

Débora Kurrle Rieger Venske

**MECANISMOS NEUROQUÍMICOS ASSOCIADOS À AÇÃO
ANTIDEPRESSIVA E NEUROPROTETORA DA LECTINA
ISOLADA DAS SEMENTES DE *CANAVALIA BRASILIENSIS*
(ConBr).**

Tese submetida ao Programa de Pós
Graduação em Bioquímica da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Doutora em
Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy
Leal

Florianópolis
2014

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

Venske, Débora Kurrle Rieger

Mecanismos neuroquímicos associados à ação antidepressiva e neuroprotetora da lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr). / Débora Kurrle Rieger Venske ; orientador, Rodrigo Bainy Leal - Florianópolis, SC, 2014.

166 p.

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

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Lectinas. 3. ConBr. 4. Neuroproteção. 5. Depressão. I. Leal, Rodrigo Bainy. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

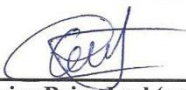
“Mecanismos neuroquímicos associados à ação antidepressiva e neuroprotetora da lectina purificada das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr)”

por

DÉBORA KURLLE RIEGER VENSKE

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 012/PPGBQA/2014) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:



Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal (BQA/CCB/UFSC)

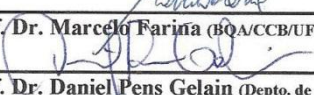
Banca examinadora:



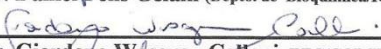
Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves (Depto. de Bioquímica/ICBS/UFGRS)



Prof. Dr. Marcelo Farina (BQA/CCB/UFSC)



Prof. Dr. Daniel Pens Gelain (Depto. de Bioquímica/ICBS/UFGRS)



Prof. Dr. Giordano Vosgrau Calloni (BEG/CCB/UFSC)



Profa. Dra. Carla Inês Tasca (BQA/CCB/UFSC)

Coordenador:



Prof. Dr. Carlos Peres Silva
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 14 de abril de 2014.

Dedico este trabalho a minha família.
Aos meus pais, Sônia e Rubem Rieger,
minhas irmãs Priscila e Dâmaris e ao
meu marido José Carlos Venske.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Rodrigo Bairy Leal, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por todos os momentos de conversa e aprendizado, pela amizade e pelo excelente churrasco!

Aos colegas e amigos do Laboratório Neuroquímica III-Transdução de Sinal no SNC, Mark, Filipe, Tanara, Helena, Sabrina, Fabiano, Michael, Daniela, Mariana, e especial a minha “dupla” e amiga Ana. Agradeço pela amizade, companheirismo, conversas, risadas e bom momentos, vocês são muito importantes para mim!

Ao Professor Benildo S. Cavada e toda sua equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela ConBr!! Mais mais do que isso, agradeço pelo apoio em todas as fases deste trabalho.

À professora Ana Lúcia Severo Rodrigues e aos colegas do Laboratório de Neurobiologia da Depressão, em especial a Josiane Budni e Morgana Moretti pela ajuda na realização dos experimentos comportamentais, pelas idéias e troca de conhecimento e pelas conversas descontraídas.

A professora Carla Inês Tasca, e a “galera do laboratório da frente”, em especial a Tharine Dal-Cin, agradeço pelas “trocas” ...de ideias, de risadas, de café, de reagentes.

Aos demais professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e aos funcionários do biotério central da UFSC o meu muito obrigada.

A Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa de Santa Catarina (FAPESC) pelo apoio financeiro e ao Departamento de Bioquímica da UFSC, por possibilitarem a realização deste trabalho e proporcionarem um ambiente excelente de estudo e aprendizado.

Agradeço também à Profa. Manuela G. López, pela orientação do doutorado sanduíche realizado em seu laboratório na Universidade

Autônoma de Madri. Aos amigos do laboratório 3, Elisa, Izas, Esther, Vanessa Javi, Daniel, e laboratório 8 Rafael, Laura, Javi por el aprendizaje, la risa, por enseñarme las grandes canciones en español, por las cañas, me “encantou mucho” haber trabajado con usted, muchas gracias por todo!

Ao meu Marido Carlinhos, pela paciência, por me esperar sempre, pela cumplicidade. Obrigada pelo teu amor.

A minha Família, meus pais Rubem e Sônia e minhas irmãs Priscila e Dâmaris. Pelo amor incondicional, pelo apoio constante, amo vocês mais hoje do que ontem.

Aos amigos de perto e de longe, pela torcida, pelas orações e pelo ouvido amigo.

A Deus, grande responsável pela minha existência, e por guiar a minha vida.

"Mire e veja: o mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas [...]"

Grande Sertão Veredas,
Guimarães Rosa

RESUMO

As lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam reversivelmente a carboidratos ligados a proteínas e lipídeos. ConBr é uma lectina purificado a partir das sementes de *Canavalia brasiliensis* com afinidade por manose/glucose. Previamente mostramos que ConBr injetada i.c.v. pode produzir uma ação do tipo antidepressiva similar a fluoxetina. ConBr também apresenta efeito neuroprotetor contra a excitotoxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo e em modelo de convulsões induzidas por ácido quinolínico. No presente estudo investigamos o envolvimento do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e da via L-arginina-óxido nítrico (NO·) na ação tipo antidepressiva de ConBr no teste do nado forçado (TNF). Para esse objetivo, camundongos machos adultos foram pré-tratados com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v.), D-serina (30 mg/sítio, i.c.v. co-agonista de receptores NMDA), L-arginina (750 mg/kg, i.p. precursor de NO·) e sildenafil (5 mg/kg, i.p. inibidor de fosfodiesterase isoforma 5), os tratamentos bloquearam o efeito antidepressivo de ConBr. Do mesmo modo, a administração de ConBr em uma dose sub-ativa (0,1 µg/sítio, i.c.v.) combinada com doses sub-ativas de antagonistas de receptores NMDA, MK-801 (0,001 mg/kg, i.p.) e cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) ou do inibidor da guanilato ciclase solúvel, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; 30 pmol/sítio, i.c.v.) foram capazes de produzir um efeito sinérgico do tipo antidepressivo. Esses resultados sugerem que o efeito antidepressivo de ConBr no TNF envolve a inibição do receptor NMDA, a redução de NO· e diminuição da síntese de GMPc. Adicionalmente, realizamos um estudo sistemático de vias de sinalização intracelular reguladas por ConBr e que podem estar associadas com os efeitos antidepressivos e neuroprotetores. ConBr (10 µg/sítio) foi injetada no ventrículo lateral (i.c.v.) de camundongos e os hipocampos foram retirados 0,5, 1, 3, 6, 8, 12, 18 e 24 h após o tratamento para análise por Western Blot e qRT-PCR. Os resultados mostraram que ConBr induziu a ativação das proteínas cinases Akt, ERK1 e PKA, bem como induziu aumento da fosforilação de CREB e da expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Esses dados sugerem que a ativação destas vias poderia estar envolvida nos efeitos neuroprotetores e antidepressivos de ConBr. Por fim, avaliamos o potencial neuroprotetor de ConBr em um modelo de isquemia utilizando culturas organotópicas hipocampais (COH) submetidas a privação de oxigênio e glicose (POG). O tratamento com ConBr (0,1 µg/mL), preveniu a morte celular, reverteu o estresse oxidativo e impediu a redução na fosforilação de Akt e ERK1 induzidos por POG. Em culturas primárias de neurônios hipocampais,

utilizando a sonda fluorescente Fluo-4/AM, ConBr bloqueou a entrada de Ca^{2+} dependente da despolarização por K^+ . Corroborando com este dado COHs submetidas a POG foram coincubadas com doses sub-ativas de ConBr e nifedipina, um inibidor dos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes (CCDV) do tipo L. Os resultados demonstraram um efeito sinérgico de nifedipina e ConBr na redução da morte celular provocada por POG, sugerindo os CCDV como alvo do mecanismo neuroprotetor do ConBr. Dessa forma, em conjunto os resultados indicam a aplicação de lectinas de plantas como estratégia para neuroproteção e modulação da neuroplasticidade através da regulação de glicoproteínas da superfície celular e regulação da sinalização intracelular.

Palavras-chave: ConBr. Lectinas. Depressão. Isquemia. NMDA. CREB. BDNF. Neuroproteção. Canais de cálcio.

ABSTRACT

Lectins are proteins that recognize and reversibly bind to carbohydrates attached to proteins and lipids. ConBr is a lectin purified from *Canavalia brasiliensis* seeds that displays high affinity for mannose/glucose. We have previously shown that ConBr produced antidepressant-like effect and blocked hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid and glutamate. The present study was undertaken to investigate the involvement of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and the L-arginine-nitric oxide (NO·) pathway in the antidepressant-like action displayed by ConBr in the forced swimming test (FST). Moreover, it was evaluated the intracellular signaling pathways regulated by ConBr that could be potentially associated with the antidepressant and neuroprotective effects. Finally, neuroprotective activity of ConBr was analysed in a model of ischemia *in vitro* using organotypic hippocampal cultures (OHCs) submitted to oxygen/glucose deprivation (OGD). With the aim of verifying the involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like effect of ConBr (10 µg/site, i.c.v.), a pretreatment with NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.), D-serine (30 µg/site, i.c.v.), L-arginine (750 mg/kg, i.p.) or sildenafil (5 mg/kg, i.p.) was carried out. The results show that all treatments blocked the effect of ConBr. Furthermore, the coadministration of subeffective doses of MK-801 (0.001 mg/kg, i.p.), ketamine (0.1 mg/kg, i.p.) or 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; 30 pmol/site, i.c.v.) and ConBr (0.1 µg/site, i.c.v.), produced a synergistic antidepressant-like effect in the FST. Taken together, the results suggest that the antidepressant-like effect of ConBr involves NMDA receptor inhibition, reduction in NO· and cGMP synthesis. In order to elucidate intracellular signaling pathways regulated by ConBr that may be potentially associated with the antidepressant and neuroprotective effects previously reported, ConBr (10 µg/site) was injected into the ventricle (i.c.v.) of mice, and the hippocampi were removed 0.5, 1, 3, 6, 8, 12, 18 and 24 h after treatment. Our results indicate that centrally administered ConBr is able to activate the hippocampal neurotrophic pathway PKA/Akt/ERK1-CREB(Ser133)-BDNF, suggesting that these signaling pathways might be involved in the neuroprotective and antidepressant-like effects of ConBr. Finally, the potential neuroprotective activity of ConBr was assessed in OHCs submitted to OGD for 15 min, followed by 24 h of recovery when cell viability and neurochemical parameters were analyzed. In addition, the ability of ConBr to modulate intracellular Ca²⁺ was evaluated by a Ca²⁺-sensitive fluorescent dye (Fluo-4/AM) in primary cultures of

hippocampal neurons. Treatment with ConBr (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) prevented cell death, mitigated the oxidative stress and prevented the reduction of Akt and ERK1 phosphorylation induced by OGD. Furthermore, ConBr blocked K^+ -induced Ca^{2+} entrance in hippocampal neurons. To examine the role of voltage dependent Ca^{2+} channels (VDCC) in the neuroprotective effect of ConBr, OHCs subjected to OGD were submitted to a coincubation of sub-effective doses of ConBr and nifedipine, an inhibitor of L-type VDCC. The results showed a synergistic effect of nifedipine plus ConBr counteracting the impairment of cell viability induced by OGD, suggesting VDCC as a target of neuroprotective mechanism of ConBr. These results corroborate with previous data that indicate the application of plant lectins for neuroprotective strategies through the regulation of cell surface glycoproteins and intracellular signaling.

Keywords: ConBr. Lectins. Depression. Ischemia. NMDA. CREB. BDNF. Neuroprotection. Calcium channel.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Leguminosa <i>Canavalia brasiliensis</i> (Feijão Bravo do Ceará).....	32
Figura 2. Estrutura global do tetrâmero de ConBr	33
Figura 3. Síntese de óxido nítrico e a via da L-arginina-NO·GMPc.....	37
Figura 4. Cascata de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos.....	40
Figura 5. Eventos celulares envolvidos na regulação de CREB	43
Figura 6. Visão simplificada dos mecanismos fisiopatológicos na isquemia	46

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 7. Representação esquemática dos tratamentos e cronograma dos testes comportamentais.....	60
Figura 8. Representação esquemática do protocolo de análises por Western Blot e qRT PCR.....	63
Figura 9. Representação esquemática do protocolo de POG.....	70

CAPÍTULO I

Figura 10. Efeito antidepressivo de ConBr no TNF.....	80
Figura 11. O efeito antidepressivo de ConBr depende de suas propriedades estruturais e de sua interação com o CRD.....	81
Figura 12. Envolvimento dos receptores NMDA no mecanismo antidepressivo de ConBr no TNF.....	82
Figura 13. Efeito antidepressivo sinérgico de ConBr com antagonistas do receptor de NMDA, MK-801 e cetamina.....	83
Figura 14. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico (NO·) e GMPc no efeito antidepressivo de ConBr.....	84
Figura 15. Efeito antidepressivo de ConBr no TNF envolve a via NO·-GMPc.....	85

CAPÍTULO II

Figura 16. ConBr estimula a atividade PKA e Akt em tempos iniciais após injeção i.c.v.	90
Figura 17. ConBr estimula a fosforilação de ERK1 nos tempos iniciais após injeção i.c.v.	92
Figura 18. ConBr estimula a fosforilação de CREB no hipocampo.....	94
Figura 19. ConBr estimula a expressão de BDNF e TrkB (mRNA).....	95
Figura 20. ConBr aumenta o conteúdo de BDNF (proteína) nos tempo mais tardios, após administração i.c.v.	96

Figura 21. ConBr aumenta fosforilação de Akt nos tempo mais tardios, após administração i.c.v.	97
Figura 22. Tratamento com inibidores de PI3K e PKA aboliu o aumento no conteúdo de BDNF provocado por ConBr.....	98
Figura 23. Tratamento com o inibidor de TrkB aboliu o aumento na fosforilação de Akt provocado por ConBr.....	100
CAPITULO III	
Figura 24. Tratamento com ConBr protege COHs contra morte celular induzida por POG/Reox.	106
Figura 25. ConBr reduz a produção de EROs e a despolarização mitocondrial de COHs submetidos à POG/Reox.	108
Figura 26. ConBr reverte a diminuição na fosforilação de Akt e ERK-1 induzida por POG.	109
Figura 27. ConBr bloqueia o aumento de $[Ca^{2+}]_c$ induzido pela despolarização por potássio em neurônios hipocampais de ratos.....	111
Figura 28. Doses subativas de ConBr e nifedipina apresentam um efeito protetor sinérgico contra a morte celular induzida por POG.	112
DISCUSSÃO	
Figura 29. ConBr pode produzir uma atividade tipo antidepressiva via inibição de NMDA e da via L-arginina/NO-/GMPC.....	117
Figura 30. ConBr induz a expressão de BDNF no hipocampo.....	121
Figura 31. ConBr induz neuroproteção contra POG.	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fabricante, número de catálogo e diluição dos anticorpos utilizados para western blot.....	67
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA - Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
AMPc - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA - Análise de variância
AQ - Ácido quinolínico
ATP - Trifosfato de adenosina
BBB - Barreira hematoencefálica
BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo
BSA - Albumina
CaM - Calmodulina
CaMKII - Proteína cinase cálcio calmodulina dependente II
CAMKs - Proteínas cinases cálcio calmodulina dependentes
CAT - Catalase
CCDV - Canais de cálcio dependentes de voltagem
cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar
COH - Cultivo organotípico hipocampal
ConA - Concanavalina A, lectina extraída das sementes de *Canavalia ensiformis*
ConBr - Lectina extraída das sementes de *Canavalia brasiliensis*
CRD - Domínio de reconhecimento de carboidrato
CRE - Elemento de resposta ao AMP cíclico
CREB - Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico
D.O. - Densidade óptica
DAG - Diacilglicerol
DAT - Transportadores de dopamina
DNA - Ácido desoxirribonucleico
ERK - Cinase regulada por sinal extracelular
ERNs - Espécies reativas ao nitrogênio
EROs - Espécies reativas ao oxigênio
GABA - Ácido γ -aminobutírico
Gal-1 - Galectina-1
GMPc - Guanosina monofosfato cíclico
GPx - Glutaciona peroxidase
H₂O₂ - Peroxido de hidrogênio
HBSS - Solução equilibrada de sais de Hank's
HEPES - ácido n-2-hidroxietilpiperazina
i.c.v. - Intracerebroventricular
i.p. - Intraperitoneal
IL-10 - Interleucina 10
IL-1 β - Interleucina 1 β

iMAO - Inibidore da monoamina oxidase
IP - Iodeto de propídeo
IRSN - Inibidor seletivo da recaptção de noradrenalina
ISRS - Inibidor seletivo da recaptção de serotonina
JNK - c-Jun cinase amino-terminal
LTD - Depressão de longa duração
LTP - Potenciação de longa duração
MAPKK - Cinase da MAP cinase
MAPKKK - Cinase da cinase da MAP cinase
MAPKs - Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MKPs - Fosfatases das MAP cinases
MM9 - Metaloproteinase 9
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
nAChRs - Receptores nicotínicos de acetilcolina
NADP - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NGF - Fator de crescimento do nervo
NMDA - N-metil-D-aspartato
NO· - Óxido nítrico
NOS - Óxido nítrico sintase
O₂· - Ânion superóxido
p.o.- per oral (via oral)
p75NTR - Receptor neurotrófico p75
PDE - Fosfodiesterase
PI3K - Fosfatidilinositol 3 cinase
PKA - Proteína cinase A
PKB - Proteína cinase B
PKC - Proteína cinase C
PKG - Proteína cinase G
PMSF - Fluoreto de sulfonilmetilfenil
POG - Privação de oxigênio e glicose
PP1 - Proteína fosfatase 1
PP2B - Proteína fosfatase 2B
qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
RSK - Cinase ribossomal s6
rtPA - Ativador do plasminogênio tecidual recombinante
SAPKs - Proteínas cinases ativadas por estresse
SDS - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SEM - Erro padrão da média
SFB - Soro fetal bovino
sGC - Guanilato ciclase solúvel

SNC - Sistema nervoso central
SOD - Superóxido dismutase
TBS - Solução salina tamponada com Tris
TBS-T - Solução Salina Tamponada com Tris e Tween
TCA - Teste do campo aberto
TNF - Teste do nado forçado
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TrkB - Receptor tirosina cinase relacionado a tropomiosina B
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Glicosilação	25
1.1.1 Glicosilação no sistema nervoso central (SNC)	26
1.2 As lectinas.....	27
1.2.1 Lectinas presentes no organismo dos mamíferos	28
1.2.2 Galectinas	28
1.2.2.1 Galectina 1	29
1.2.3 Lectinas de Plantas	30
1.2.3.1 Lectina da semente de <i>Canavalia ensiformis</i> , Concanavalia A (ConA)	31
1.2.3.2 Lectina obtida das sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr)	31
1.2.3.3 Efeitos de ConBr sobre o SNC	34
1.3 Depressão.....	34
1.3.1 Sistema Glutamatérgico na depressão	35
1.3.2 Via L-arginina-Óxido Nítrico-GMPc na depressão	36
1.4 Sinalização Celular	38
1.4.1 Sistema de transdução de sinal a partir de receptores acoplados a proteínas G	38
1.4.2 Proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPKs)	39
1.4.3 Via da Fosfatidilinositol-3 cinase/Akt (PI3K/Akt)	41
1.4.4 Sinalização celular dependente de Ca²⁺	41
1.4.5 Ativação do Fator de transcrição CREB	42
1.4.6 Fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF)	44
1.5 Isquemia.....	44
1.5.1 Excitotoxicidade e Isquemia cerebral	46
1.5.2 Isquemia cerebral e estresse oxidativo	47
1.5.3 Isquemia cerebral e inflamação	48
1.5.4 Isquemia cerebral e a integridade da barreira hematoencefálica	48
1.5.5 Isquemia cerebral e plasticidade do cérebro	49
1.5.6 Modelos <i>in vitro</i> de isquemia	50
2 JUSTIFICATIVA	53
3 OBJETIVOS	55
3.1 Objetivo Geral	55

3.2 Objetivos Específicos	55
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
4.1 Purificação da lectina ConBr	57
4.2 Bloqueio domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) e desnaturação de ConBr.....	57
4.3 Experimentos <i>in vivo</i> :	57
4.3.1 Animais.....	57
4.3.2 Injeções intracerebroventriculares (i.c.v.).....	57
4.3.3 CAPÍTULO I:	58
4.3.3.1 Drogas e tratamento	58
4.3.3.2 Teste do Campo Aberto (TCA)	61
4.3.3.3 Teste do nado forçado (TNF)	61
4.3.3.4 Análise estatística	62
4.3.4 CAPITULO II:.....	62
4.3.4.1 Químicos	62
4.3.4.2 Administração de ConBr	62
4.3.4.3 Preparação das amostras	64
4.3.4.4 Tratamento com inibidores	64
4.3.4.5 Western blotting	65
4.3.4.6 Isolamento de RNA total	67
4.3.4.7 qRT-PCR	67
4.3.4.8 Análise estatística	68
4.4 Experimentos <i>in vitro</i> :	68
4.4.1 Animais.....	68
4.4.2 Químicos.....	69
4.4.3 Preparação das culturas organotípicas de hipocampo (COH).....	69
4.4.4 Tratamento dos COH.....	69
4.4.5 Privação de oxigênio e glicose (POG).....	70
4.4.6 Determinação da morte celular por Iodeto de Propídio.....	71
4.4.7 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m)	71
4.4.8 Avaliação da produção de EROs.....	71
4.4.9 Western Blotting	72
4.4.10 Cultura primária de neurônios hipocampais de ratos	72
4.4.11 Medição de Ca^{2+} intracelular em neurônios hipocampais de ratos ..	73

4.4.12	Análise estatística.....	73
5	RESULTADOS.....	75
5.1	CAPÍTULO I.....	77
5.1.1	Efeito da administração de ConBr no tempo de imobilidade dos animais no TNF e na atividade locomotora no TCA em camundongos	79
5.1.2	Ações da Lectina ConBr desnaturada e conjugada a manose no tempo de imobilidade dos animais no TNF e na atividade locomotora no TCA em camundongos.....	81
5.1.3	Envolvimento dos receptores NMDA no efeito do tipo antidepressivo de ConBr.....	82
5.1.4	Envolvimento da via L-arginina-NO·-GMPc no efeito antidepressivo de ConBr no TNF e na atividade locomotora no TCA em camundongos ...	84
5.2	CAPITULO II.....	87
5.2.1	Análise da fosforilação de PKA, Akt e CaMKII no hipocampo de camundongos nos tempos iniciais (05-6 h) após tratamento com ConBr	89
5.2.2	Análise da ativação de MAPKs no hipocampo de camundongos nos tempos iniciais (0,5-6 h) após tratamento com ConBr	91
5.2.3	Análise da ativação de CREB no hipocampo de camundongos 1, 3, 6 e 8 h após tratamento com ConBr	93
5.2.4	Análise da expressão de BDNF e TrkB no hipocampo de camundongos 1, 6, 12 e 24 h após tratamento com ConBr	94
5.2.5	Análise da expressão da proteína BDNF no hipocampo de camundongos 8, 18 e 24 h após tratamento com ConBr	95
5.2.6	Análise da ativação de ERK e Akt no hipocampo de camundongos 18 e 24h após tratamento com ConBr	96
5.2.7	Efeito do tratamento com os inibidores H-89 ou LY294002 no aumento da expressão da proteína BDNF no hipocampo de camundongos 24 h após tratamento com ConBr	97

5.2.8 Efeito do tratamento com o inibidor K252a no aumento da fosforilação de Akt no hipocampo de camundongos 24 h após tratamento com ConBr....	99
5.3 CAPÍTULO III	101
5.3.1 Efeitos da ConBr sobre a viabilidade celular de COH submetidas a POG/Reox.....	103
5.3.2 Efeitos de ConBr sobre a produção de EROs e a perturbação do potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) em COHs submetido a POG/Reox.....	105
5.3.3 Efeitos de ConBr sobre as vias de sinalização relacionados com neuroproteção	106
5.3.4 Efeito de ConBr na elevação de $[Ca^{2+}]_c$ induzida por potássio e glutamato em neurônios do hipocampo	108
5.3.5 Papel da modulação dos CCDV no efeito neuroprotetor de ConBr no modelo de POG/Reox.	109
6 DISCUSSÃO	111
7 CONCLUSÕES	125
8 PERSPECTIVAS	127
9 BIBLIOGRAFIA	129
10 ANEXOS	155
<i>10.1 Anexo 1: Artigo Aceito para publicação na revista <i>Pharmacology Biochemistry and Behavior</i>.</i>	<i>155</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Glicosilação

A glicosilação é uma das mais comuns e mais complexas formas de modificação pós-tradução de proteínas e lipídeos. Através do processo de glicosilação são produzidos diferentes tipos de glicanos (ou glicoconjugados). Glicanos, aqui referidos como monossacarídeos, oligossacarídeos, e polissacarídeos livres ou ligados a proteínas e lipídeos. Os glicanos são um dos quatro componentes básicos das células e constituem os mais abundantes e diversificados biopolímeros da natureza (Ohtsubo e Marth, 2006).

A glicosilação de proteínas forma glicanos do tipo N-glicanos, O-glicanos e glicosaminoglicanos (conhecidos como proteoglicanos). N-glicanos são ligados a resíduos de asparagina das proteínas, enquanto que os O-glicanos são ligados a serina e treonina (Schachter, 2000; Yan e Lennarz, 2005). Embora os glicosaminoglicanos também estejam ligados a serina e treonina, são produzidos por diferentes vias biossintéticas, e são muitas vezes sulfatados (Esko e Selleck, 2002). Glicosilação de lipídeos também é uma forma de modificação pós-tradução bastante prevalente, através da qual se formam os glicolipídeos. Esta variedade de estruturas de sacarídeos complexos é regulada pela atividade das enzimas glicosiltransferases e glicosidases, que atuam sequencialmente determinando a "assinatura de glicosilação" de diferentes células e tecidos (Spiro, 2002).

A multiplicidade de papéis que os carboidratos e seus glicoconjugados apresentam nos processos biológicos tem estimulado o crescente número de estudos na área de glicobiologia, principalmente para determinar a natureza de suas interações em condições fisiológicas, bem como em condições patológicas (Lis e Sharon, 1993; Kleene e Schachner, 2004; Dube e Bertozzi, 2005; Ohtsubo e Marth, 2006; Ghazarian *et al.*, 2010).

Glicanos presentes em glicoconjugados participam de muitos mecanismos celulares. Uma das funções iniciais da glicosilação de uma proteína é dirigir esta proteína para a sua localização subcelular apropriada, por exemplo, muitas proteínas lisossômicas contêm uma unidade de manose, que funciona como uma molécula de sinalização para o lisossoma (Varki e Kornfeld, 1980). Os glicanos também desempenham um papel essencial em muitos processos fisiológicos como adesão célula-célula, crescimento celular (Kariya e Gu, 2011), fertilização (Dell *et al.*, 1999), infecção por parasitas (Fauquenoy *et al.*, 2011) e interação de receptores e seus ligantes, interferindo assim na

transdução do sinal e na modulação do desenvolvimento de vários sistemas (Cobb e Kasper, 2005). Alterações no padrão de glicosilação podem ocorrer em diversas patologias inclusive no câncer, onde as células cancerosas frequentemente exibem diferenças nos níveis e estrutura dos glicanos expressos na superfície celular em relação às células normais (Ghazarian *et al.*, 2010). Desta forma, a glicosilação aberrante de proteína está relacionada com muitas doenças, incluindo doenças neurodegenerativas (Saez-Valero *et al.*, 2003).

1.1.1 Glicosilação no sistema nervoso central (SNC)

No SNC os glicanos têm sido reconhecidos como participantes das interações celulares, desempenhando atividades regulatórias em diversos níveis. Receptores para proteínas de matriz extracelular, receptores para fatores neurotróficos, receptores glutamatérgicos, transportadores de neurotransmissores e canais iônicos possuem natureza glicoprotéica e as cadeias de açúcares presentes nestas proteínas parecem estar envolvidas em diversas funções nas células neuronais, tais como: migração celular, crescimento de neuritos e fasciculação, formação de sinapses e sua estabilização, modulação da eficácia sináptica e da neuroplasticidade (Kleene e Schachner, 2004; Ghazarian *et al.*, 2010). A importância de glicanos para o sistema nervoso é destacado por doenças congênitas de glicosilação, que resultam em dificuldades psicomotoras, retardo mental e outros sintomas neuropatológicos (Kleene e Schachner, 2004).

Muitos estudos demonstram que a glicosilação é importante para a função de receptores de neurotransmissores. As cadeias laterais de oligossacarídeos presentes nestes receptores participam ou afetam uma grande variedade das suas funções, modulando as interações entre receptores e seus ligantes, a montagem correta das subunidades do receptor na membrana, seu transporte intracelular e a sua expressão na superfície celular, a proteção contra proteases, o reconhecimento célula-célula e outras interações proteína-proteína (Martin, 2002).

Através do uso de inibidores de N-glicosilação como a tunicamicina ou a mutagênese direta dos sítios de glicosilação nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) foi demonstrado que N-glicanos presentes nas subunidades do nAChRs são importantes para a estabilidade do receptor na membrana (Merlie *et al.*, 1982; Ramanathan e Hall, 1999; Nishizaki, 2003). Em um estudo estrutural do receptor nAChR, foi demonstrado que os resíduos de açúcares presentes na estrutura do receptor participavam da ligação com a α -bungarotoxina, uma toxina moduladora do receptor (Dellisanti *et al.*, 2007).

Sinapses glutamatérgicas excitatórias no cérebro também foram estudadas quanto a importância da glicosilação. Ambos receptores, AMPA (Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) e NMDA (N-metil-D-aspartato) apresentam vários sítios de glicosilação (Everts *et al.*, 1997). Também nestes receptores a inibição da glicosilação apresenta um efeito sobre a expressão na superfície celular de algumas subunidades dos receptores (NR1, em particular). Além disso, o papel da glicosilação na atividade do receptor de NMDA tem sido relatado em estudos onde o tratamento com tunicamicina causou uma redução significativa da amplitude das correntes de excitação e aboliu as correntes evocadas por glutamato (Everts *et al.*, 1997).

As cadeias de glicano também desempenham um papel essencial na atividade de transportadores como o transportador de dopamina (DAT), uma vez que a ausência de cadeias de glicanos no DAT reduziu a sua atividade e alterou a sua sensibilidade para a inibição (Li *et al.*, 2004).

Portanto, compreender o papel funcional dos glicanos e suas interações poderá aprimorar nosso conhecimento sobre os eventos envolvidos na sinalização do SNC, e estes podem se tornar novos alvos para intervenções no tratamento de doenças (Kleene e Schachner, 2004; Ohtsubo e Marth, 2006).

1.2 As lectinas

As moléculas mais estudadas na glicobiologia e com interesse farmacológico são as lectinas. As lectinas são um grupo heterogêneo de proteínas que reconhecem e se ligam reversivelmente a carboidratos livres e carboidratos presentes em glicoconjugados. As lectinas foram inicialmente descobertas em plantas, como proteínas que apresentavam habilidade de aglutinar eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos e de modo seletivo (Sharon e Lis, 2004), mas posteriormente também foram identificadas em bactérias, vírus, vertebrados e mamíferos (Reina e Bernardi, 2012). Muitas das estruturas primárias e tridimensionais de lectinas já estão elucidadas (Brewer, 2001; Cavada *et al.*, 2001; Ambrosi *et al.*, 2005; Gabius *et al.*, 2011).

Estudos estruturais realizados em lectinas sugerem que a atividade de ligação a carboidratos da maioria das lectinas é determinado por resíduos de aminoácidos limitados designados como o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) (Sharon e Lis, 2004). O CRD tipicamente reconhece resíduos de carboidratos das glicoproteínas e glicolípídeos de membrana celular (Mody *et al.*, 1995). A interação entre o carboidrato e as lectinas é impulsionado por ligações de hidrogênio, associação de resíduos de monossacarídeos com metais (lectinas do tipo-

C e dependentes de Ca^{2+}) ou ainda interações iônicas e hidrofóbicas, que contribuem para a afinidade de ligação. As lectinas não apresentam atividade enzimática e embora a afinidade das lectinas por monossacarídeos seja geralmente fraca, é uma ligação altamente seletiva (Sharon e Lis, 2004).

1.2.1 Lectinas presentes no organismo dos mamíferos

A decodificação da informação biológica presente em glicoconjugados é atribuída, em parte, as lectinas presentes no organismo dos mamíferos. Lectinas endógenas estão envolvidas em uma enorme variedade de processos biológicos, tais como reconhecimento e interação célula-célula e célula-matriz extracelular, fertilização, desenvolvimento embrionário, crescimento e diferenciação celular, sinalização celular, adesão e migração celular, apoptose, imunomodulação e inflamação, interações patógeno-hospedeiro e indução mitogênica (Mody *et al.*, 1995; Gorelik *et al.*, 2001; Minko, 2004; Sharon e Lis, 2004; Rabinovich e Toscano, 2009). Embora os animais apresentem uma grande variedade de lectinas, apenas algumas delas foram isoladas e caracterizadas em relação aos seus papéis no organismo (Gabiús *et al.*, 2011).

No SNC é crescente o número de evidências da presença de diferentes lectinas em diferentes tipos celulares. Algumas das lectinas têm uma localização nuclear/citosólica, sugerindo que estão envolvidos no tráfego entre citosol e no núcleo. Algumas das lectinas são transitoriamente externalizadas durante o desenvolvimento cerebral para processos de adesão/reconhecimento e para a transdução de sinal. No SNC podem ser encontradas lectinas com afinidade por diversos açúcares incluindo manose/glicose, N-acetil glicosamina e galactose (Marschal *et al.*, 1989; Almkvist e Karlsson, 2004; Endo, 2005; Dani e Broadie, 2011). Essas moléculas são capazes de interferir na atividade cerebral e dentre elas as galectinas tem se destacado como importantes moléculas moduladoras da função neural (Sakaguchi *et al.*, 2007; Starossom *et al.*, 2012).

1.2.2 Galectinas

Galectinas representam uma família de lectinas amplamente distribuídas no reino animal definidas pela sua especificidade por β -galactosídeos. A estrutura cristalográfica da maioria das galectinas mostra que estas proteínas contêm pelo menos um domínio conservado de cerca de 130 aminoácidos designado como o domínio lectínico (CRD), que é responsável pelas suas propriedades de ligação a carboidratos. Até o momento são conhecidas 15 galectinas diferentes. Com base na sua

estrutura as galectinas são classificadas em diferentes grupos: (a) “Proto-type” (galectinas -1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 e -15) que contém um CRD; (b) “tandem-repeat-type” (galectinas -4, -6, -8, -9, e -12), que contém dois CRD; (c) “Quimera” (galectina -3) que é composta de um CRD e um domínio não lectínico envolvido em sua oligomerização (Barondes *et al.*, 1994; Di Lella *et al.*, 2011).

As galectinas estão distribuídas dentro e fora das células, em geral são proteínas solúveis que apresentam características típicas de moléculas citoplasmáticas. No entanto, a sua localização precisa não é limitada ao citosol, elas também são encontradas no núcleo, sobre as superfícies das células, e até mesmo no espaço extracelular (Yang, R. Y. *et al.*, 2008). No entanto, independentemente da sua localização, estas proteínas amplamente distribuídas estão envolvidas na regulação de diversos processos celulares em ambos os ambientes intra e extracelulares, como processos de homeostase, apoptose e embriogênese, e em condições patológicas como pré-eclampsia, inflamação, diabetes, arterosclerose e câncer (Hughes, 2001; Wada e Makino, 2001; Almkvist e Karlsson, 2004; Le Mercier *et al.*, 2009; Blois e Barrientos, 2013). Dentre as galectinas estudadas, a galectina-1 tem se destacado como importante molécula moduladora da função neural (Sakaguchi *et al.*, 2010; Starossom *et al.*, 2012).

1.2.2.1 Galectina 1

Galectina-1 (gal-1) foi a primeira proteína descoberta na família das galectinas. Gal-1 é uma pequena proteína de 14 kDa, que na sua forma dimérica (reduzida) interage com os carboidratos, e esta interação direciona a sua atividade biológica (Horie *et al.*, 2004; Di Lella *et al.*, 2011). Mas a perda da capacidade de ligação aos carboidratos (Gal-1 oxidada) não implica na perda da sua atividade biológica. Uma vez que a forma oxidada da gal-1 apresenta uma atividade potente de regeneração axonal (Horie *et al.*, 2004). Gal-1 tem se destacado pelos seus efeitos no SNC, especialmente pela aparente atividade neuroprotetora (Kajitani *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2011).

Alguns estudos demonstram que a gal-1 é amplamente expressa no SNC, tanto em neurônios, quando nas células gliais (Akazawa *et al.*, 2004; Sakaguchi *et al.*, 2007). Essa lectina apresenta atividade neuroprotetora contra a neurotoxicidade produzida por glutamato à medida que é capaz de sinalizar as células e alterar a composição das subunidades do receptor NMDA e por consequência sua condutância (Lekishvili *et al.*, 2006). Além disso, ela pode exercer outras ações neuroprotetoras e sobre a neuroplasticidade que incluem: indução de

diferenciação de astrócitos (Sasaki *et al.*, 2004); efeito neuroprotetor pelo estímulo na expressão astrocitária do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) *in vitro* e em modelo animal de isquemia (Endo, 2005; Qu *et al.*, 2010); inibição da astrogliose e proteção dos danos celulares e funcionais pós-isquêmicos (Qu *et al.*, 2011); estímulo da proliferação de progenitores neurais (Sakaguchi *et al.*, 2006; Ishibashi *et al.*, 2007; Kajitani *et al.*, 2009; Sakaguchi *et al.*, 2010). O mecanismo molecular exato que conduz os diversos efeitos neuroprotetores promovidos por gal-1 e outras lectinas ainda não estão bem elucidados. Entretanto, a participação de receptores de β -integrinas, glicoproteínas ricas em β -galactosídeos na sua estrutura, parece estar envolvida nas repostas celulares promovidas por gal-1 (Sakaguchi *et al.*, 2010).

1.2.3 Lectinas de Plantas

As lectinas de origem vegetal têm sido utilizadas como ferramentas na elucidação das funções das cadeias de açúcares em uma variedade de fenômenos biológicos das células animais. As lectinas de plantas podem ser utilizadas com facilidade e com baixo custo não apenas como moléculas de reconhecimento de açúcares específicos expressos na superfície celular, mas também como ferramentas para modulação de diversas atividades biológicas, incluindo: atividades antitumorais, através de segmentação e morte celular programada, como apoptose e autofagia (Fu *et al.*, 2011); atividade estimuladora da produção de óxido nítrico (NO \cdot) (Andrade *et al.*, 1999); ação anti-inflamatória através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e migração de leucócitos (Cavada *et al.*, 2001); atividade antinociceptiva via modulação do sistema opióide (De Freitas Pires *et al.*, 2011), papel gastroprotetor contra lesão da mucosa gástrica induzida por etanol e indometacina (De Vasconcellos Abdon *et al.*, 2012).

Entre as lectinas mais estudadas estão as da família Fabaceae (Leguminosae). Lectinas dessa família representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. A subtribo Diocleinae (família Leguminosae) compreende 13 principais gêneros, dentre eles encontramos os gêneros, *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea*, dos quais lectinas de origem brasileira têm sido isoladas e caracterizadas, como as extraídas de: *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Dioclea grandiflora* (DGL), *Dioclea violacea* (DVioL) entre outras (Cavada *et al.*, 2001). Todas as lectinas Diocleanae apresentam estruturas multiméricas compostas de monômeros de 25,5 kDa, além de exibirem a característica de equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH (Calvete *et al.*, 1999). Nessa família as

lectinas apresentam como especificidade principal de reconhecimento os carboidratos D-manose e D-glicose (Cavada *et al.*, 2001).

1.2.3.1 Lectina da semente de *Canavalia ensiformis*, Concanavalia A (ConA)

ConA, obtida das sementes de *Canavalia ensiformis* (Família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae), foi a primeira lectina a ser isolada, sequenciada e teve sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raios-x. ConA é uma lectina $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -dependente com afinidade por manose/glicose. ConA apresenta uma estrutura tetramérica, em que cada um dos seus monômeros contém 237 resíduos de aminoácidos (Cavada *et al.*, 2001).

ConA tem sido muito utilizada no estudo da função do SNC e neuroplasticidade (Lin e Levitan, 1991; Scherer e Udin, 1994), isolamento e estudo das glicoproteínas sinápticas (Partin *et al.*, 1993; Fay e Bowie, 2006), liberação de neurotransmissores (Boehm e Huck, 1998) e na investigação das propriedades funcionais e bioquímicas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos AMPA (Hoffman *et al.*, 1998; Thalhammer *et al.*, 2002), Cainato (Yue *et al.*, 1995; Partin *et al.*, 1996; Everts *et al.*, 1999; Fay e Bowie, 2006) e NMDA (Yue *et al.*, 1995; Everts *et al.*, 1997).

A partir do isolamento de ConA, várias lectinas com propriedades físicas similares tem sido purificadas e caracterizadas de outras espécies da subtribo Diocleinae, como a lectina obtida das sementes de *Canavalia brasiliensis*, ConBr (Moreira e Cavada, 1984).

1.2.3.2 Lectina obtida das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

A *Canavalia brasiliensis* (Figura 1) é uma angiosperma nativa do continente americano. No Brasil é encontrada nas regiões Sudeste e Nordeste, sendo conhecida popularmente como feijão bravo do Ceará (Cruz *et al.*, 1995). Pertence a família Fabaceae (Leguminosae), Tribo Diocleae e subtribo Diocleinae (Dam *et al.*, 1998). Esta espécie, pelo seu sistema de raiz amplo e profundo, pode contribuir para melhora da estrutura do solo, estabilização de processos de erosão e faz ciclagem de nutrientes. Devido a isto é muito utilizada como adubo, no controle da desertificação e erosão (Carvalho e Sodre Filho, 2000; Cobo *et al.*, 2002).



Figura 1. Leguminosa *Canavalia brasiliensis* (Feijão Bravo do Ceará).

Retirada de:

http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/images/Canavalia_brasiliensis/Canavalia_brasiliensis_02.jpg

ConBr é uma lectina isolada a partir de sementes de *Canavalia brasiliensis*, apresenta alta similaridade estrutural a ConA (99%) (Grangeiro *et al.*, 1997), e a mesma especificidade por glicose/manose. Em tecidos periféricos os efeitos biológicos da ConBr incluem a estimulação da produção de NO \cdot por macrófagos (Andrade *et al.*, 1999), indução de apoptose em linfócitos (Barbosa *et al.*, 2001) e estimulação da liberação de histamina em mastócitos (Lopes *et al.*, 2005). Outro aspecto demonstrado recentemente foi uma atividade analgésica de ConBr, quando administrada via oral em camundongos, sendo este efeito aparentemente relacionado a sua ação sobre receptores opióides no SNC (De Freitas Pires *et al.*, 2011). A estrutura de ConBr é representada abaixo (Figura 2) 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 (Grangeiro *et al.*, 1997; 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 dimérica e tetramérica, junto com mudanças na orientação relativa dos sítios de ligação de carboidratos nas estruturas quaternárias de lectinas homólogas, tem sido sugerido como explicação para as diferentes atividades e potências biológicas das lectinas ConBr e ConA (Calvete *et al.*, 1999).

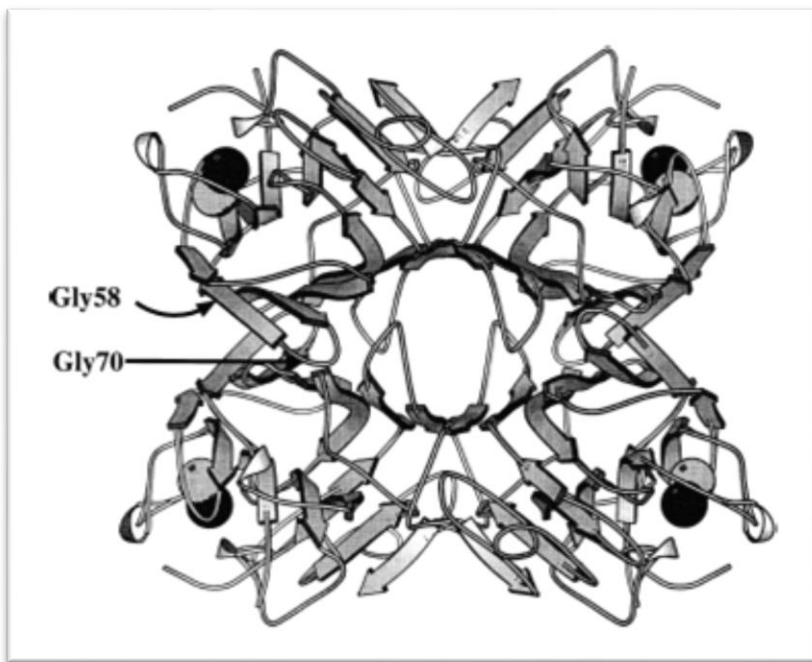


Figura 2. Estrutura global do tetrâmero de ConBr. As posições dos resíduos de Gly 58 e Gly 70 em ConBr são substituídas por Asp e Ala em ConA. As esferas cinza e preta representam os metais de transição, Mn^{2+} e Ca^{2+} , respectivamente [Adaptado de Sanz-Aparicio *et al.* (1997)].

1.2.3.3 Efeitos de ConBr sobre o SNC

Considerando estes efeitos de ConBr e a sua similaridade estrutural com ConA, nosso grupo tem buscado estudar os efeitos biológicos de ConBr sobre o SNC. Nossos dados sugerem que ConBr pode modular sistemas de neurotransmissão e algumas vias de sinalização intracelular que culminam com efeitos neuroprotetores e de modulação da neuroplasticidade (Barauna *et al.*, 2006; Russi *et al.*, 2012; Jacques *et al.*, 2013).

Em estudo recente mostramos que ConBr apresenta efeito neuroprotetor contra convulsões induzidas por ácido quinolínico (AQ) em camundongos e paralelamente reverte o aumento da fosforilação de JNK2/3 e das subunidade GluR1 do receptor AMPA induzidos pelo AQ (Russi *et al.*, 2012). ConBr também apresenta efeito neuroprotetor contra a excitotoxicidade glutamatérgica *in vitro* em fatias de hipocampo, além de reverter (nesse modelo) a diminuição da fosforilação de Akt provocada pelo glutamato (Jacques *et al.*, 2013). De Freitas Pires *et al.* (2011), relatam que ConBr administrada via oral em camundongos possui atividade analgésica, sendo este efeito aparentemente relacionado a sua ação sobre receptores opióides no SNC.

ConBr (diferentemente de 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 α 2-adrenérgico) e dopaminérgico (via receptores D2). Além disso, ConBr foi capaz de potencializar a ação da fluoxetina, um antidepressivo inibidor seletivo da recaptação da serotonina (Barauna *et al.*, 2006).

1.3 Depressão

A depressão é um transtorno de humor grave caracterizada por humor deprimido e/ou anedonia, que é a perda de prazer por atividades antes consideradas prazerosas. Além disso, sintomas como alteração no peso, no apetite e no sono, fadiga, sentimento de culpa, dificuldade de concentração também são observados (Moussavi *et al.*, 2007). A depressão leva a consequências graves, incluindo suicídio e aumento do risco de eventos cardiovasculares. Portanto, a depressão é um importante problema de saúde pública global, com altos custos sociais e pessoais, diminuição da produtividade no trabalho e aumento na utilização dos serviços de saúde (Murray e Lopez, 1997; Moussavi *et al.*, 2007).

A maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento da depressão atuam na modulação dos sistemas monoaminérgicos, principalmente bloqueando transportadores e receptores de monoaminas, ou a atividade da monoamina oxidase. As principais classes destes fármacos são os tricíclicos, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) e de noradrenalina (ISRN) ou de recaptação dual (serotonina/noradrenalina) e os inibidores da monoamina oxidase (iMAO), além de antidepressivos atípicos (Morilak e Frazer, 2004).

Entretanto, os antidepressivos disponíveis atualmente necessitam de um longo prazo de tratamento e têm a sua eficácia limitada, cerca de um terço apenas dos pacientes respondem a primeira medicação prescrita. O Instituto Nacional de Saúde Mental STAR *D (Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression) descobriu que apenas 27% dos pacientes deprimidos apresentam remissão dos sintomas dentro de 12 semanas e 33% dos pacientes não apresentam remissão (Gaynes *et al.*, 2009). Ainda, a maioria dos medicamentos apresenta efeitos colaterais como dor de cabeça, ganho de peso, disfunção sexual, hipotensão, arritmia, dentre outros (Serretti *et al.*, 2010; Serretti e Mandelli, 2010). Estes dados destacam a grande necessidade de novos agentes antidepressivos e novas abordagens, que apresentem novos mecanismos, início de ação mais rápido e maior eficácia.

1.3.1 Sistema Glutamatérgico na depressão

Considerando a grande necessidade de novos agentes antidepressivos que apresentem novos mecanismos, início de ação mais rápido e maior eficácia, atenção especial tem sido dada a outros sistemas de neurotransmissores na patogênese da depressão, tais como o sistema glutamatérgico. Evidências substanciais sugerem que a sinalização do receptor NMDA pode ser utilizada como um novo alvo para a ação antidepressiva (Trullas e Skolnick, 1990; Skolnick, 1999; Sanacora *et al.*, 2011; Duman *et al.*, 2012).

A "hipótese glutamatérgica" foi sugerida no princípio dos anos 1990, quando os primeiros resultados mostraram que antagonistas do receptor NMDA possuíam ação antidepressiva (Trullas e Skolnick, 1990). Mais recentemente, esta hipótese tem evoluído, integrando resultados de pesquisas de diversas áreas, incluindo sinalização intracelular, mecanismos de expressão gênica, mecanismos neurotróficos, neurogênese, plasticidade, remodelação neuronal de células e circuitos (Pittenger e Duman, 2008; Sanacora *et al.*, 2011; Duman *et al.*, 2012).

Estudos recentes indicam que a cetamina, um antagonista do receptor de NMDA, pode auxiliar na solução de várias limitações do

tratamento da depressão. Uma dose única de cetamina produz uma resposta antidepressiva rápida (dentro de horas) em pacientes que não responderam a dois ou mais antidepressivos típicos e são considerados resistentes ao tratamento (Salvadore e Singh, 2013). Além disso, estudos pré-clínicos mostram que a cetamina aumenta rapidamente as conexões sinápticas e, assim, evita à perda neuronal e sináptica causada por estresse crônico (Li *et al.*, 2011; Duman *et al.*, 2012; Kavalali e Monteggia, 2012).

1.3.2 Via L-arginina-Óxido Nítrico-GMPc na depressão

Os receptores NMDA são receptores ionotrópicos complexos que quando ativados permitem a entrada de Ca^{2+} a partir do meio extracelular para os neurônios. Isto resulta na modulação de vários processos intracelulares incluindo a via de sinalização da L-arginina- $NO\cdot$. Ca^{2+} ativa a enzima óxido nítrico sintase (NOS) que converte L-arginina em $NO\cdot$ e L-citrulina (Esplugues, 2002; Paul e Skolnick, 2003). O $NO\cdot$, uma molécula mensageira no cérebro, produzido em resposta à estimulação do receptor NMDA, tem sido implicado na regulação de uma variedade de processos comportamentais, cognitivos e emocionais, e também na neurotransmissão, plasticidade sináptica, aprendizado, percepção da dor, agressividade e depressão (Esplugues, 2002; Steinert *et al.*, 2010). A redução dos níveis de $NO\cdot$ no hipocampo pode induzir efeitos do tipo antidepressivo, sugerindo assim o envolvimento do $NO\cdot$ na neurobiologia da depressão (Dhir e Kulkarni, 2011).

É importante também salientar que o $NO\cdot$ é um radical altamente reativo, que tende a reagir com outras moléculas, o que resulta na oxidação, nitrosilação ou nitração de proteínas celulares com efeitos concomitantes na função neural (Esplugues, 2002). Por outro lado, há uma grande quantidade de evidências que sugerem que muitos dos efeitos do $NO\cdot$ no encéfalo são mediados através da estimulação da guanilato ciclase solúvel (sGC) e conseqüente elevação de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) (Denninger e Marletta, 1999). Esta via, L-arginina- $NO\cdot$ -GMPc é uma importante via de sinalização envolvida na depressão (Almeida, Felisbino, *et al.*, 2006; Dhir e Kulkarni, 2011).

O $NO\cdot$ é formado a partir de L-arginina com a ajuda da enzima NOS que por sua vez ativa a sGC, que é responsável pela conversão de guanosina trifosfato (GTP) em GMPc. Sabe-se que níveis aumentados de GMPc estão relacionados com o aumento da depressão, e fármacos que levem a redução nos seus níveis pode produzir ações antidepressivas (Da Silva *et al.*, 2000; Dhir e Kulkarni, 2007).

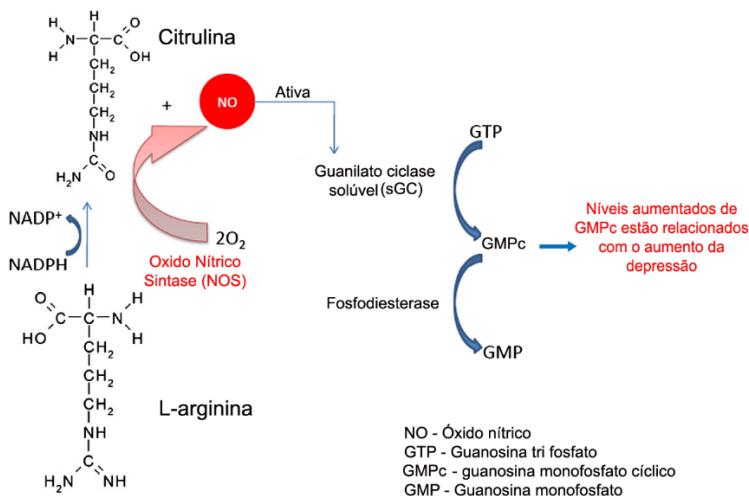


Figura 3. Síntese de óxido nítrico e a via da L-arginina- NO·-GMPC [adaptado de Dhir e Kulkarni, (2011)].

Os efeitos de GMPC ocorrem através de alvos bioquímicos distintos que incluem cinases dependentes de GMPC (cGKs), canais de cátions GMPC-regulados, e fosfodiesterases (PDEs). Os estudos farmacológicos e genéticos sugerem um papel importante das PDEs na cognição, psicose, depressão e neurodegeneração (Menniti *et al.*, 2006). A inibição de PDE2 com Bay 60-7550 (Boess *et al.*, 2004) bem como a inibição da PDE5 com sildenafil ou vardenafil (Prickaerts *et al.*, 2002) melhorou o desempenho de ratos em tarefas sociais e de memória de reconhecimento de objetos.

Nosso grupo já relatou anteriormente os efeitos antidepressivos de ConBr (Barauna *et al.*, 2006), mas pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação. A sinalização do receptor de NMDA constitui um objetivo importante da atividade antidepressiva (Trullas e Skolnick, 1990; Skolnick, 1999; Sanacora *et al.*, 2011; Duman e Li, 2012), e está bem documentado que o receptor NMDA é glicosilado no domínio extracelular e podem interagir com as lectinas com afinidade por glucose/manose (Everts *et al.*, 1997). Além disso resultados anteriores demonstram que ConBr pode modular o sistema glutamatérgico (Russi *et al.*, 2012; Jacques *et al.*, 2013). Assim, investigar o possível envolvimento do sistema glutamatérgico (através de receptores NMDA) e da via L-arginina- NO· no efeito antidepressivo provocada pela administração central do ConBr foi um dos objetivos deste trabalho.

1.4 Sinalização Celular

As células estão constantemente em comunicação com o seu ambiente externo. Tanto em processos normais como patológicos elas devem ser capazes de receber sinais a partir do meio extracelular e distribuir estes sinais para o interior da célula. Muitos estudos tentam estabelecer como estes sinais são reconhecidos pela superfície celular e a seguir traduzidos no interior da célula em resposta biológica eficiente. O SNC em particular é um tecido muito rico em sistemas de transdução de sinal, que fornecem em grande parte a base molecular que regula as funções neurais mais relevantes incluindo: proliferação, diferenciação celular, morte celular, plasticidade sináptica, aprendizado, memória e o próprio estado de humor (Cohen e Greenberg, 2008). Da mesma forma, os diversos módulos de sinalização participam da fisiopatologia de doenças neurodegenerativas e do humor bem como nas respostas terapêuticas frente aos fármacos (Schlessinger, 2000, Kleene e Schachner, 2004, Cohen e Greenberg, 2008, Ghazarian *et al.*, 2010).

Algumas das famílias de proteínas cinases mais estudadas no SNC incluem proteína cinase A (PKA), proteína cinase G (PKG), proteínas cinases C (PKCs), proteína cinase B (PKB/Akt), proteínas cinases Ca^{2+} /calmodulina-dependentes (CaMKs) e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (Sweatt, 2001; Hanada *et al.*, 2004).

Alguns módulos de sinalização de importância na modulação da plasticidade do SNC e que representam alvos importantes nas estratégias de neuroproteção e na ação de drogas antidepressivas serão abordados a seguir.

1.4.1 Sistema de transdução de sinal a partir de receptores acoplados a proteínas G

Certamente um dos mais tradicionais sistemas de transdução de sinal envolve receptores acoplados a proteínas G, levando a alterações da atividade da adenilato ciclase, e dessa forma alterando a concentração do segundo mensageiro AMP cíclico (AMPC) (Donati e Rasenick, 2003). Um das ações do AMPC é a ativação da proteína cinase dependente de AMPC (PKA) que pode por sua vez modular (via fosforilação) uma diversidade de proteínas alvo, incluindo o fator de transcrição CREB. Diversos estudos demonstram que tratamento com alguns tipos de antidepressivos aumentam a concentração de AMPC (Pittenger e Duman, 2008) e podem também modular os níveis de PKA (Nestler *et al.*, 1989; Nestler *et al.*, 2002; Shelton, 2007).

O fator de transcrição CREB ativado (via fosforilação do sítio Ser¹³³) estimula a expressão de diversos genes entre eles o gene do BDNF

e seu receptor TrkB que estão diretamente envolvidos em eventos de plasticidade neuronal (Carlezon *et al.*, 2005; Merz *et al.*, 2011).

1.4.2 Proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPKs)

Outra via de sinalização importante inclui as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), que são serina/treonina cinases amplamente distribuídas no SNC. MAPKs controlam muitos eventos celulares complexos, tais como a embriogênese, a diferenciação celular, proliferação e morte celular, plasticidade sináptica entre outros eventos de curto e de longo prazo necessárias para a homeostase neural (Chang e Karin, 2001; Cowan e Storey, 2003).

Mamíferos expressam pelo menos quatro grupos de MAPKs distintamente reguladas. As cinases relacionadas com sinais extracelulares (ERK) 1/2, c-Jun amino-terminal cinases (JNK1/2/3) e proteínas p38 (p38 α , β , γ e δ) são as mais estudadas. Estas cinases são ativadas por dupla fosforilação em resíduos de treonina e tirosina através de uma cascata de sinalização que se inicia com uma cinase da cinase da MAP cinase (MAPKKK). Esta, por sua vez ativa por fosforilação de resíduos de serina e treonina uma MAPKK (cinase da MAP cinase) específica. MEK1/2 para a ERK1/2, MKK3/6 para as p38, MKK4/7 para as JNKs. A ativação das MAPKK é responsável pela subsequente fosforilação das MAPKs em resíduos de treonina e tirosina (Chang e Karin, 2001; Cargnello e Roux, 2011). A desativação das MAPKs é dependente de fosfatases específicas, como a MKPs (fosfatase das MAP cinases), PP2A e tirosina fosfatases (Mccubrey *et al.*, 2006).

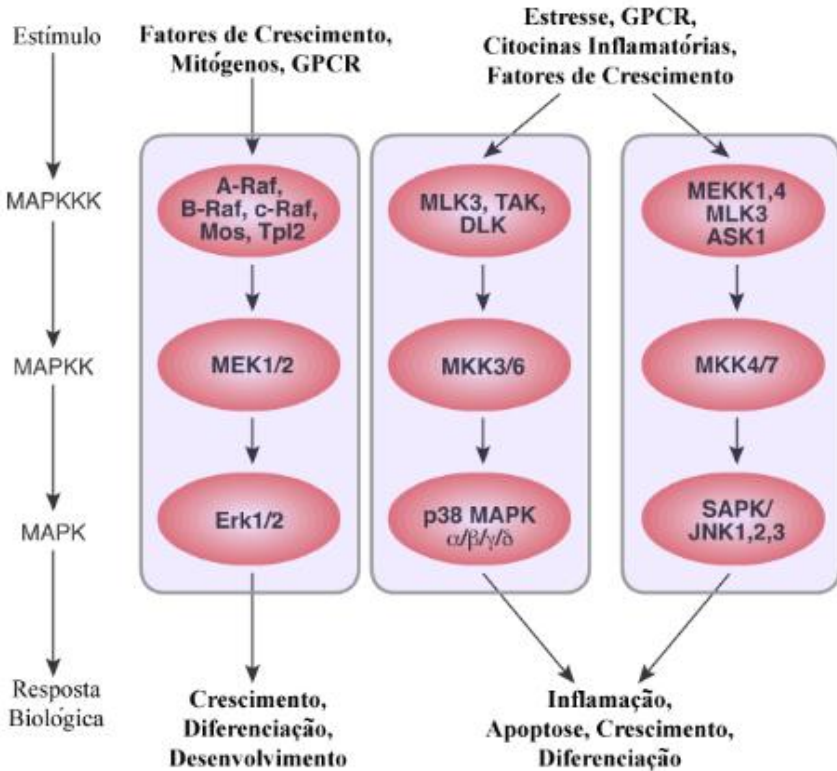


Figura 4. Cascata de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos. MAPKs medeiam a sinalização intracelular iniciada por fatores extracelulares ou intracelulares. Todas as vias operam em forma de cascata. Adaptado de www.cellsignaling.com. Acesso em: 23.03.2014.

A cascata de ERK1/2 é primariamente ativada por fatores de crescimento, sua ativação induz alteração da expressão gênica e pode modular proliferação celular, morte/sobrevivência celular e neuroplasticidade (Fumagalli *et al.*, 2005; Yoshii e Constantine-Paton, 2010). No hipocampo ERK1/2 parece estar envolvida na plasticidade sináptica essencial para a formação de memória de longa duração (Fisar e Hroudova, 2010; Callaghan e Kelly, 2012). Recentemente tem sido cada vez mais estudado o papel da via da ERK no mecanismo molecular da depressão e da ação de antidepressivos (Todorovic *et al.*, 2009).

JNK1/2/3 e a proteína cinase p38^{MAPK}, são classicamente reconhecidas como proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs), são ativadas por citocinas relacionadas a insultos citotóxicos, e muitas vezes são associadas a morte celular (Mielke e Herdegen, 2000). No entanto, JNK e p38^{MAPK} também regulam o desenvolvimento do SNC e a neuroplasticidade (Thomas e Huganir, 2004; Waetzig *et al.*, 2006).

1.4.3 Via da Fosfatidilinositol-3 cinase/Akt (PI3K/Akt)

Outro módulo de sinalização importante inclui a via da PI3K/Akt (PKB), que pode ser ativada por fatores de crescimento. Akt é uma serina/treonina cinase que contém dois sítios regulatórios de fosforilação, o Thr³⁰⁸ no domínio catalítico e Ser⁴⁷³ no domínio regulatório C-terminal (Song *et al.*, 2005).

Essa via desempenha um papel central na regulação do crescimento celular, metabolismo, proliferação e sobrevivência celular, na plasticidade sináptica, no aprendizado e memória, e na depressão maior (Kelly e Lynch, 2000; Dwivedi *et al.*, 2008; Yang, P. C. *et al.*, 2008). As alterações em vias de sinalização que regulam neuroplasticidade e sobrevivência celular, como PI3K/Akt, estão implicadas nos mecanismos de morte celular observados em processos neurodegenerativos, de excitotoxicidade e na depressão, bem como nas respostas frente a antidepressivos (Fisar e Hroudova, 2010; Budni *et al.*, 2011).

1.4.4 Sinalização celular dependente de Ca²⁺

Além destes sistemas já citados deve ser ressaltada a sinalização celular dependente de Ca²⁺, que opera como um poderoso mensageiro intracelular. A concentração intracelular de Ca²⁺ pode aumentar por diversos mecanismos que incluem: a ativação de receptores conectados à produção de inositol trifosfato (IP₃); através da abertura de canais de Ca²⁺ voltagem-dependentes (tipo L, N ou P/Q); via receptores glutamatérgicos ionotrópicos (AMPA, NMDA e Cainato); através de receptores colinérgicos nicotínicos (Cohen e Greenberg, 2008; Fisar e Hroudova, 2010). Portanto, neurotransmissores bem como a despolarização da membrana nas células podem conduzir alterações na concentração intracelular de cálcio (Pittenger e Duman, 2008).

Dentro do grupo de proteínas que ligam especificamente Ca²⁺ está a calmodulina (CaM), formando um complexo Ca²⁺/CaM. Dentre os vários tipos de proteínas moduladas pelo complexo Ca²⁺/CaM estão as proteínas cinases Ca²⁺/CaM dependentes, que são amplamente distribuídas nas no tecido neural. As CaMKs são serina/treonina cinases

que incluem CaMKII, CaMKK, CaMKI e CaMKIV (Tiraboschi *et al.*, 2004; Almeida, Souza, *et al.*, 2006).

CaMKII é particularmente muito abundante nas densidades pós-sinápticas e está implicada na plasticidade sináptica e fenômenos como a potenciação sináptica de longa duração (LTP). A ativação persistente de CaMKII proporciona a auto fosforilação nos sítios Thr²⁸⁶ e Thr³⁰⁵. A auto fosforilação do sítio Thr²⁸⁶ é de grande importância, pois permite a manutenção da sua atividade mesmo após a redução da concentração do íon Ca²⁺, ou seja, proporciona uma atividade cálcio-independente bastante prolongada (Erickson *et al.*, 2008; Wayman *et al.*, 2008). A CaMKII pode estar associada com um grande número de proteínas, incluindo receptores como AMPA (Tan *et al.*, 1994), GABA (McDonald e Moss, 1997), NMDA (Omkumar *et al.*, 1996) e canais iônicos (Maier, 2011).

CaMKIV é uma proteína que tem uma sequência de localização nuclear, sendo importante na regulação de fatores de transcrição tais como CREB (Bito *et al.*, 1996). A inibição da CaMKIV prejudica a formação da memória de longa duração (LTP) dependente do hipocampo (Kang *et al.*, 2001).

1.4.5 Ativação do Fator de transcrição CREB

No hipocampo muitas vias estão associadas a regulação da plasticidade sináptica, neurogênese e sobrevivência neuronal. Postula-se que o comprometimento da neuroplasticidade faz parte da fisiopatologia de diversas doenças neurológicas. No hipocampo a fosforilação de CREB e o aumento da expressão de BDNF são propostos como mediadores importantes na eficácia de tratamentos para doenças associadas a degeneração neuronal ou em patologias que diminuem a eficiência sináptica como a depressão (Gottschalk *et al.*, 1999; Koch *et al.*, 2009; Fisar e Hroudova, 2010).

A família CREB é um grupo de fatores de transcrição estruturalmente relacionados, caracterizado pela presença de uma região com um domínio de zíper de leucina altamente conservada (bZIP) que se liga a uma sequência específica de DNA chamado elemento de resposta ao AMPc (CRE) que são encontrados na região reguladora (promotora ou potenciadora) de diversos genes. Se um promotor contém CRE, então ele pode ser regulado por CREB. Um passo limitante para a ativação de CREB consiste na fosforilação de CREB sobre a serina 133 (Ser¹³³) (Carlezon *et al.*, 2005). Embora CREB possa se ligar a CRE em condições basais, é inativo até que seja fosforilado. A fosforilação em Ser¹³³ permite

a interação de CREB com outras proteínas como CBP levando a ativação transcricional (Shaywitz e Greenberg, 1999).

Atividade sináptica, neurotrofinas, neurotransmissores, hormônios, fatores de crescimento liberados durante o desenvolvimento, hipóxia e estresse, entre outros estímulos, podem desencadear a fosforilação de CREB através de proteínas cinases, promovendo a indução da expressão de genes dependentes de CREB. A maioria das vias citadas anteriormente pode levar a um aumento da fosforilação de CREB-Ser¹³³, como por exemplo: ativação de CAMKII e IV (Kang *et al.*, 2001), PKA (Carlezon *et al.*, 2005), ERK1/2 e p38^{MAPK} (via RSK e MSK) (Galeotti e Ghelardini, 2011) e PI3K/Akt (Du e Montminy, 1998).

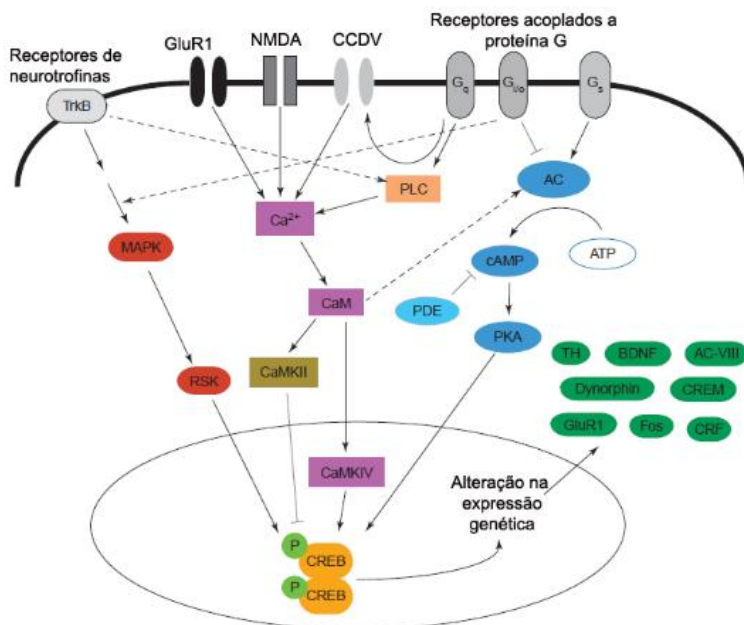


Figura 5. Eventos celulares envolvidos na regulação de CREB. Os neurotransmissores, neurotrofinas e hormônios atuam nos receptores de membrana (por exemplo, TrkB, AMPA, NMDA e receptores acoplados a proteína-G) desencadeando cascatas de sinalização intracelulares que culminam na fosforilação de CREB em serina 133 ativa a transcrição de genes mediada por CREB. Diferentes proteínas cinases como CaMKII, Akt, ERK e PKA podem fosforilar e ativar CREB. [adaptado de Carlezon *et al.* (2005)].

1.4.6 Fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF)

Um dos transcritos mais conhecidos após ativação de CREB é BDNF, um fator crítico para a sobrevivência neuronal (Finkbeiner *et al.*, 1997; Garoflos *et al.*, 2005; Koch *et al.*, 2009). Além disso, diversos estudos sugerem uma redução dos níveis de BDNF em transtornos mentais como esquizofrenia, transtorno bipolar e depressão (Gottschalk *et al.*, 1999; Garoflos *et al.*, 2005; Castren e Rantamaki, 2010).

BDNF é um dos membros de uma pequena família de proteínas que incluem o fator de crescimento do nervo (NGF), neurotrofina 3 e neurotrofina 4. BDNF interage com 2 tipos de receptores, o p75NTR e o TrkB. Os receptores TrkB são abundantes no SNC (Yamada e Nabeshima, 2003) e desempenham um importante papel na plasticidade neural durante o desenvolvimento e na vida adulta (Li *et al.*, 2008). As três principais vias de sinalização ativadas por TrkB são PLC γ , PI3K/Akt e Ras/Raf/MEK/ERK. A ativação destas vias está relacionada à sobrevivência celular, crescimento e proliferação celular (Yoshii e Constantine-Paton, 2010) e ativação da tradução de proteínas (Reichardt, 2006).

Sabe-se que ConBr exibe efeitos neuroprotetores e antidepressivos, mas os mecanismos envolvidos nestas ações ainda não estão completamente elucidados. Portanto, investigar as possíveis vias de sinalização intracelular moduladas por ConBr, e que podem ser potencialmente associados com o seu efeito antidepressivo e neuroprotetor (Barauna *et al.*, 2006; Russi *et al.*, 2012; Jacques *et al.*, 2013) é bastante promissor.

1.5 Isquemia

O acidente vascular cerebral isquêmico é a terceira maior causa de morte nos Estados Unidos e na Europa. Muitos dos pacientes que sobrevivem a um evento isquêmico permanecem com sequelas neuronais importantes, que na maioria dos casos estão associadas a déficits neurológicos permanentes que incluem: paralisia parcial, danos de memória, dificuldades de linguagem e movimentos bem como déficits cognitivos (Murray e Lopez, 1997; Donnan *et al.*, 2008).

A lesão isquêmica cerebral resulta de uma permanente ou transitória interrupção do fornecimento de sangue arterial cerebral por um êmbolo ou um trombo. Esta interrupção desencadeia uma série de processos neuroquímicos que são conhecidos como cascata isquêmica (Taoufik e Probert, 2008).

No centro ou núcleo do território isquêmico, a morte celular avança em poucos minutos devido ao déficit agudo no fluxo de sangue, baixos níveis de ATP, quebra da homeostase de íons e falhas metabólicas graves. As zonas periféricas do território comprometido, chamada de penumbra isquêmica, sofrem danos mais suaves devido a uma perfusão residual de sangue a partir dos vasos sanguíneos colaterais. Em termos hemodinâmicos é a região onde o fluxo sanguíneo cerebral local é reduzido para um grau intermediário, ou seja, 20-40% dos valores normais. Na área de penumbra a morte celular pode ser evitada se intervimos na cascata isquêmica. A diminuição da morte celular nesta área está associada com a melhora neurológica e a recuperação, e é o alvo de muitos tratamentos contra os danos da isquemia (Brouns e De Deyn, 2009; Liu *et al.*, 2012).

Na tentativa de diminuir as lesões neuronais e parar os mecanismos de morte celular alguns eventos da cascata isquêmica vêm sendo alvo das estratégias terapêuticas, como a melhoria do fluxo sanguíneo focal, intervenções em processos deletérios como excitotoxicidade, estresse oxidativo, lesão microvascular ou inflamação, e finalmente, a prevenção de morte celular ou aumento da plasticidade neuronal.

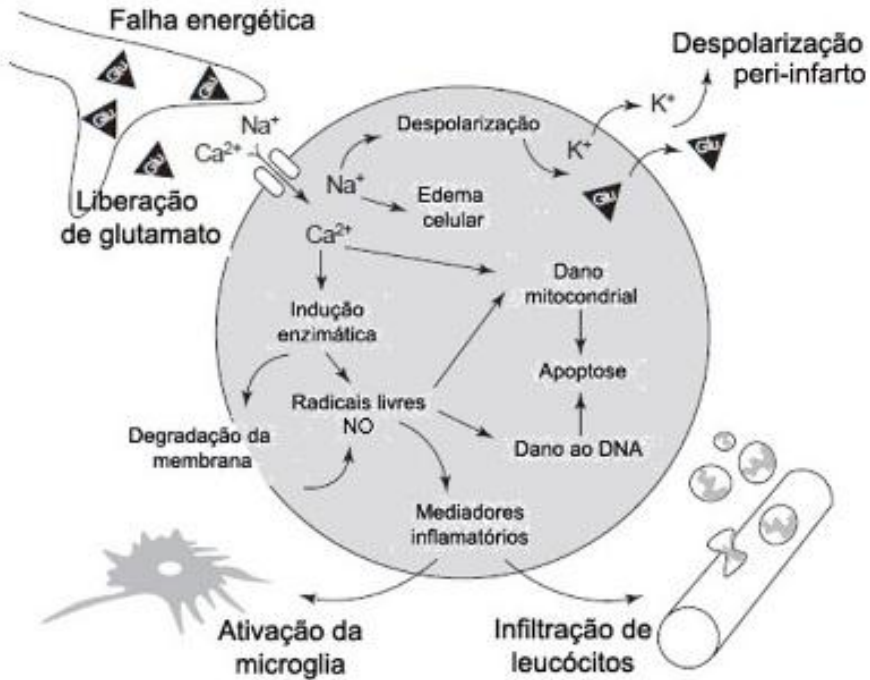


Figura 6. Visão simplificada dos mecanismos fisiopatológicos na isquemia. A falha de energia leva à despolarização dos neurônios. A ativação de receptores específicos de glutamato aumenta drasticamente a concentração de Ca^{2+} e Na^+ intracelular enquanto K^+ é liberado no espaço extracelular. A difusão do glutamato e K^+ no espaço extracelular pode propagar uma série de ondas de despolarização (despolarizações peri-infarto). A entrada de água para o espaço intracelular via gradientes osmóticos provoca edema celular. Ca^{2+} intracelular ativa diversos sistemas de enzimas (proteases, lipases, endonucleases, etc.). Os radicais livres são gerados, causando danos as membranas, a mitocôndrias e ao DNA, desencadeando a morte celular mediada por caspase (apoptose). Os radicais livres também induzem a formação de mediadores inflamatórios, que ativam a microglia e provocam a invasão de células inflamatórias através do sangue (infiltração de leucócitos), através da ativação de moléculas de adesão endoteliais [adaptado de Dirnagl, *et.al.* (1999)].

1.5.1 Excitotoxicidade e Isquemia cerebral

O tecido cerebral possui uma alta necessidade de oxigênio e glicose, e depende quase que exclusivamente de fosforilação oxidativa para produção de energia. Durante a isquemia a diminuição no fluxo de sangue prejudica a entrega destes substratos para o tecido cerebral,

retardando ou impedindo a síntese de ATP através da glicólise e da fosforilação oxidativa. A interrupção da fosforilação oxidativa também provoca um aumento na atividade da enzima ATP sintase aumentando o consumo de ATP, corroborando para diminuição intracelular ATP (Taoufik e Probert, 2008). A principal consequência da diminuição nas concentrações de ATP é a inibição da bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{ATPase}$ levando a perda do gradiente iônico e a consequente despolarização da membrana celular (Doyle *et al.*, 2008).

Essa despolarização da membrana aliada ao prejuízo do metabolismo celular leva a liberação massiva de glutamato para a fenda sináptica e prejuízo da captação astrocitária de glutamato (Lipton, 1999; Lo *et al.*, 2003; Doyle *et al.*, 2008). O excesso de glutamato ativa seus receptores AMPA, cainato e NMDA, que por sua vez consomem ATP promovendo uma liberação ainda maior de glutamato. 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 associada ao influxo excessivo de Ca^{2+} para o interior da célula (Berliocchi *et al.*, 2005). A entrada de grandes quantidades de Ca^{2+} para o citoplasma pode levar a uma série de respostas que conduzem a morte celular, como: indução de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e a ativação de vias de sinalização celular como p38^{MAPK} e JNK (Schwarzschild *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Taoufik e Probert, 2008; Brouns e De Deyn, 2009).

1.5.2 Isquemia cerebral e estresse oxidativo

Uma das consequências da isquemia cerebral é a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Muitas das complicações após um evento isquêmico estão associadas ao excesso de produção de EROs, normalmente decorrentes de disfunções mitocondriais. Estas EROs podem provocar a oxidação e nitrosilação de proteínas, peroxidação lipídica e danos ao DNA, levando a morte celular. Além disso, estresse oxidativo aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BBB) (Jung *et al.*, 2010).

Na mitocôndria dos tecidos cerebrais aproximadamente 2-5% do fluxo normal de elétrons produz radical ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas EROs são eliminadas pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT). Outros antioxidantes como glutatona, ácido ascórbico e α -tocoferol também estão envolvidos na detoxificação dos radicais livres. Um aumento na produção de EROs na isquemia consome os antioxidantes e inativa os sistemas de detoxificação, interrompendo o

sistema endógeno de defesa antioxidante levando a um aumento intracelular ainda maior de EROs (Niizuma *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2010).

1.5.3 Isquemia cerebral e inflamação

A modulação da resposta inflamatória local também é de particular interesse no tratamento do dano isquêmico. Estudos demonstram que a inflamação pode causar, exacerbar e mediar o dano neuronal, mas também inibi-lo. A resposta inflamatória envolve a ativação da microglia e astrócitos e a infiltração celular, principalmente de neutrófilos e leucócitos (Jin *et al.*, 2010).

A ativação microglial resulta na rápida produção de mediadores inflamatórios clássicos como eicosanóides e citocinas, mas também leva a produção de fatores de crescimento, envolvidos em sobrevivência neuronal (Kreutzberg, 1996; Hanisch e Kettenmann, 2007). Ativação da microglia pode ser considerada neurotóxica quando é associada a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β e TNF- α , produção de quimiocinas, produção de EROs via NADPH oxidase e produção de metaloproteinases (principalmente MMP-9). Estes eventos precedem a infiltração de leucócitos e tem um papel crucial em mediar o aumento inicial na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Assim, a inibição da ativação da microglia após a isquemia pode ter efeito neuroprotetor.

Em contraste, a ativação da microglia parece desempenhar um papel neuroprotetor após a isquemia cerebral quando é associada à liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (Neumann *et al.*, 2006; Ekdahl *et al.*, 2009). O papel protetor da microglia pode também ser mediado pela sua capacidade de eliminar o excesso de excitotoxinas do espaço extracelular, em parte através da fagocitose de neutrófilos infiltrados (Denes *et al.*, 2007). Além disso, evidências indicam que a microglia pode produzir vários fatores neurotróficos tais como BDNF e fatores de crescimento (fator de crescimento de fibroblastos e TGF-1), que estão envolvidos na sobrevivência neuronal e reparação de tecidos em casos de lesão cerebral (Streit, 2002; Neumann *et al.*, 2006).

1.5.4 Isquemia cerebral e a integridade da barreira hematoencefálica

A integridade da barreira hematoencefálica (Blood brain barrier – BBB) protege o microambiente neuronal. A incidência de falhas na permeabilidade da BBB em um evento isquêmico pode variar consideravelmente de 15% a 66%, dependendo da gravidade da isquemia (Berezowski *et al.*, 2012). São muitos os mecanismos que contribuem

para estas falhas, dentre eles os mais discutidos são o aumento de EROs, inflamação e também a ativação de metaloproteinases de matriz produzidas pelos neurônios e células gliais em resposta aos danos da isquemia (Gregersen *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2010).

A consequência destas perturbações na BBB é a passagem de componentes do sangue para o parênquima cerebral, como por exemplo, a infiltração de leucócitos, incluindo neutrófilos, células T e macrófagos, que aumentam a resposta inflamatória pós-isquêmica. Também o acesso de moléculas de alto peso molecular que é seguida pelo aumento da entrada de água promovendo edema, e posteriormente hemorragia (Brouns e De Deyn, 2009; Egea *et al.*, 2011; Berezowski *et al.*, 2012).

1.5.5 Isquemia cerebral e plasticidade do cérebro

A recuperação funcional após isquemia cerebral tem sido associada com a plasticidade do cérebro (Madinier *et al.*, 2013). Na isquemia cerebral os eventos patológicos iniciais, associados diretamente com morte celular, são seguidos da ativação de processos regenerativos durante dias, semanas e até meses posteriores a isquemia. Após isquemia, muitos pacientes exibem certos níveis de fraqueza motora e distúrbios sensoriais, contudo com o passar do tempo vão demonstrando determinada recuperação funcional. O resultado de muitos estudos em animais e humanos revelam que a recuperação pós-isquemia e a restauração das funções pode ser explicada por uma reorganização e plasticidade cerebral (Muller *et al.*, 2008; Madinier *et al.*, 2013).

Como sugerido por Lledo *et al.* (2006), a plasticidade cerebral é a capacidade do cérebro em se remodelar em resposta a requerimentos ambientais, experiências, aquisição de habilidades e novos desafios incluindo as lesões cerebrais. No entanto os fatores que podem estimular eventos de plasticidade ainda não foram completamente estabelecidos. Alguns resultados demonstram que as células gliais desempenham um papel importante na modulação da plasticidade sináptica pós-isquêmica e recuperação cerebral (Ekdahl *et al.*, 2009; Madinier *et al.*, 2009). Terapias que aumentam a plasticidade neuronal também são alvos de estudos na recuperação do dano isquêmico.

Apesar dos grandes avanços no diagnóstico e fisiopatologia da isquemia, a administração intravenosa de ativador do plasminogênio tecidual recombinante (rt-PA), utilizada no espaço de tempo de 3 h após a isquemia, é o único tratamento farmacológico aprovado atualmente. No entanto, este tratamento é eficaz em apenas um pequeno número de pacientes (Shichita *et al.*, 2012), o que demonstra que a busca de novas estratégias terapêuticas efetivas continua sendo uma prioridade.

Um dos maiores problemas na elaboração de estratégias terapêuticas é o fato de que a maioria dos alvos, como inflamação e estresse oxidativo, apresentam um papel duplo e possivelmente tempo-dependente na cascata de eventos associados com a resposta do cérebro a uma lesão isquêmica. A inibição de muitos alvos moleculares pode ser benéfica nas fases iniciais e deletéria em pontos posteriores pós-isquêmicos (Lalancette-Hebert *et al.*, 2007). Portanto além de novas estratégias terapêuticas, uma visão mais aprofundada do dano isquêmico neuronal é necessário para uma melhor concepção de terapias neuroprotetoras. Alguns estudos indicam que lectinas podem apresentar atividade neuroprotetora frente ao dano causado pela isquemia (Ishibashi *et al.*, 2007; Qu *et al.*, 2011).

1.5.6 Modelos *in vitro* de isquemia

Existe uma busca crescente de modelos *in vitro* que mimetizem mecanismos fisiopatológicos em tecidos vivos. Neste contexto, culturas organotípicas representam uma boa alternativa experimental, pois oferecem vantagens únicas em relação a outros modelos *in vitro*. Culturas organotípicas imitam os comportamentos neuroquímicos do cérebro, preservam a arquitetura do tecido e a organização celular das regiões cerebrais, mantém as atividades neuronais e as conexões intactas permitindo um longo período de sobrevivência *in vitro* (Stoppini *et al.*, 1991; Simao *et al.*, 2009).

A principal técnica para o cultivo organotípico de fatias de cérebro é o método da membrana de interface. No método da membrana de interface as fatias de cérebro são mantidas em um filtro de membrana porosa, mantendo uma interface entre o meio e uma atmosfera úmida. O meio fornece nutrição adequada aos tecidos através da membrana por ação capilar (Bergold e Casaccia-Bonofil, 1997; Noraberg *et al.*, 2005). É uma metodologia muito vantajosa, uma vez que é relativamente simples e as culturas mantém uma estrutura semi-tridimensional que é particularmente útil para estudos morfológicos, técnicas electrofisiológicas e/ou estudos bioquímicos (Staal *et al.*, 2011).

A principal limitação da técnica de cultura de fatias organotípicas é a determinação da maturidade relativa das fatias ou, em que medida as fatias cultivadas se assemelham aos tecidos vivos *in situ* (Cho *et al.*, 2007; Staal *et al.*, 2011). O rastreamento de neurônios individuais, marcados com um corante fluorescente mostrou que os neurônios em fatias organotípicas apresentavam maior número de ramificações e dendritos (De Simoni *et al.*, 2003).

Apesar disso, muitas das características das culturas organotípicas, como atividade neuronal e a manutenção da citoarquitetura, as tornam uma ferramenta útil para a investigação da fisiopatologia das doenças cerebrais e também para avaliação de estratégias neuroprotetoras (Noraberg *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2007; Frozza *et al.*, 2009; Simao *et al.*, 2009). A lesão isquêmica, representada pela privação de oxigênio e glicose (POG) é um dos modelos amplamente estudados em cultivo organotípico. Isto porque fatias organotípicas submetidas à POG apresentam uma morte celular seletiva dos neurônios piramidais da região CA1, poupando neurônios vizinhos de CA3 e CA4 e neurônios granulares no giro dentado, semelhante ao que é observado *in vivo* (Laake *et al.*, 1999; Finley *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2007; Simao *et al.*, 2009).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que os estudos em glicobiologia vêm demonstrando de forma crescente a importância das cadeias de açúcares nas funções celulares no SNC. Sabendo que receptores para proteínas de matriz extracelular e fatores neurotróficos, receptores glutamatérgicos, transportadores de neurotransmissores e canais iônicos possuem natureza glicoprotéica e as cadeias de açúcares presentes nestas proteínas são alvos de interação com lectinas e que podem regular funções neurais importantes a partir desta interação. Se torna importante e promissor estudar os mecanismos celulares e moleculares associados à estas interações.

Através do estudo dos efeitos de ConBr sobre o SNC, nosso laboratório vêm estudando o potencial neuroprotetor desta lectina. Trabalhos anteriores demonstraram que ConBr injetada i.c.v. pode modular os sistemas de neurotransmissão monoaminérgico (serotonina, noradrenalina e dopamina) e produzir uma ação tipo antidepressiva similar ao antidepressivo fluoxetina (Barauna *et al.*, 2006). Além disso, ConBr apresenta efeito neuroprotetor contra convulsões induzidas por ácido quinolínico em camundongos e paralelamente reverte o aumento da fosforilação de JNK2/3 e das subunidade GluR1 do receptor AMPA induzidos pelo ácido quinolínico (Russi *et al.*, 2012). *In vitro*, em modelo de fatias de hipocampo, ConBr também apresenta efeito neuroprotetor contra a excitotoxicidade glutamatérgica, além de reverter a diminuição da fosforilação de Akt provocada pelo glutamato (Jacques *et al.*, 2013). Portanto, nossos dados prévios sugerem que ConBr pode modular sistemas de neurotransmissão e algumas vias de sinalização intracelular que culminam com efeitos neuroprotetores e de modulação da plasticidade sináptica.

Dessa forma, baseado em nossos dados e nos dados da literatura, que também vem sugerindo um potencial neuroprotetor de algumas lectinas (Yamane *et al.*; Han *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2010; Yamane *et al.*, 2010), nossa proposta neste trabalho é aprofundar o conhecimento dos mecanismos envolvidos na ação tipo antidepressiva de ConBr, bem como investigar os mecanismos celulares e moleculares pelo qual ConBr exerce sua ação neuroprotetora. Nesse último caso avaliando a capacidade neuroprotetora de ConBr em modelo de isquemia *in vitro*, em que o dano neuronal pode envolver mecanismos de neurotoxicidade glutamatérgica, o qual ConBr já demonstrou neuroproteção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho é estudar os mecanismos celulares e moleculares associados à ação antidepressiva e neuroprotetora produzidos pela lectina extraída das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr). Nesse sentido, será focalizada a modulação pela ConBr de vias de sinalização intracelular, associadas à produção de fatores neurotróficos, bem como o potencial envolvimento do sistema glutamatérgico no seu efeito antidepressivo. Por fim, pretende-se investigar a atividade neuroprotetora de ConBr em modelo de isquemia em culturas organotípicas. Para tanto foram estabelecidos uma série de objetivos específicos apresentados abaixo.

3.2 Objetivos Específicos

- I. Investigar o possível envolvimento do sistema glutamatérgico (através de receptores NMDA) e da via L-arginina-NO \cdot no efeito tipo antidepressivo, utilizando o teste do nado forçado, provocada pela administração central do ConBr.
- II. Caracterizar, no hipocampo de camundongos, a modulação por ConBr de vias de sinalização potencialmente envolvidas nos efeitos neuroprotetor antidepressivo desencadeados pela lectina, como PKA, CAMKII, MAPK (ERK1/2, p38^{MAPK} e JNK1/2/3), PI3K/Akt, verificando a atividade do fator de transcrição CREB e a expressão de neurotrofinas (BDNF);
- III. Determinar a capacidade neuroprotetora de ConBr em modelos de isquemia *in vitro* em culturas organotípicas, caracterizando os mecanismos moleculares dessa ação.
- IV. Determinar a capacidade de ConBr modular os níveis de Ca²⁺ intracelular através da modulação de receptores NMDA, canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem ou outros alvos em neurônios em cultura, estabelecendo se essa ação da lectina poderia estar relacionada com sua ação neuroprotetora.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Purificação da lectina ConBr

A lectina ConBr foi isolada e fracionada por métodos clássicos conforme descritos previamente por (Moreira e Cavada, 1984), que incluem precipitação com sulfato de amônio e cromatografia por afinidade em Sephadex G-50. A purificação foi realizada pelo laboratório de biologia molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). A pureza da lectina foi verificada por SDS -PAGE mostrando uma única banda.

4.2 Bloqueio domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) e desnaturação de ConBr

Para determinar se a ação de ConBr é dependente da integridade da sua estrutura proteica ConBr foi desnaturada por fervura durante 5 min (90 °C). A fim de bloquear o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) na lectina, ConBr foi dissolvida em tampão HEPES-salina sem glicose, contendo 0,1 M do seu açúcar ligante específico (α - metil-D-manosídeo) e mantida durante 30 min a 37 °C.

4.3 Experimentos *in vivo*:

4.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (60 dias, 30-40 g) mantidos à uma temperatura ambiente constante (21 ± 2 °C), com livre acesso a água e comida, sob um ciclo claro-escuro de 12:12 h (07:00-19:00 h). Os animais foram alojados em grupos de 15 em gaiolas de 41 × 34 × 16 centímetros. Para os testes comportamentais as gaiolas foram colocadas na sala experimental 24 h antes dos testes para aclimatização. Todos os testes comportamentais foram realizados entre 13:00-16:00 horas. Utilizamos um n de 7-8 animais por grupo, sendo que cada animal foi utilizado somente uma vez. Os animais foram utilizados de acordo com o Guia do NIH para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. O protocolo e os experimentos foram aprovados pelo Comitê local de Ética em Pesquisa do Animal (CEUA/UFSC). Foram feitos todos os esforços para reduzir o número de animais utilizados.

4.3.2 Injeções intracerebroventriculares (i.c.v.)

As injeções i.c.v. foram realizadas através do método de "free hand" sob anestesia com éter de acordo com procedimento descrito anteriormente (Kaster *et al.*, 2005; Brocardo *et al.*, 2008; Budni *et al.*,

2011; Neis *et al.*, 2014). Resumidamente, uma agulha hipodérmica com 0,4 mm de diâmetro externo, conectada por uma cânula de propileno a uma seringa Hamilton de 25 μ L, foi inserida perpendicularmente através do crânio, não mais de 2 mm para o interior do cérebro de cada camundongo, diretamente no ventrículo lateral. Os camundongos foram anestesiados com éter, durante aproximadamente 15 s apenas o necessário para a perda do reflexo postural, em seguida eram contidos suavemente com a mão para as injeções. A assepsia do local da injeção foi realizada utilizando uma gaze com etanol a 70%. A agulha foi inserida unilateralmente 1 mm para a direita ou a esquerda do ponto médio de uma linha traçada até a base anterior das orelhas (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma, com uma perfuração de 2,4 mm de profundidade). Um volume de 3 μ L das drogas foi injetado diretamente no ventrículo lateral. A injeção foi administrada durante 30 s, e a agulha permaneceu no local por mais 30 s, a fim de evitar o refluxo das substâncias injetadas. Os camundongos exibiam comportamento normal após 1 min da injeção. Para assegurar que as drogas foram administradas exatamente no ventrículo, os cérebros foram dissecados e examinados macroscopicamente após o teste. Camundongos que apresentassem quaisquer sinais de hemorragia cerebral foram excluídos da análise estatística (o descarte total foi inferior a 5% do total de animais utilizados). A eficácia do i.c.v. foi relatada anteriormente por nosso grupo, onde foi observado que 15 minutos após à injeção i.c.v. de ConBr conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC), uma fluorescência forte era observada nos ventrículos a nível do local de injeção, mas também mais caudal ao nível do hipocampo dorsal (Barauna *et al.*, 2006).

4.3.3 CAPÍTULO I:

4.3.3.1 Drogas e tratamento

Foram utilizados os seguintes fármacos: NMDA, cetamina, fluoxetina, D-serina, dizolcipina (MK-801), L-arginina, ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) (Sigma Chemical Co. St. Louis, EUA) e sildenafil (Pfizer, São Paulo, SP, Brasil). Todas as drogas, preparadas antes da administração, foram dissolvidas em solução salina (0,9% NaCl), exceto ODQ (dissolvido em solução salina com 1% de DMSO) e fluoxetina (dissolvido em água destilada). Grupos tratados com veículos apropriados foram avaliados simultaneamente.

MK-801, cetamina, L-arginina e sildenafil foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) com um volume constante de 10 mL/kg de peso corporal. NMDA, D-serina e ODQ foram administrados por via

intracerebroventricular (i.c.v.; 3 μ L/sítio) e fluoxetina foi administrada por via oral (p.o.) através de gavagem com volume constante de 10 mL/kg de peso corporal (Da Silva *et al.*, 2000; Kaster *et al.*, 2005; Brocardo *et al.*, 2008).

ConBr foi diluída em tampão HEPES-salina sem glicose (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 25 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,4). A solução de lectina (3 μ L; 0,1-50 μ g/sítio), ou veículo (3 μ L de tampão HEPES-salina, sem glicose) foram administradas i.c.v. 15 min antes do teste do campo aberto (TCA). Para a obtenção da curva dose-resposta da administração sistêmica de ConBr, os camundongos foram tratados com doses crescentes desta lectina (0,1-50 μ g/sítio; i.c.v.). Foram utilizados como controles positivos a Fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) (Binfare *et al.*, 2009), um antidepressivo clássico, e a cetamina (1 mg/kg, i.p.) (Ludka *et al.*, 2012), um antagonista do receptor de NMDA, que tem sido testado como um novo antidepressivo. Verificamos também se a ação antidepressiva de ConBr era dependente da integridade estrutural da proteína, e da ligação ao CRD na lectina.

Com a finalidade de se investigar a hipótese de que o efeito antidepressivo de ConBr é dependente do sistema glutamatérgico e é mediado através da inibição de receptores NMDA, os camundongos foram pré-tratados com NMDA (0,1 pmol/sítio; i.c.v.) ou com D-serina (30 μ g/sítio, i.c.v.; co-agonista do receptor NMDA), e após 15 min ConBr (10 μ g/sítio, i.c.v.) ou veículo foram administrados. Quinze minutos após, foi realizado o TNF. A dose de NMDA foi escolhida com base em estudos anteriores que mostraram que esta dose não causa sinais evidentes de toxicidade nem alteração na atividade locomotora, mas é capaz de reverter as respostas do tipo antidepressiva de vários compostos (Brocardo *et al.*, 2008).

Investigamos também o efeito de dose sub-ativa de MK-801 (0,001 mg/kg, i.p.) ou cetamina (0,1 mg/kg, i.p.) ambos antagonista do receptor de NMDA, isoladamente ou em associação com uma dose sub-ativa de ConBr (0,1 μ g/sítio, i.c.v.) (30 min após o tratamento com cetamina ou MK-801) e os testes comportamentais foram realizados após 15 min. A dose de cetamina foi escolhida com base em estudos anteriores (Kaster *et al.*, 2012; Ludka *et al.*, 2012).

Para analisar o envolvimento da via L-arginina-NO \cdot no efeito antidepressivo de ConBr, os camundongos foram pré-tratados com L-arginina, (um precursor de NO \cdot ; 750 mg/kg, i.p.), utilizando uma dose que não produz nenhum efeito no TNF. Trinta minutos após a administração de L-arginina, ConBr (10 μ g/sítio, i.c.v.) ou veículo foram injetados, e 15 min mais tarde, o TCA e TNF foram realizados. A dose de

L-arginina foi escolhida com base em uma curva de dose-resposta realizada anteriormente (Da Silva *et al.*, 2000).

Em outro conjunto de experimentos analisamos uma administração combinada de doses sub-ativas de ODQ (30 pmol/sítio) e ConBr (0,1 µg/sítio), sendo os camundongos submetidos ao TCA e TNF 15 minutos após a administração de ConBr.

Para investigar o papel da GMPC na ação antidepressiva de ConBr, os camundongos receberam uma injeção do inibidor da fosfodiesterase 5 (PDE5), sildenafil (5 mg/kg, i.p.) ou veículo 30 min antes da administração de ConBr (10 µg/sítio, i.c.v.). 15 min após a injeção ConBr os camundongos foram submetidos ao TCA e TNF. A dose de sildenafil foi escolhido com base no estudo de (Kaster *et al.*, 2005). Esta dose reverte o efeito antidepressivo de vários compostos (Almeida, Felisbino, *et al.*, 2006; Dhir e Kulkarni, 2007).

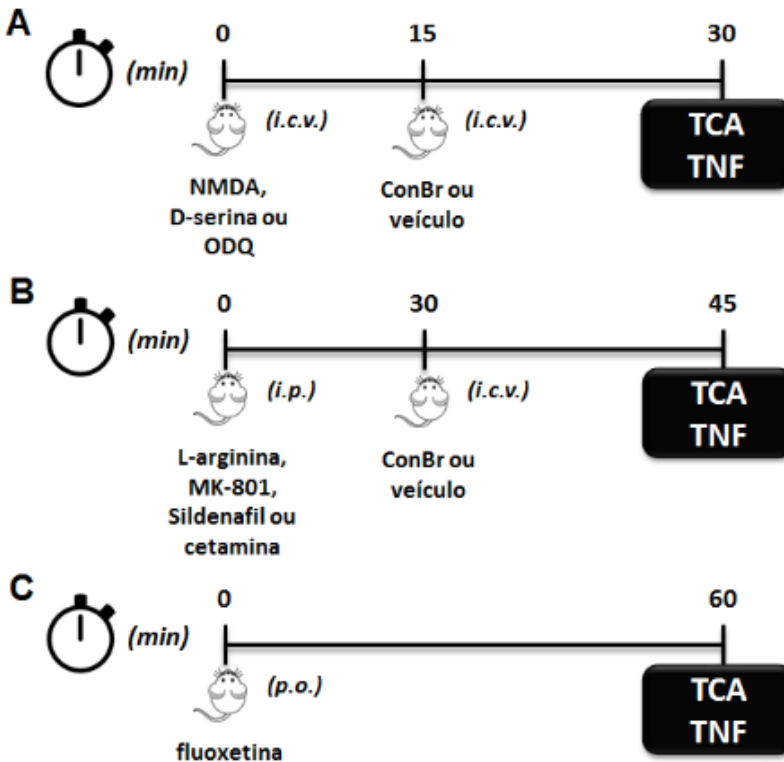


Figura 7. Representação esquemática dos tratamentos e cronograma dos testes comportamentais. (A) Os camundongos receberam NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v.), D-serina (30 µg/sítio, i.c.v.) ou ODQ (30 pmol/sítio, i.c.v.), 15 minutos após os animais foram tratados com veículo (controle) ou ConBr (dose ativa de 10 µg/sítio, ou uma dose sub-ativa de 0,1 µg/sítio) i.c.v. Quinze minutos após este procedimento foram realizados os testes comportamentais do campo aberto (TCA) e teste do nado forçado (TNF). (B) os camundongos receberam L-arginina (750 mg/kg, i.p.), cetamina (0,1 ou 1 mg/kg, i.p.) ou uma dose sub-ativa de MK-801 (0,001 mg/kg, i.p.) ou de sildenafil (5 mg/kg, i.p.). Trinta minutos após, os camundongos foram tratados com veículo (controle) ou ConBr (dose ativa de 10 µg/sítio, ou uma dose sub-ativa de 0,1 µg/sítio). Quinze minutos após este procedimento foram realizados o TCA e TNF (C) Os camundongos receberam fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) e 60 minutos após este procedimento foram realizados o TCA e TNF.

4.3.3.2 Teste do Campo Aberto (TCA)

A fim de excluir a possibilidade de que a diminuição do tempo de imobilidade no TNF seja devido a uma estimulação motora, os camundongos foram avaliados no TCA durante 6 minutos, 60 minutos após a administração das substâncias administradas via p.o., 45 minutos após a administração de substâncias administradas por via i.p. ou 30 minutos após a administração de substâncias administradas i.c.v. como descrito anteriormente (Rosa *et al.*, 2003), sendo sempre 15 min depois da administração de ConBr.

Os animais foram colocados individualmente em uma caixa de madeira (40 × 60 × 50 cm) com o chão dividido em 12 quadrados iguais. O número de quadrados cruzados com as quatro patas (cruzamento) foi contado em uma sessão de 6 min. A base da caixa de madeira foi limpa com álcool 10% entre os testes, sendo estes realizados em uma sala com temperatura e luz controladas.

4.3.3.3 Teste do nado forçado (TNF)

Camundongos foram forçados individualmente a nadar em um recipiente cilíndrico aberto (diâmetro 10 cm, altura 25 cm), contendo 19 cm de água (profundidade) a 25 ± 1 °C, o tempo total que cada animal permaneceu imóvel durante 6 min foi registado em segundos como tempo de imobilidade, tal como descrito anteriormente (Kaster *et al.*, 2005; Brocardo *et al.*, 2008). Cada animal foi considerado imóvel quando deixou de lutar e permaneceu flutuando na água, fazendo apenas os movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água. Uma diminuição da duração da imobilidade é indicativo de um efeito antidepressivo (Porsolt *et al.*, 1977).

4.3.3.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey, quando apropriado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. As análises foram feitas com o programa Statistica™ versão 10 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

4.3.4 CAPÍTULO II:

4.3.4.1 Químicos

Os anticorpos primários anti-fosfo-ERK1/2, anti-fosfo-JNK1/2/3, anti-total-CREB, anti-fosfo-CREB, anti-total-Akt, anti-substratos fosforilados de PKA, anti-fosfo-CaMKII, anti-total-CaMKII, e o reagente LumiGLO (substrato quimioluminescente luminol) foram adquiridos da empresa Cell Signaling Tecnologia (Beverly, MA, EUA). Anti-total-ERK1/2, anti-total-p38^{MAPK}, anti-fosfo-p38^{MAPK}, anti-total-JNK1/2, anti-fosfo-Akt e os inibidores LY294002, H-89 e K252a foram adquiridos da empresa Sigma (St. Louis, MO, EUA). Anti- β -actina e anti-BDNF foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). Os anticorpos secundários anti-rabbit e anti-mouse ambos conjugados com HRP foram adquiridos da empresa Millipore (Billerica, MA, EUA). Acrilamida, bis-acrilamida, β -mercaptoetanol e HybondTM nitrocelulose foram adquiridos da empresa Amersham. HyperfilmTM, dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tris foram obtidos da empresa GE Healthcare Life Sciences (Piscataway, NJ, USA). TRIzol reagente, Oligo (dT) e SuperScript[®]III RT foram adquiridos da empresa Invitrogen. Kit SYBRGreen foi adquirido da empresa Applied Biosystems. Todos os outros reagentes eram de grau analítico.

4.3.4.2 Administração de ConBr

ConBr foi diluída com tampão HEPES-salina sem glicose (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO₄ 1,2 mM, HEPES 25 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,4) a uma concentração final de 3,3 μ g/mL. Os camundongos foram tratados via i.c.v. com ConBr 10 μ g/sítio (3 μ L de uma solução a 3,3 μ g/mL), com veículo (3 μ L de tampão HEPES -salina, sem glucose) ou com ConBr desnaturada (10 μ g/sítio). 0,5, 1, 3, 6, 8, 12, 18 e 24 horas após as injeções, os animais foram sacrificados por decapitação (Figura 8).

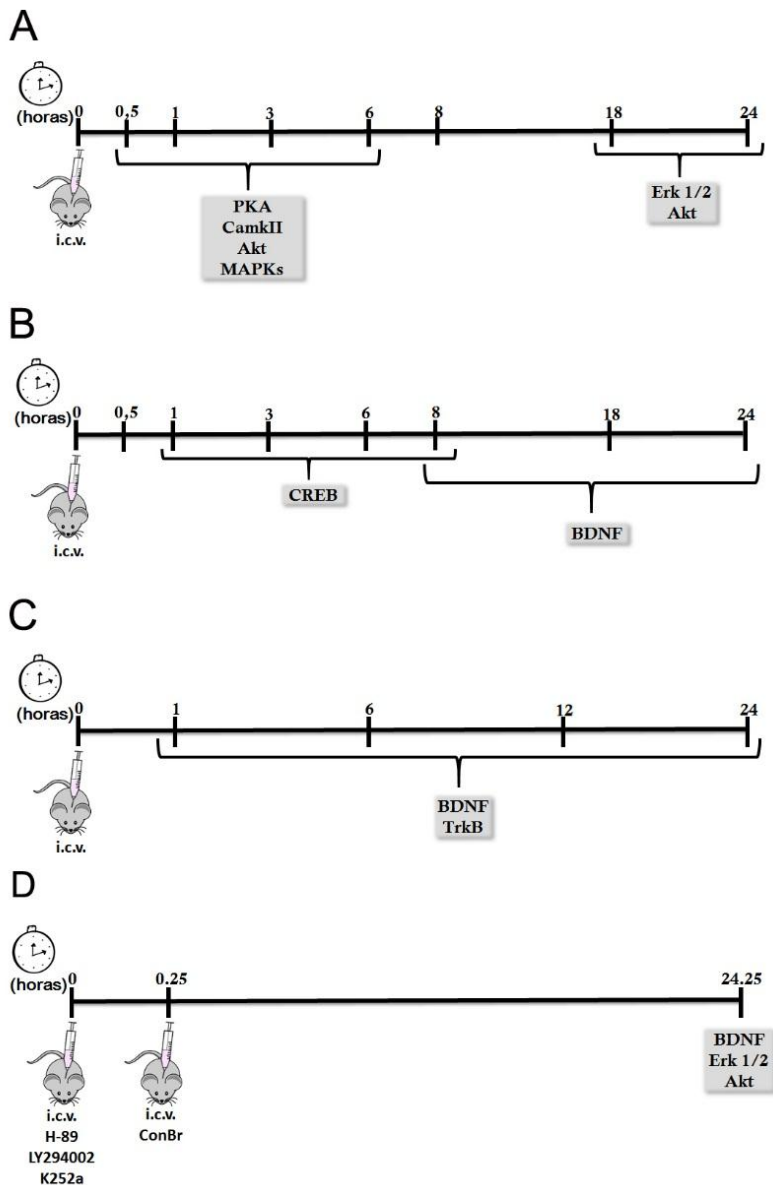


Figura 8. Representação esquemática do protocolo de análises por Western Blot e qRT-PCR. Os animais foram tratados via i.c.v. com ConBr 10 µg/sítio (3 µL de uma solução a 3,3 µg/mL), com veículo (3 µL de tampão HEPES-salina,

sem glucose), ou com ConBr desnaturada (10 µg/sítio). (A) 0,5, 1, 3, 6 h após as injeções foram realizadas as análises por Western Blot para as proteínas PKA, CaMKII, Akt e as MAPKs. Nos tempos de 18 e 24 h após as injeções foram realizadas as análises por Western Blot para as proteínas ERK 1/2 e Akt. (B) 1, 3, 6 e 8 h após as injeções foram realizadas as análises por Western Blot para o fator de transcrição CREB. Nos tempos de 8, 18 e 24 h após as injeções foram realizadas as análises por Western Blot para BDNF. (C) 1, 6, 12 e 24 h após as injeções os níveis de mRNA de BDNF e TrkB foram medidos por qRT-PCR. (D) Os animais foram tratados via i.c.v. com os inibidores H-89 (1 µg/sítio), LY294002 (10 µg/sítio) e K252a (1 µg/sítio) ou solução controle e 15 minutos após receberam injeção de ConBr. 24 h após a injeção de ConBr foram realizadas as análises por Western Blot dos níveis de BDNF e estado de fosforilação de ERK1/2 e Akt.

4.3.4.3 Preparação das amostras

Os animais foram sacrificados por decapitação, os encéfalos removidos e os hipocampus foram rapidamente dissecados em "solução de corte" (sacarose 110 mM, NaCl 60 mM, KCl a 3 mM, KH₂PO₄ 1,25 mM, CaCl₂ 0,5 mM, Mg₂SO₄ 7 mM, glicose 5 mM, HEPES 25 mM, pH 7,4) a 4 °C e colocados em nitrogênio líquido, seguido pelo armazenamento à temperatura de -80 °C até à sua utilização. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente (Oliveira *et al.*, 2008). Resumidamente, as amostras foram mecanicamente homogeneizadas em 300 µL de Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol a 10% e Cocktail de inibidores de proteases (Sigma, P2714), e incubados durante 10 min em gelo. Os lisados foram centrifugados (10.000 × g durante 10 min, a 4 °C) para eliminar os detritos celulares, os sobrenadantes foram utilizados para análise por Western blot.

4.3.4.4 Tratamento com inibidores

Inibidores seletivos para as proteínas cinases foram injetados i.c.v. Neste estudo utilizamos LY294002 (10 µg/sítio, 3 µL; inibidor seletivo da PI3K) e H-89 (1 µg/sítio, 3 µL; inibidor seletivo da PKA). Os animais também foram tratados com K252a (1 µg/sítio, 3 µL). O K252a é um inibidor não específico de tirosina-cinase (Knusel e Hefti, 1992) que bloqueia a autofosforilação de TrkB e inibem muitas das funções biológicas do BDNF (Nye *et al.*, 1992).

Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina com 1% de DMSO e foram injetadas 15 min antes da injeção i.c.v. de ConBr (figura 8). A dose de LY294002 foi baseada no estudo de (Bettio *et al.*, 1012), e

H-89 baseou-se no estudo de (Cunha *et al.*, 2012). A dose de K252a foi baseada nos estudos de (Yamada *et al.*, 2011; Takasaki *et al.*, 2013).

4.3.4.5 Western blotting

Análise de western blot foi realizada como descrito anteriormente (Leal *et al.*, 2002; Cordova *et al.*, 2004). Os sobrenadantes das amostras foram diluídos a 1/1 (v/v) em Tris 100 mM pH 6,8, EDTA 4 mM, SDS a 8% e aquecidas a 100 °C durante 5 min. Após foi adicionado a amostra uma solução de glicerol a 40%, Tris 100 mM, azul de bromofenol, pH 6,8 na proporção de 25:100 (v/v) e adicionado β -mercaptoetanol (concentração final de 8%). A dosagem de proteína foi realizada pelo método descrito por Peterson (Peterson, 1977) e a concentração proteica estimada a partir de uma curva padrão de albumina bovina. Para a comparação dos sinais obtidos, a mesma quantidade proteica (60 μ g por poço) para cada amostra foi eletrotransferida ao minigel de SDS-PAGE 10% e transferidos para as membranas de nitrocelulose ou polivinilideno de fluoreto (PVDF). Para controle da eficiência do processo de transferência, os géis foram corados com Coomassie blue (azul Coomassie R-250 0,1%, metanol 50%, ácido acético 7%) e as membranas com Ponceau 0,5% em ácido acético 1%.

As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). O conteúdo de BDNF e ambas as formas fosforiladas e totais de CREB, CaMKII, MAPKs e Akt foram detectadas após incubação durante a noite com anticorpos específicos diluído em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5) contendo BSA a 2% em diluições de 1:1000 [anti-phospho-JNK1/2/3, anti-fosfo-p38^{MAPK}, anti-fosfo-Akt (Ser⁴⁷³), anti-total-Akt, anti-fosfo-CREB (Ser¹³³), anti-total-CREB, anti-fosfo-CaMKII (Thr²⁸⁶ e Thr²⁸⁷), anti-total-CaMKII e anti-BDNF], 1:2000 (anti-fosfo-ERK1/2, anti-fosfo-substratos de PKA), 1:5000 (anti-total-JNK1/2), 1:10.000 (anti-total-p38MAPK) e 1:40.000 (anti-total-ERK1/2). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário, anti-rabbit ou anti-mouse conjugados a peroxidase (HRP) (1:5.000) durante 1 h e a imunoreatividade das bandas foi detectada por quimioluminescência (LumiGLO®). Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens (5 min) das membranas com TBS-T. A fim de se assegurar que a mesma quantidade proteica foi adicionada em cada grupo experimental, a quantidade de β -actina foi avaliada usando um anticorpo anti- β -actina (Santa Cruz, 1:1000).

A densidade óptica (DO) das bandas foi quantificada usando Scion Image software®. O nível de fosforilação da Akt, CaMKII,

p38^{MAPK}, JNK 1/2/3, ERK1/2 e CREB foram determinados pela razão entre a DO da forma fosforilada/DO da forma total. No caso dos fosfo-substratos de PKA o nível de fosforilação foi determinado em relação a β -actina. O imunoc conteúdo de BDNF foi determinado pela relação entre a DO de BDNF/DO de β -actina. (Calloni *et al.*, 2005; Posser *et al.*, 2007). Os dados são expressos como porcentagem do controle (considerado como 100%), e os valores são apresentados como média \pm SEM.

Tabela 1. Fabricante, número de catálogo e diluição dos anticorpos utilizados para western blot.

ANTICORPO	NÚMERO DE CATÁLOGO	DILUIÇÃO
Phospho-p44/42 MAPK (Thr ²⁰² / Tyr ²⁰⁴)	Cell Signalling (#4370)	1:2.000
Anti-Mitogen Activated protein kinase (ERK1 & ERK2)	Sigma (M 5670)	1:40.000
Anti-phospho-p38 (pThr ¹⁸⁰ /pTyr ¹⁸²)	Sigma (P1491)	1:1.000
Anti-p38 MAP kinase	Sigma (M 0800)	1:10.000
Phospho-SAPK/JNK (Thr ¹⁸³ /Tyr ¹⁸⁵)	Cell Signalling (#9251)	1:1.000
Anti-c-Jun N- Terminal Kinase (JNK1, JNK2)	Sigma (J 4500)	1:5.000
Anti-Phospho-PKB (ser ⁴⁷³)	Sigma (T 4112)	1:1.000
Anti- AKT	Cell Signalling (#9672)	1:1.000
Anti-phospho-CREB (ser ¹³³)	Cell Signalling (#9198)	1:1.000
Anti-CREB (48H2)	Cell Signalling (#9197)	1:1.000
B-actin (C4)	Santa Cruz (sc- 47778)	1:1.000
Anti-Brain Derived Neurotrophic Factor	Santa Cruz (sc564)	1:1.000
Goat anti-rabbit IgG, peroxidase Conjugated	Millipore (#AP132P)	1:5.000

Goat anti-Mouse IgG, (H+L) HPR conjugated	Millipore (#AP308P)	1:5.000
Anti-Phospo-PKA substrate (RRXS* /T*)	Cell Signalling (#9624)	1:2.000
Anti-phospo-CaMKII (Thr ²⁸⁶ e Thr ²⁸⁷)	Cell Signalling (#3361)	1:1.000
Anti-CaMKII	Cell Signalling (#3362)	1:1.000

4.3.4.6 Isolamento de RNA total

Os níveis de mRNA de BDNF e TrkB foram medidos a partir dos grupos animais mencionados anteriormente. Os animais foram submetidos a eutanásia por decapitação, o cérebro dissecado e o hipocampo rapidamente colocados em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até o uso. Posteriormente as amostras foram descongeladas e homogeneizadas em 500 µL de TRIzol e o RNA total extraído de acordo com as instruções do fabricante. Os métodos de isolamento de RNA foram realizados de acordo com (Chomczynski e Sacchi, 1987).

4.3.4.7 qRT-PCR

Um micrograma de RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA e análise da expressão gênica por PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR). A transcrição reversa foi realizada na presença de 2 µL de dNTPs 5 mM, 1 µL do primer Oligo, SuperScript®III RT (200U/µL). As condições de reação foram: 65 °C por 5 min, arrefecimento a 20 °C por 1 min, 50 °C por 60 min e 70 °C por 15 min.

O produto da reação foi amplificado por qRT-PCR no termociclador Realplex 4S, utilizando o kit de reação SYBRGreen. As condições de termociclagem foram 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 55 °C por 15 s, 60 °C por 20 s. Este procedimento foi seguido por curva de fusão a 95 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e aumento gradual da temperatura por 20 min terminando com 95 °C por 15 s. Os experimentos foram realizados em quadruplica para cada ponto de dados. A abundância de mRNAs de BDNF e TrkB foi quantificado em valores relativos, em comparação com uma referência interna, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT), cuja abundância se acredita não mudar entre condições experimentais diferenciadas. Os primers utilizados para qRT-PCR foram os seguintes: HPRT (camundongo) frente do primer 5'-AAGACTTGCTCGAGATGTCAGAA-3' e primer reverso 5'-

ATCCAGCAGGTCAGCAAAGAA-3' (Chiaruttini *et al.*, 2008). BDNF (camundongo) frente do primer 5'-CAGGTGAGAAGAGTGATGACC-3' e primer reverso 5'-ATTCACGCTCTCCCAGAGTCCC -3' (Chiaruttini *et al.*, 2008), e TrkB catalítico (camundongo) frente do primer 5'-CATGAAAGGCCAGCTTCGGTCA-3' e primer reverso 5'-GTCGGGACCGCCCTCCGAAG-3' (GenBank™ número de acesso NM 001025074.1).

Valores quantitativos para transcrição do mRNA de BDNF, TrkB e HPRT foram obtidos a partir do número de ciclos limites, onde o aumento do sinal associado a um crescimento exponencial dos produtos de PCR começam a ser detectados. Curvas de fusão foram geradas no final de cada corrida para garantir a uniformidade do produto. Os níveis dos genes alvo foram normalizados com base na expressão de HPRT como controle endógeno de RNA. Valores ΔC_t das amostras foram determinados subtraindo-se os valores médios de C_t dos genes alvo a partir do valor médio de C_t do controle interno HPRT. $\Delta\Delta C_t$ foi determinado subtraindo-se os valores médios de ΔC_t dos grupos tratados pelos valores médios de ΔC_t do grupo controle. Como é raro usar $\Delta\Delta C_t$ como dados relativos devido a sua característica logarítmica, o parâmetro $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi usado para expressar os dados de expressão relativa (Livak e Schmittgen, 2001).

4.3.4.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. As análises foram feitas com o programa Statistica™ versão 10 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

4.4 Experimentos *in vitro*:

4.4.1 Animais

Culturas organotípicas de hipocampo foram preparadas utilizando ratos Sprague Dawley com 8-10 dias de idade. Experimentos para avaliar as mudanças nos níveis de Ca^{2+} foram realizados em embriões de ratos Sprague Dawley com 18 dias de idade. O uso de animais para os ensaios experimentais foram realizados seguindo a diretiva do Conselho da Comunidade Europeia emitida para esses fins e foram aprovados pelo Comitê de Ética da Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Foram utilizados todos os esforços para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

4.4.2 Químicos

Iodeto de propídio (IP), Hoechst, H₂DCFDA e TMRE foram adquiridos da empresa Molecular Probes (Leiden, Holanda). Anti-fosfo-Akt, anti-fosfo-ERK1/2, anti-total-Akt, anti-total-ERK1/2, anti-β-actina, os anticorpos secundários conjugados com peroxidase, papaína, poli-D-lisina, triton X-100, MK-801 e estreptomicina/penicilina foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (Madrid, Espanha). 2-deoxiglicose, nifedipina, e Fluo-4/AM foram adquiridos da empresa Molecular Probes (Invitrogen, Barcelona, Espanha). Meio de cultivo Neurobasal, suplementos B27 e B27 menos AO, L-glutamina e gentamicina foram adquiridos da empresa Life Technologies (Madrid, Espanha). Penicilina e soro fetal bovino foram adquiridos da empresa Invitrogen (Madri, Espanha).

4.4.3 Preparação das culturas organotípicas de hipocampo (COH)

As culturas foram preparadas de acordo com os métodos descritos por (Stoppini *et al.*, 1991) com algumas modificações. Resumidamente, os cérebros foram retirados a 4 °C e os hipocampus dissecados e fatiados na espessura de 300 μm, utilizando um fatiador de tecidos de McIlwain e as fatias separadas em solução equilibrada de sais de Hank's gelada (HBSS-Hank's Balanced Salt Solution) composto (em mM) de glucose 15, CaCl₂ 1,3, KCl 5,36, NaCl 137,93, KH₂PO₄ 0,44, Na₂HPO₄ 0,34, MgCl₂ 0,49, MgSO₄ 0,44, NaHCO₃ 4,1, HEPES 25, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de gentamicina. Aproximadamente 4-6 fatias foram colocadas em uma membrana de cultivo Millicell - 0,4 mM (Millipore, Madrid, Espanha) e mantidas durante 7 dias em placas de cultura de seis poços contendo 1 mL de meio de cultura. COH foram mantidas em atmosfera humidificada a 37 °C e 5% de CO₂ com meio Neurobasal contendo suplemento B27 1×, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina. O meio de cultivo foi trocado a cada três dias. No período de reoxigenação o meio foi substituído por meio Neurobasal contendo suplemento B27 menos antioxidantes 1×, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina (Huuskonen *et al.*, 2005; Parada *et al.*, 2013).

4.4.4 Tratamento dos COH

ConBr foi diluída com tampão HEPES-salino sem glicose, composto (em mM) por NaCl 124, KCl 4, MgSO₄ 1,2, HEPES 25, CaCl₂ 1, pH 7,4. Para determinar se a ação ConBr depende da integridade da sua estrutura proteica, ConBr foi desnaturada. A fim de bloquear o domínio

de reconhecimento de carboidratos na ConBr, a lectina foi bloqueada com seu açúcar específico. COHs foram tratados durante 24 h com ConBr (0,01, 0,1 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ConBr bloqueada (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ConBr desnaturada (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), nifedipine em concentração ativa (3 $\mu\text{M}/\text{mL}$) ou sub-ativa (0,3 $\mu\text{M}/\text{mL}$) diluídas no meio de reoxigenação.

4.4.5 Privação de oxigênio e glicose (POG)

POG foi usado como um modelo *in vitro* de isquemia cerebral. As membranas contendo as fatias foram transferidas para uma placa estéril contendo 1 mL de solução de POG, composto (em mM) por NaCl 137,93, KCl 5,36, CaCl_2 2, MgSO_4 1,19, NaHCO_3 26, KH_2PO_4 1,18 e 2-deoxiglicose 11. As culturas foram alocadas em uma câmara de anóxia (Billups e Rothenberg, Del Mar, CA, EUA) e foram expostas durante 5 minutos a um fluxo de gás composto de 95% de N_2 / 5% de CO_2 para assegurar a privação de oxigênio. Depois disso, a câmara foi selada durante 15 min a 37 °C. As culturas controle foram mantidas durante o mesmo período, sob uma atmosfera normóxica e em uma solução controle com composição semelhante à de POG, exceto que foi adicionado glicose (15 mM) ao invés de 2-deoxiglicose. Após o período de POG, as culturas foram devolvidas às suas condições originais de cultivo por 24 horas, chamado o período de reoxigenação (Parada *et al.*, 2013). A Figura 9 mostra um esquema do protocolo de POG para COH.

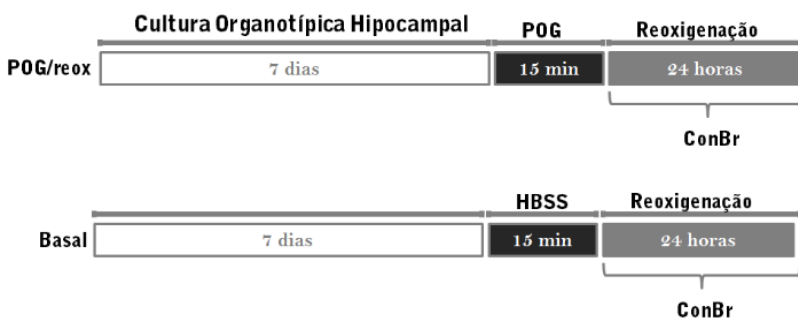


Figura 9. Representação esquemática do protocolo de POG. (A) COH foram expostas durante 15 minutos a POG ou (B) COH foram mantidas durante o mesmo tempo sob atmosfera normóxica em uma solução controle (HBSS) com a mesma composição que a solução de POG, mas contendo glicose (15 mM) em vez de 2-deoxiglicose. Após estes procedimentos as fatias de hipocampo voltaram para as condições de cultura originais durante 24 horas (período de reoxigenação; Reox). Os tratamentos (ex. ConBr e nifedipina) foram realizadas durante todo o período de Reox.

4.4.6 Determinação da morte celular por Iodeto de Propídio

A morte celular foi determinada na região CA1 do hipocampo por coloração do com iodeto de propídio (IP). Resumidamente, 30 minutos antes da análise de fluorescência, os cortes foram incubados com IP (1 mg/mL) e Hoechst (2 µg/mL). A coloração de Hoechst foi utilizada com o intuito de normalizar a fluorescência de IP com o número de núcleos. Níveis de fluorescência foram medidos em microscópio de fluorescência invertido NIKON Eclipse T2000-L (Izasa, Madrid, Espanha). Os comprimentos de onda de excitação e emissão de IP e Hoechst eram 530/350 e 580/460 nm respectivamente. Imagens da região CA1 foram feitas em ampliações de 10 ×. As análises de fluorescência foram realizadas utilizando o programa Metamorph versão 7.0. Para calcular a morte das células, a média de fluorescência de IP foi dividida pela média de fluorescência de Hoechst, como anteriormente descrito (Egea *et al.*, 2011). Os dados foram normalizados com os valores de controle que eram considerados como 100%.

4.4.7 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m)

Para a estimativa do Ψ_m , ao final do período de reoxigenação os COH foram carregados com TMRE (100 nM) e Hoechst (2 µg/mL). Coloração Hoechst foi utilizado para normalizar a fluorescência de TMRE com o número de núcleos. Níveis de fluorescência foram medidos em microscópio de fluorescência invertido NIKON Eclipse T2000-L (Izasa, Madrid, Espanha). O comprimento de onda de excitação e de emissão para TMRE é 450/580. As imagens foram tiradas a partir de CA1 em ampliações de 10 ×. As análise de fluorescência foram realizadas utilizando o programa Metamorph versão 7.0. Para calcular Ψ_m , dividiu-se a média de fluorescência de TMRE pela média de fluorescência de Hoechst, como descrito anteriormente (Egea *et al.*, 2011). Os dados foram normalizados com os valores de controle que eram considerados como 100%.

4.4.8 Avaliação da produção de EROs

Para medir a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), utilizamos a sonda molecular H₂DCFDA (Ha *et al.*, 1997), que se difunde através da membrana celular e é hidrolisada por esterases intracelulares formando diclorofluoresceína não fluorescente (DCFH). DCFH reage principalmente com o H₂O₂ intracelular para formar diclorofluorescina (DCF), um corante fluorescente verde. Trinta minutos antes da análise por fluorescência as COH foram carregadas com H₂DCFDA (10 pM) e

Hoechst (2 µg/mL). A coloração de Hoechst foi utilizada para normalizar a fluorescência de DCF com o número de núcleos. A fluorescência foi medida em microscópio de fluorescência invertido NIKON Eclipse T2000-L (Izasa, Madrid, Espanha). O comprimento de onda de excitação e emissão de DCF é 485/520 nm. As imagens foram tiradas de CA1 com ampliações de 10 ×. A análise de fluorescência foi realizada utilizando o programa Metamorph versão 7.0. Para calcular a geração de EROs, dividiu-se a média de fluorescência de DCF pela média de fluorescência de Hoechst, como descrito anteriormente (Egea *et al.*, 2011). Os dados eram normalizados com os valores de controle que eram considerados como 100%.

4.4.9 Western Blotting

Após os tratamentos, as fatias foram cuidadosamente separadas das membranas e lisadas em 100 µL de tampão de lise gelado (1% de Nonidet P-40, 10% de glicerol, 137 mM de NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 µg/mL de leupeptina, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo, 20mM de NaF, 1 mM de pirofosfato de sódio e 1 mM de Na₃VO₄). A proteína (aproximadamente 30 µg) foi eletrotransferida ao minigel de SDS-PAGE 10% e transferidas para as membranas Immobilon-P (Millipore Corp, Billerica, MA, USA). As membranas foram incubadas com anti-fosfo-Akt (1:1000), anti-fosfo-ERK 1/2 (1:1000) anti-total-Akt (1:1000), anti-total-ERK1/2 e anti-β-actina (1:100.000). Os anticorpos secundários apropriados conjugados com peroxidase (1:10.000) foram utilizados para detectar as proteínas por quimioluminescência. As bandas de proteínas foram quantificadas utilizando o programa Scion Image. Os resultados correspondem a uma média de 4-5 experimentos.

4.4.10 Cultura primária de neurônios hipocampus de ratos

Para estudar as alterações nos níveis de Ca²⁺ citosólico ([Ca²⁺]_c) foram realizadas culturas primárias de neurónios do hipocampo, preparados a partir de embriões de ratos de 18 dias de idade. Após o isolamento do cérebro, os hipocampus foram dissecados em tampão fosfato-salina a 4 °C, utilizando um estereomicroscópio. O tecido foi digerido com 0,5 mg/mL de papaína dissolvida em tampão fosfato-salina livre de Ca²⁺ - Mg²⁺ contendo 1 mg/mL de BSA e glucose 6 mM a 37 °C durante 20 min. A solução de papaína foi substituída por 5 mL de meio Neurobasal suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O tecido digerido foi desagregado e a suspensão de células centrifugadas durante 4 minutos a 120 × g. As células foram novamente suspensas em 5 mL de meio Neurobasal suplementado com 10% de SFB, 50 mg/mL de

estreptomicina/penicilina e 50 mg/mL de gentamicina, e colocadas em placas pretas de 96 poços revestidos com poli-D-lisina (0,1 mg/mL) a uma densidade de 30.000 células por poço. As células foram mantidas numa incubadora a 37 °C com 5% de CO₂. Após 4 h, o meio foi substituído por meio fresco contendo suplemento B27 e livre de SFB. Os experimentos foram realizados após 7 dias em cultura (Lorrio *et al.*, 2012).

4.4.11 Medição de Ca²⁺ intracelular em neurônios hipocâmpais de ratos

Ca²⁺ intracelular foi medido como descrito anteriormente (Lorrio *et al.*, 2012). Resumidamente, as células foram carregadas com Fluo-4/AM (3 mM) diluído em meio Neurobasal durante 1 h a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução de Krebs-HEPES com a seguinte composição (mM): NaCl 140, KCl 5,6, MgCl₂ 1,2, CaCl₂ 2, HEPES 10, D-glicose 11, pH 7,4 e incubadas com diferentes concentrações de ConBr (0,01 a 100 µg/mL) durante 15 min antes das injeções das soluções concentradas de glutamato (concentração final de 100 µM) ou de potássio (concentração final de 70 mM). As medições de fluorescência foram realizadas durante 14 s após a injeção dos agonistas em um leitor de microplacas (Fluostar Optima, BMG, a Alemanha). Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram de 485/520 nm, respectivamente. Ao final 50 µL de Triton a 5% foi adicionado a cada poço para calcular a fluorescência máxima (F_{max}) e, em seguida, 50 µL de MnCl₂ 1 M para obter a fluorescência mínima (F_{min}). As respostas evocadas por ConBr foram expressas como percentagem dos valores de fluorescência em cada ponto de tempo (F) menos os valores mínimos de fluorescência (F₀) dividido por F_{max} - F_{min} como se segue:

$$F_{520} = (F - F_0) / (F_{max} - F_{min}) \%$$

O valor máximo de F₅₂₀, obtido para cada experiência, foi considerado como o valor de pico F₅₂₀.

4.4.12 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo *post-hoc* de Tukey. Um valor de p<0,05 foi considerado significativo. As análises foram feitas com o programa Statistica™ versão 10 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

5 RESULTADOS

Os resultados estão divididos em três capítulos para apresentação mais clara dos dados desta tese.

O **CAPÍTULO I** refere-se aos resultados obtidos de estudo *in vivo* onde investigamos o possível envolvimento do sistema glutamatérgico (através de receptores NMDA) e da via L-arginina-NO no efeito tipo antidepressivo provocada pela administração central de ConBr em camundongos avaliados pelo TNF (Artigo Aceito para publicação na revista *Pharmacology Biochemistry and Behavior*).

O **CAPÍTULO II** refere-se aos resultados obtidos de estudo *in vivo* onde investigamos as vias de sinalização moduladas por ConBr, com foco em sistemas de sinalização intracelular envolvidos em mecanismos antidepressivos e de neuroplasticidade e neuroproteção (artigo submetido a revista *Journal of Molecular Recognition* – em fase final de resposta R1).

O **CAPÍTULO III** refere-se aos resultados obtidos durante o Doutorado Sanduíche no Exterior (bolsa de estudos concedida pelo CNPq) durante o período de 6 meses (01/09/2012 até 28/02/2013) no laboratório coordenado pela professora Manuela G. López no Departamento de Farmacologia da Escola de Medicina da Universidad Autonoma de Madrid - Espanha. Os resultados demonstram a prevenção, pelo tratamento com ConBr, dos danos celulares e neuroquímicos induzidos pela POG em um modelo de cultura organotípica de hipocampo e sugere possíveis mecanismos envolvidos na sua ação.

5.1 CAPÍTULO I

No presente capítulo investigamos o possível envolvimento do sistema glutamatérgico (através de receptores NMDA) e da via L-arginina-NO· no efeito tipo antidepressivo provocada pela administração central do ConBr em camundongos avaliados pelo TNF.

Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: evidence for the involvement of the glutamatergic system

Débora K. Rieger^{a†}, Ana Paula Costa^{a†}, Josiane Budni^a, Morgana Moretti^a, Sabrina Giovana Rocha Barbosa^a, Kyria S. Nascimento^b, Edson H. Teixeira^b, Benildo S. Cavada^b, Ana Lúcia S. Rodrigues^a, Rodrigo B. Leal^{a*}

(Artigo Aceito para publicação na revista *Pharmacology Biochemistry and Behavior*).

5.1.1 Efeito da administração de ConBr no tempo de imobilidade dos animais no TNF e na atividade locomotora no TCA em camundongos

Os resultados apresentados na Figura 10A mostram o efeito do tratamento com ConBr (0,1-50 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) no tempo de imobilidade no TNF. O tratamento com ConBr produziu uma redução significativa no tempo de imobilidade no TNF, nas doses de 1-50 $\mu\text{g/sítio}$ ($p < 0.0001$), ao passo que a administração de ConBr na dose de 0,1 $\mu\text{g/sítio}$ (dose sub-ativa) não alterou o tempo de imobilidade. A Figura 10B mostra o efeito de ConBr (0,1-50 $\mu\text{g/sítio}$) no TCA. ConBr em doses mais baixas (0,1-10 $\mu\text{g/sítio}$) não provocou uma mudança significativa na atividade de locomoção. No entanto, a dose mais elevada (50 $\mu\text{g/sítio}$) causou um aumento da atividade de locomoção, quando comparado com o grupo de controle ($p = 0.0252$).

A administração de ConBr não produziu sinais evidentes de toxicidade, como convulsões, comportamento estereotipado ou ataxia. Além disso, o efeito antidepressivo exibido pela ConBr (10 $\mu\text{g/sítio}$) foi semelhante ao observado para os medicamentos utilizados como controle positivo, fluoxetina e cetamina. Com base em todos estes resultados, a dose de 10 $\mu\text{g/sítio}$ e 0,1 $\mu\text{g/sítio}$ foram selecionados como a dose ativa e sub-ativa de ConBr, respectivamente.

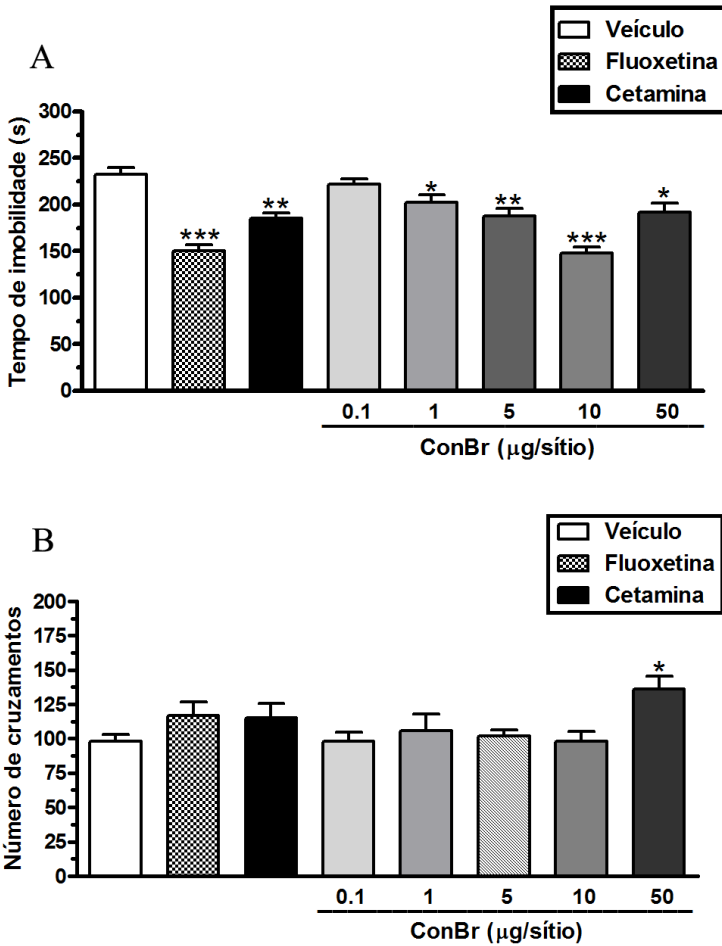


Figura 10. Efeito antidepressivo de ConBr no TNF. Efeito da administração de ConBr (0,1-50 µg/sítio, i.c.v.) no TNF (A) e TCA (B). ConBr foi administrada 15 minutos antes dos testes. Fluoxetina (10 mg/kg, p.o.) e cetamina (1 mg/kg, i.p.), foram utilizadas como controles positivos. Os valores são expressos como média \pm SEM, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo tratado com veículo (n=5-8).

5.1.2 Ações da Lectina ConBr desnaturada e conjugada a manose no tempo de imobilidade dos animais no TNF e na atividade locomotora no TCA em camundongos

Com o intuito de verificar se o efeito antidepressivo produzido pela lectina ConBr depende da integridade de sua estrutura terciária/quaternária, a lectina (3,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi mantida por 5 min em banho à temperatura de 90 °C, afim de promover a sua desnaturação. Observamos que a desnaturação de ConBr bloqueou o efeito observado com a lectina nativa no TNF (Figura 11A).

Adicionalmente, verificamos que ConBr perdeu seu efeito antidepressivo depois de ter o seu CRD bloqueado por manose, comprovando que a diminuição do tempo de imobilidade induzida pela administração do ConBr é dependente da ligação da lectina ao CRD (Figura 11C). Os tratamentos não causaram diferenças significativas na atividade locomotora dos animais.

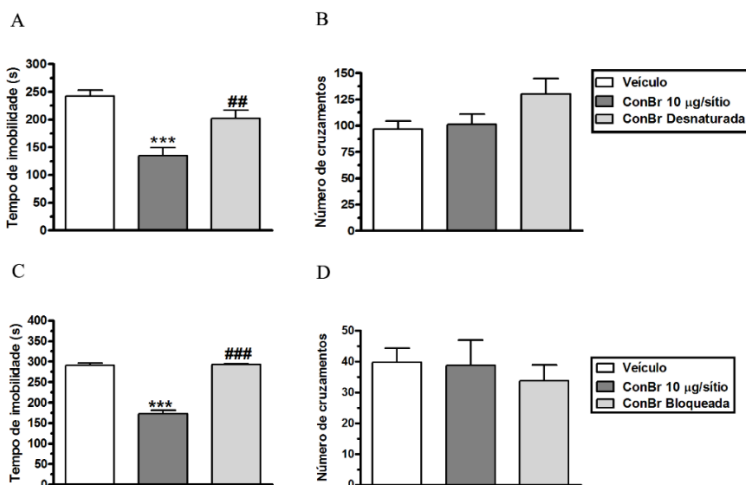


Figura 11. O efeito antidepressivo de ConBr depende de suas propriedades estruturais e de sua interação com o CDR. Efeito do tratamento de ratos com ConBr (10 $\mu\text{g}/\text{síto}$), ConBr desnaturado no TNF (A) e TCA (B) ou ConBr bloqueada no TNF (C) e TCA (D). ConBr foi desnaturada por fervura (90 °C, 5 min) e foi bloqueada com manose (100 mM). ConBr, ConBr desnaturado ou ConBr bloqueada foi injetada via i.c.v. 15 minutos antes dos testes. Os valores são expressos como média \pm SEM, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo veículo e ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ em comparação ao grupo ConBr desnaturada ou bloqueada (n=5-6).

5.1.3 Envolvimento dos receptores NMDA no efeito do tipo antidepressivo de ConBr

A fim de determinar se a ação antidepressiva de ConBr no TNF é dependente dos receptores NMDA, os animais foram pré-tratados com NMDA (0,1 pmol/sítio) ou D-serina (30µg/sítio, co-agonista de receptores NMDA), antes da administração de ConBr (10 µg/sítio). Os resultados apresentados na Figura 12A mostram uma diminuição significativa no tempo de imobilidade induzida pela administração de ConBr (10 µg/sítio; $p=0,00158$). O pré-tratamento dos camundongos com NMDA foi capaz de abolir o efeito antidepressivo do ConBr no TNF ($p=0,01076$) (pré-tratamento NMDA [F (1,22) =1,55; $p=0,22564$]; tratamento ConBr [F (1,22) =11,64; $p=0,00250$] e interação NMDA × ConBr [F (1,22) =7,30; $p=0,01300$]). A Figura 12B mostra que o efeito antidepressivo de ConBr (10 µg/sítio; $p=0,00019$) no TNF também foi abolido em camundongos pré-tratados com D-serina (30 µg/sítio; $p=0,00016$), pré-tratamento D-serina [F (1,21) =12,90; $p=0,00171$], tratamento ConBr [F (1,21) =20,71; $p=0,00017$] e interação D-serina × ConBr [F (1,21) =16,57; $p=0,00055$]).

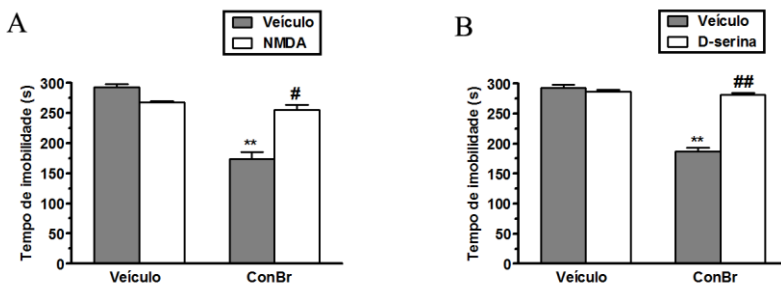


Figura 12. Envolvimento dos receptores NMDA no mecanismo antidepressivo de ConBr no TNF. Efeito do pré-tratamento com NMDA (0,1 pmol/sítio) (A) ou D-serina (30 µg/sítio) (B) sobre o efeito anti-imobilidade de ConBr no TNF ($n = 6-8$). ConBr (10 µg/sítio) foi administrada 15 minutos antes do teste. Os resultados representam a média \pm SEM, ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo veículo e # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ quando comparado com o grupo ConBr.

Os resultados apresentados na Figura 13A mostram um efeito do tipo antidepressivo obtido pela administração combinada de doses subativas do antagonista do receptor de NMDA MK-801 (0,001 mg/kg) e ConBr (0,1 µg/sítio) no TNF, em comparação com cada um dos compostos isoladamente. ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas para o tratamento com MK-801 [F (1,21) =22,48;

$p=0,00011$], tratamento com ConBr [F (1,21) =31,13; $p=0,00001$] e a interação do tratamento com MK-801 \times tratamento com ConBr [F (1,21) =10,60; $p=0,00377$]. O teste *post-hoc* indicou um efeito sinérgico antidepressivo no TNF no grupo que recebeu ConBr combinado com MK-801 ($p=0,00017$). Os tratamentos não causaram diferenças significativas na atividade locomotora (Figura 13B).

A Figura 13C mostra que a coadministração de doses sub-ativas de ConBr (0,1 $\mu\text{g/sítio}$) e cetamina (0,1 mg/kg) causou um efeito do tipo antidepressivo no TNF, em comparação com cada um dos compostos isoladamente. ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo para o tratamento com cetamina [F (1,25) =28,973; $p=0,000014$], tratamento com ConBr [F (1,25) =33,687; $p=0,000005$] e a interação do tratamento com cetamina \times tratamento com ConBr [F (1,25) =12,980; $p=0,0013$]. O teste *post-hoc* indicou um efeito sinérgico do tipo antidepressivo no TNF no grupo que recebeu ConBr combinado com cetamina ($p=0,00016$). A administração de cetamina per se ou em combinação com ConBr não afetou a atividade locomotora dos animais no TCA como mostrado na Figura 13D.

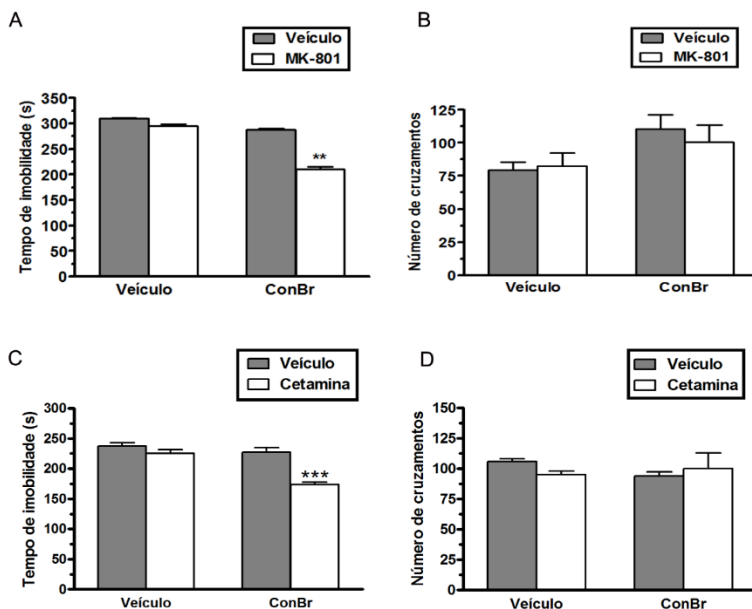


Figura 13. Efeito antidepressivo sinérgico de ConBr com antagonistas do receptor de NMDA, MK-801 e cetamina. Efeitos de uma administração combinada de doses sub-ativas de MK-801 (0,001 mg/kg) e ConBr (0,1 $\mu\text{g/sítio}$)

no TNF (A) e TCA (B), e administração combinada de doses sub-ativas de cetamina (0,1 mg/kg) e ConBr (0,1 µg/sítio) no TNF (C) e TCA (D) (n=6-8). Os resultados representam a média ± SEM, **p<0,01; ***p<0,001 em comparação com o grupo veículo.

5.1.4 Envolvimento da via L-arginina-NO·-GMPc no efeito antidepressivo de ConBr no TNF e na atividade locomotora no TCA em camundongos

A fim de investigar o envolvimento das vias L-arginina-NO· e GMPc no efeito antidepressivo de ConBr (10 µg/sítio), os camundongos foram pré-tratados com L-arginina (750 mg/kg), um precursor de NO·, ou sildenafil (5 mg/kg), inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), específica para degradar GMPc. Os resultados ilustrados na Figura 14A mostram que a administração de L-arginina foi capaz de suprimir (p=0,00037), o efeito antidepressivo de ConBr (10 µg/sítio; p=0,00047) (pré-tratamento com L-arginina [F (1,20) =6,83; p=0,01661], tratamento com ConBr [F (1,20) =3,59; p=0,07274], e interação do tratamento com L-arginina × tratamento com ConBr [F (1,20) =23,04; p=0,00011]). Da mesma forma, o efeito antidepressivo de ConBr (10 µg/sítio) foi completamente prevenido pelo pré-tratamento dos animais com sildenafil (5 mg/kg; p=0,00099). Pré-tratamento com sildenafil [F (1,20) =5,69; p=0,02702], tratamento com ConBr [F (1,20) =6,61; p=0,01823], e a interação do tratamento com sildenafil × tratamento com ConBr [F (1,20) =14,13; p=0,00124] (Figura 14B).

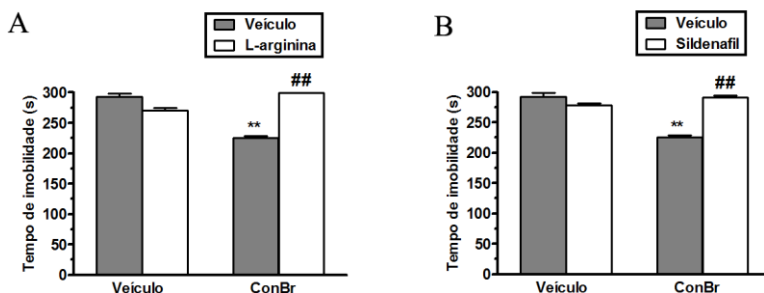


Figura 14. Envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico (NO·) e GMPc no efeito antidepressivo de ConBr. Efeito do pré-tratamento com L-arginina (750 mg/kg) (A) e sildenafil (5 mg/kg) (B) sobre o efeito antidepressivo de ConBr no TNF (n=5-7). ConBr (10 µg/sítio) foi administrada 15 minutos antes do teste. Os resultados representam a média ± SEM, **p<0,01 quando comparado com o grupo veículo e ##p<0,01 quando comparado com o grupo ConBr.

Como podemos observar na Figura 15A, uma dose sub-ativa de ConBr (0,1 $\mu\text{g/sítio}$) combinada com uma dose sub-ativa de ODQ (30 pmol/sítio), um inibidor específico da enzima GCs, provocou um efeito antidepressivo no TNF. ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas para o tratamento com ODQ [$F(1,20) = 18,22; p = 0,00037$], o tratamento com ConBr [$F(1,20) = 19,78; p = 0,00025$], e a interação entre o tratamento com ODQ \times o tratamento com ConBr [$F(1,20) = 6,77; p = 0,01703$]. O teste *post-hoc* indicou um efeito sinérgico antidepressivo no TNF no grupo que recebeu ConBr combinado com ODQ ($p = 0,00019$). A administração isolada ou em combinação de ConBr ou ODQ não afetou a mobilidade dos animais no TCA (Figura 15B).

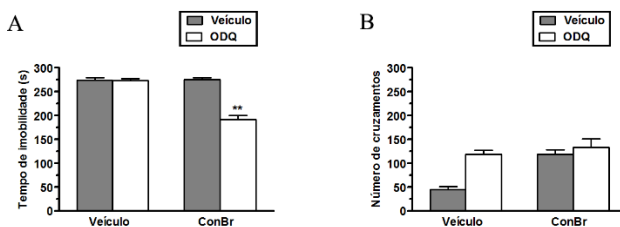


Figura 15. Efeito antidepressivo de ConBr no TNF envolve a via NO•-GMPc. Efeito de uma administração combinada de doses sub-ativas de ODQ (30 pmol/sítio) e ConBr (0,1 $\mu\text{g/sítio}$) ($n=6-8$) no TNF (A) e TCA (B). Os resultados representam a média \pm SEM, ** $p < 0,01$ comparado com o grupo veículo.

5.2 CAPITULO II

Neste capítulo investigamos as vias de sinalização moduladas por ConBr no hipocampo de animais tratados *in vivo*. O foco foram os sistemas de sinalização intracelulares classicamente envolvidos em efeitos antidepressivos, de neuroplasticidade e neuroproteção.

ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, modulates signaling pathways and increases BDNF expression probably via a glycosylated target

Débora K. Rieger^a, Rodrigo M. S. Cunha^b, Mark William Lopes^a, Ana Paula Costa^a, Josiani Budni^a, Ana Lúcia S. Rodrigues^a, Roger Walz^c, Edson H. Teixeira^d, Kyria S. Nascimento^d, Benildo S. Cavada^d, Rodrigo B. Leal^{a*}

(Artigo submetido para revista *Journal of Molecular Recognition* – em fase final de resposta R1)

5.2.1 Análise da fosforilação de PKA, Akt e CaMKII no hipocampo de camundongos nos tempos iniciais (05-6 h) após tratamento com ConBr

A Figura 16B mostra que ConBr (10 µg/sítio), produz uma ativação transitória de PKA. Houve um aumento significativo na fosforilação dos substratos de PKA de $35\% \pm 5,29$ ($p < 0,01$) e $20\% \pm 5,28$ ($p < 0,05$), após 1 e 3 h, respectivamente, voltando a níveis basais 6 h após o tratamento com ConBr. Atividade de PKA não foi alterada por ConBr desnaturada em nenhum dos tempos analisados.

A fosforilação de Akt, em resposta ao tratamento com ConBr foi avaliada nos tempos de 0,5, 1, 3 e 6 h após a administração da lectina (Figura 16D). Os resultados mostram um aumento da fosforilação de Akt sobre a Ser⁴⁷³ (sítio de ativação) de $16\% \pm 1,37$ ($p < 0,05$) e $25\% \pm 4,50$ ($p < 0,05$) em 0,5 e 3 horas, respectivamente, após administração de ConBr (10 µg/sítio). ConBr desnaturada não alterou a fosforilação de Akt.

Também foram avaliados o estado de fosforilação das isoformas α (sítio Thr²⁸⁶) e β (sítio Thr²⁸⁷) de CaMKII em resposta ao tratamento com ConBr. Os resultados mostram que a fosforilação de CaMKII não foi modificada por ConBr nos tempos iniciais (dados não mostrados).

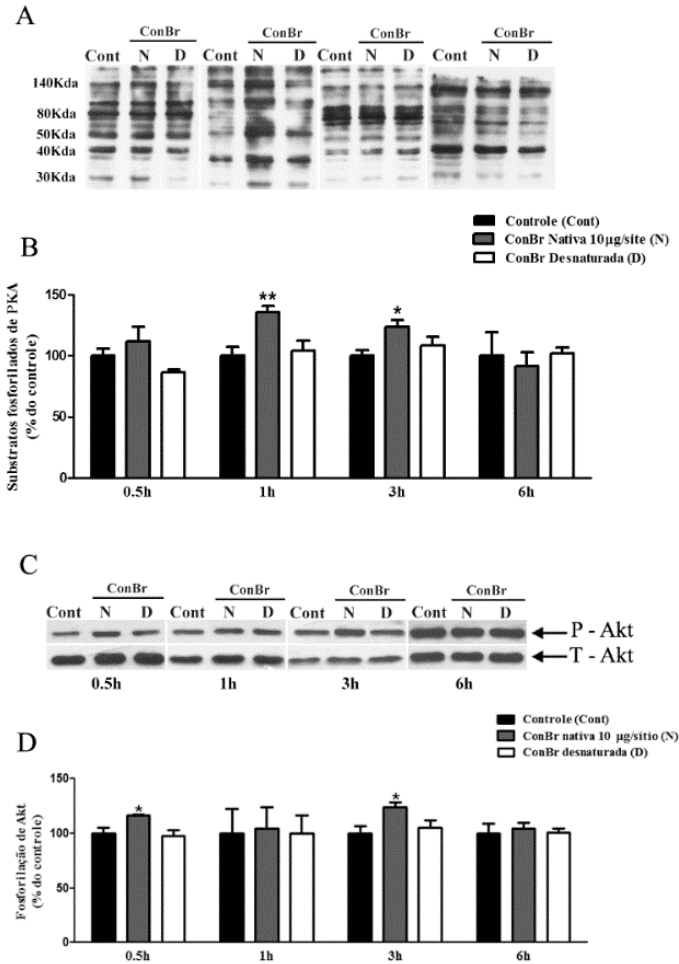


Figura 16. ConBr estimula a atividade PKA e Akt em tempos iniciais após injeção i.c.v. (A) Western blot representativo dos substratos fosforilados da PKA; (B) análise quantitativa do nível de fosforilação dos substrato de PKA; (C) western blot representativo das formas fosforilada e total de Akt; (D) análise quantitativa do nível de fosforilação de Akt em Ser⁴⁷³. Resumidamente, Controle (Cont), 10 µg/sítio de ConBr nativa (N) ou ConBr desnaturado (D) foi administrado (i.c.v.). Depois de 0,5, 1, 3 e 6 h, os animais foram submetidos a eutanásia e os hipocampus removidos para análise por Western blot. Os dados são expressos em porcentagem do controle (considerado como 100%), e os

valores são média \pm SEM de cinco experimentos independentes realizadas em duplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs controle.

5.2.2 Análise da ativação de MAPKs no hipocampo de camundongos nos tempos iniciais (0,5-6 h) após tratamento com ConBr

A fosforilação de proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) JNK1/2/3 (Figura 17A), p38^{MAPK} (Figura 17B) e ERK1/2 (Figura 17C, D e E), em resposta ao tratamento com ConBr também foi analisada em tempos iniciais (0,5 a 6 h). Os resultados mostram que ConBr (10 $\mu\text{g/sítio}$) aumenta a fosforilação de ERK1 em 37% \pm 3,09 ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle no tempo de 3 h. Entretanto, ConBr não alterou a fosforilação de ERK2, JNK1/2/3 ou de p38MAPK em nenhum dos tempos analisados.

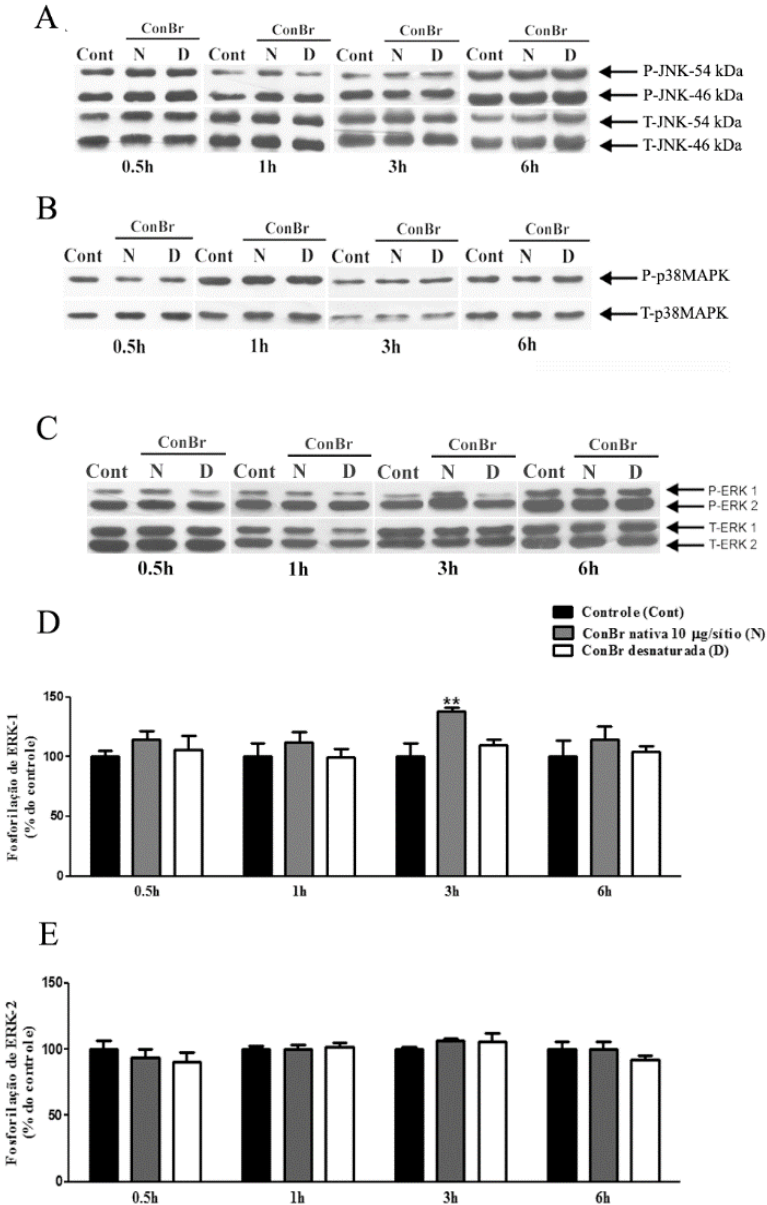


Figura 17. ConBr estimula a fosforilação de ERK1 nos tempos iniciais após injeção i.c.v. Tratamento não alterou a fosforilação de JNK1/2/3 e p38^{MAPK}. (A)

Western blot representativo das formas fosforiladas e totais de JNK1/2/3; (B) western blot representativo das formas fosforiladas e totais de p38^{MAPK}; (C) western blot representativo das formas fosforiladas e totais de ERK1 e ERK2; (D) e (E) análises quantitativas do nível de fosforilação de ERK1 e ERK2, respectivamente. Resumidamente, Controle (Cont), 10 µg/sítio de ConBr nativa (N) ou ConBr desnaturado (D) foi administrado (i.c.v.) e 0,5, 1, 3 e 6 h depois os animais foram submetidos a eutanásia e os hipocampus removidos para análise por Western blot. Os dados são expressos em porcentagem do controle (considerado como 100%), e os valores são média ± SEM de cinco experimentos independentes realizadas em duplicata. **p<0,01 vs controle.

5.2.3 Análise da ativação de CREB no hipocampo de camundongos 1, 3, 6 e 8 h após tratamento com ConBr

Com base nos resultados da modulação de proteínas cinases, decidimos investigar se ConBr poderia modular o fator de transcrição CREB, que pode ser fosforilada sobre Ser¹³³ por diversas proteínas cinases incluindo PKA, Akt e ERK (via RSK) (Shaywitz e Greenberg, 1999; Herold *et al.*, 2010). Os resultados mostram que a fosforilação de CREB no hipocampo foi significativamente aumentada em 75% ± 7,91 (p<0,01), 51% ± 0,39 (p<,0001) e 50% ± 8,80 (p<0,01) após o tratamento com ConBr (10 µg/sítio) nos tempos de 1, 3 e 6 h, respectivamente (Figura 18). Além disso, como demonstrado em resultados anteriores, o efeito de ConBr foi dependente da integridade da sua estrutura proteica terciária/quaternária.

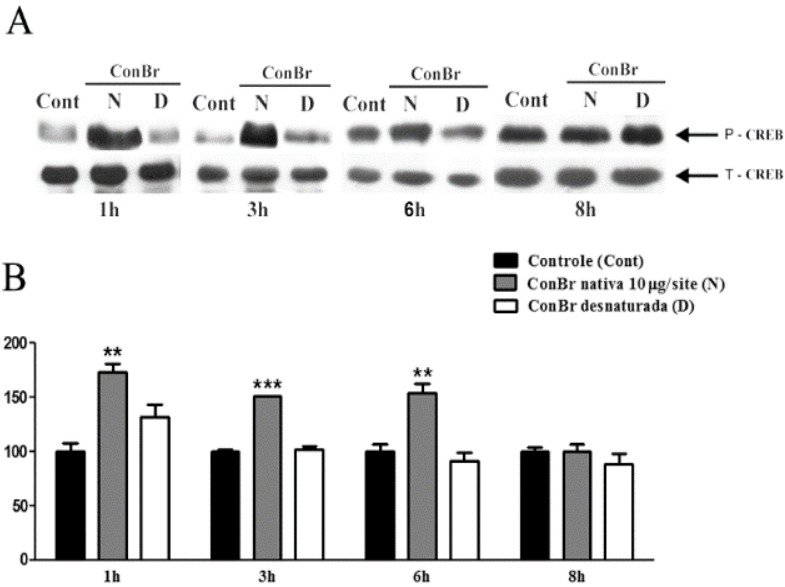


Figura 18. ConBr estimula a fosforilação de CREB no hipocampo. (A) Western blot representativo da forma fosforilada em Ser¹³³ e total de CREB; (B) análises quantitativa da fosforilação de CREB em Ser¹³³. Resumidamente, Controle (Cont), 10 µg/sítio de ConBr nativa (N) ou ConBr desnaturado (D) foi administrado (i.c.v.). Depois de 1, 3, 6 e 8 h, os animais foram submetidos a eutanásia e os hipocampus removidos para análise por Western blot. Os dados são expressos em porcentagem do controle (considerado como 100%), e os valores são média ± SEM de cinco experimentos independentes realizadas em duplicata. **p<0,01, ***p<0,001 vs controle.

5.2.4 Análise da expressão de BDNF e TrkB no hipocampo de camundongos 1, 6, 12 e 24 h após tratamento com ConBr

Está bem documentado que no hipocampo, a transcrição de BDNF é regulada positivamente pela ativação de CREB (Finkbeiner *et al.*, 1997). Assim, analisou-se a capacidade de ConBr em alterar os níveis de mRNA de BDNF. Os tempos avaliados foram 1, 6, 12 e 24 h. Na figura 19A podemos observar um aumento significativo da expressão pan-BDNF em torno de 700 % ± 2,41, em relação ao grupo controle (p<0,001) 12 h após a administração de ConBr (10 µg/sítio). Além disso, neste mesmo período, análises por qRT-PCR demonstraram um aumento de mRNA do receptor de BDNF, TrkB, após o tratamento com ConBr (10

$\mu\text{g/sítio}$) em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). Nenhum destes efeitos foi observado em resposta ao tratamento com a lectina desnaturada, demonstrando, mais uma vez, que os efeitos do tratamento com ConBr dependem da integridade da estrutura da lectina.

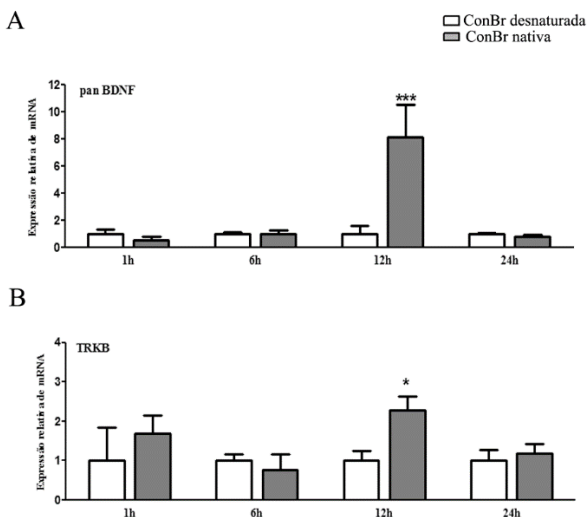
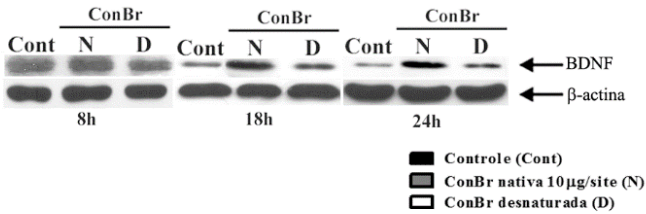


Figura 19. ConBr estimula a expressão de BDNF e TrkB (mRNA). As expressões de pan-BDNF (A) e TrkB (B) foram avaliadas por qRT-PCR, foi medida a expressão de mRNA relativa. Resumidamente, Controle (Cont), 10 $\mu\text{g/sítio}$ de ConBr nativa (N) ou ConBr desnaturado (D) foi administrado (i.c.v.). Após 1, 6, 12 e 24 h, os animais foram submetidos a eutanásia e os hipocampus removidos para análise por qRT-PCR. O nível de transcrição de HPRT foi usado para normalizar os dados. Os valores são média \pm SEM de cinco experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs ConBr desnaturada.

5.2.5 Análise da expressão da proteína BDNF no hipocampo de camundongos 8, 18 e 24 h após tratamento com ConBr

Considerando o aumento significativo do mRNA de BDNF no tempo de 12 h, avaliamos também a expressão da proteína BDNF em tempos mais tardios (18 e 24 h) por Western blot. A Figura 20 mostra um aumento significativo nos níveis de proteína de BDNF em $35\% \pm 1,43$ ($p < 0,01$) e $53\% \pm 3,25$ ($p < 0,01$) em 18 e 24 h, respectivamente, após a administração de ConBr. Este efeito não foi observado em resposta à ConBr desnaturada.

A



B

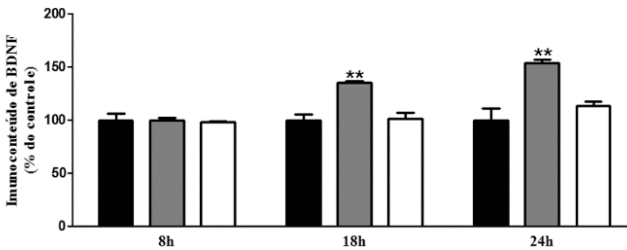


Figura 20. ConBr aumenta o conteúdo de BDNF (proteína) nos tempo mais tardios, após administração i.c.v. (A) Western blot representativo de BDNF e β -actina; (B) análises quantitativas dos níveis de BDNF. Resumidamente, Controle (Cont), 10 μ g/sítio de ConBr nativa (N) ou ConBr desnaturado (D) foi administrado (i.c.v.). Após 8, 18 e 24 h, os animais foram submetidos à eutanásia e os hipocampus removidos para análise por Western blot. Os dados são expressos em porcentagem do controle (considerado como 100%), e os valores são média \pm SEM de cinco experimentos independentes realizadas em duplicata. ** $p < 0,01$, vs controle.

5.2.6 Análise da ativação de ERK e Akt no hipocampo de camundongos 18 e 24h após tratamento com ConBr

A ativação de TrkB por BDNF ativa vias de sinalização que fosforilam Akt e ERK1/2 (Musumeci e Minichiello, 2011). Sabendo que ConBr aumenta BDNF (18-24 h), e aumenta a expressão de TrkB (12 h), avaliamos a ativação de Akt e ERK1/2 nos tempos de 18-24 h após o tratamento com ConBr. A figura 21C mostra um aumento na fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³) de 37% \pm 7,11 ($p < 0,01$) 24 h após a administração de ConBr. No entanto, a fosforilação de ERK1/2 não foi alterada nos mesmos tempo após o tratamento ConBr (Figura 21A).

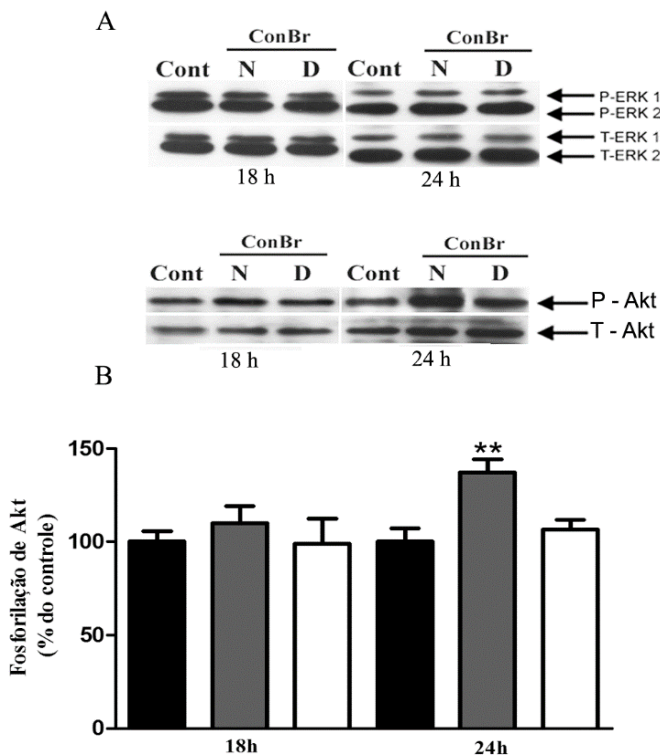


Figura 21. ConBr aumenta fosforilação de Akt nos tempo mais tardios, após administração i.c.v. (A) Western blot representativo das formas fosforilada e total de ERK1 e ERK2; (D) western blot representativo das formas fosforilada e total de Akt; (E) análise quantitativa do nível de fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³). Resumidamente, Controle (Cont), 10 µg/sítio de ConBr nativa (N) ou ConBr desnaturado (D) foi administrado (i.c.v.). Após 8, 18 e 24 h, os animais foram submetidos a eutanásia e os hipocampus removidos para análise por Western blot. Os dados são expressos em porcentagem do controle (considerado como 100%), e os valores são média ± SEM de cinco experimentos independentes realizadas em duplicata. ** $p < 0,01$, vs controle.

5.2.7 Efeito do tratamento com os inibidores H-89 ou LY294002 no aumento da expressão da proteína BDNF no hipocampo de camundongos 24 h após tratamento com ConBr

Uma vez que o tratamento com ConBr alterou os níveis de fosforilação de Akt e PKA, e que estas cinases fosforiladas podem ativar

o fator de transcrição CREB na Ser¹³³ (Shaywitz e Greenberg, 1999; Herold *et al.*, 2010), e a transcrição de BDNF no hipocampo é regulada positivamente pela ativação de CREB (Finkbeiner *et al.*, 1997), decidimos investigar a participação de Akt e PKA no aumento na proteína BDNF por ConBr. Western blot para BDNF foi realizado na presença de inibidores de PI3K/Akt e PKA 24 h após o tratamento com ConBr, (o tempo escolhido foi onde observamos o maior aumento de BDNF após o tratamento com ConBr). A Figura 22 mostra que o tratamento com os inibidores H-89 (1 µg/sítio, i.c.v.; inibidor de PKA) e LY294002 (10 µg/sítio, i.c.v.; inibidor de PI3K) foi capaz de suprimir o aumento na proteína BDNF provocado por ConBr.

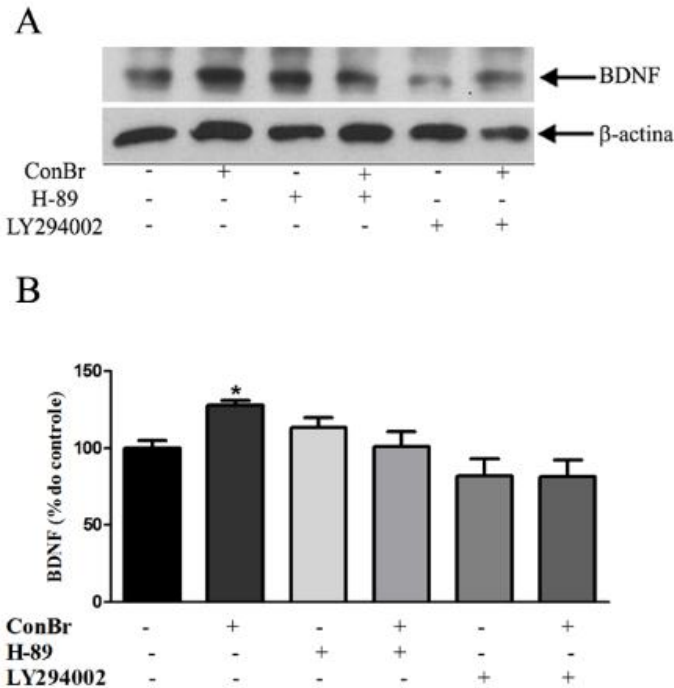


Figura 22. Tratamento com inibidores de PI3K e PKA aboliu o aumento no conteúdo de BDNF provocado por ConBr. Efeito da administração de LY294002 (10 µg/sítio, i.c.v.) ou H-89 (1 µg/sítio, i.c.v.) no aumento do conteúdo de BDNF provocado pelo tratamento com ConBr (10 µg/sítio, i.c.v.). (A) Western blot representativo de BDNF e β-actina; (B) análises quantitativas dos níveis de BDNF. Resumidamente, H-89, LY294002, ConBr sozinha ou juntamente com os

inibidores foram administrados (i.c.v.). Após 24 h, os animais foram submetidos a eutanásia e os hipocampus removidos para análise por Western blot. Os dados são expressos em porcentagem do controle (considerado como 100%), e os valores são média \pm SEM de cinco experimentos independentes realizadas em duplicata. * $p < 0,05$, vs controle.

5.2.8 Efeito do tratamento com o inibidor K252a no aumento da fosforilação de Akt no hipocampo de camundongos 24 h após tratamento com ConBr

Postulamos que a ativação de Akt em tempos mais tardios pode ser devido à regulação positiva de BDNF, uma vez que a ativação de TrkB, receptor de BDNF é acoplado a ativação de Akt e ERK1/2 (Musumeci e Minichiello, 2011). Para examinar o envolvimento de TrkB, no aumento da fosforilação da Akt 24 h após injeção i.c.v. de ConBr, utilizamos o inibidor K252a para bloquear o receptores de BDNF, TrkB. O aumento da fosforilação de Akt observado 24 h após o tratamento com ConBr foi abolida pelo pré-tratamento com K252a (1 $\mu\text{g/sítio}$, i.c.v.) (Figura 23C).

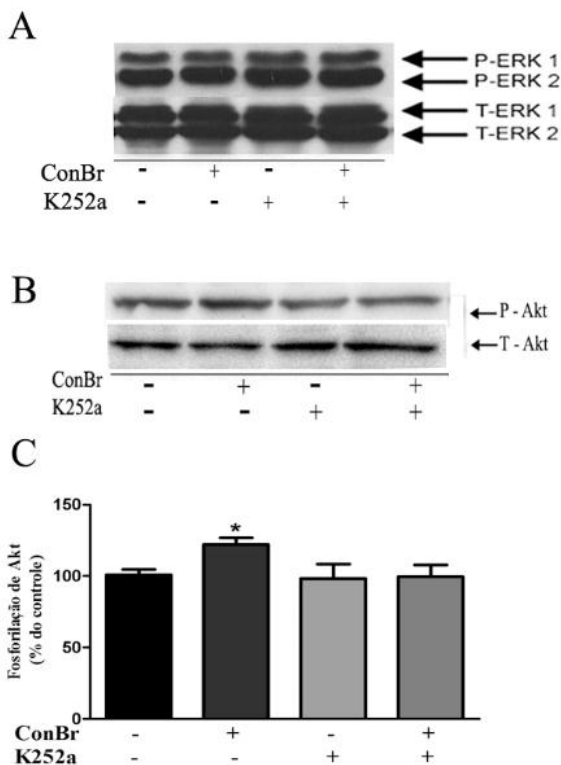


Figura 23. Tratamento com o inibidor de TrkB aboliu o aumento na fosforilação de Akt provocado por ConBr. Efeito da administração de K252a (1 µg/sítio, i.c.v.) no aumento da fosforilação de Akt provocado pelo tratamento com ConBr (10 µg/sítio, i.c.v.). (A) Western blot representativo das formas fosforilada e total de ERK1 e ERK2; (D) western blot representativo das formas fosforilada e total de Akt; (E) análise quantitativa do nível de fosforilação de Akt (Ser473). Resumidamente, K252a, ConBr sozinha ou juntamente com o inibidor foram administrados (i.c.v.). Após 24 h, os animais foram submetidos a eutanásia e os hipocampus removidos para análise por Western blot. Os dados são expressos em porcentagem do controle (considerado como 100%), e os valores são média ± SEM de cinco experimentos independentes realizadas em duplicata. * $p < 0,05$, vs controle.

5.3 CAPÍTULO III

Este capítulo traz resultados que demonstram a prevenção dos danos celulares e neuroquímicos induzidos pela isquemia pelo tratamento com ConBr e sugere possíveis mecanismos envolvidos na sua ação. Para alcançar este objetivo, foi avaliado a capacidade de ConBr em reverter a diminuição da viabilidade celular, neutralizar o estresse oxidativo e reverter as alterações nas vias de sinalização celular alteradas pela isquemia em um modelo *in vitro* utilizando COH submetidas a POG. Além disso, verificou-se a capacidade de ConBr modular os níveis de Ca^{2+} intracelular em COH e culturas primárias de neurônios do hipocampo.

ConBr, a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*, protects against ischemia in organotypic culture of rat hippocampus: Potential implication of voltage gated calcium channels

Rieger, D.K.^a; Costa, A.P.^a; Navarro, E.^c; González-Lafuente, L.^c; Buendía, I.^c; Parada, E.^c; Egea, J.^c; Leon, R.^c; Nascimento, K.S.^b; Cavada, B.S.^b; López, M.G.^c; Leal, R.B.^{a*}

(Artigo em preparação para submissão à revista *Neuropharmacology*).

5.3.1 Efeitos da ConBr sobre a viabilidade celular de COH submetidas a POG/Reox

O efeito neuroprotetor de ConBr foi estudado em um modelo *in vitro* de isquemia cerebral, onde COHs foram submetidos a um período de 15 min de POG seguido por um período de 24 horas de re-oxigenação (POG/Reox) como esquematicamente apresentado na Figura 9. As análises foram focalizadas na região CA1 do hipocampo, uma vez que está bem documentado haver uma vulnerabilidade seletiva de neurônios piramidais nesta região no processo de POG (Noraberg *et al.*, 2005).

Os resultados demonstram um aumento significativo da morte celular na região CA1 do hipocampo submetido a POG/Reox ($182,44 \pm 19,22\%$, $p < 0,01$) em relação ao grupo basal, como avaliado por fluorescência de IP. A incubação com concentrações crescentes de ConBr durante o período de re-oxigenação reduziu significativamente a morte celular nas concentrações de $0,1 \mu\text{g/mL}$ ($102,43 \pm 4,89\%$, $p < 0,01$) e $1 \mu\text{g/mL}$ ($87,7 \pm 17,81\%$, $p < 0,01$) em comparação ao grupo POG (figura 24B). Com base nestes resultados, as concentrações de $0,1 \mu\text{g/mL}$ e $0,01 \mu\text{g/mL}$ foram selecionados como concentração ativa e sub-ativa de ConBr, respectivamente.

Para investigar se a neuroproteção desencadeada por ConBr frente a POG/Reox era dependente da integridade da estrutura da proteína nativa, ConBr foi desnaturada. A Figura 24C mostra que a desnaturação de ConBr bloqueou o seu efeito protetor contra POG/Reox ($140,2\% \pm 9$, $p < 0,05$). Para investigar se o efeito neuroprotetor de ConBr foi dependente do domínio de ligação a carboidratos (CRD), ConBr foi incubada com manose (100 mM), a fim de bloquear a seu CRD. A Figura 24C mostra que ConBr bloqueada por manose perde seus efeitos protetores contra POG/Reox ($159\% \pm 11,5$ $p < 0,01$).

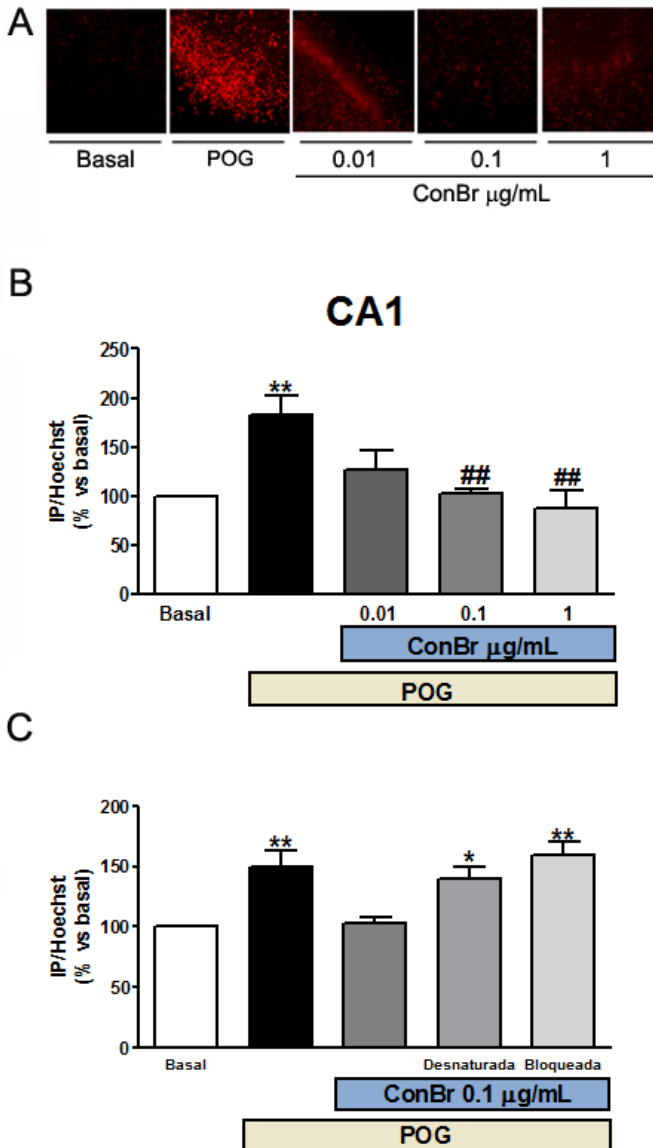


Figura 24. Tratamento com ConBr protege COHs contra morte celular induzida por POG/Reox. (A) Fotomicrografias (ampliação original 10 \times) da região CA1 marcada com IP; (B) Análise quantitativa da curva de concentração

de ConBr; (C) avaliação dos efeitos de ConBr desnaturada e ConBr-bloqueada com manose (100 mM). A morte celular foi medida através da relação de fluorescência de TMRE/Hoechst na região CA1 do hipocampo. Os valores são expressos como média \pm SEM de 5 experimentos independentes, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, comparado com o grupo basal. ## $p < 0,01$, comparado com o grupo POG.

5.3.2 Efeitos de ConBr sobre a produção de EROs e a perturbação do potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) em COHs submetido a POG/Reox

A disfunção mitocondrial está envolvida na fisiopatologia da isquemia cerebral. A manutenção da função mitocondrial, incluindo a geração de ATP, depende em grande parte da conservação do potencial de membrana mitocondrial. A perda de potencial de membrana mitocondrial é um importante evento da lesão isquêmica (Iijima, 2006). Considerando este aspecto, avaliamos se ConBr poderia interferir na despolarização mitocondrial em COHs submetidas à POG/Reox. A figura 25A mostra microfotografias da fluorescência de TMRE na região CA1 do hipocampo. Observamos um aumento da fluorescência após os COHs serem submetidos à POG/Reox ($117,68 \pm 4,32\%$, $p < 0,05$; Figura 24B) em comparação a condições basais, uma indicação de despolarização da membrana. No entanto, quando as fatias foram incubadas com $0,1 \mu\text{g/mL}$ de ConBr apresentaram níveis de fluorescência semelhantes aos do grupo em condições basais ($92,52\% \pm 6,83$, $p < 0,05$; figura 25B).

Devido a alteração da função mitocondrial levar ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, e o estresse oxidativo estar implicado na patogênese da isquemia cerebral (Brouns e De Deyn, 2009), testamos se ConBr poderia mitigar esse processo. A sonda fluorescente H_2DCFDA foi usada para determinar a produção de EROs. A figura 25C mostra uma ilustração representativa da fluorescência em CA1 produzido nos COHs submetidos a cada tratamento. POG/Reox aumentou a quantidade de EROs produzidas nos COHs ($129,33 \pm 10,91\%$, $p < 0,01$; Figura 25D), em relação ao basal. O grupo tratado com ConBr ($0,1 \mu\text{g/mL}$) reduziu significativamente ($97,61 \pm 7,44\%$, $p < 0,05$; Figura 25D) a produção de EROs induzida por POG/Reox.

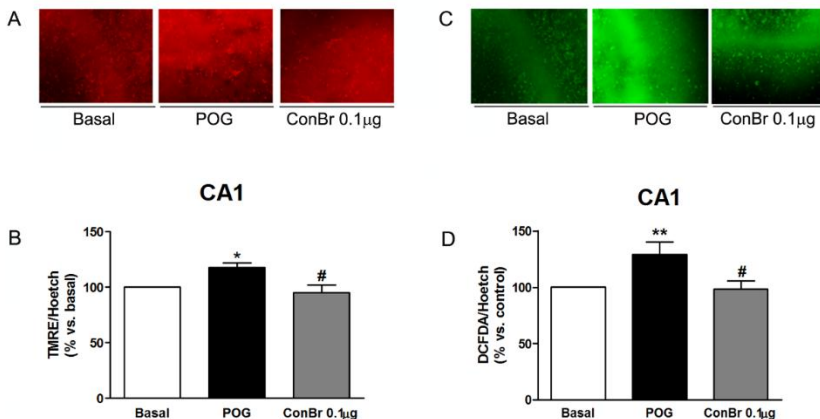


Figura 25. ConBr reduz a produção de EROs e a despolarização mitocondrial de COHs submetidos à POG/Reox. (A e C) Fotomicrografias (ampliação original 10 ×) da região CA1 marcada com TMRE e DCFDA respectivamente; (B) efeito protetor de ConBr 0,1 µg/mL incubada durante 24 h no período de Reox contra despolarização mitocondrial medida através da relação de fluorescência de TMRE/Hoechst na região CA1 do hipocampo; (D) efeito protetor de ConBr 0,1 µg/mL incubada durante 24 h no período de Reox sobre o aumento de EROs induzido por POG medida através da relação de fluorescência de DCFDA/Hoechst na região CA1 do hipocampo. Média ± SEM de 5 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo basal.

5.3.3 Efeitos de ConBr sobre as vias de sinalização relacionados com neuroproteção

Anteriormente demonstramos que ConBr é uma molécula capaz de ativar vias de sinalização envolvidas na plasticidade sináptica e neuroproteção (Russi *et al.*, 2012; Jacques *et al.*, 2013). Para explorar as vias intracelulares envolvidos no efeito protetor de ConBr contra POG/Reox, analisamos a fosforilação das proteínas cinases Akt e ERK1/2 por Western blot. Na figura 26B podemos observar que POG/Reox diminuiu a fosforilação de Akt Ser⁴⁷³ em $21\% \pm 7,62$ ($p < 0,05$) em relação ao grupo basal, no entanto, a incubação com 0,1 µg/mL de ConBr durante o período de reoxigenação preveniu esta redução ($110,45 \pm 14,16\%$, $p < 0,001$). Além disso, analisamos a fosforilação da proteína cinase ERK1/2. Os resultados mostraram que a POG/Reox não alterou a fosforilação de ERK2, mas diminuiu significativamente a fosforilação de ERK1 ($25\% \pm 4,39$ $p < 0,05$, Figura 26D) e o tratamento com ConBr (0,1

$\mu\text{g/mL}$) preveniu significativamente a diminuição da fosforilação de ERK1 induzida por POG/Reox ($p < 0,05$).

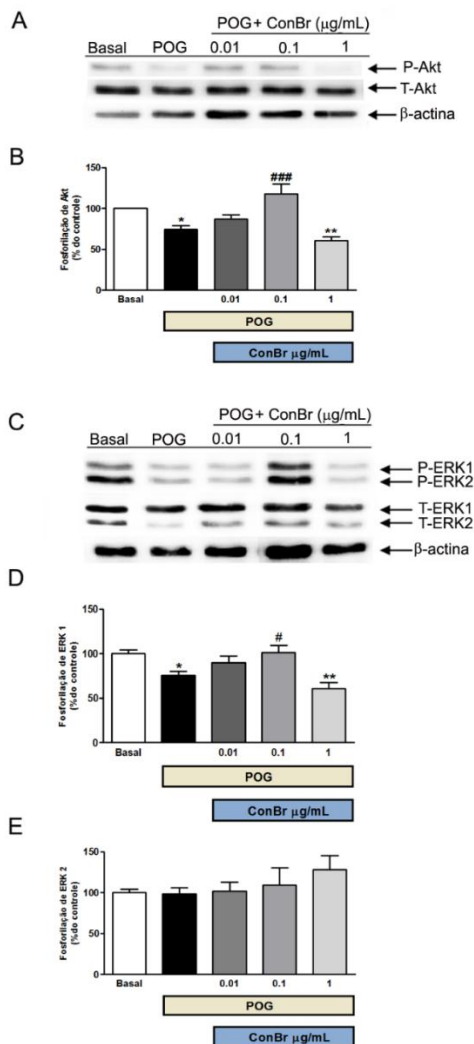


Figura 26. ConBr reverte a diminuição na fosforilação de Akt e ERK-1 induzida por POG. A figura mostra a curva de concentração de ConBr incubados durante o período de Reox. em relação à modulação de ERK e Akt. (A) Western blot representativo das formas fosforilada e total de Akt; (B) análise

quantitativa do nível de fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³); (C) western blot representativo das formas fosforilada e total de ERK1 e ERK2; (D) e (E) análises quantitativas de o nível de fosforilação de ERK1 e ERK2, respectivamente. A análise das proteínas foi realizada por Western blot. Os dados são expressos como porcentagem do controle (Veículo considerado como 100%) Os valores são expressos como média \pm SEM de 4 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, comparado com o grupo basal. # $p < 0,05$ e ### $p < 0,001$ comparado com o grupo POG/Reox.

5.3.4 Efeito de ConBr na elevação de $[Ca^{2+}]_c$ induzida por potássio e glutamato em neurônios do hipocampo

A excitotoxicidade neuronal geralmente se refere ao dano e morte neuronal decorrente de exposição prolongada ao glutamato, associada ao influxo excessivo de Ca^{2+} para o interior da célula através de receptores ionotrópicos ativados pelo glutamato e CCDV (Taoufik e Probert, 2008). Portanto investigamos os efeitos de ConBr sobre a modulação da concentração citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_c$) induzida por glutamato e decorrente da despolarização por potássio em cultura de neurônios hipocampais de ratos utilizando a sonda Fluo-4/AM. Glutamato (100 μ M) induziu um aumento de aproximadamente 30% na $[Ca^{2+}]_c$, mas ConBr (0,1-100 μ g/mL) não alterou a resposta ao glutamato. Por outro lado, o antagonista seletivo do receptor de NMDA, MK-801 (100 μ M), utilizado como um controle positivo, reduziu em 42% o aumento na $[Ca^{2+}]_c$ induzido por glutamato (figuras 27A e B).

Também foi avaliado o efeito de ConBr sobre CCDV, uma outra importante via envolvida na entrada do Ca^{2+} na célula. Quando os neurônios do hipocampo foram desafiados com uma solução despolarizante, contendo 70 mM de K^+ , que ativa CCDVs, observou-se um aumento de aproximadamente 42% na $[Ca^{2+}]_c$. Nifedipina (3 mM), um inibidor bem conhecido de CCDV do tipo-L, reduziu em 33% o aumento na $[Ca^{2+}]_c$ induzida pela despolarização por K^+ . Notavelmente, sob as mesmas condições experimentais, ConBr também foi capaz de bloquear em 29,2% (0.1 μ g/mL) e 26% (1 μ g/mL) a entrada de Ca^{2+} induzida por potássio (Figuras 27C e D).

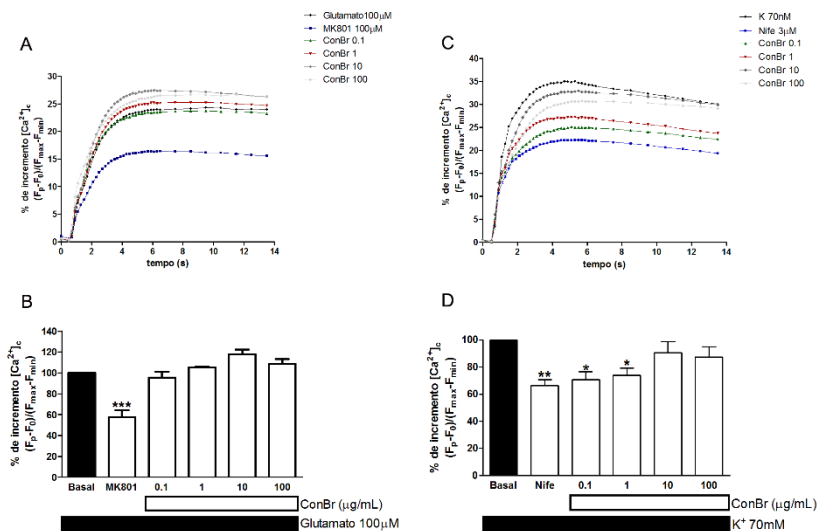


Figura 27. ConBr bloqueia o aumento de $[Ca^{2+}]_i$ induzida pela despolarização por potássio em neurônios hipocâmpais de ratos. O incremento do $[Ca^{2+}]_i$ foi avaliado em cultura de neurônios hipocâmpais através do uso da sonda Fluo-4/AM. (A) e (C) mostra os registros dos incrementos de $[Ca^{2+}]_i$ em resposta a glutamato (100 μ M) e K^+ (70 mM) respectivamente (ordenadas, % do valor máximo de fluorescência) em condições basais e na presença de concentrações crescentes de ConBr (0,1-100 μ M). MK-801 (100 μ M) ou nifedipina (3 mM) foram utilizados como controles positivos; (B) e (D) resultados normalizados (% de incrementos $[Ca^{2+}]_i$) a partir dos registros obtidos nas figuras A e C. Os dados são representados como médias \pm SEM de 4 culturas celulares diferentes, cada experimento foi realizado em triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo basal.

5.3.5 Papel da modulação dos CCDV no efeito neuroprotetor de ConBr no modelo de POG/Reox.

A fim de avaliar o papel do bloqueio dos CCDVs no efeito neuroprotetor exibido por ConBr as COHs foram submetidas a POG/Reox e tratados com concentrações ativas e sub-ativas de ambos nifedipina e ConBr. A viabilidade celular foi medida através da incorporação de IP. A concentração ativa de nifedipina (3 μ M) sozinha ou co-incubada com uma concentração ativa de ConBr (0,1 μ g/mL) reverteu a morte celular induzida por POG/Reox (121,16 \pm 11,9%; $p < 0,05$; e 125,8 \pm 11,6%; $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 28B). Além disso, o tratamento combinado de concentrações sub-ativas de nifedipina (0,3 μ M)

e ConBr (0,01 $\mu\text{g/mL}$) exibiu um efeito neuroprotetor ($p < 0,05$, Figura 28D), sugerindo um efeito sinérgico entre ConBr e nifedipina na reversão da morte celular induzida por POG/Reox. A incubação com concentrações sub-ativas de cada um dos compostos sozinho não foi capaz de reverter a morte celular induzida pela POG/Reox.

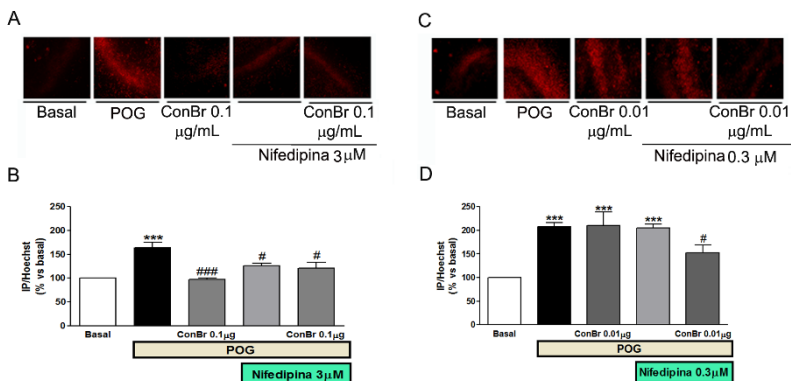


Figura 28. Doses subativas de ConBr e nifedipina apresentam um efeito protetor sinérgico contra a morte celular induzida por POG. (A, C) Fotomicrografias (ampliação original 10 \times) da região CA1 marcadas com IP; (B) concentrações ativas de Nifedipina (3 μM), ConBr (0,1 $\mu\text{g/mL}$) e ConBr combinada com nifedipina protege COHs da morte celular induzida por POG; (D) concentrações sub-ativas de Nifedipina (0,3 μM) e ConBr (0,01 $\mu\text{g/mL}$) exibem um efeito sinérgico na proteção contra a morte celular induzida por POG. A morte celular foi medida através da relação de fluorescência de TMRE/Hoechst na região CA1 do hipocampo. Os valores são expressos como média \pm SEM de 5 experimentos independentes, *** $p < 0,001$, comparado com o grupo basal. # $p < 0,05$, ### $p < 0,001$ em comparação com o grupo POG.

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos no campo da glicobiologia têm mostrado a importância de glicanos como biossinalizadores atuando como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos (Kleene e Schachner, 2004; Ohtsubo e Marth, 2006; Ghazarian *et al.*, 2010). Dessa forma, considerando os seguintes aspectos: 1) a importância das cadeias de açúcares presentes na superfície da membrana para comunicação intercelular; 2) a natureza glicoproteica da grande maioria dos receptores, canais iônicos e transportadores de neurotransmissores; 3) dados prévios de nosso grupo e da literatura, que demonstram um potencial neuroprotetor de lectinas (Yamane *et al.*; Han *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2010; Yamane *et al.*, 2010; Russi *et al.*, 2012; Jacques *et al.*, 2013); no presente estudo foi proposto investigar os mecanismos celulares e moleculares pelo qual ConBr pode exercer ação antidepressiva e neuroprotetora.

Nosso grupo tem buscado estudar os efeitos biológicos de ConBr sobre o SNC. Nesse sentido evidenciamos que ConBr injetada i.c.v. pode modular os sistemas de neurotransmissão monoaminérgico (serotonina, noradrenalina e dopamina) e produzir uma ação tipo antidepressiva similar ao antidepressivo fluoxetina (Barauna *et al.*, 2006). Em estudo recente demonstramos que ConBr apresenta efeito neuroprotetor contra convulsões induzidas por ácido quinolínico (AQ) em camundongos e paralelamente reverte o aumento da fosforilação, dependentes de AQ, de JNK2/3 e das subunidade GluR1 do receptor AMPA (Russi *et al.*, 2012). ConBr também apresenta efeito neuroprotetor contra a excitotoxicidade glutamatérgica *in vitro* em fatias de hipocampo, além de reverter (nesse modelo) a diminuição da fosforilação de Akt provocada pelo glutamato (Jacques *et al.*, 2012).

No presente trabalho, fornecemos a evidência do envolvimento do sistema glutamatérgico (através de receptores NMDA) e da via L-arginina-NO-cGMP no efeito tipo antidepressivo provocado pela administração central de ConBr. Além disto, mostramos que algumas vias de sinalização do hipocampo, notavelmente reconhecidas por desempenhar papéis-chave na plasticidade sináptica, neuroproteção e resposta aos antidepressivos (Gottschalk *et al.*, 1999; Shaywitz e Greenberg, 1999), podem ser moduladas por ConBr. Os nossos dados sugerem que ConBr, de uma maneira dependente da sua estrutura nativa, ativa PKA, Akt e ERK1 que culmina com aumento da expressão de BDNF mediado pela ativação de CREB.

É importante salientar que o efeito tipo antidepressivo de ConBr depende de suas propriedades estruturais e da disponibilidade do domínio de interação com carboidratos (CRD). Dessa forma, pode ser sugerido que a interação de ConBr com as cadeias de glicanos, comumente presentes na superfície celular, é um passo fundamental para ancorar a lectina para acesso ao seu alvo. Esta conclusão baseia-se nos resultados que mostram que a redução do tempo de imobilidade induzida por ConBr foi neutralizada tanto pela desnaturação térmica como pelo bloqueio do CRD, através da pré-incubação de ConBr com manose.

ConBr injetada i.c.v. pode modular os sistemas de neurotransmissão monoaminérgico (serotonina, noradrenalina e dopamina) e produzir uma ação antidepressiva (Barauna *et al.*, 2006). A maioria dos tratamentos farmacológicos para depressão está relacionada com estes sistemas de neurotransmissão. Mas estes tratamentos apresentam limitações significativas, incluindo baixa eficácia (ou seja, cerca de um terço dos pacientes respondem ao primeiro agente prescrito), e um grande intervalo de tempo para resposta ao tratamento, ou seja, os efeitos terapêuticos são observados apenas após 2-3 semanas e em muitos casos após meses (Moussavi *et al.*, 2007). Estas limitações destacam a importância de novas estratégias e alvos terapêuticos bem como a disponibilidade de antidepressivos mais eficazes e de ação mais rápida, principalmente considerando os altos índices de suicídio observados em indivíduos deprimidos que não respondem bem as terapias clássicas disponíveis.

Devido a estes aspectos, a elucidação dos mecanismos envolvidos na neurobiologia da depressão, e a busca de novos alvos e agentes terapêuticos que tenham o potencial de fornecer mais eficácia e resposta mais rápida ao tratamento são essenciais. Um número crescente de evidências relatam que além do papel fundamental da transmissão monoaminérgica na modulação da emoção e cognição (Nestler *et al.*, 2002; Krishnan e Nestler, 2008; Aan Het Rot *et al.*, 2010), a transmissão glutamatérgica também está associada com a modulação cognitiva e do humor e pode também estar envolvida na fisiopatologia da depressão. Dessa forma, o sistema de neurotransmissão excitatório podem representar uma via para abordagem terapêutica na depressão e outros transtornos de humor (Hashimoto, 2011).

Nós demonstramos que o pré-tratamento dos animais com NMDA (0,1 pmol/sítio, i.c.v.) ou D-serina, um co-agonista do receptor de NMDA (30 µg/sítio, i.c.v.), aboliu a redução do tempo de imobilidade induzido por ConBr no TNF, sugerindo que o efeito antidepressivo de ConBr é dependente da inibição de receptores NMDA. Resultados

anteriores de nosso grupo já sugeriam a transmissão glutamatérgica como um possível alvo para ConBr, quando foi demonstrado proteção pela ConBr contra as convulsões induzidas por AQ *in vivo* (Russi *et al.*, 2012) e contra a neurotoxicidade do glutamato *in vitro* (Jacques *et al.*, 2013). A hipótese do envolvimento dos receptores NMDA na ação de ConBr foi reforçado com o efeito sinérgico anti-imobilidade observado pela administração combinada de doses sub-ativas dos antagonistas do receptor de NMDA, MK-801 e cetamina, e ConBr.

Evidências convincentes de estudos clínicos sugerem que a transmissão do glutamato é anormalmente regulada no plasma, líquido cerebrospinal (CSF) e áreas límbicas/corticais do cérebro de indivíduos com transtornos do humor (Berman *et al.*, 2000). Pacientes deprimidos apresentam uma elevada concentração de glutamato e uma tendência para a diminuição plasmática das proporções glutamina/glutamato em comparação com indivíduos saudáveis (Altamura *et al.*, 1995). Outros estudos indicaram que o tratamento com antidepressivos podem diminuir os níveis de glutamato no plasma em indivíduos deprimidos (Altamura *et al.*, 1995; Kucukibrahimoglu *et al.*, 2009). Além disso, uma quantidade crescente de evidências mostra que os sistemas glutamatérgico, noradrenérgicos e serotoninérgicos podem interagir no mecanismo de ação dos antidepressivos (Bonanno *et al.*, 2005; Pittaluga *et al.*, 2007; Szasz *et al.*, 2007).

Em roedores, efeitos do tipo antidepressivo após o tratamento agudo com antagonistas do receptor NMDA, como MK-801, cetamina, memantina, amantadina, foram observados em modelos preditivos de ação antidepressiva como o teste do nado forçado, o teste de suspensão pela cauda e em modelos de depressão como a exposição ao estresse crônico moderado (Trullas e Skolnick, 1990; Almeida, Felisbino, *et al.*, 2006). Isto sugere que o tratamento com antagonistas de receptores NMDA pode representar uma alternativa eficaz às terapias atuais para o tratamento da depressão (Trullas e Skolnick, 1990). Portanto, o efeito de ConBr sobre os receptores NMDA pode representar uma estratégia interessante para a modulação destes receptores em condições patológicas como a depressão.

A hipótese do envolvimento dos receptores NMDA no efeito anti-imobilidade de ConBr foi reforçada por experimentos que mostraram que o tratamento de camundongos com uma dose de sub-ativa de ConBr combinada com uma dose sub-ativa de cetamina produziu um efeito antidepressivo no TNF. A cetamina vem se destacando nas pesquisas pela sua ação antidepressiva rápida, sendo assim um candidato para solucionar a limitada eficácia e a demora no tempo para a resposta terapêutica típicas

dos antidepressivos em uso. A cetamina em doses baixas é um psicotomimético e em doses elevadas um anestésico dissociativo. A ação antidepressiva rápida da cetamina foi primeiramente relatada por (Krystal *et al.*, 1994), que relatam que uma dose baixa de cetamina (0,5 mg/kg) produziu uma resposta antidepressiva rápida, observada 4 h após o tratamento e que durou 3 dias. Estudos posteriores confirmaram essa constatação, relatando rápida resposta antidepressiva da cetamina dentro de 2 h com efeitos sustentados de até 7 dias (Berman *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2009; Aan Het Rot *et al.*, 2010). Estes efeitos rápidos da cetamina são observados em pacientes considerados resistentes ao tratamento (Krystal *et al.*, 2013). O efeito sinérgico de doses sub-ativas de ConBr e cetamina demonstra, mais uma vez, que o mecanismo antidepressivo de ConBr parece envolver o antagonismo de receptores NMDA, mecanismo que parece ser muito eficaz no tratamento da depressão.

O efeito antidepressivo mais associado à inibição de receptores NMDA é a diminuição na produção enzimática de óxido nítrico nos neurônios pós-sinápticos (Dhir e Kulkarni, 2011). O NO· é uma molécula mensageira do SNC que é sintetizado a partir de L-arginina pela NOS após a ativação dos receptores NMDA e influxo de Ca²⁺. O nível elevado de NO· está relacionada com o processo biológico da depressão (Steinert *et al.*, 2010), sendo que pacientes depressivos, com tendências suicidas, apresentam altos níveis plasmáticos de NO· (Lee *et al.*, 2006). Considerando a possibilidade do mecanismo antidepressivo de ConBr estar relacionado com a inibição de receptores NMDA, o que culminaria na modulação dos níveis de NO·, investigamos o envolvimento da via L-arginina-NO· no efeito antidepressivo de ConBr. O tratamento dos animais com L-arginina, um precursor de NO·, foi capaz de reverter a diminuição do tempo de imobilidade induzida por ConBr, sugerindo que a inibição da síntese de NO· pode estar implicado no efeito antidepressivo produzido por esta lectina no TNF. Dados da literatura demonstram que a administração de L-arginina inibe a atividade de antidepressivos conhecidos, tais como escitalopram, imipramina, venlafaxina e bupropiona (Harkin (Harkin *et al.*, 1999; Zomkowski *et al.*, 2012).

Os efeitos de NO· são mediados principalmente pela GMPc. O NO· formado a partir de L-arginina pela ação catalítica da enzima NOS, ativa a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), que é responsável pela conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (Denninger e Marletta, 1999). O envolvimento de L-arginina-NO·-GMPc é bastante estudado no mecanismo da depressão. Várias moléculas, tais como venlafaxina (um inibidor da recaptação da dupla de serotonina e noradrenalina), bupropiona (um

inibidor de recaptação de dopamina), memantina (receptor de NMDA antagonista) e o zinco, todos conhecidos por produzir uma ação antidepressiva nos modelos animais de depressão, parecem também poder modular essa via de sinalização (Rosa *et al.*, 2003; Almeida, Felisbino, *et al.*, 2006; Dhir e Kulkarni, 2007; Kulkarni e Dhir, 2007). No nosso estudo mostram que ConBr também pode modular esta via. Nesse sentido a administração combinada de doses sub-ativas de ConBr e ODQ (inibidor da sGC) produziu um efeito sinérgico antimobilidade no TNF. Ainda corroborando com este dado, o sildenafil (um inibidor da PDE5) impediu o efeito anti-imobilidade da ConBr. Assim, é possível postular que a redução dos níveis de GMPC, através da inibição da via L-arginina-NO-GMPC, um evento importante para a ação antidepressiva, está envolvido no mecanismo antidepressivo de ConBr.

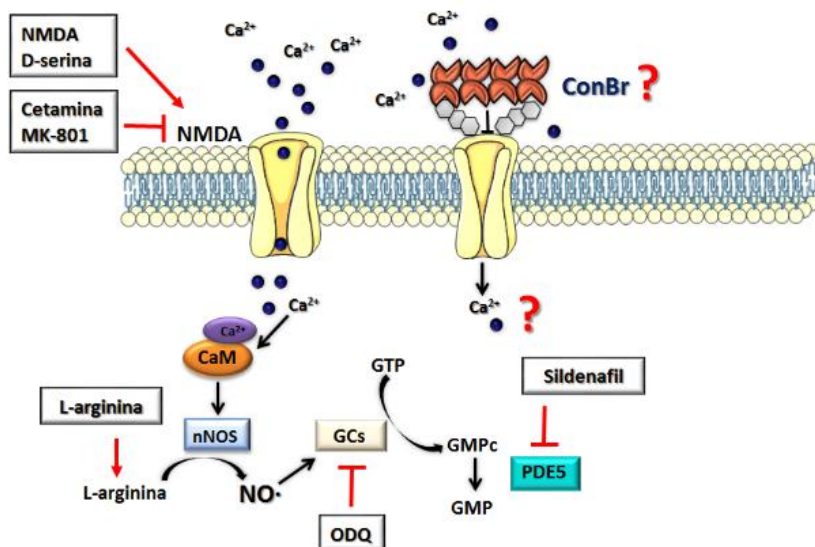


Figura 29. ConBr pode produzir uma atividade do tipo antidepressiva via inibição de NMDA e da via L-arginina/NO/GMPC. Os dados experimentais sugerem que ConBr poderia inibir os receptores NMDA e dessa forma diminuir a entrada de Ca²⁺, a ativação de óxido nítrico sintase e por fim a produção de NO e de GMPC.

Vias de sinalização intracelular implicadas em eventos de neuroproteção, memória e aprendizado, sobrevivência neuronal, arborização dendrítica, sinaptogênese e plasticidade sináptica têm sido propostas como alvos potenciais para estratégias de tratamento em diferentes situações neuropatológicas.

As vias de sinalização envolvendo as cinases PKA, Akt, ERK1/2 e a modulação do fator de transcrição CREB e a expressão de BDNF são eventos conhecidos por estarem envolvidos na modulação da plasticidade sináptica e em respostas neuroprotetoras. Os nossos resultados indicam que a administração central ConBr é capaz de ativar a via PKA/Akt/ERK1-CREB(Ser¹³³)-BDNF no hipocampo de camundongos, o que sugere que estas vias de sinalização podem estar envolvidas nos efeitos neuroprotetores e antidepressivos de ConBr.

ConBr induziu a ativação de PKA e Akt (0,5-3 h), seguido da ativação de ERK1 3 h após o tratamento i.c.v. O mecanismo envolvido na ativação de PKA por ConBr é em grande parte desconhecido. No entanto, considerando que ConBr pode ativar o sistema monoaminérgico (Barauna *et al.*, 2006), é plausível que a ativação de PKA por ConBr possa ocorrer através de receptores de monoaminas acoplados a proteína G, que ativam a enzima adenilato ciclase aumentando o nível intracelular de cAMP (Donati e Rasenick, 2003). PKA ativada pode translocar para o núcleo, e os substratos nucleares mais conhecidos de PKA são os membros da família CREB (Shaywitz e Greenberg, 1999).

A sinalização de ERK é regulada por diversos estímulos extracelulares, tais como fatores de crescimento, receptores para as neurotrofinas acoplados à via de Ras/Raf/MEK (Sweatt, 2004; Thomas e Haganir, 2004). A via da ERK também pode ser ativada no hipocampo através de outras enzimas de sinalização, incluindo PKA, PKC e CaMKII (Dumaz e Marais, 2005; Gelinas *et al.*, 2008). Nossos resultados mostraram que PKA foi ativada por ConBr em tempos anteriores a ativação de ERK, podendo assim participar nesta ativação. Além disso, alguns estudos sugerem que a inibição dos receptores de NMDA, especialmente os receptores extrasinápticos, pode levar a ativação da ERK (Hardingham e Bading, 2003). Em nosso estudo sobre o mecanismo antidepressivo de ConBr postulamos que a lectina pode bloquear a ativação do receptor NMDA, provavelmente através da interação com os resíduos de glicanos presentes no domínio extracelular N-terminal de NR1 e/ou subunidades NR2 do receptor NMDA (Russi *et al.*, 2011). No entanto, apesar de todas essas possibilidades, os mecanismos responsáveis pela modulação da ERK1 por ConBr ainda são uma questão em aberto que devem ser abordadas em estudos futuros.

Em tempos iniciais o tratamento com ConBr aumentou a fosforilação de Akt (30 minutos e 3 horas após a injeção i.c.v.) no hipocampo. Em estudo anterior mostramos que a via da PI3K/Akt pode estar envolvida no efeito neuroprotetor de ConBr contra a neurotoxicidade do glutamato em fatias de hipocampus de ConBr

(Jacques *et al.*, 2013). Tendo em vista esse estudo anterior e o papel bem estabelecido de PI3K/Akt na modulação da neuroplasticidade, sobrevivência celular e em respostas neuroprotetoras bem como aos antidepressivos (Brasil e outros 2004; Budni e outros 2011b; Fišar e Hroudova 2010), podemos postular que Akt pode estar implicada no mecanismo de ação da ConBr no hipocampo.

A fosforilação de CREB-Ser¹³³ é um passo essencial para a ativação deste fator de transcrição (Shaywitz e Greenberg, 1999). Ativação de muitas vias de sinalização, incluindo AMPc/PKA, Ca²⁺/calmodulina- CaMK -II e IV, MAPKs (via RSK), PI3K/Akt e Ca²⁺/DAG/PKC, levam à ativação de CREB e o aumento da expressão de genes dependentes de CRE (Shaywitz e Greenberg, 1999; Yang *et al.*, 2010). ConBr promoveu uma fosforilação sustentada (de 1 até 6 h) de CREB-Ser¹³³, provavelmente pela ativação das vias de sinalização PKA, MEK/ERK1 e PI3K/Akt.

Além disso, ConBr promoveu um aumento nos níveis de mRNA de BDNF (12 h) e da proteína BDNF (18-24 h). A ativação do CREB é essencial para a transcrição hipocampal de BDNF (Shaywitz e Greenberg, 1999; Herold *et al.*, 2010). Portanto, através da interação com glicanos presentes em alvos na superfície celular e a ativação de vias de sinalização intracelular, ConBr induziu a fosforilação de CREB em tempos iniciais (1-6 h), o que levou a um aumento posterior do BDNF. Para comprovar que a fosforilação de CREB e o aumento de BDNF provocado por ConBr estaria relacionado com a ativação de Akt e PKA, utilizamos os inibidores de PI3K, LY294002, e o inibidor de PKA, H-89. Ambos bloquearam o aumento de BDNF induzido por ConBr. Estes resultados indicam que a ativação das vias (PI3K/Akt e cAMP/PKA) estão envolvidas no mecanismo de aumento de BDNF via ativação de CREB provocado por ConBr. Dessa forma, podemos sugerir que a fosforilação de CREB induzida pelo tratamento com ConBr depende, pelo menos, dessas duas vias de sinalização. Na literatura observa-se em muitas situações que um único estímulo pode disparar cascatas distintas que convergem para um mesmo efetor (Shaywitz e Greenberg, 1999). A fosforilação de CREB pode ser estimulada por diversas vias, sendo a ativação sustentada deste fator determinada muitas vezes pela interação de mais de uma via bem como por outros fatores que se associam a CREB e ao promotor (Shaywitz e Greenberg, 1999).

Outro aspecto observado foi um aumento do mRNA de TrkB (12 h), juntamente com o aumento da expressão de BDNF (18-24 h) e ativação de Akt (24 h), em resposta a administração i.c.v. de ConBr. Estes resultados sugerem que a interação BDNF/TrkB poderia estar mediando

esta ativação de Akt induzida por ConBr em tempos mais tardios (24 h). Para comprovar essa hipótese utilizamos o inibidor K252a para bloquear o receptores de BDNF, TrkB. Os resultados indicaram que o aumento da fosforilação de Akt após 24 h foi abolida pelo pré-tratamento com K252a, confirmando assim que a ativação tardia de Akt realmente parece ser mediada pela interação BDNF/TrkB.

Considerando a diversidade de eventos mediados por BDNF como o crescimento neuronal e desenvolvimento (Garoflos *et al.*, 2005; Cohen-Cory *et al.*, 2010), neuroplasticidade (Fritsch *et al.*, 2010; Callaghan e Kelly, 2012), sobrevivência celular (Johnson-Farley *et al.*, 2007), neuroproteção (Qu *et al.*, 2010), e reparação neural (Duman e Monteggia, 2006), a capacidade de ConBr em ativar vias de sinalização que culminam com o aumento de BDNF pode ser relevante como estratégia para o tratamento de uma diversidade de neuropatologias em que a via neurotrófica é prejudicada. A ativação destas vias pode explicar em parte os mecanismos envolvidos na ação antidepressiva e neuroprotetora de ConBr. Finalmente, nos deparamos com uma possibilidade instigante onde além da galectina-1, uma lectina cerebral bem estudada e com atividade neuroprotetora comprovada, lectinas de plantas podem ser também capazes de modular vias de sinalização celular envolvidas na neuroplasticidade, neuroproteção e resposta antidepressiva.

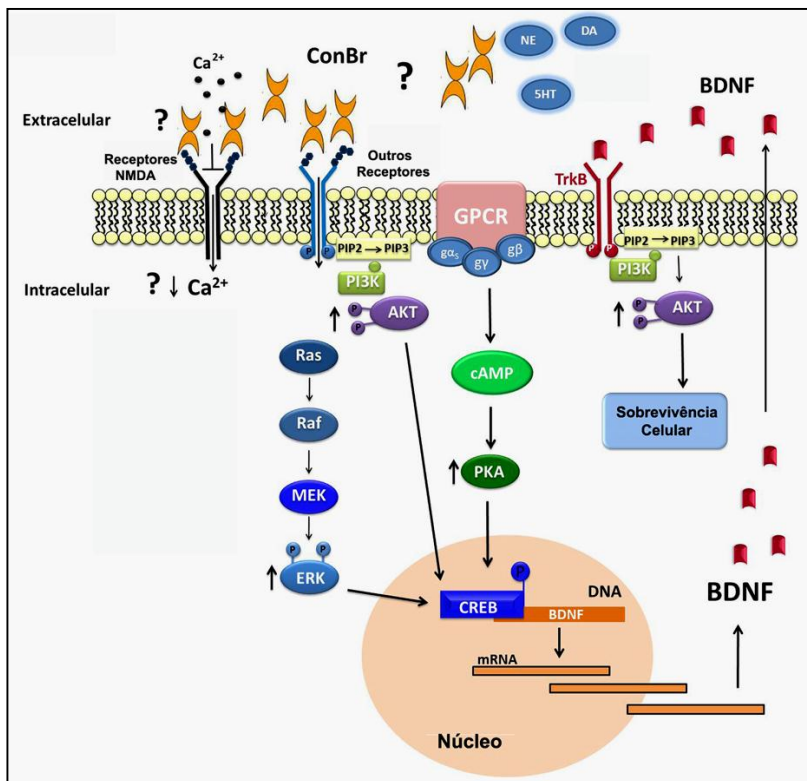


Figura 30. ConBr induz a expressão de BDNF no hipocampo. Os dados experimentais sugerem que ConBr administrada i.c.v. pode aumentar os níveis de monoaminas (Barauna *et al.*, 2006) e inibir receptores NMDA (Russi *et al.*, 2012). Além disso, por mecanismo que pode envolver a ativação de PKA, ERK e Akt essa lectina estimula a fosforilação de CREB. A fosforilação de CREB (no sítio Ser¹³³) é ativadora desse fator estimula a expressão hipocampal de BDNF (cujo gene apresenta o elemento de resposta ao AMPc, CRE). Essa ação de ConBr reforça os dados obtidos até o momento que apontam essa lectina como uma molécula multifuncional, capaz de induzir remodelagem sináptica e produzir neuroproteção.

Considerando o potencial efeito neuroprotetor de ConBr foi também objetivo deste trabalho avaliar capacidade neuroprotetora de ConBr em outro modelo de dano neuronal, um modelo de privação de oxigênio e glicose (POG), utilizando culturas organotípicas de hipocampo (COH). Os resultados obtidos em COH demonstram que ConBr, pode

proporcionar neuroproteção contra a POG, uma vez que impede tanto a morte celular, a despolarização mitocondrial, o estresse oxidativo, bem como a inibição de Akt e da atividade de ERK1 induzida por POG. O mecanismo desta neuroproteção ainda não está totalmente elucidado, no entanto, usando cultivos primários de neurônios hipocâmpais e também nos COHs, nossos resultados sugerem que a redução da sobrecarga de $[Ca^{2+}]_c$ via bloqueio de CCDV pode ser um mecanismo importante na ação neuroprotetora de ConBr nesse modelo de isquemia *in vitro*.

Nestes experimentos *in vitro* podemos observar que a proteção de ConBr contra a morte celular dependente de POG também foi dependente de sua estrutura nativa e da sua interação com as cadeias de glicanos. Uma vez que a redução da morte neuronal observada pelo tratamento com ConBr foi perdido pela desnaturação de ConBr e pelo bloqueio de seu domínio de ligação de carboidrato (CRD), por meio de incubação de ConBr com manose.

O efeito neuroprotetor de ConBr foi anteriormente mostrado pelo nosso grupo contra as convulsões induzidas pelo ácido quinolínico *in vivo* (Rus et al. 2012) e contra a neurotoxicidade do glutamato *in vitro* em fatias do hipocampo (Jacques et al. 2013), sugerindo a prevenção de morte neuronal excitotóxica como um possível mecanismo envolvido na neuroproteção de ConBr. Na isquemia podemos observar um quadro de excitotoxicidade neuronal, decorrente em grande parte ao influxo excessivo de Ca^{2+} para o interior da célula (Berliocchi *et al.*, 2005). Esse quadro pode levar a uma série de respostas que convergem para indução de morte celular e inclui: indução de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, modulação de vias de sinalização celular como ativação de $p38^{MAPK}$ e JNK e inibição de Akt (Schwarzschild *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Taoufik e Probert, 2008; Brouns e De Deyn, 2009). Após o início da isquemia, a perda de reservas de energia resulta em desequilíbrio iônico, indução da liberação e de inibição da recaptação de glutamato. A ligação do glutamato nos seus receptores ionotrópicos NMDA e AMPA promove influxo excessivo de cálcio e o desequilíbrio de cálcio intracelular (Lo *et al.*, 2003).

No entanto, apesar de ser largamente aceito que a perturbação da homeostase dos níveis de Ca^{2+} intracelular seja o passo central na morte neuronal no evento isquêmico, o mecanismo e os alvos que medeiam a entrada de Ca^{2+} extracelular não é bem determinada. Alguns estudos sugerem que uma grande parte do fluxo de Ca^{2+} , durante a isquemia pode ocorrer através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (Rami e Krieglstein, 1994). Experimentos em modelos animais têm indicado que antagonistas de canais de Ca^{2+} administrados após isquemia cerebral são

eficazes na redução do volume do infarto e promovem melhorias na evolução neurológica (Rami e Krieglstein, 1994; Fogelholm *et al.*, 2000; Sobrado *et al.*, 2003). Os nossos resultados sugerem os CCDV como um alvo do mecanismo neuroprotetor de ConBr contra POG em COH. ConBr foi capaz de bloquear o aumento induzido pela despolarização por potássio da concentração de cálcio citosólico em neurônios de hipocampo de ratos e a co-incubação de concentrações sub-ativas de ConBr e nifedipina (um bloqueador de CCDV do tipo L) exibiu um efeito neuroprotetor sinérgico contra a morte celular induzida por POG em COH.

Estes resultados estão de acordo com outros estudos que indicam que antagonistas de CCDV atuam como drogas neuroprotetoras por diminuir influxo de Ca^{2+} através de CCDVs (Sobrado *et al.*, 2003; Gonzalez-Lafuente *et al.*, 2012; Lorrio *et al.*, 2012). Em cultura de células PC12 diferenciadas foi relatado que inibidores de CCDV do tipo L, tais como nimodipina e nifedipina, revertem a morte celular induzida pela POG (Lecht *et al.*, 2012). Da mesma maneira, nifedipina e flunarizina reverteram a morte celular induzida por um modelo de POG no hipocampo de ratos (Shibata *et al.*, 1995). Em outro estudo, bloqueadores de CCDV do tipo L, N e P atenuaram significativamente a lesão neuronal induzida pela privação de oxigênio de longa duração *in vitro* (Kimura *et al.*, 1998).

Após eventos de isquemia e reperfusão, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), normalmente são decorrentes de disfunções mitocondriais, provocam oxidação e nitrosilação de proteínas, peroxidação lipídica e danos ao DNA, levando a morte celular e alterando a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BBB) (Niizuma *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2010). Portanto, estratégias que revertam a produção de EROs ou aumentem as defesas antioxidantes tem sido exploradas na tentativa de evitar os danos celulares e produzir neuroproteção (Brouns e De Deyn, 2009; Jung *et al.*, 2010; Parada *et al.*, 2013). No presente trabalho observamos um aumento na produção de EROs e na despolarização mitocondrial após POG/Reox. O tratamento com ConBr reverteu ambos os processos. Estas observações reforçam o potencial neuroprotetor do ConBr em eventos isquêmicos.

Durante eventos de isquemia/reperfusão as células sofrem alterações que conduzem à regulação negativa de vias de sinalização de sobrevivência celular que podem ser determinantes no aumento da morte celular neuronal. Uma via de sinalização importante que desempenha um papel crucial no crescimento celular, proliferação e sobrevivência é a via PI3K/Akt (Song *et al.*, 2005). Ativação de PI3K/Akt participa na proteção

contra a lesão cerebral isquêmica observada após tratamento farmacológico (Friguls *et al.*, 2002; Chan, 2004; Yuan *et al.*, 2010). A maioria dos estudos concorda que após a isquemia a fosforilação de Akt (Ser⁴⁷³) aumenta transitoriamente em questão de horas, mas diminui após 24 h do evento isquêmico. Além disso, a neuroproteção por alguns agentes envolve a manutenção ou o aumento na atividade de Akt após o acidente vascular cerebral (Noshita *et al.*, 2001; Friguls *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003). Resultados anteriores do nosso grupo sugerem que ConBr atua através da via PI3K/Akt na reversão da neurotoxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo (Jacques *et al.*, 2013). No presente trabalho também mostramos que ConBr aumenta a fosforilação de Akt *in vivo*, em tempos iniciais após a injeção i.c.v. Assim, postulamos que a fosforilação de Akt poderia ser um alvo envolvido no mecanismo de neuroproteção de ConBr contra POG. Demonstramos que a POG diminui significativamente a fosforilação de Akt e a incubação com 0,1 µg/mL de ConBr, durante o período de reoxigenação, restaurou a fosforilação de Akt, sugerindo que a via de sinalização de PI3K/Akt pode estar envolvida no mecanismo de neuroproteção de ConBr contra POG.

Outra via de sinalização que é modulada na isquemia cerebral é a sinalização mediada pela via das MAPKs. A sinalização via MAPKs desempenha um papel significativo na regulação da sobrevivência celular após isquemia cerebral (Nozaki *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2012). A cascata de ERK1/2, primariamente ativada por fatores de crescimento, induz alteração da expressão gênica e pode modular proliferação celular, morte/sobrevivência celular e neuroplasticidade (Fumagalli *et al.*, 2005; Yoshii e Constantine-Paton, 2010). Anteriormente demonstramos que o tratamento com ConBr i.c.v. ativa ERK1, portanto postulamos a sinalização de ERK como uma estratégia promissora para o tratamento do acidente vascular cerebral isquêmico por ConBr. Os nossos resultados mostraram que POG diminuiu significativamente a fosforilação de ERK1 e o tratamento com ConBr (0,1 µg/mL) reverteu esta diminuição induzida por POG. Estes resultados sugerem que a ativação de ERK1 pode ser associada com a neuroproteção por ConBr contra a isquemia, no entanto, esta possibilidade precisa ser melhor esclarecida em estudos futuros.

Em conclusão, este estudo reforça o papel neuroprotetor de ConBr, uma vez que é capaz de interferir no mecanismo de morte celular induzida por POG. O mecanismo desta ação de ConBr pode incluir: 1) diminuição do acúmulo de Ca²⁺ intracelular, 2) proteção contra a despolarização mitocondrial, 3) diminuição da produção de EROs, 4) aumento da atividade de cinases potencialmente neuroprotetoras, como Akt e ERK1.

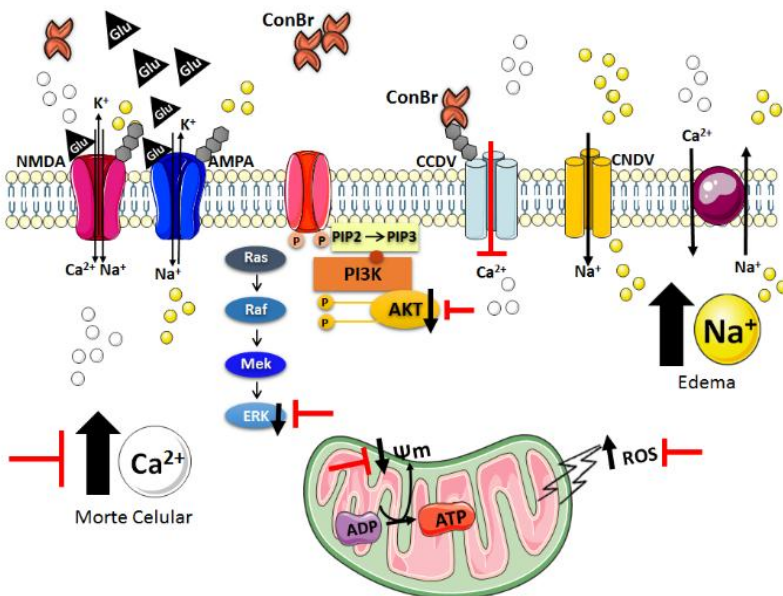


Figura 31. ConBr induz neuroproteção contra POG. Os dados experimentais sugerem que COHs tratadas com ConBr (0,1µg/mL) são protegidas contra a morte celular e alterações neuroquímicas induzidas por POG. Os possíveis mecanismos envolvidos nesta proteção desencadeada por ConBr são a diminuição do acúmulo de Ca²⁺ intracelular, via inibição de CCDV, bloqueio da despolarização mitocondrial e diminuição da produção de EROs. Além disso, a lectina proporciona aumento da atividade de cinases neuroprotetoras, como Akt e ERK1.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que:

O sistema glutamatérgico (através de receptores NMDA) está envolvido na ação tipo antidepressiva provocado pela administração central de ConBr. Além disso, uma inibição da via L-arginina-NO· bem como sGC e GMPc são também importantes para a ação tipo antidepressiva provocado pela administração central de ConBr.

A ativação inicial por ConBr das proteínas cinases Akt, ERK1 e PKA induz a fosforilação do fator de transcrição CREB-Ser¹³³, resultando em um aumento, CREB-dependente, da expressão de BDNF. Notavelmente, a fosforilação de Akt também foi aumentada 24 h após a administração de ConBr, suportando a noção de que o incremento de BDNF, ConBr-dependente, pode gerar um segundo pico de atividade de Akt via ativação do receptor TrkB.

ConBr apresenta efeito neuroprotetor contra POG em modelos de COH, interferindo no mecanismo de morte celular induzida pela POG. ConBr pode bloquear o aumento da concentração de cálcio citosólico induzido pela despolarização por potássio em neurônios de hipocampo de ratos.

O mecanismo da ação neuroprotetora de ConBr contra os danos induzido pela POG em COH podem incluir: diminuição do acúmulo de Ca²⁺ intracelular, proteção contra a despolarização mitocondrial, diminuição da produção de EROs e o aumento da atividade de cinases neuroprotetoras, como Akt e ERK1. Nesse modelo os resultados sugerem os CCDV como um importante alvo dentro do mecanismo neuroprotetor de ConBr.

Em conjunto os resultados indicam que, através da modulação de múltiplos alvos neuroquímicos, ConBr pode exercer efeito modulador da neuroplasticidade e ação neuroprotetora. Os dados sugerem ConBr como uma molécula multifuncional capaz de induzir neuroproteção.

8 PERSPECTIVAS

- I. Através de colunas com ConBr imobilizada isolar a partir de membranas sinápticas possíveis alvos de ligação de ConBr. As glicoproteínas isoladas serão caracterizadas por espectrometria de massa através da análise na base de dados NCBI do padrão de massa dos peptídeos (MFP);
- II. Verificar através de diferentes técnicas de microscopia a distribuição no sistema nervoso central, especialmente no hipocampo, de ConBr marcada com FITC (ConBr-FITC), administrada via intracerebroventricular (i.c.v.). Nesse contexto determinar os tipos celulares e compartimentos subcelulares que interagem com a lectina;
- III. Determinar se a capacidade de ConBr em modular os níveis de Ca^{2+} intracelular através da modulação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem é específica para um tipo de canal, utilizando inibidores específicos dos diferentes CCDV em neurônios em cultura através do uso de técnicas de fluorescência e patch-clamp;
- IV. Determinar a capacidade neuroprotetora de ConBr em modelos de isquemia *in vivo*, caracterizando os mecanismos moleculares dessa ação;
- V. Avaliar o envolvimento das vias de sinalização ativadas por ConBr no seu efeito antidepressivo, através do uso de inibidores destas vias (PI3K/Akt, PKA, MAPKs, CREB e BDNF) no TNF;

9 BIBLIOGRAFIA

AAN HET ROT, M. et al. Safety and efficacy of repeated-dose intravenous ketamine for treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry*, v. 67, n. 2, p. 139-45, 2010.

AKAZAWA, C. et al. Distribution of the galectin-1 mRNA in the rat nervous system: its transient upregulation in rat facial motor neurons after facial nerve axotomy. *Neuroscience*, v. 125, n. 1, p. 171-8, 2004.

ALMEIDA, R. C. et al. Evidence for the involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of memantine in mice. *Behav Brain Res*, v. 168, n. 2, p. 318-22, 2006.

ALMEIDA, R. C. et al. Involvement of PKA, MAPK/ERK and CaMKII, but not PKC in the acute antidepressant-like effect of memantine in mice. *Neurosci Lett*, v. 395, n. 2, p. 93-7, 2006.

ALMKVIST, J.; KARLSSON, A. Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J*, v. 19, n. 7-9, p. 575-81, 2004.

ALTAMURA, C. et al. Plasma concentrations of excitatory amino acids, serine, glycine, taurine and histidine in major depression. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 5 Suppl, p. 71-5, 1995.

AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org Biomol Chem*, v. 3, n. 9, p. 1593-608, 2005.

ANDRADE, J. L. et al. Lectin-induced nitric oxide production. *Cell Immunol*, v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

BARAUNA, S. C. et al. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, v. 85, n. 1, p. 160-9, 2006.

BARBOSA, T. et al. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 5, p. 673-8, 2001.

BARONDES, S. H. et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*, v. 269, n. 33, p. 20807-10, 1994.

BEREZOWSKI, V. et al. [Dysfunction of the blood-brain barrier during ischaemia: a therapeutic concern]. *Biol Aujourdhui*, v. 206, n. 3, p. 161-76, 2012.

BERGOLD, P. J.; CASACCIA-BONNEFIL, P. Preparation of organotypic hippocampal slice cultures using the membrane filter method. *Methods Mol Biol*, v. 72, p. 15-22, 1997.

BERLIOCCHI, L.; BANO, D.; NICOTERA, P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 360, n. 1464, p. 2255-8, 2005.

BERMAN, R. M. et al. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry*, v. 47, n. 4, p. 351-4, 2000.

BETTIO, L. E. et al. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. *Behav Brain Res*, v. 234, n. 2, p. 137-48, 2012.

BINFARE, R. W. et al. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 33, n. 3, p. 530-40, 2009.

BITO, H.; DEISSEROTH, K.; TSIEN, R. W. CREB phosphorylation and dephosphorylation: a Ca²⁺- and stimulus duration-dependent switch for hippocampal gene expression. *Cell*, v. 87, n. 7, p. 1203-14, 1996.

BLOIS, S. M.; BARRIENTOS, G. Galectin signature in normal pregnancy and preeclampsia. *J Reprod Immunol*, v. 101-102, p. 127-34, 2013.

BOEHM, S.; HUCK, S. Presynaptic inhibition by concanavalin A: are alpha-latrotoxin receptors involved in action potential-dependent transmitter release? *J Neurochem*, v. 71, n. 6, p. 2421-30, 1998.

BOESS, F. G. et al. Inhibition of phosphodiesterase 2 increases neuronal cGMP, synaptic plasticity and memory performance. *Neuropharmacology*, v. 47, n. 7, p. 1081-92, 2004.

BONANNO, G. et al. Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. *J Neurosci*, v. 25, n. 13, p. 3270-9, 2005.

BREWER, C. F. Lectin cross-linking interactions with multivalent carbohydrates. *Adv Exp Med Biol*, v. 491, p. 17-25, 2001.

BROCARD, P. S. et al. Antidepressant-like effect of folic acid: Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur J Pharmacol*, v. 598, n. 1-3, p. 37-42, 2008.

BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg*, v. 111, n. 6, p. 483-95, 2009.

BUDNI, J. et al. Involvement of PI3K, GSK-3 β and PPAR γ in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. *J Psychopharmacol*, v. 26, n. 5, p. 714-23, 2011.

CALLAGHAN, C. K.; KELLY, A. M. Differential BDNF signaling in dentate gyrus and perirhinal cortex during consolidation of recognition memory in the rat. *Hippocampus*, 2012.

CALLONI, G. W. et al. Congenital hypothyroidism alters the phosphorylation of ERK1/2 and p38MAPK in the hippocampus of neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res*, v. 154, n. 1, p. 141-5, 2005.

CALVETE, J. J. et al. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochim Biophys Acta*, v. 1430, n. 2, p. 367-75, 1999.

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*, v. 75, n. 1, p. 50-83, 2011.

CARLEZON, W. A., JR.; DUMAN, R. S.; NESTLER, E. J. The many faces of CREB. *Trends Neurosci*, v. 28, n. 8, p. 436-45, 2005.

CARVALHO, A. M.; SODRE FILHO, J. Uso de adubos verdes como cobertura do solo. *Boletim de Pesquisa - Embrapa Cerrados No.11*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecu-ria (EMBRAPA) Cerrados, Planaltina, Brazil., 2000.

CASTREN, E.; RANTAMAKI, T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Dev Neurobiol*, v. 70, n. 5, p. 289-97, 2010.

CAVADA, B. S. et al. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr Protein Pept Sci*, v. 2, n. 2, p. 123-35, 2001.

CHAN, P. H. Future targets and cascades for neuroprotective strategies. *Stroke*, v. 35, n. 11 Suppl 1, p. 2748-50, 2004.

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

CHIARUTTINI, C. et al. BDNF mRNA splice variants display activity-dependent targeting to distinct hippocampal laminae. *Mol Cell Neurosci*, v. 37, n. 1, p. 11-9, 2008.

CHO, S.; WOOD, A.; BOWLBY, M. R. Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics. *Curr Neuropharmacol*, v. 5, n. 1, p. 19-33, 2007.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, v. 162, n. 1, p. 156-9, 1987.

COBB, B. A.; KASPER, D. L. Coming of age: carbohydrates and immunity. *Eur J Immunol*, v. 35, n. 2, p. 352-6, 2005.

COBO, J. G. et al. Nitrogen mineralization and crop uptake from surface-applied leaves of green manure species on a tropical volcanic-ash soil. *Biol. Fertil. Soils*, v. 36 p. 87-92, 2002.

COHEN-CORY, S. et al. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev Neurobiol*, v. 70, n. 5, p. 271-88, 2010.

COHEN, S.; GREENBERG, M. E. Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 24, p. 183-209, 2008.

CORDOVA, F. M. et al. Lead stimulates ERK1/2 and p38MAPK phosphorylation in the hippocampus of immature rats. *Brain Res*, v. 998, n. 1, p. 65-72, 2004.

COWAN, K. J.; STOREY, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol*, v. 206, n. Pt 7, p. 1107-15, 2003.

CRUZ, M. S. D. et al. Factors affecting germination of *Canavalia brasiliensis*, *Leucaena leucocephala*, *Clitoria ternatea* and *Calopogonium mucunoides* seeds. *Seed Science and Technology*, v. 23, p. 447-454, 1995.

CUNHA, M. P. et al. The antidepressant-like effect of physical activity on a voluntary running wheel. *Med Sci Sports Exerc*, v. 45, n. 5, p. 851-9, 2012.

DA SILVA, G. D. et al. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *Neuroreport*, v. 11, n. 17, p. 3699-702, 2000.

DAM, T. K. et al. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. *J Biol Chem*, v. 273, n. 20, p. 12082-8, 1998.

DANI, N.; BROADIE, K. Glycosylated synaptomatrix regulation of trans-synaptic signaling. *Dev Neurobiol*, v. 72, n. 1, p. 2-21, 2011.

DE FREITAS PIRES, A. et al. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. *Fundam Clin Pharmacol*, 2011.

DE SIMONI, A.; GRIESINGER, C. B.; EDWARDS, F. A. Development of rat CA1 neurones in acute versus organotypic slices: role of experience in synaptic morphology and activity. *J Physiol*, v. 550, n. Pt 1, p. 135-47, 2003.

DE VASCONCELLOS ABDON, A. P. et al. Gastroprotective potential of frutalin, a D-galactose binding lectin, against ethanol-induced gastric lesions. *Fitoterapia*, v. 83, n. 3, p. 604-8, 2012.

DELL, A. et al. The glycobiology of gametes and fertilization. *Biochim Biophys Acta*, v. 1473, n. 1, p. 196-205, 1999.

DELLISANTI, C. D. et al. Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nat Neurosci*, v. 10, n. 8, p. 953-62, 2007.

DENES, A. et al. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 27, n. 12, p. 1941-53, 2007.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, v. 1411, n. 2-3, p. 334-50, 1999.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Involvement of L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 31, n. 4, p. 921-5, 2007.

DHIR, A.; KULKARNI, S.K. Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide*, v. 24, n. 3, p. 125-31, 2011.

DI LELLA, S. et al. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry*, v. 50, n. 37, p. 7842-57, 2011.

DONATI, R. J.; RASENICK, M. M. G protein signaling and the molecular basis of antidepressant action. *Life Sci*, v. 73, n. 1, p. 1-17, 2003.

DONNAN, G. A. et al. Stroke. *Lancet*, v. 371, n. 9624, p. 1612-23, 2008.

DOYLE, K. P.; SIMON, R. P.; STENZEL-POORE, M. P. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, v. 55, n. 3, p. 310-8, 2008.

DU, K.; MONTMINY, M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem*, v. 273, n. 49, p. 32377-9, 1998.

DUBE, D. H.; BERTOZZI, C. R. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov*, v. 4, n. 6, p. 477-88, 2005.

DUMAN, R. S.; LI, N. A neurotrophic hypothesis of depression: role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 367, n. 1601, p. 2475-84, 2012.

DUMAN, R. S. et al. Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 1, p. 35-41, 2012.

DUMAN, R. S.; MONTEGGIA, L. M. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry*, v. 59, n. 12, p. 1116-27, 2006.

DUMAZ, N.; MARAIS, R. Integrating signals between cAMP and the RAS/RAF/MEK/ERK signalling pathways. Based on the anniversary prize of the Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie Lecture delivered on 5 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J*, v. 272, n. 14, p. 3491-504, 2005.

DWIVEDI, Y. et al. Lower phosphoinositide 3-kinase (PI 3-kinase) activity and differential expression levels of selective catalytic and regulatory PI 3-kinase subunit isoforms in prefrontal cortex and hippocampus of suicide subjects. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 10, p. 2324-40, 2008.

EGEA, J. et al. Galantamine elicits neuroprotection by inhibiting iNOS, NADPH oxidase and ROS in hippocampal slices stressed with anoxia/reoxygenation. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 2, p. 1082-90, 2011.

EKDAHL, C. T.; KOKAIA, Z.; LINDVALL, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*, v. 158, n. 3, p. 1021-9, 2009.

ENDO, T. Glycans and glycan-binding proteins in brain: galectin-1-induced expression of neurotrophic factors in astrocytes. *Curr Drug Targets*, v. 6, n. 4, p. 427-36, 2005.

ERICKSON, J. R. et al. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell*, v. 133, n. 3, p. 462-74, 2008.

ESKO, J. D.; SELLECK, S. B. Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem*, v. 71, p. 435-71, 2002.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol*, v. 135, n. 5, p. 1079-95, 2002.

EVERTS, I. et al. Lectin-induced inhibition of desensitization of the kainate receptor GluR6 depends on the activation state and can be mediated by a single native or ectopic N-linked carbohydrate side chain. *J Neurosci*, v. 19, n. 3, p. 916-27, 1999.

EVERTS, I.; VILLMANN, C.; HOLLMANN, M. N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Mol Pharmacol*, v. 52, n. 5, p. 861-73, 1997.

FAUQUENOY, S. et al. Unusual N-glycan structures required for trafficking *Toxoplasma gondii* GAP50 to the inner membrane complex regulate host cell entry through parasite motility. *Mol Cell Proteomics*, v. 10, n. 9, p. M111 008953, 2011.

FAY, A. M.; BOWIE, D. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. *J Physiol*, v. 572, n. Pt 1, p. 201-13, 2006.

FINKBEINER, S. et al. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron*, v. 19, n. 5, p. 1031-47, 1997.

FINLEY, M. et al. Functional validation of adult hippocampal organotypic cultures as an in vitro model of brain injury. *Brain Res*, v. 1001, n. 1-2, p. 125-32, 2004.

FISAR, Z.; HROUDOVA, J. Intracellular signalling pathways and mood disorders. *Folia Biol (Praha)*, v. 56, n. 4, p. 135-48, 2010.

FOGELHOLM, R. et al. Effect of nimodipine on final infarct volume after acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*, v. 10, n. 3, p. 189-93, 2000.

FRIGULS, B. et al. Activation of ERK and Akt signaling in focal cerebral ischemia: modulation by TGF- α and involvement of NMDA receptor. *Neurobiol Dis*, v. 11, n. 3, p. 443-56, 2002.

FRITSCH, B. et al. Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. *Neuron*, v. 66, n. 2, p. 198-204, 2010.

FROZZA, R. L. et al. A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Res*, v. 34, n. 2, p. 295-303, 2009.

FU, L. L. et al. Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 43, n. 10, p. 1442-9, 2011.

FUMAGALLI, F. et al. Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. *J Neurochem*, v. 93, n. 6, p. 1551-60, 2005.

GABIUS, H. J. et al. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends Biochem Sci*, v. 36, n. 6, p. 298-313, 2011.

GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C. Regionally selective activation and differential regulation of ERK, JNK and p38 MAP kinase signalling pathway by protein kinase C in mood modulation. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 15, n. 6, p. 781-93, 2011.

GAROFLOS, E. et al. Cellular mechanisms underlying an effect of "early handling" on pCREB and BDNF in the neonatal rat hippocampus. *Brain Res*, v. 1052, n. 2, p. 187-95, 2005.

GAYNES, B. N. et al. What did STAR*D teach us? Results from a large-scale, practical, clinical trial for patients with depression. *Psychiatr Serv*, v. 60, n. 11, p. 1439-45, 2009.

GELINAS, J. N. et al. Activation of exchange protein activated by cyclic-AMP enhances long-lasting synaptic potentiation in the hippocampus. *Learn Mem*, v. 15, n. 6, p. 403-11, 2008.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem*, v. 113, n. 3, p. 236-47, 2010.

GONZALEZ-LAFUENTE, L. et al. Benzothiazepine CGP37157 and its isosteric 2'-methyl analogue provide neuroprotection and block cell calcium entry. *ACS Chem Neurosci*, v. 3, n. 7, p. 519-29, 2012.

GORELIK, E.; GALILI, U.; RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, v. 20, n. 3-4, p. 245-77, 2001.

GOTTSCHALK, W. A. et al. Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *Learn Mem*, v. 6, n. 3, p. 243-56, 1999.

GRANGEIRO, T. B. et al. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Eur J Biochem*, v. 248, n. 1, p. 43-8, 1997.

GREGERSEN, R.; LAMBERTSEN, K.; FINSEN, B. Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 20, n. 1, p. 53-65, 2000.

HA, H. C. et al. The role of polyamine catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 94, n. 21, p. 11557-62, 1997. I

HAN, H. et al. Synergistic effects of galectin-1 and reactive astrocytes on functional recovery after contusive spinal cord injury. *Arch Orthop Trauma Surg*, v. 131, n. 6, p. 829-39, 2010.

HANADA, M.; FENG, J.; HEMMINGS, B. A. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*, v. 1697, n. 1-2, p. 3-16, 2004.

HANISCH, U. K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, v. 10, n. 11, p. 1387-94, 2007.

HARKIN, A. J. et al. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur J Pharmacol*, v. 372, n. 3, p. 207-13, 1999.

HASHIMOTO, K. The role of glutamate on the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 35, n. 7, p. 1558-68, 2011.

HEROLD, S. et al. CREB signalling regulates early survival, neuronal gene expression and morphological development in adult subventricular zone neurogenesis. *Mol Cell Neurosci*, v. 46, n. 1, p. 79-88, 2010.

HOFFMAN, K. B. et al. Mannose-specific lectins modulate ligand binding to AMPA-type glutamate receptors. *Brain Res*, v. 795, n. 1-2, p. 105-11, 1998.

HORIE, H. et al. Oxidized galectin-1 stimulates macrophages to promote axonal regeneration in peripheral nerves after axotomy. *J Neurosci*, v. 24, n. 8, p. 1873-80, 2004.

HUGHES, R. C. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*, v. 83, n. 7, p. 667-76, 2001.

HUUSKONEN, J. et al. A refined in vitro model to study inflammatory responses in organotypic membrane culture of postnatal rat hippocampal slices. *J Neuroinflammation*, v. 2, p. 25, 2005.

IJIMA, T. Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neurosci Res*, v. 55, n. 3, p. 234-43, 2006.

ISHIBASHI, S. et al. Galectin-1 regulates neurogenesis in the subventricular zone and promotes functional recovery after stroke. *Exp Neurol*, v. 207, n. 2, p. 302-13, 2007.

JACQUES, A. V. et al. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. *Neurochem Int*, v. 62, n. 6, p. 836-42, 2013.

JIN, G. et al. Protection against ischemic brain damage by GDNF affecting cell survival and death signals. *Neurol Res*, v. 25, n. 3, p. 249-53, 2003.

JIN, R.; YANG, G.; LI, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*, v. 87, n. 5, p. 779-89, 2010.

JOHNSON-FARLEY, N. N. et al. Interaction of FGF-2 with IGF-1 and BDNF in stimulating Akt, ERK, and neuronal survival in hippocampal cultures. *Brain Res*, v. 1154, p. 40-9, 2007.

JUNG, J. E. et al. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. *Mol Neurobiol*, v. 41, n. 2-3, p. 172-9, 2010.

KAJITANI, K. et al. Galectin-1 promotes basal and kainate-induced proliferation of neural progenitors in the dentate gyrus of adult mouse hippocampus. *Cell Death Differ*, v. 16, n. 3, p. 417-27, 2009.

KANG, H. et al. An important role of neural activity-dependent CaMKIV signaling in the consolidation of long-term memory. *Cell*, v. 106, n. 6, p. 771-83, 2001.

KARIYA, Y.; GU, J. N-glycosylation of $\alpha 4$ integrin controls the adhesion and motility of keratinocytes. *PLoS One*, v. 6, n. 11, p. e27084, 2011.

KASTER, M. P. et al. Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like action of adenosine. *Pharmacol Rep*, v. 64, n. 3, p. 706-13, 2012.

KASTER, M. P. et al. Involvement of nitric oxide-cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 8, n. 4, p. 601-6, 2005.

KAVALALI, E. T.; MONTEGGIA, L. M. Synaptic mechanisms underlying rapid antidepressant action of ketamine. *Am J Psychiatry*, v. 169, n. 11, p. 1150-6, 2012.

KELLY, A.; LYNCH, M. A. Long-term potentiation in dentate gyrus of the rat is inhibited by the phosphoinositide 3-kinase inhibitor, wortmannin. *Neuropharmacology*, v. 39, n. 4, p. 643-51, 2000.

KIMURA, M. et al. Role of glutamate receptors and voltage-dependent calcium and sodium channels in the extracellular glutamate/aspartate accumulation and subsequent neuronal injury induced by oxygen/glucose deprivation in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 285, n. 1, p. 178-85, 1998.

KLEENE, R.; SCHACHNER, M. Glycans and neural cell interactions. *Nat Rev Neurosci*, v. 5, n. 3, p. 195-208, 2004.

KNUSEL, B.; HEFTI, F. K-252 compounds: modulators of neurotrophin signal transduction. *J Neurochem*, v. 59, n. 6, p. 1987-96, 1992.

KOCH, J. M. et al. Changes in CREB phosphorylation and BDNF plasma levels during psychotherapy of depression. *Psychother Psychosom*, v. 78, n. 3, p. 187-92, 2009.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, v. 19, n. 8, p. 312-8, 1996.

KRISHNAN, V.; NESTLER, E. J. The molecular neurobiology of depression. *Nature*, v. 455, n. 7215, p. 894-902, 2008.

KRYSTAL, J. H. et al. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*, v. 51, n. 3, p. 199-214, 1994.

KRYSTAL, J. H.; SANACORA, G.; DUMAN, R. S. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. *Biol Psychiatry*, v. 73, n. 12, p. 1133-41, 2013.

KUCUKIBRAHIMOGLU, E. et al. The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine- or S-citalopram-treated female patients with major depression. *Eur J Clin Pharmacol*, v. 65, n. 6, p. 571-7, 2009.

KULKARNI, S. K.; DHIR, A. Possible involvement of L-arginine-nitric oxide (NO)-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway in the antidepressant activity of berberine chloride. *Eur J Pharmacol*, v. 569, n. 1-2, p. 77-83, 2007.

LAAKE, J. H. et al. A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. *Brain Res Brain Res Protoc*, v. 4, n. 2, p. 173-84, 1999.

LALANCETTE-HEBERT, M. et al. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci*, v. 27, n. 10, p. 2596-605, 2007.

LE MERCIER, M. et al. Galectins and gliomas. *Brain Pathol*, v. 20, n. 1, p. 17-27, 2009.

LEAL, R. B. et al. Lead-stimulated p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 178, n. 1, p. 44-51, 2002.

LECHT, S. et al. Neuroprotective effects of nimodipine and nifedipine in the NGF-differentiated PC12 cells exposed to oxygen-glucose deprivation or trophic withdrawal. *Int J Dev Neurosci*, v. 30, n. 6, p. 465-9, 2012.

LEE, B. H. et al. Increased plasma nitric oxide metabolites in suicide attempters. *Neuropsychobiology*, v. 53, n. 3, p. 127-32, 2006.

LEKISHVILI, T. et al. Mouse galectin-1 inhibits the toxicity of glutamate by modifying NR1 NMDA receptor expression. *Eur J Neurosci*, v. 24, n. 11, p. 3017-25, 2006.

- LI, L. B. et al. The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *J Biol Chem*, v. 279, n. 20, p. 21012-20, 2004.
- LI, N. et al. Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry*, v. 69, n. 8, p. 754-61, 2011.
- LI, Y. et al. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron*, v. 59, n. 3, p. 399-412, 2008.
- LIN, S. S.; LEVITAN, I. B. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. *Trends Neurosci*, v. 14, n. 7, p. 273-7, 1991.
- LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, v. 79, n. 4, p. 1431-568, 1999.
- LIS, H.; SHARON, N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur J Biochem*, v. 218, n. 1, p. 1-27, 1993.
- LIU, R. et al. Neuroprotection targeting ischemic penumbra and beyond for the treatment of ischemic stroke. *Neurol Res*, v. 34, n. 4, p. 331-7, 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.
- LLEDO, P. M.; ALONSO, M.; GRUBB, M. S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*, v. 7, n. 3, p. 179-93, 2006.
- LO, E. H.; DALKARA, T.; MOSKOWITZ, M. A. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci*, v. 4, n. 5, p. 399-415, 2003.
- LOPES, F. C. et al. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. *Braz J Med Biol Res*, v. 38, n. 6, p. 935-41, 2005.

LORRIO, S. et al. Novel multitarget ligand ITH33/IQM9.21 provides neuroprotection in in vitro and in vivo models related to brain ischemia. *Neuropharmacology*, v. 67, p. 403-11, 2012.

LUDKA, F. K. et al. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 23, n. 5, p. 400-12, 2012.

MADINIER, A. et al. Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS One*, v. 4, n. 12, p. e8101, 2009.

MADINIER, A. et al. Ipsilateral versus contralateral spontaneous post-stroke neuroplastic changes: involvement of BDNF? *Neuroscience*, v. 231, p. 169-81, 2013. I

MAIER, L. S. CaMKII regulation of voltage-gated sodium channels and cell excitability. *Heart Rhythm*, v. 8, n. 3, p. 474-7, 2011.

MARSCHAL, P. et al. Carbohydrate and glycoprotein specificity of two endogenous cerebellar lectins. *Biochimie*, v. 71, n. 5, p. 645-53, 1989.

MARTIN, P. T. Glycobiology of the synapse. *Glycobiology*, v. 12, n. 1, p. 1R-7R, 2002.

MCCUBREY, J. A.; LAHAIR, M. M.; FRANKLIN, R. A. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal*, v. 8, n. 9-10, p. 1775-89, 2006.

MCDONALD, B. J.; MOSS, S. J. Conserved phosphorylation of the intracellular domains of GABA(A) receptor beta2 and beta3 subunits by cAMP-dependent protein kinase, cGMP-dependent protein kinase protein kinase C and Ca²⁺/calmodulin type II-dependent protein kinase. *Neuropharmacology*, v. 36, n. 10, p. 1377-85, 1997.

MENNITI, F. S.; FARACI, W. S.; SCHMIDT, C. J. Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, v. 5, n. 8, p. 660-70, 2006.

MERLIE, J. P. et al. Inhibition of glycosylation with tunicamycin blocks assembly of newly synthesized acetylcholine receptor subunits in muscle cells. *J Biol Chem*, v. 257, n. 5, p. 2694-701, 1982.

MERZ, K.; HEROLD, S.; LIE, D. C. CREB in adult neurogenesis--master and partner in the development of adult-born neurons? *Eur J Neurosci*, v. 33, n. 6, p. 1078-86,

MIELKE, K.; HERDEGEN, T. JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol*, v. 61, n. 1, p. 45-60, 2000.

MINKO, T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 56, n. 4, p. 491-509, 2004.

MODY, R.; JOSHI, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J Pharmacol Toxicol Methods*, v. 33, n. 1, p. 1-10, 1995.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. *Biol Plant Praga – Checoslov*, v. 26, n. 26, p. 113-20, 1984.

MORILAK, D. A.; FRAZER, A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects in depression and anxiety disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 7, n. 2, p. 193-218, 2004.

MOUSSAVI, S. et al. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet*, v. 370, n. 9590, p. 851-8, 2007.

MULLER, H. D. et al. Brain-derived neurotrophic factor but not forced arm use improves long-term outcome after photothrombotic stroke and transiently upregulates binding densities of excitatory glutamate receptors in the rat brain. *Stroke*, v. 39, n. 3, p. 1012-21, 2008.

MURRAY, C. J.; LOPEZ, A. D. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, v. 349, n. 9063, p. 1436-42, 1997.

MUSUMECI, G.; MINICHELLO, L. BDNF-TrkB signalling in fear learning: from genetics to neural networks. *Rev Neurosci*, v. 22, n. 3, p. 303-15, 2011.

NEIS, V. B. et al. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor-alpha is abolished by agmatine administration. *Behav Brain Res*, v. 261C, p. 336-344, 2014.

NESTLER, E. J. et al. Neurobiology of depression. *Neuron*, v. 34, n. 1, p. 13-25, 2002.

NESTLER, E. J.; TERWILLIGER, R. Z.; DUMAN, R. S. Chronic antidepressant administration alters the subcellular distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in rat frontal cortex. *J Neurochem*, v. 53, n. 5, p. 1644-7, 1989.

NEUMANN, J. et al. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J*, v. 20, n. 6, p. 714-6, 2006.

NIIZUMA, K. et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta*, v. 1802, n. 1, p. 92-9, 2009.

NISHIZAKI, T. N-glycosylation sites on the nicotinic ACh receptor subunits regulate receptor channel desensitization and conductance. *Brain Res Mol Brain Res*, v. 114, n. 2, p. 172-6, 2003.

NORABERG, J. et al. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, v. 4, n. 4, p. 435-52, 2005.

NOSHITA, N. et al. Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, v. 21, n. 12, p. 1442-50, 2001.

NOZAKI, K.; NISHIMURA, M.; HASHIMOTO, N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. *Mol Neurobiol*, v. 23, n. 1, p. 1-19, 2001.

NYE, S. H. et al. K-252a and staurosporine selectively block autophosphorylation of neurotrophin receptors and neurotrophin-mediated responses. *Mol Biol Cell*, v. 3, n. 6, p. 677-86, 1992.

OHTSUBO, K.; MARTH, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, v. 126, n. 5, p. 855-67, 2006.

OLIVEIRA, C. S. et al. The activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases is dynamically regulated in the developing rat visual system. *Int J Dev Neurosci*, v. 26, n. 3-4, p. 355-62, 2008.

OMKUMAR, R. V. et al. Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem*, v. 271, n. 49, p. 31670-8, 1996.

PARADA, E. et al. The Microglial alpha7-Acetylcholine Nicotinic Receptor Is a Key Element in Promoting Neuroprotection by Inducing Heme Oxygenase-1 via Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2. *Antioxid Redox Signal*, 2013.

PARTIN, K. M.; FLECK, M. W.; MAYER, M. L. AMPA receptor flip/flop mutants affecting deactivation, desensitization, and modulation by cyclothiazide, aniracetam, and thiocyanate. *J Neurosci*, v. 16, n. 21, p. 6634-47, 1996.

PARTIN, K. M. et al. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. *Neuron*, v. 11, n. 6, p. 1069-82, 1993.

PAUL, I. A.; SKOLNICK, P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1003, p. 250-72, 2003.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem*, v. 83, n. 2, p. 346-56, 1977.

PITTALUGA, A. et al. Antidepressant treatments and function of glutamate ionotropic receptors mediating amine release in hippocampus. *Neuropharmacology*, v. 53, n. 1, p. 27-36, 2007.

PITTENGER, C.; DUMAN, R. S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, n. 1, p. 88-109, 2008.

PORSOLT, R. D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, v. 229, n. 2, p. 327-36, 1977.

POSSER, T. et al. Exposure of C6 glioma cells to Pb(II) increases the phosphorylation of p38(MAPK) and JNK1/2 but not of ERK1/2. *Arch Toxicol*, v. 81, n. 6, p. 407-14, 2007.

PRICE, R. B. et al. Effects of intravenous ketamine on explicit and implicit measures of suicidality in treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry*, v. 66, n. 5, p. 522-6, 2009.

PRICKAERTS, J. et al. Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibitors, sildenafil and vardenafil, on object recognition memory and hippocampal cyclic GMP levels in the rat. *Neuroscience*, v. 113, n. 2, p. 351-61, 2002.

QU, W. S. et al. Galectin-1 attenuates astrogliosis-associated injuries and improves recovery of rats following focal cerebral ischemia. *J Neurochem*, v. 116, n. 2, p. 217-26, 2011.

QU, W. S. et al. Galectin-1 enhances astrocytic BDNF production and improves functional outcome in rats following ischemia. *Neurochem Res*, v. 35, n. 11, p. 1716-24, 2010.

RABINOVICH, G. A.; TOSCANO, M. A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol*, v. 9, n. 5, p. 338-52, 2009.

RAMANATHAN, V. K.; HALL, Z. W. Altered glycosylation sites of the delta subunit of the acetylcholine receptor (AChR) reduce alpha delta association and receptor assembly. *J Biol Chem*, v. 274, n. 29, p. 20513-20, 1999.

RAMI, A.; KRIEGLSTEIN, J. Neuronal protective effects of calcium antagonists in cerebral ischemia. *Life Sci*, v. 55, n. 25-26, p. 2105-13, 1994.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 361, n. 1473, p. 1545-64, 2006.

REINA, J. J.; BERNARDI, A. Carbohydrate mimics and lectins: a source of new drugs and therapeutic opportunities. *Mini Rev Med Chem*, v. 12, n. 14, p. 1434-42, 2012.

ROSA, A. O. et al. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. *Behav Brain Res*, v. 144, n. 1-2, p. 87-93, 2003.

RUSSI, M. A. et al. ConBr, a Lectin from *Canavalia brasiliensis* Seeds, Protects Against Quinolinic Acid-Induced Seizures in Mice. *Neurochem Res*, v. 37, n. 2, p. 288-97, 2012.

SAEZ-VALERO, J. et al. Glycosylation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase changes as a function of the duration of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, v. 72, n. 4, p. 520-6, 2003.

SAKAGUCHI, M.; IMAIZUMI, Y.; OKANO, H. Expression and function of galectin-1 in adult neural stem cells. *Cell Mol Life Sci*, v. 64, n. 10, p. 1254-8, 2007.

SAKAGUCHI, M. et al. Regulation of adult neural progenitor cells by Galectin-1/ β 1 Integrin interaction. *J Neurochem*, v. 113, n. 6, p. 1516-24, 2010.

SAKAGUCHI, M. et al. A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 18, p. 7112-7, 2006.

SALVADORE, G.; SINGH, J. B. Ketamine as a fast acting antidepressant: current knowledge and open questions. *CNS Neurosci Ther*, v. 19, n. 6, p. 428-36, 2013.

SANACORA, G.; TRECCANI, G.; POPOLI, M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology*, v. 62, n. 1, p. 63-77, 2011.

SANZ-APARICIO, J. et al. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Lett*, v. 405, n. 1, p. 114-8, 1997.

SASAKI, T. et al. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. *Glycobiology*, v. 14, n. 4, p. 357-63, 2004.

SCHACHTER, H. The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj J*, v. 17, n. 7-9, p. 465-83, 2000.

SCHERER, W. J.; UDIN, S. B. Concanavalin A reduces habituation in the tectum of the frog. *Brain Res*, v. 667, n. 2, p. 209-15, 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*, v. 17, n. 10, p. 3455-66, 1997.

SERRETTI, A. et al. Antidepressants in healthy subjects: what are the psychotropic/psychological effects? *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 20, n. 7, p. 433-53, 2010.

SERRETTI, A.; MANDELLI, L. Antidepressants and body weight: a comprehensive review and meta-analysis. *J Clin Psychiatry*, v. 71, n. 10, p. 1259-72, 2010.

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

SHAYWITZ, A. J.; GREENBERG, M. E. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*, v. 68, p. 821-61, 1999.

SHELTON, R. C. The molecular neurobiology of depression. *Psychiatr Clin North Am*, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2007.

SHIBATA, S. et al. Calcium channel blockers improve hypoxia/hypoglycemia-induced impairment of rat hippocampal 2-deoxyglucose uptake in vitro after ethanol withdrawal. *Brain Res*, v. 673, n. 2, p. 320-4, 1995.

SHICHITA, T. et al. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *J Neurochem*, v. 123 Suppl 2, p. 29-38, 2012.

SIMAO, F. et al. Protective profile of oxcarbazepine against oxygen-glucose deprivation in organotypic hippocampal slice culture could involve PI3K cell signaling pathway. *Neurol Res*, v. 31, n. 10, p. 1044-8, 2009.

SKOLNICK, P. Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol*, v. 375, n. 1-3, p. 31-40, 1999.

SOBRADO, M. et al. Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, v. 118, n. 1, p. 107-13, 2003.

SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, v. 9, n. 1, p. 59-71, 2005.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, v. 12, n. 4, p. 43R-56R, 2002

STAAL, J. A. et al. Characterization of cortical neuronal and glial alterations during culture of organotypic whole brain slices from neonatal and mature mice. *PLoS One*, v. 6, n. 7, p. e22040, 2011.

STAROSSOM, S. C. et al. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity*, v. 37, n. 2, p. 249-63, 2012.

STEINERT, J. R.; CHERNOVA, T.; FORSYTHE, I. D. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist*, v. 16, n. 4, p. 435-52, 2010.

STOPPINI, L.; BUCHS, P. A.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*, v. 37, n. 2, p. 173-82, 1991.

STREIT, W. J. Microglia and the response to brain injury. *Ernst Schering Res Found Workshop*, n. 39, p. 11-24, 2002.

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

SWEATT, J.D. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol*, v. 14, n. 3, p. 311-7, 2004.

SZASZ, B. K. et al. Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. *Biol Psychiatry*, v. 62, n. 11, p. 1303-9, 2007.

TAKASAKI, I. et al. Type II pyrethroid deltamethrin produces antidepressant-like effects in mice. *Behav Brain Res*, v. 257, p. 182-8, 2013.

TAN, S. E.; WENTHOLD, R. J.; SODERLING, T. R. Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci*, v. 14, n. 3 Pt 1, p. 1123-9, 1994.

TAOUFIK, E.; PROBERT, L. Ischemic neuronal damage. *Curr Pharm Des*, v. 14, n. 33, p. 3565-73, 2008.

THALHAMMER, A.; EVERTS, I.; HOLLMANN, M. Inhibition by lectins of glutamate receptor desensitization is determined by the lectin's sugar specificity at kainate but not AMPA receptors. *Mol Cell Neurosci*, v. 21, n. 4, p. 521-33, 2002.

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, v. 5, n. 3, p. 173-83, 2004.

TIRABOSCHI, E. et al. Antidepressants activate CaMKII in neuron cell body by Thr286 phosphorylation. *Neuroreport*, v. 15, n. 15, p. 2393-6, 2004.

TODOROVIC, C. et al. Suppression of the MEK/ERK signaling pathway reverses depression-like behaviors of CRF2-deficient mice. *Neuropsychopharmacology*, v. 34, n. 6, p. 1416-26, 2009.

TRULLAS, R.; SKOLNICK, P. Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol*, v. 185, n. 1, p. 1-10, 1990.

VARKI, A.; KORNFELD, S. Structural studies of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. *J Biol Chem*, v. 255, n. 22, p. 10847-58, 1980.

WADA, J.; MAKINO, H. Galectins, galactoside-binding mammalian lectins: clinical application of multi-functional proteins. *Acta Med Okayama*, v. 55, n. 1, p. 11-7, 2001.

WAETZIG, V.; ZHAO, Y.; HERDEGEN, T. The bright side of JNKs- Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration. *Prog Neurobiol*, v. 80, n. 2, p. 84-97, 2006.

WAYMAN, G. A. et al. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*, v. 59, n. 6, p. 914-31, 2008.

YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci*, v. 91, n. 4, p. 267-70, 2003.

YAMADA, N. et al. Impaired CNS leptin action is implicated in depression associated with obesity. *Endocrinology*, v. 152, n. 7, p. 2634-43, 2011.

YAMANE, J. et al. Transplantation of galectin-1-expressing human neural stem cells into the injured spinal cord of adult common marmosets. *J Neurosci Res*, v. 88, n. 7, p. 1394-405, 2010.

YAN, A.; LENNARZ, W. J. Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. *J Biol Chem*, v. 280, n. 5, p. 3121-4, 2005.

YANG, D. D. et al. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the Jnk3 gene. *Nature*, v. 389, n. 6653, p. 865-70, 1997.

YANG, L. C. et al. Extranuclear estrogen receptors mediate the neuroprotective effects of estrogen in the rat hippocampus. *PLoS One*, v. 5, n. 5, p. e9851, 2010.

YANG, P. C. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for stress protocol-induced modification of hippocampal synaptic plasticity. *J Biol Chem*, v. 283, n. 5, p. 2631-43, 2008.

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

YOSHII, A.; CONSTANTINE-PATON, M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. *Dev Neurobiol*, v. 70, n. 5, p. 304-22, 2010.

YUAN, Y. et al. Ischemic postconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PI3K-Akt pathway. *Brain Res*, v. 1367, p. 85-93, 2010.

YUE, K. T. et al. Differential effects of lectins on recombinant glutamate receptors. *Eur J Pharmacol*, v. 291, n. 3, p. 229-35, 1995.

ZHU, Y. M. et al. Both PI3K/Akt and ERK1/2 pathways participate in the protection by dexmedetomidine against transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Brain Res*, v. 1494, p. 1-8, 2012.

ZOMKOWSKI, A. D. et al. Involvement of NMDA receptors and L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol*, v. 20, n. 11, p. 793-801, 2012.

10 ANEXOS

10.1 **Anexo 1:** Artigo Aceito para publicação na revista *Pharmacology Biochemistry and Behavior*.

Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: evidence for the involvement of the glutamatergic system

Débora K. Rieger^{a†}, Ana Paula Costa^{a†}, Josiane Budni^a, Morgana Moretti^a, Sabrina Giovana Rocha Barbosa^a, Kyria S. Nascimento^b, Edson H. Teixeira^b, Benildo S. Cavada^b, Ana Lúcia S. Rodrigues^a, Rodrigo B. Leal^{a*}



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system



Débora K. Rieger^{a,1}, Ana Paula Costa^{a,1}, Josiane Budni^a, Morgana Moretti^a, Sabrina Giovana Rocha Barbosa^a, Kyria S. Nascimento^b, Edson H. Teixeira^b, Benildo S. Cavada^b, Ana Lúcia S. Rodrigues^a, Rodrigo B. Leal^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

^b BioMollus, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE 60455-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2014

Received in revised form 6 March 2014

Accepted 12 March 2014

Available online 18 March 2014

Keywords:

ConBr

Lectin

Depression

NMDA

Nitric oxide

Forced swimming test

ABSTRACT

Lectins recognize and reversibly bind to carbohydrates attached to proteins and lipids modulating a variety of signaling pathways. We previously showed that ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, produced an antidepressant-like effect in mice by modulating the monoaminergic neurotransmitter systems. Moreover, ConBr blocked hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid *in vivo* and by glutamate *in vitro*, suggesting a neuroprotective activity of ConBr via glutamatergic system modulation. Therefore, the present study was undertaken to investigate the involvement of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor and the L-arginine-nitric oxide (NO) pathway in the antidepressant-like action displayed by ConBr in the forced swimming test (FST). With the aim of verifying the involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like effect of ConBr (10 µg/site, *i.c.v.*), an intracerebroventricular (*i.c.v.*) pretreatment with either NMDA (0.1 pmol/site) or D-serine (30 µg/site) was carried out. The results show that both treatments blocked the effect of ConBr. Furthermore, the coadministration of subeffective doses of the NMDA receptor antagonist MK-801 (0.001 mg/kg, *i.p.*) or ketamine (0.1 mg/kg, *i.p.*; NMDA receptor antagonist) and ConBr (0.1 µg/site, *i.c.v.*) caused a synergistic reduction in immobility time. In order to verify the dependence of the L-arginine-NO-cGMP pathway, on the effect of ConBr in the FST, a pretreatment with the NO precursor, L-arginine (750 mg/kg, *i.p.*), or the PDE5 inhibitor, sildenafil (5 mg/kg, *i.p.*), was performed. Both drugs abolished the antidepressant-like action of ConBr. Finally, the administration of subeffective doses of the soluble guanylate cyclase inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazol[4,3-d]quinoxalin-1-one (ODQ; 30 pmol/site, *i.c.v.*) and ConBr (0.1 µg/site, *i.c.v.*) produced a synergistic antidepressant-like effect in the FST. Taken together, the results suggest that the antidepressant-like effect of ConBr in the FST involves NMDA receptor inhibition and reduction in NO and cGMP synthesis.

© 2014 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Lectins are ubiquitous natural carbohydrate-binding proteins possessing at least one noncatalytic domain that binds reversibly to a specific mono- or oligosaccharide, without altering its covalent structure (Dixon, 1981; Peumans and Van Damme, 1995). Lectin-binding glycoproteins participate in numerous cellular processes (Dell et al., 1999; Faheina-Martins et al., 2012; Liu and Rabinovich, 2005), and in the central nervous system (CNS), they are expressed in neurons, astrocytes and microglia where they play important roles during development, regeneration and synaptic plasticity (Imaizumi et al., 2011; Kleene and Schachner, 2004; Lin and Levitan, 1991).

Lectin-like proteins are a large group of structurally similar proteins with distinct carbohydrate specificities (Cavada et al., 2001). ConBr, a lectin

purified from *Canavalia brasiliensis* seeds, is a glucose/mannose specific lectin (Cavada et al., 2001; Sanz-Aparicio et al., 1997). The biological effects of ConBr include stimulation of nitric oxide (NO) production by murine macrophages (Andrade et al., 1999), activation or induction of apoptosis in lymphocytes (Barbosa et al., 2001), antinociceptive activity displayed by the activation of the opioid system (de Freitas Pires et al., 2011), and antiproliferative effects in human leukemia cell lines (Faheina-Martins et al., 2012). In the CNS, we previously showed that ConBr protects against seizures induced by quinolinic acid (QA), possibly modulating N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Rusli et al., 2012) and also protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a PI3K/Akt-dependent manner (Jacques et al., 2013). Moreover, Barauna et al. (2006) demonstrated that ConBr, given centrally, produces an antidepressant-like effect in the forced swimming test (FST) in mice by a mechanism dependent on activation of the monoaminergic system.

Depression is an important global public health issue, because its high lifetime prevalence and substantial disability associated with this

* Corresponding author. Tel.: +55 48 3721 5045; fax: +55 48 3721 9672.

E-mail address: rbleal@gmail.com (R.B. Leal).

¹ These authors contributed equally to this work.

disorder (Moussavi et al., 2007). Monoamine-based approaches show slow treatment response and relatively low efficacy with approximately one-third of patients responding to the first agent prescribed (Duman and Li, 2012; Nestler et al., 2002; Trivedi et al., 2006). Therefore, special attention has been given to the glutamatergic mechanism underlying antidepressant treatments. Indeed, substantial evidence suggests that NMDA receptor signaling could be considered a novel target for antidepressant action (Duman et al., 2012; Sanacora et al., 2011; Skolnick, 1999; Trullas and Skolnick, 1990).

NMDA receptors are complex ionotropic receptors. When activated, they permit calcium (Ca^{2+}) entrance from extracellular medium into the neurons, resulting in the modulation of several processes, including the L-arginine-nitric oxide (NO) signaling pathway. Ca^{2+} -activated nitric oxide synthase (NOS) converts L-arginine into NO and L-citrulline (Espulgues, 2002; Paul and Skolnick, 2003). NO produced in response to NMDA receptor stimulation has been implicated in the regulation of a variety of behavioral, cognitive and emotional processes, including depression (Steinert et al., 2010). It has been demonstrated that the reduction of NO levels within the hippocampus can induce antidepressant-like effects, thus implicating endogenous hippocampal NO overproduction in the neurobiology of depression (Dhir and Kulkarni, 2011). Some of the physiological actions of NO are mediated through cyclic guanosine monophosphate (cGMP) synthesized by the NO-sensitive soluble guanylate cyclase (sGC) enzyme. It is accepted that the NO-sGC-cGMP pathway is the main effector of NO actions in the brain (Espulgues, 2002).

Even though the antidepressant-like effect of ConBr in mouse FST has been reported (Barauna et al., 2006), little is known about its mechanism of action. NMDA receptor signaling represents an important target of antidepressant action (Duman et al., 2012; Sanacora et al., 2011; Skolnick, 1999; Trullas and Skolnick, 1990), and it is well documented that the receptor is glycosylated in the extracellular domain and may interact with glucose/mannose lectins (Everts et al., 1997). Moreover, previous results of our group suggest that ConBr can modulate the glutamatergic system (Jacques et al., 2013; Russi et al., 2012). Therefore, the present study was designed to investigate the possible involvement of the glutamatergic system (through NMDA receptors) and the L-arginine-NO pathway in the antidepressant effect elicited by central administration of ConBr, purified from *C. brasiliensis* seeds, in mouse FST.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male Swiss mice (2 months, 30–40 g) were maintained at constant room temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) with free access to water and food, under a 12:12 h light:dark cycle (lights on at 7:00 a.m.). The animals were housed in groups of 15 in $41 \times 34 \times 16$ cm cages and were placed in the experimental room 24 h before the test for acclimatization. All behavioral tests were carried out between 1:00 p.m. and 4:00 p.m. The animals were used according to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The protocol and experiments were approved by the local Ethical Committee of Animal Research (CEJA/UFSC). All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

2.2. Drugs and treatment

The following drugs were used: NMDA, ketamine, fluoxetine, D-serine, dizocilpine (MK-801), L-arginine, 1H-(1,2,4)-oxadiazolo (4,3-a) quinoxalin-1-one (ODQ) (all from Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) and sildenafil (Pfizer, São Paulo, SP, Brazil). All drugs, freshly prepared before administration, were dissolved in saline solution (0.9% NaCl), except ODQ (dissolved in saline with 1% DMSO) and fluoxetine (dissolved in distilled water). Appropriate vehicle treated groups were also assessed simultaneously.

MK-801, ketamine, L-arginine and sildenafil were administered by the intraperitoneal (i.p.) route in constant volume of 10 mL/kg body weight. NMDA, D-serine and ODQ were administered by the intracerebroventricular (i.c.v.) route (5 $\mu\text{L}/\text{site}$) and fluoxetine was administered by oral route (p.o.) by gavage in constant volume of 10 mL/kg body weight (Brocardo et al., 2008; da Silva et al., 2000; Kaster et al., 2005). All treatments were performed by an experienced investigator.

The i.c.v. injections were performed by employing a "free hand" method under light ether anesthesia according to the procedure described previously (Brocardo et al., 2008; Budni et al., 2011; Kaster et al., 2005; Neis et al., 2014). Briefly, a 0.4 mm external diameter hypodermic needle attached to a cannula, which was linked to a 25 μL Hamilton syringe, was inserted perpendicularly through the skull and no more than 2 mm into the brain of each mouse. The animals were anesthetized with ether and then gently restrained by hand for i.c.v. injections. The asepsis of the injection site was carried out using gauze embedded in 70% ethanol. Under light anesthesia (i.e., just that necessary for loss of the postural reflex), the needle was inserted unilaterally 1 mm to the midline point equidistant from each eye, at an equal distance between the eyes and the ears and perpendicular to the plane of the skull. A volume of 5 μL of the drugs was injected directly into the lateral ventricle, at the following bregma coordinates: anteroposterior (AP) = -0.1 mm; mediolateral (ML) = 1 mm; and dorsoventral (DV) = -3 mm. The injection was given over 30 s, and the needle remained in place for another 30 s in order to avoid the reflux of the substances injected. Mice exhibited normal behavior within 1 min after injection. To ascertain that the drugs were administered exactly into the cerebral ventricle, the brains were dissected and examined macroscopically after the test. Results from mice presenting misplacement of the injection site or any sign of cerebral hemorrhage were excluded from the statistical analysis (overall less than 5% of the total animals used). The effectiveness of the i.c.v. administration was previously reported by our group. We observed that 15 min subsequent to the i.c.v. injection of fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated ConBr lectin, a strong fluorescence was observed in the ventricles at the level of the injection site but also more caudally at the level of the dorsal hippocampus (Barauna et al., 2006).

ConBr was diluted with HEPES-saline buffer without glucose (NaCl 124 mM, KCl 4 mM, MgSO_4 1.2 mM, HEPES 25 mM, CaCl_2 1 mM, pH 7.4). The lectin solution (5 μL ; 0.1–50 $\mu\text{g}/\text{site}$) or vehicle (5 μL of HEPES-saline buffer without glucose) was administered to mice in the lateral ventricle (i.c.v.) 15 min before the open-field test (OFT). To obtain the dose-response curve of systemic administration of ConBr in the FST, mice were treated with increasing doses of the compound (0.1–50 $\mu\text{g}/\text{site}$, i.c.v.). Fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) (Binfante et al., 2009), a classical antidepressant (administration protocol shown in Fig. 1C), and ketamine (1 mg/kg, i.p.) an NMDA receptor antagonist that has been used as a novel antidepressant, were used as positive controls.

Aiming to determine if ConBr action depends on protein structural integrity, ConBr was denatured by boiling for 5 min (90°C). In order to block the carbohydrate recognition domain (CRD) on the lectin, ConBr (2 mg/mL) was dissolved in HEPES-saline buffer containing 0.1 M of its specific sugar (α -methyl-D-mannoside) and maintained for 30 min at 37°C prior to performing the experiments.

To test the hypothesis that the antidepressant-like effect of ConBr is dependent on the glutamatergic system and is mediated through the inhibition of NMDA receptors, mice ($n = 6-8$) were pretreated with NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.) or D-serine (30 $\mu\text{g}/\text{site}$, i.c.v.; NMDA receptor co-agonist), and after 15 min, ConBr (10 $\mu\text{g}/\text{site}$, i.c.v.) or vehicle was administered. Fifteen minutes later, the FST was carried out (Fig. 1A). The dose of NMDA was chosen based on previous studies showing that NMDA at this dose caused neither overt signs of toxicity nor alteration in locomotor activity, but was able to reverse the antidepressant-like responses of several antidepressant compounds (Brocardo et al., 2008). Likewise, we investigate the effect of the

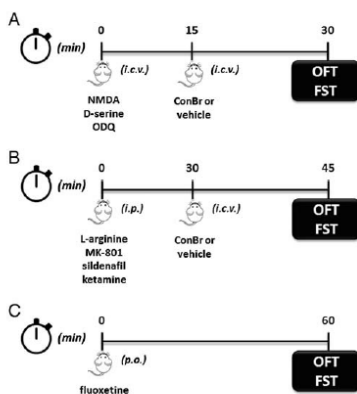


Fig. 1. Schematic view of treatments and schedule of behavioral tests. (A) Adult male Swiss mice received NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.), D-serine (30 µg/site, i.c.v.) or ODQ (30 pmol/site, i.c.v.), and 15 min afterwards, vehicle (control) or ConBr (an effective dose of 10 µg/site, or a subeffective dose of 0.1 µg/site) was injected i.c.v. Fifteen minutes after this procedure, the open-field test (OFT) and forced swimming test (FST) were carried out. (B) Adult male Swiss mice received L-arginine (750 mg/kg, i.p.), ketamine (0.1 or 1 mg/kg, i.p.) or a subeffective dose of MK-801 (0.001 mg/kg, i.p.) or sildenafil (5 mg/kg, i.p.). Thirty minutes afterwards, vehicle (control) or ConBr (in an effective dose of 10 µg/site or subeffective dose of 0.1 µg/site) was injected i.c.v. Fifteen minutes afterwards this procedure, the OFT and FST were carried out. (C) Adult male Swiss mice received fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) and 60 min afterwards this procedure, the OFT and FST were carried out.

combined administration of ConBr with ketamine in the FST. Mice were treated with a subeffective dose of ketamine (0.1 mg/kg, i.p., NMDA receptor antagonist) 30 min before the treatment with a subeffective dose of ConBr (0.1 µg/site, i.c.v.) and the behavioral tests were performed after 15 min (Fig. 1B). The dose of ketamine was chosen based on previous studies (Kaster et al., 2012; Ludka et al., 2012).

To investigate whether the antidepressant-like effect of ConBr is mediated through the involvement of the L-arginine-nitric oxide pathway in the FST, mice ($n = 5-7$) were pretreated with L-arginine, a precursor of nitric oxide (750 mg/kg, i.p.); a dose that produces no effect in the FST. Thirty minutes after L-arginine administration, ConBr (10 µg/site, i.c.v.) or vehicle was injected, and 15 min later the FST was carried out (Fig. 1B). The dose of L-arginine was chosen based on a previously reported dose-response curve in the FST (da Silva et al., 2000).

In another set of experiments, we investigated the effect of subeffective dose of ConBr (0.1 µg/site, i.c.v.), in combination with subeffective doses of the noncompetitive NMDA receptor antagonist MK-801 (0.001 mg/kg, i.p.) or the sGC inhibitor ODQ (30 pmol/site, i.c.v.). ConBr or vehicle was administered 15 min after the drugs, and 15 min later, the animals ($n = 6-8$) were tested in the FST (Fig. 1A and B).

To investigate the role of cGMP in the antidepressant action of ConBr, mice ($n = 5-7$) received an injection of the phosphodiesterase inhibitor (Brocardo et al., 2008), sildenafil (5 mg/kg, i.p.) or vehicle 30 min before ConBr (10 µg/site, i.c.v.) administration. The animals were tested in the FST 15 min after ConBr injection (Fig. 1B). The dose of sildenafil was chosen based on the study from Kaster et al. (2005). This dose was reported to reverse the antidepressant-like effect of several

compounds (Almeida et al., 2006; Dhir and Kulkarni, 2007; Kulkarni and Dhir, 2007).

2.3. Purification of lectins

C. brasiliensis lectin (ConBr) was isolated by affinity chromatography (Moreira and Cavada, 1984). Briefly, mature seeds were collected at Ceará State, northeast Brazil. The seeds were ground to a fine powder in a coffee mill and then defatted with *n*-hexane. Soluble proteins were extracted at 20 °C for 4 h by continuous stirring with 0.9% NaCl (1:10 w/v), followed by centrifugation at 10,000 g at 4 °C for 20 min. The supernatant was applied to a Sephadex G-50 column (5 × 25 cm), which had been equilibrated with 0.9% NaCl containing 5 mmol L⁻¹ CaCl₂ and MnCl₂. The column was then washed with equilibration buffer at a flow rate of 45 mL h⁻¹ until the effluent absorbance at 280 nm was below 0.05. The bound lectin was eluted with 0.1 mol L⁻¹ glycine, pH 2.6, dialyzed extensively against distilled water, and lyophilized. The affinity chromatography fraction was further purified using an Äkta chromatographic system and Mono-Q column (5 × 0.5 cm) equilibrated with 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7.0, and developed with a linear gradient of 20 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7.0, containing 1.0 mol L⁻¹ NaCl at a flow rate of 1 mL min⁻¹ and a slope of 5% NaCl/min. The lectin preparations recovered in the unbound fraction were exhaustively dialyzed against distilled water and freeze-dried. The purity of lectin was checked by SDS-PAGE showing a single band.

2.4. Forced swimming test (FST)

Mice were individually forced to swim in an open cylindrical container (diameter 10 cm; height 25 cm), containing 19 cm of water (depth) at 25 ± 1 °C; the total amount of time each animal remained immobile during a 6 min session was recorded in seconds as immobility time, as described previously (Brocardo et al., 2008; Kaster et al., 2005). Each mouse was judged to be immobile when it ceased struggling and remained floating motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water. A decrease in the duration of immobility is indicative of an antidepressant-like effect (Porsolt et al., 1977).

2.5. Open-field test (OFT)

To assess the effects of ConBr on locomotor activity, mice were evaluated in the open-field paradigm, as previously described (Rosa et al., 2003). Animals were individually placed in a wooden box (40 × 60 × 50 cm) with the floor divided into 12 rectangles. The number of rectangles crossed with all paws (crossing) was counted in a 6 min session. The apparatus were cleaned with a solution of 10% ethanol between tests in order to hide animal clues.

2.6. Statistical analysis

Comparisons between experimental and control groups were performed by one-way and two-way ANOVA followed by the Newman-Keuls test when appropriate. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

The results depicted in Fig. 2A show the effect of the treatment of mice with ConBr (0.1–50 µg/site, i.c.v.) in the immobility time in the FST. One-way ANOVA revealed a main effect of the treatment [$F(7,61) = 17.56; p < 0.0001$]. Post-hoc analyses indicated that the treatment of mice with ConBr produced a significant reduction in the immobility time in the FST at the dose range of 1–50 µg/site (i.c.v.) ($p < 0.0001$), whereas the administration of ConBr at the dose of 0.1 µg/site (subeffective dose, i.c.v.) caused no alteration in

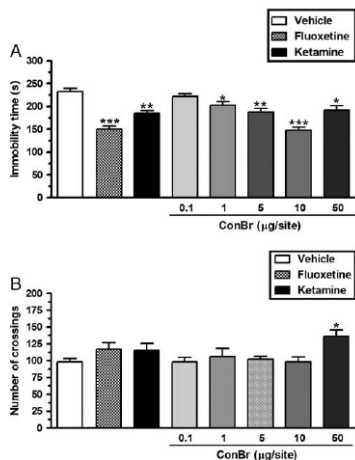


Fig. 2. ConBr causes antidepressant-like action in the FST. Effect of administration of ConBr (0.1–50 µg/site, i.c.v.) in the FST (A) and OFT (B). ConBr was administered 15 min before the tests by the i.c.v. route. Fluoxetine (10 mg/kg, p.o.) and ketamine (1 mg/kg, i.p.) were used as positive controls. Values are expressed as mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with vehicle-treated group ($n = 5-8$).

the immobility time in the FST. Fig. 2B shows the effect of ConBr (0.1–50 µg/site, i.c.v.) in the OFT. One-way ANOVA revealed a significant main effect of the treatment [$F(6,62) = 2.7$; $p < 0.05$]. The post-hoc analysis indicated that ConBr at lower doses (0.1–10 µg/site, i.c.v.) did not cause a significant change in ambulation scores. However, the highest dose (50 µg/site, i.c.v.) caused an increase in ambulation scores when compared to the control group ($p = 0.0252$). The administration of ConBr did not produce overt signs of toxicity in mice, like convulsion, stereotyped behavior or ataxia. Moreover, the antidepressant-like effect displayed by ConBr (10 µg/site) was similar to that observed for the positive control drugs fluoxetine and ketamine (Fig. 2A and B). Based on all these results the doses 10 µg/site and 0.1 µg/site were selected as the active and the subeffective dose of ConBr respectively for the subsequent experiments.

An important question that we addressed was whether the antidepressant-like action of ConBr in the FST depends on the integrity of its tertiary/quaternary protein structure. Fig. 3A shows that denaturation of ConBr blocked its effect [$F(2,21) = 15.46$; $p < 0.0001$]. Furthermore, we investigated if the decrease in immobility time elicited by the administration of the ConBr was dependent on the carbohydrate-binding domain (CRD). To make this determination, ConBr was incubated with mannose (100 mM) to block its CRD. Fig. 3C shows that ConBr lost its antidepressant-like effect after it was blocked by mannose [$F(1,15) = 140.7$; $p < 0.0001$]. The treatments did not cause significant differences in locomotor activity (Fig. 3B and D).

In order to determine if the antidepressant-like action of ConBr in FST depends on NMDA receptors, mice were pretreated with NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.) or *D*-serine (30 µg/site, i.c.v.), an agonist at the glycine site of the NMDA receptor, before ConBr administration (10 µg/site, i.c.v.). The results depicted in Fig. 4A show a significant decrease in the immobility time elicited by the administration of ConBr (10 µg/site, i.c.v.; $p = 0.00158$). The pretreatment of mice with NMDA was able to abolish the antidepressant-like effect of ConBr in the FST ($p = 0.01076$) (NMDA pretreatment [$F(1,22) = 1.55$; $p = 0.22564$]; ConBr treatment

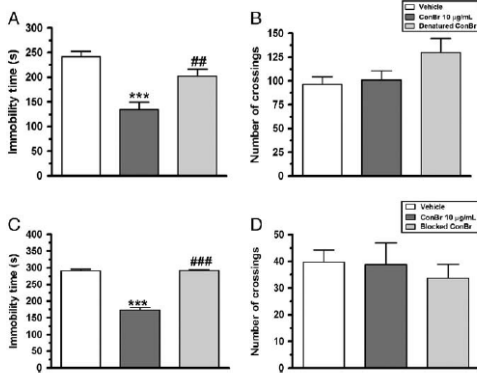


Fig. 3. The antidepressant-like effect of ConBr depends on its structural properties and on its interaction with the CRD. Effect of treatment of mice with ConBr (10 µg/site, i.c.v.), denatured ConBr in the FST (A) and OFT (B) or with blocked ConBr in the FST (C) and OFT (D). ConBr was denatured by boiling and was blocked with mannose (100 mM). Native ConBr, denatured ConBr or blocked ConBr was injected by the i.c.v. route 15 min before the tests. Values are expressed as mean \pm S.E.M. *** $p < 0.001$ compared to vehicle-treated group and ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to heated or blocked ConBr ($n = 5-8$).

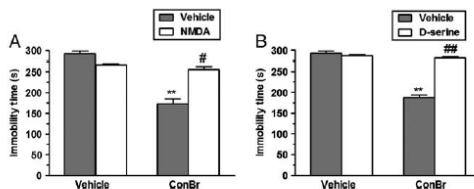


Fig. 4. Involvement of NMDA receptors in the mechanism by which ConBr causes an antidepressant-like action in the FST. Effect of pretreatment with NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.) (A) or D-serine (30 μ g/site, i.c.v.) (B) on the anti-immobility effect of ConBr in the FST ($n = 6-8$). ConBr (10 μ g/site, i.c.v.) was administered 15 min before the test. The results represent the mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$ when compared with vehicle-treated group and # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ when compared with ConBr.

[$F(1,22) = 11.64$; $p = 0.00250$] and NMDA \times ConBr interaction [$F(1,22) = 7.30$; $p = 0.01300$]. Fig. 4B shows that the antidepressant-like effect of ConBr (10 μ g/site, i.c.v.; $p = 0.00019$) in the FST was also prevented in mice pretreated with D-serine (30 μ g/site, i.c.v.; $p = 0.00016$) (D-serine pretreatment [$F(1,21) = 12.90$; $p = 0.00171$], ConBr treatment [$F(1,21) = 20.71$; $p = 0.00017$] and D-serine \times ConBr interaction [$F(1,21) = 16.57$; $p = 0.00055$]).

The results presented in Fig. 5A show an anti-immobility effect obtained by the combined administration of subeffective doses of the NMDA receptor antagonist MK-801 (0.001 mg/kg, i.c.v.) and ConBr (0.1 μ g/site, i.c.v.) in the FST, as compared to each compound alone. The two-way ANOVA revealed significant differences for MK-801 pretreatment [$F(1,21) = 22.48$; $p = 0.00011$], ConBr treatment [$F(1,21) = 31.13$; $p = 0.00001$] and MK-801 \times ConBr interaction [$F(1,21) = 10.60$; $p = 0.00377$]. The post-hoc test indicated a synergistic anti-immobility effect in the FST in the group that received ConBr combined with MK-801 ($p = 0.00017$). The treatments did not cause significant differences in locomotor activity (Fig. 5B).

Fig. 5C shows that the coadministration of subeffective doses of ConBr (0.1 μ g/site, i.c.v.) and ketamine (0.1 mg/kg, i.p.) caused an

antidepressant-like effect in the FST, as compared to each compound alone. The two-way ANOVA revealed a significant main effect for ketamine pretreatment [$F(1,25) = 28.973$; $p = 0.000014$], ConBr treatment [$F(1,25) = 33.687$; $p = 0.000005$] and ketamine \times ConBr interaction [$F(1,25) = 12.980$; $p = 0.0013$]. The post-hoc test indicated a synergistic anti-immobility effect in the FST in the group that received ConBr combined with ketamine ($p = 0.00016$). The OFT (Fig. 5D) revealed no statistical differences for the ConBr treatment [$F(1,25) = 0.2322$; $p = 0.63$], ketamine treatment [$F(1,25) = 0.1146$; $p = 0.73$] and ConBr \times ketamine treatment interaction [$F(1,25) = 1.6294$; $p = 0.21$].

In order to investigate the involvement of the L-arginine-NO and cGMP pathways in the anti-immobility effect of ConBr (10 μ g/site, i.c.v.), mice were pretreated with L-arginine (750 mg/kg, i.p.), a NO precursor, or sildenafil (5 mg/kg, i.p.), a PDE5 inhibitor. The results illustrated in Fig. 6A show that administration of L-arginine (750 mg/kg, i.p.) was able to abolish ($p = 0.00037$) the antidepressant-like effect of ConBr (10 μ g/site, i.c.v.; $p = 0.00047$) in the FST (L-arginine pretreatment [$F(1,20) = 6.83$; $p = 0.01661$], ConBr treatment [$F(1,20) = 3.59$; $p = 0.07274$], and L-arginine \times ConBr interaction [$F(1,20) = 23.04$; $p = 0.00011$]). Similarly, the anti-

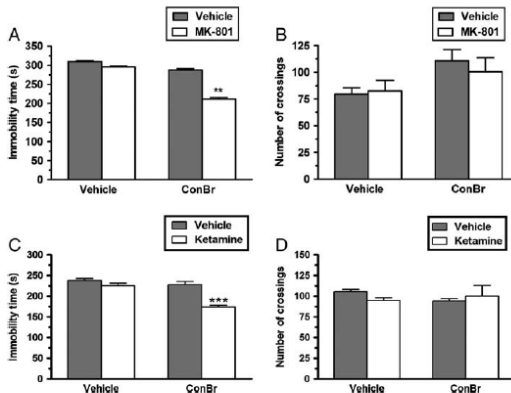


Fig. 5. Synergistic antidepressant-like effect of ConBr with NMDA receptor antagonists, MK-801 and ketamine. Effects of a combined administration of subeffective doses of MK-801 (0.001 mg/kg, i.p.) and ConBr (0.1 μ g/site, i.c.v.) in the FST (A) and OFT (B), and combined administration of subeffective doses of ketamine (0.1 mg/kg, i.p.) and ConBr (0.1 μ g/site, i.c.v.) in the FST (C) and OFT (D) ($n = 6-8$). The results represent the mean \pm S.E.M. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with vehicle-treated group.

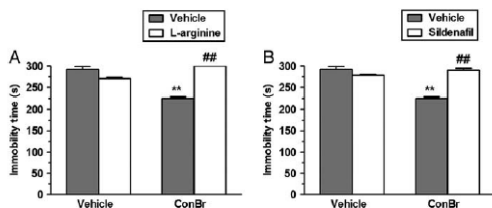


Fig. 6. The involvement of the L-arginine-nitric oxide (NO) and cGMP pathway in the anti-immobility effect of ConBr. Effect of a pretreatment with L-arginine (750 mg/kg, i.p.) (A) and sildenafil (5 mg/kg, i.p.) (B) on the anti-immobility effect of ConBr in the FST ($n = 5-7$). ConBr (10 $\mu\text{g}/\text{site}$, i.c.v.) was administered 15 min before the test. The results represent the mean \pm S.E.M., ** $p < 0.01$ when compared with vehicle-treated group and ## $p < 0.01$ when compared to ConBr.

immobility effect of ConBr (10 $\mu\text{g}/\text{site}$, i.c.v.) was completely prevented by the pretreatment of animals with sildenafil (5 mg/kg, i.p.; $p = 0.00099$), which *per se* produced no effect in the FST (sildenafil pretreatment [$F(1,20) = 5.69$; $p = 0.02702$], ConBr treatment [$F(1,20) = 6.61$; $p = 0.01823$], and sildenafil \times ConBr interaction [$F(1,20) = 14.13$; $p = 0.00124$]) (Fig. 6B).

As shown in Fig. 7A, subeffective doses of ConBr (0.1 $\mu\text{g}/\text{site}$, i.c.v.) combined with a subeffective dose of ODQ (30 pmol/site, i.c.v.), a specific sGC enzyme inhibitor, elicited anti-immobility effects in the FST. Two-way ANOVA showed significant differences for ODQ pretreatment [$F(1,20) = 18.22$; $p = 0.00037$], ConBr treatment [$F(1,20) = 19.78$; $p = 0.00025$], and ODQ \times ConBr interaction [$F(1,20) = 6.77$; $p = 0.01703$]. The *post-hoc* test indicated a synergistic anti-immobility effect in the FST in the group that received ConBr combined with ODQ ($p = 0.00019$). The administration of ODQ alone or in combination with ConBr did not affect ambulation in the OFT (Fig. 7B).

4. Discussion

We previously demonstrated that ConBr given centrally, was capable of producing an antidepressant-like effect similar to the antidepressant fluoxetine, acting via the serotonergic (5-HT1A and 5-HT2), noradrenergic ($\alpha 2$ -adrenoceptors) and dopaminergic (D2 receptors) systems (Baraona et al., 2006). In the present study, we provide evidence that inhibition of NMDA receptors-L-arginine-NO-cGMP pathway is also involved in the ConBr antidepressant-like effect in the FST in mice.

It is important to note that the antidepressant-like effect of ConBr depends on its structural properties and on its interaction with the glycan chain on the cell surface that is a fundamental step to anchor the lectin on its target. This conclusion is based on the results that show that the reduction of immobility time elicited by ConBr was

counteracted either by thermal denaturation or by the blockage of the carbohydrate-binding domain (CRD) via preincubation of ConBr with mannose.

The previous results of our group demonstrating ConBr protection against seizures induced by quinolinic acid (QA) *in vivo* (Russi et al., 2012) and against glutamate neurotoxicity *in vitro* (Jacques et al., 2013) suggest glutamate transmission as a possible target for ConBr. Therefore, while it is well established that monoaminergic transmission has a primary role in the modulation of emotion and cognition (Nestler et al., 2002), excitatory transmission has been recognized to play a central role mediating complex emotional/cognitive changes associated with depression and most likely represents a common pathway of therapeutic treatments for depression and other mood/anxiety disorders (Hashimoto, 2011). A growing amount of evidence shows that glutamatergic, noradrenergic and serotonergic systems interact in the mechanism of action of antidepressants (Bonanno et al., 2005; Pittaluga et al., 2007; Szasz et al., 2007).

In this study, we showed that pretreatment of the animals with the NMDA receptor agonist NMDA (0.1 pmol/site, i.c.v.) or D-serine, NMDA receptor coagonist (30 $\mu\text{g}/\text{site}$, i.c.v.), abolished the reduction of the immobility time elicited by ConBr in the FST, suggesting that the antidepressant-like effect of ConBr is dependent on the inhibition of NMDA receptor. The hypothesis of the involvement of NMDA receptors in ConBr action was reinforced with the synergistic anti-immobility effect observed by the combined administration of subeffective doses of the NMDA receptor antagonist MK-801 and ConBr. Compelling evidence from clinical studies suggests that glutamate transmission is abnormally regulated in a number of limbic/cortical areas in the brain of depressed individuals. Multiple studies have reported findings of elevated glutamate content in the plasma of depressed patients compared to healthy subjects (Kucukibrahimoglu et al., 2009; Mauri et al., 1998; Mitani et al., 2006). Other studies have provided evidence that treatment with antidepressant agents may decrease the plasma glutamate levels

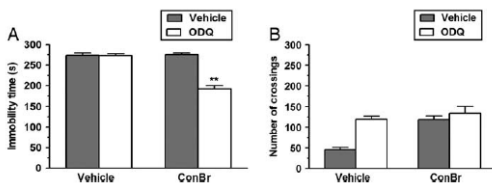


Fig. 7. The antidepressant-like effect of ConBr in the FST involves the NO-cGMP pathway. Effects of a combined administration of subeffective doses of ODQ (30 pmol/site, i.c.v.) and ConBr (0.1 $\mu\text{g}/\text{site}$, i.c.v.) ($n = 6-8$) in the FST (A) and OFT (B). The results represent the mean \pm S.E.M., ** $p < 0.01$ compared with vehicle-treated group.

in depressed individuals (Altamura et al., 1995; Kucukbrahimoglu et al., 2009). Therefore, the putative effect of ConBr on NMDA receptors via glycans might represent an interesting new strategy for NMDA receptor modulation in pathological conditions.

The hypothesis of the involvement of NMDA receptors in the anti-immobility effect of ConBr was further reinforced by additional experiments which showed that the treatment of mice with a subeffective dose of ConBr combined with a subeffective dose of ketamine produces an antidepressant-like effect in the FST. It has been demonstrated that the NMDA receptor antagonist ketamine has rapid-acting and transient antidepressant effects in patients that are treatment resistant (Duman et al., 2012; Krystal et al., 2013). Moreover, it was demonstrated that ketamine produce a rapid antidepressant response in FST and novelty-suppressed feeding tests, and blocked anhedonia caused by chronic stress exposure (Kaster et al., 2012; Krystal et al., 2013; Ludka et al., 2012; Zarate et al., 2013).

NO is a messenger molecule in the nervous system that is synthesized from L-arginine by NOS following activation of the NMDA receptors. Moreover, the elevated level of this molecule is related to biological processes associated with depression (Steinert et al., 2010). NO can, in turn, activate soluble sGC that generates cGMP, which mediates many NO effects (Denninger and Marletta, 1999). Considering the possibility of controlling NMDA activation by ConBr, which would ultimately modulate NO levels, we also investigated the involvement of the L-arginine–NO pathway in the antidepressant-like effect of ConBr. We show that the treatment of mice with L-arginine, a NO precursor, was able to reverse the decreased immobility time elicited by ConBr, suggesting that the inhibition of NO synthesis might be implicated in the antidepressant-like effect produced by this lectin in the FST. Indeed, the administration of L-arginine inhibits the activity of different antidepressants, such as escitalopram, imipramine, venlafaxine and bupropion, in preclinical studies (Harkin et al., 1999; Zomkowski et al., 2012).

Biological signaling by NO is primarily mediated by cGMP, which is synthesized by NO-activated guanylyl cyclases and broken down by cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) (Beavo, 1995). Our study demonstrates that the combined administration of subeffective doses of ConBr and the sGC inhibitor ODQ produced synergistic anti-immobility effect in the FST. In line with this, the PDE5 inhibitor sildenafil prevented the anti-immobility effect of ConBr. Thus, when taken together, it is possible to postulate that the reduction in cGMP levels is a key event involved in the antidepressant-like effects displayed by ConBr, which agrees with the effect of other compounds with predictive antidepressant action in animal models (Brocardo et al., 2008; Moretti et al., 2011; Rosa et al., 2003).

5. Conclusion

In conclusion, we showed that ConBr administered centrally exerts an antidepressant-like effect in the FST by a mechanism involving inhibition of the NMDA receptors–L-arginine–NO–cGMP pathway. Given that these targets have been increasingly reported to be involved in the pathophysiology of depression and on the antidepressants efficacy, we can speculate that ConBr shares some mechanisms of action with antidepressants through glycan residues.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Brazil (#305194/2010-0 and #481523/2013-8); Studies and Projects Financing Agency (FINEP) and National Institute of Science and Technology (INCT) for Excitotoxicity and Neuroprotection (IBN 01.06.0842-00); Santa Catarina Research

Foundation (FAPESC) and PRONEX – Santa Catarina Center of Excellence in Applied Neuroscience (NENASC; #2012000354). A.L.S.R., E.H.T., K.S.N., B.S.C. and R.B.L. are recipients of research scholarships from CNPq. The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We thank David Martin for helping with the English language editing of the manuscript.

References

- Almeida RC, Felisbino CS, Lopez MG, Rodrigues AL, Gablan NH. Evidence for the involvement of L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of memantine in mice. *Behav Brain Res* 2006;168:318–22.
- Altamura C, Maes M, Dai J, Meltzer HY. Plasma concentrations of excitatory amino acids, serine, glycine, taurine and histidine in major depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 1995;5:71–5. (Suppl).
- Andrade JL, Arruda S, Barbosa T, Paim L, Ramos MV, Cavada BS, et al. Lectin-induced nitric oxide production. *Cell Immunol* 1999;194:98–102.
- Barauna SC, Kaster MP, Heckert BT, do Nascimento KS, Rossi JM, Teixeira EH, et al. Antidepressant-like effect of lectin from *Conovallia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;85:160–9.
- Barbosa T, Arruda S, Cavada B, Grangoso TB, de Freitas LA, Baral-Netto M. In vivo lymphocyte activation and angiogenesis by lectins of the Diocleinae subtribe. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;196:673–8.
- Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev* 1995;75:725–48.
- Binfare RW, Rosa AO, Lobato KR, Santos AR, Rodrigues AL. Ascorbic acid administration produces an antidepressant-like effect: evidence for the involvement of monoaminergic neurotransmission. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33:530–40.
- Bonanno G, Gambelli R, Raiteri L, Tiraboschi E, Zappertini S, Muzazzi L, et al. Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. *J Neurosci* 2005;25:3270–9.
- Brocardo PS, Budni J, Lobato KR, Kaster MP, Rodrigues AL. Antidepressant-like effect of folic acid: involvement of NMDA receptors and L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur J Pharmacol* 2008;598:37–42.
- Budni J, Lobato KR, Binfare RW, Freitas AE, Costa AP, Martin-de-Saavedra MD, et al. Involvement of PI3K, GSK-3beta and PPARgamma in the antidepressant-like effect of folic acid in the forced swimming test in mice. *J Psychopharmacol* 2011;26:714–23.
- Cavada BS, Barbosa T, Arruda S, Grangoso TB, Baral-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. *Curr Protein Pept Sci* 2001;2:123–35.
- da Silva GD, Matteussi AS, dos Santos AR, Calixto JB, Rodrigues AL. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *Neuroreport* 2000;11:3699–702.
- de Freitas Pires A, Azeiteiro AM, Lopes EA, Celedonio NR, Soares CE, Rodrigues NV, et al. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Conovallia brasiliensis*. *Fundam Clin Pharmacol* 2011;27:201–9.
- Dell A, Morris HR, Easton RL, Panakar M, Clark GF. The glycochemistry of gametes and fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1999;1473:196–205.
- Denninger JW, Marletta MA. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:334–50.
- Dhir A, Kulkarni SK. Involvement of L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2007;31:921–5.
- Dhir A, Kulkarni SK. Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide* 2011;24:125–31.
- Dixon HBF. Defining a lectin. *Nature* 1981;292:192.
- Duman RS, Li N. A neurotrophic hypothesis of depression: the role of synaptogenesis in the actions of NMDA receptor antagonists. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012;367:2475–84.
- Duman RS, Li N, Liu RJ, Durk V, Aghajanian G. Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology* 2012;262:35–41.
- Espiguelas JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol* 2002;135:1079–95.
- Everts I, Villmann C, Hollmann M. N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Mol Pharmacol* 1997;52:861–73.
- Fabeina-Martins GV, da Silveira AL, Cavalanti BC, Ramos MV, Moraes MO, Pessoa C, et al. Antiproliferative effects of lectins from *Conovallia ensiformis* and *Conovallia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicol in Vitro* 2012;26(1):161–9.
- Harkin AJ, Bruce KH, Gaß R, Paul IA. Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur J Pharmacol* 1999;372:207–13.
- Hashimoto K. The role of glutamate on the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35:1558–68.
- Imaizumi Y, Sakaguchi M, Morishita T, Ito M, Poirier F, Sawamoto K, et al. Galectin-1 is expressed in early-type neural progenitor cells and down-regulates neurogenesis in the adult hippocampus. *Mol Brain* 2010;3:147.
- Jacques AV, Rieger DK, Maestri M, Lopes MW, Peres TV, Gonçalves FM, et al. Lectin from *Conovallia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate

- neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. *Neurochem Int* 2013;62: 836–42.
- Kaster MP, Rosa AO, Santos AR, Rodrigues AL. Involvement of nitric oxide–cGMP pathway in the antidepressant-like effects of adenosine in the forced swimming test. *Int J Neuropsychopharmacol* 2005;8:601–6.
- Kaster MP, Machado DG, Santos AR, Rodrigues AL. Involvement of NMDA receptors in the antidepressant-like action of adenosine. *Pharmacol Rep* 2012;64:706–13.
- Kleene R, Schachner M. Glycans and neural cell interactions. *Nat Rev Neurosci* 2004;5: 195–208.
- Krystal JH, Sanacora C, Duman RS. Rapid-acting glutamatergic antidepressants: the path to ketamine and beyond. *Biol Psychiatry* 2013;73:1133–41.
- Kucukbrahimoğlu E, Saygin MZ, Caliskan M, Kaplan OK, Uresal C, Goren MZ. The change in plasma GABA, glutamine and glutamate levels in fluoxetine- or 5-citalopram-treated female patients with major depression. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65:571–7.
- Kulkarni SK, Dhir A. Possible involvement of L-arginine–nitric oxide (NO)–cyclic guanosine monophosphate (cGMP) signaling pathway in the antidepressant activity of berberine chloride. *Eur J Pharmacol* 2007;569:77–83.
- Lin SS, Levitan IB, Concananin A: a tool to investigate neuronal plasticity. *Trends Neurosci* 1991;14:273–7.
- Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2005;5:29–41.
- Ludka FK, Zomkowski AD, Cunha MP, Dal-Cim T, Zeni AL, Rodrigues AL, et al. Acute atorvastatin treatment exerts antidepressant-like effect in mice via the L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway and increases BDNF levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 2012;23:400–12.
- Maun MC, Ferrara A, Boscatto I, Bravin S, Zamberlan F, Alecci M, et al. Plasma and platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and under fluvoxamine treatment. *Neuropsychobiology* 1998;37:124–9.
- Mitani H, Shirayama Y, Yamada T, Maeda K, Ashby Jr CR, Kawahara R. Correlation between plasma levels of glutamate, alanine and serine with severity of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30:1155–8.
- Moreira RA, Cavada BS. Lectin from *Canavalia bursiflora* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. *Biol Plant Paga – Czechoslov* 1984;26:113–20.
- Moretti M, Freitas AE, Budini J, Fernandes SC, Baden Gde O, Rodrigues AL. Involvement of nitric oxide–cGMP pathway in the antidepressant-like effect of acorbic acid in the tail suspension test. *Behav Brain Res* 2011;225:328–33.
- Mousavi S, Chatterji S, Verdes E, Tandon A, Patel V, Ustun B. Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys. *Lancet* 2007;370: 851–8.
- Neis VB, Manosso LM, Moretti M, Freitas AE, Daufenbach J, Rodrigues AL. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- α is abolished by agmatine administration. *Behav Brain Res* 2014;261C:36–44.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM. Neurobiology of depression. *Neuron* 2002;34:13–25.
- Paul IA, Skolnick P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1003:250–72.
- Peumans WJ, Van Damme EJ. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol* 1995;109: 347–52.
- Pittaluga A, Rateri L, Longardo F, Lucchini E, Barbero VS, Racagni G, et al. Antidepressant treatments and function of glutamate ionotropic receptors mediating antidepressant effects in hippocampus. *Neuropharmacology* 2007;53:27–36.
- Postolt RD, Le Pichon M, Jaffre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977;266:730–2.
- Rosa AO, Lin J, Calixto JB, Santos AR, Rodrigues AL. Involvement of NMDA receptors and L-arginine–nitric oxide pathway in the antidepressant-like effects of zinc in mice. *Behav Brain Res* 2003;144:87–93.
- Russi MA, Vandrezen-Filho S, Rieger DK, Costa AP, Lopes MW, Cunha RM, et al. Confl. a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. *Neurochem Res* 2012;37:288–97.
- Sanacora G, Treccani G, Popoli M. Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 2011;62:63–77.
- Sanz-Aparicio J, Hermoso J, Grangeiro TB, Calvete JJ, Cavada BS. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Lett* 1997;405:114–8.
- Skolnick P. Antidepressants for the new millennium. *Eur J Pharmacol* 1999;375:31–40.
- Steinert P, Chernova T, Forsythe ID. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* 2010;16:435–52.
- Szase BK, Mike A, Karoly R, Gerevich Z, Illes P, Vizi ES, et al. Direct inhibitory effect of fluoxetine on N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 2007;62:1303–9.
- Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Warden D, Ritz L, et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry* 2006;163:28–40.
- Trullas R, Skolnick P. Functional antagonism at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol* 1990;185:1–10.
- Zarate C, Duman RS, Liu G, Sartori S, Quinzó J, March H. New paradigms for treatment-resistant depression. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1292:21–31.
- Zomkowski AD, Engel D, Gablan NH, Rodrigues AL. Involvement of NMDA receptors and L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol* 2012;20:793–801.