

AMANDA VIRTUOSO JACQUES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DE LECTINAS  
FRENTE À NEUROTOXICIDADE GLUTAMATÉRGICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós  
graduação em Bioquímica do Centro de  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Santa Catarina como parte dos requisitos para  
obtenção do grau de Mestre em Bioquímica  
Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

Florianópolis  
2012

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Jacques, Amanda Virtuoso  
Avaliação do efeito neuroprotetor de lectinas frente à  
neurotoxicidade glutamatérgica [dissertação] / Amanda  
Virtuoso Jacques ; orientador, Rodrigo Bainy Leal -  
Florianópolis, SC, 2012.  
104 p. ; 21cm

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. lectinas . 3. neuroproteção. 4.  
glutamato. I. Leal, Rodrigo Bainy. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica. III. Título.





## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo incentivo de seguir em frente...

Ao Professor Rodrigo B. Leal, meu orientador, pelos ensinamentos...

Aos companheiros de laboratório Ana Paula Costa, Daniela Zótico, Débora Rieger, Filipe Gonçalves, Mariana Maestri, Mark Lopes e Tanara Peres pelo companheirismo e toda a ajuda que foi de extrema importância no desenvolvimento deste projeto...

A todos os professores e alunos da PPG-BQA que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho...

Aos professores Alexandra Latini, Carlos Peres, Nelson Gabilan e Rui Prediger por participarem da banca examinadora desta dissertação e pela valiosa contribuição na sua correção...

Ao CNPq, CAPES, FAPESC e FINEP, pelo apoio financeiro...

Aos meus amigos e familiares que acreditaram em mim e que contribuíram para o encerramento de mais esta etapa em minha vida...

**...Muito obrigada!**



## RESUMO

A excitotoxicidade induzida pela excessiva ativação da neurotransmissão glutamatérgica está envolvida em várias neuropatologias. Neste sentido, moléculas que impeçam a liberação de glutamato ou a ativação excessiva dos seus receptores, podem ser úteis para prevenir a morte neuronal em algumas doenças. As lectinas são proteínas capazes de ligação reversível a carboidratos e glicoconjugados, e algumas têm sido utilizadas no estudo e purificação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos. O presente estudo teve como objetivo avaliar a potencial atividade neuroprotetora de lectinas extraídas de plantas como a ConBr, BBL, VGL, CGL e FTL frente à excitotoxicidade glutamatérgica. Fatias de hipocampo foram isoladas a partir de camundongos machos adultos e incubadas durante 6 h em solução tampão salina/Krebs/DMEM, na presença de glutamato (10 mM) ou glutamato (10 mM) co-administrado com ConBr, BBL, VGL, CGL ou FTL (10 µg/mL). Além disso, a fosforilação de MAPKs (ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup> e JNK1/2/3) e AKT foi avaliada por western blot na avaliação neuroprotetora de ConBr, VGL e CGL. Os resultados mostram que o glutamato foi capaz de reduzir a viabilidade hipocampal (~25%), diminuiu a fosforilação de AKT e aumentou a fosforilação de ERK1 e p38<sup>MAPK</sup>. Notavelmente, ConBr e VGL impediram a redução da viabilidade celular e reverteram a diminuição da fosforilação de AKT induzida pelo glutamato. Entretanto, somente VGL reverteu o aumento na fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> e ERK1 induzido por glutamato. Na presença do inibidor de PI3K, LY294002 (10 µM), ConBr não foi capaz de reverter a queda na viabilidade induzida pelo glutamato, sugerindo que o efeito neuroprotetor de ConBr é dependente da via PI3K/AKT. O mecanismo envolvido na modulação das vias de sinalização intracelular não foi elucidado. No entanto, considerando os receptores NMDA como uma proteína glicosilada no domínio N-terminal extracelular, é possível sugerir um bloqueio dos receptores de NMDA por meio da interação das lectinas ConBr e VGL com as cadeias de oligossacarídeos.

**Palavras-chave:** glutamato, lectinas de planta, neuroproteção, AKT, MAPK, NMDA.





## ABSTRACT

The excitotoxicity induced by excessive activation of the glutamatergic neurotransmission is involved in several neuropathologies. In this sense, molecules that prevent the release of glutamate or excessive activation of its receptors can be useful to prevent neuronal death in these diseases. Lectins are proteins capable of reversible binding to carbohydrates on glycoconjugates, and some have been used in the study and purification of ionotropic glutamate receptors. The present study aimed to evaluate the potential neuroprotective activity of lectins extracted from plants such as ConBr, BBL, VGL, CGL and FTL to prevent glutamate-induced excitotoxicity. Hippocampal slices were isolated from adult male mice and incubated for 6 h in Krebs/saline/DMEM buffer in the presence of glutamate (10 mM) or glutamate (10 mM) plus ConBr, BBL, VGL, CGL or FTL (10 µg/mL). Moreover, the phosphorylation of MAPKs (ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup> and JNK1/2/3) and AKT was evaluated by western blotting in the study concerning the neuroprotective mechanism displayed by ConBr, VGL and CGL. The results show that glutamate was able to reduce hippocampal slice viability (-25%), diminish the phosphorylation of AKT and increase the phosphorylation of p38<sup>MAPK</sup> and ERK1. No changes were observed in the phosphorylation of JNK1/2/3 and ERK2. VGL prevented the increment of p38<sup>MAPK</sup> and ERK1 phosphorylation. Notably, ConBr and VGL prevented the reduction of cell viability and the decrease of AKT phosphorylation induced by glutamate. Furthermore, in the presence of PI3K inhibitor, LY294002 (10 µM), ConBr was unable to reverse the loss in cell viability induced by glutamate. It suggests that ConBr exerts its neuroprotective effect in a manner dependent of PI3K/AKT pathway. The mechanism involved in the modulation of signaling pathways was not addressed in our study. However, considering NMDA receptors as glycosylated protein in the extracellular N-terminal domain it is possible to suggest a blockage of NMDA receptors via ConBr or VGL lectin interaction with oligosaccharide chains.

**Key words:** Glutamate, plant lectins, neuroprotection, AKT, MAPKs, NMDA.



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura global do tetrâmero de ConBr e a localização das quatro subunidades.....	21
<b>Figura 2:</b> Classificação esquemática dos receptores glutamatérgicos.....	24
<b>Figura 3:</b> Vias de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs). ....	29
<b>Figura 4:</b> Vias de sinalização da PI3K/AKT .....	31
<b>Figura 5:</b> Avaliação do efeito neuroprotetor de VGL, BBL e FTL (afinidade por galactose) frente à neurotoxicidade do glutamato sobre fatias hipocâmpais de camundongos.....	70
<b>Figura 6:</b> Avaliação do efeito neuroprotetor de CGL (afinidade por manose/glicose) frente à neurotoxicidade do glutamato em modelo <i>in vitro</i> de fatias hipocâmpais de camundongos.....	71
<b>Figura 7:</b> Avaliação da neurotoxicidade de CGL em fatias de hipocampo de camundongo. ....	72
<b>Figura 8:</b> Avaliação do efeito neuroprotetor de CGL contra a neurotoxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo de camundongos.....	72
<b>Figura 9:</b> O tratamento com glutamato e/ou VGL e CGL não altera a fosforilação de JNK1/2.....	74
<b>Figura 10:</b> Glutamato estimula a fosforilação de ERK-1, e VGL reverte esse efeito.....	75
<b>Figura 11:</b> Glutamato estimula a fosforilação de p38 <sup>MAPK</sup> e esse efeito é revertido por VGL, mas não por CGL.....	76
<b>Figura 12:</b> Glutamato induz diminuição da fosforilação de AKT e a lectina VGL reverte este efeito.....	77
<b>Figura 13:</b> Possível mecanismo de ação de ConBr envolvendo o sistema glutamatérgico no efeito neuroprotetor observado <i>in vitro</i> .....	81
<b>Figura 14:</b> Bloqueio do domínio de ligação de carboidratos (CRD) com manose neutraliza o efeito neuroprotetor de ConBr .....	82
<b>Figura 15:</b> Possível mecanismo de excitotoxicidade glutamatérgica utilizando um inibidor de PI3K observado no ensaio de viabilidade celular MTT <i>in vitro</i> .....	83
<b>Tabela 1:</b> Substratos da AKT e Efeitos.....	32
<b>Tabela 2:</b> Fabricante, número do catálogo e diluição dos anticorpos utilizados para “western blot”.....	40



## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico

ANOVA: análise de variância

BBL: lectina extraída das sementes de *Bauhinia bauhinioides*

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

ConA: lectina concanavalina A

ConBr: lectina extraída das sementes de *Canavalia brasiliensis*

CGL: lectina extraída das sementes de *Canavalia gladiata*

FTL: Frutalina- lectina extraída da *Artrocarpus incisa*

GMPC: guanosina de monofosfato cíclico

HEPES: ácido n-2-hidroxiethylpiperazina

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

NMDA: N-metil D-aspartato

PI3K: Fosfatidil-inositol 3- cinase

PKA: proteína cinase A

PKB/AKT: proteína cinase B

PKC: proteína cinase C

PKG: proteína cinase G

SNC: sistema nervoso central

TNF: teste do nado forçado

VGL: lectina extraída das sementes de *Vatairea guianensis*



# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 Lectinas.....	18
1.1.1 Lectinas endógenas.....	18
1.1.2 Lectinas extraídas de plantas.....	19
1.2 Glutamato.....	22
1.2.1 Receptores Glutamatérgicos.....	22
1.2.1.1 Receptores glutamatérgicos ionotrópicos.....	22
1.2.1.2 Receptores glutamatérgicos metabotrópicos.....	23
1.2.2 Transmissão glutamatérgica e a glicosilação dos receptores de glutamato.....	24
1.2.3 Excitotoxicidade glutamatérgica e morte celular.....	25
1.3 Proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPKs).....	27
1.4 Via da Fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K)/ AKT.....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	33
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 Objetivos gerais.....	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
4.1 Animais.....	37
4.2 Drogas e Reagentes.....	37
4.3 Isolamento de lectinas.....	37
4.4 Preparo de fatias hipocampais e determinação de viabilidade celular frente à toxicidade glutamatérgica in vitro.....	38
4.5 Determinação de viabilidade celular frente à toxicidade glutamatérgica in vitro.....	38
4.6 Western blot.....	38
4.6.1 Preparo das amostras para eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	38
4.6.2 Separação de proteínas por eletroforese (SDS-PAGE).....	39
4.6.3 Eletrotransferência.....	39
4.6.4 Imunodeteção.....	39
4.7 Análise estatística.....	41
<b>5. RESULTADOS</b> .....	43
5.1 CAPÍTULO 1- Artigo submetido ao periódico Neurochemistry International.....	43

5.2 CAPÍTULO 2- Estudo da ação neuroprotetora das lectinas VGL, BBL, CGL e FTL frente à neurotoxicidade glutamatérgica.....	69
5.2.1 Avaliação da viabilidade celular frente à toxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo de camundongos.....	69
5.2.2 Avaliação da viabilidade celular e curvas dose-resposta da lectina CGL (afinidade manose/glicose) frente à neurotoxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo de camundongos.....	71
5.2.3 Modulação das MAPKs em fatias hipocampais expostas ao glutamato.....	73
5.2.4 Modulação de PI3K/AKT em fatias hipocampais expostas ao glutamato.....	77
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>87</b>
<b>8.PERSPECTIVAS.....</b>	<b>89</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>91</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A funcionalidade do sistema nervoso central (SNC) depende dos sistemas de sinalização intracelular que se organizam como módulos interdependentes (GREENGARD, 2001; WONG e SCOTT, 2004), que respondem aos sinais extracelulares através da modificação da atividade de proteínas cinases e proteínas fosfatases regulando o estado de fosforilação de proteínas (GREENGARD, 2001; LEAL et al., 2004; THOMAS e HUGANIR, 2004). Desta forma, a atividade de fatores de transcrição, enzimas, canais iônicos, receptores e proteínas sinápticas podem ser modificados por este mecanismo resultando na modulação de processos como proliferação, diferenciação celular, morte celular, neurogênese, interações celulares, neurotransmissão e neuroplasticidade (CHANG e KARIN, 2001; GREENGARD, 2001; KANDEL, 2001; THOMAS e HUGANIR, 2004; WONG e SCOTT, 2004). Alterações destes sistemas podem causar ou induzir distúrbios neurodegenerativos, psiquiátricos ou comportamentais.

A grande maioria dos receptores, canais iônicos e transportadores de neurotransmissores de membrana são de natureza glicoproteica e podem modular direta ou indiretamente enzimas intracelulares como proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), proteína cinase A (PKA), proteína cinase  $Ca^{2+}$ /calmodulina-dependente (CaMKs), proteína cinase C (PKC), fosfatidil-inositol 3-cinase (PI3K/AKT) regulando expressão gênica, embriogênese, proliferação, sobrevivência/morte celular, neuroplasticidade (THOMAS e HUGANIR, 2004).

Estudos de glicobiologia têm revelado a importância das cadeias de açúcares, presentes nas glicoproteínas, glicolípídios e proteoglicanos da superfície celular, como biossinalizadores na comunicação intercelular e controle de vias de sinalização intracelular; realizando papéis chave no desenvolvimento do SNC, na modulação sináptica e neuroplasticidade (DUBE e BERTOZZI, 2005; ENDO, 2005). Carboidratos agem como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos e podem influenciar fenômenos de diferenciação, proliferação e interações entre células em condições fisiológicas e patológicas. As informações presentes na estrutura dos oligossacarídeos conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células são reconhecidas por um grupo especializado de proteínas, as lectinas (SANZ- APARICIO et al., 1997).

## 1.1 Lectinas

As moléculas mais estudadas na glicobiologia e com interesse farmacológico são as lectinas. As lectinas são um grupo heterogêneo de proteínas que possuem a capacidade de ligação reversível aos carboidratos e glicoconjugados, podendo regular diversos eventos fisiológicos e patológicos da função celular (DUBE e BERTOZZI, 2005; LIU e RABINOVICH, 2005). Os animais possuem várias lectinas no SNC com capacidade de regular funções neurais importantes (YAMANE et al., 2010). Apesar disso, exceto as galectinas, poucas delas têm sido isoladas do SNC e caracterizadas com relação a suas funções (GHAZARIAN et al, 2010).

### 1.1.1 Lectinas endógenas

Dentre as lectinas presentes no organismo dos mamíferos, destacam-se as galectinas. As galectinas são uma família de 15 lectinas hidrossolúveis que exibem notável afinidade por beta-galactose, podendo ser encontradas no citoplasma, no núcleo ou até mesmo no espaço intercelular em diferentes tecidos, desempenhando diversas atividades biológicas. Estudos cristalográficos determinaram que grande parte das galectinas possuem em sua estrutura um domínio de cerca de 130 aminoácidos denominado “domínio de reconhecimento de carboidratos” (CRD), responsável pela interação da proteína com o carboidrato (também denominado domínio lectínico) (LOPEZ-LUCENDO et al., 2004; RABINOVICH e TOSCANO, 2009; HUGHES, 1999, YANG et al., 2008). Grande variedade de processos fisiológicos e patológicos como embriogênese, diferenciação e reparo de células adultas, regulação do sistema imune e processos de metástase tumoral são modulados por diferentes galectinas (NISHIOKA et al 2002; LADERACH et al., 2010; RABINOVICH e TOSCANO, 2009).

A galectina-1 é uma pequena proteína de 14 kDa, em solução ocorre predominantemente sob a forma dimérica essencial para as interações com os carboidratos e determinante de sua atividade biológica (LIAO et al, 1994; LOPEZ-LUCENDO et al., 2004, DI LELLA, 2010). Nos estudos relacionados ao SNC tem se destacado o papel da galectina-1 no desenvolvimento do SNC e na resposta frente a diversas condições neuropatológicas. Estudos utilizando culturas primárias de astrócitos mostraram que galectina-1 pode induzir a diferenciação astrocitária e estimular a expressão de BDNF (SASAKI, 2004; ENDO, 2005). A expressão de galectina-1 principalmente por astrócitos e células progenitoras neurais parece estimular a neurogênese (IMAIZUNI et al, 2011, SAKAGUCHI et al., 2006; KAJITANI et al,

2009) e a produção de fatores neurotróficos como BDNF (ENDO, 2005). Adicionalmente, foi observado que em condições de isquemia *in vivo* e *in vitro* a expressão de galectina-1 pelos astrócitos foi estimulada, acarretando elevação da produção de BDNF (QU et al., 2011). Além disso, foi descrito um papel neuroprotetor de galectina-1 frente à neurotoxicidade glutamatérgica em modelo de neurônios cerebelares (LEKISHVILI et al., 2006).

### 1.1.2 Lectinas extraídas de plantas

Lectinas obtidas de plantas têm sido muito utilizadas como ferramentas no estudo de mecanismos moleculares relacionados à fisiologia e patologia celular animal (CAVADA et al., 2001; FAY e BOWIE, 2006). Além disso, têm sido utilizadas como estratégias no tratamento de certos tipos de câncer (ROSTOCK et al., 2005; KIM et al., 2004). As atividades biológicas variam e podem incluir modulação da proliferação celular, apoptose e produção de óxido nítrico (NO) (CAVADA et al., 2001).

Lectinas da família Fabaceae (Leguminosae) possuem a capacidade potencial de modular alvos moleculares que dentro do sistema nervoso central poderiam estar envolvidos na regulação comportamental, na neuroplasticidade, ou mesmo na resposta a determinadas drogas de ação central (CAVADA et al. 2001; RUSSI et al., 2012). Lectinas provenientes dessa família representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. Na subtribo Diocleinae observam-se os gêneros, *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*, dos quais lectinas têm sido isoladas e caracterizadas, sendo muitas de origem brasileira como as extraídas de: *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Dioclea grandiflora* (DGL), *Dioclea violacea* (DVioL) entre outras (CAVADA et al., 2001).

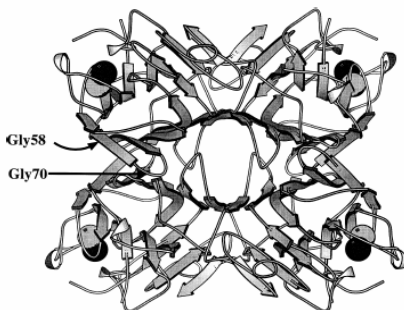
Todas as lectinas Diocleanae apresentam estruturas multiméricas compostas de monômeros de 25,5 KDa, além de exibirem a característica de equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH (CALVETE et al., 1999). Cada subunidade também contém sítios de ligação para íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , importantes para atividade biológica da proteína, e uma cavidade hidrofóbica que interage com ligantes hidrofóbicos, assim como fito-hormônios (SANZ-APARICIO et al., 1997). Nessa família as lectinas apresentam como especificidade principal de reconhecimentoos carboidratos D-manose e D-glicose (CAVADA et al., 2001).

Concanalina A (ConA), uma lectina extraída das sementes de *Canavalia ensiformes* (Família Fabaceae, tribo Phaseoleae, subtribo

Dioclenae), foi a primeira lectina a ser isolada, sequenciada e teve sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raio- X. ConA é uma lectina  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -dependente com afinidade por manose/glicose e seu monômero contém 237 resíduos de aminoácidos (CAVADA et al., 2001). ConA tem sido utilizada como ferramenta no estudo da função neural e neuroplasticidade (LIN e LEVITAN 1991; SCHERER e UDIN 1994), no isolamento glicoproteínas sinápticas, modulação de receptores glutamatérgicos (PARTIN et al., 1993; FAY e BOWIE 2006), no estudo do mecanismo de liberação de neurotransmissores (BOEHM e HUCK, 1998), e na modulação de receptores e transportadores de monoaminas (CEDEÑO et al., 2005). Além disso, estudos recentes tem mostrado que ConA também pode apresentar atividades anti-proliferativas sobre diversas linhagens de células cancerosas, dando perspectivas de uma aplicação anti-tumoral para essa lectina (LI et al., 2011).

ConBr, é uma lectina isolada das sementes de um tipo de feijão brasileiro (*Canavalia brasiliensis*) e tem sua sequência e estrutura cristalográfica definidas, apresentando 99% de homologia com ConA além de possuir a mesma especificidade por manose/glicose (SANZ-APARICIO et al., 1997; CAVADA et al., 2001). Os efeitos biológicos de ConBr em tecidos periféricos incluem a estimulação da liberação de histamina em mastócitos (LOPES et al., 2005), estímulo da produção de óxido nítrico em macrófagos (ANDRADE et al., 1999) e ativação da apoptose em linfócitos (BARBOSA et al., 2001). Apesar destas ações e da similaridade estrutural entre ConBr e ConA (CAVADA et al., 2001), os efeitos biológicos de ConBr sobre células neurais e sobre a função do SNC são pouco conhecidas.

A estrutura de ConBr é representada abaixo (Figura 1) e mostra os resíduos de aminoácidos que variam em relação a ConA. Apenas dois aminoácidos são substituídos e nenhum destes resíduos está próximo do sítio de ligação de carboidratos em ambas lectinas. Além das mudanças na estrutura primária, têm sido encontrado importantes diferenças na estrutura quaternária de ConBr em relação a ConA (SANZ-APARICIO et al., 1997; GRANGEIRO et al., 1997).



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

A lectina ConBr apresenta um comportamento de oligomerização diferente de ConA. Por exemplo, enquanto ConA, em pH 7,0, é um tetrâmero homogêneo, ConBr exibe uma mistura de dímeros (31%) e tetrâmeros (69%) nesta mesma faixa de pH. A razão entre as formas divalentes e tetravalentes, junto com mudanças na orientação relativa dos sítios de ligação de carboidratos nas estruturas quaternárias das lectinas homólogas, tem sido sugeridas como explicação para as diferentes atividades e potências biológicas das lectinas Dioclenae de *Canavalia brasiliensis* e *Canavalia ensiformes* (CALVETE et al., 1999)

ConBr (mas não ConA), tem ação do tipo antidepressiva, avaliada no teste do nado forçado (TNF), que é utilizado para “screening” de compostos com potencial ação antidepressiva. O mecanismo dessa ação de ConBr foi dependente da ativação dos sistemas serotoninérgicos (via receptores 5HT1 e 5HT2), adrenérgico (via receptores  $\alpha_2$ -adrenérgico) e dopaminérgico (via receptores D2). Além disso, ConBr foi capaz de potencializar a ação da fluoxetina, um antidepressivo inibidor da recaptação da serotonina (BARAUNA et al., 2006).

Estudos mais recentes, demonstram também um potencial inibidor de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA por ConBr. Essa ação se evidenciou através de dois modelos: 1) inibição da via NMDA/NO/GMPc no TNF (COSTA e COLABORADORES, 2010; dados não publicados);

2) bloqueio de convulsões induzidas pelo ácido quinolínico (agonista NMDA) (RUSSI et al., 2012).

Além disso, por mecanismo ainda não elucidado ConBr ativa o fator de transcrição CREB e produz um aumento marcante da expressão de BDNF no hipocampo (RIEGER e COLABORAES, 2012; dados não publicados).

PIRES e COLABORADORES (2011), demonstraram que ConBr administrada via oral em camundongos possui atividade analgésica, sendo este efeito aparentemente relacionado a sua ação sobre receptores opióides no SNC. Dessa forma pode-se verificar múltiplas ações de ConBr sobre o SNC convergindo para modulação de diversos alvos da superfície celular e repercutindo com modificações da sinalização intracelular.

Portanto, temos um conjunto de evidências que indicam a capacidade de lectinas, obtidas de plantas leguminosas brasileiras, em modular a plasticidade do SNC, através da interação com receptores glutamatérgicos, transportadores de neurotransmissores e consequente modulação de vias de sinalização intracelular, produzindo assim, neuroproteção.

## **1.2 Glutamato**

O glutamato, identificado pela primeira vez em 1866, é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos e está envolvido no desenvolvimento, sobrevivência neuronal, e em funções cerebrais vinculadas à aprendizagem e memória (RAHN, 2012), além de participar como mediador da comunicação intercelular, plasticidade, crescimento e diferenciação celular (NEDERGAARD et al., 2002). Uma vez liberado na fenda sináptica, o glutamato pode se ligar a diferentes receptores, como os receptores glutamatérgicos ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA),  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e Cainato e os receptores metabotrópicos (KANAI e HEDIGER, 2003; AHMADIAN et al., 2004; GRAZIOSO et al., 2005).

### **1.2.1 Receptores Glutamatérgicos**

#### **1.2.1.1 Receptores glutamatérgicos ionotrópicos**

Farmacologicamente, os receptores ionotrópicos classificam-se em receptores NMDA, AMPA e Cainato de acordo com a maior seletividade por seus ligantes sintéticos específicos (GONDA, 2012).

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

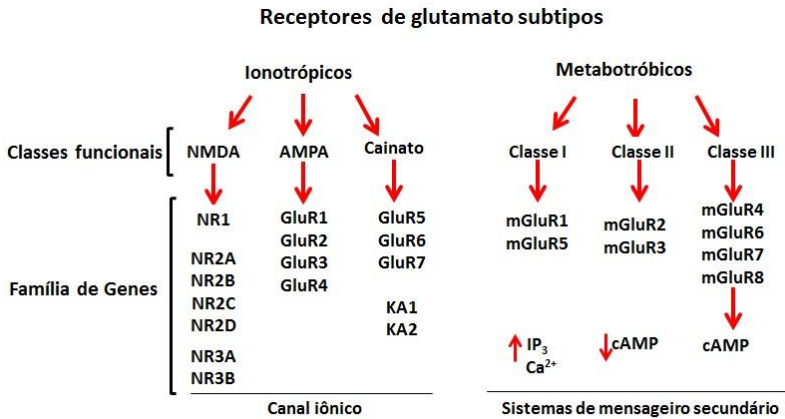
receptores NMDA consistem de um canal iônico central e diversos sítios de modulação pelos quais neurotransmissores e drogas podem se ligar e afetar a atividade do receptor (MCBAIN et al, 1994). A ativação dos receptores NMDA requer a união simultânea de glicina e glutamato em combinação com despolarização da membrana celular. No potencial de repouso o canal do receptor NMDA é bloqueado pelo íon magnésio, o qual é expulso após uma despolarização inicial, com a abertura do canal ocorre influxo principalmente de íons cálcio (WAXMAN et al., 2005). Portanto, os receptores NMDA respondem mais lentamente ao glutamato, contribuindo com o componente lento das correntes pós-sinápticas excitatórias e sendo altamente permeáveis aos íons  $\text{Ca}^{2+}$  (CULL-CANDY et al., 2001; WAXMAN et al., 2005).

Diversos estudos sugerem que os receptores de glutamato, especialmente o receptor NMDA apresenta papel crucial no desenvolvimento do SNC, na sobrevivência neuronal, na estrutura dos axônios e dendritos, e na plasticidade sináptica e sinaptogênese. Devido a essas propriedades, os receptores NMDA são implicados como responsáveis pelos processos de aprendizado e memória. Estes receptores existem, primariamente, como complexos heteroméricos, formados por duas subunidades obrigatórias NR1 e duas subunidades regulatórias NR2 ou NR3. São expressas oito isoformas da subunidade NR1, enquanto a subunidade NR2 apresenta quatro isoformas (NR2A, 2B, 2C e 2D) e a as subunidades NR3 duas isoformas (NR3A e NR3B). NR1 é essencial para a formação do canal, enquanto que NR2 determina as propriedades funcionais e farmacológicas do receptor. Recentemente, encontrou-se que as diferentes subunidades do receptor NMDA diferem em suas propriedades cinéticas, sensibilidade aos ligantes, permeabilidade a íons divalentes e interações com proteínas. A expressão alterada de algumas subunidades ocorre em certas condições fisiopatológicas e podem ser diretamente relacionadas com a excitotoxicidade glutamatérgica, como por exemplo, na dor crônica, hipóxia e isquemia, epilepsia, doenças neurodegenerativas (ex. Alzheimer e Parkinson) e transtornos psiquiátricos como a esquizofrenia e a depressão (SEVERINO et al., 2011).

### **1.2.1.2 Receptores glutamatérgicos metabotrópicos**

Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos são aqueles acoplados às proteínas G. Estes receptores são subdivididos em classe I, classe II e classe III e podem agir através da ativação da fosfolipase C ou por modulação da enzima adenilato ciclase (OBRENOVITCH e URENJAK, 1997). Há a ativação de mensageiros secundários, na qual

em última análise alteram a permeabilidade de íons na membrana plasmática (SEVERINO et al., 2011).



**Figura 2: Classificação esquemática dos receptores glutamatérgicos** (adaptado de Siegel et al., 2006).

### 1.2.2 Transmissão glutamatérgica e a glicosilação dos receptores de glutamato

As sinapses são locais ricos em carboidratos (RAMBOURG e LEBLOND, 1967), além disso, foi demonstrado que glicoproteínas presentes nesta região estariam potencialmente envolvidas na regulação da atividade sináptica no SNC (GURD, 1989; WING, 1993).

Ao longo dos últimos anos, muitos estudos têm comprovado o papel da transmissão glutamatérgica no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica fisiológica (fundamental nos processos de aprendizado e memória), bem como em processos patológicos (envolvendo reorganização sináptica e morte celular) observados em processos como: isquemia, hipoglicemia, epilepsia, doenças neurodegenerativas, dependência e tolerância a drogas, dor neuropática, ansiedade e depressão (MELDRUM, 2000; OTTERSEN e MATHISEN, 2000; RAHN, 2012).

Nesse sentido estudos de “binding”, utilizando lectinas como ferramentas, demonstraram que cadeias de oligossacarídeos associadas à glicoproteínas sinápticas estão localizadas na fenda sináptica (MATUS et al, 1973).



A glicosilação é capaz de influenciar diversas propriedades dos receptores glutamatérgicos, incluindo a atividade do canal e sua modulação por lectinas. Os receptores ionotrópicos glutamatérgicos são complexos protéicos com um percentual de glicosilação que varia de 8 a 24% (HULEBROECK e HAMPSON, 1992). Dentre os receptores glutamatérgicos, os receptores NMDA são os que possuem a maior afinidade pelo glutamato (WAXMAN et al., 2005). Diversos estudos demonstram que as subunidades dos receptores NMDA, NR2A-NR2B, possuem cadeias oligossacarídicas contendo grande quantidade de manose, além de outras cadeias laterais complexas de açúcares (MACHAIDZE e MIKELADZE, 2001). Outros estudos indicam que a subunidade NR1A do receptor NMDA também possui alta quantidade de manose (STANDLEY e BAUDRYB, 2000). Portanto, tem sido sugerido que alguns dos sítios de NMDA, preferencialmente ricos em manose, sejam necessários para a modulação do canal por lectinas e outros sítios, provavelmente ricos em galactose, estejam envolvidos na modulação da interação ligante/receptor (MACHAIDZE e MIKELADZE, 2001).

### **1.2.3 Excitotoxicidade glutamatérgica e morte celular**

A morte celular resultante das ações tóxicas de aminoácidos excitatórios pode ser definida como excitotoxicidade. Sendo o glutamato o principal neurotransmissor excitatório no SNC, a excitotoxicidade neuronal geralmente se refere à lesão e à morte de neurônios decorrente de exposição prolongada ao glutamato e associada ao influxo excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da célula (BERLIOCCHI et al, 2005).

O glutamato pode ser neurotóxico agindo em receptores ionotrópicos (NMDA e AMPA) e, também em seus receptores metabotrópicos, a lesão excitotóxica glutamatérgica resulta do excesso de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  na célula através dos canais iônicos e pela ação suplementar da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos reservatórios intracelulares, levando a um aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . O excesso de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ativa uma série de enzimas como proteases, fosfolipases, óxido nítrico sintase e endonucleases que contribuem para a morte celular (CHOI, 1987; MELDRUM, 2000). Portanto, devido a sua elevada permeabilidade ao cálcio e incompleta dessensibilização, o receptor NMDA é considerado o principal mediador da excitotoxicidade glutamatérgica (CHOI, 1992; ROTHSTEIN, 1996; GONDA, 2012).

Em várias condições neuropatológicas, como acidente vascular cerebral (AVC), epilepsia, traumatismo crânio encefálico (TCE) e doenças neurodegenerativas (OBRENOVITCH e URENJAK, 1997),

observa-se um aumento nos níveis extracelulares de glutamato, que conduz a uma excessiva ativação dos receptores NMDA, com elevação dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e indução de morte celular (LIPTON e ROSENBERG, 1994).

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

As mitocôndrias estão fortemente envolvidas na toxicidade dependente de NMDA e o modo de morte (apoptose ou necrose) pode depender da intensidade do dano e do estado funcional da mitocôndria. O mecanismo pelo qual as mitocôndrias com excesso de cálcio causam morte celular por necrose envolve, muitas vezes, a produção de espécies reativas de oxigênio que danificam os processos respiratórios mitocondriais (NICHOLLS e BUDD, 2000; WARD et al., 2000). Já os mecanismos de morte celular por apoptose envolvem a liberação de fatores apoptóticos e ativação de vias de estresse como  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  e JNK3 (SCHWARZSCHILD et al., 1997; YANG et al., 1997).

Portanto, é de extrema importância o estudo relacionado a determinação dos mecanismos que envolvem a neuroproteção produzida por lectinas, focalizando sua interação com receptores glutamatérgicos e a modulação de vias de sinalização intracelular neuroprotetoras.

No presente estudo pretendemos caracterizar as lectinas como proteínas com potencial neuroprotetor que poderiam interferir positivamente, na diminuição dos danos observados em processos neurotóxicos, em resposta a superestimulação do sistema glutamatérgico. Dentro desse contexto, um ponto importante de investigação se refere a possível modulação de vias de sinalização intracelular por lectinas, como as vias de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e a via fosfatidil-inositol-3 cinase (PI3K)/AKT, em condições basais e frente à neurotoxicidade do glutamato,.

### 1.3 Proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPKs)

Os receptores de membrana, em sua grande maioria, são de natureza glicoproteica e podem modular direta ou indiretamente enzimas intracelulares como proteína cinase A (PKA), proteína cinase G (PKG), proteína cinase C (PKC), proteína cinase B (PKB/AKT), proteínas cinases  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina-dependentes (CaMKs) e as MAPKs (HUNTER e SEFTON, 1991; NESTLER e GREENGARD, 1999; SWEATT, 2001; HANADA et al., 2004).

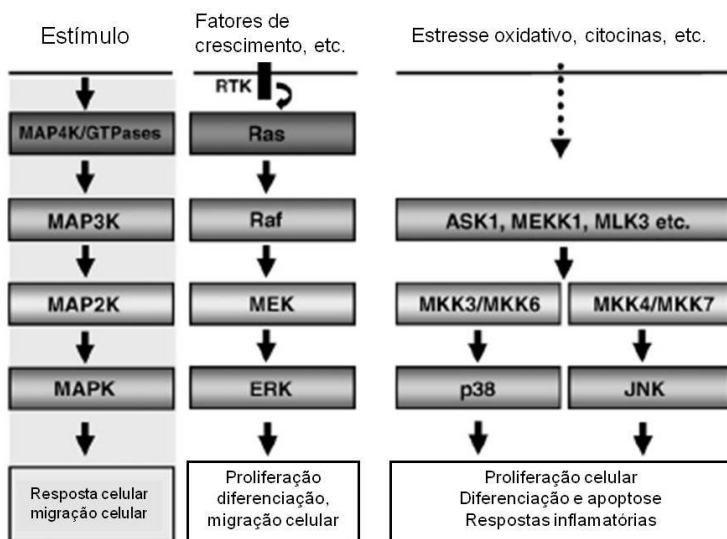
As proteínas cinases ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*; MAPKs) são serina-treonina cinases mediadoras de várias respostas celulares, como proliferação celular, diferenciação, sobrevivência, morte e transformação (KIM e CHOI, 2010). As três principais MAPKs identificadas são as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2), c-Jun N- terminal cinase (JNK) e as  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  (CHANG; KARIN, 2001; CHEN et al., 2001; THOMAS e HUGANIR, 2004; WAETZIG e HERDEGEN, 2004). Todas as vias operam em forma de cascata (Figura 3), com uma MAP cinase cinase cinase (MAP3K) ativando por fosforilação uma MAP cinase cinase (MAP2K) que por sua vez fosforila e ativa a MAP cinase (MAPK). A desativação das MAPKs é dependente de fosfatases específicas, como a MKPs (fosfatase das MAP cinases), PP2A e tirosina fosfatases (McCUBREY et al., 2006; SIEGEL et al., 2006).

As proteínas ERK1/2 estão envolvidas em respostas celulares a fatores de crescimento e outros mitógenos, exercendo ações regulatórias sobre mecanismos de proliferação e diferenciação (THOMAS; HUGANIR, 2004). As ERKs também participam de processos de memória hipocampal e da plasticidade sináptica (SWEATT, 2004). ERK1/2 são translocadas do citosol para o núcleo, onde via RSK ativam fatores de transcrição como CREB (“cAMP response element binding protein”), regulando a transcrição gênica. Sua via de sinalização é iniciada por diversos estímulos extracelulares, capazes de ativar receptores tirosina cinase (RTK), que através de um proteína adaptadora, como Grb2 (“growth factor receptor-binding protein 2”)/SOS (“son of sevenless”) pode ativar Ras, uma proteína G solúvel. Ras recruta Raf (MAP3K), uma serina-treonina cinase, que ativa MEK (cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular; MAP2K) que por sua vez fosforila ERK num resíduo de treonina e de tirosina, ativando-a (ver esquema ilustrado na Figura 3) (SIEGEL et al., 2006; KIM e CHOI, 2010).

JNK1/2/3 e  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$ , também conhecidas como proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs), são proteínas ativadas por citocinas e

insultos citotóxicos, estando freqüentemente relacionadas a estresse e morte celular (MIELKE e HERDEGEN, 2000; COWAN e STOREY, 2003). Entre os diversos alvos destas cinases podem ser citados fatores de transcrição (por exemplo, c-Jun), enzimas, proteínas de choque térmico (por exemplo, Hsp27) e proteínas relacionadas à morte ou sobrevivência celular (MIELKE e HERDEGEN, 2000; HARPER e LOGRASSO, 2001; RAIVICH e BEHRENS, 2006; NAGAI et al., 2007). A via da JNK consiste de uma MAP3K tal como ASK1 (cinase reguladora de sinais apoptóticos), MEKK1 ou cinase de linhagem mista (MLK) ativando uma MAP2K como MKK4 ou MKK7 (Figura 3) (KIM e CHOI, 2010). As JNKs estão amplamente distribuídas nos tecidos dos mamíferos e apresentam funções biológicas relevantes para o cérebro em desenvolvimento (WAETZIG e HERDEGEN, 2004) e em processos de neurodegeneração e ativação microglial (LIU e RABINOVICH, 2005).

As p38<sup>MAPK</sup> são ativadas por diversos estímulos, incluindo hormônios, ligantes de receptores acoplados a proteínas G e estresses. Estão envolvidas em processos inflamatórios e apoptóticos em diferentes tipos celulares, incluindo neurônios (SIEGEL et al., 2006; MOLZ et al., 2008b).



**Figura 3: Vias de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs).** MAPKs medeiam a sinalização intracelular iniciada por fatores extracelulares ou intracelulares. Todas as vias operam em forma de cascata. MAP3Ks, que podem ser ativadas tanto por MAP4Ks ou proteínas G, fosforilam MAP2Ks que por sua vez fosforilam e ativam as MAPKs. Uma vez ativadas, MAPKs fosforilam vários substratos, incluindo fatores de transcrição e outras enzimas cinases, regulando uma variedade de atividades celulares (ex. proliferação, diferenciação, migração, respostas inflamatórias e morte celular). Em mamíferos, destacam-se na família de MAPKs as enzimas ERK, p38<sup>MAPK</sup> e JNK. Adaptado de Kim e Choi (2010).

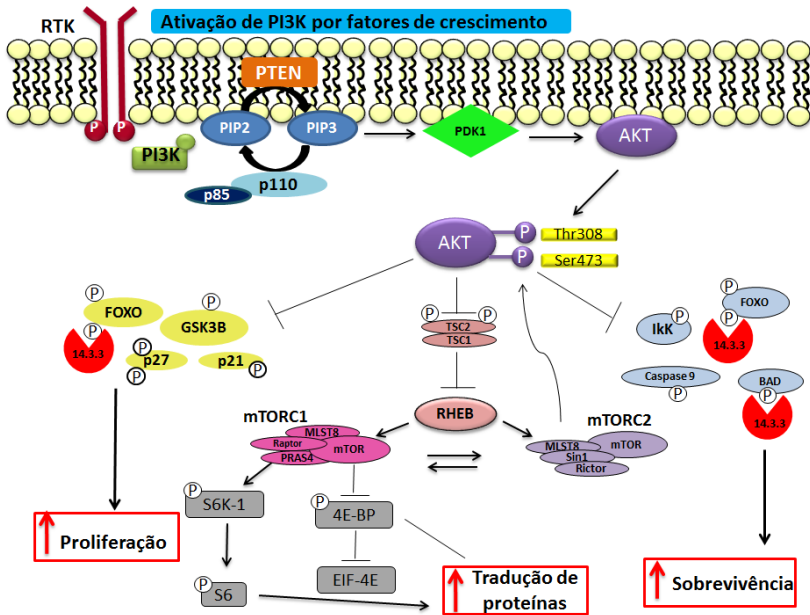
#### 1.4 Via da Fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K)/AKT

A via da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K)/AKT (ou PKB) pode ser ativada por fatores de crescimento, e sua ativação tem papel central no controle do crescimento, proliferação, metabolismo e sobrevivência celular e na neuroplasticidade (HANADA et al., 2004; BRAZIL et al., 2004; VAN DER HEIDE et al., 2006). Dessa forma, considera-se que processos neuroquímicos relacionados ao desenvolvimento do SNC, à neuroplasticidade, à sobrevivência e morte celular e ao aparecimento de doenças neurodegenerativas podem ser modulados pela atividade dessa via de sinalização sobre diversas proteínas alvo, como fatores de transcrição, proteínas apoptóticas, produção de fatores neurotróficos.

A proteína Akt pode promover a sobrevivência celular direta ou indiretamente. BAD, que é um proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 pode ser fosforilada na Ser136 pela Akt, dissociando BAD do complexo Bcl-2/Bcl-X, com perda da função pró-apoptótica. Além disso, Akt pode ativar NF- $\kappa$ B através da regulação da cinase I $\kappa$ B (IKK), o que resulta na transcrição de genes pró-sobrevivência (regulação de NF- $\kappa$ B). Também são alvos de Akt a proteína cinase mTOR, fosfodisterase-3B, receptor de substrato de insulina (IRS-1), FKHR, p21 e p27, e possivelmente Raf1. Estas moléculas estão envolvidas na síntese protéica, e regulação do ciclo celular (VARA et al., 2004).

O efeito neuroprotetor contra a excitotoxicidade do glutamato da grelina, um hormônio que é principalmente sintetizado e liberado a partir de células Gr na mucosa oxíntica (mucosa gástrica), ocorre através da ativação da via PI3K/Akt (LEE et al, 2012). Adicionalmente, outro estudo demonstra um efeito neuroprotetor de dehidroglasperina C (DGC) via Nrf2-Keap1 e PI3K/AKT contra a lesão oxidativa induzida pelo glutamato (KIM et al., 2012).

Considerando todos os aspectos relacionados com a sinalização celular e de que o hipocampo é um importante alvo para a neurotoxicidade glutamatérgica, avaliamos neste estudo os efeitos *in vitro* do glutamato (10 mM) sobre a fosforilação de MAPKs e via da AKT e a viabilidade celular de fatias hipocampais de camundongos adultos. A partir dessas ações buscou-se a investigar o potencial neuroprotetor de lectinas extraídas de plantas.



**Figura 4: Vias de sinalização da PI3K/AKT.** A ativação de Akt/PKB pode proteger as células da apoptose, pela fosforilação e inibição de mediadores pró-apoptóticos como Bad, fatores de transcrição como FOXO e ativação de NFκB. Adaptado de Hanada et al., 2004.

**TABELA 1: Substratos da AKT e seus efeitos biológicos****Associados a regulação de sobrevivência**

<b>Substrato</b>	<b>Efeito</b>
Bad	Supressão da atividade pró-apoptótica de Bad
CREB	Aumento da transcrição dos genes de sobrevivência regulados por CREB
Família Forkhead (Fkhr, Fkhr1, Afx)	Exclusão nuclear e inibição da transcrição dos genes pró-apoptóticos
IKK	Indução da atividade transcricional de NF- $\kappa$ B - ativação de genes de sobrevivência
Procaspase-9	Supressão da apoptose induzida por Caspase-9
Mdm2	Entrada nuclear de Mdm2 - inibição do processo regulado por p53

**Associados a regulação do crescimento celular e proliferação**

<b>Substrato</b>	<b>Efeito</b>
p21, p27	Exclusão nuclear, prevenção da atividade antiproliferativa
mTOR/FRAP	Modulação da tradução do RNAm
TSC2	Modulação da atividade de mTOR

(adaptado de Vara et al., 2004).



## 2. JUSTIFICATIVA

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

Estudos recentes utilizando lectinas com alvos específicos para receptores presentes no SNC têm demonstrado resultados promissores em modelos experimentais e estratégias direcionadas ao reparo do dano cerebral e a neuroproteção frente à toxicidade glutamatérgica (MACHAIDZE e MIKELAZE, 2006; SAKAGUCHI et al., 2007). O sistema glutamatérgico é reconhecido por possuir um papel central na neurobiologia da depressão bem como em diversas condições patológicas agudas e crônicas no sistema nervoso central, como os processos neurodegenerativos (SANACORA et al, 2008).

A demonstração prévia de que a ConBr apresenta atividade antidepressiva através de mecanismo de ação similar a antidepressivos clássicos, dependentes dos sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos e dopaminérgicos (BARAUNA et al., 2006) e outro estudo que demonstrou a ação anticonvulsivante da ConBr através da inibição de convulsões induzidas pelo ácido quinolínico (RUSSI et al., 2012) sugerem um papel neuromodulador e neuroprotetor para ConBr.

Na literatura está bem estabelecido que lectinas da família (Fabaceae) Leguminosae com afinidade por manose/glicose podem ligar e modular a atividade de receptores glutamatérgicos em virtude da presença de cadeias de oligossacarídeos na porção extracelular destes receptores (MAYER e VYKLICKY, 1989). Desta maneira, pretendemos investigar a possível capacidade modulatória de lectinas obtidas de plantas sobre os receptores glutamatérgicos, tendo em vista que resíduos oligossarídicos nos receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, AMPA e Cainato) podem representar sítios regulatórios importantes para atividade destes receptores.

Portanto, através do conjunto de evidências que demonstram que as lectinas podem modular o sistema glutamatérgico foi desenvolvido o presente estudo para analisar o potencial neuroprotetor de lectinas

extraídas de plantas sobre a neurotoxicidade glutamatérgica *in vitro*, além disso, foi foco do presente estudo evidenciar a modulação de vias de sinalização intracelular no processo de neurotoxicidade do glutamato e na potencial ação neuroprotetora das lectinas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Gerais

Investigar a ação neuroprotetora de lectinas extraídas de plantas em modelos de neurotoxicidade glutamatérgica sobre fatias de hipocampo de camundongos, caracterizando o mecanismo molecular desta modulação.

#### 3.2 Objetivos Específicos

1) Realizar um “screening” da atividade neuroprotetora de lectinas em modelos de fatias hipocámpais de camundongos tratadas *in vitro* com glutamato, através do teste de viabilidade MTT. As lectinas testadas foram obtidas da família (Fabaceae) Leguminosae que possuem afinidade por glicose/manose como a *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e a *Canavalia gladiata* (CGL), bem como de lectinas com afinidade por galactose como a *Artrocarpus incisa* (Frutalina-FTL) e *Bauhinia bauhinioides* (BBL) e *Vatairea guianensis* (VGL).

2) Determinar a possível modulação das vias intracelulares das MAPKs e de PI3K/AKT pelas lectinas que apresentaram ação neuroprotetora frente à exposição das fatias à neurotoxicidade glutamatérgica.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss com idade aproximada de 50 dias, pesando entre 30 e 40 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em temperatura entre 21 °C ±1 com livre acesso à água e ração, em ciclo de claro/escuro 12:12 h (iluminação das 7:00 às 19:00h). Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (Protocolo PP0345/CEUA)., sendo manipulados e eutanaziados de acordo com o código de ética de utilização de animais para pesquisa.

### 4.2 Drogas e Reagentes

Anticorpos Anti-fosfo-ERK1/2, anti-fosfo-JNK1/2/3 e anti-fosfo-Akt(Ser473) e substrato quimioluminescente LumiGLO foram adquiridos a partir da Cell Signalling (Beverly, MA, EUA). Anticorpos Anti-fosfo-p38<sup>MAPK</sup>, anti-total-p38<sup>MAPK</sup>, anti-total-ERK1/2 e anti-total-JNK1/2 e inibidor de PI3K, LY294002, foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). Anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com HRP foi obtido da Millipore (Billerica, MA, EUA). Meio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) foi adquirido da Gibco®. Tris e β-mercaptoetanol foram obtidos a partir Amresco (Solon, OH, EUA). MTT, SDS, e bis-acrilamida, foram a partir da USB (Cleveland, OH, EUA). Acrilamida, Hyperfilm<sup>TM</sup>, e Hybond nitrocelulose<sup>TM</sup> foram adquiridos da GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, EUA). Todos os outros reagentes eram de grau analítico elevado.

### 4.3 Isolamento de lectinas

As lectinas de interesse foram isoladas e fracionadas por métodos clássicos conforme descritos previamente (MOREIRA e CAVADA, 1984; CAVADA et al., 2001), que inclui precipitação com sulfato de amônio e cromatografia por afinidade em Sephadex G-50, pelo laboratório de biologia molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). Estas lectinas purificadas foram enviadas para o nosso laboratório a fim de avaliarmos os possíveis efeitos biológicos das mesmas.

#### **4.4 Preparo de fatias hipocâmpais e determinação de viabilidade celular frente à toxicidade glutamatérgica *in vitro***

Os animais foram eutanaziados por decapitação, os cérebros foram imediatamente retirados a 4°C e os hipocâmpos dissecados e fatiados na espessura de 400 µm, utilizando um fatiador de tecidos de McIlwain. Após a separação das fatias seguiu-se uma pré-incubação de 30 minutos à temperatura ambiente para recuperação metabólica das fatias no tampão HEPES-salina (NaCl 124mM, KCl 3mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2mM, HEPES 25mM, glicose 12mM e CaCl<sub>2</sub> 1mM, pH 7,4) (LEAL et al., 1997; CORDOVA et al., 2004). Nos experimentos com posterior incubação de 6 horas, as fatias foram pré-incubadas por 30 min em tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB; composto por NaCl 122 mM, KCl 3 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,3 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glicose 10 mM) gaseificado com carbogênio (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) para atingir o pH 7,4 (MOLZ et al, 2008a).

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

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico que mede a redução do MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium) adicionado às fatias hipocâmpais após o período de incubação (LIU et al., 1997). Este reagente é convertido, nas células vivas e viáveis, em cristais azuis insolúveis (formazana) por diversas desidrogenases (especialmente a enzima mitocondrial succinato desidrogenase). A formazana foi solubilizada pelo dimetil sulfoxido (DMSO), formando um composto colorido cuja densidade ótica (DO) foi medida em leitor de microplacas ( $\lambda=540$  nm). A quantificação da coloração obtida é proporcional à viabilidade celular. Esse experimento foi realizado em placas de 24 poços, cada poço contendo uma fatia de hipocampo em volume final de 1 mL. Após 30 minutos de pré-incubação nas placas, as fatias de hipocampo foram incubadas por 6 h com glutamato (10 mM) na presença ou ausência das lectinas em meio composto por 50% Krebs e 50% DMEM (Dulbecco's modifiel Eagle's médium) em atmosfera de CO<sub>2</sub> (MOLZ et al., 2008a).

#### **4.6 Western blot**

##### **4.6.1 Preparo das amostras para eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)**

Após os tratamentos, as fatias foram solubilizadas em tampão de amostra contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 4%, Tris 50 mM,

EDTA 100 mM (pH 6,8) por 5 minutos a 100°C. Após homogeneização das amostras uma alíquota foi retirada para a dosagem de proteínas. Em seguida adicionou-se a solução de diluição de amostra (glicerol 40%, Tris 25 mM e azul de bromofenol, pH 6,8), numa proporção de 25:100 (v/v) e  $\beta$ -mercaptoetanol (concentração final v/v 8%). As proteínas totais das amostras de fatias hipocâmpais e estriatais foram dosadas pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977).

#### **4.6.2 Separação de proteínas por eletroforese (SDS-PAGE)**

As proteínas foram isoladas através de SDS-PAGE unidimensional. O gel de empilhamento continha 4% acrilamida e o gel de separação 10% acrilamida. Para preparo dos géis foi utilizado um sistema de eletroforese em mini-gel com espaçadores de 1 mm de espessura. A eletroforese foi realizada com corrente de 15 mA por placa e voltagem máxima de 140 V durante aproximadamente 2 horas, utilizando-se os tampões superior (glicina 190 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%) e inferior (Tris 50 mM; pH 8,3). Após a corrida, os géis foram submetidos à eletrotransferência.

#### **4.6.3 Eletrotransferência**

Após a eletroforese o gel foi incubado com tampão de equilíbrio (Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 5% e SDS 0,1%) por 30 minutos. As proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose através de um sistema semi-dry utilizando tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM, metanol 5%) com uma corrente de 1,2 mA/cm<sup>2</sup> de gel durante 1h30min como descrito por Bjerrum e Heegaard (1989). Por fim as membranas foram coraradas com solução de Ponceau (Ponceau 0,5% em ácido acético 1%) para verificar a eficiência da eletrotransferência.

#### **4.6.4 Imunodeteção**

As membranas de nitrocelulose foram cortadas nas posições correspondentes às massas moleculares adequadas para o uso de anticorpos específicos contra formas fosforiladas de ERK1/2 (44-42 kDa), JNK1/2 (46-54 kDa), p38<sup>MAPK</sup> (~38 kDa) e AKT (60kDa). Primeiramente as membranas foram lavadas com TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) para retirar a marcação com Ponceau, e a seguir foram bloqueadas por 1 hora com leite desnatado (Molico®) 5% em TBS, em temperatura ambiente (TA). Então as membranas foram lavadas 3 vezes de 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,05%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM; pH 7,5) e incubadas com os anticorpos de interesse

(Tabela 2) overnight a 4°C em agitação constante. Após 3 lavagens de 5 min com TBS-T incubaram-se as membranas por 1 hora a TA com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. Por fim as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e 2 vezes com TBS, e a seguir incubadas com o reagente LumiGLO (Cell Signaling Technology, EUA) segundo especificações do fabricante. A quimioluminescência das bandas reativas era detectada pela exposição defolhas do Hyperfilm ECL (Kodak) sobre as membranas. Para a detecção do conteúdo total das MAPKs foi realizado “*stripping*” das membranas utilizadas anteriormente. O “*stripping*” foi realizado com NaOH 0,2N por 5 minutos. Após esse procedimento as membranas foram lavadas em água e TBS-T para, a seguir, proceder ao bloqueio e demais passos para a detecção das formas totais utilizando os anticorpos específicos conforme a tabela 2 (CORDOVA, et al., 2004; LEAL et al., 2007; RIGON et al., 2008). A densitometria das bandas foi determinada utilizando o programa Scion Image® versão Beta 3 e os resultados foram expressos como porcentagem em relação ao controle. Observa-se que a expressão de fosforilação é dada como uma razão DO da banda fosforilada/DO da banda total, das respectivas MAPKs e AKT.

**Tabela 2:** Fabricante, número do catálogo e diluição dos anticorpos utilizados para western blot.

ANTICORPO	FABRICANTE (Nº CAT.)	DILUIÇÃO
<i>Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/ Tyr204)</i>	Cell Signalling Technology (#4370)	1:2000
<i>Anti-Mitogen Activated protein kinase (ERK1 &amp; ERK2)</i>	Sigma (M 5670)	1:40000
<i>Anti-phospho-p38 (pThr<sup>180</sup>/pTyr<sup>182</sup>)</i>	Sigma (P 1491)	1:1000
<i>Anti-p38 MAP kinase</i>	Sigma (M 0800)	1:10000
<i>Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)</i>	Cell Signalling Technology (#9251)	1:1000
<i>Anti-c-Jun N-Terminal Kinase (JNK1, JNK2)</i>	Sigma (J 4500)	1:5000
<i>Phospho-AKT</i>	Sigma	1:1000
<i>Anti- AKT</i>	Cell Signalling	1:2000
<i>Goat anti-Rabbit IgG, Peroxidase Conjugated secondary antibody</i>	Millipore (AP 132 P)	1:5000



#### **4.7 Análise Estatística**

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



## 5. RESULTADOS

### 5.1 CAPÍTULO 1- Artigo submetido ao periódico *Neurochemistry International*

#### **Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/AKT pathway.**

Amanda V. Jacques<sup>a</sup>, Débora K. Rieger<sup>a</sup>, Mariana Maestri<sup>a</sup>, Mark W. Lopes<sup>a</sup>, Tanara V. Peres<sup>a</sup>, Filipe M. Gonçalves<sup>a</sup>, Daniela Z. Pedro<sup>a</sup>, Carla I. Tasca<sup>a</sup>, Manuela G. López<sup>b</sup>, Javier Egea<sup>b</sup>, Kyria S. Nascimento<sup>c</sup>, Benildo S. Cavada<sup>c</sup>, Rodrigo B. Leal<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil

<sup>b</sup> Instituto Teófilo Hernando, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

<sup>c</sup> Departamento de Biología Molecular, BioMol-Lab, Universidade Federal do Ceará, Brazil

\* Corresponding author: Rodrigo Bainy Leal, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-900, Brazil. Phone: +55 48 3331-5045; Fax +55 48 3331-9672; E-mail address: [rbleal@gmail.com](mailto:rbleal@gmail.com)

**Abstract:** The excitotoxicity induced by excessive activation of the glutamatergic neurotransmission is involved in several neuropathologies. In this sense, molecules that prevent the release of glutamate or excessive activation of its receptors can be useful to prevent neuronal death in these diseases. Lectins are proteins capable of reversible binding to carbohydrates in glycoconjugates, and some have been used in the study and purification of glutamate receptors. In the present study we aimed to evaluate the potential neuroprotective activity of ConBr, a mannose/glucose-binding lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr), to prevent glutamate-induced excitotoxicity. Hippocampal slices were isolated from adult male mice and incubated for 6 h in Krebs saline/DMEM buffer in the presence of glutamate (10 mM) or glutamate (10 mM) plus ConBr (10 µg/mL). The phosphorylation of MAPKs (ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup> and JNK1/2) and AKT were evaluated by western blotting. The results show that glutamate was able to reduce hippocampal slice viability (-25%), diminish the phosphorylation of AKT and increase the phosphorylation of p38<sup>MAPK</sup> and ERK1. No changes were observed in the phosphorylation of JNK1/2/3 and ERK2. Notably, ConBr, by a mechanism dependent of sugar interaction, prevented both the reduction of cell viability and the decrease of AKT phosphorylation induced by glutamate. Furthermore, in the presence of PI3K inhibitor, LY294002, ConBr was unable to reverse glutamate neurotoxicity. Taken together our data suggest that the neuroprotective effect of ConBr against glutamate neurotoxicity needs oligossacharide interaction and is dependent on PI3K/Akt pathway.

**Key words:** Glutamate, NMDA, lectin, ConBr, PI3K/Akt, neuroprotection.

## 1. INTRODUCTION

Glycobiology studies have revealed the importance of sugar chains present in glycoproteins. They are constituents of biological membranes and can function as biosignaling molecules performing key roles in central nervous system (CNS) development, neuroplasticity and synaptic modulation (Matthies Jr et al., 1999; Dube and Bertozzi, 2005; Endo, 2005). Therefore, carbohydrates act as intermediaries in cellular communication systems and may influence a variety of signaling pathways (Greengard, 2001; Thomas and Haganir, 2004; Wong and Scott, 2004) in physiological and pathological conditions. The information contained in the structure of oligosaccharides conjugated to proteins or lipids on the cell surface are recognized by a specialized group of proteins, lectins (Sanz-Aparicio et al., 1997).

Lectins are the foremost molecules studied in glycobiology. They compose a heterogeneous group of proteins that are capable of reversible binding to carbohydrates and glycoconjugates, regulating several physiological and pathological events (Dube and Bertozzi, 2005; Liu and Rabinovich, 2005). Lectins are present in the CNS of animals, where they have the capacity to regulate important neuronal functions (Yamane et al., 2010). Synapses are sites rich in carbohydrates (Rambourg and Leblond, 1967), moreover, it has been shown that glycoproteins present in this region would be potentially involved in regulating synaptic activity in the CNS (Gurd, 1989; Wing, 1993). Nevertheless, except for the galectin-1, a lectin characterized by affinity to galactose, few lectins have been isolated and characterized in the CNS concerning their potential functions (Ghazarian et al, 2010).

Lectins obtained from plants have been used as tools in the study of molecular mechanisms related to animal cell physiology and pathology (Cavada et al., 2001, Fay and Bowie, 2006). Legume lectins have the potential capacity to modulate molecular targets that could be involved in behavioral regulation, in neuroplasticity, or even in response to certain centrally acting drugs (Cavada et al. 2001; Russi et al., 2012). The Concanavalin A (ConA), a lectin extracted from the seeds of *Canavalia ensiformis*, a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -dependent and ligand of mannose/glucose, has attracted increasing attention for its remarkable anti-proliferative and anti-tumor activity for a variety of cancer cell lines *in vitro* (Lin and Levitan, 1991; Li et al., 2011). Moreover, ConA has been used in the study of neuroplasticity (Lin and Levitan, 1991; Scherer and Udin, 1994), isolation and study of synaptic glycoproteins (Partin et al., 1993, Fay and Bowie, 2006), neurotransmitter release

(Boehm and Huck, 1998), and modulation of receptors and transporters of monoamines (Cedeño et al. 2005). Furthermore, it has been shown the capacity of ConA to bind and modulate glutamatergic receptors (Yue et al, 1995; Fay and Bowie, 2006).

*Canavalia brasiliensis*, ConBr, is a lectin isolated from a Brazilian bean that has its sequence and crystallographic structure defined that display 99% homology, regarding amino acid sequence, with ConA. These lectins also share the specificity for mannose/glucose binding (Sanz-Aparicio et al. 1997; Cavada et al., 2001). The biological effects of ConBr in peripheral tissues include stimulation of histamine release in mast cells (Lopes et al., 2005), stimulation of nitric oxide production in macrophages (Andrade et al., 1999) and activation of apoptosis in lymphocytes (Barbosa et al., 2001). Despite these actions and the structural similarity between ConBr and ConA (Cavada et al., 2001), the biological effects of ConBr on neural cells and its role in the CNS are poorly known.

Our group previously demonstrated that ConBr, but not ConA, presents an antidepressant-like action via activation of monoaminergic system, assessed in mice by the forced swimming test (Barauna et al., 2006). Moreover, in recent study we showed that ConBr may act as a potential inhibitor of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation, thus counteracting the calcium influx gated by this ionotropic glutamate receptor. ConBr was able to block both seizures, cell death, activation of AMPA subtype of glutamate receptors and JNK2/3 induced by the NMDA receptor activation by its synthetic agonist, quinolinic acid (Russi et al., 2012).

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter in the CNS of mammals; however, excess of glutamate in the synaptic cleft may be toxic to neural cells, inducing cell death as result of excessive influx of  $Ca^{2+}$  (Choi, 1987; Bonfoco et al, 1995; Meldrum, 2000; Lynch et al., 2002). Due to its high permeability to  $Ca^{2+}$  and incomplete desensitization, the NMDA receptor is considered the main mediator of glutamatergic excitotoxicity (Choi, 1992; Rothstein, 1996; Gonda, 2012). The mechanisms of cell death in response to glutamatergic excitotoxicity are unclear but are likely to involve both, release of apoptotic factors, activation of MAPKs (Schwarzschild et al. 1997, Yang et al., 1997; Molz et al., 2008b) and inhibition of PI3K/AKT (Chuang et al. 2011; Molz et al., 2011; Sun et al., 2012).

MAPKs are serine-threonine kinases involved in neurodevelopment and neuroplasticity, since they mediate various cellular responses such as proliferation, differentiation, cell survival and

death (Thomas and Huganir, 2004; Kim and Choi, 2010). The three major MAPKs identified are: extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinases (JNK1/2/3) and p38<sup>MAPK</sup> (Chang and Karin, 2001; Chen et al. 2001; Thomas and Huganir, 2004; Waetzig and Herdegen, 2004). In the CNS ERK1/2 are involved in memory and hippocampal synaptic plasticity (Sweatt, 2004; Thomas and Huganir, 2004). However, in many cases over activation of ERK1/2 may be associated with induction of cell death (Chu et al., 2004). JNKs and p38<sup>MAPK</sup> are well known as stress-activated protein kinases (SAPKs) modulated by cytokines and cytotoxic insults and they are often related to stress response, neuroinflammation and cell death (Mielke and Herdegen, 2000; Cowan and Storey, 2003).

Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT (or PKB) pathway can be modulated by growth factors and its activation plays central role controlling the growth, proliferation, metabolism, cell survival and neuroplasticity (Hanada et al, 2004; Brazil et al, 2004, Van Der Heide et al., 2006).

Noteworthy, inhibition of p38<sup>MAPK</sup> (Molz et al., 2008b), knockdown of JNK3 (Yang et al., 1997; Bogoyevitch et al., 2010) and activation of PI3K/AKT (Piermartiri et al., 2009; Chuang et al., 2011; Molz et al., 2011; Lee et al, 2012; Sun et al., 2012) display neuroprotective effect against glutamate excitotoxicity. Moreover, the selective NMDA receptor antagonist dizocilpine maleate (MK-801) promoted cell survival and increased the phosphorylation of Akt.

Taken all these aspects together, the present study was designed to investigate the neuroprotective capacity of ConBr in an *in vitro* model of glutamatergic excitotoxicity. Moreover, we aimed to establish the putative involvement of MAPKs and PI3K/Akt pathways in the neuroprotective mechanism displayed by ConBr. Our results reinforce previous data regarding the neuroprotective potential of ConBr by a mechanism dependent of carbohydrate-binding domain (CRD) interaction. Moreover, they show for the first time a ConBr-dependent activation of PI3K/Akt pathway counteracting glutamate excitotoxicity.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Chemicals**

Anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-JNK1/2 and Anti-phospho-AKT antibodies and LumiGLO chemiluminescent substrate were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). Anti-phospho-

p38<sup>MAPK</sup>, anti-total-p38<sup>MAPK</sup>, anti-total-ERK1/2 and anti-total-JNK1/2 antibodies and inhibitor of PI3K, LY294002, were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Goat anti-Rabbit IgG HRP (horseradish peroxidase) conjugate secondary antibody was from Millipore (Billerica, MA, USA). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) was from Gibco®. Tris and  $\beta$ -mercaptoethanol were obtained from Amresco (Solon, OH, USA). MTT, SDS, and bis-acrylamide, were from USB (Cleveland, OH, USA). Acrylamide, Hyperfilm™, and Hybond™ nitrocellulose were purchased from GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, USA). All other reagents were of high analytical grade.

## 2.2 Animals

Male adult Swiss mice (approximately 50 days), weighting between 30 and 40g were provided by Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Brazil) breeding colony. Mice were housed in plastic cages with food and water available ad libitum and maintained in an air-conditioned room ( $23 \pm 1$  °C) on a 12 h light/dark cycle. The animals were treated, manipulated and euthanized according to the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication no. 80-23, revised 1996) and approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC; [www.ceua.ufsc.br](http://www.ceua.ufsc.br); Permit Number PP00345). All efforts were made to minimize the number of animals used and animal suffering.

## 2.3 Lectin purification

The *C. brasiliensis* lectin was purified by classical methods including precipitation with ammonium sulfate and affinity chromatography on a Sephadex-G-50 column. The homogeneity of all lectin preparations were monitored by SDS-PAGE as described previously (Moreira and Cavada, 1984; Cavada et al., 2001).

## 2.4 Preparation of hippocampal slices

Preparation and treatment of hippocampal slices were performed as previously described (Cordova et al., 2004; Molz et al., 2008a). Briefly, animals were euthanized by decapitation, their encephala were extracted and the hippocampi were immediately dissected (4°C) in Krebs–Ringer bicarbonate buffer (KRB) (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2



mM MgSO<sub>4</sub>, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub> and 10 mM D-glucose). The buffer was bubbled with 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> up to pH 7.4. Slices of 400 μm thickness were prepared using a McIlwain Tissue Chopper. The slices were individually preincubated with Krebs–Ringer bicarbonate buffer (KRB) (300 μl/slice) for 30 min at room temperature (RT). For the treatments, the medium was replaced by a nutritive incubation medium composed of 50% KRB, 50% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 20 mM of HEPES and 100 μg/ml of gentamicin, at 37°C in a 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The treatments were divided into 4 groups: control (KRB/DMEM), glutamate, ConBr and glutamate co-administred with ConBr. In another set of experiments, PI3K inhibitor LY294002 (10 μM) was added during the 30 minutes of pre-incubation and during the 6 h of treatment.

## 2.5 Cell viability

The viability of slices was analyzed by the colorimetric MTT [3'- (4,5-dimethylthiazol-2yl) 2,5-diphenyltetrazolium bromide] reduction assay (Liu et al., 1997). When the treatments were finished, medium was removed and slices (in triplicates) were incubated with 0.5 mg/ml MTT (200μl) in HEPES-saline buffer in KRB. The slices were incubated for 20 minutes at 37°C. Mitochondrial dehydrogenases from viable cells reduce MTT to formazan crystals, which were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). The absorbance was measured spectrophotometrically using a microplate reader (λ=540 nm). Results are expressed as a percentage of the control (non treated slices).

## 2.6 Western blotting analysis

After treatments, the hippocampal slices were solubilized in sample buffer (200 mM Tris, 40 mM EDTA, 4% SDS, pH 6,8) and immediately boiled for 5 min. After homogenization an aliquot was removed to determine protein concentration with the method described by Peterson (1977), and the concentration was calculated by a pattern curve with bovine serum albumin. Thereafter, sample dilution solution (1:4 vol/vol; 40% glycerol, 50 mM Tris and minimal bromophenol blue) and β-mercaptoethanol (for a final concentration of 8%) were added to each sample. The samples (60 μg of total protein/track) were eletrophoresed on 10% SDS-PAGE minigels The proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane using a semidry blotting apparatus (TE 70 SemiPhor™ Unit, GE Healthcare Life Sciences,

Piscataway, NJ, USA) ( $1.2 \text{ mA/cm}^2$ ; 1h30min) as described by Bjerrum and Heegaard (1989). The membranes were blocked with 5% skim milk in TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) for 1 hour. Then membranes were incubated overnight ( $4^\circ\text{C}$ ) with primary antibodies to detect the total and phosphorylated forms of ERK1/2, p38<sup>MAPK</sup>, JNK1/2/3 and AKT in the dilutions recommended by the manufacturer. Subsequently, membranes were incubated for 1h at room temperature with anti-rabbit peroxidase-linked secondary antibody (1:4,000). All steps were followed by three times washing with TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.1%, pH 7.5). The blots were developed by chemiluminescent reaction. The bands were quantified using the Scion Image<sup>TM</sup> software (Frederick, MD, USA). The phosphorylation level of each protein is determined by the ratio of OD of the phosphorylated band/OD of the total band. The data are expressed as a percentage of the control (considered 100%), and the values are presented as mean  $\pm$  SEM (Cordova et al., 2012).

## 2.7 Statistical Analysis

Statistical significance was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's post-hoc test when appropriate. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

## 3. RESULTS

The result depicted in Figure 1A, shows glutamate neurotoxicity *in vitro* against hippocampal slices evaluated by MTT reduction assay. Notably, glutamate exposure for 6 h caused a statistically significant decrease of cell viability at concentrations of 1 mM ( $22.27\% \pm 3.57$ ;  $*p < 0.01$ ), 10 mM ( $26\% \pm 2.0$ ;  $**p < 0.01$ ). From this result, we chose the concentration of 10 mM glutamate to test the neuroprotective activity of ConBr lectin against glutamatergic neurotoxicity.

In order to establish the neuroprotective dose of ConBr the slices were incubated for 6 h in the presence of 10 mM glutamate alone and in the presence of increasing doses of ConBr (0.1-100  $\mu\text{g/mL}$ ). This experiment demonstrated that glutamate (10 mM) decreased the slices viability ( $30\pm \%$ ) and ConBr at concentration 10  $\mu\text{g/mL}$  attenuated the cytotoxicity produced by glutamate (Figure 1B;  $14.28 \pm 1.6 \%$ ;  $\#p < 0.05$  vs glutamate). ConBr (0.1-100  $\mu\text{g/mL}$ ) administered alone did not changed cell viability (data not shown).

In order to investigate if the neuroprotective effect of ConBr was dependent on the carbohydrate-binding domain (CRD), ConBr was incubated with mannose (100 mM) to block its CRD. Figure 1C shows that ConBr previously blocked by mannose (ConBr blocked) lost its protective effect against glutamate excitotoxicity ( $33.28\% \pm 2.51$ ). This result indicates that the neuroprotective effect of ConBr depends on lectin interaction with glycan chains via its CRD.

To assess the signaling pathways altered by glutamate exposure and determine the possible mechanism which lead to ConBr's protective effect against glutamate excitotoxicity, the modulation of MAPKs (ERK 1/2, p38<sup>MAPK</sup> and JNK1/2/3) and PI3K/Akt were evaluated 6 h after treatment of hippocampal slices with glutamate (10 mM), ConBr (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or Glutamate (10 mM) co-administered with ConBr (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The results showed that glutamate did not alter the phosphorylation of JNK1/2/3 (Figure 2A and B) and ERK2 (Figure 3). However, glutamate significantly increased phosphorylation of ERK1 ( $26.73\% \pm 5.11$ ; \* $p < 0.05$ ) (Figure 3A and B) and p38<sup>MAPK</sup> ( $37.58\% \pm 8.41$ ; \* $p < 0.05$ ; Figure 4A and B). Nevertheless, co-treatment with ConBr (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) did not prevent the increased phosphorylation of MAPKs induced by glutamate (Figures 2, 3 and 4). Moreover, the total contents of all kinases were not modified by treatment with ConBr and/or glutamate.

Furthermore, we evaluated the modulation of PI3K/Akt by glutamate and/or ConBr. The results showed that glutamate (10 mM) decreased hippocampal slices phosphorylation of Akt by  $24.21\% \pm 4.94$  and the treatment with ConBr (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) significantly prevented the glutamate-induced decreasing of Akt phosphorylation (<sup>#</sup> $p < 0.05$ ; Figure 5A and B). Noteworthy, the total content of Akt was not modified by any treatment.

Based on this finding, it was evaluated the possible involvement of PI3K/Akt pathway in the neuroprotective effect of ConBr. Therefore, hippocampal slices were incubated with the PI3K inhibitor LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ), and cell viability were evaluated after glutamate, ConBr or Glutamate/ConBr treatment. Notably, in the presence of PI3K inhibitor (LY294002) the neuroprotective effect of ConBr was abolished (figure 5C). LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ), per se, did not change the cell viability (data not shown).

#### 4. DISCUSSION

The neuroprotective properties of ConBr against glutamatergic neurotoxicity *in vitro* are the main finding of the present study. ConBr, a

mannose/glucose specific lectin was able to prevent the decreased cell viability induced by glutamate in hippocampal slices and this neuroprotective mechanism involves the PI3K/Akt pathway. Previous results from our group showed beneficial actions of ConBr in the CNS function, including: i) antidepressant-like effect in the forced swimming test (FST) at doses that do not alter locomotor activity by a mechanism dependent upon its interaction with the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems (Barauna et al, 2006); ii) neuroprotection against seizures and hippocampal cell death caused by quinolinic acid (QA) injected intracerebroventricularly (Russi et al., 2012).

Endogenous brain lectins have been recognized as important potential cell modulators (Dube and Bertozzi, 2005; Endo, 2005; Liu and Rabinovich, 2005; Qu et al., 2011). However, their specific functional roles in the CNS, as synaptic activity and neuroplasticity, are not yet clear (Marschal et al., 1989; Dube and Bertozzi, 2005; Endo, 2005; Qu et al., 2011; Russi et al., 2012). Therefore, the present study applying a plant lectin is particularly important, since it gives new evidence concerning the importance and the potential effect of glycan chains associated to surface proteins, as signaling molecules involved in the neuroprotection mechanism, via interaction with lectins. Nevertheless, our findings indicate that the ConBr interaction with glycans at cell surface is a fundamental step in order to anchor the lectin on its target. This conclusion is supported by the fact that the blockage of the carbohydrate-binding domain (CRD) with mannose counteracted the neuroprotective effect of ConBr against glutamate excitotoxicity.

As mentioned earlier, excessive glutamate in the synaptic cleft causes neuronal dysfunction and degeneration, and it has been implicated in many pathological processes such as ischemia, traumatic brain injury, seizures and chronic neurodegenerative diseases (Lau and Tymianski, 2010). The NMDA receptor, the main actor in glutamate excitotoxicity, is a glycoprotein that could be a potential target for the mannose/glucose-specific lectin ConBr, since it has been shown ConBr exerts a modulatory action over NMDA receptors by inhibiting its activity in response to its agonist QA (Russi et al., 2012). Here we confirm that glutamate (10 mM) is neurotoxic to hippocampal slices; however, ConBr (10  $\mu$ g/mL) reverses the glutamate-induced decline on cell viability demonstrating a clear neuroprotective effect of the lectin against glutamatergic neurotoxicity, thus reinforcing the inhibitory action of ConBr on NMDA receptor response. Contributing to the idea of this putative interaction of ConBr at NMDA receptor, previous evidence showed glutamate-induced cell damage in hippocampal slices

is blocked by MK-801, a non-competitive NMDA receptor antagonist (Moz et al., 2008b).

To investigate the alterations of cell signaling pathways by glutamate and their possible involvement in the neuroprotective effect attained by ConBr, the modulation of MAPKs and PI3K/Akt was evaluated.

We previously demonstrated glutamate can cause impairment of cell viability and may induce apoptosis in hippocampal slices by a mechanism dependent of ionotropic receptors and p38<sup>MAPK</sup> activation (Molz et al., 2008b). Our results showed that glutamatergic excitotoxicity provoked elevation in p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation and decreased cell viability. ConBr did not reverse p38<sup>MAPK</sup> activation, thereby assuming that the route of neuroprotection exerted by ConBr does not occur via this MAPK. Moreover, glutamatergic excitotoxicity provoked elevation of ERK1 phosphorylation, and ConBr did not reverse this effect. Although ERK signaling pathway is mostly implicated in cell survival, many studies have shown that the ERK signaling pathway can also play a detrimental role during oxidative neuronal injury, such as cerebral ischemia, brain trauma, and neurodegenerative diseases (Chu et al., 2004).

In contrast, glutamate did not alter the phosphorylation of ERK2 and JNK1/2/3. JNKs, a subfamily of MAP kinases, are central mediators of apoptosis and neurodegeneration, but also of plasticity and regeneration (Zhao and Herdegen, 2009). In spite JNK3 knock down is associated with neuroprotection against glutamate excitotoxicity (Yang et al., 1997; Bogoyevitch et al., 2010), this pathway was not modified in hippocampal slices under the conditions tested.

Akt is involved in proliferation, differentiation and protection from apoptosis (Brazil and Hemmings, 2001; Kim et al., 2004), promoting cell survival in response to growth factors. Activation of PI3K by growth factors initiates a cascade of events that culminates with Akt activation, via phosphorylation of Thr308 and Ser473 sites (Choudhari et al., 2007; Jing et al., 2012). Recently, Molz et al., 2011 showed that guanosine protects hippocampal slices by a mechanism that involves the PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  (Ser9) pathway, preventing glutamate-induced neurotoxicity. Moreover, it has been shown that glutamate excitotoxicity may decrease PI3K/Akt activation and neuroprotective compounds may reverse this effect (Chuang et al., 2011; Dal-Cim, et al., 2011; Lee et al, 2012; Sun et al., 2012). Therefore, our results agree with these previous studies showing that glutamate induces decrease of Akt phosphorylation and ConBr reversed this effect. Moreover, using the

PI3K inhibitor LY294002, the neuroprotective effect of ConBr was abrogated, confirming that ConBr acts via a PI3K/Akt dependent pathway in order to reverse glutamatergic neurotoxicity.

In conclusion our findings reinforce ConBr, a mannose/glucose lectin, as a protein with neuroprotective effects against glutamate excitotoxicity. The mechanism involved in the lectin action has not been fully elucidated, but it likely involves the PI3K/Akt pathway. Since NMDA receptor subunits (NR1 and NR2) are glycosylated in the N-terminal extracellular domain (Everts et al., 1997; Clark et al., 1998), it will be valuable in future studies to address the capability of ConBr to block NMDA receptors as result of its interaction with the oligosaccharides chains.

**Acknowledgments:** This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brazil (#305194/2010-0); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/PROCAD and CAPES/DGU 173/2008; National Institute of Science and Technology (INCT) for Excitotoxicity and Neuroprotection; Fundação de Amparo a Pesquisa de Santa Catarina (FAPESC); FAPESC/PRONEX - Núcleo de Excelência em Neurociências Aplicadas de Santa Catarina (NENASC); IBN.Net/CNPq. C.I.T, K.S.N., B.S.C. and R.B.L. are recipient of Research Scholarship from CNPq. The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## REFERENCES

- Andrade, J.L., Arruda, S., Barbosa, T., Paim L., Ramos, M.V., Cavada, B.S., 1999. Lectin-induced nitric oxide production. *Cell Immunol.* 194, 98 – 102.
- Barauna, S.C., Kaster, M.P., Heckert, B.T., do Nascimento, K.S., Rossi, F.M., Teixeira, E.H., Cavada, B.S., Rodrigues, A.L., Leal, R.B., 2006. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacol. Biochem. Behavior.* 85, 160 –169.
- Bjerrum, O.J., Heegaard, N.H., 1989. Has immunoblotting replaced electroimmunoprecipitation? Examples from the analysis of autoantigens and transglutaminase-induced polymers of the human erythrocyte membrane. *J Chromatogr.* 470, 351 – 367.
- Barbosa, T., Arruda S., Cavada, B.S., Grangeiro, T.B., de Freitas, L.A., Barral-Netto, M., 2001. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribo. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96, 673 – 678.
- Boehm, S.; Huck, S., 1998. Presynaptic inhibition by concavalin A: Are alpha-latrotoxin receptors involved in action potential-dependent transmitter release?. *J. Neurochem.* 71, 2421 – 2430.
- Bogoyevitch, M.A., Ngoei, K.R., Zhao, T.T., Yeap, Y.Y., Ng, D.C., 2010. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. *Biochim Biophys.* 1804, 463 – 475.
- Bonfoco, E.; Krainc, D.Ankrakrona, M. D.; Nicotera, P.; Lipton, S.A., 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92, 7162 – 7166.
- Brazil, D.P., Hemmings, B.A., 2001. Ten years of protein kinase B signaling: a hard AKT to follow. *Trends Biochem Sci.* 26, 657 – 664.

Brazil, D.P., Yang, Z.Z., Hemmings, B.A., 2004. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci.* 29, 23 – 42.

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

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

Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410, 37 – 40.

Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., Cobb, M.H., 2001 MAP kinases. *Chem Rev.* 101, 2449 –2476.

Choi, D.W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7, 369 – 379.

Choi, D.W., 1992. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23, 1261–1276.

Choudhari, S.R., Khan, M.A., Harris, G., Picker, D., Jacob, G.S., Block, T., Shailubhai, K., 2007. Deactivation of Akt and STAT3 signaling promotes apoptosis, inhibits proliferation, and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to an anticancer agent. *Atiprimod Molecular Cancer Therapeutics.* 6, 112 –121.

Chu, C.T., Levinthal, D.J., Kulich, S.M., Chalovich, E.M., DeFranco, D.B., 2004. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem.* 271, 2060 – 2066.

Chuang, D.M., Wang, Z., Chiu, C.T., 2011. GSK-3 as a target for lithium-induced neuroprotection against excitotoxicity in neuronal cultures and animal models of ischemic stroke. *Front Mol Neurosci.* 4, 15.



Clark, R.A., Gurd, J.W., Bissoon, N., Tricaud, N., Molnar, E., Zamze, S.E., Dwek, R.A., McIlhinney, R.A., Wing, D.R., 1998. Identification of lectin-purified neural glycoproteins, GPs 180, 116, and 110, with NMDA and AMPA receptor subunits: conservation of glycosylation at the synapse. *J Neurochem.* 70, 2594 – 2605.

Cordova, F.M., Rodrigues, A.L., Giacomelli, M.B., Oliveira, C.S., Posser, T., Dunkley, P.R., Leal, R.B., 2004. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Research.* 998, 65 – 72.

Cordova, F.M., Aguiar, A.S Jr., Peres, T.V., Lopes, M.W., Gonçalves, F.M., Remor, A.P., Lopes, S.C., Pilati, C., Latini, A.S., Prediger, R.D., Erikson, K.M., Aschner, M., Leal, R.B., 2012. In vivo manganese exposure modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the striatum of developing rats, and impairs their motorfunction. *PLoS One.* 7, 1 – 14.

Cowan, K.J., Storey, K.B., 2003. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *Journal of Experimental Biology.* 206, 1107 – 1115.

Dal-Cim, T., Martins, W.C., Santos, A.R., Tasca, C.I., 2011. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. *Neuroscience.* 183, 212 – 220.

Dube, D.H., Bertozzi, C.R., 2005. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov.* 4, 477 – 488.

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

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

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

Ghazarian, H., Idoni B., Pooenheimer, S.B., 2010. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. Elsevier. 113, 236 – 247.

Gonda X., 2012. Basic pharmacology of NMDA receptors. *Curr Pharm Des.* 18, 1558 – 1567.

Greengard, P., 2001. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science.* 294, 1024 – 1030.

Gurd, J.W., 1989. Glycoproteins of the synapse, in *Neurobiology of Glycoconjugates* (Margolis R. U. and Margolis R. K., eds), Plenum Press, New York. 219 – 242.

Hanada, M., Feng, J., Hemmings, B.A., 2004. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta.* 1697, 3 – 16.

Jing, Y., Liu, L.Z., Jiang, Y., Zhu, Y., Guo, N.L., Barnett, J., Rojanasakul, Y., Agani, F., Jiang, B.H., 2012. Cadmium increases HIF-1 and VEGF expression through ROS, ERK, and AKT signaling pathways and induces malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Toxicological Sciences* 125, 10 – 19.

Kim, Y., Seger, R., Suresh babu, C. V., Hwang, S. Y. and Yoo, Y. S. 2004. A positive role of the PI3K/Akt signaling pathway in PC12 cell differentiation. *Mol Cells.* 18, 353 – 359.

Kim, E.K., Choi, E.J., 2010. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1802, 396 – 405.

Lau, A., Tymianski, M., 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity an neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 460, 525 – 542.

- Lee, S., Kim, Y., Li, E., Park, S., 2012. Ghrelin protects spinal cord motoneurons against chronic glutamate excitotoxicity by inhibiting microglial activation. *Korean J Physiol Pharmacol.* 16, 43 – 48.
- Li, W.; Yu, J.; Xu, H.; Bao, J., 2011. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 414, 282 – 286.
- Liu Y., Peterson D.A., Kimura H., Schubert, D., 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry.* 69, 581 – 593.
- Lin, S.S.; Levitan, I.B., 1991. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. *Trends Neurosci* 14, 273 – 277.
- Liu, F.T.; Rabinovich, G.A., 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 5, 29 – 41.
- Lopes, F.C., Cavada, B.S., Pinto, V.P., Sampaio, A.H., Gomes, J.C., 2005. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins on the histamine release induced by plant lectins. *Braz J Med Biol Res.* 38, 935 – 941.
- Lynch, D.R., Guttman, R.P, 2002. Excitotoxicity: perspectives based on NMDA receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 300, 717 – 723.
- Marschal, P., Reeber, A., Neeser, J.R., Vincendon, G., Zanetta, J.P., 1989. Carbohydrate and glycoprotein specificity of two endogenous cerebellar lectins. *Biochimie* 71, 645 – 653.
- Matthies, H. Jr., Kretlow, J., Matthies, H., Smalla, K.H., Staak, S., Krug, M. 1999. Glycosylation of proteins during a critical time window is necessary for the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neuroscience* 91, 75 – 183.
- Meldrum, B.S., 2000. Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *J. Nutr.* 130, 1007S – 1015S.

Mielke, K., Herdegen, T., 2000. JNK and p38 stress kinases-degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Progress in Neurobiology*. 61, 45 – 60.

Molz, S., Dal-Cim, T., Decker, H., Tasca, C.I., 2008a. GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. *Brain Res*. 22, 113 –120.

Molz, S., Decker, H., Dal-Cim, T., Cremonez, C., Cordova, F.M., Leal, R.B., Tasca, C.I., 2008b. Glutamate induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and - p38MAPK signaling. *Neurochem. Res*. 33, 27– 36.

Molz, S., Dal-Cim, T., Budni, J., Martín-de-Saavedra, M.D., Egea, J., Romero, A., del Barrio, L., Rodrigues, A.L., López, M.G., Tasca, C.I., 2011. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase  $\beta$  pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. *J Neurosci.Res*. 89, 1400 – 1408.

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

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

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

Piermartiri, T.C., Vandresen-Filho, S., de Araújo, Herculano. B., Martins, W.C., Dal'agnolo, D., Stroeh, E., Carqueja, C.L., Boeck, C.R., Tasca, C.I., 2009. Atorvastatin prevents hippocampal cell death due to quinolinic acid-induced seizures in mice by increasing Akt phosphorylation and glutamate uptake. *Neurotox Res*. 16, 106 – 115.

Qu, W.S., Wang Y.H., Ma, J.F., Tian, D.S., Zhang, Q., Pan, D.J., Yu, Z.Y., Xie, M.J., Wang, J.P., 2011. Wang W. Galectin-1 attenuates astroglial-associated injuries and improves recovery of rats following focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 116, 217– 226.

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

Rothstein, J.D., 1996. Excitotoxicity hypothesis. *Neurology.* 47 (4 Suppl 2), S19 – 25.

Russi, M.A., Vandresen-Filho, S., Rieger, D.K., Costa, A.P., Lopes, M.W., Cunha, R.M., Teixeira, E.H., Nascimento, K.S., Cavada, B.S., Tasca, C.I., Leal, R.B., 2012. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. *Neurochem Res.* 37, 288 –297.

Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J., Grangeiro, T.B., Calvete, J.J., Cavada, B.S., 1997. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Letters* 405, 114 – 118.

Scherer, W.J., Udin, S.B., 1994. Concanavalin A reduces habituation in the tectum of the frog. *Brain Res.* 405, 114 – 118.

Schwarzschild, M.A., Cole, R.L., Hyman, S.E., 1997. Glutamate, but not dopamine, stimulates stress-activated protein kinase and AP-1-mediated transcription in striatal neurons. *J Neurosci.* 17, 3455 – 3466.

Sun, C., Wang, D., Zheng, W., 2012. Hydrogen peroxide attenuates the pro-survival signaling of insulin-like growth factor-1 through two pathways. *Neuroreport.* DOI 10.1097/WNR.0b013e328356f78a.

Sweatt, J.D., 2004. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 14, 1 – 7.

Thomas, G.M.; Huganir, R.L., 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Reviews. Neuroscience.* 5, 173 –183.

Van der Heide, L.P., Ramakers, G.M., Smidt, M.P., 2006. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol.* 79, 205 – 221.

Waetzig, V., Herdegen, T., 2004. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neurosci Lett.* 6; 361, 64 – 67.

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

Wong, W., Scott, J.D., 2004. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 959 –970.

Yamane, J., Nakamura, M., Iwanami, A., Sakaguchi, M., Katoh, H., Yamada, M., Momoshima, S., Miyao, S., Ishii, K., Tamaoki, N., Nomura, T., Okano, H.J., Kanemura, Y., Toyama, Y., Okano, H., 2010. Transplantation of galectin-1 expressing human Neural Stem Cells into injured spinal cord of adult common marmosets. *Journal of Neuroscience Research.* 88, 1394 –1405.

Yang, D.D., Kuan, C.Y., Whitmarsh, A.J., Rincon, M., Zheng, T.S., Davis, R.J., Rakic, P., Flavell, R.A., 1997. Absence of excitotoxicity induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature.* 389, 865 – 870.

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

Zhao Y, Herdegen T. Cerebral ischemia provokes a profound exchange of activated JNK isoforms in brain mitochondria., 2009. *Mol Cell Neurosci.* 41, 186 – 195.

## Figure Legend

**Figure 1. Neurotoxicity of glutamate on mice hippocampal slices and the neuroprotective effect of ConBr.** (A) Shows the neurotoxicity of glutamate against hippocampal slices. Briefly, slices were incubated for 6 h in Krebs saline/DMEM buffer alone (control) or in the presence of glutamate 1 or 10 mM. (B) Shows the neuroprotective effect of ConBr. For this evaluation hippocampal slices were incubated for 6 h in Krebs saline/DMEM buffer alone (control) or in the presence of glutamate 10 mM, or glutamate 10 mM plus ConBr 10  $\mu$ g/mL. (C) Evaluates the role of the CRD in the neuroprotective activity of ConBr against the glutamate neurotoxicity. In brief, ConBr was incubated with mannose (100mM) in order to block its CRD. Thereafter, hippocampal slices were incubated for 6 h in Krebs saline/DMEM buffer alone (control) or in the presence of glutamate 10 mM, or glutamate 10 mM plus ConBr 10  $\mu$ g/mL (not blocked) or ConBr blocked with mannose. In all experiments the cell viability was assessed by MTT assay. The data are expressed as a percentage (control is considered 100%), and the values are presented as mean  $\pm$  SEM of 6 independent experiments performed in triplicate. \*\*\*P<0.001 vs. control; \*\*P<0.01 vs. control; #P<0.05 vs. glutamate 10 mM.

**Figure 2. The treatments did not change the JNK1/2/3 phosphorylation.** (A) Shows representative western blot of phosphorylated JNK1 and JNK2/3 and their total content. (B) Shows quantitative analyses of the level of JNK1 and JNK2/3 phosphorylation. Hippocampal slices were incubated for 6 h in Krebs saline/DMEM buffer alone (control) or in presence of ConBr 10  $\mu$ g/mL, or glutamate 10 mM, or glutamate 10 mM plus ConBr 10  $\mu$ g/mL. Protein analysis was performed by western blotting. The data are expressed as percentage. The values are mean  $\pm$  S.E.M. of 5 independent experiments performed in duplicate.

**Figure 3. Glutamate stimulates ERK1 phosphorylation but ConBr did not reverse this effect.** (A) Shows representative western blot of phosphorylated ERK1 and ERK2 and their total content; (B) Shows quantitative analyses of ERK1 and ERK2 phosphorylation. Hippocampal slices were incubated for 6h in Krebs saline/DMEM buffer alone (control) or in presence of ConBr 10  $\mu$ g/mL, or glutamate 10 mM, or glutamate 10mM plus ConBr 10  $\mu$ g/mL. Protein analysis was performed by western blotting. The data are expressed as percentage.

The values are mean  $\pm$  S.E.M. of 5 independent experiments. \* $P < 0.05$  vs. control group.

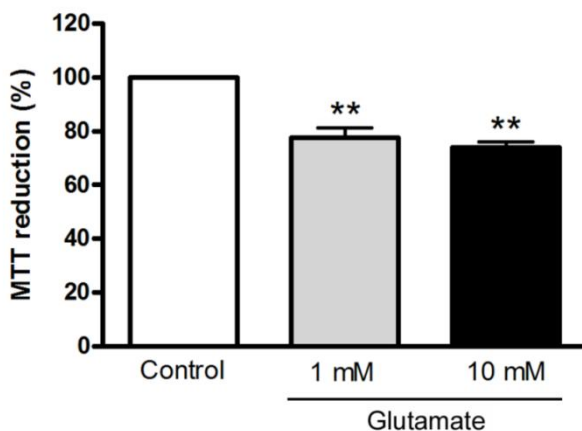
**Figure 4. Glutamate stimulates p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation but ConBr did not reverse this effect.** (A) Shows representative western blot of phosphorylated p38<sup>MAPK</sup> and their total content; (B) Shows a quantitative analyses of p38<sup>MAPK</sup> phosphorylation. Hippocampal slices were incubated for 6 h in Krebs saline/DMEM buffer alone (control) or in presence of ConBr 10  $\mu\text{g/mL}$ , or glutamate 10 mM, or glutamate 10mM plus ConBr 10  $\mu\text{g/mL}$ . Protein analysis was performed by western blotting. The data are expressed as percentage. The values are mean  $\pm$  S.E.M. of 5 independent experiments. \* $P < 0.05$  vs. control group.

**Figure 5. PI3K/Akt pathway is involved in the neuroprotective effect of ConBr.** (A) Shows a representative western blot of phosphorylated Akt and its total content and (B) shows quantitative analyses of the level of Akt phosphorylation. Briefly, hippocampal slices were incubated for 6 h in Krebs saline/DMEM buffer alone (control) or in the presence of ConBr 10  $\mu\text{g/mL}$ , or glutamate 10 mM, or glutamate 10 mM plus ConBr 10  $\mu\text{g/mL}$ . Protein analysis was performed by western blotting. The data are expressed as percentage. The values are mean  $\pm$  S.E.M. of 5 independent experiments performed in duplicate. \* $P < 0.05$  vs. control and #  $P < 0.05$  vs. Glutamate. (C) Shows the effect of the PI3K inhibitor, LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ), on the neuroprotective effect of ConBr against the neurotoxicity of glutamate on hippocampal slices. For this assay, hippocampal slices were incubated for 6 h in Krebs saline/DMEM buffer alone (control) or in the presence of glutamate 10 mM, or glutamate 10 mM plus ConBr 10  $\mu\text{g/mL}$  or glutamate 10 mM plus ConBr 10  $\mu\text{g/mL}$  with LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ). The cell viability was assessed by MMT assay. The data are expressed as percentage. The values are mean  $\pm$  S.E.M. of 6 independent experiments performed in triplicate. \*\*\* $P < 0.001$  vs. control; # $P < 0.05$  vs. glutamate 10 mM and vs glutamate/ConBr/LY294002.

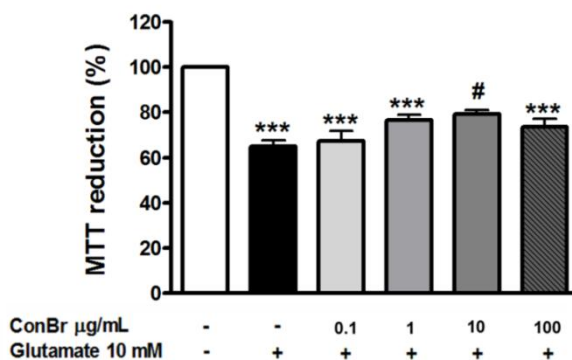
**Conflict of Interest statement:** None of the authors has a known or perceived conflict of interest with the contents of this manuscript.



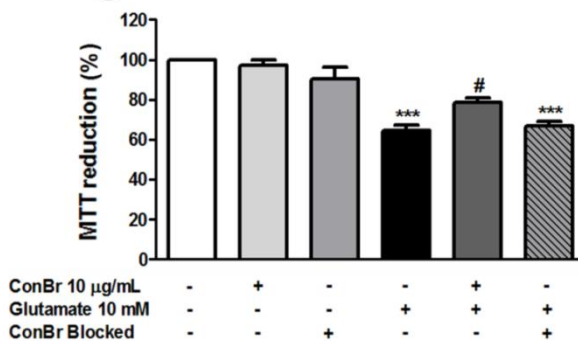
**A** Figure 1

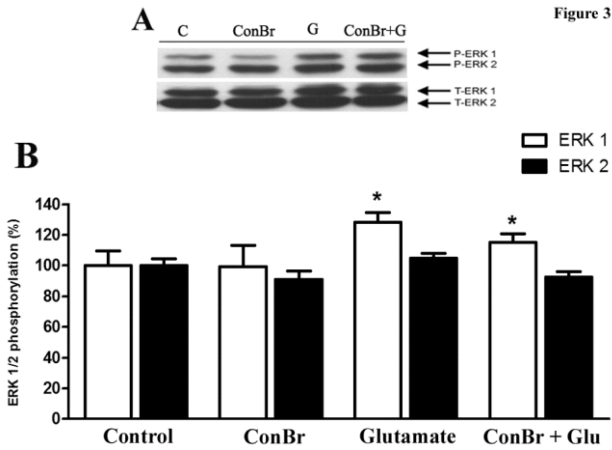
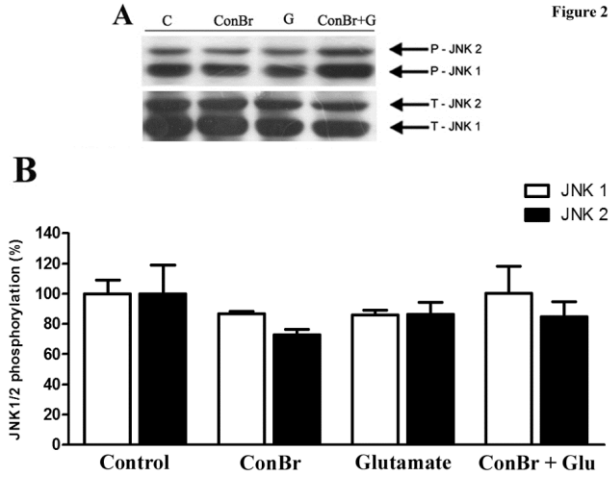


**B**



**C**





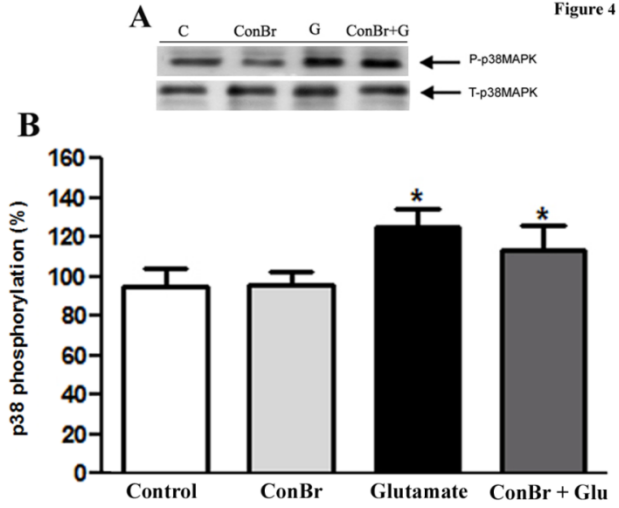
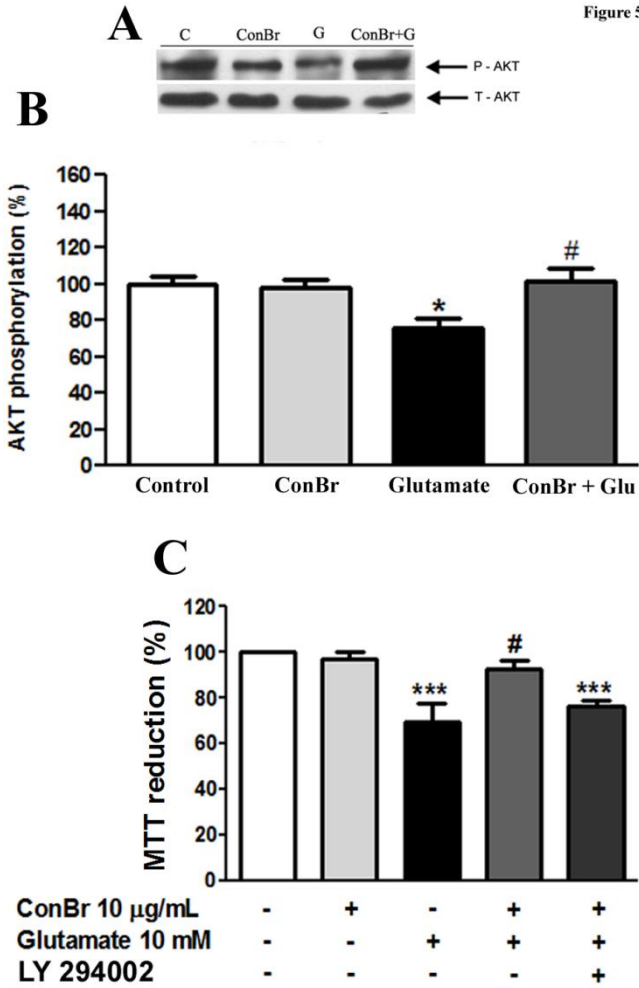


Figure 5

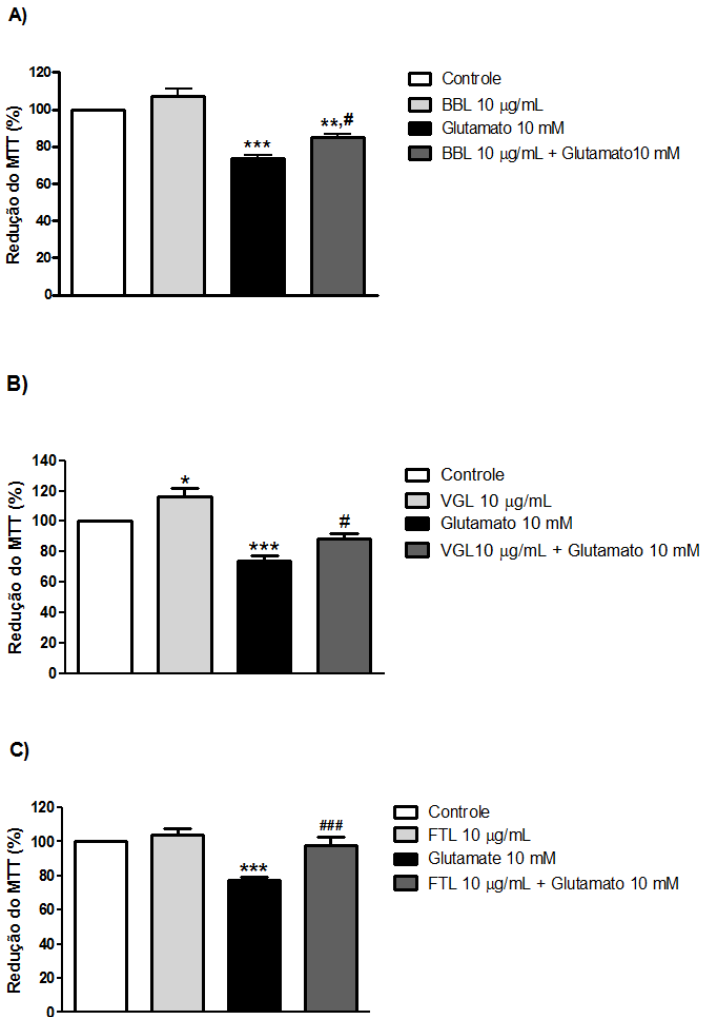


## **5.2 CAPÍTULO 2- Estudo da ação neuroprotetora das lectinas VGL, BBL, CGL e FTL frente à neurotoxicidade glutamatérgica**

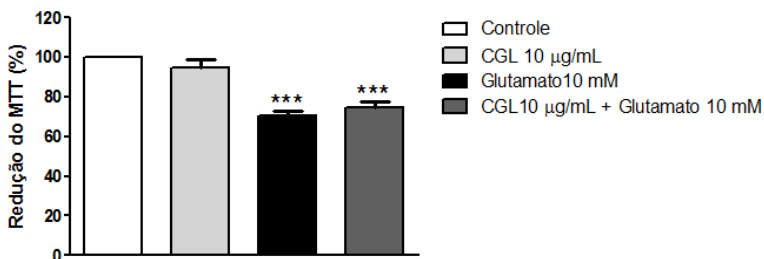
### **5.2.1 Avaliação da viabilidade celular frente à toxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo de camundongos**

Baseado na ação neuroprotetora *in vitro* de ConBr frente à neurotoxicidade glutamatérgica utilizando o teste de viabilidade MTT, o presente estudo teve como objetivo avaliar a possível atividade neuroprotetora de outras lectinas de plantas com afinidade por manose/glicose ou galactose. Nesse sentido, foram selecionadas lectinas extraídas de *Canavalia gladiata* (CGL) com afinidade por glicose/manose; e lectinas de *Artrocarpus incisa* (Frutalina- FTL), *Vatairea guianensis* (VGL) e *Bauhinia bauhinioides* (BBL) com afinidade por galactose. A atividade neuroprotetora foi avaliada em modelo de fatias hipocámpais de camundongos tratadas *in vitro* com glutamato (10 mM) durante 6 horas.

Os resultados demonstram que o glutamato (10 mM) administrado isoladamente (Figuras 5 e 6) diminuiu a viabilidade cerca de  $25 \pm 3\%$ . Entretanto, a co-incubação de glutamato com as lectinas com afinidade por galactose, VGL, BBL ou FTL (10  $\mu\text{g/mL}$ ) revelou que as essas lectinas foram capazes de reverter, de forma significativa, a citotoxicidade produzida pelo glutamato *in vitro* (Figura 5). Por outro lado, a lectina manose/glicose específica, CGL (10  $\mu\text{g/mL}$ ), não reverteu a diminuição da viabilidade celular provocada pelo glutamato (figura 6).



**Figura 5: Avaliação do efeito neuroprotetor de VGL, BBL e FTL (afinidade por galactose) frente à neurotoxicidade do glutamato sobre fatias hipocâmpais de camundongos.** Fatias hipocâmpais foram incubadas durante 6 h em meio Krebs/DMEM contendo veículo (salina), BBL, VGL ou FTL 10 µg/mL, glutamato 10 mM ou BBL, VGL ou FTL 10µg/mL co-administradas com glutamato 10mM. Os dados são expressos com porcentagem do controle (considerado 100%). Valores em média ± S.E.M. de 8 experimentos independentes. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001comparado com o controle; #P<0,05, ###P<0,001 comparado com o glutamato.

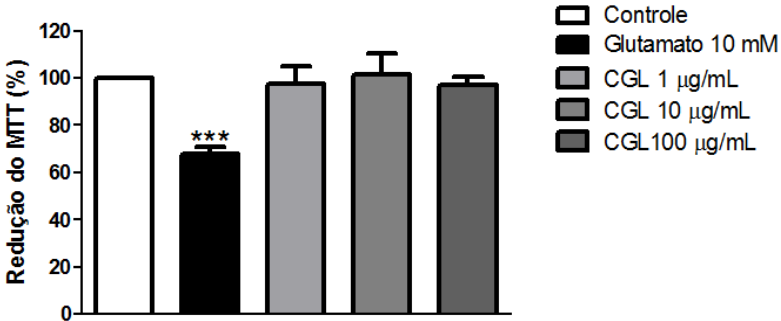


**Figura 6: Avaliação do efeito neuroprotetor de CGL (afinidade por manose/glicose) frente à neurotoxicidade do glutamato em modelo *in vitro* de fatias hipocâmpais de camundongos.** Fatias hipocâmpais foram incubadas durante 6h em meio Krebs/DMEM contendo veículo (salina), CGL 10 µg/mL, glutamato 10 mM ou CGL co-administrado com glutamato 10 mM. Os dados são expressos com porcentagem do controle (considerado como 100%). Valores em média ± S.E.M. de 8 experimentos independentes. \*\*\*P<0,001 comparado com o controle.

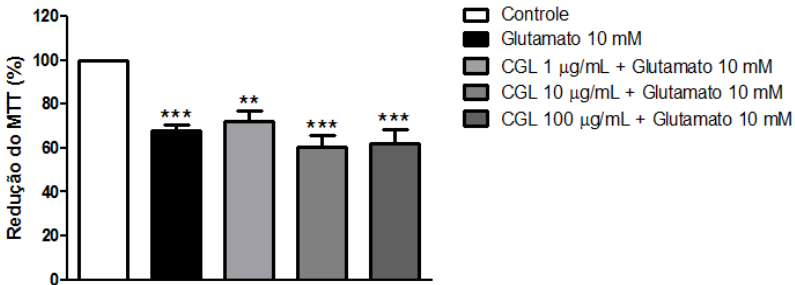
### 5.2.2 Avaliação da viabilidade celular e curvas dose-resposta da lectina CGL (afinidade manose/glicose) frente à neurotoxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo de camundongos

A lectina CGL não ocasionou efeito neuroprotetor frente à neurotoxicidade do glutamato na concentração de 10 µg/mL, concentração esta padronizada para os experimentos iniciais de prospecção para ação neuroprotetora das lectinas. Esses resultados diferem dos obtidos com ConBr, que como CGL também tem afinidade por manose/glicose, mas se mostrou efetiva na ação neuroprotetora contra a neurotoxicidade glutamatérgica. Dessa forma, foi realizada uma curva de concentração com a lectina CGL para confirmar a falta de ação neuroprotetora dessa lectina.

A lectina CGL (1, 10, 100 µg/mL) isoladamente não modificou a viabilidade celular em relação ao controle (Figura 7). Além disso, a incubação das fatias com glutamato em presença de CGL (1, 10 e 100 µg/mL) demonstrou que a lectina não foi capaz de reverter a queda de viabilidade celular induzida pelo glutamato (10 mM) em nenhuma das concentrações testadas (Figura 8).



**Figura 7: Avaliação da neurotoxicidade de CGL em fatias de hipocampo de camundongo.** Fatias hipocámpicas de camundongos foram incubadas por 6h em tampão salina/Krebs/DMEM isoladamente (controle), em presença de glutamato 10 mM ou em presença de CGL 1, 10 e 100 µg/mL. Valores em média ± S.E.M. de 6 experimentos independentes. \*\*\*P<0,001 comparado com o controle.



**FIGURA 8: Avaliação do efeito neuroprotetor de CGL contra a neurotoxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo de camundongos.** Fatias hipocámpicas de camundongos foram incubadas por 6h em tampão salina/Krebs/DMEM isoladamente (controle) ou em presença de glutamato 10 mM, ou glutamato 10 mM co-administrado com CGL 1, 10 e 100 µg/mL. Os valores são expressos como média ± S.E.M de 6 experimentos independentes. \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001 comparado com o controle.

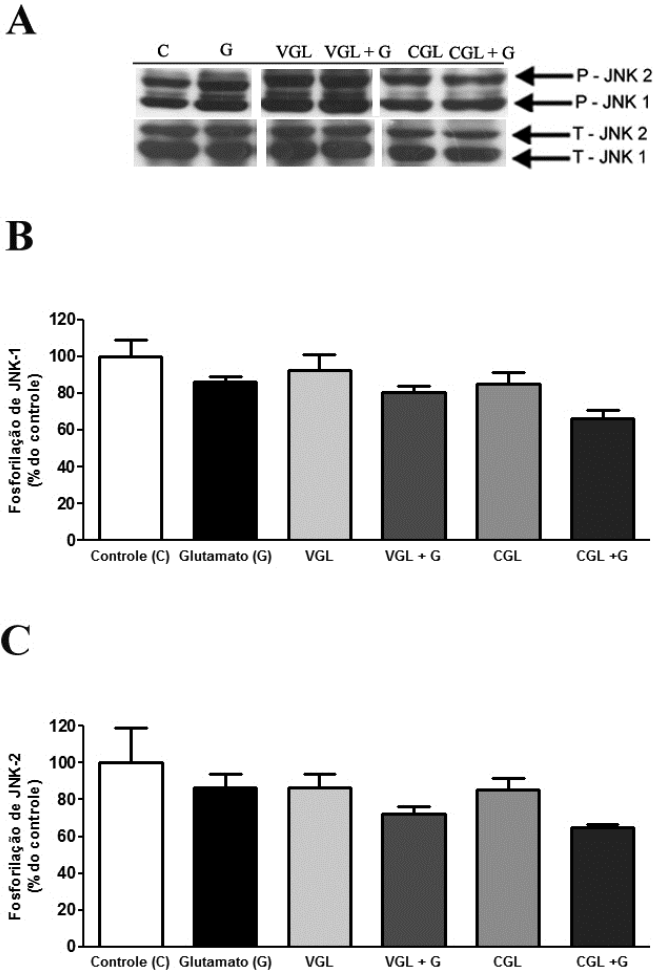


### 5.2.3 Modulação das MAPKs em fatias hipocampais expostas ao glutamato

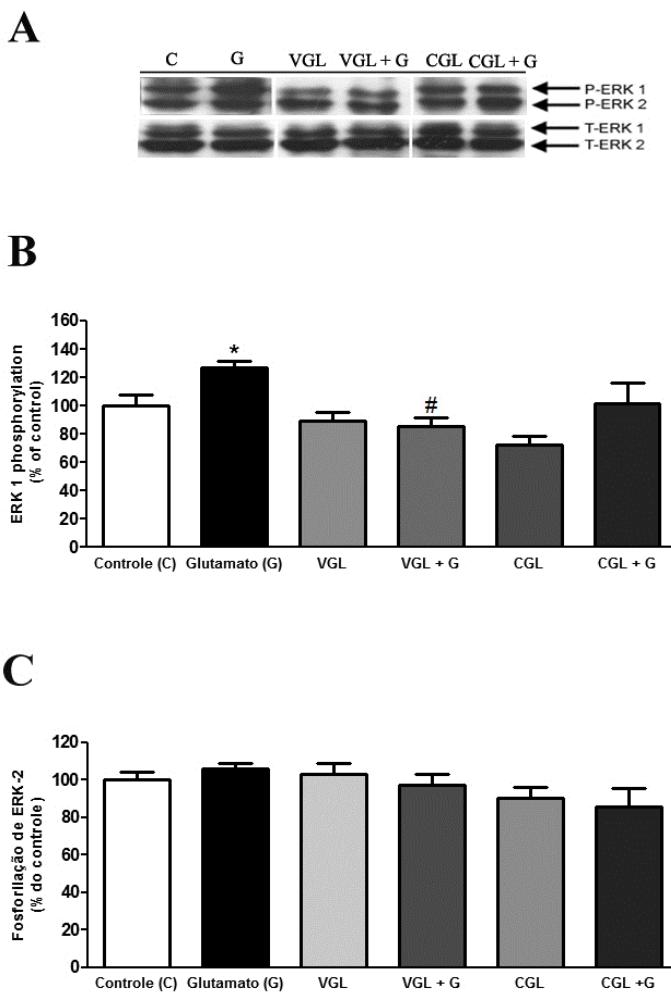
A excitotoxicidade, processo no qual a célula nervosa é exposta a concentrações elevadas de glutamato na fenda sináptica, ocasiona um influxo excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  (LYNCH et al., 2002), que pode ocasionar morte celular apoptótica ou necrótica (BONFOCO et al., 1995). Os mecanismos de morte celular por apoptose envolvem em parte a ativação de vias de estresse como  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  e JNK e a liberação de fatores apoptóticos (SCHWARZSCHILD et al., 1997; YANG et al., 1997).

O presente estudo pretendeu identificar lectinas com potencial neuroprotetor que podem interferir positivamente na diminuição dos danos observados em processos neurotóxicos em resposta a superestimulação do sistema glutamatérgico. Desta forma, avaliamos a ativação por fosforilação de ERK1/2,  $\text{p38}^{\text{MAPK}}$  e JNK1/2/3 em fatias de hipocampo de camundongos machos Swiss adultos. As fatias foram expostas por 6 h em meio controle ou meio contendo glutamato (10 mM), lectinas (VGL ou CGL; 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ou glutamato (10 mM) juntamente com VGL ou CGL (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). As proteínas foram posteriormente analisadas através de western blot.

Os resultados mostraram que não houve alteração na fosforilação de JNK1/2 (Figura 9 A-C) nem de ERK2 (Figura 10C) nas condições testadas. Entretanto, glutamato (10 mM) aumentou significativamente a fosforilação de ERK1 ( $40\% \pm 5,11$ ;  $*p < 0,05$ ) (Figura 10A e B) e o co-tratamento com VGL (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) preveniu o aumento da fosforilação de ERK1. Por outro lado, CGL não foi efetiva em reverter o aumento de fosforilação de ERK1 induzido pelo glutamato. Os resultados mostraram que a fosforilação de ERK1 nas fatias tratadas com CGL isoladamente ou juntamente com glutamato (Figura 10A e B), não diferiu significativamente do grupo controle e do grupo glutamato, respectivamente.



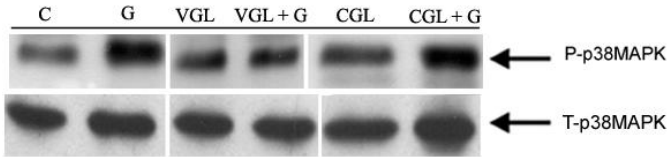
**Figura 9: O tratamento com glutamato e/ou VGL e CGL não altera a fosforilação de JNK1/2.** (A) Mostra um Western Blot representativo da fosforilação de JNK1 and JNK2 e seu conteúdo total; (B) e (C) mostram, respectivamente, a análise quantitativa dos níveis de fosforilação de JNK1 and JNK2. Fatias hipocâmpais de camundongos foram incubadas por 6h em tampão salina/Krebs/DMEM isoladamente (controle), ou contendo glutamato (10 mM), ou glutamato juntamente com VGL ou CGL (10 µg/mL). A análise de proteínas foi realizada por Western Blot. Os valores são expressos como percentual do controle (considerado 100%). Os valores são média ± S.E.M. de 6 experimentos independentes.



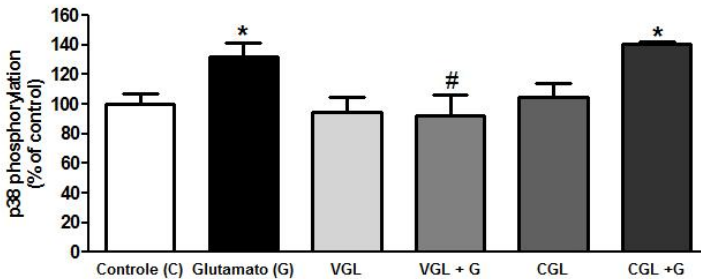
**Figura 10: Glutamato estimula a fosforilação de ERK-1 e VGL reverte esse efeito.** (A) Western blot representativo das formas fosforiladas e totais de ERK1/2; (B) e (C) mostram, respectivamente, a análise quantitativa dos níveis de fosforilação de ERK1 and ERK2. Fatias hipocâmpais foram incubadas por 6 h em tampão salina/Krebs/DMEM (controle), ou nesse meio em presença de glutamato (10 mM), ou de glutamato juntamente com VGL ou CGL (10 µg/mL). Os valores são expressos como percentual do controle (considerado 100%) e representam média ± S.E.M. de 6 experimentos independentes. \*P<0,01 comparado ao controle; #P<0,05 em relação ao glutamato 10 mM.

Glutamato também aumentou a fosforilação de  $p38^{MAPK}$  ( $38,70\% \pm 9,20$ ;  $*p < 0.05$ ; Figura 11). Entretanto, VGL preveniu esse efeito. Por outro lado, a lectina CGL não foi capaz de reverter o aumento na fosforilação de  $p38^{MAPK}$  induzida pelo glutamato (Figura 11). O conteúdo de todas as MAPKs analisadas não foi modificado pelos tratamentos (Figuras 9, 10 e 11).

**A**



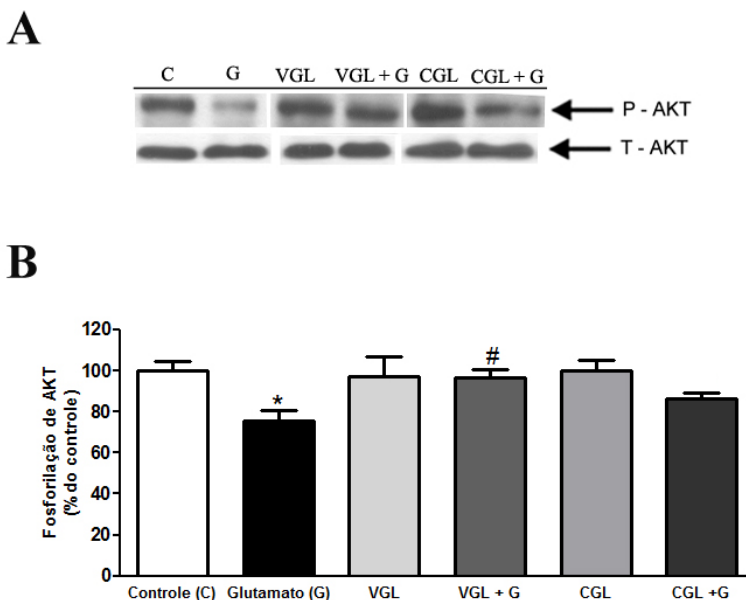
**B**



**Figura 11: Glutamato estimula a fosforilação de  $p38^{MAPK}$  e esse efeito é revertido por VGL, mas não por CGL.** (A) Mostra um Western Blot representativo da fosforilação de  $p38^{MAPK}$  e seu conteúdo total; (B) mostra a análise quantitativa do nível de fosforilação de  $p38^{MAPK}$ . Fatias hipocâmpais de camundongos foram incubadas por 6h em tampão salina/Krebs/DMEM (controle) ou em presença de glutamato 10 mM, ou glutamato 10 mM juntamente com VGL ou CGL 10  $\mu\text{g/mL}$ . A análise de proteínas foi avaliada por Western Blot. Os valores são expressos como percentual do controle (considerado 100%). Os valores são média  $\pm$  S.E.M. de 6 experimentos independentes.  $*P < 0,05$  comparado com o controle,  $\#P < 0,05$  em relação ao glutamato 10 mM.

### 5.2.4 Modulação de PI3K/AKT em fatias hipocampais expostas ao glutamato

No presente estudo, também foi avaliado a ativação por fosforilação de AKT (Ser473) nas fatias de hipocampo. As fatias foram expostas durante 6h em situação meio controle, ou meio contendo glutamato (10 mM), ou contendo as lectinas VGL ou CGL (10  $\mu$ g/mL) isoladamente, ou ainda meio contendo glutamato juntamente com as lectinas VGL ou CGL. As amostras foram analisadas através de western blot. Os resultados demonstraram que glutamato (10 mM) induz uma diminuição da fosforilação de AKT em relação ao controle (24,21%  $\pm$  4,94). Notavelmente, VGL reverteu significativamente esse efeito (Figura 12B). Nas fatias co-tratadas com a lectina CGL e glutamato o nível de fosforilação de AKT não diferiu significativamente tanto em relação ao controle quanto em relação ao tratamento com glutamato.



**Figura 12: Glutamato induz diminuição da fosforilação de AKT e a lectina VGL reverte este efeito.** (A) Western Blot representativo da fosforilação de AKT e seu conteúdo total; (B) mostra a análise quantitativa do nível de fosforilação de AKT. Fatias hipocampais de camundongos foram incubadas por 6h em tampão salina/Krebs/DMEM (controle), ou esse meio contendo glutamato 10 mM, ou contendo somente as lectinas (VGL ou CGL), ou ainda

contendo glutamato 10 mM juntamente com VGL ou CGL (10 µg/mL). As proteínas foram avaliadas por Western Blot. Os valores são expressos como percentual do controle (considerado 100%) e representam a média ± S.E.M. de 6 experimentos independentes. \*P<0,05 comparado com o controle; #P<0,05 comparado com o glutamato.

## 6. DISCUSSÃO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC, entretanto em excesso ele causa excitotoxicidade, fenômeno associado ao influxo excessivo de  $Ca^{2+}$ , induzindo um processo de morte neuronal (BERLIOCCHI et al, 2005). Baseado nesse paradigma foi avaliada a atividade neuroprotetora de lectinas extraídas de plantas, como a ConBr, VGL, CGL, FTL e BBL frente à neurotoxicidade glutamatérgica *in vitro* sobre fatias hipocâmpais expostas a concentrações elevadas de glutamato.

Sem dúvida, a propriedade neuroprotetora de ConBr contra a neurotoxicidade glutamatérgica *in vitro* é o principal achado do presente trabalho. ConBr, uma lectina glicose/manose específica, foi capaz de reverter a diminuição da viabilidade celular induzida pelo glutamato em modelo de fatias de hipocampo e este mecanismo de neuroproteção parece envolver a via de sinalização PI3K/AKT.

O glutamato em altas concentrações causa disfunção na fenda sináptica neuronal, e tem sido implicado em vários processos patológicos tais como a isquemia, lesão cerebral traumática, convulsões e doenças neurodegenerativas crônicas (LAU et al., 2010). Os receptores NMDA (NMDAR) são amplamente expressos pelos neurônios no sistema nervoso central e devido a sua elevada permeabilidade ao cálcio e incompleta dessensibilização, o receptor NMDA é considerado o principal mediador da excitotoxicidade glutamatérgica (CHOI, 1992; ROTHSTEIN, 1996; GONDA, 2012). O NMDAR é uma glicoproteína que possui diversos sítios de glicosilação na face extracelular contendo oligossacarídeos como a manose (MACHAIDZE e MIKELADZE, 2001; STANDLEY e BAUDRYB, 2000).

Além disso, a interação de lectinas como ConA com receptores glutamatérgicos tem sido bem documentada (CLARK et al, 1998; MAYER et al., 1989). Nesse sentido foi demonstrado que ConA foi capaz de potencializar a atividade de receptores NMDA, sugerindo que alguns dos sítios desse receptor, preferencialmente ricos em manose, seja necessário para a modulação do canal por lectinas (MACHAIDZE e MIKELADZE, 2001). Estudos prévios realizados por nosso grupo mostraram que ConBr exerce um efeito antidepressivo no teste do nado forçado (TNF), em doses que não alteram a atividade locomotora, esse efeito antidepressivo no teste do nado forçado é dependente de sua interação com os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico (BARAUNA et al, 2006). Contudo, estudos recentes de nosso grupo também evidenciaram inibição do sistema glutamatérgico

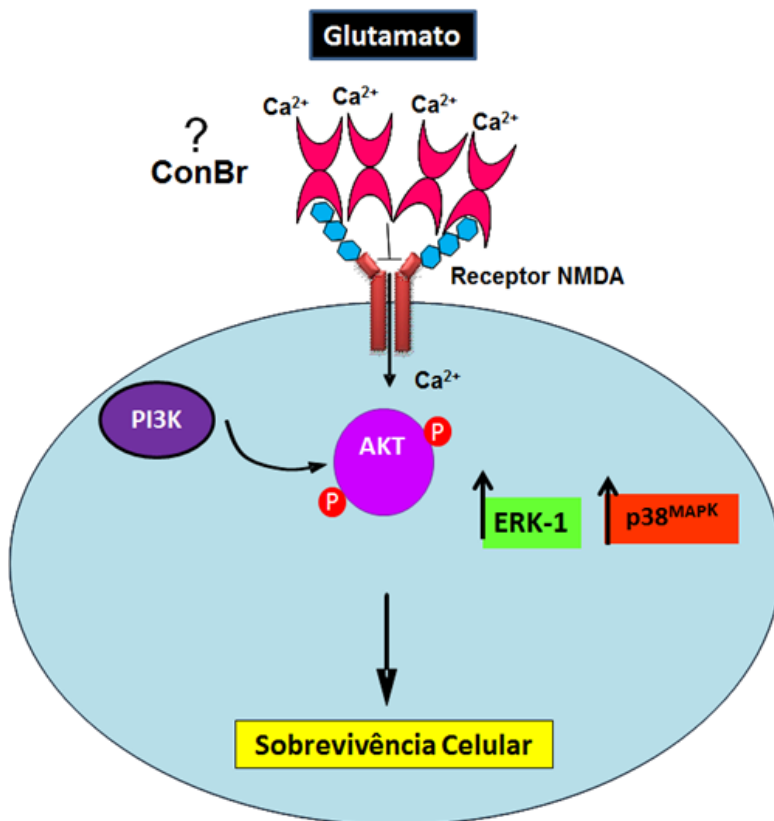
no mecanismo de ação antidepressivo de ConBr, através das seguintes observações (COSTA et al, 2010; dados não publicados):

- O pré-tratamento de camundongos com NMDA ou D-serina (agonistas dos receptores glutamatérgicos NMDA) reverteu a ação antidepressiva de ConBr no teste do nado forçado;
- A administração consecutiva de MK-801 (antagonista de receptor NMDA) e ConBr, ambos em doses sub-efetivas, produziram atividade antidepressiva;
- O pré-tratamento com L-arginina (precursor de NO via a enzima NOS) ou Sildenafil (inibidor da PDE5) reverteu a ação antidepressiva de ConBr;
- A administração consecutiva de ODQ (inibidor da guanilato ciclase solúvel) e ConBr, ambos em doses sub-efetivas, produziram atividade antidepressiva;
- Nenhum dos tratamentos causou alteração na atividade locomotora dos animais (medida através do teste do campo aberto).

Além disso, outros estudos recentes de nosso grupo mostraram um efeito neuroprotetor de ConBr frente ao ácido quinolínico, que foi dependente de sua integridade estrutural bem como da sua capacidade de ligação a resíduos de oligossacarídeos. Esses achados sugerem que a lectina ConBr é capaz de exercer uma ação modulatória sobre receptores NMDA, inibindo sua atividade e dessa forma produzindo neuroproteção (RUSSI et al., 2012). Dessa maneira, podemos sugerir que os receptores NMDA poderiam ser um alvo potencial para a lectina ConBr, provavelmente pela interação da lectina com os resíduos de manose/glicose presentes no NMDAR.

Os resultados do presente estudo demonstram que o glutamato induz a diminuição da fosforilação da AKT e ConBr reverte este efeito, sugerindo que ConBr exerce seu efeito neuroprotetor, possivelmente via inibição do receptor NMDA. Uma hipótese sugerida é de que como consequência da inibição dos receptores NMDA, pode ocorrer diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$  e ativação da PI3K/AKT (Figura 13). A ativação da PI3K/AKT inicia uma cascata de eventos que regulam várias funções celulares incluindo sobrevivência celular (protegendo contra a apoptose) e pode modular proteínas importantes relacionadas a neuroplasticidade (BRAZIL e HEMMINGS, 2001;. KIM et al., 2004; CHOUDHARI et al., 2007; JING et al., 2012).

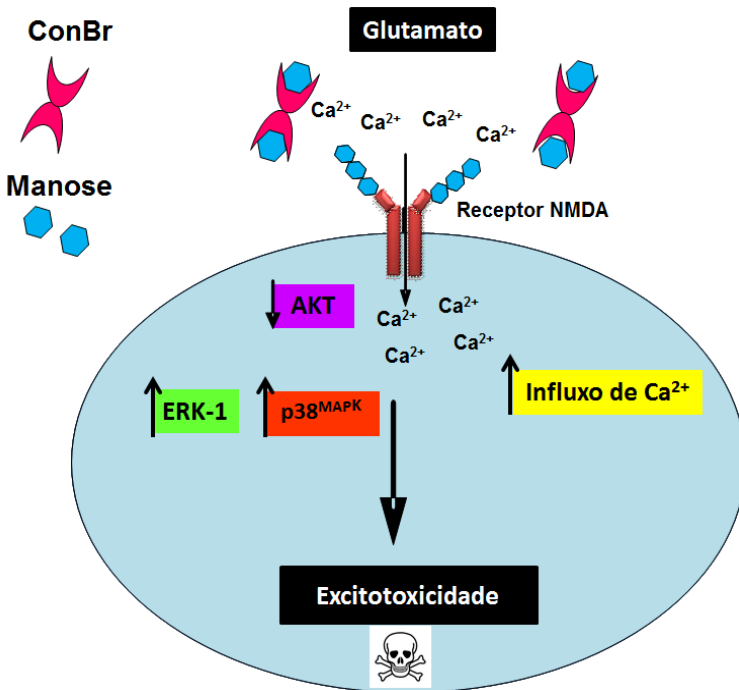




**Figura 13: Possível mecanismo de ação de ConBr envolvendo o sistema glutamatérgico no efeito neuroprotetor observado *in vitro*.** ConBr pode exercer efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade induzida por glutamato *in vitro*, possivelmente via inibição de receptores NMDA. Como consequência ConBr reverte a queda de fosforilação de AKT, mas sem alterar o aumento de fosforilação de ERK1 e p38<sup>MAPK</sup> dependentes da exposição ao glutamato.

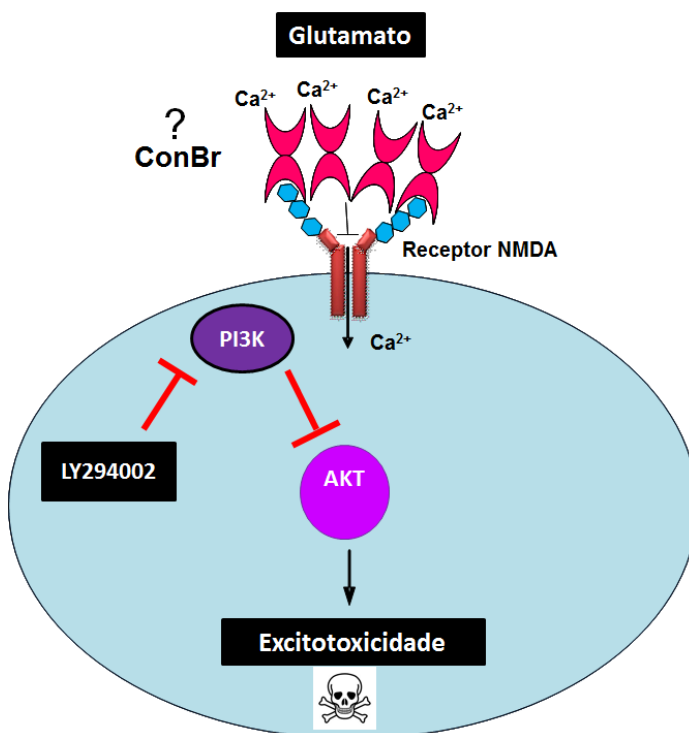
A ação de ConBr provavelmente depende das suas propriedades estruturais ou da interação proteína-proteína entre a lectina e o seu alvo (SANZ-APARICIO et al, 1997). No entanto, parece bastante evidente que a interação da ConBr com o glicano na superfície da célula é um passo fundamental, a fim de ancorar a lectina sobre seu alvo. O bloqueio do domínio de ligação de carboidratos (CRD) com manose neutraliza o efeito neuroprotetor de ConBr. Os nossos resultados mostram que

ConBr bloqueada com manose não reverte a redução da viabilidade celular causada pelo glutamato, demonstrando que a interação lectina-receptor ocorre via interação com os resíduos de manose. A exposição ao glutamato também causa diminuição da fosforilação de AKT (proteína relacionada à sobrevivência celular), juntamente com aumento da fosforilação de ERK1 e p38<sup>MAPK</sup> (Figura 14). Entretanto o bloqueio de ConBr com manose somente reverteu a ação do glutamato sobre AKT, mas não sobre ERK1 e p38<sup>MAPK</sup>. Isso indica que a interação de ConBr com seu alvo via CRD somente pode modular a via PI3K/Akt sem alterar a resposta sobre as MAPKs.



**FIGURA 14: Bloqueio do domínio de ligação de carboidratos (CRD) com manose neutraliza o efeito neuroprotetor de ConBr.** ConBr *in vitro* foi bloqueada com manose e dessa forma o seu efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade do glutamato, medido pelo teste do MTT, foi abolido, possivelmente pelo impedimento de sua ancoragem sobre o receptor NMDA. Dessa forma, na presença de ConBr bloqueada predominam os efeitos do glutamato, relativos a estimulação do influxo de Ca<sup>2+</sup>, modulação das vias de sinalização e indução de morte celular.

Tendo em vista que o bloqueio de ConBr reverteu seu efeito neuroprotetor bem como impediu a ativação de AKT frente ao glutamato, avaliamos o papel da via PI3K/AKT na reversão da queda de viabilidade por ConBr. Dessa forma o inibidor de PI3K, LY294002, bloqueou a capacidade de ConBr reverter a queda na viabilidade celular causada pelo glutamato, permitindo a ocorrência de excitotoxicidade glutamatérgica mesmo na presença da lectina. Esse achado indica que a ação neuroprotetora de ConBr frente ao glutamato é dependente da via PI3K/AKT (Figura 15).



**Figura 15: Possível mecanismo de excitotoxicidade glutamatérgica utilizando um inibidor de PI3K observado no ensaio de viabilidade celular MTT *in vitro*.** ConBr 10  $\mu\text{g/mL}$  não foi capaz de reverter a queda na viabilidade celular causada pelo glutamato quando as fatias hipocâmpais foram pré-tratadas com LY294002 (10  $\mu\text{M}$ ), um inibidor de PI3K, que por sua vez impede a ativação de AKT, sugerindo que a proteção da excitotoxicidade glutamatérgica por ConBr é dependente da via PI3K/AKT.

Em virtude do papel neuroprotetor *in vitro* de ConBr no ensaio de viabilidade celular (MTT), resolvemos realizar um screening com outras lectinas extraídas de plantas neste mesmo modelo, a fim de avaliar suas supostas ações neuroprotetoras frente à neurotoxicidade glutamatérgica. Assim, similar a ConBr (lectina com afinidade por manose/glicose), as lectinas VGL, BBL e FTL (lectinas com afinidade por galactose) protegeram contra a neurotoxicidade do glutamato. Por outro lado CGL (lectina com afinidade por manose/glicose) não reverteu a queda na viabilidade celular causada pelo glutamato.

A ação neuroprotetora de lectinas tem sido pouco estudada, entretanto, alguns estudos mostram que galectina-1, uma lectina endógena presente no cérebro de mamíferos com afinidade por D-galactose, pode exercer um efeito neuroprotetor, frente à toxicidade glutamatérgica sobre neurônios cerebelares, via alteração da expressão da subunidade NR1a do receptor NMDA por um mecanismo desconhecido, mas dependente do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (LEKISHVILI et al., 2006). Nossos achados colaboram no tema, pois sugerem a capacidade de lectinas modularem os receptores NMDA. Isso nos permite postular que uma ação modulatória de lectinas sobre a transmissão glutamatérgica seja um mecanismo passível de ocorrer fisiologicamente, através da interação de lectinas neurais (endógenas) com resíduos sacarídicos presentes nos receptores.

Sabendo que ConBr (que apresentou ação neuroprotetora) e CGL (que não demonstrou a mesma capacidade) são lectinas com afinidade por manose/glicose, não podemos inferir que o efeito neuroprotetor ocorre somente em função da interação com resíduos de manose. Além disso, lectinas com afinidade por galactose como a BBL, FTL e VGL também apresentam efeito neuroprotetor neste modelo de neurotoxicidade glutamatérgica *in vitro*. Nesse sentido, alguns autores sugerem que alguns dos sítios dos receptores NMDA, preferencialmente ricos em manose, sejam necessários para a modulação do canal por lectinas e outros sítios, provavelmente ricos em galactose, para as propriedades de interação ligante/receptor (MACHAIDZE e MIKELADZE, 2001).

Após a realização do screening com as lectinas, foram selecionadas duas lectinas: a VGL e a CGL, a fim de avaliar as vias de sinalização das MAPKs e AKT. Sendo que, a VGL apresentou efeito neuroprotetor (“*ConBr-like*”) e a CGL não reverteu os efeitos citotóxicos do glutamato *in vitro*.

O glutamato induz apoptose em fatias de hipocampo e provoca uma diminuição da viabilidade celular por um mecanismo dependente da ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos e ativação da via  $p38^{MAPK}$  (MOLZ et al., 2008b). A proteína cinase  $p38^{MAPK}$  muitas vezes está relacionada ao estresse e morte celular (MIELK; HERDEGEN, 2000; COWAN; Storey, 2003). Portanto, nossos resultados concordam com essa possibilidade, e indicam que o glutamato induz morte celular e ativa  $p38^{MAPK}$ . Por outro lado, os resultados mostraram que a elevação na fosforilação de  $p38^{MAPK}$  e ERK1 dependente de glutamato não foi revertida por ConBr, mas foi pela lectina VGL, embora ambas desempenhem efeitos neuroprotetores. CGL não apresentou efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade glutamatérgica e também não alterou nenhuma das vias de sinalização incluindo ativação de AKT e/ou inibição da ativação de  $p38^{MAPK}$  ou ERK1. Estes dados em conjunto sugerem que no modelo estudado a modulação de  $p38^{MAPK}$  ou ERK1, diferente de PI3K/AKT, não sejam cruciais para determinar a neuroproteção pelas lectinas. Por fim, o glutamato não alterou a fosforilação de ERK2 e JNK1/2/3 o que indica o não envolvimento dessas vias na neurotoxicidade glutamatérgica no modelo utilizado.

A ativação de PI3K por fatores de crescimento iniciam uma cascata de eventos que ativa AKT, via fosforilação dos sítios Thr308 e Ser473 (Choudhari et al., 2007; Jing et al., 2012). Recentemente, Molz et al., 2011 mostraram que a guanosina protege as fatias hipocampais por um mecanismo que envolve a via PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  (Ser9), prevenindo a neurotoxicidade induzida por glutamato. Além disso, está bem estabelecido que a excitotoxicidade glutamatérgica diminui a ativação de PI3K/AKT e compostos neuroprotetores podem reverter este efeito (Chuang et al., 2011; Dal-Cim, et al., 2011; Lee et al, 2012; Sun et al., 2012). Nossos estudos com a ConBr, mostram que o glutamato induz a diminuição da fosforilação de AKT e ConBr reverte este efeito, da mesma maneira VGL também reverte o efeito do glutamato sobre a fosforilação de AKT. Uma ação não observada com CGL.

Confirmamos que ConBr exerce seu efeito neuroprotetor via AKT, utilizando o inibidor de PI3K, LY294002, que na presença deste, a lectina não reverte a perda da viabilidade celular induzida por glutamato. A partir desses resultados, seria interessante realizar futuramente o experimento utilizando o inibidor LY294002 e a lectina VGL, já que ela também reverteu a queda na fosforilação de AKT ocasionada pelo glutamato.

No presente estudo, nós demonstramos que assim como a ConBr, outras lectinas extraídas de plantas como a VGL, BBL e FTL previnem

a diminuição da viabilidade celular. Estes achados reforçam que estas lectinas apresentam efeito neuroprotetor contra a excitotoxicidade glutamatérgica. Embora os mecanismos envolvidos nessa neuroproteção não estejam totalmente elucidados, no caso da ConBr parece envolver a via de sinalização PI3K/AKT. Adicionalmente, deve ser considerado que os receptores NMDA são proteínas glicosiladas no domínio N-terminal extracelular, sendo possível sugerir que as lectinas exerçam sua atividade neuroprotetora bloqueando os receptores NMDA por um processo dependente da interação lectina com as cadeias de oligossacarídeos. Entretanto, mais estudos serão necessários para confirmar esta possibilidade.

## 7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- ConBr (lectina com afinidade por manose/glicose), VGL, Frutalina (FTL) e BBL (lectina com afinidade por galactose) são capazes de reverter de forma significativa a excitotoxicidade glutamatérgica *in vitro*, sugerindo um potencial neuroprotetor para essas lectinas frente à neurotoxicidade do glutamato. Diferentemente, a lectina CGL (com afinidade por manose/glicose) não reverteu de forma significativa a excitotoxicidade glutamatérgica, não demonstrando potencial neuroprotetor.
- As enzimas de sinalização ERK2 e JNK1/2/3 parecem não estar envolvidas na neurotoxicidade do glutamato sobre fatias hipocampais expostas *in vitro*.
- Glutamato aumenta a fosforilação de ERK1, entretanto ConBr não reverte este efeito, portanto a via de neuroproteção da ConBr, parece não depender de ERK1.
- Glutamato aumenta significativamente a fosforilação de p38<sup>MAPK</sup>, esses dados corroboram dados anteriores nesse modelo (MOLZ et al., 2008b) que indicam a ativação dessa via no modelo de neurotoxicidade do glutamato. Contudo, ConBr não reverte esse efeito, indicando que a neuroproteção de ConBr não se relaciona com a modulação de p38<sup>MAPK</sup>.
- Glutamato *in vitro* diminui de forma significativa a fosforilação de AKT e ConBr 10 µg/mL reverte este efeito.
- ConBr exerce seu efeito neuroprotetor *in vitro* de maneira depende da via PI3K/AKT, baseado na reversão da neuroproteção de ConBr pelo inibidor de PI3K, LY294002.
- A lectina VGL apresenta atividade neuroprotetora frente à neurotoxicidade glutamatérgica *in vitro*, e reverte todos os efeitos neuroquímicos provocados pelo glutamato como: aumento da fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> e ERK1, além da diminuição da fosforilação de AKT.

- A lectina CGL não reverte a neurotoxicidade do glutamato, nem seus efeitos relativos ao aumento na fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> e ERK1.



## 8. PERSPECTIVAS

- Realizar o Western blot das fatias hipocâmpais tratadas com o inibidor de PI3K (LY294002) e ConBr.
- Avaliar a atividade de PKA em resposta a exposição à ConBr *in vitro*.
- Utilizar inibidores específicos de MAPKs em fatias de hipocampo, no ensaio de viabilidade MTT para verificar o envolvimento da modulação dessas cascatas de sinalização pelo glutamato, tendo em vista a neurotoxicidade do glutamato e o aumento da fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> e ERK1 em fatias tratadas com glutamato 10mM.
- Caracterizar o possível envolvimento de receptores AMPA na resposta antidepressiva de ConBr.
- Caracterizar a ação neuroprotetora de ConBr e VGL contra a morte celular induzida por ácido quinolínico (necrótica e/ou apoptótica) no hipocampo.
- Determinar se VGL é capaz de proteger convulsões em modelos de convulsão induzida por ácido quinolínico.
- Determinar a modulação do estado de fosforilação das subunidades dos receptores NMDA e AMPA por ConBr e VGL.
- Estudar em modelo *in vivo* o efeito neuroprotetor de VGL administrada intracerebroventricular (i.c.v) frente à neurotoxicidade glutamatérgica.



## 9. REFERÊNCIAS

- AHMADIAN, G.; JU, W.; LIU, L.; WYSZYNSKI, M.; LEE, S.H.; DUNAH, A.W.; TAGHIBIGLOU, C.; WANG, Y.; LU, J.; WONG, T.P.; SHENG, M.; WANG, Y.T. Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD. *Embo J.* 23, 1040 – 1050, 2004.
- ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S. Lectin-induced nitric oxide production. *Cell Immunol.* 194, 98 – 102, 1999.
- AOUADI, M.; BINETRUY, B.; CARON, L.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; BOST, F. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie.* 88, 1091 – 1098, 2006.
- BARAUNA, S.C.; KASTER, M.P.; HECKERT, B.T.; DO NASCIMENTO, K.S.; ROSSI, F.M.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, A.L.; LEAL, R.B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacol. Biochem. Behavior.* 85, 160 – 169, 2006.
- BARBOSA, T.; ARRUDA S.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; DE FREITAS, L.A.; BARRAL-NETTO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribo. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96, 673 – 678, 2001.
- BERLIOCCHI, L.; BANO, D.; NICOTERA, P.  $Ca^{2+}$  signals and death programmes in neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360, 2255 – 2258, 2005.
- BJERRUM, O.J.; HEEGAARD, N.H. Has immunoblotting replaced electroimmunoprecipitation? Examples from the analysis of autoantigens and transglutaminase-induced polymers of the human erythrocyte membrane. *J Chromatogr.* 470, 351 – 367, 1989.
- BOEHM, S.; HUCK, S. Presynaptic inhibition by concavalin A: Are alpha-latrotoxin receptors involved in action potential-dependent transmitter release?. *J. Neurochem.* 71, 2421 – 2430, 1998.

BONFOCO, E.; KRAINC, D. ANKRAKRONA, M. D.; NICOTERA, P.; LIPTON, S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92, 7162 – 7166, 1995.

BRAZIL, D.P.; HEMMINGS, B.A. Ten years of protein kinase B signaling: a hard AKT to follow. *Trends Biochem Sci*. 26, 657 – 664, 2001.

BRAZIL, D.P.; YANG, Z.Z.; HEMMINGS, B.A. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci*. 29, 233 – 242, 2004.

CALVETE, J.J.; THOLE, H.H.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; ROCHA, I.M.A.; GUIMARÃES, F.N.; CAVADA, B.S. Molecular characterization and crystalization of Diocleinae lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1430, 367 – 375, 1999.

CARLEZON, W.A.; DUMAN, R.S.; NESTLER, E.J. The many faces of CREB. *Trends Neurosci*. 28, 436 – 445, 2005.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Current Protein and Peptides Science*. 2, 1 – 13, 2001.

CEDEÑO, N.; URBINA, M.; OBREGÓN, F.; LIMA, L. Characterization of serotonin transporter in blood lymphocytes of rats. Modulation by in vivo administration of mitogens. *J Neuroimmunol*. 159, 31 – 40, 2005.

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410, 37 – 40, 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*. 101, 2449 – 2476, 2001.

CHOI, D.W. Ionic Dependence of Glutamate Neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7, 369 – 379, 1987.

CHOI, D.W. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 23, 1261 – 1276, 1992.

CHOUDHARI, S.R.; KHAN, M.A.; HARRIS, G.; PICKER, D.; JACOB, G.S.; BLOCK, T.; SHAILUBHAI, K. Deactivation of Akt and STAT3 signaling promotes apoptosis, inhibits proliferation, and enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to an anticancer agent, Atiprimod. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 112 – 121, 2007.

CHU, C.T.; LEVINTHAL, D.J.; KULICH, S.M.; CHALOVICH, E.M.; DEFRANCO, D.B. Oxidative neuronal injury. The dark side of ERK1/2. *Eur J Biochem.* 271, 2060 –2066, 2004.

CHUANG, D.M.; WANG, Z.; CHIU, C.T. GSK-3 as a Target for Lithium-Induced Neuroprotection Against Excitotoxicity in Neuronal Cultures and Animal Models of Ischemic Stroke. *Front Mol Neurosci.* 4, 15, 2011.

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 p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Research.* 998, 65 – 72, 2004.

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

CULL-CANDY, S.; BRICKLEY, S.; FARRANT, M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 11, 327 – 335, 2001.

DAL-CIM, T.; MARTINS, W.C.; SANTOS, A.R.; TASCA, C.I. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. *Neuroscience.* 183, 212 – 220, 2011.

DE FREITAS PIRES, A.; ASSREUY, A.M.; LOPES, E.A.; CELEDÔNIO, N.R.; SOARES, C.E.; RODRIGUES, N.V.; SOUSA, P.L.; BENEVIDES, R.G.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S.; LEAL-CARDOSO, J.H.; COELHO-DE-SOUZA, A.N.; SANTOS, C.F. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. *Fundam Clin Pharmacol*. doi: 10.1111/j.1472-8206.2011.00987.x., 2011.

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

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

DI LELLA, S.; MARTÍ, M.A.; CROCI, D.O.; GUARDIA C.M.; DÍAZ-RICCI, J.C.; RABINOVICH, G.A.; CAMELO, J.J.; ESTRIN, D.A. Linking the structure and thermal stability of beta-galactoside-binding protein galectin-1 to ligand binding and dimerization. *Biochemistry*. 49, 7652 – 7658, 2010.

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

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; POENHEIMER, S.B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Elsevier*. 113, 236 – 247, 2010.

GONDA X. Basic pharmacology of NMDA receptors. *Curr Pharm Des*. 18, 1558 –1567, 2012.

GRANGEIRO, T.B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J.J.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETTO, M.; CAVADA, B.S. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Eur J Biochem*. 248, 43 – 48, 1997.

GRAZIOSO, G.; MORETTI, L.; SCAPOZZA, L.; DE AMICI, M.; DE MICHELI, C.

Development of a three-dimensional model for the N-methyl-D-aspartate NR2A subunit. *J Med Chem.* 48, 5489 – 5494, 2005.

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science.* 294, 1024 – 1030, 2001.

GURD, J.W. Glycoproteins of the synapse, in Neurobiology of Glycoconjugates (Margolis R. U. and Margolis R. K., eds), *Plenum Press*, New York. 219 – 242, 1989.

HANADA, M.; FENG, J.; HEMMING, B.A. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta.* 1697, 3 – 16, 2004.

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

HICKEY, M.A.; CHESSELET, M.F. Apoptosis in Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 27, 255 – 265, 2003.

HONG, E.J.; WEST, A.E.; GREENBERG, M.E. Transcriptional control of cognitive development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 21 – 28, 2005.

HUGHES, R.C. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1473, 72 – 85, 1999.

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

HUNTER, T.; SEFTON, B.M. Protein phosphorylation. Part A. *Methods in Enzymology*, 200, 1991.

IMAIZUNI, Y.; SAKAGUCHI, M.; MORISHITA, T.; ITO, M.; POIRIER, F.; SAWAMOTO, K.; OKANO, H. Galectin-1 is expressed in early-type neural progenitor cells and down-regulates neurogenesis in the adult hippocampus. *Molecular Brain*, 4 – 7, 2011.

JING, Y.; LIU, L.Z.; JIANG, Y.; ZHU, Y.; GUO, N.L.; BARNETT, J.; ROJANASAKUL, Y.; AGANI, F.; JIANG, B.H. Cadmium increases HIF-1 and VEGF expression through ROS, ERK, and AKT signaling pathways and induces malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Toxicological Sciences*. 125, 10 – 19, 2012.

KAJITANI, K.; NOMARU, H.; IFUKU, M.; YUTSUDO, N.; DAN, Y.; MIURA, T.; TSUCHIMOTO, D.; SAKUMI, K.; KADOYA, T.; HORIE, H.; POIRIER, F.; NODA, M.; NAKABEPPU, Y. Galectin-1 promotes basal and kainate-induced proliferation of neural progenitors in the dentate gyrus of adult mouse hippocampus. *Cell Death Differ*. 16, 417 – 27, 2009.

KANAI Y, HEDIGER MA. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol*. 479, 237 – 247, 2003.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. Princípios da Neurociência. 4ª Edição. São Paulo: Manole Ltda. 1430, 2003.

KIM, Y.; SEGER, R.; SURESH BABU, C. V.; HWANG, S. Y.; YOO, Y. S. A positive role of the PI3K/Akt signaling pathway in PC12 cell differentiation. *Mol Cells*. 18, 353 – 359, 2004.

KIM, E.K.; CHOI, E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1802, 396 – 405, 2010.

KIM, W.H.; PARK, W.B.; GAO, B.; JUNG, M.H. Critical role of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential in Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in human hepatocarcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 66, 1383 – 1396, 2004.

KIM, H.J.; LIM, S.S.; PARK, I.S.; LIM, J.S.; SEO, J.Y.; KIM, J.S. Neuroprotective Effects of Dehydroglyasperin C through Activation of Heme Oxygenase-1 in Mouse Hippocampal Cells. *J Agric Food Chem*. 60, 5583 – 5589, 2012.



LADERACH, D.J.; COMPAGNO, D.; TOSCANO, M.A.; CROCI, D.O.; DERGAN-DYLON, S.; SALATINO, M.; RABINOVICH, G.A. Dissecting the signal transduction pathways triggered by galectin-glycan interactions in physiological and pathological settings. *IUBMB Life*. 62, 1 – 13. 2010.

LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch* 460, 525 – 542, 2010.

LEE, S.; KIM, Y.; LI, E.; PARK, S. Ghrelin protects spinal cord motoneurons against chronic glutamate excitotoxicity by inhibiting microglial activation. *Korean J Physiol Pharmacol*. 16, 43 – 48, 2012.

LEKISHVILI, T.; HESKETH, S.; BRAZIER, M.W.; BROWN, D.R. Mouse galectin-1 inhibits the toxicity of glutamate by modifying NR1 NMDA receptor expression. *Eur J Neurosci*. 24, 3017 – 3025, 2006.

LEAL, R.B.; GONCALVES, C.A.; RODNIGHT, R. Calcium-dependent phosphorylation of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the rat hippocampus: a comparison of the kinase/phosphatase balance in immature and mature slices using tryptic phosphopeptide mapping. *Brain Research. Developmental Brain Research*. 104, 1 – 10, 1997.

LEAL, R.B.; FRIZZO, J.K.; TRAMONTINA, F.; FIEUW-MAKAROFF, S.; BOBROVSKAYA, L.; DUNKLEY, P.R.; GONÇALVES, C.A. S100B protein stimulates calcineurin activity. *Neuroreport*. 15, 317 – 320, 2004.

LEAL, R.B.; POSSER, T.; RIGON, A.P.; OLIVEIRA, C.S.; GONCALVES, C.A.; GELAIN, D.P.; DUNKLEY, P.R. Cadmium stimulates MAPKs and Hsp27 phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *Toxicology*. 234, 34 – 43, 2007.

LI, W.; YU, J.; XU, H.; BAO, J. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 414, 282 – 286, 2011.

LIAO, D.I.; KAPADIA, G.; AHMED, H.; VASTA, G.R.; HERZBERG, O. Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 91, 428 – 1432, 1994.

LIU Y.; PETERSON D.A.; KIMURA H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*. 69, 581 – 593, 1997.

LIN, S.S.; LEVITAN, I.B. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. *Trends Neurosci* 14, 273 – 277, 1991.

LIPTON, S.A.; ROSENBERG, P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med*. 330, 613 – 622, 1994.

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

LOPES, F.C.; CAVADA, B.S.; PINTO, V.P.; SAMPAIO, A.H.; GOMES, J.C. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins on the histamine release induced by plant lectins. *Braz J Med Biol Res*. 38, 935 – 941, 2005.

LOPEZ-LUCENDO, M.; SOLÍS, D.; ANDRÉ, S.; HIRABAYASHI, J.; KALTNER, H.; GABIUS H.; ROMERO, A. Growth-regulatory Human Galectin-1, Crystallographic Characterisation of the Structural Changes Induced by Single-site Mutations and their Impact on the Thermodynamics of Ligand Binding. *J. Mol. Biol*. 343, 957–970, 2004.

LYNCH, D.R.; GUTTMANN, R.P. Excitotoxicity: perspectives based on NMDA receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*. 300, 717 – 723, 2002.

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

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

MATUS A. I.; DEPETRIS S.; RAFF M.C. Mobility of concanavalin A receptors in myelin and synaptic membranes. *Nat. New Biol.* 244, 278 – 280, 1973.

MAYER, M.L.; L. VYKLIČKY JR. Concanavalin A selectively reduces desensitization of mammalian neuronal quisqualate receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1411, 1989.

MCBAIN, C.J.; MAYER, M.L. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev* 74, 723 –760, 1994.

McCUBREY, J.A.; LaHAIR, M.M.; FRANKLIN, R.A. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants & Redox Signaling.* 8, 1775 – 1789, 2006.

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

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

MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; DECKER, H.; TASCA, C.I. GMP prevents excitotoxicity mediated by NMDA receptor activation but not by reversal activity of glutamate transporters in rat hippocampal slices. *Brain Res.* 22, 113 – 120, 2008a.

MOLZ, S.; DECKER, H.; DAL-CIM, T.; CREMONEZ, C.; CORDOVA, F.M.; LEAL, R.B.; TASCA, C.I. Glutamate induced toxicity in hippocampal slices involves apoptotic features and - p38MAPK signaling. *Neurochem. Res.* 33, 27 – 36, 2008b.

MOLZ, S.; DAL-CIM, T.; BUDNI, J.; MARTÍN-DE-SAAVEDRA, M.D.; EGEA, J.; ROMERO, A.; DEL BARRIO, L.; RODRIGUES, A.L.; LÓPEZ, M.G.; TASCA, C.I. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3 $\beta$  pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. *J Neurosci. Res.* 89, 1400 – 1408, 2011.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis*: Isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum (Praha)*. 26, 113 – 120, 1984.

NAGAI, H.; NOGUCHI, T.; TAKEDA, K.; ICHIJO, H. Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 1 – 6, 2007.

NEDERGAARD M, TAKANO T, HANSEN AJ. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci.* 9, 748 – 755, 2002.

NISHIOKA, T.; SAKUMI, K.; MIURA, T.; TAHARA, K.; HORIE, H.; KADOYA, T.; NAKABEPPU, Y. FosB gene products trigger cell proliferation and morphological alteration with an increased expression of a novel processed form of galectin-1 in the rat 3Y1 embryo cell line. *J. Biochem.* 131, 653 – 661, 2002.

OBRENOVITCH, T.P.; URENJAK, J. Altered Glutamatergic Transmission in Neurological Disorders: From High Extracellular Glutamate to Excessive Synaptic Efficacy. *Progr. Neurobiol.* 51, 39 – 87, 1997.

OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J. Glutamate. In: Björklund A, Hökfelt T, eds. *Handbook of chemical neuroanatomy*. Vol 18. Amsterdam: Elsevier; 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.* 11, 1069 – 1082, 1993.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry.* 83, 346 – 356, 1977.

QU, W.S.; WANG Y.H.; MA, J.F.; TIAN, D.S.; ZHANG, Q.; PAN, D.J.; YU, Z.Y.; XIE, M.J.; WANG, J.P. WANG W. Galectin-1 attenuates astroglial-associated injuries and improves recovery of rats following focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 116, 217 – 226, 2011.

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

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

RAHN, K.A.; SLUSHER, B.S.; KAPLIN, A.I. Glutamate in CNS neurodegeneration and cognition and its regulation by GCPII inhibition. *Curr Med Chem.* 19, 1335 – 1345, 2012.

RAMBOURG, A.; LEBLOND, C.P. Electron microscope observations on the carbohydrate-rich cell coat present at the surface of cells in the rat. *J. Cell Biol.* 32, 27 – 53, 1967.

RIGON, A.P.; CORDOVA, F.M.; OLIVEIRA, C.S.; POSSER, T.; COSTA, A.P.; SILVA, I.G., SANTOS, D.A., ROSSI, F.M., ROCHA, J.B., LEAL, R.B. Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38 MAPK. *Neurotoxicology.* 29, 727 – 734, 2008.

ROSTOCK, M.; HUBER, R.; GREINER, T.; FRITZ, P.; SCHEER, R.; SCHUELER, J.; FIEBIG, H.H. Anticancer activity of a lectin-rich mistletoe extract injected intratumorally into human pancreatic cancer xenografts. *Anticancer Res* 25, 1969 – 1975, 2005.

ROTHSTEIN, J.D. Excitotoxicity hypothesis. *Neurology.* 47 (4 Suppl 2), S19 – 25, 1996.

RUSSI, M.A.; VANDRESEN-FILHO, S.; RIEGER, D.K.; COSTA, A.P.; LOPES, M.W.; CUNHA, R.M.; TEIXEIRA, E.H.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; TASCA, C.I.; LEAL, R.B. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. *Neurochem Res.* 37, 288 – 97, 2012.

SAKAGUCHI M.;TETSURO, S.; TAKUYA, S.; HIROTAKA, J.O.; MIEKO, S.; SATORU, I.; HIDEYUKI, O.; MIKIKO, N.G.H.; TOSHIHIKO, K.; HIDENORI, H.; AKIRA, S.; HIDEHIRO, M.; FRANCOISE, P.; HIROMITSU, N.; KAZUNOBU S.H,H;

HIDEYUKI, O. A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. *PNAS*. 103, 7112 – 7117, 2006.

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

SANACORA, G.; ZARATE, C.A.; KRYSTAL, J.H.; MANJI, H.K. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*. 7, 426 – 437. 2008.

SASAKI, T.; HIRABAYASHI, J.; MANYA, H.; KASAI, K.; ENDO, T. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. *Glycobiology*. 14, 357 – 363, 2004.

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

SCHENK, U.; MENNA, E.; KIM, T.; PASSAFARO, M.; CHANG, S.; DE CAMILLI, P.; MATTEOLI, M. A novel pathway for presynaptic mitogen-activated kinase activation via AMPA receptors. *J. Neurosc.* 25, 1654 – 1663, 2005.

SCHERER, W.J.; UDIN, S.B. Concanavalin A reduces habituation in the tectum of the frog. *Brain Res*. 405, 114 – 118, 1994.

SCHWARZSCHILD, M.A.; COLE, R.L.; HYMAN, S.E. Glutamate, but not dopamine, stimulates stress-activated protein kinase and AP-1-mediated transcription in striatal neurons. *J Neurosci*. 17, 3455 – 3466, 1997.

SEVERINO, P.C.; MULLER, GDO. A.; VANDRESEN-FILHO, S.; TASCA, C.I. Cell Signaling in NMDA preconditioning and neuroprotection in convulsions induced by quinolinic acid. *Review of Life Sci*. 89, 570 – 576, 2011.

SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, 131 – 136, 2002.

SIEGEL, G.J.; ALBERS R.W.; BRADY S.T.; PRICE, D.L. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects. 7th Edition. Londres: Elsevier Academic Press, 2006. 1016 p.

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

SUBRAMANIAM, S.; UNSICKER, K. Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. *Neuroscience.* 138, 1055 – 1065, 2006.

SUN, C., WANG, D., ZHENG, W. Hydrogen peroxide attenuates the pro-survival signaling of insulin-like growth factor-1 through two pathways. *Neuroreport.* doi: 10.1097/WNR.0b013e328356f78a, 2012.

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

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

SWEATT, J.D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol.* 14, 1 – 7, 2004.

THOMAS, G.M.; HUGANIR, R.L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Reviews. Neuroscience.* 5, 173 – 183, 2004.

VARA J.A.K.; CASADO, E.; CASTRO, J. DE, CEJAS, P.; BELDA-INIESTA, C.; GONZÁLEZ-BARÍN, M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat ver.* 30, 193 – 204, 2004.

VAN DER HEIDE, L.P.; RAMAKERS, G.M.; SMIDT, M.P. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. *Prog Neurobiol.* 79, 205 – 221, 2006.

WAETZIG, V., HERDEGEN, T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. *Neurosci Lett.* 361, 64 – 67, 2004.

WANG, J., GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K. Kinases and phosphatases and tau sites involved in Alzheimer neurofibrillary degeneration. *European J. Neurosci.* 25, 59 – 68, 2007.

WAYMAN, G.A.; IMPEY, S.; MARKS, D.; SANEYOSHI, T.; GRANT, W.F.; DERKACH, V.; SODERLING, T.R. Activity-dependent dendritic arborization mediated by CaM-kinase I activation and enhanced CREB-dependent transcription of Wnt-2. *Neuron.* 50, 897 – 909, 2006.

WAXMAN, E.A.; LYNCH, D.R. N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist.* 11, 37 – 49, 2005.

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

WONG, W.; SCOTT, J.D. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 959 – 970, 2004.

YAMANE, J.; NAKAMURA, M.; IWANAMI, A.; SAKAGUCHI, M.; KATO, H.; YAMADA, M.; MOMOSHIMA, S.; MIYAO, S.; ISHII, K.; TAMAOKI, N.; NOMURA, T.; OKANO, H.J.; KANEMURA, Y.; TOYAMA, Y.; OKANO, H. Transplantation of galectin-1 expressing human Neural Stem Cells into injured spinal cord of adult common marmosets. *Journal of Neuroscience Research.* 88, 1394 – 1405, 2010.

YANG, D.D.; KUAN, C.Y.; WHITMARSH, A.J.; RINCON, M.; ZHENG, T.S.; DAVIS, R.J.; RAKIC, P.; FLAVELL, R.A. Absence of excitotoxicity induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature.* 389, 865 – 870, 1997.

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