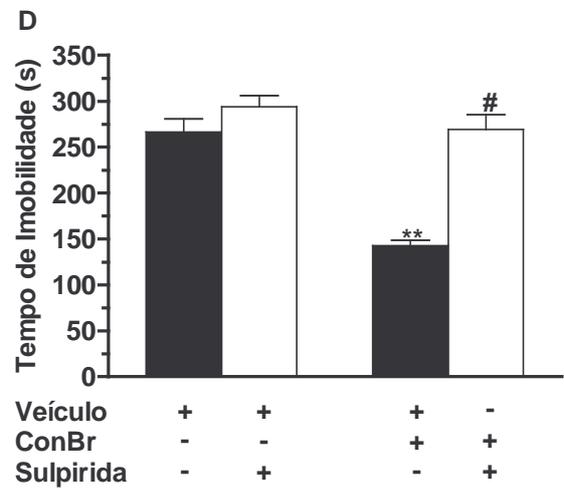
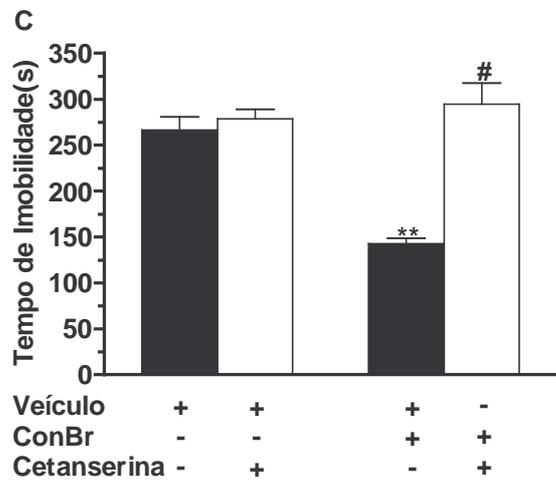
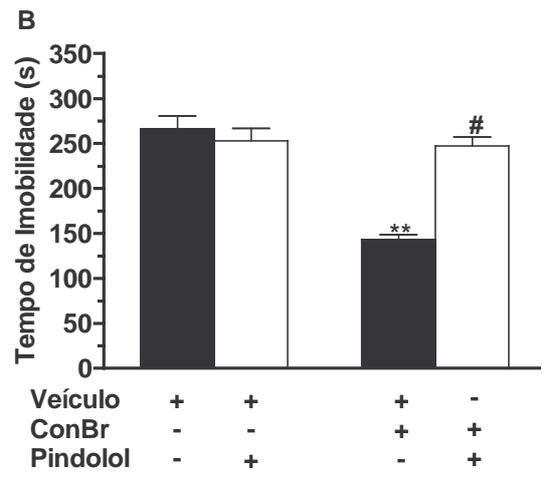
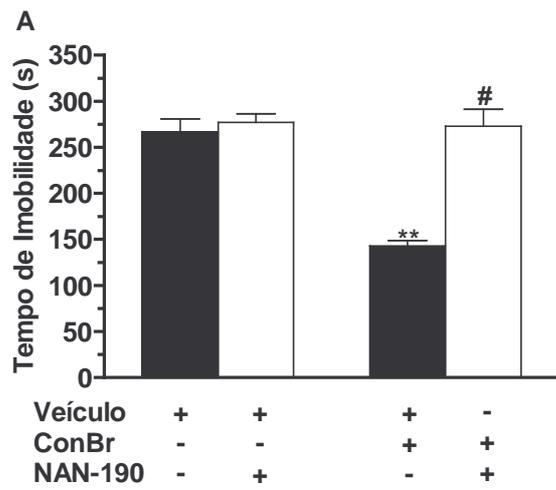


Figura 11. Efeito do tratamento com doses sub-ativas de fluoxetina e ConBr no Teste do Nado Forçado (TNF) ($n=6 - 7$). Os camundongos foram tratados com fluoxetina (0,1 nmol/sítio) mais ConBr (0,1 µg/sítio) 15 minutos antes do teste. Os resultados representam a média dos experimentos \pm erro padrão, * $p<0,05$; ** $p<0,01$ comparado com o grupo tratado com veículo (controle, C).

5.6. Influência da lectina ConBr sobre os sistemas serotoninérgico, dopaminérgico e noradrenérgico (monoaminas) no Teste do Nado Forçado (TNF) em camundongos

Com o objetivo de verificar se a ConBr estava atuando sobre algum dos sistemas das monoaminas (serotoninérgico, dopaminérgico ou noradrenérgico) foram utilizados antagonistas destes três sistemas.

Na figura 12 estão representados os resultados obtidos após o pré-tratamento via intra-peritoneal (i.p.) com NAN-190 (0,5 mg/Kg, um antagonista de receptor 5-HT_{1A}), pindolol (32 mg/Kg, bloqueador β -adrenérgico com atividade antagonista 5-HT_{1A}/5-HT_{1B}), cetanserina (5 mg/Kg, um antagonista de receptor 5-HT_{2A}), sulpirida (50mg/Kg, um antagonista dopaminérgico D2), SCH 23390 (0,05 mg/Kg, um antagonista dopaminérgico D1), ioimbina (1 mg/Kg, antagonista α 2-adrenérgico), prazosim (62,5 μ g/Kg, antagonista α 1-adrenérgico) ou veículo (tampão HEPES sem glicose). O teste ANOVA de duas vias demonstrou que o pré-tratamento com NAN-190 reverteu significativamente o efeito de ConBr quando comparado com o controle (Fig. 12 A). Da mesma maneira, os resultados demonstraram que o pré-tratamento com pindolol (Fig. 12 B), cetanserina (Fig. 12 C), sulpirida (Fig. 12 D) e ioimbina (Fig. 12 F) reverteram de forma significativa o efeito de ConBr quando comparado com o controle. Entretanto, o pré-tratamento com SCH 23390 (Fig. 12 E) e prazosim (FIG. 12 G) não reverteu significativamente o efeito de ConBr quando comparado com o controle.



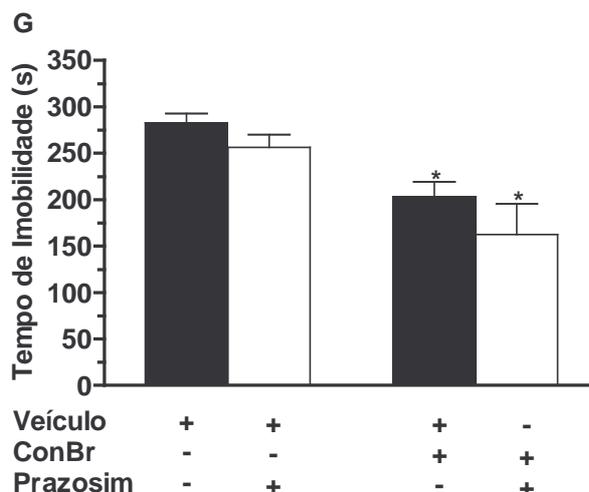


Figura 12. Efeito do pré-tratamento com os antagonistas dos sistemas serotoninérgico, NAN-190 (A), pindolol (B) e Cetanserina (C); dopaminérgico, sulpirida (D) e SCH 23390 (E); noradrenérgico, ioimbina (F) e prazosim (G) ($n=6$). Os animais foram pré-tratados com os antagonistas via i.p., exceto SCH 23390, que foi administrado via subcutânea (s.c.), 30 min antes da injeção de ConBr via i.c.v. O TNF foi realizado 15 min após a administração de ConBr. Os resultados representam a média dos experimentos \pm erro padrão, * $p<0,05$; ** $p<0,01$ quando comparado com o grupo tratado com veículo; # reversão do efeito comparado com o mesmo grupo pré-tratado com veículo (controle, C).

5.7. Análise da fosforilação de ERK1/2 e CREB no hipocampo de camundongos tratados com ConBr

Vários estudos têm demonstrado a participação, no hipocampo, da via de sinalização dependente de ERK1/2 (Dwivedi *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2001; D'Sa e Duman, 2002; Einat *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2003; Fumagalli *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2006) e do fator de transcrição CREB (Manji *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Tiraboschi *et al.*, 2004) no efeito antidepressivo de diversas drogas. Além disso, tem sido postulado que estas vias podem ser moduladas durante o TNF em camundongos (Blendy, 2006).

Neste trabalho avaliamos a possível modulação de ERK1/2 e do fator de transcrição CREB pela lectina ConBr, nas concentrações ativas e subativas, quanto a sua ação

antidepressiva no TNF em camundongos. Desta forma foi verificado as ações de ConBr sobre essas vias no hipocampo de camundongos submetidos ou não ao TNF.

Os animais foram injetados via i.c.v. com a lectina ConBr em uma dose ativa (10 $\mu\text{g/sítio}$), ou com uma dose sub-ativa (0,1 $\mu\text{g/sítio}$) ou com veículo. Os parâmetros bioquímicos foram avaliados no hipocampo, 21 min após a injeção de ConBr ou veículo, tanto em animais não submetidos como em animais submetidos ao TNF. Nas figuras 13 A (animais não submetidos ao TNF) e 13 B (animais submetidos ao TNF) são demonstrados “imunoblottings” representativos da fosforilação e do conteúdo total de ERK1/2, bem como sua quantificação. As figuras 13 C (animais não submetidos ao TNF) e 13 D (animais submetidos ao TNF) mostram os “imunoblottings” representativos da fosforilação e do conteúdo total de CREB, bem como sua quantificação. A fosforilação de ERK1/2 e CREB foram expressas em porcentagem do controle (considerado 100%). O teste ANOVA de uma via revelou que a lectina nas duas doses testadas (0,1 $\mu\text{g/sítio}$ e 10 $\mu\text{g/sítio}$) não alterou significativamente a fosforilação de ERK1/2 tanto nos animais não submetidos ao TNF (Fig. 13 A) quanto nos animais submetidos ao TNF (Fig. 13 B). Por outro lado, a fosforilação de CREB foi aumentada na dose ativa da ConBr (10 $\mu\text{g/sítio}$) tanto nos animais não submetidos ao TNF (Fig. 13 C) quanto nos animais submetidos ao TNF (Fig. 13 D). Os animais submetidos ao TNF não apresentaram alteração significativa no nível de fosforilação de ERK1/2 ou CREB quando comparados ao grupo de animais somente injetados com veículo, e não submetidos ao TNF (Figs. 13 B e 13 D). Estes dados demonstram que aparentemente o TNF *per se* não interfere na fosforilação destas proteínas.

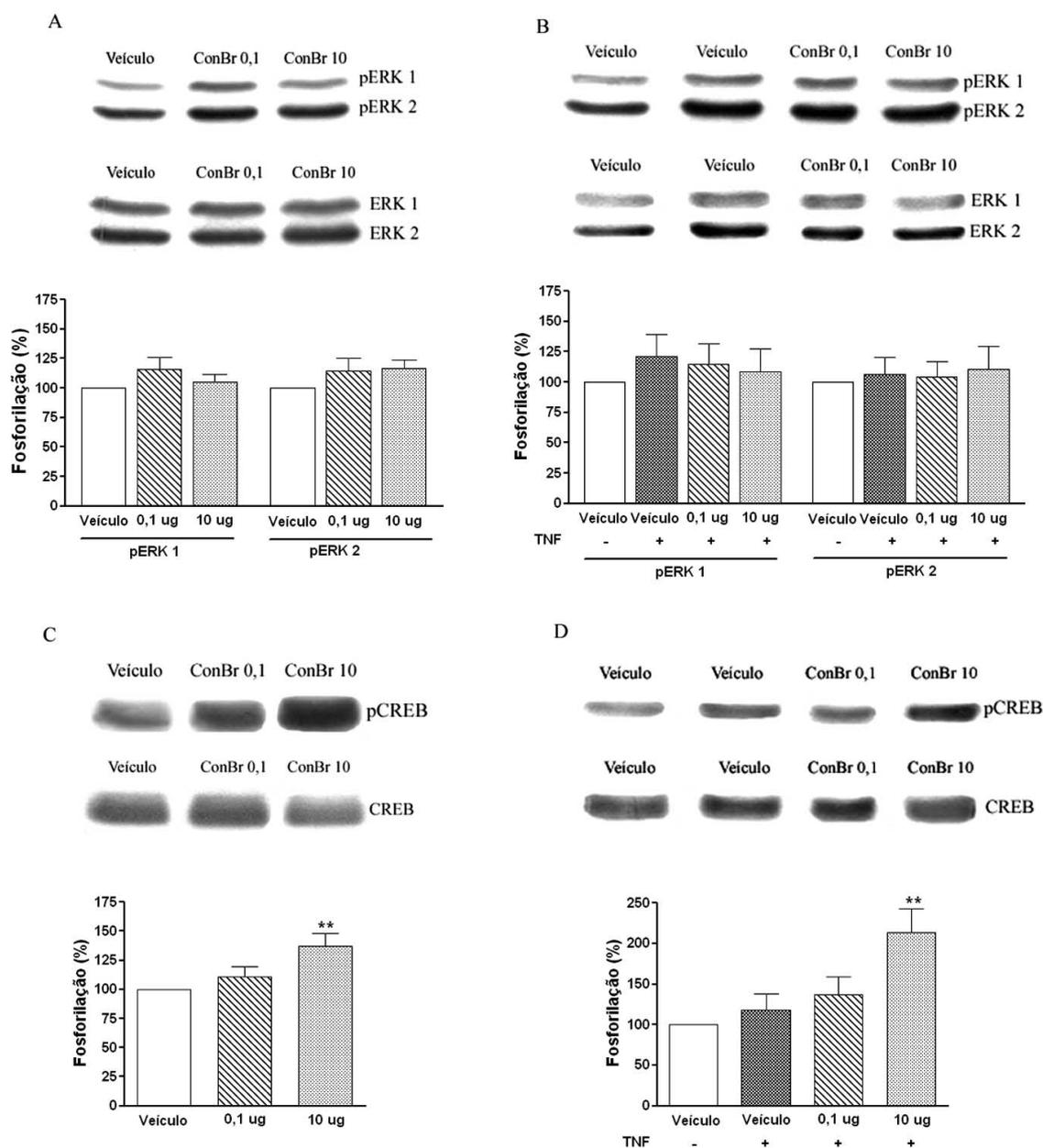


Figura 13. Efeito da lectina ConBr sobre a fosforilação da proteína ERK1/2 (A, B) e do fator de transcrição CREB (C, D) no hipocampo de camundongos injetados com a lectina ($n=4$, B e D; 8, A; 11, C). Os animais foram tratados com a lectina ConBr via i.c.v. na dose subativa (0,1 $\mu\text{g/sítio}$) ou na dose ativa (10 $\mu\text{g/sítio}$). Os hipocampus foram analisados 21 min após a injeção de ConBr em animais não submetidos ao TNF (A e C) ou submetidos ao TNF (B e D). Os resultados representam a média dos experimentos \pm erro padrão, ** $p<0,01$ quando comparado com o grupo tratado com veículo.

5.8. Análise da fosforilação de ERK1/2 e CREB no hipocampo de camundongos tratados com Fluoxetina.

Um dos mecanismos pelos quais a fluoxetina exerce seu efeito antidepressivo parece ser através da modulação da via ERK1/2 (Fumagalli *et al.*, 2005) e do fator de transcrição CREB no hipocampo (Manji *et al.*, 2000; Thome, *et al.*, 2000; D'Sa e Duman, 2002).

Com o objetivo de comparar o efeito da fluoxetina com o efeito de ConBr foi verificado a fosforilação de ERK1/2 e CREB em resposta ao tratamento com fluoxetina, um antidepressivo clássico. Fluoxetina, foi injetada em camundongos via i.c.v., em uma dose ativa de (1 nmol/sítio) ou uma dose sub-ativa (0,1 nmol/sítio). Nos grupos controle foi injetado veículo. O hipocampo dos animais foi dissecado 21 min após a injeção da fluoxetina em animais submetidos ou não ao TNF. As figuras 14 A (animais não submetidos ao TNF) e 14 B (animais submetidos ao TNF) demonstram os “imunoblottings” representativos da fosforilação e do conteúdo total de ERK1/2, bem como a quantificação da fosforilação. As figuras 14 C (animais não submetidos ao TNF) e 14 D (animais submetidos ao TNF) demonstram os “imunoblottings” representativos da fosforilação do resíduo de Ser-133 e do conteúdo total de CREB, bem como a quantificação da fosforilação. A fosforilação de ERK1/2 e CREB foram expressas em porcentagem do controle (considerado 100%). O teste ANOVA de uma via revelou que a fluoxetina (1 nmol/sítio) alterou significativamente a fosforilação de ERK1/2 em relação ao veículo em animais não submetidos ao TNF (Figs. 14 A). Nos animais submetidos ao TNF (Fig. 14 B) a fluoxetina não causou aumento da fosforilação de ERK1/2 em relação ao veículo submetido ao TNF. A fosforilação do fator de transcrição CREB foi aumentada significativamente no grupo injetado com a fluoxetina (1 nmol/sítio) tanto nos animais não

submetidos ao TNF (Fig. 14 C) quanto nos animais submetidos ao TNF (Fig. 14 D) em relação aos seus respectivos veículos. Aparentemente o TNF não altera *per se* a fosforilação de ERK1/2 ou CREB, desde que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos veículo de animais submetido ao TNF quando comparado com o grupo veículo dos animais não submetidos ao TNF (Figs. 14 B e 14 D).

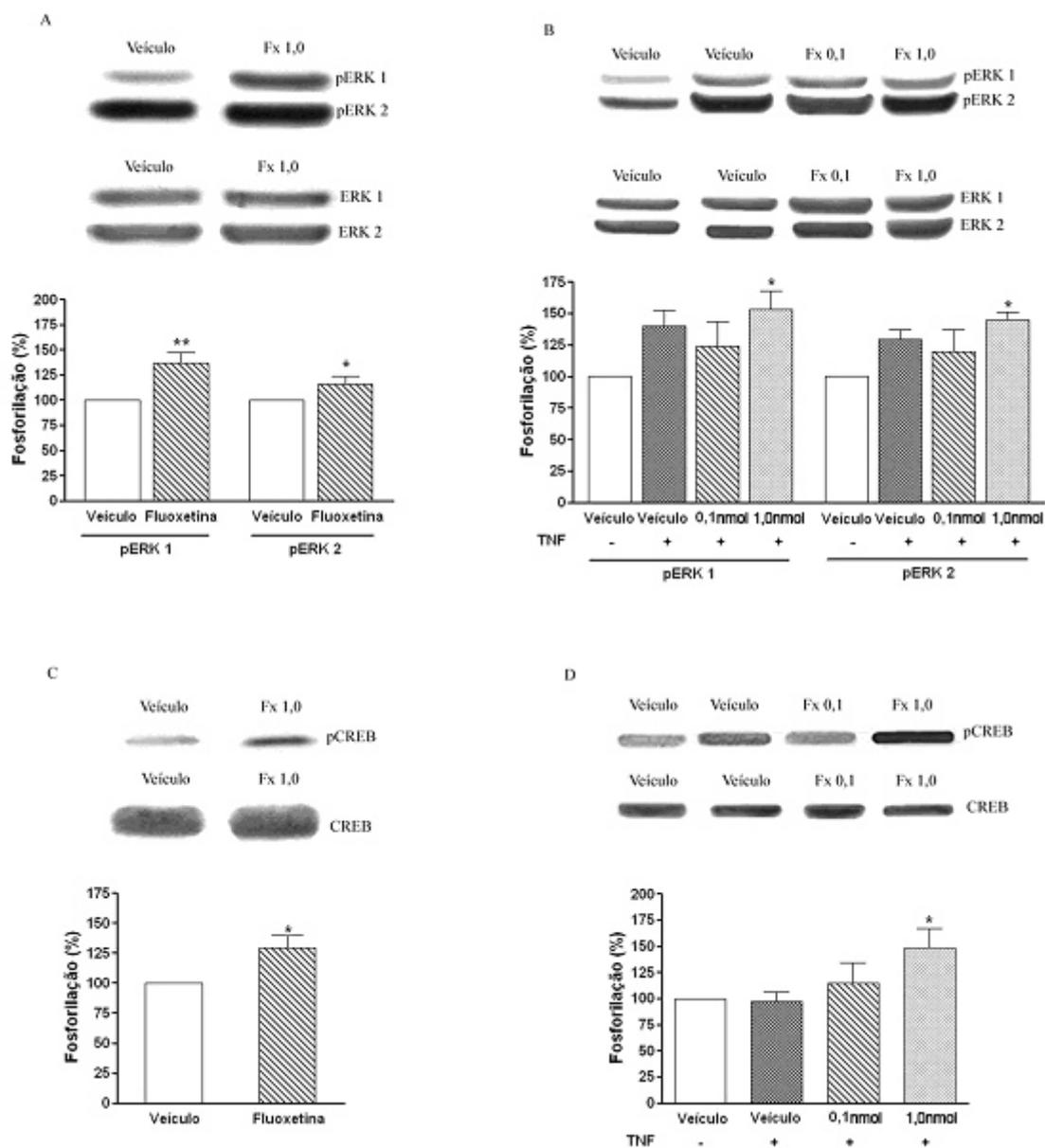


Figura 14. Efeito da fluoxetina sobre a fosforilação da proteína ERK1/2 (A, B) e do fator de transcrição CREB (C, D) no hipocampo de camundongos injetados com este antidepressivo ($n=4$, B e D; $n=8$ A e C). Os animais foram tratados com a fluoxetina via i.c.v. na dose ativa (1 nmol/sítio) ou na dose subativa (0,1 nmol/sítio) ou com veículo. Os hipocampus foram analisados 21 min após a injeção de ConBr em animais não submetidos ao TNF (A e C) ou submetidos ao TNF (B e D). Os resultados representam a média dos experimentos \pm erro padrão, * $p<0,05$; ** $p<0,01$ quando comparado com o grupo tratado com veículo.

5.9. Análise da fosforilação de ERK1/2 e CREB no córtex pré-frontal de camundongos injetados com ConBr.

Assim como o hipocampo, o córtex pré-frontal é uma estrutura que está bastante envolvida com a depressão (Drevets, 2001; Liotti e Mayberg, 2001). A modulação de algumas proteínas, como ERK1/2 (Einat *et al.*, 2003; Feng *et al.*, 2003) e o fator de transcrição CREB (Tiraboschi *et al.*, 2004) podem ocorrer no córtex pré-frontal após tratamento com antidepressivos.

Para investigar se a lectina ConBr estaria modulando a proteína ERK1/2 e o fator de transcrição CREB no córtex pré-frontal de camundongos, os animais foram tratados via i.c.v. com duas doses diferentes de lectina, uma ativa (10 µg/sítio) e uma sub-ativa (0,1 µg/sítio), ou veículo. Os parâmetros bioquímicos foram avaliados, 21 min após a injeção de ConBr ou veículo, tanto em animais não submetidos como em animais submetidos ao TNF. Nas figuras 15 A (animais não submetidos ao TNF) e 15 B (animais submetidos ao TNF) são demonstrados “imunoblottings” representativos da fosforilação e do conteúdo total de ERK1/2, bem como sua quantificação. As figuras 15 C (animais não submetidos ao TNF) e 15 D (animais submetidos ao TNF) mostram os “imunoblottings” representativos da fosforilação e do conteúdo total de CREB, bem como sua quantificação. A fosforilação de ERK1/2 e CREB foram expressas em porcentagem do controle (considerado 100%).

O teste ANOVA de uma via revelou que a lectina ConBr nas duas doses 0,1 µg/sítio ou 10 µg/sítio não causou alteração significativa na fosforilação de ERK1/2 e de CREB tanto nos animais não submetidos ao TNF (Fig. 15 A e 15 C) quanto nos animais submetidos ao TNF (Fig. 15 B e 15 D). O TNF não alterou significativamente a fosforilação das proteínas avaliadas nesta estrutura.

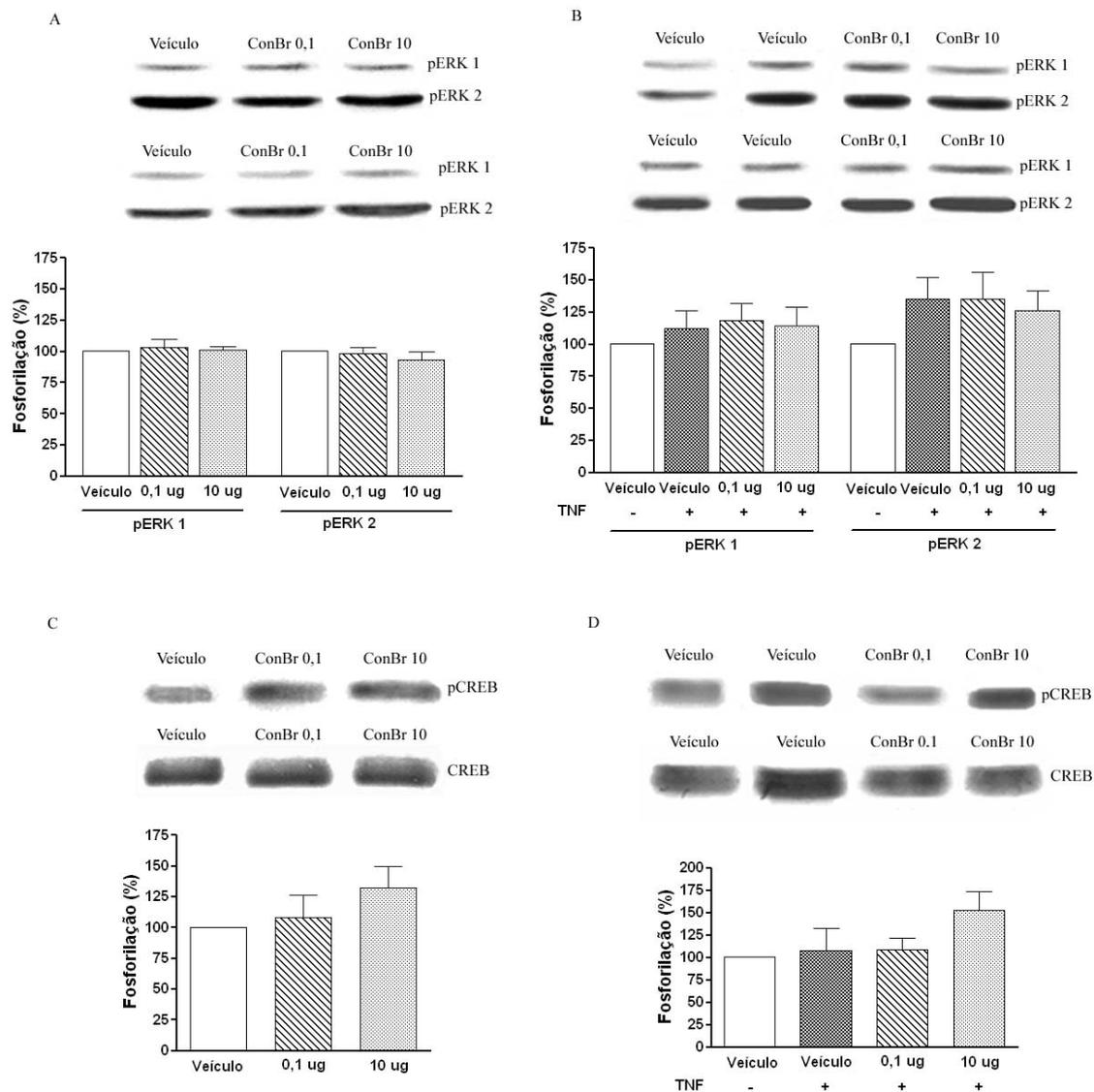


Figura 15. Efeito da lectina ConBr sobre a fosforilação da proteína ERK1/2 (A, B) e do fator de transcrição CREB (C, D) no córtex pré-frontal de camundongos injetados com a lectina ($n=4$, B e D; $n=8$, A e C). Os animais foram tratados com a lectina ConBr via i.c.v. na dose ativa (10 $\mu\text{g/sítio}$) ou na dose subativa (0,1 $\mu\text{g/sítio}$) ou com veículo. O córtex pré-frontal foi analisado 21 min após a injeção de ConBr em animais não submetidos ao TNF (A e C) ou submetidos ao TNF (B e D). Os resultados representam a média dos experimentos \pm erro padrão.

5.10. Análise da fosforilação de ERK1/2 e CREB no córtex pré-frontal de camundongos tratados com Fluoxetina.

A fluoxetina, além de modular as proteínas ERK1/2 e o fator de transcrição CREB no hipocampo, também, pode modular a fosforilação destas proteínas no córtex pré-frontal (Tiraboschi *et al.*, 2004).

Com o objetivo de verificar se a fluoxetina estaria modulando a proteína ERK1/2 e o fator de transcrição CREB no córtex pré-frontal no modelo utilizado neste estudo, e no sentido de comparar estes efeitos com os observados com a administração de ConBr, foram injetadas, via i.c.v., doses ativas (1 nmol/sítio) e doses sub-ativas (0,1 nmol/sítio) de fluoxetina. No controle foi administrado veículo. O córtex pré-frontal dos animais foi dissecado 21 min após os tratamentos em animais submetidos ou não ao TNF.

O teste ANOVA de uma via revelou que tanto doses ativas como subativas de fluoxetina não causaram alteração significativa na fosforilação de ERK1/2 ou de CREB tanto nos animais não submetidos ao TNF (Fig. 16 A e 16 C) quanto nos animais submetidos ao TNF (Fig. 16 B e 16 D). O TNF não alterou significativamente a fosforilação das proteínas avaliadas nesta estrutura.

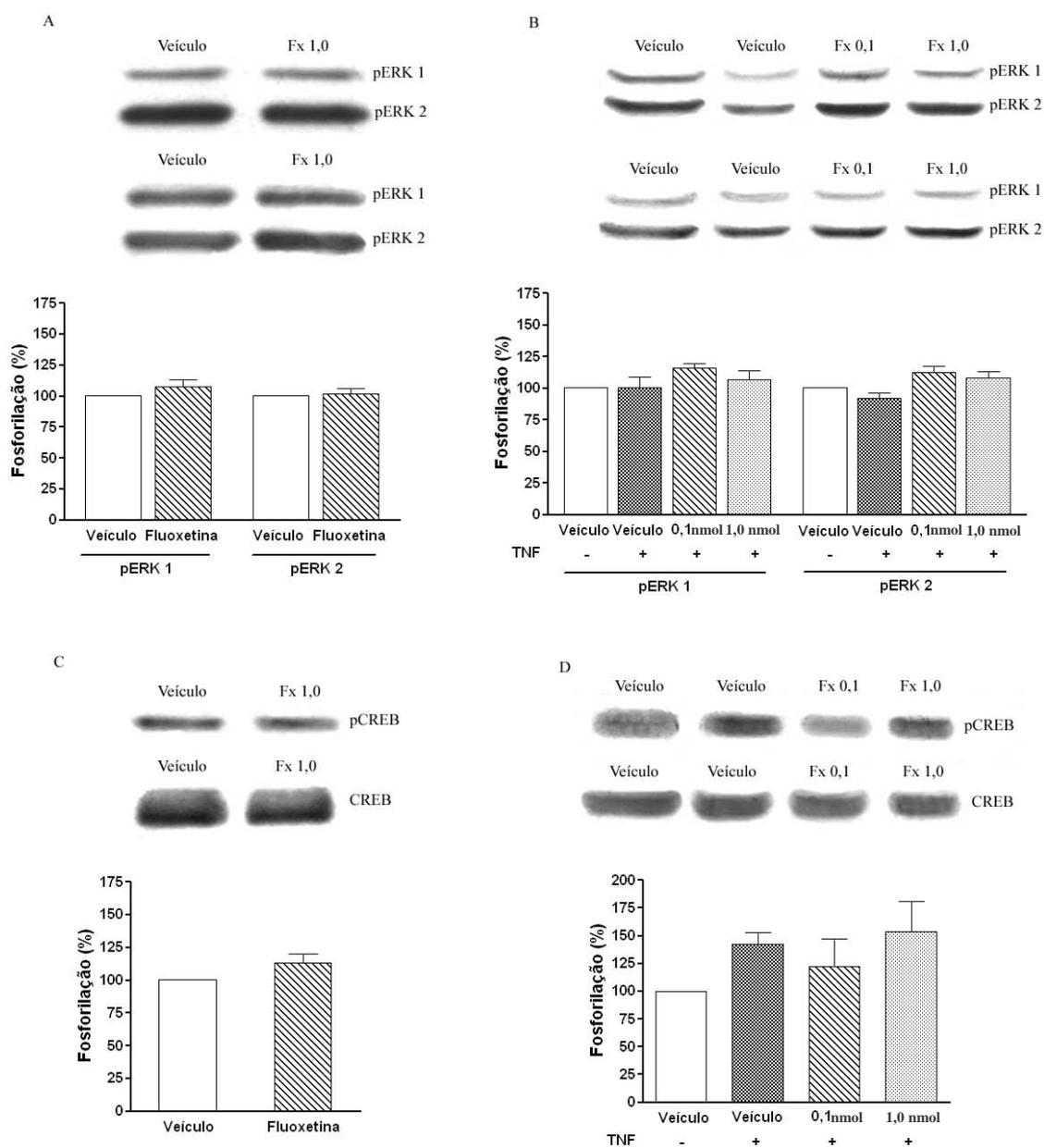


Figura 16. Efeito da fluoxetina sobre a fosforilação de ERK1/2 (A, B) e do fator de transcrição CREB (C, D) no córtex pré-frontal de camundongos tratados com este antidepressivo ($n=4$, B e D; $n=8$ A e C). Os animais foram tratados com a fluoxetina via i.c.v. na dose ativa (1 nmol/sítio) ou na dose subativa (0,1 nmol/sítio). O córtex pré-frontal foi analisado 21 min após a injeção de ConBr em animais não submetidos ao TNF (A e C) ou submetidos ao TNF (B e D). Os resultados representam a média dos experimentos \pm erro padrão.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstra pela primeira vez que a ConBr, uma lectina com alta afinidade pelos açúcares D-manose e D-glicose, quando administrada via i.c.v. em camundongos, leva a uma diminuição do tempo de imobilidade no TNF (efeito observado de 15 min a 120 min após a injeção da lectina), um efeito consistente com uma ação antidepressiva (Porsolt *et al.*, 1977; Petit-Demouliere *et al.*, 2005). Este teste é sensível e relativamente específico a diversas classes de antidepressivos, incluindo os tricíclicos, inibidores da recaptação de serotonina e inibidores da MAO. Todas essas classes de drogas reduzem o tempo de imobilidade no TNF quando administradas agudamente (Porsolt *et al.*, 1977; Cryan *et al.*, 2002; Petit-Demouliere *et al.*, 2005).

A redução no tempo de imobilidade no TNF observada pelo tratamento com ConBr não foi acompanhada por mudanças na atividade locomotora dos animais quando submetidos ao teste do campo aberto, com exceção na dose mais alta (50 µg/sítio), na qual foi observado um efeito psicoestimulante. Este resultado indica que a ConBr exerce uma ação antidepressiva específica (não devido a um aumento da atividade locomotora) sobre o TNF quando administrada em doses mais baixas (1 – 10 µg/sítio, i.c.v.).

Ao utilizar ConBr e ConA, lectinas pertencentes à subtribo Diocleinae, para investigar possíveis similaridades em suas ações sobre o SNC, observamos que a lectina ConA, em todas as doses utilizadas, não alterou o tempo de imobilidade dos animais no TNF, enquanto que a lectina ConBr nas doses de 1 – 50 µg/sítio diminuiu o tempo de imobilidade dos camundongos no TNF. Todas as lectinas Diocleinae apresentam estruturas multiméricas compostas de monômeros de 25.5 KDa, além de exibirem a característica de equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH. Elas são metaloproteínas que requerem íons

divalentes (Ca^{2+} e Mn^{2+}) para exibir atividade biológica completa (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997). Ambas lectinas apresentam como especificidade principal de reconhecimento os carboidratos D-manose e D-glicose (Cavada *et al.*, 2001).

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

Apesar de sua alta homologia e capacidade de reconhecimento dos mesmos resíduos de carboidrato (D-glicose e D-manose), ConBr e ConA apresentam diferenças quanto a sua estrutura tridimensional. ConA possui duas pontes de hidrogênio a mais, o que torna sua estrutura mais fechada do que a de ConBr (Sanz-Aparicio *et al.*, 1997; Cavada *et al.*, 2001).

O efeito de ConBr foi dependente da integridade de sua estrutura terciária/quartenária, tendo em vista que a desnaturação da proteína pela alta temperatura tornou ConBr inativa em termos de sua ação sobre o TNF. Da mesma forma, a lectina ConBr bloqueada com o açúcar de seu reconhecimento, D-manose (ConBr – Man), não alterou o comportamento dos animais submetidos ao TNF, demonstrando que o efeito de ConBr sobre o TNF está relacionado a sua capacidade de reconhecimento e ligação a glicoconjugados.

ConA não demonstrou a mesma ação que ConBr sobre o TNF. Embora não se tenha uma explicação para este fato podem-se especular alguns fatores que possam justificar as

diferenças de ação entre as duas lectinas, tais como: diferenças na relação dímero/tetrâmero nas condições utilizadas, ou diferença estrutural (uma vez que ConBr tem sua estrutura mais aberta), isso poderia repercutir com a eficiência de ConBr na modulação dos alvos envolvidos no TNF (ex. receptores, transportadores de NT, vias de sinalização, etc). Em estudos realizados no sistema imune, têm-se observado que ConA, após 18h aumenta o número de receptores ativos de serotonina na superfície de linfócitos (Sempere *et al.*, 2003). Em cultura de células PC12, a ConA levou a um aumento no número de transportadores para dopamina por inibir sua internalização (Dai *et al.*, 2002). A lectina ConA tem sido utilizada no estudo da função do SNC e de neuroplasticidade (Lin & Levitan, 1991; Scherer e Udin, 1994; Kirner *et al.*, 2003). Desta forma, tem sido demonstrado inibição de dessensibilização de receptores glutamatérgicos do tipo cainato por ConA (Dai *et al.*, 2004; Fay e Bowie, 2006). Além disso, um aumento da ligação de [³H]-AMPA ao seu receptor após o pré-tratamento de membranas cerebrais de ratos com ConA, principalmente na região do hipocampo tem sido também descrito (Hoffman *et al.*, 1998). Apesar destas ações de ConA sobre o SNC, em nosso estudo não foi observada nenhuma ação de ConA sobre o TNF.

Alguns efeitos biológicos de ConBr tem sido demonstrados, especialmente em sistema imune e mastócitos, incluindo liberação de histamina, produção de NO e indução de apoptose em linfócitos (Ferreira *et al.*, 1996; Andrade *et al.*, 1999; Cavada *et al.*, 2001), entretanto inexistem na literatura estudos sistemáticos de ConBr sobre o SNC. Nosso laboratório tem colaborado na compreensão da ação de ConBr no SNC (Pereira, 2005).

A lectina ConBr quando administrada em uma dose sub-ativa causou uma potencialização da ação da fluoxetina. Este resultado sugere que a ConBr e a fluoxetina podem atuar por um mecanismo semelhante de ação para levar a uma diminuição do tempo

de imobilidade no TNF. Além disso, esta ação de ConBr sobre o TNF, um modelo preditivo de atividade antidepressiva, e sua capacidade de potencializar a ação da fluoxetina, um antidepressivo clássico utilizado na clínica (Blier e Montigny, 1994; Wong *et al.*, 1995; Malberg e Blendy, 2005; Berton e Nestler, 2006), reforça a idéia de que a lectina ConBr produz um efeito antidepressivo no modelo do TNF quando administrada via i.c.v.

A administração de ConBr – FITC via i.c.v. levou a uma distribuição da lectina pelo ventrículo lateral até a parte mais caudal, próximo ao hipocampo dorsal, estrutura alvo para a ação de antidepressivos (Malberg e Blendy, 2005; Berton e Nestler, 2006). Com base nesta informação, não é possível estabelecer se o efeito de ConBr no TNF é uma consequência da sua ação nas paredes do ventrículo ou sua difusão para estruturas adjacentes ou ainda uma eventual entrada na corrente sanguínea. Entretanto, os dados permitem sugerir a possibilidade de que este efeito no TNF seja devido a discreta difusão de ConBr nas proximidades do hipocampo, uma estrutura cerebral relacionada à patofisiologia da depressão (Santarelli *et al.*, 2003).

Como os sistemas monoaminérgicos são importantes alvos na patofisiologia e tratamento da depressão (Elhwuegi, 2004; Millan, 2004; Berton e Nestler, 2006), nós investigamos o envolvimento dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico no efeito de ConBr sobre o TNF para revelar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos neste efeito. Nós verificamos os efeitos de alguns antagonistas farmacológicos sobre a ação de ConBr (10 µg/sítio) no TNF em camundongos. O envolvimento do sistema serotoninérgico na ação de ConBr sobre o TNF é sugerida por duas evidências. A primeira é o efeito sinérgico sobre o tempo de imobilidade nos camundongos tratados com ConBr e fluoxetina, citado anteriormente. A segunda é a

reversão da ação de ConBr sobre o TNF após o pré-tratamento dos camundongos com pindolol (bloqueador β -adrenérgico com atividade antagonista 5-HT_{1A}/5-HT_{1B}; 32 mg/Kg, i.p.), NAN – 190 (antagonista 5-HT_{1A}; 0,5 mg/Kg, i.p.) e cetanserina (antagonista 5-HT_{2A}; 5 mg/Kg, i.p.) que agem sobre receptores que parecem estar envolvidos no mecanismo de ação de drogas com efeito antidepressivo (Cryan *et al.*, 2002, Millan, 2004).

Nosso estudo também indica que a ConBr pode interagir com os receptores α_2 -adrenérgicos e D₂ dopaminérgicos para produzir seu efeito sobre o TNF, uma vez que o efeito da lectina foi revertido após o pré-tratamento dos animais com ioimbina (antagonista α_2 -adrenérgico; 1 mg/Kg, i.p.) e sulpirida (antagonista dopaminérgico D₂; 50 mg/Kg, i.p.). Alguns estudos têm mostrado que estes receptores estão implicados nas respostas comportamentais de algumas drogas no TNF (Zomkowski *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2004). Mesmo demonstrando um envolvimento nas ações de alguns agentes antidepressivos, os receptores α_1 -adrenérgico e D₁ dopaminérgicos (Millan, 2004; Yamada *et al.*, 2004; Dailly *et al.*, 2004) parecem não estar envolvidos na ação antidepressiva de ConBr observada neste estudo.

Como vários estudos apontam para o envolvimento da via de sinalização dependente de ERK1/2 (Dwivedi *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2001; D'Sa e Duman, 2002; Einat *et al.*, 2003 ; Feng *et al.*, 2003; Fumagalli *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2006) e do fator de transcrição CREB (Manji *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Tiraboschi *et al.*, 2004) no efeito antidepressivo de diversas drogas em algumas regiões do SNC, nós investigamos a modulação de ERK1/2 e CREB no hipocampo de camundongos após o tratamento com ConBr para elucidar alguns dos possíveis mecanismos intracelulares envolvidos no efeito antidepressivo da ConBr. Nosso estudo demonstrou um envolvimento do fator de transcrição CREB na ação de ConBr no hipocampo. Apesar de ERK1/2 modular

intracelularmente a resposta de alguns antidepressivos (D'Sa e Duman, 2002; Einat *et al.*, 2003), nosso trabalho não demonstrou uma modulação de ERK1/2 no hipocampo de camundongos após o tratamento com ConBr via i.c.v.

Apesar de ter sido demonstrado que o efeito de algumas drogas em diminuir o tempo de imobilidade dos animais no TNF é dependente da ativação de ERK1/2 e CREB (Blendy, 2006), nós observamos que ERK1/2 e CREB não são alterados pelo TNF no hipocampo.

Aparentemente o fator de transcrição CREB foi fosforilado mais intensamente no hipocampo de animais tratados com ConBr e submetidos ao TNF do que no hipocampo de animais não submetidos ao teste. Este fato pode ser devido a uma potencialização do efeito da ConBr sobre este parâmetro pela exposição ao TNF.

Nosso trabalho demonstrou que a lectina ConBr e a fluoxetina não são capazes de modular a fosforilação de ERK1/2 bem como CREB no córtex pré-frontal. Apesar de o córtex pré-frontal ser apontado como uma região envolvida na ação de alguns antidepressivos (Einat *et al.*, 2003; Fumagalli *et al.*, 2005), nossos resultados não demonstraram modulação destes alvos moleculares nesta estrutura. Isto pode ser explicado pelo fato de que algumas variações nos níveis de fosforilação de CREB após o tratamento com antidepressivos parecem ser dependentes do tipo de célula e da região do cérebro examinada, bem como do tempo para a coleta da amostra após o tratamento com antidepressivos (Blendy, 2006).

Os efeitos de ConBr sobre o TNF apresentados neste estudo parecem muito similares aos da fluoxetina. Como discutido anteriormente, nós observamos um efeito sinérgico da fluoxetina com a ConBr. Da mesma forma a ConBr também parece bastante similar à fluoxetina em relação a capacidade de modular vias intracelulares importantes na

resposta antidepressiva. Alguns estudos demonstram que o tratamento com fluoxetina aumenta a atividade de CREB no hipocampo (Thome *et al.*, 2000; Tiraboschi *et al.*, 2004). Nosso estudo confirma o estímulo de fosforilação de CREB pela ConBr, sugerindo um mecanismo de ação da lectina comum entre ConBr e fluoxetina.

Em relação ao envolvimento da ERK1/2 no efeito antidepressivo da fluoxetina, os estudos existentes parecem bastante contraditórios. Um trabalho recente demonstrou uma diminuição na fosforilação de ERK1/2 no hipocampo de ratos após o tratamento crônico com fluoxetina (Fumagalli *et al.*, 2005). Outro trabalho aponta para um aumento na atividade de CREB dependente da via MEK/ERK1/2 no hipocampo de ratos tratados com fluoxetina (Tiraboschi *et al.*, 2004). Entretanto deve ser considerado que existe uma diversidade de vias de sinalização que convergem para a fosforilação do sítio serina-133 de CREB, causando como consequência a ativação deste importante fator de transcrição.

Tem sido demonstrado que a ativação de receptores serotoninérgicos e dopaminérgicos por alguns antidepressivos leva à ativação da via PKA, podendo causar uma fosforilação de CREB (Carlezon *et al.*, 2005). Uma vez que nós demonstramos neste estudo que a ConBr pode interagir com alguns subtipos de receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A}) e noradrenérgicos (α_2), é possível que a PKA esteja sendo ativada. Outro estudo demonstra que os receptores 5-HT₃ serotoninérgicos quando ativados promovem um aumento no influxo de Ca²⁺, gerando a ativação de CaMKII e CaMKIV (Braun e Shulman, 1995). Nosso estudo demonstrou que a ConBr parece não atuar via receptor α_1 noradrenérgico, mas não sabemos se ela poderia atuar via receptores 5-HT₃ serotoninérgicos, levando a uma ativação da via CaMK. Desta forma, deve ser considerado que é mais provável uma convergência de vias, mais do que a ativação de um dos elementos isoladamente para obtenção de uma plena ativação de CREB. Desta forma será

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que;

- A administração da lectina ConBr (10 µg/sítio) via i.c.v. apresenta efeito antidepressivo no modelo do TNF, que persiste por até 120 min após o tratamento. Nesta concentração a ConBr não altera a atividade locomotora de camundongos, o que indica um efeito antidepressivo específico desta lectina neste modelo animal.
- A lectina ConBr quando administrada com a fluoxetina, em doses sub-ativas, 0,1 µg/sítio e 0,1 nmol/sítio respectivamente, potencializa o efeito antidepressivo da fluoxetina.
- O efeito antidepressivo de ConBr sobre o TNF é dependente da sua interação com os sistemas serotoninérgico (via receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A}), noradrenérgico (via receptores α₂-adrenérgicos) e dopaminérgico (via receptores D₂ dopaminérgicos).
- O TNF *per se* não alterou a fosforilação de CREB e ERK1/2 no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos tratados com veículo.
- A ConBr quando administrada via i.c.v. aumenta a fosforilação de CREB no hipocampo de camundongos, sendo que ERK1/2 não parece ser a proteína cinase responsável pela fosforilação no resíduo de Serina-133 de CREB no hipocampo de camundongos tratados com ConBr. Este efeito de ConBr não é observado no córtex, onde nenhum dos parâmetros bioquímicos estudados foram alterados.
- A lectina ConBr apresentou efeitos similares aos da fluoxetina sobre a fosforilação de CREB no hipocampo de camundongos. Entretanto, diferentemente da

ConBr, a fluoxetina ativa ERK1/2 no hipocampo. De forma similar à ConBr, fluoxetina também não causou alteração da fosforilação de CREB ou ERK1/2 no córtex pré-frontal.

8 PERSPECTIVAS

Este trabalho apresenta algumas perspectivas a serem consideradas como:

- Avaliar um possível envolvimento das principais vias que fosforilam o resíduo serina-133 de CREB (PKA e CAMK II e IV);
- Testar a ação do inibidor da proteína ERK1/2 no efeito antidepressivo de ConBr no TNF;
- Verificar a expressão do fator de transcrição c-fos e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) após o tratamento com ConBr;
- Analisar o efeito do tratamento crônico com ConBr sobre a fosforilação de proteínas cinases envolvidas com a depressão.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akiskal, H.S. Temperament and mood disorders. **Harv Ment Health Lett.** v. 16, p. 5 – 6, 2000.

Almeida, R.C.; Souza, D.G.; Soletti, R.C.; Lopez, M.G.; Rodrigues, A.L.; Gabilan, N.H. Involvement of PKA, MAPK/ERK and CaMKII, but not PKC in the acute antidepressant-like effect of memantine in mice. **Neurosci Lett.** v. 395, p. 93 – 97, 2006.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders . Washington DC, 4 ed, 1994.

Andrade, J.L.; Arruda, S.; Barbosa, T.; Paim, L.; Ramos, M.V.; Cavada, B.S.; Barral-neto, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunol.** v. 194, p. 98 – 102, 1999.

Bailey, C.H.; Kandel, E.R.; Si, K. The persistence of long-term memory: a molecular approach to self-sustaining changes in learning-induced synaptic growth neuron. **Neuron.** v. 44, p.49 – 57, 2004.

Baldessarini, R.J. Drugs and the treatment of psychiatric disorders. Em Goodman & Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** McGraw-Hill, 1996.

Barral-Neto, M.; Santos, S.B.; Barral, A.; Moreira, L.I.; Santos, C.F.; Moreira R.A.; Oliveira, J.T.; Cavada, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the dioclanae tribe. **Immunol Invest.** v. 21, p. 297 – 303, 1992.

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

Bjerrum, O.J.; Heegaard, N.H. CRC handbook of immunoblotting of proteins. Technical descriptions. Flórida, v. 1, 1988.

Blendy, J.A. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. **Biol Psychiatry.** 2006 (*in press*).

Blier, P.; de Montigny, C. Current advances and trends in the treatment of depression. **Trends Pharmacol Sci.** v. 15, p.220 – 226, 1994.

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

Bonny, C.; Borsello, T.; Zine, A. Targeting the JNK pathway as a therapeutic protective strategy for nervous system diseases. **Rev Neurosci.** v. 16, p.57 – 67, 2005.

- Braun, A.P.; Schulman, H.A. non-selective cation current activated via the multifunctional Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase in human epithelial cells. **J Physiol.** v. 488, p. 37 – 55, 1995.
- Bento, C.A.; Cavada, B.S.; Oliveira, J.T.; Moreira, R.A.; Barja-Fidalgo, C. Rat paw edema and leukocyte imigration induced by plant lectins. **Agents Actions.** v. 38, p. 48 – 54, 1993.
- Calloni, G.W.; Penno, C.A.; Cordova, F.M.; Trentin, A.G.; Neto, V.M.; Leal, R.B. Congenital hypothyroidism alters the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK in the hippocampus of neonatal rats. **Brain Res Dev Brain Res.** v. 154, p. 141 – 145, 2005.
- Carlezon, W.A.; Duman, R.S.; Nestler, E.J. The many faces of CREB. **Trends Neurosci.** v. 28, p. 436 – 445, 2005.
- Cavada, B.S.; Barbosa, T.; Arruda, S.; Grangeiro, T.B.; Baral-neto, M. Revisiting *proteus*: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci.** v. 2, p. 1 – 13, 2001.
- Cebo, C.; Vergoten, G.; Zanetta, J.P. Lectin activities of cytokines: functions and putative carbohydrate-recognition domains. **Biochim Biophys Acta.** v. 19, p. 422 – 434, 2002.
- Chang, L.; Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature.** v.410, n.1, p.37 – 40, 2001.
- Chen, A.C.; Shirayama, Y.; Shin, K.H.; Neve, R.L.; Duman, R.S. Expression of the cAMP response element binding protein (CREB) in hippocampus produces an antidepressant effect. **Biol Psychiatry.** v. 49, 753 – 762, 2001.
- Chen, Z.; Gibson, T.B.; Robinson, F.; Silvestro, L.; Pearson, G.; Xu, B.; Wright, A.; Vanderbilt, C.; Cobb, M.H. MAP Kinases. **Chem Rev.** v. 101, p.2449 – 2476, 2001.
- Chrivia, J.C.; Kwok, R.P.; Lamb, N.; Hagiwara, M.; Montminy, M.R.; Goodman, R.H. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. **Nature.** v. 365, p. 855 – 859, 1993.
- Cordova, F.M.; Rodrigues, A.L.; Giacomelli, M.B.; Oliveira, C.S.; Posser, T.; Dunkley, P.R.; Leal, R.B. Lead stimulates ERK1/2 and p38^{MAPK} phosphorylation in the hippocampus of imature rats. **Brain Res.** v. 998, p. 65 – 72, 2004.
- Coyle, J.T.; Duman, R.S. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. **Neuron.** v. 38, p. 157 – 160, 2003.
- Cryan, J.F.; Markou, A.; Lucki, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends Pharmacol Sci.** v. 23, p. 36 – 43, 2002.
- Da Silva, G.D.; Matteussi, A.S.; dos Santos, A.R.; Calixto, J.B.; Rodrigues, A.L. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the til suspension test in mice. **Neuroreport.** v. 11, p. 3699 – 3702, 2000.

Dai, W.M.; Christensen, K.V.; Egebjerg, J.; Ebert, B.; Lambert, J.D.C. Correlation of the expression of kainate receptor subtypes to responses evoked in cultured cortical and spinal cord neurones. **Brain Res.** v. 926, p.94 – 107, 2002.

Dailly, E.; Chenu, F.; Renard, C.E.; Bourin, M. Dopamine, depression and antidepressants. **Fundam Clin Pharmacol.** v. 18, p.601 – 607, 2004.

Delay, J.; Lane, B.; Buisson, J.F. [The action of isonicotinyln-hydrazone used in the treatment of depressive states.]. **Am Med Psychol.** v. 110, p. 689 – 692, 1952.

Dolmetsch, R.E.; Pajvani, U.; Fife, K.; Spotts, J.M.; Greenberg, M.E. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. **Science.** v. 294, p.333 – 339, 2001.

Drevets, W.C. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. **Curr Opin Neurobiol.** v. 11, p. 240 – 249, 2001.

D'Sa, C.; Duman, R.S. Antidepressants and neuroplasticity. **Bipolar Disord.** v. 4, p.183–194, 2002.

Duman, R.; Malberg, J.; Nakagawa, S.; D'Sa, C. Neuronal plasticity and survival in mood disorders. **Biol Psychiatry.** v.48, p732–739, 2000.

Dwivedi, Y.; Rizavi, H.S.; Roberts, R.C.; Conley, R.C.; Tamminga, C.A.; Pandey, G.N. Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. **J Neurochem.** v. 77, p. 916 – 928, 2001.

Eckeli, A.L.; Dach, F.; Rodrigues, A.L.S. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effect in mice. **Neuroreport.** v. 11, p. 839 – 843, 2000.

Einat, H.; Yuan, P.; Gould, T.D.; Li, J.; Du, J.; Zhang, L.; Manji, H.K.; Chen, G. The role of the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in mood modulation. **J Neurosci.** v. 23, p. 7311 – 7316, 2003.

Elhwuegi, A.S. Central monoamines and their role in major depression. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** v. 28, p.435 – 451, 2004.

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

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

Fava, M.; Kendler, K.S. Major depressive disorder. **Neuron.** v. 28, p. 335 – 341, 2000.

Fay, A.M.; Bowie, D. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. **J Physiol.** v. 572, p. 201 – 213, 2006.

- Feng, P.; Guan, Z.; Yang, X.; Fang, J. Impairments of ERK signal transduction in the brain in a rat model of depression induced by neonatal exposure of clomipramine. **Brain Res.** v. 991, p. 195 – 205, 2003.
- Fumagalli, F.; Molteni, R.; Calabrese, F.; Frasca, A.; Racagni, G.; Riva, M.A. Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. **J Neurochem.** v. 93, p. 1551 – 1560, 2005.
- Ferreira, R.R.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.; Gomes, J.C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and Concanavalin A. **Inflamm Res.** v. 45, p.442 – 447, 1996.
- Gomes, J.C.; Ferreira, R.R.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T. 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. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science.** v.294, p.1024 – 1030, 2001.
- Gutman, Y.; Lazarovici, P. Cellular & Molecular Mechanisms of Toxin Action. Volume 1: **Toxins and signal transduction.** Hardwood Academic Publishers. pp.501, 1997.
- Hagemann, C.; Blank, J.L. The ups and downs of MEK kinase interactions. **Cell Signalling.** v.13, p. 863 – 875, 2001.
- Harkin, A.; Connor, T.J.; Walsh, M.; St John, N.; Kelly, J.P. Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors. **Neuropharmacology.** v. 44, p. 616 – 623, 2003.
- Helmholz H.; Cartellieri S.; He, L.; Thiensen, P.; Niemeyer, B. Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. **J Chromatography A.** v.1006, p.127 – 135, 2003.
- Heurteaux, C.; Guy, N.; Laigle, C.; Blondeau, N.; Duprat, F.; Mazzuca, M.; Lang-Lazdunski, L.; Widmann, C.; Zanzouri, M.; Romey, G.; Lazdunski, M. TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. **EMBO J.** v. 23, p.2684 – 2695, 2004.
- 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.
- Hunter, T. Signaling – 2000 and beyond. **Cell.** v. 100, p.113 – 127, 2000.
- Johnson-Farley, N.N.; Kertesy, S.B.; Dubyak, G.R.; Cowen, D.S. Enhanced activation of Akt and extracellular-regulated kinase pathways by simultaneous occupancy of Gq-coupled 5-HT_{2A} receptors and Gs-coupled 5-HT_{7A} receptors in PC12 cells. **J Neurochem.** v. 92, p. 72 – 82, 2005.

- Kirner, A.; Deutsch, S.; Weiler, E.; Polak, E.H.; Apfelbach, R. Concanavalin A application to the olfactory epithelium reveals different sensory neuron populations for the odour pair D- and L-carvone. **Behav Brain Res.** v. 138, p. 201 – 206, 2003.
- Kuan, C.Y.; Yang, D.D.; Samanta, D.R.; Davis, R.J.; Rakic, P.; Flavel, R.A. The JNK 1 and JNK 2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. **Neuron.** v. 22, p.667 – 676, 1999.
- Kuhn, R. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). **Am J Psychiatry.** v. 115, p. 459 – 464, 1958.
- Laifenfeld, D.; Karry, R.; Grauer, E.; Klein, E.; Ben-Shachar, D. Antidepressants and prolonged stress in rats modulate CAM-L1, laminin, and pCREB, implicated in neuronal plasticity. **Neurobiol Dis.** v. 20, 432 – 441, 2005.
- Leal, R.B.; Cordova, F.M.; Lynn, H.; Bobrovskaya, L.; Dunkley, P.R. Lead-stimulate p38^{MAPK}-dependent Hsp27 phosphorylation. **Toxicol App Pharmacol.** v.178, p.44 – 51, 2002.
- Liang, S.; Woodlock, T.J.; Whitin, J.C.; Lichtman, M.A.; Segel, G.B. Signal transduction in N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and Concanavalin A stimulated human neutrophils: superoxide production without a rise in intracellular free calcium. **J Cell Physiol.** v.145, p.295 – 302, 1990.
- Lin, S.S.; Levitan, I.B. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. **Trends Neurosci.** v.14, p.273 – 277, 1991.
- Lineal, M.; Grasso, A.; Lazarovici, P. Cellular & Molecular Mechanisms of Toxin Action. Volume 2: **Secretory systems and toxins.** Harwood Academic Publishers. pp.476, 1998.
- Liotti, M.; Mayberg, H.S. The role of functional neuroimaging in the neuropsychology of depression. **J Clin Exp Neuropsychol.** v. 23, 121 – 136, 2001.
- Liu, F.T.; Rabinovich, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer.** v. 5, p.29 – 41, 2005.
- Malberg, J.E.; Blendy, J.A. Antidepressant action: to the nucleus and beyond. **Trends Pharmacol Sci.** v. 26, 631 – 638, 2005.
- Manji, H.K.; Drevets, W.C.; Charney, D.S. The cellular neurobiology of depression. **Nat Med.** v. 7, p. 541 – 547, 2001.
- Manji, H.K.; Moore, G.J.; Rajkowska, G.; Chen, G. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. **Mol Psychiatry.** v. 5, p.578 –593, 2000.
- Mann, J.J.; Malone, K.M.; Diehl, D.J.; Perel, J.; Cooper, T.B.; Mintum, M.A. Demonstration in vivo of reduced serotonin responsivity in the brain of untreated depressed patients. **Am J Psychiatry.** v. 153, p. 174 – 182, 1996.
- Matos e Sousa, F.G. Tratamento da depressão. **Rev Bras Psiqu.** v. 21, p. 18 – 23, 1999.

Maubach, K.A.; Rupniak, N.M.; Kramer, M.S.; Hill, R.G. Novel strategies for pharmacotherapy of depression. **Curr Opin Chem Biol.** v. 3, p. 481 – 488, 1999.

Mayr, B.; Montminy, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 2, p. 599 – 609, 2001.

Mielke, K.; Herdegent, T. JNK and p38 stresskinases – degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. **Prog Neurobiol.** v.61, p.45 – 60, 2000.

Millan, M.J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review. **Eur J Pharmacol.** v. 500, p.371 – 384, 2004.

Moreira, R.A. & Cavada, B.S.; Lectin from *Canavalia brasiliensis*. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biol Plantarum.** v. 26, p. 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.

Nebreda, A.R.; Porras, A. p38 MAP Kinases: Beyond the stress response. **Trends Neurosci.** v.25, p.257 – 260, 2000.

Nemeroff, C. B.; Owens, M. J. Treatment of mood disorders. **Nat Neurosci.** 5 Suppl, p.1068-1070, 2002.

Nestler, E.J.; Barrot, M.; Dileone, R.J.; Eisch, A.J.; Gold, S.J.; Monteggia, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron.** v.34 p.13 – 25, 2002.

Ohta, S.; Inazu, T.; Taniguchi, T.; Nakagawara, G.; Yamamura, H. Protein-tyrosine phosphorylations induced by concanavalin A and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. **Eur J Biochem.** v. 206, p.895 – 900, 1992.

Oliveira, J.T.A.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda*. **Rev Brasil Bot.** v. 14, p. 61-66, 1991.

Pandey, S.C.; Roy, A.; Zhang, H. The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. **Alcohol Clin Exp Res.** v. 27, 396 – 409, 2003.

Pani, G.; Colavitti, R.; Borrello, S.; Galeotti, T. Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes. **Biochem J.** v.347, p.173 – 181, 2000.

Park, R.; Kim, M.S.; So, H.S.; Jung, B.H.; Moon, S.R.; Chungf, S.Y.; Ko, C.B.; Kim, B.R.; Chung, H.T. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1(JNK 1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. **Biochem Pharmacol.** v. 60, p.1685 – 1691, 2000.

Partin, K.M.; Patneau, D.K.; Winters, C.A., Mayer, M.L.; Buonanno, A. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. **Neuron**. v.11, p.1069 – 1082, 1993.

Pereira, S.F. Caracterização dos efeitos biológicos das lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e de *Canavalia ensiformes* (ConA) em preparações do sistema nervoso central e em células tumorais. **Dissertação de Mestrado**. CPG-Neurociências, CCB, UFSC, pp.97. 2005.

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

Petit-Demouliere, B.; Chenu, F.; Bourin, M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacology**. v. 177, p.245 – 255, 2005.

Petrie, R.X.; Reid, I.C.; Stewart, C.A. The N-methyl-D-Aspartate receptor, synaptic plasticity, and depressive disorder. A critical review. **Pharmacol Ther**. v. 87, p. 11 – 25, 2000.

Pliakas, A.M.; Carlson, R.R.; Neve, R.L.; Konradi, C.; Nestler, E.J.; Carlezon, W.A.Jr. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. **J Neurosci**. v. 21, p. 7397 – 7403, 2001.

Porsolt, R.D.; Bertin, A.; Jalfre, M. Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**. v. 229, p.327 – 336, 1977.

Ricci, L.C.; Wellman, M.M. Monoamines: biochemical markers of suicide? **J Clin Psychol**. v. 46, p. 106 – 116, 1990.

Rodrigues, A.L.; Rocha, J.B.T.; Mello, C.F.; Souza, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol**. v. 79, p. 150 – 156 , 1996.

Rodriguez, D.; Cavada, B.S.; Abreu-de-Oliveira, J.T.; de-Azevedo-Moreira, R.; Russo, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/manose-binding plant lectins. **Braz J Med Biol Res**. v. 25, p. 823 – 826, 1992.

Rogóz, Z.; Skuza, G.; Maj, J.; Danysz, W. Synergistic effect of uncompetitive NMDA receptor antagonists and antidepressant drugs in the forced swimming test in rats . **Neuropharmacology**. v. 42, p. 1024 – 1030, 2002.

Rosa, A.O.; Lin, J.; Calixto, J.B.; Santos, A.R.S.; Rodrigues, A.L.S. Involvement of NMDA receptors and L-arginine – nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. **Behav Brain Res**. v. 144, p. 87 – 93, 2003.

Santarelli, L.; Saxe, M.; Gross, C.; Surget, A.; Battaglia, F.; Dulava, S. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioural effects of antidepressants. **Science**. v. 301, p.805 – 809, 2003.

- Sanz-Aparicio, J.; Hermoso, J.; Ggrangeiro, T.B.; Calvete, J.J.; Cavada, B.S. The crystal structure of canavalia brasiliensis lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from concanavalin A. **FEBS Lett.** v. 405, p. 114 – 8, 1997.
- Schenk, U.; Menna, E.; Kim, T.; Passafaro, M.; Chang, S.; Camilli, P.; Matteoli, M. A novel pathway for presynaptic mitogen-activated kinase activation via AMPA receptors. **J Neurosci.** v. 25, p.1654 – 1663, 2005.
- Scherer, W.J.; Udin, S.B. Concanavalin A reduces habituation in the tectum of the frog. **Brain Res.** v.667, p.209 – 215, 1994.
- Sempere, T.; Cedeño, N.; Urbina, M.; Lima, L. 8-[³H]-hydroxyl-2-(di-*n*-propylamino)tetralin binding sites in blood lymphocytes of rats and the modulation by mitogens and immobilization. **J Neuroimmunol.** v. 138, p.8 – 16, 2003.
- Sheline, Y.I.; Gado, M.H.; Kraemer, H.C. Untreated depression and hippocampal volume loss. **Am J Psychiatry.** v. 160, p. 1516 – 1518, 2003.
- Sheng, M.; McFadden, G.; Greenberg, M.E. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. **Neuron.** v. 4 , p. 571 – 582, 1997.
- Skolnick, P. Antidepressants for the new millennium. **Eur J Pharmacol.** v. 375, p. 31 – 40, 1999.
- Smith, M.A.; Makino, S.; Kvetnansky, R.; Post, R.M. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. **J Neurosci.** v. 15, 1768 – 1777, 1995.
- Summer, J.B.; Howell, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with Concanavalin A. **J Bacteriol.** v. 32, p.227 – 237, 1936.
- Sweatt, J.D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. **Curr Opin Neurobiol.** v. 14, p.1 – 7, 2004.
- Thomas, G.M.; Huganir, R.L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci.** v. 5, p.173 – 183, 2004.
- Thome, J.; Sakai, N.; Shin, K.; Steffen, C.; Zhang, Y.J.; Impey, S.; Storm, D.; Duman, R.S. cAMP response element-mediated gene transcription is upregulated by chronic antidepressant treatment. **J Neurosci.** v. 20, p. 4030 – 4036, 2000.
- Tiraboschi, E.; Tardito, D.; Kasahara, J.; Moraschi, S.; Pruneri, P.; Gennarelli, M.; Racagni, G.; Popoli, M. Selective phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaM kinase IV and MAP kinase cascades. **Neuropsychopharmacology.** v. 29, p. 1831 – 1840, 2004.

Trigueiros, V.; Lougarre, A.A.; Ali-Ahmed, D.; Rahbé, Y.; Guillot, L.C.; Fournier, D.; Paquereau, L. Xerocomus chrysenteron lectin: identification of new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1621, p. 292-298, 2003.

Vasconcelos, I.M.; Cavada, B.S.; Moreira, R.A.; Oliveira, J.T.A. **J Food Biochem**. v. 15, p. 137-154, 1991.

Volke, V., Wegener, G., Bourin, M., Vasar, E. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of selective neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole in mice. **Behav Brain Res**. v. 140 p. 141 – 147, 2003.

Xing, J.; Ginty, D.D.; Greenberg, M.E. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. **Science**. v. 273, p. 959 – 963, 1996.

Wallace, T.L.; Stellitano, K.E.; Neve, R.L.; Duman, R.S. Effects of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein overexpression in the basolateral amygdala on behavioral models of depression and anxiety. **Biol Psychiatry**. v. 56, 151 – 160, 2004.

Wang, Y.Z.; Bonner, J.C. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase ERK-1 and ERK-2 activation by vanadium pentoxide in rat pulmonary myofibroblasts. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v.22, p.590 – 596, 2000.

Wong, D.T.; Bymaster, F.P.; Engleman, E.A. Prozac (fluoxetine, lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. **Life Sciences**. v. 57, p.411 – 441, 1995.

Wong, M.L.; Licinio, J. Research and treatment approaches to depression. **Nat Rev Neurosci**. v.2, p.343 – 351, 2001.

Yamada, J.; Sugimoto, Y. involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. **Eur J Pharmacol**. v. 504, p. 207 – 211, 2004.

Yamato, K.K.; Gonzalez, G.A.; Biggs, W.H.; Montminy, M.R. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. **Nature**. v. 334, p. 494 – 498, 1988.

Yuan, P.X.; Huang, L.D.; Jiang, Y.M.; Gutkind, J.S.; Manji, H.K.; Chen, G. The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth. **J Biol Chem**. v. 276, p. 31674 – 31683, 2001.

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

Zomkowski, A.D.; Hammes, L.; Lin, J.; Calixto, J.B.; Santos, A.R.; Rodrigues, A.L. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. **Neuroreport**. v. 13, p.387 – 91, 2002.

Zomkowski, A.D.E; Rosa, A.O.; Lin, J.; Santos, A.R.S.; Calixto, J.B.; Rodrigues, A.L.S. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. **Brain Res.** v. 1023, p. 253– 263, 2004.

ANEXO

ARTIGO PUBLICADO