



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

RODRIGO MARANGUAPE SILVA DA CUNHA

**ALTERAÇÕES NO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES EM CÉLULAS
HIPOCAMPAIS DE CAMUNDONGOS (*MUS MUSCULUS*) INDUZIDAS POR
LECTINAS DE *CANAVALIA BRASILIENSIS* (CONBR) E *VATAIREA
MACROCARPA* (VML) SUGEREM DIFERENTES EFEITOS SOBRE A
NEUROPLASTICIDADE**

**FORTALEZA
2010**

RODRIGO MARANGUAPE SILVA DA CUNHA

ALTERAÇÕES NO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES EM CÉLULAS
HIPOCAMPAIS DE CAMUNDONGOS (*MUS MUSCULUS*) INDUZIDAS POR
LECTINAS DE *CANAVALIA BRASILIENSIS* (CONBR) E *VATAIREA MACROCARPA*
(VML) SUGEREM DIFERENTES EFEITOS SOBRE A NEUROPLASTICIDADE

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal

FORTALEZA

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C98a Cunha, Rodrigo Maranguape Silva da.

Alterações no perfil de expressão de genes em células hipocâmpais de camundongos (*Mus musculus*) induzidas por lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Vatairea macrocarpa* (VML) sugerem diferentes efeitos sobre a neuroplasticidade / Rodrigo Maranguape Silva da Cunha. – 2010.

143 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2010.

Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.

Coorientação: Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal.

1. Genes em células hipocâmpais. 2. Lectinas de *canavalia brasiliensis*. 3. Neuroplasticidade. I. Título.

RODRIGO MARANGUAPE SILVA DA CUNHA

ALTERAÇÕES NO PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES EM CÉLULAS HIPOCAMPAIS DE CAMUNDONGOS (*MUS MUSCULUS*) INDUZIDAS POR LECTINAS DE *CANAVALIA BRASILIENSIS* (CONBR) E *VATAIREA MACROCARPA* (VML) SUGEREM DIFERENTES EFEITOS SOBRE A NEUROPLASTICIDADE

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rodrigo Bainy Leal (Co-orientador)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Jorge Luiz Martins
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Alexandre Holanda Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

RESUMO

O Sistema Nervoso produz e regula todos os aspectos das funções do corpo humano e a sua complexidade parece ser infinita. Bilhões de neurônios, agrupados para diferentes funções, checam constantemente o meio interno da nossa anatomia e o universo exterior, como a luz, pressão, som, equilíbrio, imagens, concentrações de muitas substâncias, dor, emoção, consciência e etc. A aquisição de novas memórias induz precisas modificações na quantidade e na intensidade circuitária neuronal. A região do cérebro onde a formação da memória mais tem sido estudada é a formação hipocampal. O sistema nervoso central possui um sistema extremamente rigoroso de controle da expressão de genes. O controle espaço-temporal da expressão destas moléculas é um mecanismo não somente de construir a rede funcional dos neurônios, mas de ajustar a rede em resposta às novas informações recebidas pelo indivíduo. A modificação das sinapses, ou seja: criação de novas, exclusão, enfraquecimento e fortalecimento e diversas outras modificações, são denominadas de neuroplasticidade. Neuroplasticidade é um termo abrangente e compreende diversas modificações na circuitária do neurônios. Grande parte do nosso conhecimento da neuroplasticidade e formação da memória advém de dois fenômenos antagônicos, a potenciação de longo termo (LTP) e a depressão de longo termo (LTD). Por sua vez, a LTP é dividida em pelo menos duas fases temporais distintas, a LTP inicial (E-LTP) e a tardia (L-LTP). A E-LTP dura somente alguns minutos e depende de proteínas já existentes. A L-LTP persiste por horas ou dias e requer a transcrição de genes e a síntese de novas proteínas. A expressão de diversos genes está relacionada a neuroplasticidade, como *BDNF*, *c-fos*, *c-jun*, *Arc*, *SNAP25* e etc. Lectinas são proteínas de origem não imune que reconhecem e ligam-se a específicos epítomos estruturais de carboidratos, contudo, sem modificá-los. Devido à habilidade destas proteínas de decifrar glico-códigos, as lectinas são capazes de induzir diversos efeitos biológicos. Os objetivos principais deste trabalho foram determinar o efeito das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* e de *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) na expressão de genes de importantes vias do metabolismo de células hipocámpais e avaliar o potencial destas lectinas sobre a neuroplasticidade e a neuroproteção. Para tanto, analisamos o nível de expressão, nos tempos de 1, 6, 12 e 24 horas, de três transcritos alternativos de BDNF, BDN total, TrkB, Arc, SNAP25, c-fos, c-jun, EAAT1, EAAT2, Lgals1, Lgals3, NR1, NR2A, NR2B, BAD, BCL2, COX2

e HO1. Os dados obtidos demonstram que o tratamento com VML elevou a expressão de BDNF Éxon I, Arc, c-fos, Lgals1, Lgals3, NR2B, BAD, BCL2 e Cox-2 no tempo de uma hora. O aumento de BAD e COX2 sugere que essa lectina está modulando um processo inflamatório. No contexto geral, VML reduziu a expressão de diversos genes importantes para a neuroplasticidade e para a função neuronal. Por outro lado, o tratamento com ConBr, principalmente após 12 horas do tratamento, induziu um forte aumento da expressão de todas as formas de BDNF analisadas, TrkB, SNAP25, c-fos, c-jun e outros, sugerindo um aumento da atividade neuronal e indução da neuroplasticidade. Além disso, ConBr elevou consideravelmente a expressão de EAAT1 e EAAT2, sugerindo que ConBr modula a homeostase de glutamato, prevenindo a excitotoxicidade. Vale salientar ainda que ConBr não aumentou a expressão de BAD e COX2. Podemos concluir que ConBr, mas não VML, tem forte potencial biotecnológico na modulação da neuroplasticidade, neuroproteção e regulação da atividade neuronal.

Palavras-chave: genes em células hipocâmpais; lectinas de *canavalia brasiliensis*; neuroplasticidade.

ABSTRACT

The nervous system regulates every aspect of the human body functions, and its complexity seems to be unlimited. Billions of neurons, clustered by distinct functions, constantly assess our anatomic inner conditions and surroundings factors, as light, pressure, sound, equilibrium, visual images, compounds concentrations, pain, emotions, consciousness, etc. The acquirement of new memories induces precise alterations on the neuronal guidance sum and intensity. The brain region where the memory formation is most studied is the hippocampus. The gene expression is rigorously controlled by the central nervous system. This space-time control is not only an efficient mechanism to functional neuronal net, but also to adjust this system in response to the acquisition of new information. The synapses alterations are known as neuroplasticity, a wide term that includes variations in the neuronal circuit, i.e. creation, exclusion, weakening, strengthening, etc. Most of our current knowledge on neuroplasticity and memory formation is from two antagonistic phenomenons, the long-term potentiation (LTP) and the long-term depression (LTD). The LTP is usually divided in two temporal distinct phases, the early (E-LTP) and late LTP (L-LTP). The E-LTP depends on preexistent proteins and last only a few minutes. Conversely, the L-LTP persists for several hours or days, requiring gene transcription and protein synthesis. The expression of several known genes, as BDNF, c-fos, c-jun, Arc, SNAP25, etc., is associated to neuroplasticity. Lectins are non-immune proteins that recognize and bind to carbohydrate specific structural epitopes. The aims of the present study was to assess the effect of the lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) seeds on the expression of key genes in hippocampus cell metabolism, and to evaluate these lectins potential on the neuroplasticity and neuroprotection. For this, the time-dependent expression levels (1, 6, 12 and 12 h) of the following genes were analyzed: BDNF (Total and three alternative transcripts), TrkB, Arc, SNAP25, c-fos, c-jun, EAAT1, EAAT2, Lgals1, Lgals3, NR1, NR2A, NR2B, BAD, BCL2, COX2 e HO1. The obtained results demonstrate that the VML treatment, after 1 h induced the expression of the genes BDNF (exon 1), Arc, c-fos, Lgals1, Lgals3, NR2B, BAD, BCL2 and Cox-2. BAD and COX2 up-regulation suggest that the VML is probably involved in an inflammatory process modulation. Nonetheless, in a general context, this lectin down-regulated the expression of several important genes to neuronal functioning and neuroplasticity. On the other hand, the ConBr treatment, predominantly after 12 h,

induced an intense increase in the BDNF expression, as well as the transcripts from TrkB, SNAP25, c-fos, c-jun and other genes, suggesting an augmented neuronal activity and neuroplasticity induction. Moreover, ConBr up-regulated EAAT1 and EAAT2 expression, indicating that this lectin could exerts a role on glutamate homeostasis, preventing excitotoxicity. Besides, it is worth pointing out that ConBr did not induced BAD and COX2 genes expression. Considering the obtained results, it can be concluded that ConBr, but not VML, has a strong biotechnological potential to modulate neuroplasticity, to act in neuroprotection and to regulate neuronal activity.

Keywords: genes in hippocampal cells; brasiliensis cane lectins; neuroplasticity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Lista dos primers organizados por categorias. São mostradas as sequências dos primers F (avante) e R (reverso); número de acesso no NCBI; tamanho do *amplicon* em número de pares de base e posicionamento na junção exon-exon (E/E), quando houver. ... 66

Figura 2 Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de RNA total de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 1-4: RNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após 24 horas; Raias 5-8: RNA total dos animais tratados com ConBr nativa após 24 horas; Raias 9-12: RNA total dos animais tratados com salina após 24 horas; Raias 13-16: RNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após 6 horas; Raias 17-20: RNA total dos animais tratados com ConBr nativa após 6 horas; e Raias 21 e 22: RNA total dos animais tratados com salina após 24 horas.. 71

Figura 3 Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de RNA total de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 23-26: RNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após 12 horas; Raias 27-30: RNA total dos animais tratados com ConBr nativa após 12 horas; Raias 31-34: RNA total dos animais tratados com salina após 12 horas; Raias 35-38: RNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após uma hora; e Raias 39-42: RNA total dos animais tratados com ConBr nativa após uma hora..... 71

Figura 4 Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de RNA total de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 43-46: RNA total dos animais tratados com VML desnaturada após 1 hora; Raias 47-50: RNA total dos animais tratados com VML nativa após 1 hora; Raias 51-54: RNA total dos animais tratados com VML desnaturada após 6 horas; Raias 55-58: RNA total dos animais tratados com VML nativa após 6 horas; Raias 59-62: RNA total dos animais tratados com VML desnaturada após 12 horas. 72

Figura 5 Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de cDNA total de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 1-4: cDNA dos animais tratados com ConBr desnaturada após 24 horas; Raias 5-8: cDNA dos animais tratados com ConBr nativa após 24 horas; Raias 9-12: cDNA dos animais tratados com salina após 24 horas; Raias 13-16: cDNA dos animais tratados com ConBr desnaturada após 6 horas; Raias 17-20: cDNA dos animais tratados com ConBr nativa após 6 horas; e Raia 21: cDNA do animal tratado com salina após 24 horas..... 75

Figura 6 Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de cDNA de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 23-26: cDNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após 12 horas; Raias 27-30: cDNA total dos animais tratados com ConBr nativa após 12 horas; Raias 31-34: cDNA total dos animais tratados com salina após 12 horas; Raias 35-38: cDNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após uma hora; e Raias 39-42: cDNA total dos animais tratados com ConBr nativa após uma hora; 43-46: cDNA dos animais tratados com VML desnaturada após 1 hora; Raias 47-50: cDNA dos animais tratados com VML nativa após 1 hora; Raias 51-54: cDNA dos animais tratados com VML desnaturada após 6 horas 75

Figura 7 Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de RNA total de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 55-58: cDNA total dos animais tratados com VML nativa após 6 horas; Raias 59-62: cDNA dos animais tratados com VML desnaturada após 12 horas; Raias 63-66: cDNA total dos animais tratados com VML nativa após 12 horas; Raias 67-70: cDNA dos animais tratados com VML desnaturada após 24 horas, e Raias 71-74: cDNA dos animais tratados com VML nativa após 24 horas. Raia 75 mesma amostra da Raia 39 (Figura 6), repetição. 75

Figura 8 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon I (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF I, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de BDNF I dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 e 12 horas 77

Figura 9 Nível de expressão relativa de BDNF I em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 77

Figura 10 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon II (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF II, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de BDNF II dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 6 e 12 horas 79

Figura 11 Nível de expressão relativa de BDNF II em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 79

Figura 12 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon IV (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF IV, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de BDNF IV dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 12 e 24 horas 80

Figura 13 Nível de expressão relativa de BDNF IV em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 80

Figura 14 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão da pan-BDNF (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de pan-BDNF dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 12 e 24 horas. 81

Figura 15 Nível de expressão relativa de pan-BDNF em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 81

Figura 16 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de TrkB, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de TrkB dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 12 e 24 horas. 82

Figura 17 Nível de expressão relativa de TrkB em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 82

Figura 18 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de Arc, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de Arc dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 6 e 24 horas. 83

Figura 19 Nível de expressão relativa de Arc em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001). 83

Figura 20 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de SNAP-25, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição

de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de SNAP-25 dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 6 e 12 horas. 84

Figura 21 Nível de expressão relativa de SNAP25 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 84

Figura 22 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de c-fos, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de c-fos dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 6 e 12 horas. 85

Figura 23 Nível de expressão relativa de c-fos em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 85

Figura 24 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de c-jun, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de c-jun dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 6 e 12 horas. 86

Figura 25 Nível de expressão relativa de c-jun em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 86

Figura 26 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de EAAT-1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de EAAT-1 dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 12 e 24 horas. 87

Figura 27 Nível de expressão relativa de EAAT1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em

comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 87

Figura 28 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de EAAT-2, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de EAAT-2 dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 6 e 12 horas. 88

Figura 29 Nível de expressão relativa de EAAT2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 88

Figura 30 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de Lgals1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de Lgals1 dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, e 6 horas. 89

Figura 31 Nível de expressão relativa de Lgal1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 90

Figura 32 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de Lgals3, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de Lgals3 dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempo de 12 horas. 90

Figura 33 Nível de expressão relativa de Lgal3 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 91

Figura 34 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de NR1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de NR1 dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram

analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 6 horas. ... 91

Figura 35 Nível de expressão relativa de NR1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 92

Figura 36 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de NR2A, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de NR2A dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 12 horas. 92

Figura 37 Nível de expressão relativa de NR2A em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 93

Figura 38 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de NR2B, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de NR2B dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 1 e 12 horas. 93

Figura 39 Nível de expressão relativa de NR2B em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 94

Figura 40 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de BAD, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de BAD dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 6 horas. ... 94

Figura 41 Nível de expressão relativa de BAD em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 95

Figura 42 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de NR1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia*

brasiliensis (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de NR1 dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 6, 12 e 24 horas..... 95

Figura 43 Nível de expressão relativa de BCL2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 96

Figura 44 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de COX2, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de COX2 dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos e não foi detectada a expressão do gene nos indivíduos tratados com ConBr nativa. 96

Figura 45 Nível de expressão relativa de COX2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 97

Figura 46 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de HO, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de HO dos animais controle () e dos animais tratados com ConBr nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos, nos tempos analisados 97

Figura 47 Nível de expressão relativa de HO em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001). 98

Figura 48 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon I (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF I, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de BDNF I dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 1 hora. 99

Figura 49 Nível de expressão relativa de BDNF I em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 100

Figura 50 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon II (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF II, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de BDNF II dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 6 horas. 100

Figura 51 Nível de expressão relativa de BDNF II em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 101

Figura 52 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon IV (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF IV, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de BDNF IV dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 24 horas..... 101

Figura 53 Nível de expressão relativa de BDNF IV em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 102

Figura 54 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de pan-BDNF (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de pan-BDNF dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 24 horas. 102

Figura 55 Nível de expressão relativa de pan-BDNF em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 103

Figura 56 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão TrkB, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de TrkB dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 6 e 24 horas. 103

Figura 57 Nível de expressão relativa de TrkB em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001). 104

Figura 58 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão Arc, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de Arc dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 6 e 12 horas. 104

Figura 59 Nível de expressão relativa de Arc em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001). 105

Figura 60 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão SNAP-25, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de SNAP-25 dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 12 horas. 105

Figura 61 Nível de expressão relativa de SNAP25 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001). 106

Figura 62 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão c-fos, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de c-fos dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 e 6 horas. 106

Figura 63 Nível de expressão relativa de c-fos em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em

comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 107

Figura 64 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão *c-jun*, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de *c-jun* dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 12 e 24 horas..... 107

Figura 65 Nível de expressão relativa de *c-jun* em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 108

Figura 66 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão EAAT-1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de EAAT-1 dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 6 horas. 108

Figura 67 Nível de expressão relativa de EAAT1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 109

Figura 68 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão EAAT-2, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de EAAT-2 dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 1 hora. ... 109

Figura 69 Nível de expressão relativa de EAAT2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 110

Figura 70 Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão *Lgals1*, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de *Lgals1* dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 1 hora. ... 110

Figura 71 Nível de expressão relativa de Lgal1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 111

Figura 72 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão Lgals3, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de Lgals3 dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 1 e 12 horas. 111

Figura 73 Nível de expressão relativa de Lgal3 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 112

Figura 74 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão NR1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de NR1 dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 12 e 24 horas. 112

Figura 75 Nível de expressão relativa de NR1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 113

Figura 76 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão NR2A, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de NR2A dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 24 horas. 113

Figura 77 Nível de expressão relativa de NR2A em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 114

Figura 78 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão NR2B, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de

NR2B dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 e 12 horas. 114

Figura 79 Nível de expressão relativa de NR2B em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 115

Figura 80 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão BAD, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de BAD dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 e 6 horas..... 115

Figura 81 Nível de expressão relativa de BAD em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 116

Figura 82 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão BCL2, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de BCL2 dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 e 12 horas..... 116

Figura 83 Nível de expressão relativa de BCL2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 117

Figura 84 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão COX2, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de COX2 dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 hora. 117

Figura 85 Nível de expressão relativa de COX2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001)..... 118

Figura 86 Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão HO, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de HO dos animais controle () e dos animais tratados com VML nativa (). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 24 hora. 118

Figura 87 Nível de expressão relativa de HO em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001). 119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentração em ng/ μ l de RNA total extraído de hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com ConBr e ConBr desnaturada. A relação entre as absorvâncias de 260 e 280 nm ($A_{260/280}$) foi utilizada como um dos parâmetros de mensuração de pureza da amostra..... 69

Tabela 2 Concentração em ng/ μ l de RNA total extraído de hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com VML e VML desnaturada. A relação entre as absorvâncias de 260 e 280 nm ($A_{260/280}$) foi utilizada como um dos parâmetros de mensuração de pureza da amostra..... 70

Tabela 3 Concentração em ng/ μ l de cDNA produzido através de transcrição reversa e utilizando iniciadores Oligo-dT e RNA total de hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com ConBr e ConBr desnaturada. A relação entre as absorvâncias de 260 e 280 nm ($A_{260/280}$) foi utilizada como um dos parâmetros de mensuração de pureza da amostra . 73

Tabela 4 Concentração em ng/ μ l de cDNA produzido através de transcrição reversa e utilizando iniciadores Oligo-dT e RNA total de hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com VML e VML desnaturada. A relação entre as absorvâncias de 260 e 280 nm ($A_{260/280}$) foi utilizada como um dos parâmetros de mensuração de pureza da amostra 74

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA	24
1 NEUROBIOLOGIA E NEUROQUÍMICA	24
1.1 Aspectos Gerais do Sistema Nervoso.....	24
1.2 O Hipocampo	25
1.3 Aspectos funcionais do Hipocampo.....	26
1.4 Formação da Memória	27
1.5 Neuroplasticidade	29
1.6 As Sinapses - sua estrutura, complexidade e aspectos neuroquímicos	30
1.7 O papel do íon cálcio na sinalização celular.....	32
1.8 Os Neurotransmissores: importância do glutamato para o SNC.....	37
1.9 Receptores glutamatérgicos ionotrópicos.....	38
1.10 Receptores glutamatérgicos metabotrópicos	40
1.11 Via de sinalização mediada pela ativação da Fosfolipase C – PLC através da mGluR1/5	41
1.12 Metabolismo do glutamato no SNC	43
1.13 Neurotrofinas	45
1.14 Receptores de BDNF.....	48
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA	53
2 LECTINAS	53
2.1 Aspectos Gerais de Lectinas	53
2.2 Classificação das Lectinas.....	54
2.3 Lectinas de leguminosas.....	56
2.4 Galectinas	60
CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS	61
3.1 Objetivos Gerais.....	61
3.2 Objetivos Específicos	62
CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1 Material e Métodos	63
4.1.1 <i>Tratamentos e coleta de material biológico</i>	63
4.2 Construção dos oligonucleotídeos iniciadores para as PCRs em tempo real	64

4.3 Extração de RNA	64
4.4. Síntese de cDNA.....	64
4.5 qRT-PCR – PCR em Tempo Real.....	65
4.6 Análises da Expressão relativa e análises estatísticas	66
CAPÍTULO 5 – RESULTADOS	68
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO	120
REFERÊNCIAS.....	121

CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

1 NEUROBIOLOGIA E NEUROQUÍMICA

1.1 Aspectos Gerais do Sistema Nervoso

O desenvolvimento e os aspectos da performance dos organismos são características complexas. Entretanto, esses organismos são também compostos de muitas outras características de níveis biológicos mais simples (SWALLOW e GARLAND, 2005). Assim, a resposta evolucionária para seleção em tais características complexas envolve alterações associadas à morfologia, fisiologia e vias bioquímicas (GHALAMBOR, WALKER e REZNICK, 2003), (SINERVO e CALSBEEK, 2003), (GARLAND, 2006). Essa habilidade de promover alterações morfofisiológicas e moleculares em respostas às mudanças ambientais denomina-se Plasticidade Fenotípica (SCHLICHTING, 1986). Neste aspecto, o sistema nervoso (SN) merece uma atenção especial, pois ele recebe uma variedade de estímulos e informações do meio e responde através de adaptações de diversos sistemas do organismo, inclusive do próprio SN.

O Sistema Nervoso produz e regula todos os aspectos das funções do corpo humano e a sua complexidade parece ser infinita. Bilhões de neurônios, agrupados para diferentes funções checam constantemente o meio interno da nossa anatomia e o universo exterior, como a luz, pressão, som, equilíbrio, imagens, concentrações de muitas substâncias, dor, emoção, consciência e etc. (LOPES, ROSA, *et al.*, 1999).

Anatomicamente, o SN pode ser dividido em quatro regiões, a saber: 1 – regiões periféricas, 2 – medular espinal, 3 – tronco encefálico e cerebelar e 4 – cerebral. Especificamente sobre a quarta região, o cérebro é a parte maciça do encéfalo, consistindo no diencéfalo e nos hemisférios cerebrais. A fissura longitudinal demarca a existência de dois hemisférios cerebrais. A superfície dos hemisférios é marcada por elevações arredondadas (giros) e depressões (sulcos). Cada hemisfério é subdividido em seis lobos: Frontal, Parietal, Temporal, Occipital, Límbico e Insular (LUNDY-EKMAN, 2008).

A nível celular, o sistema nervoso é constituído por 2 tipos celulares, os neurônios e a glia. O neurônio é a unidade funcional do sistema nervoso, consistindo

de um corpo celular nervoso e nas partes que se estendem para fora do corpo celular, os dendritos e o axônio. A glia é constituída de células não neurais que prestam serviços aos neurônios. As células gliais formam uma rede crítica para o SN, pois proporcionam aos neurônios todas as condições necessárias para o seu funcionamento. Existem dois tipos de células gliais, a macroglia (astrócitos, oligodendrócitos e Células de Schwann) e microglia (LUNDY-EKMAN, 2008). Até bem pouco tempo, as células gliais eram tidas como um componente interno do SN que serviriam apenas para dar suporte aos neurônios, contudo um crescente número de trabalhos tem alterado esse ponto de vista, conforme discutiremos a seguir.

1.2 O Hipocampo

Uma das estruturas mais estudadas do cérebro é o hipocampo e estruturas próximas a ele. O hipocampo está presente na região medial do lobo temporal e é componente do sistema límbico (HEIMER e VAN GOESEJN, 2006) *apud* (LUNDY-EKMAN, 2008). O nome desta estrutura deriva do latim *hippocampus* e faz alusão à sua forma semelhante a um cavalo-marinho. A formação hipocampal (no sentido de junção funcional de estruturas) tem sido uma das regiões mais estudadas do sistema neuronal (BIRD e BURGESS, 2008). O hipocampo propriamente dito tem 3 subdivisões, CA3, CA2 e CA1 (direção proximal para distal no eixo transversal). A sigla CA faz referência à forma desta região, Corno de Amon. Vários autores defendem que as regiões CA são o hipocampo propriamente dito. Além destas 3 regiões, a formação hipocampal possui o giro denteado (anterior a CA3) e o *subiculum*, o *presubiculum*, o *parasubiculum* e o córtex entorrinal, após a região CA1 do hipocampo (ANDERSEN, MORRIS, *et al.*, 2007).

A arquitetura celular da formação hipocampal é laminar e possui alguns aspectos interessantes. Os neurônios principais recebem ou realizam sinapses com neurônios externos ao núcleo ou região na qual estão situados, enquanto os interneurônios são células que possuem apenas sinapses locais. O Hipocampo CA está limitado ao ventrículo e ao giro denteado. São reconhecidas 7 camadas do CA, a saber: células endimárias, o estrato alveus, estrato oriens, estrato piramidal, estrato radial, estrato lacunoso e o estrato molecular (RAMON, 1911) (LORENTE DE NÓ, 1934) *Apud* (ANDERSEN, MORRIS, *et al.*, 2007).

Ostratum pyramidale é a camada que possui as células piramidais, que são os neurônios principais, e está mais empacotada em CA1 que em CA2 e CA3. A camada mais profunda em relação à piramidal é a “*Sratum oriens*” que contém os dendritos basais das células piramidais e classes de interneurônios (SHEPHERD e KOCH, 1997); (TURNER DA, 1998) apud (TAVARES, 2006). A célula neuronal mais proeminente do Giro Denteado é o neurônio granular (ALTMAN e BAYER, 1990).

1.3 Aspectos funcionais do Hipocampo

Inicialmente, neuroanatomistas afirmaram que o hipocampo estava associado ao sistema olfatório (ANDERSEN, MORRIS, *et al.*, 2007), talvez devido à essa estrutura ser maior em animais macrosmáticos. Complementar a esse fato, David Ferrier (1876) relatou movimentos dos lábios e narinas de macacos após estímulo do hipocampo (FERRIER, 1876). Podemos considerar que a partir de 1930 e, principalmente após 1947, o papel estritamente olfativo do hipocampo começou a ser revisto. Alf Brodal (1947) sumarizou uma série de evidências tanto a favor quanto contra à teoria do papel olfativo da formação hipocampal (BRODAL, 1947). O pesquisador relatou evidências filogenéticas e de neuroanatomia comparativa que sugerem o desenvolvimento paralelo entre o hipocampo e as regiões olfatórias do cérebro, sendo esta particularmente proeminente em animais macrosmáticos. Além disso, Broadal relatou a presença de fibras do trato olfatório lateral até regiões próximas à formação hipocampal. Contudo, o pesquisador também relaciona uma série de argumentos contra o papel de percepção olfatória do hipocampo, sugerindo que esta teoria é baseada em evidências circunstanciais, como a presença de hipocampo em animais anosmáticos e microsmáticos (RIES e LANGWORTHY, 1937) e que cachorros com danos no lobo temporal não foram afetados quanto à execução de atividades que requeiram percepção olfatória segundo Allen (1940 *apud* ANDERSEN, MORRIS, *et al.*, 2007).

Apesar do trabalho de Broadal ser um marco sobre as funções da formação hipocampal, não se pode negar que existe alguma relação entre o hipocampo e o sistema olfatório. À guisa de exemplo, tarefas sobre a memória e aprendizados olfatórios são amplamente utilizados para estudos de função de hipocampo em

roedores (ANDERSEN, MORRIS, *et al.*, 2007), mas vale ressaltar que o hipocampo não é uma estrutura restrita ao processamento das informações olfatórias.

Atualmente, diversos pesquisadores buscam inspiração para a compreensão da função do hipocampo em uma grande variedade de procedimentos experimentais. Muitos pesquisadores têm iniciado as pesquisas através da análise das consequências de danos no lobo temporal medial bilateral e os efeitos devastadores sobre a memória. Além disso, efeitos similares, mas reduzidos, têm sido observados quando ocorre dano seletivo ao hipocampo (BIRD e BURGESS, 2008). Em geral, estes pacientes são comprometidos na aquisição da memória recente. Contudo, as memórias de curto prazo, *priming*, aprendizado inconsciente e memórias remotas antigas são preservadas. De modo geral, vários autores têm relatado o importante papel da formação hipocampal na memória espacial e na aprendizagem (MILNER, 1972); (SQUIRE, 1982); (GOULD, BEYLIN, *et al.*, 1999). A atividade neuronal das células piramidais do hipocampo aumenta substancialmente quando um rato é colocado em um local particular, cuja localização seja definida por diferentes marcos espaciais presentes em uma sala (O'KEEFE, 1991) (KUBIE e MULLER, 1991); (ROLLS, 2000).

1.4 Formação da Memória

Segundo Hawkins e colaboradores (1993), a aprendizagem é a modificação do comportamento pela experiência e a memória é a retenção desta modificação sobre o tempo (HAWKINS, KANDEL e SIEGELBAUM, 1993) (ZHANG e POO, 2010). A formação da memória do Sistema Nervoso é um processo que envolve várias etapas. Inicialmente, deve haver a aquisição da informação, que pode ser de fontes internas (cognição, emoção e etc.) ou externas (interação com ambiente diretamente, p. ex. as sensoriais), esta etapa corresponde à aprendizagem. Após esta etapa, a informação pode ser retida e, enquanto retida, pode ser evocada. A retenção da informação pode ser de curta duração (minutos ou horas) que, por sua vez, pode ser convertida em longa duração (semanas ou anos) através de um processo denominado de consolidação que se inicia logo após a aquisição (SILVA, 2010).

A grande quantidade de informação que nos cerca, demanda a existência de alguns filtros para que apenas as informações mais relevantes sejam armazenadas. Assim, de todas as informações que entram no SN, apenas algumas

são de fato retidas por longos prazos, sendo que a maioria nem sequer é adquirida, devido aos filtros atencionais e emocionais. Das que são adquiridas, apenas algumas são consolidadas como memórias de longa duração e dentre estas, muitas serão esquecidas. A recuperação de uma memória já armazenada pode induzir o surgimento de uma fase de instabilidade que resultará em uma ameaça ao armazenamento da informação, sendo necessário um processo ativo para reestabilizar a memória após a evocação, processo denominado de reconsolidação. A reconsolidação tem sido considerada uma importante etapa do processamento de memórias de longo termo (MISANIN, MILLER e LEWIS, 1968); (GORDON, 1981); (NADER, SCHAFE e LE DOUX, 2000); (NADER, 2003); (DUDAI, 2006); (TRONSON e TAYLOR, 2007); (TRONSON, WISEMAN, *et al.*, 2006).

Analisando a formação da memória à luz da teoria de Swallow e Garland (2005), devemos pressupor que um conjunto de alterações moleculares, bioquímicas e celulares estão interligadas às diversas etapas do processo. Por exemplo, analisando as memórias de curta e as de longa duração, percebemos que uma das principais diferenças é que a última é sensível a mecanismos de inibição da síntese de proteínas (DAVIS e SQUIRRE, 1984) (BOURRTCHOULADZE, SBEL, *et al.*, 1998) (QUEVEDO, VIANNA, *et al.*, 2004). O sistema nervoso central possui um sistema extremamente rigoroso de controle da expressão de genes. O controle espaço-temporal da expressão destas moléculas é um mecanismo não somente de construir a rede funcional dos neurônios, mas de ajustar a rede em resposta a novas informações recebidas pelo indivíduo (OHIRA e HAYASHI, 2009). Até pouco tempo, acreditava-se que cérebros de indivíduos adultos eram incapazes de alterar a sua estrutura de comunicação. Contudo, (MERZENICH, 1984) realizou um trabalho com macacos e demonstrou modificações no cérebro dos animais quando estes tinham alguns dedos decepados. Pode-se perceber que todas essas alterações/adequações da circuitária neuronal dependem de mecanismos moleculares e celulares clássicos. Contudo, a estabilização em longo termo dessas alterações/adequações é dependente da modificação da expressão de genes (MCCLUNG e NESTLER, 2008).

Atualmente, há vários relatos da importância dos mecanismos moleculares na aquisição, consolidação, reconsolidação, e recuperação de memórias (ABEL e LATTAL, 2001) (TRONSON e TAYLOR, 2007). À guisa de exemplo, (MEIRI e ROSENBLUM, 1998) relataram que a infusão intra-cérebro-ventricular (icv) de

anisomicina, inibidor de síntese protéica, bloqueia a aquisição da memória associada à tarefa comportamental do labirinto aquático de Morris.

A região do cérebro onde os mecanismos celulares de consolidação da memória mais têm sido investigados é o sistema hipocampal que inclui a formação hipocampal, os córtices perirrinal e para-hipocampal (SQUIRE e ZOLA, 1996) *apud* (SILVA, 2010). O fluxo de informações que serão armazenadas como memórias declarativas de longa duração são primeiramente processadas em pelo menos um dos córtices de associação polimodais, que associam as informações visuais, auditórias, olfativas, e somáticas. A seguir, essas informações são encaminhadas para os córtices para-hipocampal e perirrinal, em seguida, seguem para a formação hipocampal (SILVA, 2010). Perfazendo o caminho de volta até os córtices de associação polimodais (SQUIRE e ZOLA, 1996).

1.5 Neuroplasticidade

Ramon y Cajal (1911) sugeriu que para a aquisição de novas memórias eram necessárias modificações precisas nas intensidades das conexões neuronais existentes. Outro grande avanço ocorreu na década de 40 quando Feng Te-Pei descobriu a modulação sináptica induzida pela atividade. Assim, podemos postular que a plasticidade sináptica é o mecanismo celular primário da aprendizagem e memória (ZHANG e POO, 2010). A modificação das sinapses (forma de comunicação entre os neurônios) ou seja: criação de novas, exclusão, enfraquecimento e fortalecimento; excitabilidade neuronal intrínseca, integração dendrítica, sinalização neuro-glia e diversas outras modificações morfofisiológicas do Sistema são denominadas de neuroplasticidade (ZHANG e POO, 2010). Neuroplasticidade é um termo abrangente e compreende diversas modificações na circuitária do neurônios. Grande parte do nosso conhecimento da neuroplasticidade e formação da memória advém de dois fenômenos antagônicos, a potenciação de longo termo (LTP) e a depressão de longo termo (LTD).

A LTP e a LTD são os dois modelos de neuroplasticidade melhor descritos. A LTP foi descrita por BLISS e LOMO (1973) que demonstraram o incremento da amplitude da linha de base do potencial excitatório pós-sináptico (EPSP) nas sinapses mediadas por AMPA após certas células do hipocampo serem submetidas a uma série de estímulos (tipo de espasmos celulares) com uma frequência de 100 Hz. Segundo

Bear (1996), a LTP significa um aumento na eficiência da transmissão sináptica, refletindo o incremento do EPSP (BEAR, 1996). A LTD é a redução da amplitude e EPSP em decorrência de estímulos de baixa frequência, sendo um reflexo da redução na eficiência da transmissão sináptica (ABARBANEL, HAAS e TALATHI, 2008). Vale salientar ainda que a LTP é dividida em pelo menos duas fases temporais distintas, a LTP inicial (*Early LTP* ou E-LTP) e a fase tardia (*Late LTP* ou L-LTP). A E-LTP é dura somente alguns minutos e depende de proteínas já existentes. A L-LTP persiste por horas ou dias e requer a transcrição de genes e a síntese de novas proteínas (KANDEL, 2001); (WU, ZHOU e XIONG, 2007).

Segundo Silva (2010) é evidente que o hipocampo é um local de convergência de informações, fato condizente com as fortes evidências experimentais (Izquierdo, 2007) de que a plasticidade sináptica hipocampal tem um papel fundamental tanto na tomada de decisão sobre consolidar ou não uma informação, quanto no próprio mecanismo de consolidação, compreendendo todo um conjunto de alterações das sinapses nos complexos corticais subjacentes da informação a ser armazenada (WANG e MORRIS, 2010) (SQUIRE e ZOLA, 1996) (DUDAI, 2004) (MARTIN e CLARCK, 2007).

1.6 As Sinapses - sua estrutura, complexidade e aspectos neuroquímicos

A sinapse, forma de comunicação entre os neurônios, compreende um terminal pré-sináptico (extremidade do axônio), um terminal pós-sináptico (região da célula receptora do estímulo que pode ser uma glândula, uma célula nuclear ou outro neurônio) e a fenda sináptica que é um pequeno espaço entre os terminais pré e pós-sinápticos. Os eventos de uma sinapse são: 1 – um potencial de ação chega ao terminal pré-sináptico, através de um breve pulso de corrente elétrica que viaja ao longo do axônio; 2 – a membrana do terminal pré-sináptico se despolariza, ocasionando a abertura dos canais de Ca^{2+} voltagem dependentes; 3 – o influxo de Ca^{2+} ao terminal neuronal, combinado à liberação Ca^{2+} das reservas intracelulares, desencadeia o movimento de vesículas sinápticas, contendo neurotransmissores, em direção ao local de liberação; 4- As vesículas sinápticas se fundem com a membrana plasmática liberando neurotransmissores na fenda sináptica; 5 – Os neurotransmissores se difundem na fenda e entram em contato e se unem com

receptores específicos da membrana do terminal pós-sináptico; 6 – os receptores alteram sua conformação e desencadeiam uma ação através da abertura de canais iônicos, no caso dos receptores ionotrópicos, ou ativam vias de segundos mensageiros, nos receptores metabotrópicos (LUNDY-EKMAN, 2008). A via sináptica apresentada é uma via simplificada, conforme veremos a seguir, vários íons, neurotransmissores e receptores estão envolvidos.

Pelo relato da via sináptica acima descrito, percebemos que o íon de cálcio exerce um papel fundamental para a sinalização celular, tanto interna quanto externamente. Além disso, podemos perceber que Ca^{2+} pode atuar de duas formas na sinalização, 1 - alterando o potencial elétrico das membranas e 2 – modificando a conformação de proteínas em consequência da ligação do íon a estas proteínas (YUSTE, NELSON, *et al.*, 1995) (CHARLES, KODALI e TYNDALE, 1996) (DANI, CHERNJAVSKY e SMITH, 1992) (CHARLES, 1994).

As proteínas são responsáveis por diversas funções celulares, como a catálise de reações químicas, o controle da entrada e saída de substâncias da célula e etc. A conformação (forma ou estrutura 3D) de uma proteína é, reconhecidamente, o ponto chave da sua ativação ou desativação funcional. O fosfato e o íon cálcio desempenham um papel fundamental neste aspecto, pois têm a capacidade de alterar a forma e a carga de uma proteína (CLAPHAM, 2007). A fosforilação confere uma carga negativa às proteínas e alteram a sua forma (WESTHEIMER, 1987). As quinases (ou cinases) são enzimas que possuem a habilidade de remover um grupo fosfato (PO_3^{2-}) do ATP e transferi-lo à um grupo hidroxil, de uma serina, treonina ou tirosina, da proteína alvo. A importância das quinases é tamanha que seus genes ocupam cerca de 2% do genoma de eucariontes (CLAPHAM, 2007).

1.7 O papel do íon cálcio na sinalização celular

As células investem uma grande quantidade de energia para manter diferentes concentrações do Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]$, do meio intracelular em comparação com o meio extracelular, enquanto que o Mg^{2+} praticamente não apresenta diferenças de concentração entre esses dois sítios. O nível de Ca^{2+} citosólico livre é mantido muito baixo, cerca de 100 nM em células em metabolismo basal, devido ao ativo funcionamento das bombas de Ca^{2+} . O Ca^{2+} citosólico se torna um sinal intracelular quando esta concentração é temporariamente aumentada, para cerca de 1000 nM, como resultado da ativação de canais permeáveis de Ca^{2+} que se abrem e permitem a migração do íon a favor do gradiente de concentração (BERRIDGE, LIPP e BOOTMAN, 2000). Em seguida, o nível original do íon é recuperado pelo fechamento dos canais específicos e aumento da atividade de seus transportadores de contra-gradiente. Em geral, Ca^{2+} citosólico é regulado pela operação de transportadores localizados tanto na membrana plasmática quanto nas membranas das organelas. Segundo Berridge e colaboradores (2000), o influxo do Ca^{2+} é devido a ação de três tipos de canais, 1 - o dependente de voltagem, 2 - o operado por receptor e 3 - o operado pelo estoque.

O Ca^{2+} externo pode entrar através dos canais de Ca^{2+} que são distribuídos ao longo da membrana celular. Estoques internos podem incluir reservas vesiculares e em organelas, como a mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e etc. (SILVERMAN-GAVRILA e LEW, 2001); (MESSERLI, CRETON, *et al.*, 2000).

Um importante aspecto das vias de sinalização cálcio-dependentes é o fato de que esse íon não é passível de modificações químicas, como as moléculas de maior complexidade. Assim, a célula pode exercer o controle dessa via por mecanismos simplificados, como pela captura, compartimentalização ou exclusão do íon do espaço intracelular. Centenas de proteínas celulares podem ligar-se ao íon cálcio com diferentes afinidades (CLAPHAM, 2007).

Estruturalmente, o íon cálcio pode acomodar até 12 átomos de oxigênio, sendo de 6 a 8 o mais comum, formando uma estrutura de bipirâmide pentagonal a uma distância média de 2,5 Å (STRYNADKA e JAMES, 1989). Um dos domínios proteicos mais importantes para a captura de íon cálcio é o “mão-EF” (*EF-hand*). O termo EF é uma referência às regiões E e F da parvalbumina, uma pequena proteína

albumínica ligante a Ca^{2+} e o termo mão, *hand*, é alusivo ao formato E- Ca^{2+} -F lembrar uma mão com os dedos indicador e polegar estendidos e os outros (médio, anelar e mínimo) fechados e o cálcio na junção entres os dedos polegar e indicador. O domínio EF-*hand* possui um motivo Hélice-volta-Hélice, sendo as regiões E e F correspondentes às estruturas secundárias em forma Hélices alfa. Os motivos Hélice-volta-Hélice são comuns em proteínas ligantes a DNA e canais sensíveis a voltagem (CLAPHAM, 2007).

Os domínios EF-*hand* Hélice-volta-Hélice são carregados negativamente e possuem uma região entre as duas hélices ortogonais de 12 resíduos de aminoácidos que permite um acoplamento perfeito de Ca^{2+} . A afinidade desse domínio pelo íon cálcio é alterada por uma série de fatores, como a composição dos resíduos de aminoácidos e etc. (CLAPHAM, 2007).

A calmodulina (CaM) é um dos principais exemplos de proteínas que possuem o motivo EF-*hand*, sendo uma pequena e ubíqua proteína que amplifica o sinal do diminuto Ca^{2+} para a escala proteica. Quando ligada ao íon cálcio, a forma do sítio ativo muda, expondo algumas regiões hidrofóbicas e modulando a função de uma série de proteínas-alvo. A junção Ca-CaM remodela o sítio da proteína e favorece a dimerização funcional destas (Hoefflich e Ikura, 2002). A calmodulina destaca-se devido a uma variedade de características, como ser ubiquamente expressa, em forma de altere com uma proteína de 17 kDa com cada extremidade globular contendo 2 domínios EF (CHIN e MEANS, 2000); (WAYMAN, YONG-SEOK, *et al.*, 2008).

A CaM é altamente conservada em eucariontes e é considerada uma proteína multifuncional por causa da sua habilidade de interagir e modular a atividade de várias outras proteínas, ativando ou inativando-as, como as fosfodiesterases, adenilil ciclases, canais iônicos, proteínas quinases e fosfatases (Sato *et al.*, 2004; Van der Luit *et al.*, 1999; Silverman-Gavrila e Lee, 2001; Kahl e Means, 2003).

Dentre os vários tipos de proteínas moduladas por Ca^{2+} /CaM, as CaMKs (calmodulin-dependent protein kinase ou proteína quinase depende de calmodulina) se destacam por serem encontradas em quase todas as células animais. As CaMKs são particularmente abundantes no cérebro e atuam através da fosforilação de resíduos de serina (Ser) ou treonina (Thr) das suas proteínas alvo, com exceção da CaMKIII (WAYMAN, YONG-SEOK, *et al.*, 2008). Em geral, as CaMKs fosforilam várias proteínas alvos, ativando-as ou inativando-as. Novamente, a exceção é a CaMKIII que

possui como alvo único a eEF2 (MITSUI, BRADY, *et al.*, 1993) (WAYMAN, YONG-SEOK, *et al.*, 2008). A CaMKIII possui muitas diferenças em relação às outras CaMKs, por isso pertence a uma família diferente de quinases (WAYMAN, YONG-SEOK, *et al.*, 2008).

As multifuncionais CaMKs são separadas em 2 grupos, CaMKII e CaM-K cascata, que inclui a CaMKI, CaMKIV e CaMKK (WAYMAN, YONG-SEOK, *et al.*, 2008). A estrutura destas quinases são muito similares, elas possuem 3 domínios clássicos em suas subunidades de 50 a 60 kDa, 1 - o domínio catalítico, 2 - o domínio inibitório e 3 - o sítio de ligação à $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. A ativação de CaMKII permite a autofosforilação nos sítios Thr286, Thr305 e Thr306. A autofosforilação do sítio Thr 286 é de grande importância, pois permite a manutenção da atividade mesmo após a redução da concentração do íon cálcio, ou seja, uma atividade cálcio-independente que perdura até que a fosforilação seja retirada por alguma fosfatase (COLBRAN, 2004); (WAYMAN, YONG-SEOK, *et al.*, 2008). A CaMKII é o maior componente proteico da Densidade Pós-Sináptica (PSD, que será discutida posteriormente), onde interage com um grande número de proteínas. Vários artigos científicos têm relacionado à CaMKII com diversos receptores de membrana como AMPA (TAN, WENTHOLD e SODERLING, 1994), GABA (MCDONALD e MOSS, 1994) e NMDA (OMKUMAR, KIELY, *et al.*, 1996); (STRACK, CHOI, *et al.*, 1997). Vale salientar ainda que a CaMKII é citosólica enquanto que CaMKIV é nuclear. Contudo, ambas têm sido relacionadas com a sobrevivência neuronal (JENSEN, OHMSTEDE, *et al.*, 1991) (SEE, BOUTILLIER, *et al.*, 2001); (HANSEN, DEVAIAH, *et al.*, 2003).

A via da cascata de CaMK é formada pela CaM Kinase Kinase- CaMKK (genes α e β), CaMKI (genes α , β , δ e γ) e CaMKIV. Para que se tornem ativas, a CaMKI e CaMKIV ligam-se à $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ e expõe o loop do sítio de ativação. No loop, a ativação depende de uma fosforilação que é realizada pela CaMKK, logo após esta também ser ativada pela $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Wayman *et al.* 2008). Após ativada, a CaMKIV irá ativar o CREB através de fosforilação na Ser133 (WAYMAN, YONG-SEOK, *et al.*, 2008).

Outra importante arquitetura proteica modulada por íon cálcio é o domínio C2, sendo comum em cadeias polipeptídicas de vias de sinalização e que está presente em mais de 650 proteínas humanas, dentre as quais destacamos, a saber: fosfolipases, proteína quinase C (PKC), fosfoinositideo-3-quinase (PI3K) e outras

(CLAPHAM, 2007). O domínio C2 ajuda a recrutar proteínas para a membrana plasmática.

A análise das vias de sinalização celular do Sistema Nervoso, principalmente do hipocampo é complexa, principalmente pelo fato que além das sinapses, temos que considerar a comunicação entre os astrócitos e os neurônios. Além disso, temos vias de sinalização que convergem, fontes diferentes de cálcio (extracelular ou compartimentalizada) e, ainda, mecanismos de retroalimentação e inibição.

O conceito de sinapse tripartite leva em consideração o reconhecimento da comunicação bidirecional entre os neurônios (pré e pós-sináptico) e os astrócitos (AGULHON, PETRAVICZ, *et al.*, 2008). Como citado anteriormente, as sinapses dependem da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica pelo terminal pré-sináptico. Para que isso ocorra, vesículas contendo o neurotransmissor devem ser recrutadas para a região ativa, mas não fundidas à membrana. Cerca de 10 vesículas estão estavelmente ancoradas na zona ativa aguardando o potencial de ação (HEUSER e REESE, 1977); (SCHIKORSKI e STEVENS, 1997); (HARLOW, RESS, *et al.*, 2001); (ROSENMUND, RETTIG e BROSE, 2003); (BRUNGER, WENINGER, *et al.*, 2009).

A fusão entre as vesículas e a membrana plasmática é uma etapa crucial para a liberação dos neurotransmissores e é realizada por uma família de proteínas altamente conservadas, denominadas SNARE - Receptor protéico acessório sensível ao fator solúvel N-etil-maleimidi ou *soluble N-ethyl maleimide sensitive factor attachment protein receptors* (SORENSEN, MATTI, *et al.*, 2002); (SAKABA, STEIN, *et al.*, 2005). As SNARES são moduladas pelo íon cálcio e atuam em sincronismo com proteínas sensoras de Ca^{2+} , como a sinaptotagmina e complexina, para a ocorrência da exocitose (FERNANDEZ-CHACON, KONIGSTORFER, *et al.*, 2001). As SNARES são alvo da neurotoxina clostridial, uma protease que afeta a ancoragem e a fusão das vesículas à membrana plasmática e, por conseguinte, bloqueiam a neurotransmissão (BRUNGER, WENINGER, *et al.*, 2009). As três principais tipos de SNAREs são a Sintaxina, a Sinaptobrevina, ambas com apenas um sítio SNARE, e a SNAP-25, com dois (BRUNGER, WENINGER, *et al.*, 2009). O processo de fusão da vesícula com a membrana celular envolve a participação dos três tipos de SNARE. A Sintaxina e a SNAP-25 atuam através da formação de um complexo protéico binário

(syntaxina-SNAP25) que atuará como um receptor na membrana para acoplagem da vesícula. A Sinaptobrevina está situada na vesícula e liga-se ao binário syntaxina-SNAP-25 (POBBATI, STEIN e FASSHAUER, 2006) viabilizando a ancoragem e, em seguida, a exocitose.

Quando um potencial de ação invade o nervo terminal, as vesículas são fundidas à membrana plasmática através do complexo SNARE e liberam o neurotransmissor na fenda sináptica. Na maioria das sinapses, estes eventos de liberação dos neurotransmissores são consequências de um influxo de cálcio através dos canais iônicos $Ca_v2.1$ e/ou $Ca_v2.2$ (SUDHOF, 2004) que se abrem com o potencial de ação.

Palade e Palay (1954 e 1958) relataram, através de estudos de microscopia eletrônica, que tanto o terminal pré quanto o pós-sináptico apresentam densas estruturas eletrônicas. No terminal pré-sináptico, essa observação é explicada pela presença das vesículas e todo o aparato de exocitose (PALADE e PALAY, 1954); (OKABE, 2007).

No caso do terminal pós-sináptico, a maior densidade eletrônica representa a estrutura composta por proteínas membranares e citoplasmáticas localizadas com a função de receber, processar e propagar os sinais neuronais (FENG e ZHANG, 2009). Essa megaorganela responsável pelo processamento e transdução do sinal pós-sináptico é denominada de densidade pós-sináptica ou PSD. A PSD é composta por receptores de membrana, moléculas de adesão celular, proteínas sinalizadoras, quinases, fosfatases, proteínas de citoesqueleto e proteínas de *scaffold* (FENG e ZHANG, 2009); (OKABE, 2007).

A CaMKII é uma das proteínas mais abundantes nos neurônios e encontrada em elevadas concentrações na PSD (KENNEDY, BENNETT e ERONDU, 1983). O aumento na concentração de Ca^{2+} ou K^+ incrementa e 5X a quantidade de CaMKII na PSD. Além disso, a CaMKII encontra-se associada a uma série de outras proteínas (receptores NMDA e AMPA, PSD-95, Actina, Ras e etc), possivelmente modulando suas atividades (FENG e ZHANG, 2009); (OKABE, 2007).

1.8 Os Neurotransmissores: importância do glutamato para o SNC

Os principais neurotransmissores podem ser agrupados em colinérgicos (acetilcolina), aminoácidos (glutamato, glicina, GABA e aspartato), aminas (dopamina, serotonina, histamina, norepinefrina), peptídeos (endorfinas, encefalinas) e outras classes químicas, como o óxido nítrico (LUNDY-EKMAN, 2008). A percepção do sinal enviado pelo terminal pré ao pós-sináptico é determinado tanto pela liberação dos neurotransmissores pelo primeiro quanto pela presença de tipos específicos de receptores na membrana do terminal pós-sináptico. Os receptores mais importantes no contexto aqui apresentado são os ionotrópicos (operados por voltagem ou ligantes) e os metabotrópicos (tirosina quinase – RTK ou acoplados à proteína G – GPCR).

O glutamato é o principal mediador excitatório do cérebro de mamíferos (ORREGO e VILLANUEVA, 1993), por isso, considerações mais detalhadas serão direcionadas a ele e aos seus receptores. Sob condições normais, o glutamato tem um importante papel na plasticidade sináptica, aprendizagem e memória, mas em condições patológicas é uma potente excitotoxina neuronal (SANACORA, ZARATE, *et al.*, 2008).

O glutamato pode ser sintetizado a partir da glicose via ciclo de Krebs, via *de novo*, ou reciclado através do ciclo glutamato/glutamina (ERECINSKA, 1990). O glutamato é transportado para as vesículas sinápticas por transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs), onde são armazenados em altas concentrações até a exocitose cálcio-dependente (SANACORA, ZARATE, *et al.*, 2008); (VAROQUI, SCHAFER, *et al.*, 2002); (HERZOG, 2004).

Após a liberação do glutamato no sítio sináptico, este liga-se à receptores ionotrópicos ou metabotrópicos do terminal pós-sináptico, desencadeando uma série de respostas neuronais. Além da liberação do glutamato, a via de sinalização dependente de glutamato é regulada pela composição de um complexo supramolecular que reúne receptores de glutamato, proteínas de ancoragem, proteínas do citoesqueleto e proteínas sinalizadoras (PENG, 2004).

Os receptores ionotrópicos são canais iônicos que se abrem quando o glutamato está ligado permeando a passagem de cátions. Estes receptores são classificados em 3 grupos, de acordo com o seu agonista específico, a saber: AMPA

(Ácido propiônico α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol), Kainato e NMDA (N-Metil-D-aspartato).

1.9 Receptores glutamatérgicos ionotrópicos

Os receptores AMPA – AMPAr são proteínas homo- ou heterotetraméricas formados a partir de subunidades conhecidas como GluR1 a GluR4 (também conhecida como GluRA-D (HOLLMANN e S., 1994); (WISDEN W, 1993); (SANACORA, ZARATE, *et al.*, 2008). Em hipocampo de adultos, os receptores AMPA são formados predominantemente pela oligomerização das subunidades GluR1/GluR2 ou pela formação de GluR3/GluR2 (WENTHOLD, PETRALIA, *et al.*, 1996). Contudo, o hipocampo imaturo e outras regiões maduras do cérebro, expressam GluR4 que se complexa com GluR2 para formar um receptor funcional (ZHU, ESTEBAN, *et al.*, 2000). As regiões transmembrana e extracelular são extremamente similares nas diferentes subunidades GluR, contudo a região citoplasmática apresentam diferenças marcantes (MALLINOW e MALENKA, 2002). Vale salientar ainda que os receptores AMPA são funcionalmente diversos, devido a três fatores: às diferenças entre as 4 subunidades, à possibilidade de transcritos alternativos e modificações pós-traducionais (SANACORA, ZARATE, *et al.*, 2008). Funcionalmente, o AMPAr são mediadores rápidos e que são responsáveis pela resposta inicial ao glutamato. A ativação destes receptores, abrem os canais iônicos permeáveis a Na⁺ permitindo a sua entrada no interior da célula e ocasionando a despolarização da membrana (SANACORA, ZARATE, *et al.*, 2008).

Os receptores de kainato são formados por proteínas de baixa afinidade (GluR5-7) e de alta afinidade (KA1 e KA2). Estas subunidades também são sujeitas a extensas alterações pós-transcricionais e pós-traducionais Os receptores KA possuem distribuição diferente de AMPA, mas são funcionalmente semelhantes (SANACORA, ZARATE, *et al.*, 2008).

Os receptores glutamatérgicos NMDA (NMDAr) são complexos tetraméricos formados por duas subunidades obrigatórias, a NR1, e duas subunidades regulatórias, que podem ser do tipo NR2A-D ou NR3A/B. A precisa combinação entre as subunidades determinam as propriedades funcionais dos NMDAr (CHATTERTON, AWOBULUYI, *et al.*, 2002); (CULL-CANDY e LESZKIEWICZ, 2004); (YASHIRO e

PHILPOT, 2008). As subunidades NR1 e NR2A/B são as mais estudadas por serem as mais abundantes do cérebro (YASHIRO e PHILPOT, 2008), sendo o tetrâmero formado por duas subunidades obrigatórias e qualquer combinação das subunidades NR2 (PAPADIA e HARDINGHAM, 2007). A diversidade dos NMDAr ainda pode ser aumentada pelos diferentes transcritos alternativos que NR1 possui (LAURIE e SEEBURG, 1994); (PRYBYLOWSKI, CHANG, *et al.*, 2005); (YASHIRO e PHILPOT, 2008).

Os níveis de NR2B são extremamente altos nas fases iniciais do desenvolvimento, sendo reduzidos pós-natalmente, enquanto que os níveis de NR2A aumentam (KOHR, 2006). A privação sensorial retarda a substituição das subunidades NR2B pela NR2A (NASE, WEISHAUP, *et al.*, 1999); (QUINLAN, PHILPOT, *et al.*, 1999); (ROBERTS e RAMOA, 1999), sugerindo que a substituição destas subunidades é estimulada, em parte, pela experiência sensorial (YASHIRO e PHILPOT, 2008). Em indivíduos adultos, os receptores formados por NR2B estão predominantemente situados nos sítios extrasinápticos, mas também são encontrados nas regiões sinápticas (TOVAR e WESTBROOK, 1999); (CALDEIRA, MELO, *et al.*, 2007). Em contraste, (MARGOTTIL e DOMENICI, 2003) relatam aumento progressivo da expressão de NR2A e incorporação destes nos sítios sinápticos (TOVAR e WESTBROOK, 1999). O mecanismo de substituição dos receptores com as subunidades NR2B por NR2A não são compreendidos (BARRIA e MALINOW, 2002), mas sabe-se que é regulado pela atividade neuronal (MUZET e DUPONT, 1996). Os NMDAr situados nos sítios sinápticos e extrasinápticos demonstraram estimular vias distintas de sinalização celular (EHLERS, 2003); (HARDINGHAM, FUKUNAGA e BADING, 2002); (IVANOV, PELLEGRINO, *et al.*, 2006). Segundo Yashiro e Philpot (2008), a ativação por diferentes vias de sinalização pode ser uma evidência que os receptores NMDA sinápticos estão relacionados à LTP, enquanto que os extrasinápticos à LTD.

Os NMDAr são receptores importante da transmissão sináptica e são dependentes de um co-agonista, a glicina que liga-se às subunidades NR1 (GROC e BARD, 2009), e de alteração de voltagem da membrana plasmática que libera o Mg^{2+} que está bloqueando o canal iônico (MAYER, WESTBROOK e GUTHRIE, 1984); (NOWAK, BREGOSTOVSKI, *et al.*, 1984); (SANACORA, ZARATE, *et al.*, 2008). Os receptores NMDA são permeáveis a Na^+ , K^+ e, principalmente, a Ca^{2+} (LYNCH,

LARSON, *et al.*, 1983). A entrada de cálcio na célula ativa diversas respostas celulares através da formação da Ca^{2+} /Calmodulina e ativação das vias cálcio-dependentes, como as CaMKs.

1.10 Receptores glutamatérgicos metabotrópicos

Os receptores metabotrópicos de glutamato - mGluR são membros da superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR – *G-protein coupled receptor*), uma das mais abundantes família de receptores do genoma humano. GPCR são proteínas transmembrana que são ativadas por ligantes extracelulares, como peptídeos e neurotransmissores. A interação dos receptores com o ligante gera uma alteração na conformação estrutural da GPCR, a qual é um complexo heterotrimérico de α , β e γ subunidades. No estado inativo, a subunidade α está ligada com uma molécula de GDP, a mudança conformacional em consequência da interação com o ligante externo, libera o GDP e uma molécula de GTP liga-se ao sítio livre, tornando-a ativa. A proteína G ativa modula a função de várias moléculas efetoras, como enzimas, canais iônicos e fatores de transcrição (NISWENDER e CONN, 2010).

A superfamília de GPCR é dividida em vários subgrupos, os receptores mGluR pertencem a classe C, da qual também pertencem os receptores GABA_B. Uma característica desta classe é a existência de um grande domínio extracelular de ligação ao glutamato na extremidade N-terminal da proteína, denominado de VFD. Existem 8 tipos de mGluR, mGluR1-8, alguns deles com a possibilidade de gerar diversidade através de transcritos alternativos que são diferencialmente expressos em todo o SNC (NISWENDER e CONN, 2010).

Os mGluRs são, ainda, divididos em três grupos. O Grupo I, acoplado a G_q/G_{11} , pode atuar na estimulação da Fosfolipase C – PLC, da Adenilil ciclase e MAP quinase, sendo formado por mGluR 1 e mGluR 5. O grupo II, formado por mGluR 2 e mGluR 3, inibe a adenilil ciclase e os canais de Ca^{2+} , mas ativa os canais de K^+ . O último grupo, o Grupo III, é composto por mGluR 4, 6, 7 e 8, possui as mesmas atividades do GII, adicionando-se o estímulo da cGMP fosfodiesterase pela mGluR6 (NISWENDER e CONN, 2010).

A ligação do glutamato aos receptores do Grupo I ativa a sua via clássica de sinalização, a ativação da PLC que resultará na hidrólise de

Fosfaditilglicerol(4,5)bifosfato – PI(4,5)P₂ a inositol-1,4,5-trifosfato - IP₃ e diacilglicerol – DAG, sendo ambos segundos mensageiros (SKWAREK e BOULIANNE, 2009). O IP₃ formado irá ligar-se à receptores específicos no retículo endoplasmático, alterando a sua conformação e permitindo a saída do íon cálcio da luz do RE para o citoplasma (BERRIDGE, 1992); (NAKAMURA, BARBARA, *et al.*, 1999); (IRVINE, 2003).

1.11 Via de sinalização mediada pela ativação da Fosfolipase C – PLC através da mGluR1/5

O DAG é uma substância importante para a sinalização celular, pois é capaz de modular a via a fosfoquinase C, ou ser fosforilado pela quinase sensível a DAG gerando ácido fosfatídico, ou, ainda, ser convertido a ácido araquidônico pela DAG lípase (CLAPHAM, 2007).

A fosfoquinase C, ou simplesmente PKC, compreende uma família de isoenzimas que são agrupadas em 3 sub-classes com base na composição do seus domínios regulatórios, a saber: convencional, nova e atípica (MELLOR e PARKER, 1998). As PKC α , β I, β II e γ são classificadas como convencionais, pois possuem um sítio C1 e um sítio C2 em seu domínio regulatório. A fosfoquinase C é mantida em uma conformação inativa através de dois mecanismos, o bloqueio do sítio catalítico pela interação deste com um pseudosubstrato e a falta de uma fosforilação no loop de ativação. A região C2 é o local de ligação do íon cálcio, enquanto que C1 liga-se ao DAG. Ambas as interações são necessárias para a ativação de PKC, pois expõe o loop de ativação e libera a cavidade catalítica da interação com o pseudosubstrato. A exposição do loop de ativação permite que o resíduo Thr⁵⁰⁰ seja fosforilado por uma quinase à montante na via, a PDK1 (NEWTON, 2003). A ativação da PKC através da adição de PO₃²⁻ no loop de ativação é um importante mecanismo regulatório da superfamília das proteínas quinases (TAYLOR e RADZIO-ANDZELM, 1994); (JOHNSON, NOBLE e OWEN, 1996); (JOHNSON e LEWIS, 2001); (NEWTON, 2003).

A ativação da PKC nos neurônios está fortemente correlacionada, e parece ser essencial, com todas as fases da aprendizagem, incluindo a aquisição, consolidação e reconsolidação. Muitos substratos da PKC são envolvidos nas vias bioquímicas da memória e aprendizagem (ALKOM, MIAO-KUM e NELSON, 2006); (NELSON, SUN, *et al.*, 2008). Dentre todos os alvos, as vias de ação da PKC que mais interessam no presente trabalho é a da fosforilação do MEK/ERK (MAPK),

complexo proteico 14-3-3 e NF- κ B. A via da MAPK será discutida com detalhe em seguida e retornaremos a apresentar o cruzamento da via do PKC e a via clássica de MEK/ERK.

As proteínas 14-3-3 foram inicialmente descritas como moléculas sinalisadoras com capacidade de ativar a síntese de neurotransmissores. Contudo, vários trabalhos têm relatado a sua importância em vários processos fisiológicos da célula, como a sinalização, crescimento celular, divisão, adesão, diferenciação, apoptose e regulação de canais iônicos (PAWSON, 1997); (FU, SUBRAMANIAN e MASTERS, 2000); (AITKEN, 1996); (NIU, 2002); (TOSKA, 2002); (BUNNEY, VAN DEN WIJNGAARD e DE BOER, 2002). Contudo, vale salientar, que o exato mecanismo dessas atividades não está completamente elucidado (YAFFE, 2002). Esta classe de proteínas tem sido encontradas em todos os organismos eucarióticos (VAN HEMERT, VAN HEUSDEN e STEENSMA, 2001). Cerca de 1% das proteínas totais solúveis do cérebro são constituídas de proteínas 14-3-3, ressaltando a sua importância para as funções neuronais. Além disso, esse grupo de proteínas tem atraído mais interesse devido à possibilidade de envolvimento com várias doenças neurológicas (BERG, RIESS e BORNEMANN, 2003).

O fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) foi inicialmente descrito em linfócitos mas diversos estudos têm demonstrado o seu importante papel no SNC (MEFFERT, 2005). NF- κ B é responsável pela regulação da transcrição de múltiplos genes alvos, envolvidos nas reações imunes e inflamatórias, na proliferação celular, apoptose e funcionamento do sistema nervoso central (MALEK, BOROWICZ, *et al.*, 2007). A família NF- κ B também denominada de Rel, nos mamíferos, é composta por 5 membros: p50 ou NF- κ B1, p52 ou NF- κ B2, p65 ou RelA, c-Rel e RelB (MEFFERT, 2005). As proteínas dessa família, em células não ativadas, formam homo ou heterodímeros que são inativos pela interação com uma proteína inibitória, a I κ B, permanecendo no citoplasma (MALEK, BOROWICZ, *et al.*, 2007). A translocação de NF- κ B para o núcleo, somente é possível após a dissociação do dímero com I κ B. Essa dissociação é mediada pela fosforilação de I κ B através do complexo I κ B quinase – IKK. Após a separação, o dímero de NF- κ B é translocado para o núcleo e, possivelmente, ativado via fosforilação por uma das isoformas de PKC (DURAM, DIAZ-MECO e MOSCAT, 2003). Após a translocação para o núcleo e ativação, NF- κ B liga-se ao DNA e promove a transcrição de uma série de genes, como: citocinas

(IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM, ELAM-1, E-selectinas), ciclooxigenase-2, proteínas de membrana, outros fatores de transcrição (c-Myc e IRF4), proteínas anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-XL e outras) e etc (MALEK, BOROWICZ, *et al.*, 2007); (HACKER e KARIN, 2006).

Desta forma, podemos perceber que o glutamato, principal neurotransmissor do SN, possui importantes efeitos na alteração do estado de repouso na célula, modificando uma série de aspectos como a ativação e inativação de proteínas, alteração do balanço iônico celular, expressão gênica, controle epigenético e outros. Contudo, grandes concentrações de glutamato na fenda sináptica pode causar excesso da entrada de cálcio no citoplasma causando toxicidade que pode levar à apoptose da célula. Para compreender melhor esse processo, descreveremos melhor o metabolismo do glutamato no SN de mamíferos.

1.12 Metabolismo do glutamato no SNC

A glutamina e o α -cetoglutarato são os maiores precursores de glutamato, o qual é subsequentemente armazenado em vesículas no terminal pré-sináptico para futura liberação na fenda sináptica (TAPIERO, MATHE, *et al.*, 2002). A glutamina é obtida para o interior do terminal pré-sináptico via transporte ativo Na⁺-dependente (ANDERSON e SWANSON, 2000); (DAIKHIN, 2000). Em seguida, a glutamina é transportada para a mitocôndria, onde é convertida a glutamato pela ação da enzima glutaminase, previamente ativada. (DAIKHIN, 2000); (PLATT, 2007). O α -cetoglutarato também é obtido por via ativa e transaminado a glutamato.

A liberação do glutamato armazenado nas vesículas, poderá ativar receptores pré e pós-sinápticos, retornar ao terminal pré-sinápticos por transportadores ativos e serem re-empacotados, se difundir pelo espaço intercelular ou ser internalizados por células gliais através de transportadores específicos (ANDERSON e SWANSON, 2000); (ATTWELL, 2000); (DAIKHIN, 2000); (PLATT, 2007).

Os principais transportadores membranares de glutamato são os EAATs, *Excitatory amino acid transporters* ou transportadores de aminoácidos excitatórios. Os EAATs são membros da família 1 de carreadores de soluto (SLC1 – *solute carrier family 1*) e cinco principais membros são reconhecidos, denominados EAAT1-5

(BEART e O'SHEA, 2007). Os EAATs possuem diferentes localização, tanto a nível celular quanto regional.

O EAAT1 (SLC1A3 ou GLAST1) está presente nas células gliais ao longo de todo o SNC, sendo encontradas em altos níveis na células gliais de Bergman do cerebelo (STORCK, SCHULTE, *et al.*, 1992); (PINES, DANBOLT, *et al.*, 1992); (DANBOLT, 2001); (O'SHEA, 2002); (KANAI e HEDIGER, 2004); (BEART e O'SHEA, 2007). EAAT2 (SLC1A2 ou GLT1) é praticamente exclusiva das células gliais e abundantemente expressa ao longo de todo o SNC. EAAT3 (SLC1A1 ou EAAC1) e 4 (SLC1A6) estão presentes nos neurônios, o EAAT4 é mas abundante nas células cerebelares de Purinje e EAAT3 é ubíqua no SNC (DANBOLT, 2001); (O'SHEA, 2002); (KANAI e HEDIGER, 2004); (BEART e O'SHEA, 2007). EAAT5 (SLC1A7) está presente na haste do fotoreceptor e nas células bipolares da retina (ARRIZA, ELIASOF, *et al.*, 1997); (POW D. V., 2000); (BEART e O'SHEA, 2007).

Vários relatos enfatizam o importante papel dos EAATs na manutenção do nível limiar de glutamato na fenda sináptica. Em geral, o excesso de glutamato é re-incorporado ao sistema pré-sináptico e às células gliais pelos transportadores. Esse sistema evita a toxicidade por excesso de excitação, denominada de excitotoxicidade, termo utilizado para descrever como um componente excitatório elicit a toxicidade (OLNEY, 1969); (DIAMOND J. S., 1997); (TAKAYASU, IINO, *et al.*, 2006); (BEART e O'SHEA, 2007). Segundo Meldrum (2000) existem 3 mecanismos básicos da excitotoxicidade, 1 – aumento da concentração de glutamato ou agonistas exógenos nos receptores glutamatérgicos; 2 – a liberação intracelular do glutamato endógeno armazenado pode contribuir para uma neurodegeneração aguda causada por uma isquemia ou injúria no cérebro, ou; 3 – algumas desordens neurodegenerativa crônicas como Alzheimer, Parkinson's, Huntington e etc, que também causam uma disrupção no sistema glutamatérgico padrão (MELDRUM, 2000).

O potencial de toxicidade mediada por glutamato envolve o grande fluxo do íon cálcio para o interior celular, contudo o exato mecanismo da citotoxicidade permanece controverso (SZYDLOWSKA e TYMIANSKI, 2010). Atualmente são conhecidos vários efeitos que levam à apoptose ou morte necrótica em consequência da excitotoxicidade. Existem 2 hipóteses desta toxicidade: 1 – a hipótese da sobrecarga de Ca^{2+} (MANEV, FAVARON, *et al.*, 1989); (MARCOUX, PROBERT JR e WEBER,

1990) e 2 – a hipótese da Especificidade da Fonte (TYMIANSKI, CHARLTON, *et al.*, 1993); (SATTLER, CHARLTON, *et al.*, 1998).

Quando a concentração citoplasmática de íon cálcio supera o limiar fisiológico, e os mecanismos de homeostase falham, diversos efeitos neurodegenerativos como a ativação de lipases, caspases, calpains, proteases e fosfatases (SAEZ, RAMIREZ-LORCA, *et al.*, 2006); (CONG, GOLL, *et al.*, 1989) são ativados, desencadeando uma série de efeitos catastróficos, como: o dano à fisiologia mitocondrial (LOEW, CARRINGTON, *et al.*, 1994); (SCHINDER, OLSON, *et al.*, 1996); (MURPHY e FISKUM, 1999); (RACAY, TATARKOVA, *et al.*, 2009), ruptura das membranas celulares (POTTORF, JOHANNIS, *et al.*, 2006), dano ao citoesqueleto, produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (HERSON e ASHFORD, 1999); (RETAMAL, CORTES, *et al.*, 2006), alterações na cromatina e fragmentação do DNA (Mattson, 2008), e disfunção do retículo endoplasmático (PISANI, BONSI, *et al.*, 2000); (CHEN, KINTNER, *et al.*, 2008).

Apesar deste efeito excitotóxico existir apenas em condições extremas, é importante para as células do SN possuir um aparato de promoção da sobrevivência e diferenciação neuronal, regulação da transmissão sináptica e plasticidade. Desta forma, garantindo que mesmo diante de condições desfavoráveis, até certo limiar, as células mantenham as suas atividades intactas.

1.13 Neurotrofinas

As neurotrofinas são uma família de pequenas proteínas que regulam todos esses aspectos da sobrevivência e atividades dos neurônios (CHAO, 2003). O fator de crescimento do nervo – NGF foi a primeira neurotrofina descoberta e é a melhor caracterizada (SHOOTER, 2001). Outros membros desta família são a neurotrofina-3 (NT3), neurotrofina 4/5 (NT-4/5) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (KALB, 2005); (PRICE, SHARKEY e MATSUOKA, 2007). Além das neurotrofinas, muitas outras substâncias neurotróficas demonstram atividades correlatas, como: o fator de crescimento do fibroblasto – FGF (Eswarakumar *et al.*, 2005), o fator neurotrófico derivado de células gliais – GDNF, dentre outros (PRICE, SHARKEY e MATSUOKA, 2007). Vale salientar que as neurotrofinas não somente desempenham o importante papel de modular a proliferação, a migração, a diferenciação ou a manutenção do fenótipo de células de SNC em desenvolvimento (LEWIN e BARDE,

1996); (MCALLISTER, 2001), mas a sua expressão é necessária para a manutenção das funções neuronais, integridade estrutura e neurogênese (SOFRONIEW, GALLETLY, *et al.*, 1990); (COOPER, SKEPPER, *et al.*, 1996). Desta forma, sendo importante durante toda a vida do indivíduo.

O BDNF foi a segunda neurotrofina descoberta, sendo também a segunda melhor caracterizada (REICHARDT, 2006). O BDNF é crítico para a sobrevivência neuronal no SNC (NUMAKAWA, SHINGO SUZUKI, *et al.*, 2010). A aplicação *in vivo* de BDNF demonstrou proteger os neurônios de uma variedade de injúrias cerebrais (WU e PARDRIDGE, 1999). Schabitz e colaboradores (2000) demonstraram que uma série de isquemias cerebrais, precedidas de aplicação intra-venosa de BDNF, não resultava em danos aos neurônios, caracterizando o efeito neuroprotetor mediado pela neurotrofina (SCHÄBITZ, SOMMER, *et al.*, 2000).

Experimentos com cultura de células hipocâmpais e cerebrocorticais, demonstraram que o BDNF potencializa a transmissão sináptica excitatória no terminal pré-sináptico através do aumento da liberação de neurotransmissores, pelo menos em parte (LESSMANN e HEUMANN, 1998); (TAKEI, NUMAKAWA, *et al.*, 1998). Pós-sinápticamente, BDNF eleva a transmissão sináptica glutamatérgica regulando a fosforilação de receptores NMDA, subunidades NR1 e NR2B (SUEN, WU, *et al.*, 1997); (LIN, WU, *et al.*, 1998); (ALDER, THAKKER-VARIA, *et al.*, 2005) e, portanto, incrementando a atividade do receptor (LEVINE, CROZIER, *et al.*, 1998); (SONG, CHOE, *et al.*, 1998). Além disso, Caldeira e colaboradores (2007) demonstraram, em cultura de neurônios hipocâmpais, que BDNF aumenta a abundância de receptores de NMDA e sua translocação para a membrana plasmática, regulando positivamente a atividade do receptor ionotrópico. Assim, percebemos a modulação positiva de BDNF sobre os receptores NMDA em vários níveis do metabolismo, desde o aumento da transcrição até a translocação destes para o domínio de membrana específico.

Além disso, diversas pesquisas sugerem a redução dos níveis de BDNF em diversas desordens mentais, como: Esquizofrenia, disordem bipolar e depressão maior (KNABLE, BARCI, *et al.*, 2004); (GERVASONI, AUBRY, *et al.*, 2005); (KAREGE, VAUDAN, *et al.*, 2005).

Durante o desenvolvimento do indivíduo, BDNF possui expressão mais abundante no sistema nervoso em comparação com outros tecidos e seu nível

aumenta substancialmente no cérebro durante o desenvolvimento pós-natal (KATOH-SEMBA, TAKEUCHI, *et al.*, 1997). No sistema nervoso de animais adultos, BDNF demonstra um padrão de expressão difuso, com altos níveis de mRNA e proteína no hipocampo, amígdala, cortex cerebral e hipotálamo (KATOH-SEMBA, TAKEUCHI, *et al.*, 1997); (CONNER, LAUTERBORN, *et al.*, 1997); (ERNFORS, WETMORE, *et al.*, 1990); (TIMMUSK, PALM, *et al.*, 1993). O mRNA de BDNF tem presença restrita aos neurônios e há poucas áreas do cérebro onde o BDNF não é detectado. (CONNER, LAUTERBORN, *et al.*, 1997); (ERNFORS, WETMORE, *et al.*, 1990); (TIMMUSK, PALM, *et al.*, 1993). Em adultos, a expressão de BDNF pode ser detectada em outros tecidos fora do SN, como: timo, fígado, coração e rim. (KATOH-SEMBA, TAKEUCHI, *et al.*, 1997); (ERNFORS, WETMORE, *et al.*, 1990); (MAISONPIERRE, BELLUSCIO, *et al.*, 1990); (MAISONPIERRE, LE BEAU, *et al.*, 1991).

Timmusk e colaboradores (1993) foram os primeiros a descrever a estrutura do gene de BDNF em roedores. A estrutura e classificação proposta por Timmusk permaneceu inalterada até 2007 quando Aid e colaboradores descreveram novos transcritos alternativos. Atualmente, é aceito que existem pelo menos 22 tipos de transcritos derivados do mesmo gene, formados a partir da combinação de 11 tipos de 5'UTR e 2 tipos distintos de sítio de poliadenilação. Os 11 tipos de mRNAs com distintos 5'UTR são gerados por processamento do mRNA, dos tipos I-VIII são gerados por *splicing*. O último tipo é formado através da extensão da parte que contém o 3'UTR (Aid *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2006). Assim, podemos perceber que existe grande complexidade do estudo da expressão de BDNF, pois não envolve somente a produção da cadeia polipeptídica. Lauteborn e colaboradores (1996) introduziram o termo de pan-BDNF para representar o conjunto de mRNA de BDNF.

BDNF, assim como outras neurotrofinas, são sintetizadas como pre-pro-BDNF (SEIDAH, BENJANNET, *et al.*, 1996), esse precursor sofre modificações pós-traducionais antes de se organizar em uma estrutura funcional homodimérica (DWIVEDI, 2009). O pro-BDNF (32 kDa) é um precursor glicosilado e produzido no retículo endoplasmático, sendo, em seguida, translocado para o aparelho de Golgi. Na rede trans-Golgi, a pro-BDNF acumula-se em vesículas até ser transportado para o sítio de secreção.

Um importante aspecto dessa via é o agrupamento da neurotrofina nas vesículas. O sítio extra da BDNF tem um papel fundamental no agrupamento, pois um

experimento com células escassas desta região demonstraram incapacidade de secretar BDNF (NUMAKAWA, SHINGO SUZUKI, *et al.*, 2010). Um polimorfismo de nucleotídeo, Val66Met na sequência codante da região adicional, é suficiente para prejudicar o agrupamento e inviabilizar a secreção de proBDNF (EGAN, KOJIMA, *et al.*, 2003). A conservação dessa região parece ser importante na ligação do pro-BDNF à carboxipeptidase-E processo que também necessita da sortilina. (LU, PANG e WOO, 2005); (CHEN, IERACI, *et al.*, 2005).

Ainda permanece controverso onde e como o pro-BDNF é processado ao BDNF maduro (mBDNF) no SNC (NUMAKAWA, SHINGO SUZUKI, *et al.*, 2010). Originalmente foi postulado que o processamento ocorria através da clivagem pela furina ou pelas pro-proteínas convertases, no trans-Golgi ou nas vesículas secretoras (SEIDAH, BENJANNET, *et al.*, 1996); (MATSUMOTO, RAUSKOLB, *et al.*, 2008). Contudo, estudos recentes têm relatado a presença de consideráveis quantidades de proBDNF sendo secretadas pelos neurônios. A forma imatura secretada pode ser convertida à mBDNF (14 kDa) por processamentos extracelulares mediados por fatores plasminogênicos ou metaloproteases da matrix (LU, PANG e WOO, 2005); (YANG, SIAO, *et al.*, 2009). É interessante ressaltar que estímulos de baixa e alta frequências em cultura de células de hipocampo elevam os níveis de proBDNF extracelular. Contudo, apenas o estímulo de alta frequência induziu a secreção de fatores plasminogênicos, resultando na conversão de proBDNF a mBDNF (YANG, SIAO, *et al.*, 2009); (NUMAKAWA, SHINGO SUZUKI, *et al.*, 2010).

1.14 Receptores de BDNF

BDNF interage com 2 tipos de receptores, o p75NTR e o TrkB. O receptor pan75 de neurotrofina p75NTR, é membro da superfamília de necrose tumoral. p75NTR possui um domínio extracelular que inclui 4 motivos ricos em cisteína, um domínio simples transmembrana e uma região citoplasmática que inclui o domínio da morte (LIEPINSH, ILAG, *et al.*, 1997); (HE e GARCIA, 2004). Apesar deste receptor não possuir domínio catalítico, ele interage com várias proteínas que transmitem importantes sinais e regulam a sobrevivência e diferenciação neuronal, tanto quanto a plasticidade sináptica (REICHARDT, 2006); (HEMPSTEAD, MARTIN-ZANCA, *et al.*, 1991); (BENEDETTI M, 1993); (ESPOSITO, PATEL e STEPHENS, 2001). Segundo

Kaplan e Miller (2000), os receptores p75 transmitem tanto sinais positivos quanto negativos (KAPLAN e MILLER, 2000). Pang e colaboradores (2004) demonstraram que proBDNF liga-se a p75NTR tendo um importante papel na LTD (PANG, TENG, *et al.*, 2004).

Os receptores TrkB são abundantes no SNC (KAPLAN e MILLER, 2000) e desempenham uma importante papel crucial na plasticidade neural durante a o desenvolvimento e a vida adulta (BRAMHAM, 2005); (OHIRA e HAYASHI, 2009). Os TrkBs são receptores com sítio tirosina quinase na extremidade citosólica e são estimulados pela dimerização dependente da neurotofina e da transfosforilação do loop tirosínico (HUANG e REICHARDT, 2003). Os receptores Trk são ativados especificamente pela BDNF madura (LEE, KERMANI, *et al.*, 2001).

As três maiores vias de sinalização ativadas por TrkB são PLC γ , PI3K/Akt e Ras/Raf/Mek/Erk. A via da fosfolipase C produz DAG e IP3, culminando na ativação da PKC e toda a via a jusante. PI3Ks são quinases que fosforilam fosfaditilinositol na posição 3. Existem 3 classes de PI3K (fosfaditilinositol-3-quinase), das quais apenas a Classe I é hábil em ativar Akt. A PI3K do grupo I é composta de heterodímeros, dos quais uma sub-unidade é regulatória, a p85, e outra é catalítica, a p110). A ativação da PI3K depende de sua associação com o domínio tirosina quinase de uma proteína, como a TrkB, e de um adaptador de proteína G – Ras. PI3K funcional resulta na fosforilação de PI(4,5)P₂ gerando o segundo mensageiro PI(3,4,5)P₃ (VANHAESEBROECK e ALESSI, 2000); (MORA, KOMANDER, *et al.*, 2004).

A produção de PIP3 provoca o movimento para a membrana plasmática de diversas proteínas com sítio PH – Homologia de Pleckstrina. A Akt, uma proteína quinase serina-treonina também denominada de PKB, possui o domínio PH na extremidade N-terminal. O recrutamento da Akt para a membrana plasmática, resulta em uma alteração conformacional que expõe dois resíduos de aminoácidos cruciais, Thr308 e Ser473 (HENESSY, SMITH, *et al.*, 2005). O primeiro aminoácido é fosforilado pela PDK1, enquanto que o segundo sítio é fosforilado pela PDK2 (ALESSI, 1996); (BLUME-JENSEN, 2001). A PDK1 é uma quinase bem descrita na literatura, contudo a PDK2 ainda necessita de informações. Várias PDK2s putativas têm sido sugeridas, como mTORC, PKC β II e até mesmo a Akt. (LYNCH, ELLIS, *et al.*, 1999); (KAWAKAMI, 2004); (SARBASSOV DOS, GUERTIN, *et al.*, 2005).

A ativação de PKB está relacionada a sobrevivência (VIVANCO e SAWYERS, 2002); (LUO, MANNING e CANTLEY, 2003), inibição da apoptose (CHEN, 2001); (WANG, 2002), crescimento celular, proliferação (WENDEL, 2004) e ativação da máquina celular de tradução (WENDEL, 2004); (SCHMELZLE e HALL, 2000); (LAZARIS-KARATZAS, MONTINE e SONENBERG, 1990); (POLUNOVSKY, 2000). Dentre os substratos de Akt/PKB destacam-se GS3K, BAD e Caspase 9 que são inibidos; e, IKK, CREB e eNOS que são ativados (MANNING e CANTLEY, 2007); (HENESSY, SMITH, *et al.*, 2005).

A via Ras/Raf/Mek/Erk é uma das mais importantes e conhecidas vias de sinalização celular. Essa via de sinalização também é conhecida com via das MAPK (quinase proteica ativada por mitogenio) e modula uma série de eventos celulares como a proliferação, a diferenciação e migração (NISHIMOTO e NISHIDA, 2006). A via MAPK possui a cascata consecutiva de 3 quinase como característica marcante (GREWAL, YORK e STORK, 1999); (SWEATT, 2001).

Uma variedade de estímulos extracelulares, como fatores de crescimento ou estresses ambientais, são percebidos pela células e desencadeiam a ativação da via MAPK. A primeira quinase da cascata, a MAPKKK ou MAP3K (p. ex. Raf, TAK1 ou MLK3/MEKK1), é ativada por acopladores de proteína G, como o Ras. A MAP3K fosforila e ativa a segunda quinase da via, globalmente denominada de MAPKK ou MAP2K. A MAP2k, que pode ser a MEK1/2 ou MKK3/6 ou MKK4/7, de acordo com o tipo de MAP3K, ativa as MAPKs através de fosforilação. Enfim, a MAPK funcional (que pode ser ERK1/2 ou p38 ou JNK) ativa diversos fatores de transcrição através de fosforilações específicas (JI, GEREAU, *et al.*, 2009). Resumidamente, as três principais vias de MAPK são: 1 – Raf/MEK1,2/ERK1,2/CREB, 2 – TAK1/MKK3,6/p38/ATF-2, e 3 – MLK3 ou MEKK1/MKK4,7/JNK/c-jun.

ERK-1 (p44) e ERK-2 (p-42) são duas quinases extremamente importantes na proliferação e pro-diferenciação celular (SWEATT, 2001). As duas proteínas possuem alta similaridade e são reguladas à montante por MEK1 e MEK2. As ERK1,2 foram originalmente identificadas como efetores primários de receptores específicos para fatores de crescimento. Posteriormente, foi descoberto a sua importante participação em processos de neuroplasticidade como a aprendizagem e formação da memória (IMPEY, OBRIETAN e STORM, 1999); (JI e WOOLF, 2001) (JI, GEREAU, *et al.*, 2009). As vias das MAPK formam um importante elo entre a percepção as

alterações externas e as respostas desencadeadas pelo núcleo (PENG, ZHANG, *et al.*, 2010). Vale salientar que dependendo da duração, magnitude e localização sub-celular, a ativação de ERK pode modular a morte celular (CAGNOL e CHAMBARD, 2010).

Dois substratos das MAPK são importantes no presente contexto, CREB e c-jun. O CREB (*cAMP-response-element-binding protein*) é um fator transcricional implicado na expressão de uma série de genes importantes, como BDNF, c-fos e Bcl-2 (HATA, GASS, *et al.*, 1998); (KITAGAWA, 2007). CREB pertence à família de fatores de ativação de transcrição (ATF). Os ATFs são estruturalmente relacionados e formados ATF-1, ATF-2, ATF-3 e ATF-4. ATF-1, CREB e CREM (modulador do CREB) formam uma subclasse de uma subclasse de fatores de transcrição. O CREB é uma proteína de 43 kDa conservada de *Drosophila* humanos (SHAYWITZ e GREENBERG, 1999). CREB é expresso ubícuamente em todos os tecidos e possui 3 domínios funcionais: 1 – zipper de leucina, que intermedia a dimerização, 2 – um domínio de ligação ao DNA, e 3 – domínio de ativação transcricional que possui importantes sítio de fosforilação (WALTON e DRAGUNOW, 2000); (SANDOVAL, PIGAZZI e SAKAMOTO, 2009). O CREB possui três transcritos alternativos, denominados de α , β e Δ . Cada um desses transcritos alternativos possui diferentes mecanismos de regulação e propriedades metabólicas distintas (WALTON e DRAGUNOW, 2000).

Nos neurônios, existem três vias de sinalização que ativam o CREB: 1 – Receptor acoplado à proteínas G/Adenilil Ciclase/PKA; 2 – CaMKK/CaMKIV; 3 – MAPK (CARLEZON, 2005). A ativação do CREB através da fosforilação, recruta uma proteína de ligação ao CREB, denominada de CBP. Posteriormente, CREB/CBP forma um grande complexo com RNA polimerase para o reconhecimento das regiões CRE (TgACgTCA). A ligação do complexo às regiões CRE permite o início da transcrição dos genes (KITAGAWA, 2007). Contudo, vale salientar que nem todos os genes que possuem a região CRE como reguladora são transcritos, pois o grau de condensação da cromatina também é um regulador da expressão gênica (GAS e RIVA, 2007). A atividade do CREB também pode ser desencadeada de maneira independente da fosforilação da Ser133, através de transdutores coativadores de CREB (CONKRIGHT, CANETTIERI e SCREATON, 2003); (SCREATON, CONKRIGHT e KATOH, 2004).

O fator protéico ativador de transcrição – 1, ou AP-1, é um dímero composto pela junção de membros das famílias proteicas Jun e Fos. A família Jun (c-jun, junB e junD), principal componente de AP-1, é hábil em se organizar em homodímeros ou heterodímeros com membros do grupo Fos (c-fos, FosB, Fra-1 e Fra-2), para formar AP-1. Contudo, não existe AP-1 formado por homodímeros de Fos (ANGEL e KARIN, 1991); (JOCHUM, PASSEGUE e WAGNER, 2001). Outro aspecto importante é que Jun também pode formar heterodímeros com outros fatores transcripcionais da família ATF (HAI, 2001) e, ainda, com outros fatores que possuem o zíper de leucina, como CBP e c-rel (HERDEGEN e LEAH, 1998); (RAIVICH e BEHRENS, 2006).

A ativação de c-jun para a formação dos homo ou heterodímeros funcionais é, principalmente, dependente da fosforilação na extremidade amino. A quinase responsável por essa ativação é a c-jun-N-terminal quinase ou JNK. Há vários trabalhos na literatura que relatam o incremento de transcrição e ativação de c-jun desencadeado por uma variedade de eventos, como: diferenciação e sobrevivência neuronal durante o desenvolvimento embriônico e pós-Natal (MELLSTROM, ACHAVAL, *et al.*, 1991); (KOCKEL, ZEITLINGER, *et al.*, 1997), dor (WISDEN, ERRINGTON, *et al.*, 1990); (NARANJO, MELLSTROM, *et al.*, 1991), LTP, LTD e formação da memória (ABRAHAM, MASON, *et al.*, 1993); (TISCHMEYER, GRIMM, *et al.*, 1994), isquemia (KINDY, CARNEY, *et al.*, 1991) e reparo pós-traumático (CHAIKUSUNT, CAMPBELL, *et al.*, 2003). Vale salientar ainda que estudos funcionais utilizando estratégias *in vivo* de perda de função de c-jun têm sugerido o seu papel bipotencial tanto na neurodegeneração e morte celular, quanto na plasticidade e reparo (RAIVICH e BEHRENS, 2006).

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA

2 LECTINAS

2.1 Aspectos Gerais de Lectinas

Lectinas são proteínas de origem não imune que reconhecem e ligam-se a específicos epítomos estruturais de carboidratos, contudo sem modificá-los. São proteínas ubíquas, sendo encontradas em várias espécies de microrganismos, vegetais e animais. Pode-se postular que apenas uma pequena fração do total de lectinas é conhecida atualmente (BIES e LEHR, 2004). A identificação de lectinas ocorre através de análises funcionais, principalmente a hemaglutinação (mas não exclusivamente), ou através da identificação de sítios putativos a lectinas em seqüências de resíduos de aminoácidos de proteínas (NILSSON, 2007).

Weir Mitchell (1860) foi o primeiro a observar a atividade lectínica quando relatou a precipitação de eritrócitos de sangue de pombos por veneno de cascavel (KILPATRICK e GREEN, 1992) *apud* (SHARON e LIS, 2003). Em seguida, Peter Hermann Stillmark (1888) detalhou a hemaglutinação por extratos de sementes de *Ricinus communis* e que este fator protéico hemaglutinante, denominado posteriormente de ricina, era responsável pela toxicidade da semente. O trabalho de Stillmark é considerado como o marco inicial para os estudos das lectinas. Em 1891, Hellin descobriu que o extrato tóxico das sementes de *Abrus precatorius* também causava a aglutinação de eritrócitos e o fator protéico hemaglutinante foi denominado de Abrina. Devido a esses relatos, foi proposto por Elfstand (1898) o termo genérico hemaglutininas para as proteínas citotóxicas e hemaglutinantes.

Em 1948, Renkonen descobriu que algumas hemaglutininas exibem uma clara preferência para eritrócitos de um particular tipo sangüíneo humano, dentro do sistema ABO (RENKONEN, 1948). A descoberta desta especificidade foi o motivo direto da introdução do termo lectina (do latim *legere*, que significa escolher), no início da década de 50, para referência a essas proteínas de origem vegetal que aglutinam células (VAN DAMME, PEUMANS, *et al.*, 1998).

A ligação das lectinas a carboidratos foi descrita por Watkins e Morgan (1952), que afirmaram que as propriedades aglutinantes das lectinas são baseadas

na sua atividade específica de ligação a açúcar. As lectinas, então, passaram a ser reconhecidas como proteínas de ligação a carboidratos e assim puderam ser distinguidas de outras proteínas com base em um critério funcional bem definido (VAN DAMME, PEUMANS, *et al.*, 1998).

A ampla distribuição na natureza e sua habilidade de decifrar glico-códigos reforçam a importância das lectinas, estando envolvidas em uma grande variedade de processos celulares, como: comunicação, defesa, fertilização, desenvolvimento, etc. (CALVETE, THOLEM, *et al.*, 1999). Além disso, várias lectinas são moléculas de reconhecimento entre patógenos e células-alvos, como em bactérias e vírus. De modo geral, podemos afirmar que as lectinas agem como mediadores da transferência de informação em sistemas biológicos através da interação com glicoproteínas, glicolípideos e oligossacarídeos (GABIUS, 1997); (BIES e LEHR, 2004); (NILSSON, 2007).

2.2 Classificação das Lectinas

Existem diversas características passíveis de serem utilizadas na classificação das lectinas, como a estrutura geral das lectinas, quantidade e tipos de domínios de ligação e o(s) tipo(s) de açúcar(es) específico(s) da lectina. Com relação à estrutura geral (SCOP – *structural classification of protein*), a superfamília das lectinas compreende 15 famílias, dentre as quais destacamos as lectinas de leguminosas, β -glucanase, endoglucanase, sialidase, galectinas, pentraxinas e etc (BRINDA, SUROLIA e VISHVESHWARA, 2005).

Makela (1957) classificou as lectinas de acordo com a configuração dos carbonos 3 e 4 do monossacarídeo específico das lectinas e propôs quatro grupos. O grupo I é formado pelas lectinas ligantes à L-fucose. O grupo II lectinas específicas a lactose e N-acetil-glicosamina. As lectinas para manose e glucose, pertencem ao grupo III. Por último, o grupo IV agrupa as lectinas putativas para interação com gulose, L-xylose e L-glicose (MAKELA, 1957). Nesta classificação não estavam incluídas as lectinas específicas por ácido siálico e aquelas específicas por estruturas complexas (GOLDSTEIN e PORETZ, 1986). Esta subdivisão é certamente muito útil para a utilização de lectinas como ferramentas, no entanto é provavelmente artificial

e irrelevante com respeito às possíveis relações evolutivas (VAN DAMME, PEUMANS, *et al.*, 1998).

As lectinas podem, ainda, serem categorizadas em Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas (VAN DAMME, PEUMANS, *et al.*, 1998), de acordo com a quantidade e tipo de sítios de ligação. As merolectinas possuem um único domínio, sendo este o de ligação a carboidrato. A característica das lectinas de aglutinar eritrócitos é dependente da existência de pelo menos dois sítios de ligação à carboidrato, pois viabiliza a formação de uma rede de eritrócitos intercalados com lectinas. Assim, como as Merolectinas são monovalentes, não podem precipitar glico-conjugados ou aglutinar células. Um exemplo de uma típica merolectina é uma pequena proteína de ligação à quitina, heveína, extraída do látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*) (VAN DAMME, PEUMANS, *et al.*, 1998).

As hololectinas possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidrato, que podem ser tanto idênticos ou muito similares e se ligam ao mesmo açúcar ou a açúcares estruturalmente similares. Vale salientar que as hololectinas possuem sítios apenas para carboidratos. Por definição são di- ou multivalentes e, portanto precipitam glicoconjugados e aglutinam células. A maioria das lectinas vegetais pertence a este subgrupo (VAN DAMME, PEUMANS, *et al.*, 1998).

As quimerolectinas são proteínas fusionadas consistindo de um ou mais domínios de ligação a carboidratos aleatoriamente arranjados a um domínio não relacionado ao sítio lectínico. O outro domínio pode ter uma atividade enzimática bem definida ou outra qualquer, no entanto, agindo de forma independente do domínio de ligação a carboidrato. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas. Por exemplo, proteínas inativadoras de ribossomos - RIPs do tipo 2 com mais de um sítio de ligação a carboidratos por protômero, se comportam como verdadeiras hololectinas, enquanto que quitinases vegetais da classe 1 com um único domínio atuam como merolectinas (VAN DAMME, PEUMANS, *et al.*, 1998).

As superlectinas são um tipo especial de quimerolectinas. Elas seriam proteínas de fusão, com dois domínios de ligação a carboidratos. Estes domínios são estruturalmente distintos e reconhecem carboidratos estruturalmente diferentes. Apenas um exemplo de superlectinas foi, até hoje, descrito, a lectina de bulbo de

tulipa, com dois domínios, um específico para manose e outro específico para N-acetilglicosamina (VAN DAMME, PEUMANS, *et al.*, 1998).

As lectinas de plantas superiores foram as primeiras a serem descobertas e são as melhores caracterizadas, em parte devido à grande quantidade produzida e por serem, frequentemente, hidrofílicas. Sabe-se que as lectinas de plantas possuem funções biológicas importantes, como: proteína de reserva, defesa, comunicação e etc. (SHARON, 1980); (COOK, 1986); (VAN DAMME, PEUMANS, *et al.*, 1998). Contudo, vale salientar que a função exata das lectinas nas plantas ainda é uma incógnita (GALEGO, NAGANO, *et al.*, 2006).

A maioria das lectinas vegetais conhecidas pertence a quatro grandes famílias de proteínas que mantêm similaridades estruturais e evolutivas, 1 – lectinas de leguminosas; 2 – lectinas ligantes a quitina; 3 – Inativadoras de ribossomos, e 4 – lectinas de monocotiledôneas específicas à manose. Outros três grupos menos numerosos abrangem as lectinas similares à jacalina, similares à amarantina e lectinas do floema de Curcubitaceae (GALEGO, NAGANO, *et al.*, 2006).

2.3 Lectinas de leguminosas

Dentre todos esses grupos, as lectinas de leguminosas destacam-se por serem as mais numerosas e melhor estudadas (GALEGO, NAGANO, *et al.*, 2006). À guisa de exemplo, 42% das estruturas tridimensionais conhecidas de lectinas de plantas são de leguminosas (NILSSON, 2007). As lectinas de leguminosas podem ser agrupadas em uma mesma família por possuírem elevada similaridade na estrutura primária, sequência dos resíduos de aminoácidos, e tridimensional, além de conservação das propriedades biofísicas (LIENER, SHARON e GOLDSTEIN, 1986); (VARKI, CUMMINGS, *et al.*, 2002). Contudo, (SHARMA e SUROLIA, 1997) afirmaram que as lectinas desta família se assemelham em suas propriedades fisiológicas embora se diferenciem em suas especificidades a carboidratos devido a variações de aminoácidos envolvidos no sítio de ligação a carboidratos. Muitas destas lectinas são de sementes, onde as lectinas representam 10%, em média, do total protéico (GALEGO, NAGANO, *et al.*, 2006).

As lectinas de leguminosas são freqüentemente, metaloproteínas onde cada subunidade contém um íon de Mn^{2+} e um de Ca^{2+} , que são essenciais para a

atividade de ligação a carboidrato da lectina. Outro aspecto interessante é que algumas lectinas de leguminosas são N-glicosiladas (SHARON e LIS, 1990). A glicosilação pode ocorrer em um ou dois sítios, lembrando que o sítio de glicosilação é Asn-X-Ser/Thr (Helenius e Aebi, 2001). As diferenças na glicosilação resultam na formação de glicofomas (ALVES-FILHO, 2008). Vale salientar ainda que todas as lectinas de leguminosas são diméricas ou tetraméricas, com monômeros de 25-30 kDa e contendo um único sítio de ligação a carboidratos com a mesma especificidade (NOGUEIRA, 1999); (GALEGO, NAGANO, *et al.*, 2006).

A arquitetura dos monômeros é composta por três folhas- β pregueadas, sendo: um conjunto posterior de 6 segmentos, um anterior de 7 segmentos e uma folha menor de 5 segmentos que tem o papel de manter as duas primeiras unidas. Um núcleo hidrofóbico está localizado entre as folhas frontal e posterior. Não existem regiões de α hélice e 50% dos resíduos estão nas regiões de loops. Um desses loops se curva sobre a folha anterior resultando na formação de um segundo núcleo hidrofóbico entre eles (SHARMA e SUROLIA, 1997); (BRINDA, SUROLIA e VISHVESHVARA, 2005).

O domínio de ligação a carboidratos das lectinas de leguminosas é uma depressão rasa sobre os loops associados com a face côncava da folha- β pregueada de 7 segmentos (SHARMA e SUROLIA, 1997). Dois resíduos altamente conservados, Asp e Asn, são cruciais para o reconhecimento dos carboidratos já que eles, juntamente com um NH da cadeia principal de um resíduo Gly ou Arg, participam em quatro ligações de hidrogênio chaves com o monossacarídeo. Além disso, o açúcar é estabilizado por interações com resíduos hidrofóbicos como Phe, Tyr, Trp ou Leu (VARKI, CUMMINGS, *et al.*, 2002). A conservação dos resíduos de aminoácidos nas lectinas de leguminosas com especificidades a diferentes carboidratos ressalta a habilidade única destas proteínas de utilizarem uma sequência comum de resíduos de AA para ligação e ainda discriminar entre diferentes monossacarídeos.

Dentre as diversas lectinas de leguminosas já purificadas e caracterizadas, o presente trabalho enfoca a lectina de semente de *Canavalia brasiliensis* (Fabaceae, Papilionoideae, Phaseoleae, Diocleiane, *Canavalia*) - ConBr e a lectina de semente de *Vatairea macrocarpa* (Fabaceae, Papilionoideae, Dalbergieae, *Vatairea*) - VML.

A subtribo Diocleinae compreende 13 gêneros (*Calopogonium*, *Camptosema*, *Canavalia*, *Cleobulia*, *Collaea*, *Cratylia*, *Cymbosema*, *Dioclea*, *Galactia*,

Herpyza, *Luzonia*, *Macropsychanthus* e *Pachyrhizus*) distribuídos nas regiões tropicais, notadamente no Novo Mundo. As lectinas purificadas de sementes deste táxon possuem, em geral, especificidade por D-glicose/D-manose e muitas delas estão em caracterizadas com relação aos aspectos químicos, físico-químicos, estruturais e biológicos (NOGUEIRA, 1999).

A lectina de sementes de *Canavalia ensiformes*, denominada de Concavalina A ou ConA, é uma das lectinas mais estudadas, sendo a primeira lectina a ter a sua estrutura tridimensional determinada por difração de raios-X (HARDMAN e AINSWORTH, 1972). A ConA é um homotetrâmero composto por subunidades de 237 resíduos de aminoácidos.

Apesar de possuírem uma alta similaridade em suas estruturas primárias e terciárias (SANZ-APARICIO, HERMOSO, *et al.*, 1997); (GRANGEIRO, SHRIEFER, *et al.*, 1997) e de compartilharem a mesma especificidade por resíduos de glicose/manose, as lectinas de Diocleinae apresentam diferenças marcantes em várias atividades biológicas (NOGUEIRA, 1999). Como exemplo podemos citar os principais efeitos biológicos das lectinas de Diocleinae: a indução da proliferação de linfócitos e da produção de interferon- γ (BARRAL-NETO, SANTOS, *et al.*, 1992); estimulação de macrófagos (RODRIGUEZ, CAVADA, *et al.*, 1992), indução da migração de leucócitos (BENTO, CAVADA, *et al.*, 1993), indução da liberação de histamina (GOMES, CAVADA, *et al.*, 1994), efeitos anti e pró-inflamatórios (ASSREUY, SHIBUYA, *et al.*, 1997) indução da produção de óxido nítrico por células murinas (ANDRADE, ARRUDA, *et al.*, 1999), indução da apoptose (BARBOSA, ARRUDA, *et al.*, 1999), indução da liberação de histamina (LOPES, CAVADA, *et al.*, 2005), efeito anti-depressivo (BARAUNA, KASTER, *et al.*, 2006), efeito vaso dilatador (ASSREUY, FONTENELE, *et al.*, 2009), dentre outros.

Embora a ConA seja utilizada como padrão de referência nos estudos de atividades biológicas determinadas por lectinas, em sistemas *in vitro*, diversos estudos têm demonstrado que a ConBr é capaz de induzir respostas biológicas com maior intensidade, apesar dessas duas lectinas possuírem altas similaridades nas suas estruturas primárias e terciárias (GRANGEIRO, SHRIEFER, *et al.*, 1997); (SANZ-APARICIO, HERMOSO, *et al.*, 1997).

A obtenção dos dados estruturais da ConBr por Ramos e colaboradores (1996), (GRANGEIRO, SHRIEFER, *et al.*, 1997); (SANZ-APARICIO, HERMOSO, *et*

al., 1997) permitiu, pelo menos em parte, a elucidação das diferenças observadas entre as atividades biológicas. A ConA e a ConBr diferem nas posições 58, 70 e 96 da cadeia polipeptídica, na estrutura quaternária, na oligomerização diferenciada em função do pH do meio e nas quantidades relativas de subunidades intactas.

A outra lectina de interesse no presente trabalho é a de sementes de *Vatairea macrocarpa* – VML. Esta é uma glicoproteína que se apresenta na forma de um tetrâmero formado por quatro subunidades idênticas de 25 kDa cada, independente de pH. Essa lectina induz aglutinação de hemácias de coelhos e humanos e mostra especificidade por galactose, N-acetilgalactosamina e outros açúcares derivados (CAVADA *et al.*, 1998). Estudos de cromatografia de afinidade de oligossacarídeos e glicoproteínas em coluna imobilizada de VML demonstraram que esta lectina também reconhece sequências de N-acetilgalactosamina não reduzidas (RAMOS *et al.*, 2000).

Estudos de SDS-PAGE mostram que VML é composta de uma banda dupla de 32-34 kDa (cadeia alfa) e duas bandas menores de 22 kDa (cadeia beta) e de 13 kDa (cadeia gama). A lectina de *V. macrocarpa* é N-glicosilada nos resíduos de asparagina nas posições 111 e 183. O sequenciamento N-terminal da proteína revelou que os fragmentos gama e beta correspondem à parte N- e C- terminal, respectivamente, da cadeia alfa (CALVETE, SANTOS, *et al.*, 1998). Além disso, a heterogeneidade nas posições 117 (I/V), 148 (M/K), 154 (G/A), e 168 (E/Q) sugere que a lectina de semente de *V. macrocarpa* pode conter uma mistura de lectinas altamente relacionadas assim como ocorre com as lectinas de *Robinia pseudoacacia* (VAN DAMME, BARRE, *et al.*, 1995) e várias outras lectinas de leguminosas. Alves-Filho (2008) identificou a presença de pelo menos três genes de VML codificando para isolectinas com pequenas, mas marcantes diferenças nas sequências (ALVES-FILHO, 2008).

Segundo Martinez (2004), a lectina de semente de *Vatairea macrocarpa* estimula o fluxo de H⁺ em *Rhizobium tropici* com ou sem Galactose (MARTINEZ, CHANWAY, *et al.*, 2004). O mesmo não foi observado quando albumina sérica bovina foi testada. A adição de 16 µg de VML por ml resultou em um aumento de 700% da concentração extracelular de Na⁺ sugerindo que VML ativa *R. tropici* resultando em alteração no potencial de membrana da bactéria.

Segundo Martins e colaboradores (2005), a lectina de *V. macrocarpa* tem um importante efeito nos sítios de ligação a carboidrato do sistema renal (MARTINS, MONTEIRO, *et al.*, 2005). Além disso, várias outras atividades biológicas têm sido encontradas na VML como efeito pró-inflamatório (ALENCAR, ASSREUY, *et al.*, 2009); indução da formação de edema de pata e infiltração de leucócitos (ALENCAR, ASSREUY, *et al.*, 2009); indução da migração de neutrófilos por mecanismo indireto (ALENCAR, ASSREUY, *et al.*, 2003); ativação de cultura de macrófagos para liberar mediadores quimiotáticos (ALENCAR, ASSREUY, *et al.*, 2007); indução da formação de edema em pata de rato com infiltração de leucócito (ALENCAR, ASSREUY, *et al.*, 2004). Mais recentemente, Dam e colaboradores (2007) mostraram por microcalorimetria que lectinas de *V. macrocarpa* assim como de *Glycine max* (SBA) se ligam ao antígeno Tn da mucina em toda a extensão da cadeia polipeptídica num modelo conhecido como “*bind and jump*” antes da dissociação (DAM *et al.*, 2007).

2.4 Galectinas

As lectinas de animais podem ser classificadas em tipo-C (dependentes de cálcio), tipo-S, tipo-I, tipo-M, tipo-L, tipo-P, tipo-R e etc. As galectinas (tipo-S) se ligam a epítomos de β -galactosídeos formam a família das galectinas. A classificação em S deve-se ao fato de possuírem cisteínas livres. Além disso, a solubilidade e habilidade de ligação a carboidratos deve-se à manutenção dos grupos sulfidrílicos (tiol) na forma reduzida (BARONDES, CASTRONOVO, *et al.*, 1994); (CUMMINGS e LIU, 2009).

As galectinas são proteínas solúveis, não possuem peptídeo sinal, permanecem confinadas a compartimentos citosólicos e são liberadas para o meio extracelular através de um mecanismo secretório não convencional (Cooper e Barondes, 1990; Sato *et al.*, 1993; Liu e Rabinovich, 2010). Atualmente, existem identificadas 15 galectinas em mamíferos, sendo algumas encontradas em diversos tecidos enquanto outras são extremamente específicas de uma determinada região (Cooper, 2002). As galectinas são subdivididas em três classes com base na similaridade das sequências de AA e na estrutura geral. A Classe I, ou Prototípica, é formada pelas galectinas são homodiméricas e cada monômero possui apenas um domínio de ligação a carboidratos. As Quiméricas, Classe II, contém uma região N-terminal não lectínica ligada a um domínio de reconhecimento de carboidratos,

portanto são monovalentes. A última classe, a *Tandem-repeat*, é formada por lectinas heterodiméricas conectadas por uma cadeia polipeptídica de 5 a 50 resíduos de AA. As galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 15 são da classe das Prototípicas. A galectina-3 é a única representante Quimérica. Enfim, as galectinas 4, 6, 8, 9 e 10 são *Tandem-repeat* (Yang et al., 2008).

A galectina-1 é uma proteína que possui estrutura tridimensional semelhante às lectinas de leguminosas, topologia do tipo *jelly-roll*. Essa lectina é expressa em diversos tecidos, tanto normais quanto patológicos, e participa de diversos processos biológicos, dentre os quais destacamos: controle da adesão celular, sinalização celular, proliferação e ciclos celulares, dentre outros. O gene da galectina-1 em camundongos é o *Igals1* que possui 3451 pares de base e gera um transcrito maduro de 817 pb. Os monômeros de galectina-1 possuem 135 AA, que em solução podem formar homodímeros (YANG et al., 2008).

A galectina-3, único membro da classe Quimérica, possui pequenas sequências de AA, de 12 resíduos, repetidas em tandem cerca de dez vezes, totalizando cerca de 120 resíduos de AA (Yang et al., 2008). Essa lectina possui três domínios estruturais distintos, o domínio N-terminal (citado acima), uma sequência semelhante ao colágeno rica em glicina e o domínio carboxi terminal, onde está localizado o sítio de reconhecimento de carboidratos. Geralmente é encontrada como monômero, mas, em solução, pode oligomerizar através da interação entre os domínios N-terminais. A galectina-3 é encontrada tanto no meio intracelular (citoplasma e núcleo) quanto no meio extracelular, embora o exato mecanismo de secreção não seja conhecido. Existem evidências que o domínio N-terminal esteja envolvido, pois a retirada dessa região direciona a proteína, preferencialmente, para o citoplasma. O gene da galectina em camundongos, o *Igals3*, possui mais de 12 kb. O mRNA primário desta lectina pode originar dois diferentes transcritos alternativos que diferem entre si apenas na 5'UTR, não alterando a sequência codificante que origina uma proteína de 264 resíduos de AA.

CAPÍTULO 3 – OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Os objetivos gerais deste trabalho foi determinar o efeito das lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* e de *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) na expressão de genes de importantes vias do metabolismo de células hipocâmpais e avaliar o potencial destas lectinas sobre a neuroplasticidade e a neuroproteção.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Realizar o tratamento dos animais com as lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* e de *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae);
- b) Estabelecer procedimentos para obtenção de RNA de qualidade para estudos de PCR quantitativo em tempo real;
- c) Obter iniciadores específicos para a amplificação dos genes de interesse;
- d) Determinar a curva de expressão e o *cycle threshold* para os genes selecionados;
- e) Calcular o nível relativo de transcrição dos genes em relação ao controle e utilizando o gene da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase como controle endógeno;
- f) Determinar o potencial dos tratamentos na modulação da neuroplasticidade e neuroproteção.

CAPÍTULO 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material e Métodos

4.1.1 *Tratamentos e coleta de material biológico*

Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais assim como o número de animais utilizados em acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e normas internacionais (*Guide for care and use of laboratory animals* - NIH publication 85-23, revised 1985).

A administração intracerebroventricular (i.c.v.) foi realizada em camundongos (*Mus musculus* L.) levemente anestesiados com éter. Para a injeção, uma agulha 26 G foi conectada a uma cânula de polipropileno acoplada a uma microseringa *Hamilton* de 25 µL e inserida perpendicularmente ao crânio dos animais, não mais que 2 mm do cérebro.

A injeção teve a duração de 30 s, porém a agulha permaneceu no local por mais 30 s para evitar o refluxo das substâncias injetadas. A inserção da agulha, a mão livre, no ventrículo lateral direito ou esquerdo foi delimitado medindo-se 1 mm para a esquerda ou direita do ponto médio da linha desenhada a partir da base anterior do ouvido dos animais.

No presente trabalho, foram realizados 4 tratamentos, a saber: a lectina de semente de *Canavalia brasiliensis* - ConBr, a lectina de *Vatairea macrocarpa* – VML e como controle, a ConBr e VML desnaturadas termicamente, cada um dos tratamentos nos tempos de 1, 6, 12 e 24 h. Foi administrado um volume de 3 µl (cerca de 3 ng de lectina). No total, 96 animais foram mortos por decapitação e o hipocampo foi dissecado para preparo de homogenato.

Depois de dissecados, os cérebros foram examinados macroscopicamente para confirmar que a substância foi administrada exatamente sobre o ventrículo cerebral dos camundongos (KASTER, BUDNI, *et al.*, 2007).

4.2 Construção dos oligonucleotídeos iniciadores para as PCRs em tempo real

No presente trabalho, analisamos as alterações do perfil de expressão de 20 genes relacionados à atividade neuronal, neuroplasticidade, apoptose e transmissão sináptica glutamatérgica. A grande maioria dos *primers* utilizados foi obtida a partir da seqüência de referência existente no GenBank e desenhados utilizando a ferramenta primer-BLAST (Rozen e Skaletsky, 2000). Como alguns mRNAs sofrem processamento por *splicing*, foi dada preferência por *primers* que se anelem na junção exon-exon evitando assim a contaminação com o DNA genômico. A lista dos primers é mostrada na Figura 1. Os iniciadores para os quatro transcritos alternativos de BDNF (I, II, IV e pan-BDNF) foram obtidos do estudo de Cadwell e colaboradores (2008). Os dados foram normalizados com o nível de expressão da hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase - HPRT.

4.3 Extração de RNA

O RNA total foi extraído utilizando TRIzol® (Life Technologies/Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante e os métodos de isolamento de RNA desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987) (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987). Posteriormente o RNA total foi purificado com fenol:clorofórmio (5:1), precipitado com isopropanol e lavado com etanol 75%. O RNA total obtido foi ressuspenso em água tipo I livre de RNase e mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização. A pureza e a concentração do RNA total foram determinadas por espectrofotometria (A_{260} e A_{280}). A integridade do RNA foi mensurada por eletroforese em gel de agarose a 1.2% corado com brometo de etídio.

4.4. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA, foi utilizado 1 μg de RNA total, 0,5 μg do *primer* oligo (dT) (Invitrogen), 2 μL de dNTPs Mix 5 mM e água estéril. Os componentes da reação foram misturados, aquecidos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min e depois resfriados em gelo. Posteriormente, foi adicionado 1 μL da SuperScript® III RT (Invitrogen) (200 U/ μL), 1 μL de DTT 0,1 M, 4 μL de *Fist-Strind Buffer* 5X e o mix foi incubado no termociclador

a 50 °C por 60 min, sendo depois aquecido a 70 °C por 15 min. A eficácia da síntese de cDNA foi determinada por espectrofotometria (A_{260} e A_{280}). A integridade do RNA foi mensurada por eletroforese em gel de agarose a 1.2% corado com brometo de etídio.

4.5 qRT-PCR – PCR em Tempo Real

As análises quantitativas da expressão dos genes previamente selecionados foram realizadas através de PCR em Tempo Real (qRT-PCR). Para tanto, 100 ng do cDNA de cada amostra foram utilizados na reação de qRT-PCR. Além dos ácidos nucléicos, a reação foi composta de iniciadores específicos (300 nm cada) e 10 µl de 2X Power SYBR Green Master Mix (*Applied Biosystems*), com volume final de 20 µL. A reação de amplificação foi realizada através de 40 ciclos térmicos de 95 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 60 °C por 20 s. A desnaturação inicial foi de 95 °C por 10 min.

O monitoramento em tempo real da PCR foi realizado em um termociclador RealPlex 4S (Eppendorf®) através da detecção dos níveis de fluorescência do SYBR Green. As análises dos dados de fluorescência obtidos foram realizadas pelo *Realplex Software*.

Nome	Sigla	Sequencia	Referência	amplicon	Construído na junção exon
TrkB catalítico (funcional)	TrkB	F CATGAAAGGCCAGCTTCGGTCA R GTCGGGACCGCCCTCCGAAG	NM_001025074.1	109	1918/1919 F
Sub-unidade 1 do receptor de NMDA	NR1	F TGGTAGAGCAGAGCCCAGCCCTA R CCCCCTGCTCGTCTTTGGGA	NM_008169.2	110	2977/2978 R
Sub-unidade 2a do receptor de NMDA	NR2A	F TCAGCGCCTCTGTCTGGGTGA R GGCCCATGGGGAGCTTTCCC	NM_008170.2	133	1777/1778 R
Sub-unidade 2b do receptor de NMDA	NR2B	F TGTGAGAGGAAATCTCGGGCTTGG R CCGCTGGATGCCGGGGATAGA	NM_008171.3	82	39/40 F
EAAT-1	Slc1a3	F CTCGTACAGGAATGGCGGCC R TGCCCTTTCCGGGGTGGATGA	NM_148938.3	142	885/886 F
EAAT-2	Slc1a2-II	F CCGTGATGATAGGCACCGTG R CTCCAGCAGCGTCCATTCAA	NM_011393.2	98	não
Célula tipo B de linfoma	BCL2	F CGGAGGCTGGGATGCCTTTGT R AGTGATGCAGGCCCGACCA	NM_009741.3	118	1986/1987 F
Proteína promotora de morte assoc. a BCL2	BAD	F GCCTGGGCCCTAGCCTCACT R GCCCTGCGCCTCCATGATG	NM_007522.2	121	766/767 R
Fator de transcrição c-fos	c-fos	F AGACCAGAGCGCCCATCCT R GGAGATAGCTGCTACTTTGCCCC	NM_010234.2	136	532/533 R
Fator de transcrição c-jun	c-jun	F CAGGAGAGCGCTCAGGCAGACA R CAGGAGAGCGCTCAGGCAGACA	NM_010591.2	121	não
Ciclooxigenase	Cox-2	F TCCAGTATCAGAACCGCATTGCC R AGCAAGTCCGTGTTCAAGGAGGAT	NM_017232.3	149	não
Hemoxigenase	Hmox	F ACAGCACTACGTAAGCGTCTCCA R CATGGCCTCTGCGCAATCTTCTT	NM_012580.2	133	não
Proteína de citoesqueleto associada a atividade	Arc	F: AATGACACCAGGTCTCAAGG R: TGTCTTGAACCCATGTAGG	NM_018790.2		2146(E2)/2147(E3)
Proteína 25 associada ao sinaptosoma	SNAP-25	F CCGAAGACGACGACATGCGC R CGGGTGCTTCCAGGGACTCAT	NM_011428.3	85	285/286 R
Galectina 1	Lgals1	F GCCTCGGACGCCAAGAGCTTTG R GTGTTGGCGTCTCCATGGGCA	NM_008495.2	101	160/161 F
Galectina 3	Lgals3	F CGGGTGGAGCACTAATCAGGAAAA R GTTCCCCATGCACCCGGAT	NM_010705.3	107	93/94 F
Fator neurotrófico derivado do cérebro	BDNF I	F CCTGCATCTGTTGGGGAG R GCCTTGCCGTGGACGTTT	Cardwell et al., 2008		
	BDNF II	F GGGTTGGTATACTGGGTT R GGATGGTCATCACTCTTCTC	Cardwell et al., 2008		
	BDNF IV	F CAGAGCAGCTGCCTTGAT R GCCTTGCCGTGGACG	Cardwell et al., 2008		
	pan BDNF	F CAGGTGAGAAAGTGTATGACC R ATTCACGCTCTCCAGAGTCCC	Cardwell et al., 2008		
Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase	HPRT	F AAGACTTGCTCGAGATGTCATGAA R ATCCAGCAGGTCAAGAA	Cardwell et al., 2008		

Figura 1 - Lista dos primers organizados por categorias. São mostradas as sequências dos primers F (avante) e R (reverso); número de acesso no NCBI; tamanho do *amplicon* em número de pares de base e posicionamento na junção exon-exon (E/E), quando houver.

4.6 Análises da Expressão relativa e análises estatísticas

As análises da expressão dos genes foram realizadas através do método de Livak e colaboradores (2001) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Para a realização das análises quantitativas, os valores de *Cycle threshold* (Ct) obtidos para cada gene de cada animal foram normalizados com o nível de expressão de HPRT respectivo, através do cálculo do ΔCt [$\Delta Ct = Ct$ (gene alvo) – Ct (controle endógeno)]. Para efeito de comparação entre os grupos, foi utilizada a média de ΔCt (m ΔCt) dos quatro animais de cada parcela experimental. Os valores de m ΔCt obtidos para cada gene

de cada tratamento foram comparados estatisticamente pelo teste de *t-student*, com $p < 0,05$. O nível de expressão relativa foi obtido pelo cálculo do $\Delta\Delta Ct = m\Delta Ct_x$ (tratamento com lectina nativa no tempo X) – $m\Delta Ct_x$ (tratamento com lectina desnaturada no tempo X). A quantificação relativa foi obtida pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A especificidade das reações foi confirmada pela *melting curve*.

CAPÍTULO 5 – RESULTADOS

Os dados quantitativos da extração de RNA total apresentaram grande variação. As amostras oriundas dos animais tratados com ConBr após 6 horas foram as que geraram maior rendimento, com concentrações que variaram de 1456 ng/ul a 2372 ng/ul (Tabela 1). Os animais tratados com ConBr no grupo de 1 hora foram os que apresentaram menores rendimentos.

Dentre os animais que foram tratados com VML ou com VML desnaturada, os dois grupos de 24 horas foram os que apresentaram, em média, maiores concentrações de RNA total (Tabela 2). Vale salientar que essas diferenças de concentração não afetam as análises, pois as análises foram normalizadas com o gene HPRT já utilizado por Cadwell e colaboradores (2008).

A presença de contaminantes, como proteínas e álcool, foram determinadas pela relação entre as absorbâncias a 260 nm e a 280 nm. Os valores ideais dessas absorbâncias situam-se entre 1,5 e 2,0. Valores abaixo de 1,5 indicam grande presença de proteínas e abaixo desse valor contaminação por álcool. Os resultados obtidos demonstram que todos os RNAs totais extraídos estão dentro dos padrões de qualidade necessária para a execução do presente estudo. Apenas uma amostra, o Animal 1 de 12 horas de tratamento com VML desnaturada apresentou a relação acima de 2,0. Contudo, a contaminação com álcool não afetou a transcrição reversa e o cDNA dessa amostra foi gerado com sucesso (Tabela 2). A eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta foi utilizada para verificar a integridade dos RNAs extraídos. Como podemos observar, as preparações de RNA extraídos apresentaram excelente qualidade, com clara definição das bandas representativas dos RNAs ribossômicos. Algumas amostras apresentaram pequena contaminação com DNA, contudo a influência nos resultados foi mínima, pois a maioria dos primers foi obtido para a junção éxon-éxon.

O cDNA obtido a partir da transcrição reversa da população de mRNA apresentou boa qualidade. As concentrações ficaram, em geral, acima de 1000 ng/ul e a relação entre A_{260}/A_{280} manteve-se dentro do limite de 1,5 a 2,0 (Tabela 3 e Tabela 4). A eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta demonstrou a presença do *smear* característico da exitosa síntese de cDNA de uma população de mRNA. Contudo, pouco se pode inferir acerca da

qualidade, tendo em vista que o arrastado visualizado é característico do conjunto de cDNAs presentes na preparação (Figura 5, Figura 6, Figura 7).

Tabela 1 - Concentração em ng/μl de RNA total extraído de hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com ConBr e ConBr desnaturada. A relação entre as absorvâncias de 260 e 280 nm ($A_{260/280}$) foi utilizada como um dos parâmetros de mensuração de pureza da amostra

Tratamentos	Amostras	Concentração ng/μL	A₂₆₀	A_{260/280}
1 hora - ConBr	Animal 1	796	0,398	1,58
	Animal 2	586	0,293	1,70
	Animal 3	702	0,351	1,67
	Animal 4	466	0,233	1,71
1 hora – ConBr desnaturada	Animal 1	646	0,323	1,69
	Animal 2	638	0,319	1,69
	Animal 3	688	0,344	1,61
	Animal 4	798	0,399	1,50
6 horas - ConBr	Animal 1	2372	Nd	Nd
	Animal 2	2173	Nd	Nd
	Animal 3	1456	Nd	Nd
	Animal 4	1677	Nd	Nd
6 horas – ConBr desnaturada	Animal 1	1079	Nd	Nd
	Animal 2	1053	Nd	Nd
	Animal 3	838	Nd	Nd
	Animal 4	1213	Nd	Nd
12 horas - ConBr	Animal 1	750	Nd	Nd
	Animal 2	1386	Nd	Nd
	Animal 3	820	Nd	Nd
	Animal 4	631	Nd	Nd
12 hora – ConBr desnaturada	Animal 1	1152	Nd	Nd
	Animal 2	892	Nd	Nd
	Animal 3	675	Nd	Nd
	Animal 4	1074	Nd	Nd
24 horas - ConBr	Animal 1	1038	0,519	1,56
	Animal 2	792	0,396	1,62
	Animal 3	968	0,484	1,56
	Animal 4	Excluído		
24 horas – ConBr desnaturada	Animal 1	922	0,461	1,57
	Animal 2	984	0,492	1,53
	Animal 3	925	0,463	1,52
	Animal 4	955	0,475	1,60

Nd – Dado não disponível

Tabela 2 - Concentração em ng/ μ L de RNA total extraído de hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com VML e VML desnaturada. A relação entre as absorvâncias de 260 e 280 nm ($A_{260/280}$) foi utilizada como um dos parâmetros de mensuração de pureza da amostra

Tratamentos	Amostras	Concentração ng/μL	A₂₆₀	A_{260/280}
1 hora - VML	Animal 1	656	0,328	1,657
	Animal 2	616	0,308	1,525
	Animal 3	472	0,236	1,65
	Animal 4	688	0,344	1,729
1 hora – VML desnaturada	Animal 1	742	0,317	1,75
	Animal 2	654	0,327	1,749
	Animal 3	658	0,329	1,723
	Animal 4	598	0,299	1,634
6 horas - VML	Animal 1	704	0,352	1,935
	Animal 2	778	0,389	1,947
	Animal 3	980	0,49	1,809
	Animal 4	578	0,289	1,914
6 horas – VML desnaturada	Animal 1	1.080	0,54	1,935
	Animal 2	822	0,411	1,575
	Animal 3	884	0,442	1,819
	Animal 4	984	0,492	1,802
12 horas - VML	Animal 1	706	0,353	1,756
	Animal 2	690	0,345	1,716
	Animal 3	718	0,359	1,603
	Animal 4	726	0,363	1,797
12 horas – VML desnaturada	Animal 1	812	0,406	2,082
	Animal 2	668	0,334	1,856
	Animal 3	778	0,389	1,965
	Animal 4			
24 horas - VML	Animal 1	1124	0,562	1,668
	Animal 2	846	0,423	1,652
	Animal 3	1326	0,663	1,549
	Animal 4	1196	0,598	1,522
24 horas – VML desnaturada	Animal 1	1206	0,603	1,538
	Animal 2	1170	0,585	1,504
	Animal 3	1226	0,613	1,56
	Animal 4	968	0,484	1,592

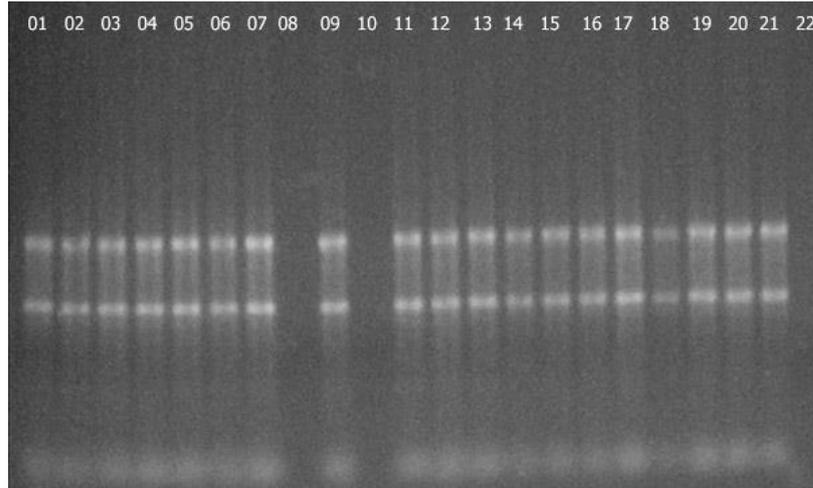


Figura 2 - Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de RNA total de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 1-4: RNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após 24 horas; Raias 5-8: RNA total dos animais tratados com ConBr nativa após 24 horas; Raias 9-12: RNA total dos animais tratados com salina após 24 horas; Raias 13-16: RNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após 6 horas; Raias 17-20: RNA total dos animais tratados com ConBr nativa após 6 horas; e Raias 21 e 22: RNA total dos animais tratados com salina após 24 horas.

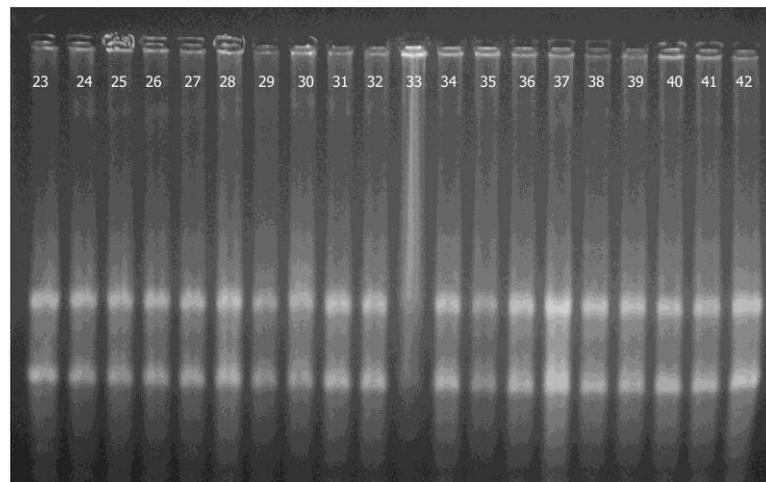


Figura 3 - Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de RNA total de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 23-26: RNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após 12 horas; Raias 27-30: RNA total dos animais tratados com ConBr nativa após 12 horas; Raias 31-34: RNA total dos animais tratados com salina após 12 horas; Raias 35-38: RNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após uma hora; e Raias 39-42: RNA total dos animais tratados com ConBr nativa após uma hora.

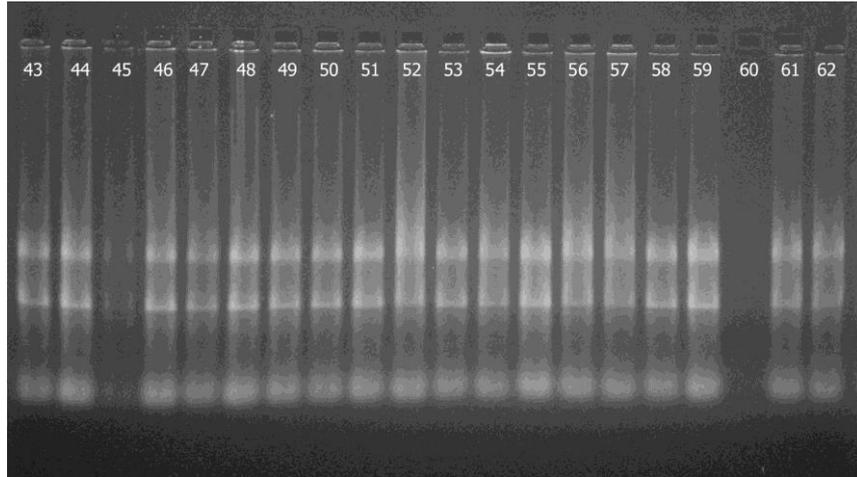


Figura 4 - Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de RNA total de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 43-46: RNA total dos animais tratados com VML desnaturada após 1 hora; Raias 47-50: RNA total dos animais tratados com VML nativa após 1 hora; Raias 51-54: RNA total dos animais tratados com VML desnaturada após 6 horas; Raias 55-58: RNA total dos animais tratados com VML nativa após 6 horas; Raias 59-62: RNA total dos animais tratados com VML desnaturada após 12 horas.

Tabela 3 - Concentração em ng/ μ l de cDNA produzido através de transcrição reversa e utilizando iniciadores Oligo-dT e RNA total de hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com ConBr e ConBr desnaturada. A relação entre as absorvâncias de 260 e 280 nm ($A_{260/280}$) foi utilizada como um dos parâmetros de mensuração de pureza da amostra

Tratamentos	Amostras	Concentração ng/μL	A₂₆₀	A_{260/280}
1 hora - ConBr	Animal 1	1100	0,440	1,705
	Animal 2	1433	0,573	1,769
	Animal 3	963	0,385	1,791
	Animal 4	2090	0,836	1,738
1 hora – ConBr desnaturada	Animal 1	1608	0,643	1,752
	Animal 2	1138	0,455	1,548
	Animal 3	1315	0,526	1,777
	Animal 4	1048	0,419	1,768
6 horas - ConBr	Animal 1	1248	0,499	1,574
	Animal 2	1053	0,421	1,595
	Animal 3	1038	0,415	1,572
	Animal 4	1088	0,435	1,582
6 horas – ConBr desnaturada	Animal 1	1098	0,439	1,608
	Animal 2	1018	0,407	1,519
	Animal 3	1045	0,418	1,566
	Animal 4	1058	0,423	1,602
12 horas - ConBr	Animal 1	1613	0,645	1,521
	Animal 2	1558	0,623	1,573
	Animal 3	1738	0,695	1,517
	Animal 4	1730	0,692	1,518
12 hora – ConBr desnaturada	Animal 1	1658	0,663	1,598
	Animal 2	1598	0,639	1,614
	Animal 3	1605	0,642	1,597
	Animal 4	1638	0,655	1,479
24 horas - ConBr	Animal 1	1325	0,53	1,72
	Animal 2	1275	0,51	1,72
	Animal 3	1133	0,45	1,70
	Animal 4			
24 horas – ConBr desnaturada	Animal 1	1285	0,51	1,72
	Animal 2	1203	0,48	1,71
	Animal 3	1100	0,440	1,72
	Animal 4	1275	0,51	1,74

Tabela 4 - Concentração em ng/ μ l de cDNA produzido através de transcrição reversa e utilizando iniciadores Oligo-dT e RNA total de hipocampo de camundongos submetidos ao tratamento com VML e VML desnaturada. A relação entre as absorvâncias de 260 e 280 nm ($A_{260/280}$) foi utilizada como um dos parâmetros de mensuração de pureza da amostra

Tratamentos	Amostras	Concentração ng/μL	A₂₆₀	A_{260/280}
1 hora - VML	Animal 1	1493	0,597	1,772
	Animal 2	1633	0,653	1,829
	Animal 3	1470	0,588	1,771
	Animal 4	1688	0,675	1,767
1 hora – VML desnaturada	Animal 1	1680	0,672	1,792
	Animal 2	1588	0,635	1,794
	Animal 3	1673	0,665	1,792
	Animal 4	1540	0,616	1,801
6 horas - VML	Animal 1	1938	0,775	1,769
	Animal 2	1840	0,736	1,769
	Animal 3	1900	0,760	1,78
	Animal 4	1320	0,528	1,737
6 horas – VML desnaturada	Animal 1	1888	0,755	1,764
	Animal 2	1640	0,656	1,745
	Animal 3	1843	0,737	1,763
	Animal 4	1953	0,781	1,759
12 horas - VML	Animal 1	1368	0,547	1,653
	Animal 2	1648	0,659	1,725
	Animal 3	1545	0,618	1,741
	Animal 4	1505	0,602	1,705
12 hora – VML desnaturada	Animal 1	1783	0,713	1,752
	Animal 2	1460	0,584	1,749
	Animal 3	1688	0,675	1,744
	Animal 4			
24 horas - VML	Animal 1	1473	0,589	1,702
	Animal 2	1153	0,461	1,78
	Animal 3	1340	0,536	1,686
	Animal 4	1460	0,584	1,738
12 horas – VML desnaturada	Animal 1	1170	0,468	1,759
	Animal 2	1793	0,71	1,753
	Animal 3	1588	0,635	1,735
	Animal 4	1220	0,488	1,762

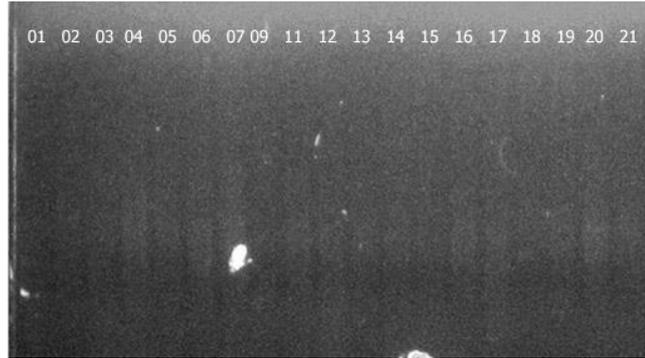


Figura 5 - Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de cDNA total de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 1-4: cDNA dos animais tratados com ConBr desnaturada após 24 horas; Raias 5-8: cDNA dos animais tratados com ConBr nativa após 24 horas; Raias 9-12: cDNA dos animais tratados com salina após 24 horas; Raias 13-16: cDNA dos animais tratados com ConBr desnaturada após 6 horas; Raias 17-20: cDNA dos animais tratados com ConBr nativa após 6 horas; e Raia 21: cDNA do animal tratado com salina após 24 horas.

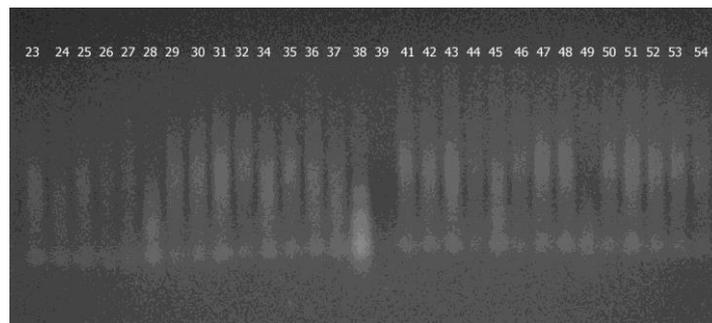


Figura 6 - Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de cDNA de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 23-26: cDNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após 12 horas; Raias 27-30: cDNA total dos animais tratados com ConBr nativa após 12 horas; Raias 31-34: cDNA total dos animais tratados com salina após 12 horas; Raias 35-38: cDNA total dos animais tratados com ConBr desnaturada após uma hora; e Raias 39-42: cDNA total dos animais tratados com ConBr nativa após uma hora; 43-46: cDNA dos animais tratados com VML desnaturada após 1 hora; Raias 47-50: cDNA dos animais tratados com VML nativa após 1 hora; Raias 51-54: cDNA dos animais tratados com VML desnaturada após 6 horas

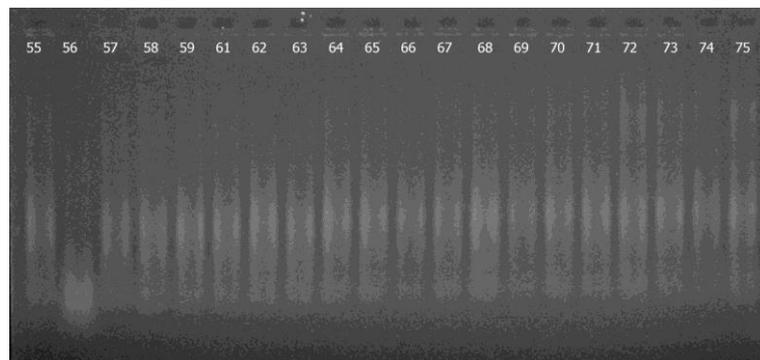


Figura 7 - Foto de gel eletroforese de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1% de RNA total de hipocampo de camundongos e visualizado sob luz ultravioleta. Raias 55-58: cDNA total dos animais tratados com VML nativa após 6 horas; Raias

59-62: cDNA dos animais tratados com VML desnaturada após 12 horas; Raias 63-66: cDNA total dos animais tratados com VML nativa após 12 horas; Raias 67-70: cDNA dos animais tratados com VML desnaturada após 24 horas, e Raias 71-74: cDNA dos animais tratados com VML nativa após 24 horas. Raia 75 mesma amostra da Raia 39 (**Figura 6**), repetição.

As análises das alterações quantitativas na transcrição dos genes foram realizadas através da comparação do nível de expressão de um determinado gene de uma amostra tratada com a lectina nativa *versus* o controle do tratamento, a mesma lectina desnaturada termicamente. Para tanto, fizemos a normalização dos dados de todos os Cts de todos os genes com os valores obtidos de HPRT, sendo o ΔCt o produto dessa normalização. Desta forma, ΔCt é o valor base para as comparações e as análises estatísticas dos dados. Se o ΔCt apresentar o mesmo valor para o grupo tratado com a lectina nativa e para o grupo tratado com a lectina desnaturada, o nível de expressão não foi alterado. Caso os delta-Cts possuam valores distintos, temos uma alteração na expressão do gene, que pode ser redução ou aumento. O valor relativo de expressão, a mais ou menos, é calculado através do modelo matemático de Livak e colaboradores. Desta forma, no presente trabalho apresentamos dois gráficos para cada uma das lectinas testadas, sempre comparando a lectina nativa com a desnaturada.

Os gráficos que apresentam valores negativos significam, apenas, que o nível de transcrição foi maior no HPRT que no gene alvo, mas não tendo nenhuma implicação mais relevante. Inicialmente serão apresentados os dados referentes aos tratamentos com ConBr e ConBr desnaturada. Os valores de ΔCt de BDNF I foram estatisticamente diferentes nos tempos de 1 hora e 6 horas. Nestes tempos, o nível de expressão relativa foi reduzido à metade no tempo de uma hora e apresentou duplicação no tempo de 12 horas (Figura 9). Nos tempos de 6 e 12 horas, os valores de expressão relativa foram de 0,86 e 0,92, mas não refletindo em diferenças estatísticas nos dados de delta-Ct de nativa x desnaturada.

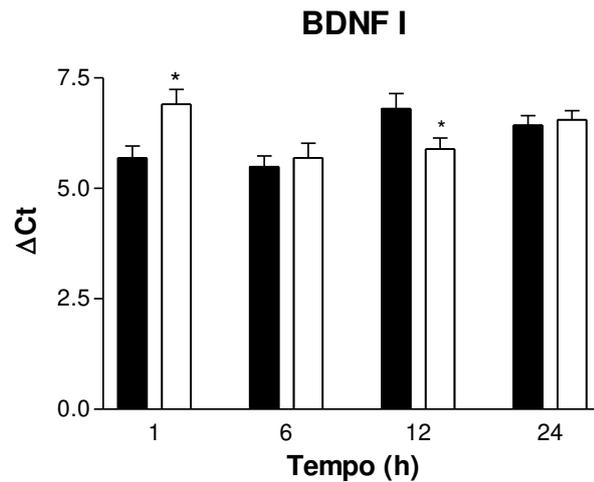


Figura 8 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon I (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF I, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturation (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de BDNF I dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 e 12 horas

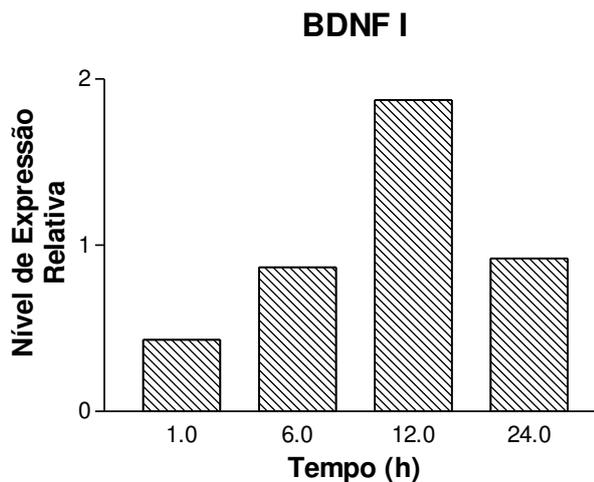


Figura 9 - Nível de expressão relativa de BDNF I em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturation. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

Os dados da expressão de éxon II de BDNF apresentam uma peculiaridade. Em termos absolutos, houve uma redução de 60% do nível de expressão de BDNFII no tempo de uma hora (Figura 11). Entretanto, isso pode ser explicado pelo elevado desvio padrão observado nesse grupo (Figura 10). Neste transcrito alternativo de BDNF foram verificadas diferenças estatísticas do nível de expressão nos tempos de 6 horas (redução) e 12 horas (aumento). Vale salientar que

este tipo de BDNF possui 3 subtipos, A, B e C, podendo estar ligado à grande variação encontrada no tempo de 1 hora.

O transcrito alternativo IV de BDNF também demonstrou nível heterogêneo de resposta após uma hora de tratamento, tanto que mesmo uma redução de 30% não resultou em diferença significativa (Figura 12). Nos outros tempos, houve manutenção do nível de expressão nos animais de 6 horas, aumento em 12 horas e redução após 24 horas de tratamento (Figura 13). O nível global de BDNF, pan-BDNF, apresentou redução nos tempos de 1 e 24 horas e aumento significativo após 12 horas, todos com significância estatística (Figura 14 e Figura 15). O receptor funcional de BDNF, TrkB, foi alterado apenas após 12 horas de tratamento com ConBr, permanecendo no mesmo nível de expressão nos outros tempos. Vale ressaltar que um aumento de quase 70% de expressão de TrkB foi verificado no tempo de uma hora, demonstrando que neste tempo os animais também apresentaram variação na resposta ao tratamento (Figura 17).

O gene Arc teve sua expressão reduzida em 6 horas e elevada após 24 horas do tratamento. O nível de expressão foi reduzido em 70% em 12 horas, mas sem apresentar diferença estatística (Figura 18 e Figura 19). As análises no gene SNAP-25 demonstraram redução na expressão nos tempos de 1 e 6 horas, 48% e 27% respectivamente. Após 12 horas de tratamento, foi identificado um aumento de 130% (Figura 20 e Figura 21). Os genes c-fos e c-jun apresentaram os mesmos padrões de variação de expressão nos tempos de 6, 12 e 24 horas. No tempo de uma hora, observou-se aumento de 300% em c-jun que não foi acompanhado por c-fos (Figura 22, Figura 23 e Figura 25).

Os transportadores de aminoácidos excitatórios apresentaram efeitos opostos em quase todos os tempos. Eaat1 aumentou a expressão nos tempos de 1 e 24 horas, Eaat2 já permaneceu inalterado. No tempo de 12 horas, Eaat2 dobrou a expressão enquanto que Eaat1 neste tempo foi reduzido a 5% do total expresso no controle (Figura 26, Figura 27, Figura 28 e Figura 29).

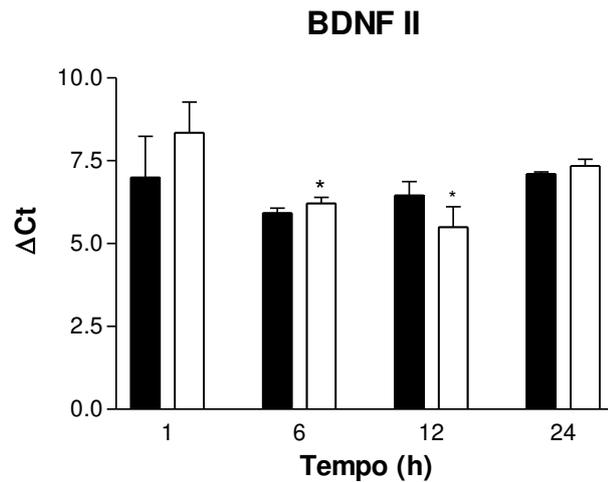


Figura 10 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon II (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF II, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de BDNF II dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 6 e 12 horas

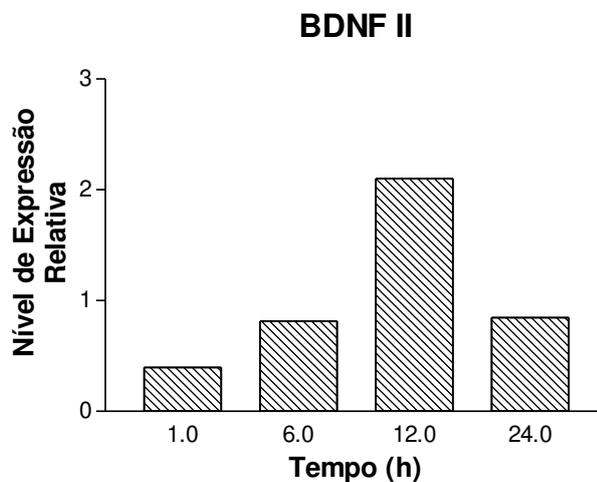


Figura 11 - Nível de expressão relativa de BDNF II em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

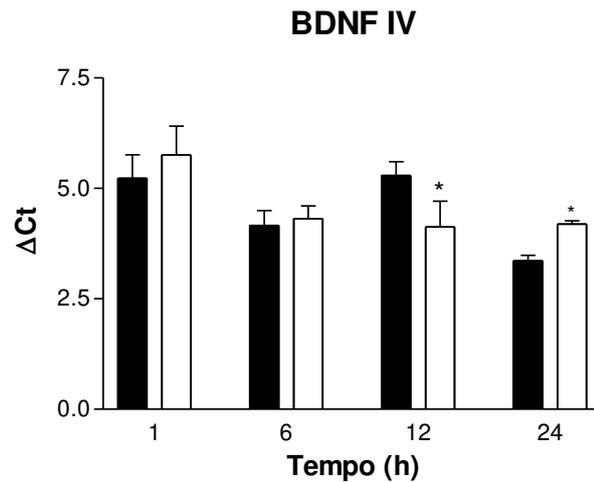


Figura 12 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon IV (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF IV, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de BDNF IV dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 12 e 24 horas

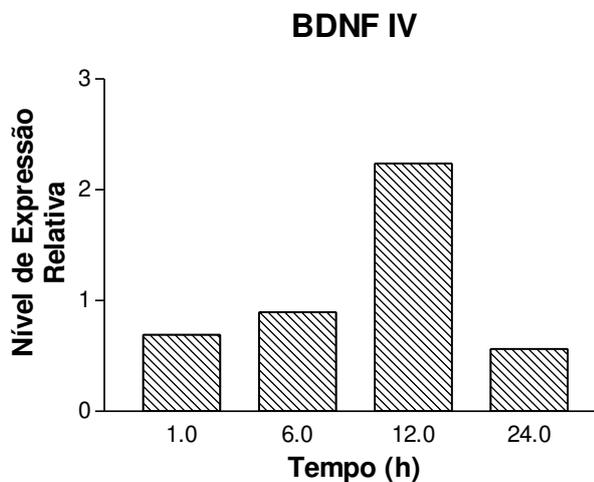


Figura 13 - Nível de expressão relativa de BDNF IV em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

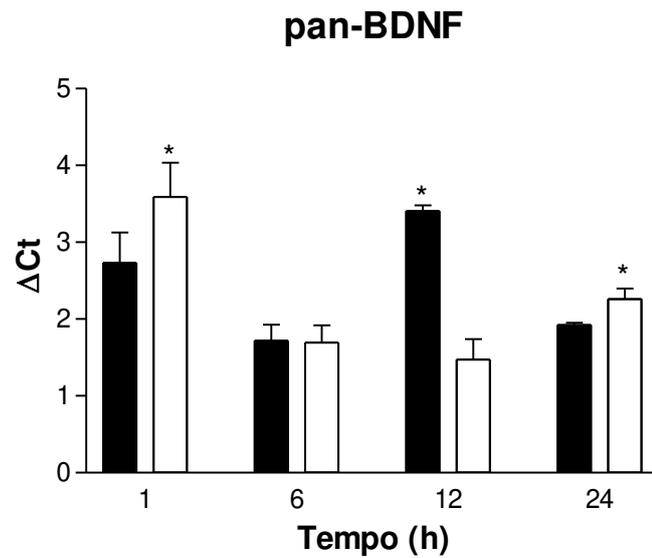


Figura 14 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão da pan-BDNF (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de pan-BDNF dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença entre os tratamentos nos tempos de 1, 12 e 24 horas.

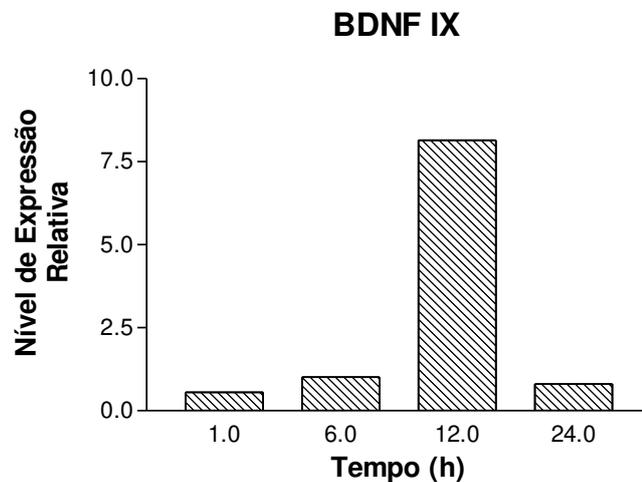


Figura 15 - Nível de expressão relativa de pan-BDNF em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

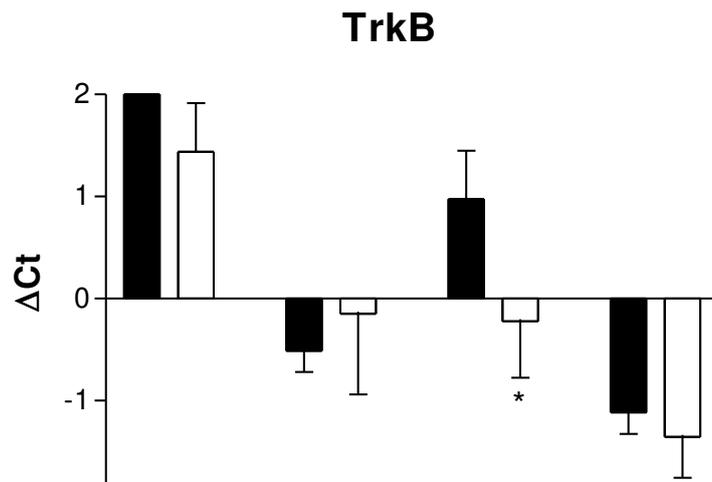


Figura 16 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de TrkB, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de TrkB dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 12 e 24 horas.

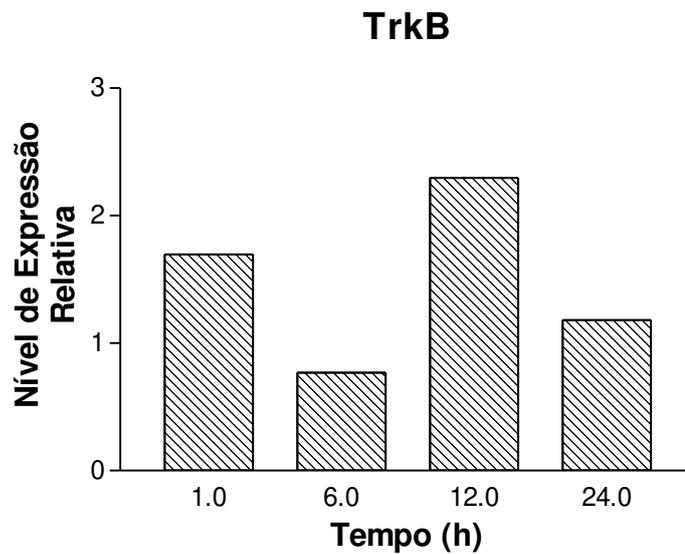


Figura 17 - Nível de expressão relativa de TrkB em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

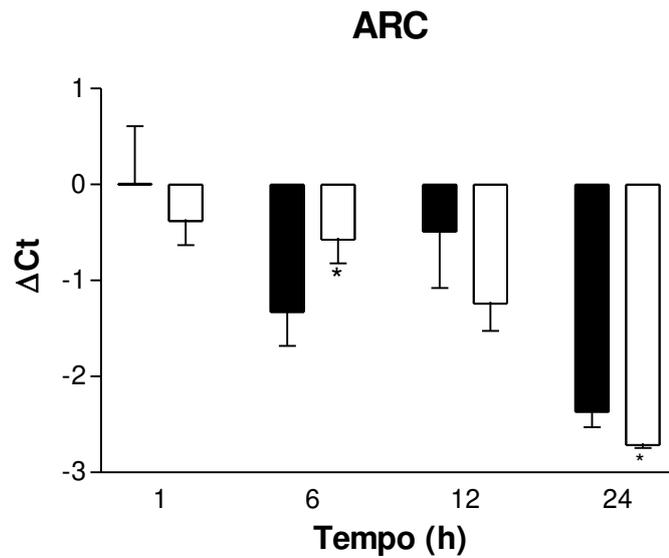


Figura 18 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de Arc, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de Arc dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 6 e 24 horas.

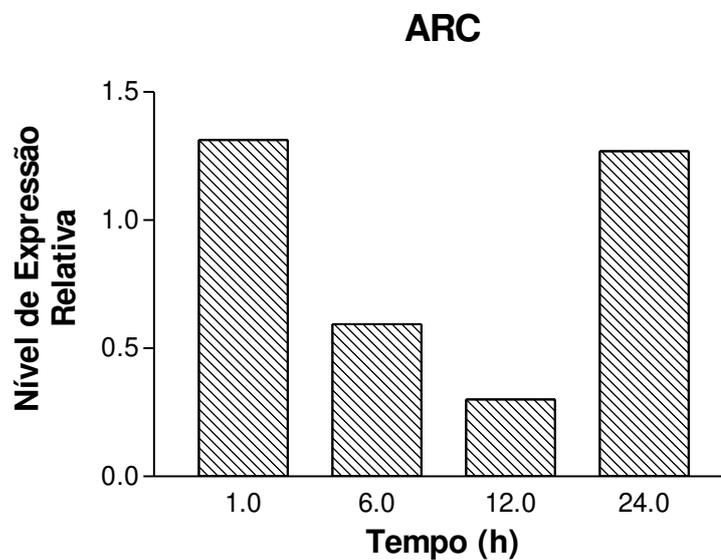


Figura 19 - Nível de expressão relativa de Arc em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

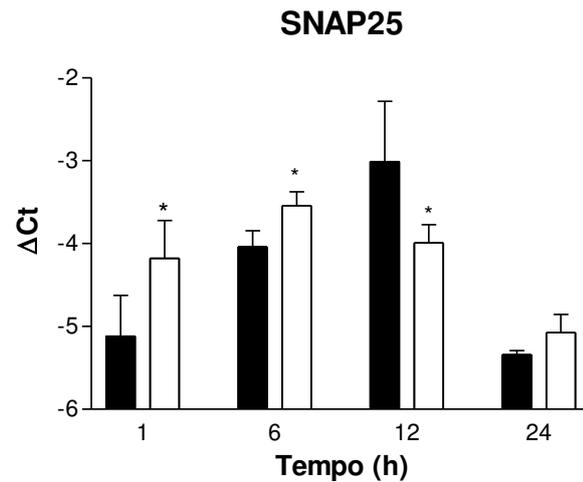


Figura 20 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de SNAP-25, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de SNAP-25 dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 6 e 12 horas.

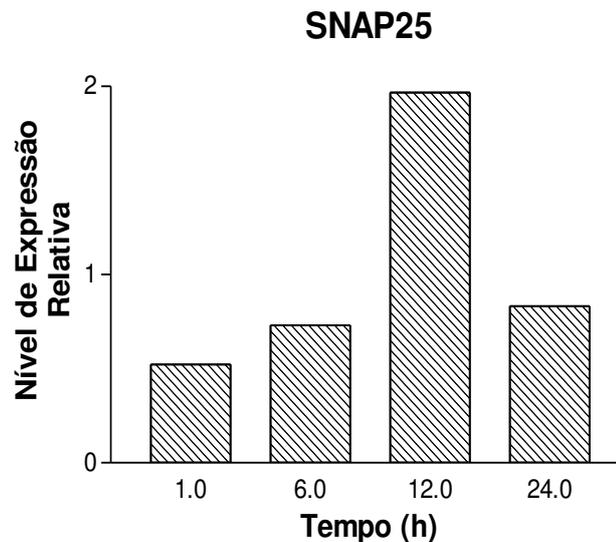


Figura 21 - Nível de expressão relativa de SNAP25 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

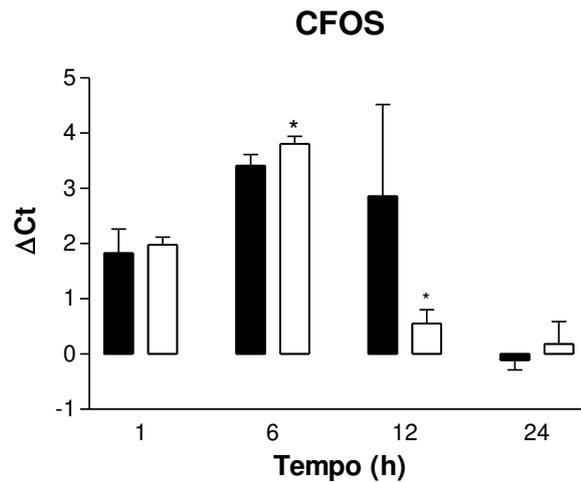


Figura 22 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de c-fos, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturalada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de c-fos dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 6 e 12 horas.

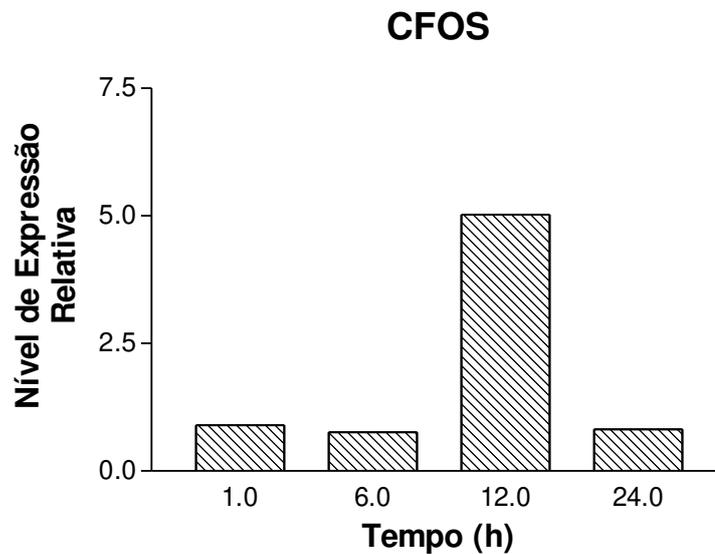


Figura 23 - Nível de expressão relativa de c-fos em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturalada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

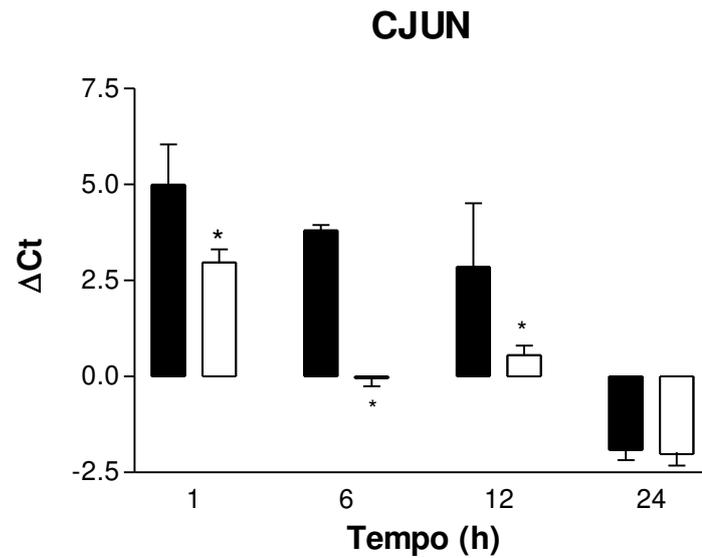


Figura 24 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de c-jun, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de c-jun dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 6 e 12 horas.

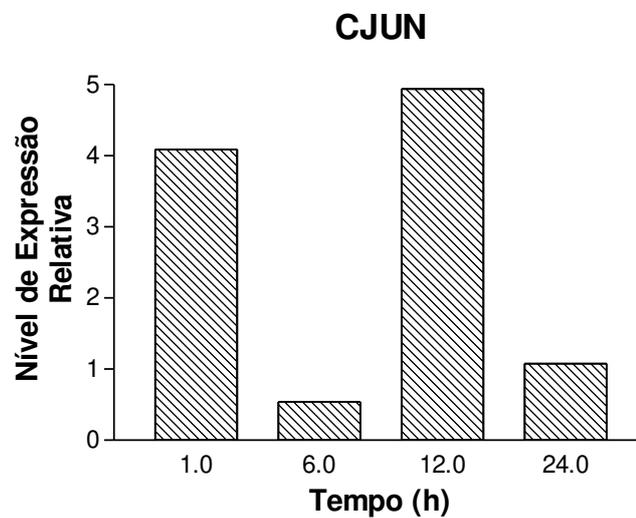


Figura 25 - Nível de expressão relativa de c-jun em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

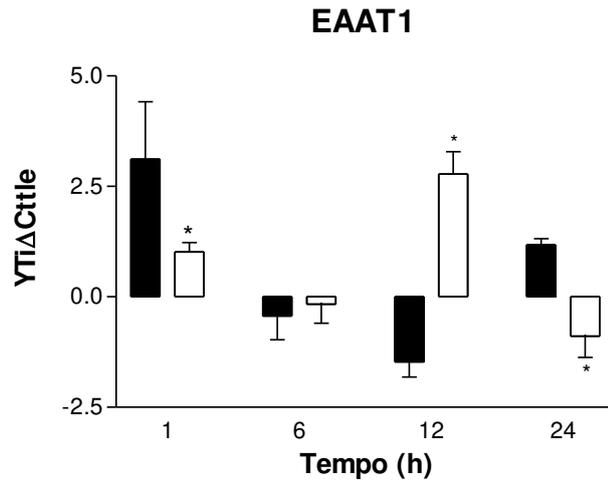


Figura 26 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de EAAT-1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de EAAT-1 dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 12 e 24 horas.

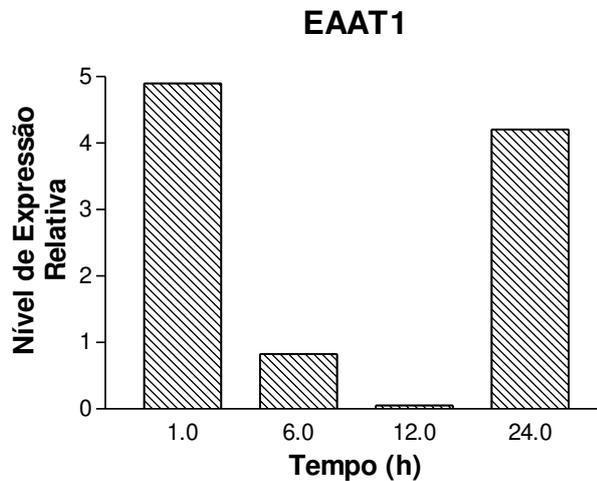


Figura 27 - Nível de expressão relativa de EAAT1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

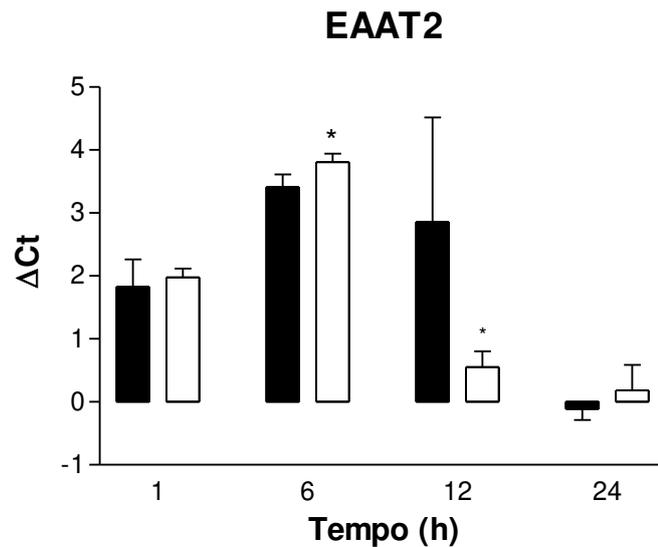


Figura 28 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de EAAT-2, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturalada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de EAAT-2 dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 6 e 12 horas.

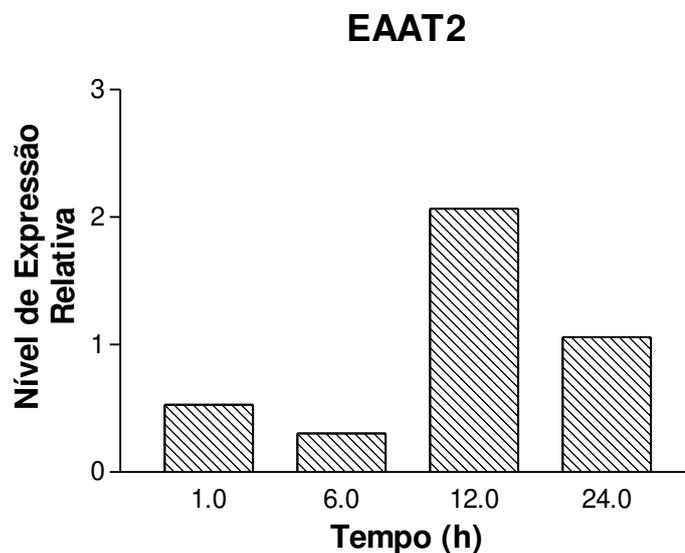


Figura 29 - Nível de expressão relativa de EAAT2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturalada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

Os resultados para as galectinas também foram contrastantes. A galectina-1 foi reduzida pela metade em termos de transcrição nos tempos de 1 e 6 horas. Nestes mesmos tempos, a galectina-3 manteve o nível de expressão constante e sem diferenças entre os tratamentos com a lectina nativa e o controle. No grupo de animais

que foram submetidos ao tratamento durante 12 horas, galectina-1 não apresentou alteração. Contudo, a galectina-3 foi intensamente expressa no grupo de animais tratados com ConBr nativa e sacrificados após 12 horas do procedimento de injeção (Figura 30, Figura 31, Figura 32 e Figura 33).

A subunidade NR1 do receptor de NMDA apresentou redução de 45% após 6 horas de tratamento com ConBr, nos outros tempos o nível de expressão foi igual entre as amostras do tratamento e controle (Figura 34 e Figura 35). NR2A manteve o mesmo nível de expressão nos tempos de 1, 6 e 24 horas, sendo fortemente reduzida em 90% no tempo de 24 horas (Figura 36 e Figura 37). Dentre as subunidades de NDMA avaliadas, o único aumento de expressão foi NR2B no tempo de 12 horas que foi 2,38 vezes maior no tratamento que no controle (Figura 38 e Figura 39).

A expressão dos genes pró e anti-inflamatórios não apresentou alteração nos níveis de expressão nos tempos de 1, 6 e 12 horas. No grupo de animais submetidos ao tratamento com ConBr não detectamos a expressão tanto de Cox-2 quanto de HO (Figura 44, Figura 45, Figura 46 e Figura 47). A expressão do gene pró-apoptótico BAD foi reduzida após 6 horas, não apresentando alterações significativas nos outros tempos (Figura 40 e Figura 41). BCL2 foi o único gene que teve o nível de expressão alterado em todos os tempos analisados e após os tratamentos com a lectina nativa e desnaturada. O nível de expressão foi elevado em 12 horas e reduzido nos demais (Figura 43 e Figura 42).

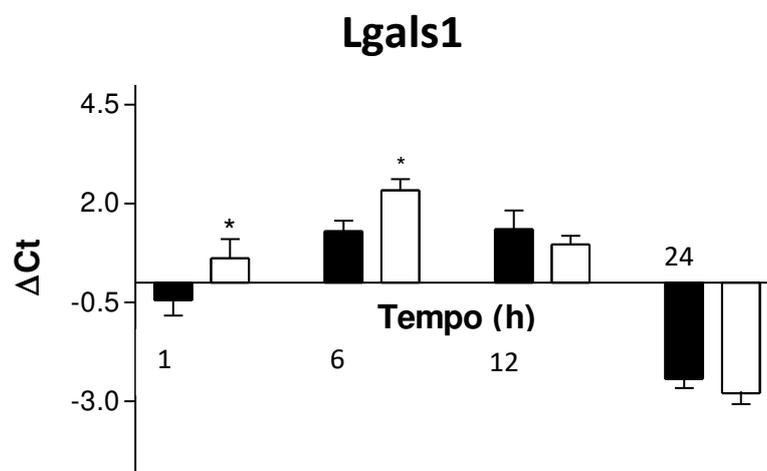


Figura 30 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de Lgals1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de Lgals1 dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os

dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, e 6 horas.

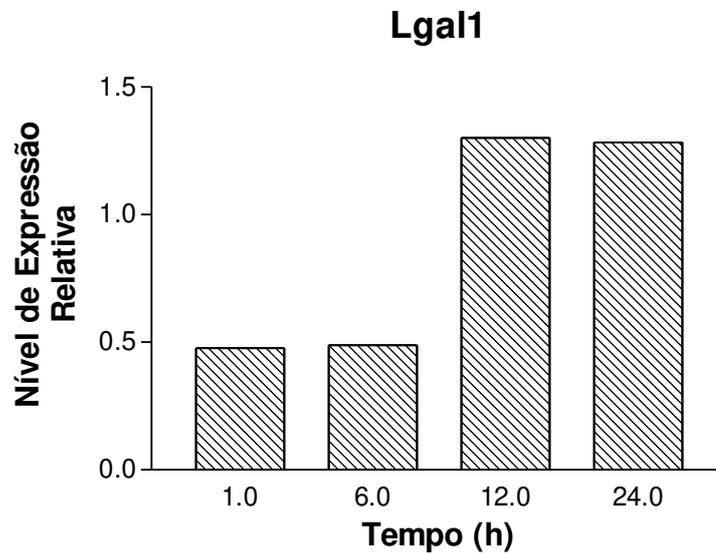


Figura 31 - Nível de expressão relativa de Lgal1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

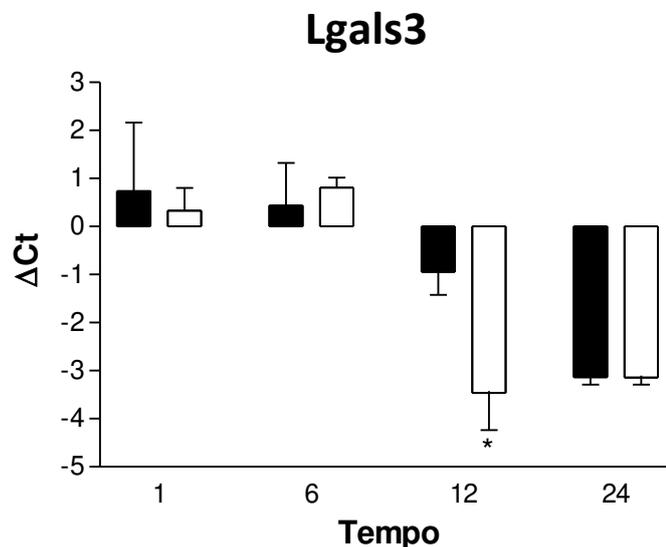


Figura 32 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de Lgals3, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de Lgals3 dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempo de 12 horas.

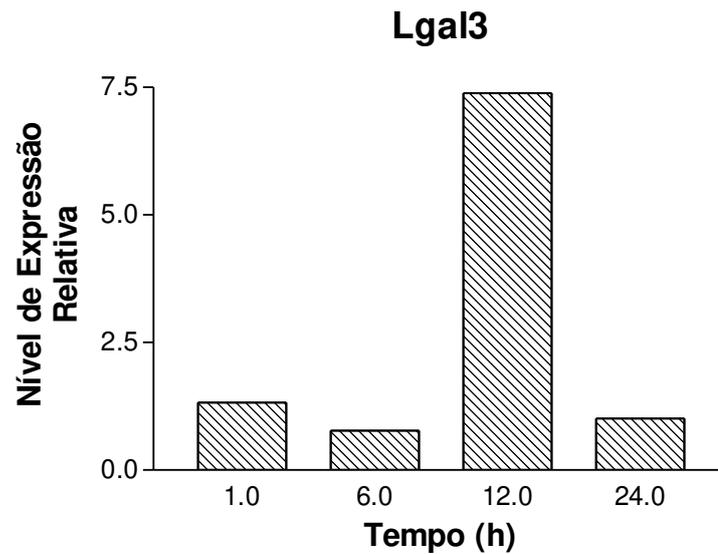


Figura 33 - Nível de expressão relativa de Lgal3 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

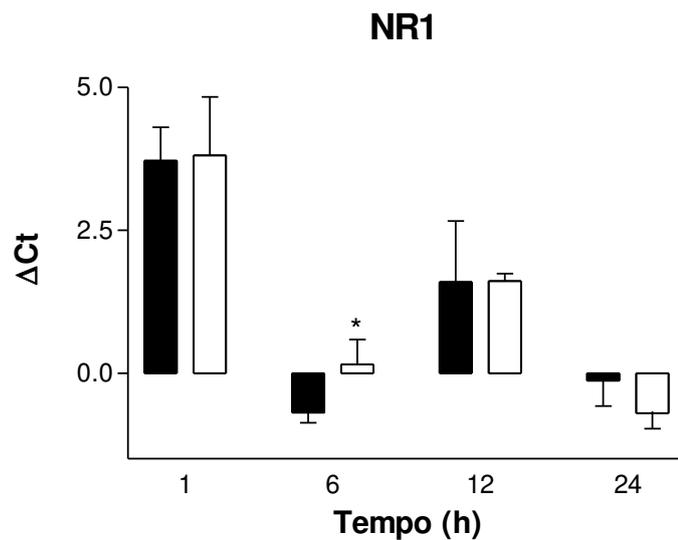


Figura 34 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de NR1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de NR1 dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 6 horas.

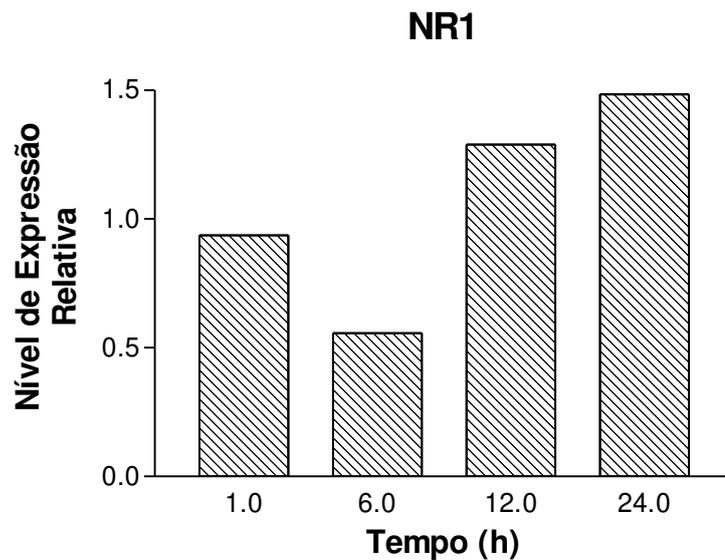


Figura 35 - Nível de expressão relativa de NR1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

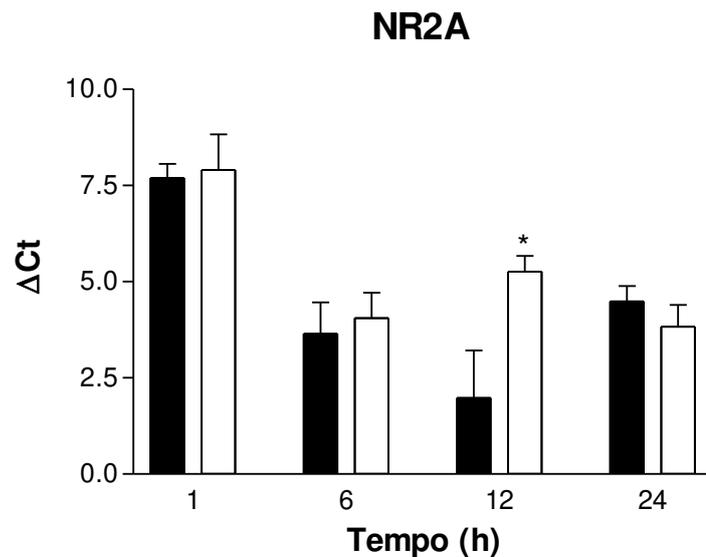


Figura 36 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de NR2A, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de NR2A dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 12 horas.

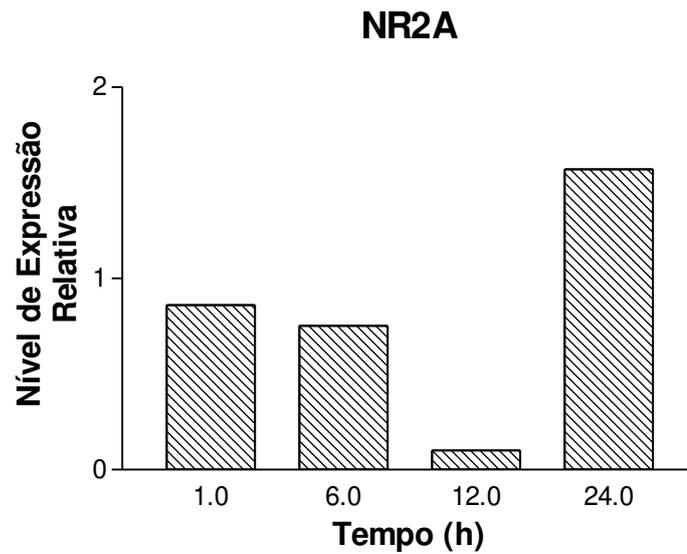


Figura 37 - Nível de expressão relativa de NR2A em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

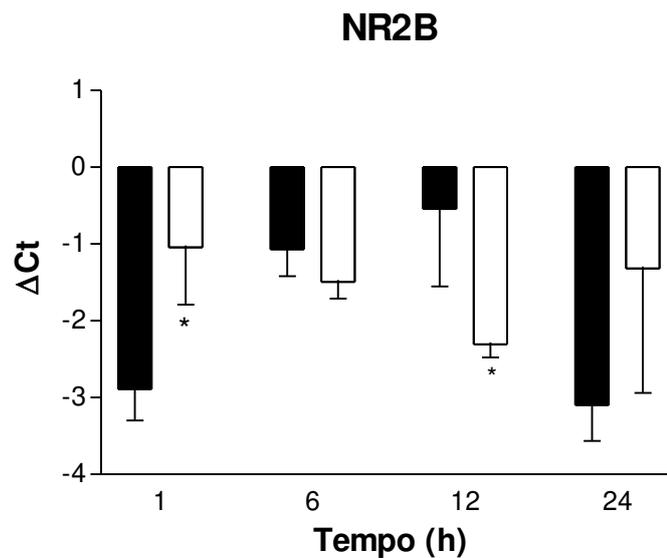


Figura 38 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de NR2B, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de NR2B dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 1 e 12 horas.

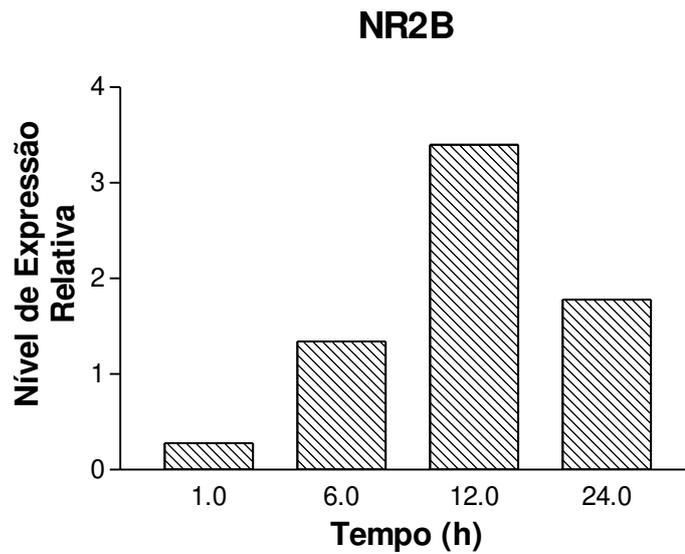


Figura 39 - Nível de expressão relativa de NR2B em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

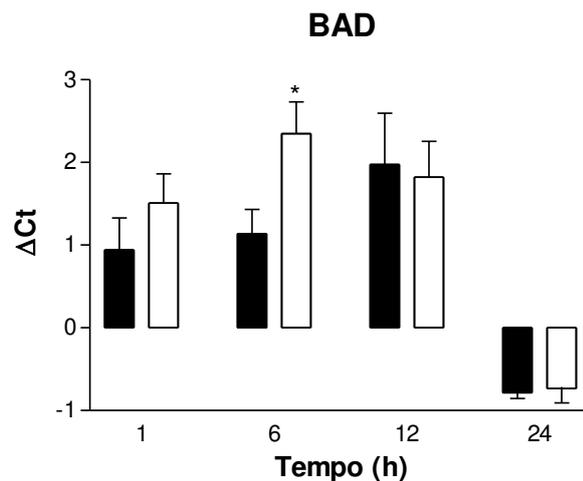


Figura 40 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de BAD, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de BAD dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 6 horas.

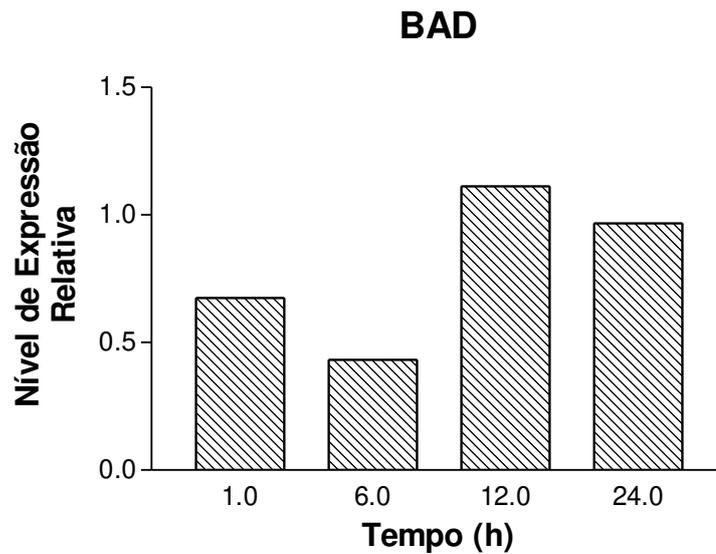


Figura 41 - Nível de expressão relativa de BAD em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

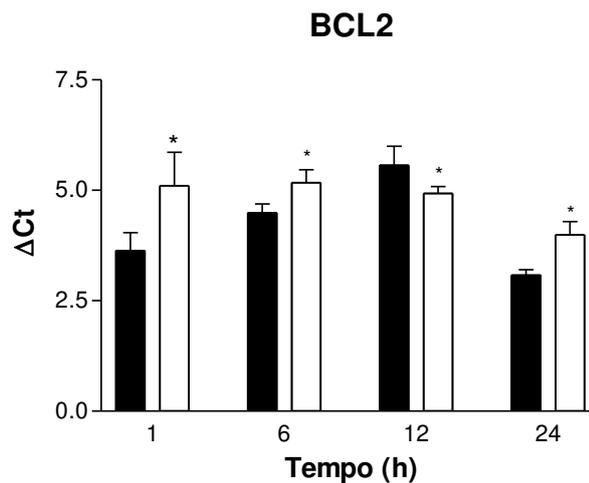


Figura 42 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de BCL2, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de NR1 dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 6, 12 e 24 horas.

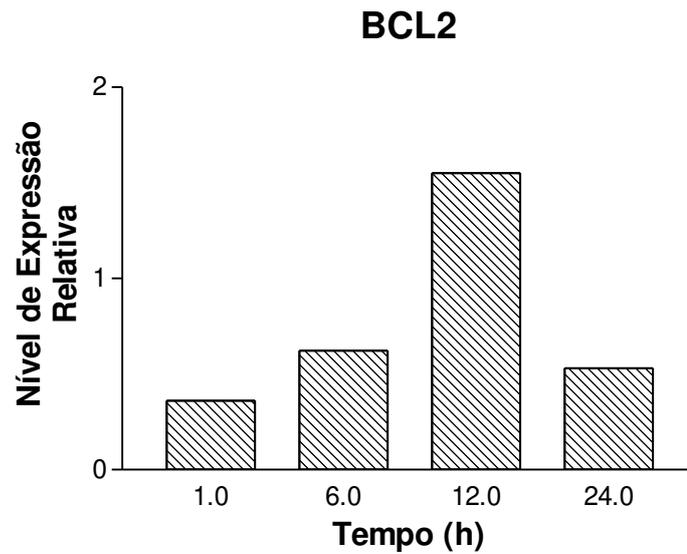


Figura 43 - Nível de expressão relativa de BCL2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

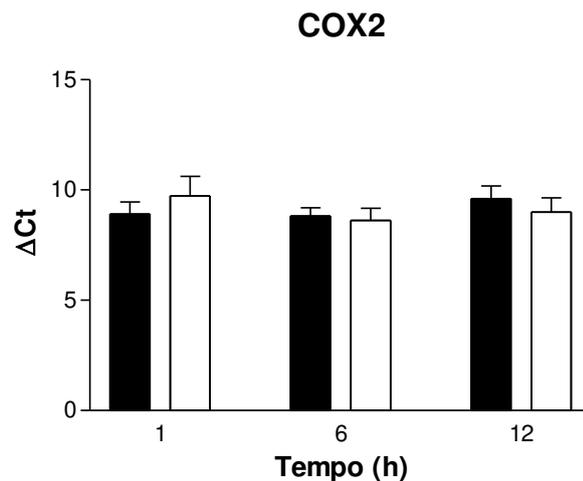


Figura 44 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de COX2, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de COX2 dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). $*P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos e não foi detectada a expressão do gene nos indivíduos tratados com ConBr nativa.

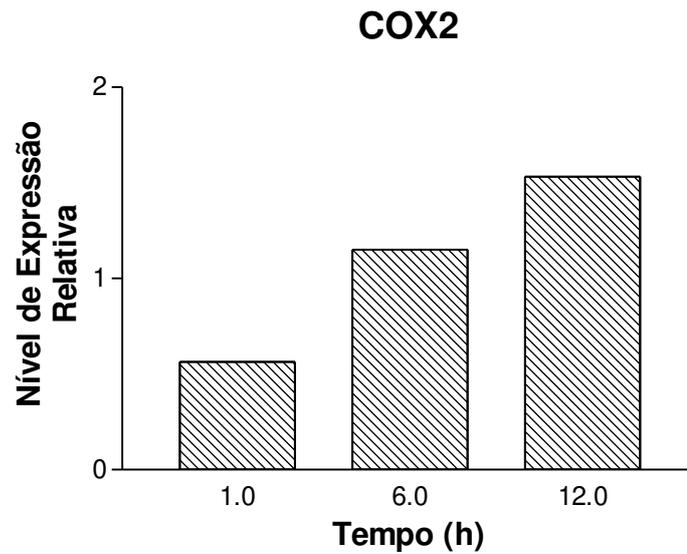


Figura 45 - Nível de expressão relativa de COX2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

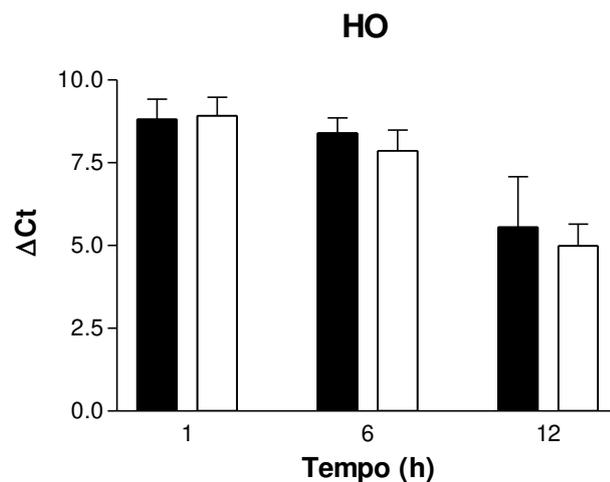


Figura 46 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão de HO, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) nativa ou ConBr desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de HO dos animais controle (■) e dos animais tratados com ConBr nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos, nos tempos analisados.

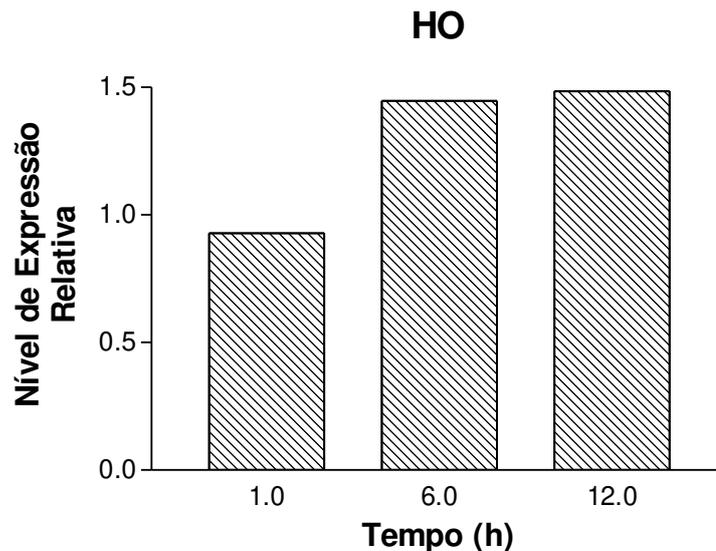


Figura 47 - Nível de expressão relativa de HO em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Canavalia brasiliensis* - ConBr em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à ConBr desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

O tratamento com VML nativa apresentou menor impacto na expressão de genes quando comparado com os resultados de ConBr. O transcrito variante Éxon de BDNF teve seu perfil de expressão alterado apenas no grupo de animais de 1 hora, permanecendo constante nos outros tempos (Figura 48 e Figura 49). Resultado semelhante foi obtido com BDNFII, contudo em tempos diferentes. BDNF II teve a expressão aumentada em 50%, em relação ao controle, no tempo de 6 horas após o tratamento com VML (Figura 50 e Figura 51). Os níveis de expressão de BDNF IV e pan-BDNF foram alterados somente após 24 horas de tratamento com VML, permanecendo no mesmo nível do controle nos outros tempos (Figura 52, Figura 53, Figura 54 e Figura 55). A expressão do receptor de BDNF, Trkb, foi reduzida após 24 horas do tratamento

Figura 56 e Figura 57). Os genes marcadores de atividade do metabolismo celular foram pouco afetados pelo tratamento com VML. A proteína de citoesqueleto ARC foi expressa em dobro na primeira hora após o tratamento com VML e reduzida pela metade nos tempos de 6 e 12 horas (Figura 58 e Figura 59). Dentre os dois fatores de transcrição, apenas c-fos apresentou algum aumento. C-fos aumentou 145% na primeira hora, contudo foi reduzido a ¼ de expressão no tempo seguinte (Figura 62 e Figura 63). Em nenhum dos tempos de tratamento com VML a expressão

de c-jun foi elevada. Foi detectada redução de expressão nos tempos de 12 e 24 horas (Figura 64 e Figura 65).

Os transportadores excitatórios de AA, Eaat1 e Eaat2, não tiveram os níveis de expressão aumentados, o que seria desejável pelo potencial de prevenção da excitotoxicidade. Eaat1 teve o nível de expressão reduzido em 80% no tempo de 6 horas (Figura 66 e Figura 67). O Eaat2 teve o nível de transcrição mantido nos tempos de 1 e 24 horas, e foi reduzido nos tempos de 6 e 12 horas (Figura 68 e Figura 69).

Tanto galectina-1 Figura 70 Figura 71 quanto galectina-3 (Figura 72 e Figura 73) foram reguladas positivamente após 1 hora de tratamento com VML. Uma redução foi observada apenas em galectina-3, no tempo de 12 horas. Nos outros tempos, tanto para galectina-1 quanto para galectina-3, não houve alteração da expressão dos genes.

Os níveis de expressão de NR1 foi mantido em 1 e 6 horas e reduzido nos demais tempos (Figura 74 e Figura 75). NR2A também foi reduzida no tempo de 24 horas, mantendo o patamar de expressão nos demais tempos (Figura 76 e Figura 77). O único aumento identificado nas subunidades de receptores de NDMA foi em NR2B com uma hora de tratamento. Além disso, houve uma redução de 50% de NR2B no tempo de 12 horas (Figura 78 e Figura 79).

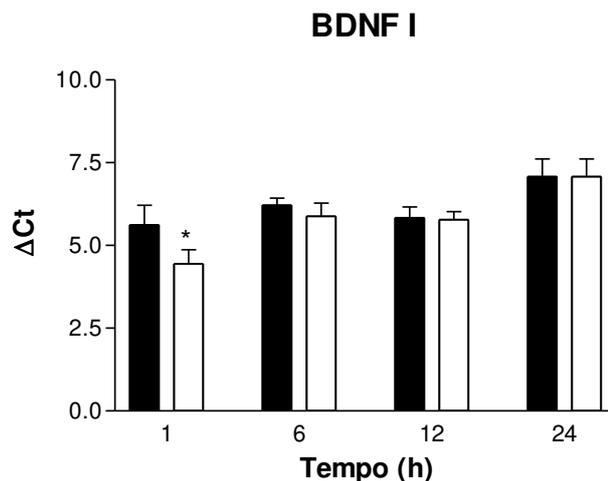


Figura 48 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon I (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF I, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de BDNF I dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 1 hora.

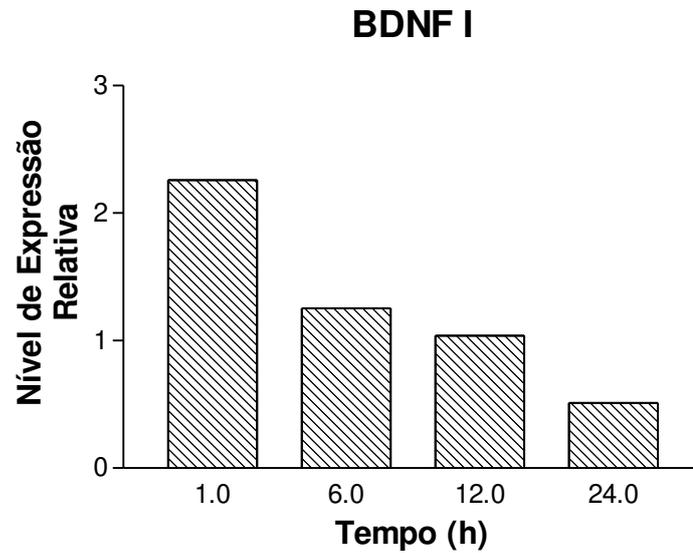


Figura 49 - Nível de expressão relativa de BDNF I em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

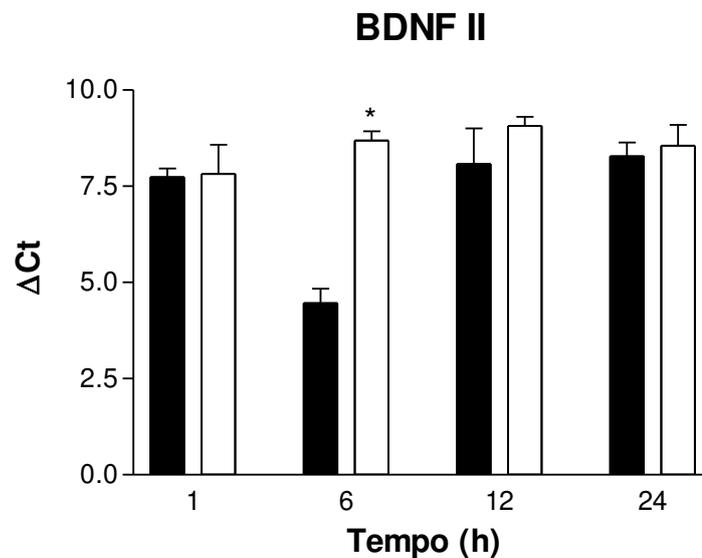


Figura 50 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon II (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF II, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de BDNF II dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 6 horas.

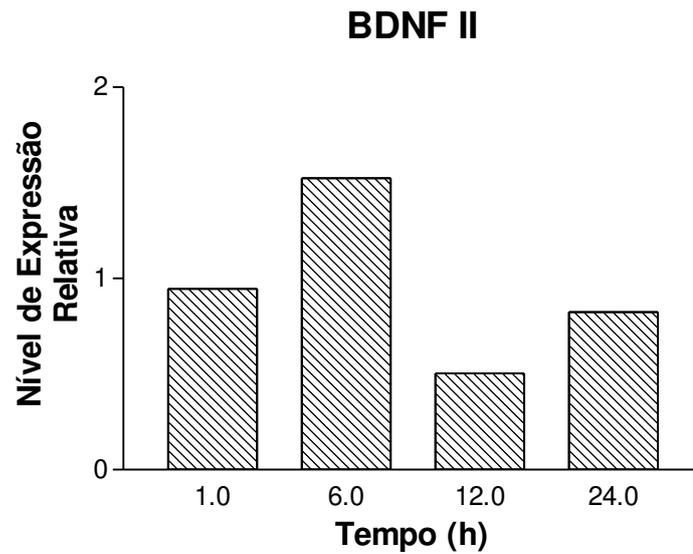


Figura 51 - Nível de expressão relativa de BDNF II em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

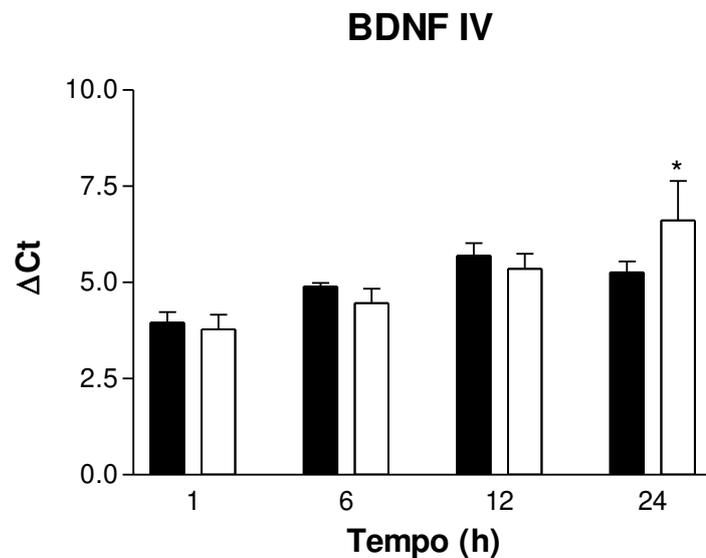


Figura 52 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão do transcrito alternativo éxon IV (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro – BDNF IV, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de BDNF IV dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 24 horas.

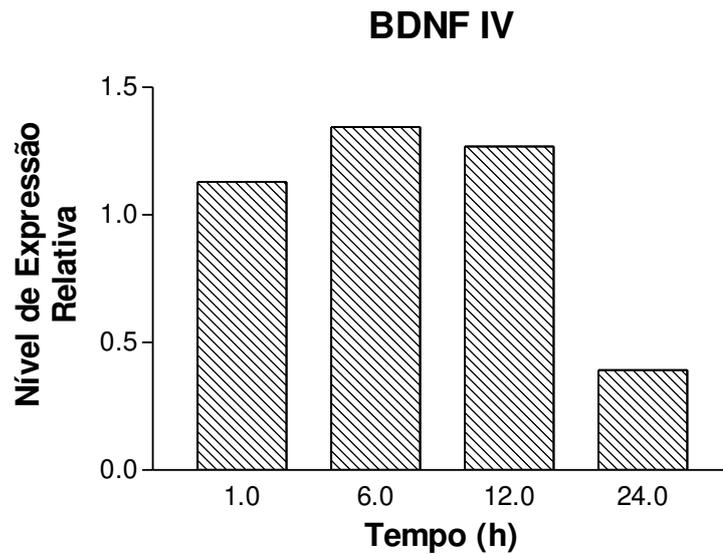


Figura 53 - Nível de expressão relativa de BDNF IV em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

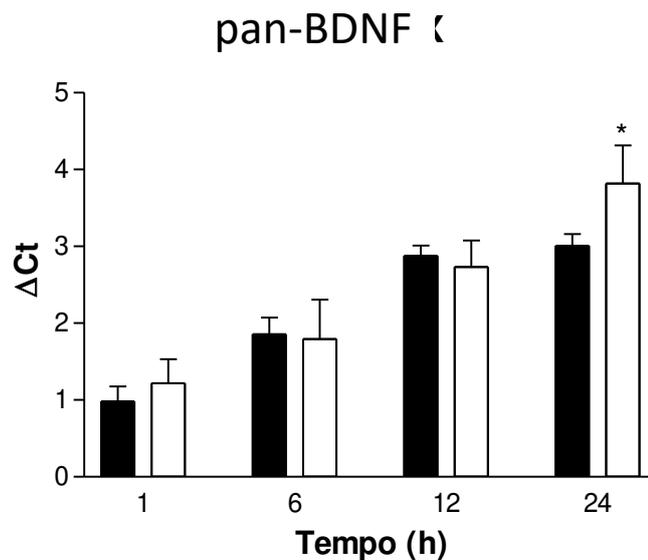


Figura 54 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão de pan-BDNF (Aid et al., 2007) do gene da Neurotrofina Derivada do Cérebro, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de pan-BDNF dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 24 horas.

pan-BDNF

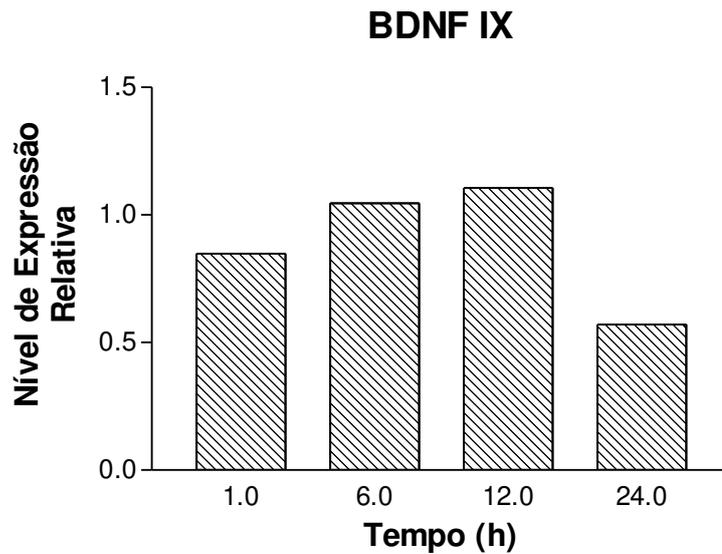


Figura 55 - Nível de expressão relativa de pan-BDNF em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

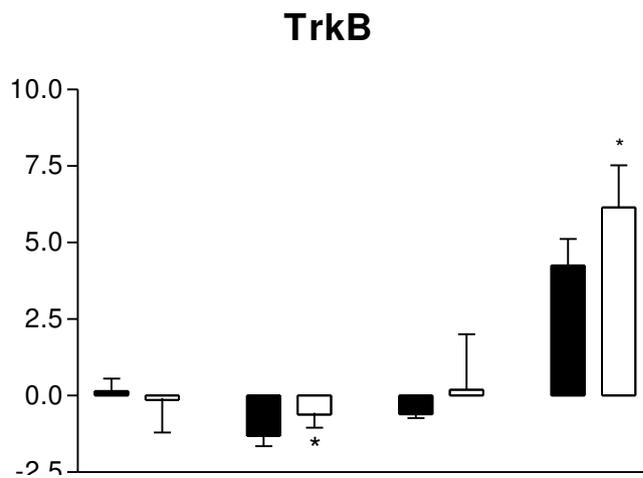


Figura 56 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão TrkB, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de TrkB dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 6 e 24 horas.

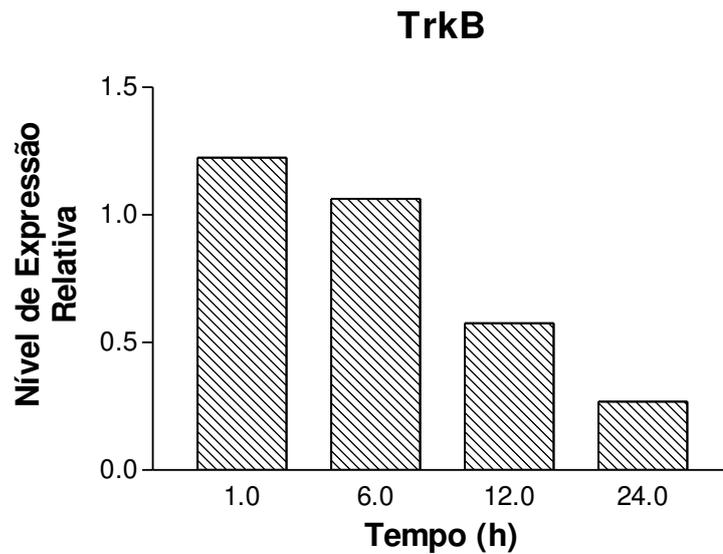


Figura 57 - Nível de expressão relativa de TrkB em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

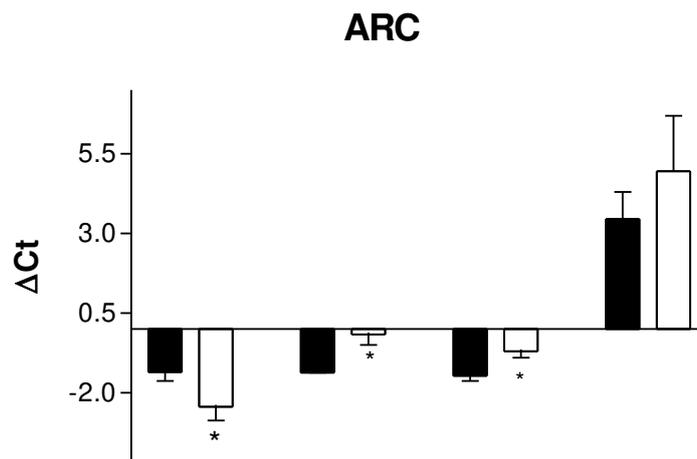


Figura 58 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão Arc, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de Arc dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P < 0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1, 6 e 12 horas.

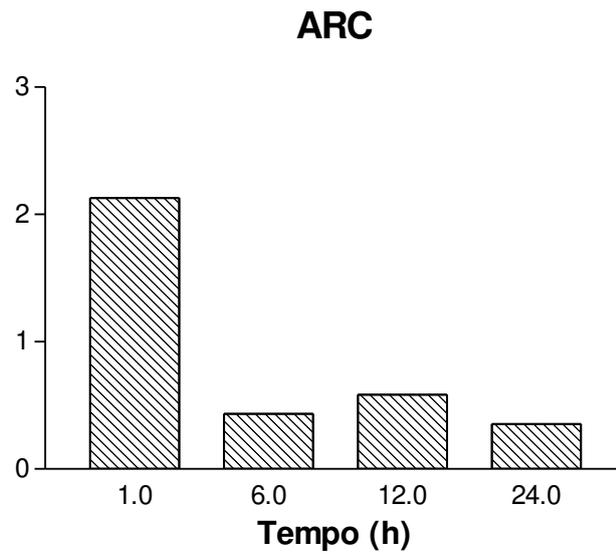


Figura 59 - Nível de expressão relativa de Arc em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

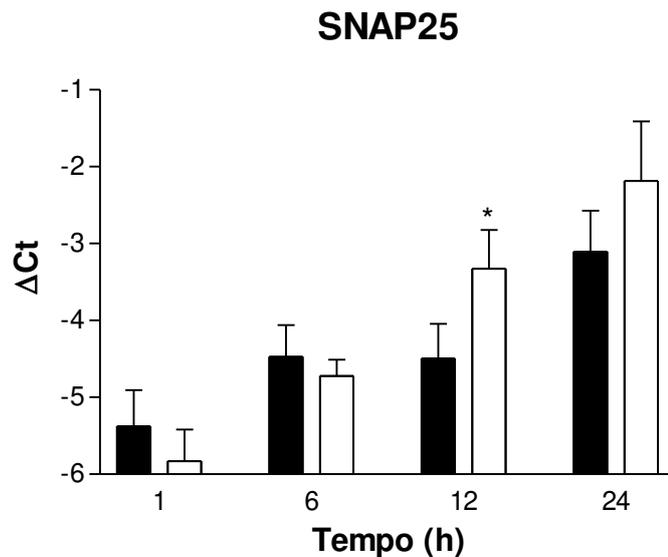


Figura 60 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão SNAP-25, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de SNAP-25 dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 12 horas.

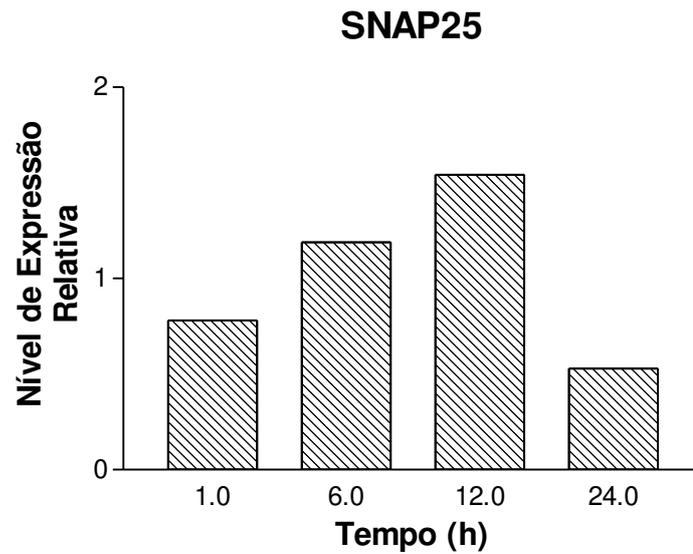


Figura 61 - Nível de expressão relativa de SNAP25 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

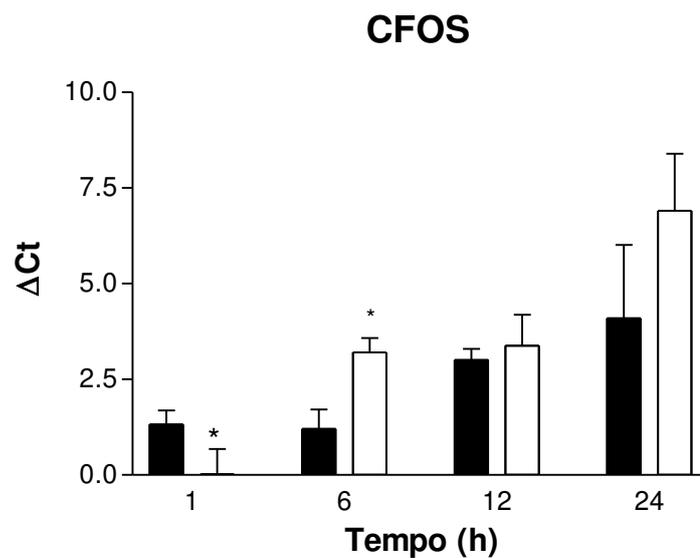


Figura 62 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão c-fos, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de c-fos dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 e 6 horas.

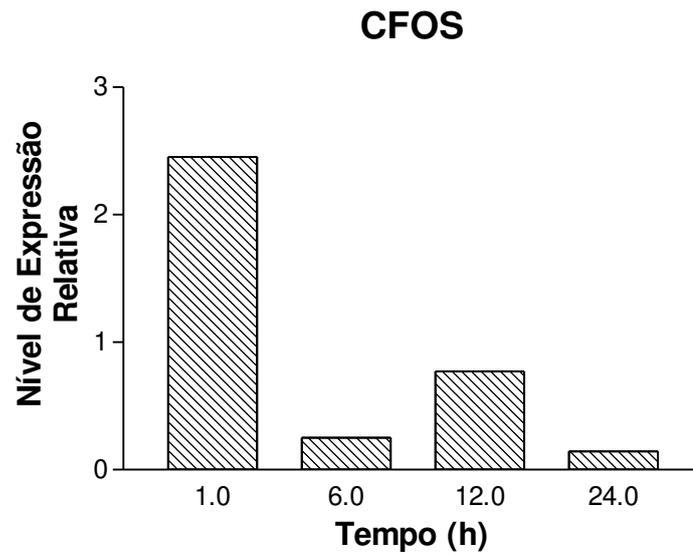


Figura 63 - Nível de expressão relativa de *c-fos* em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

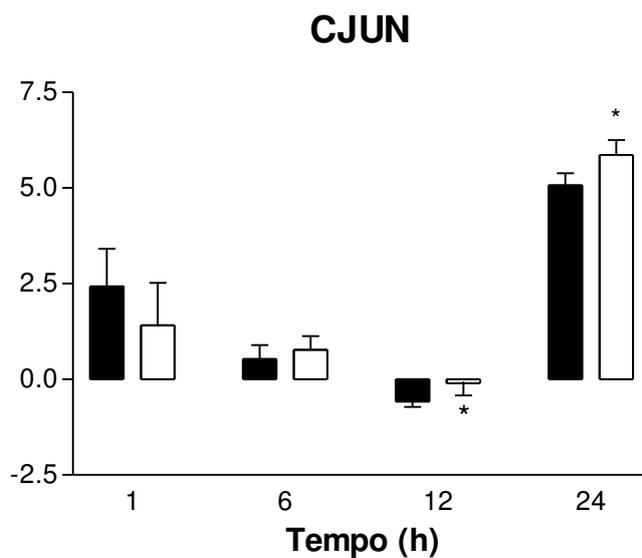


Figura 64 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão *c-jun*, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de *c-jun* dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 12 e 24 horas.

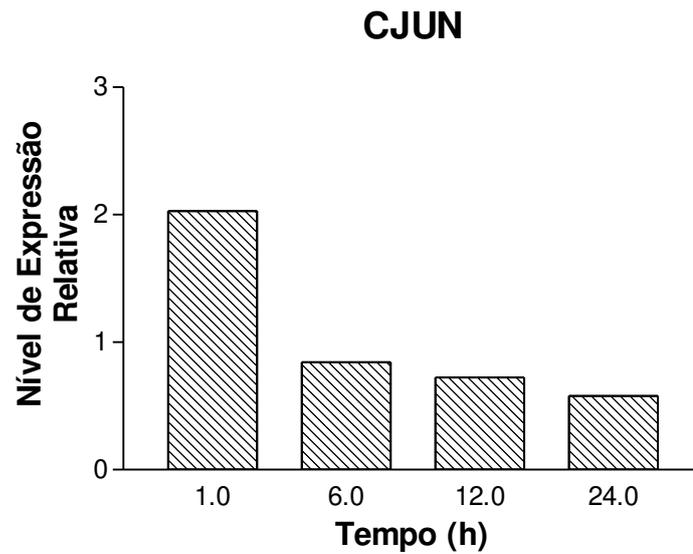


Figura 65 - Nível de expressão relativa de *c-jun* em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

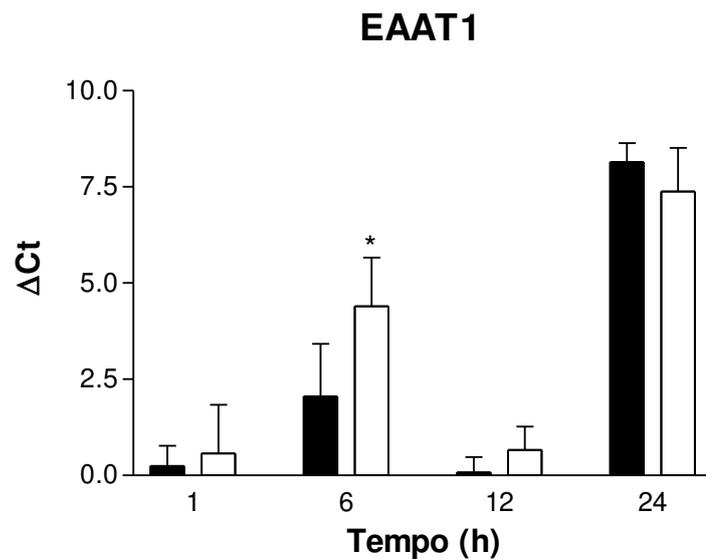


Figura 66 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão EAAT-1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de EAAT-1 dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 6 horas.

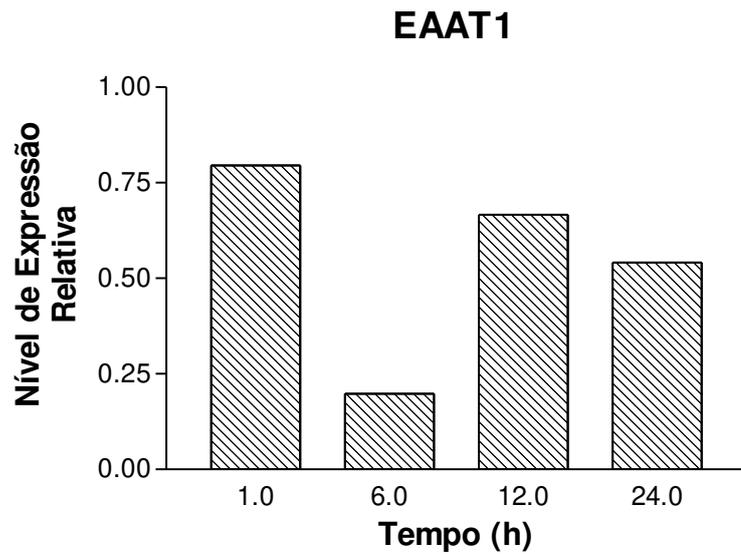


Figura 67 - Nível de expressão relativa de EAAT1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

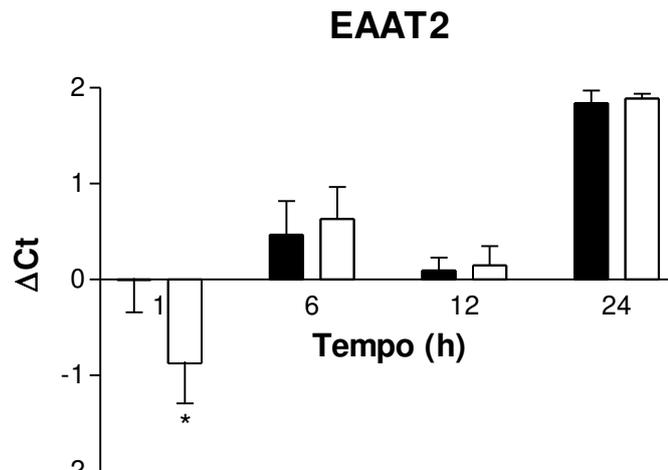


Figura 68 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão EAAT-2, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de EAAT-2 dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 1 hora.

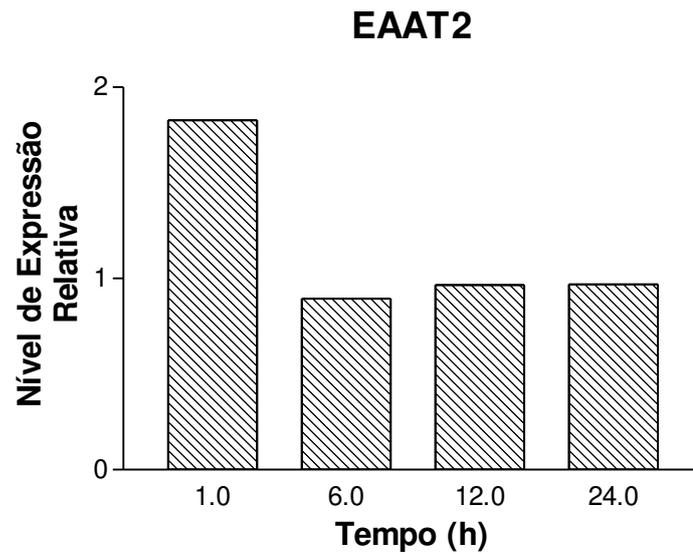


Figura 69 - Nível de expressão relativa de EAAT2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

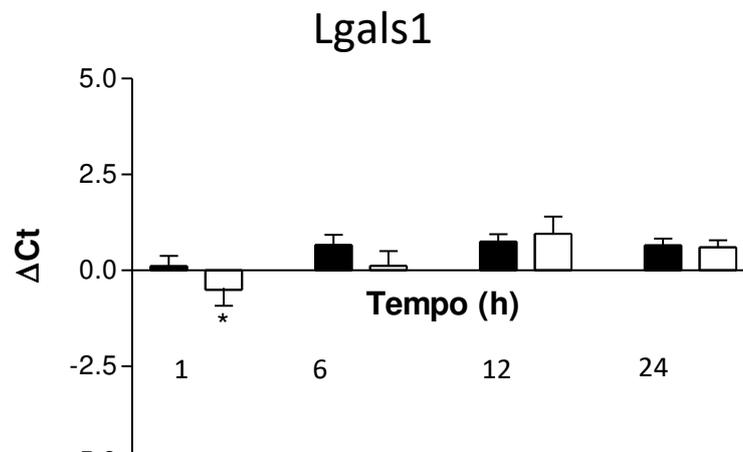


Figura 70 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão Lgals1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de Lgals1 dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 1 hora.

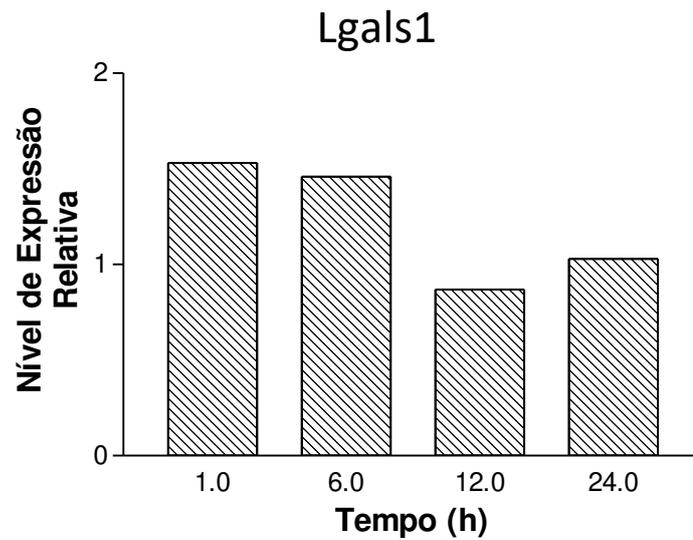


Figura 71 - Nível de expressão relativa de Lgal1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

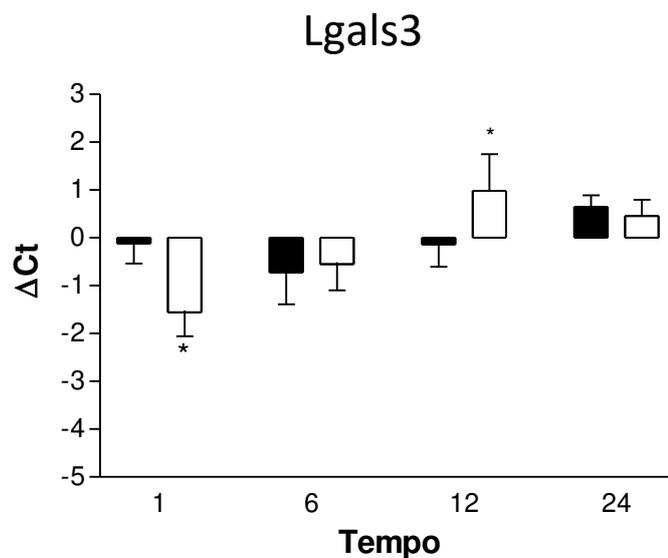


Figura 72 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão Lgals3, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de Lgals3 dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 1 e 12 horas.

Lgals3

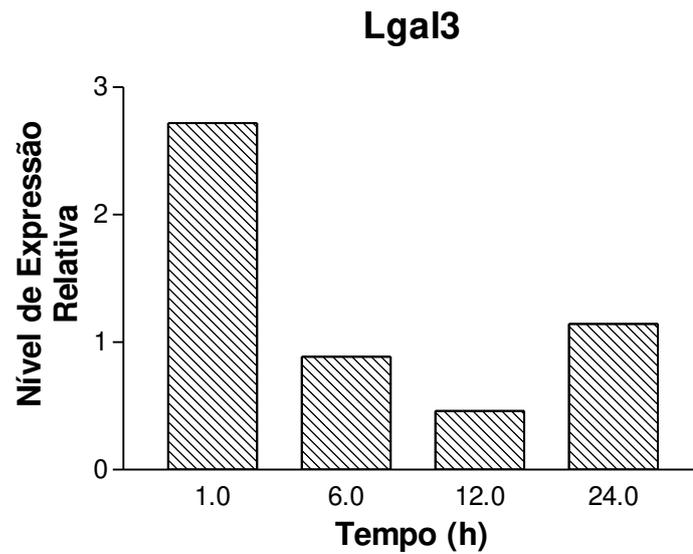


Figura 73 - Nível de expressão relativa de Lgal3 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

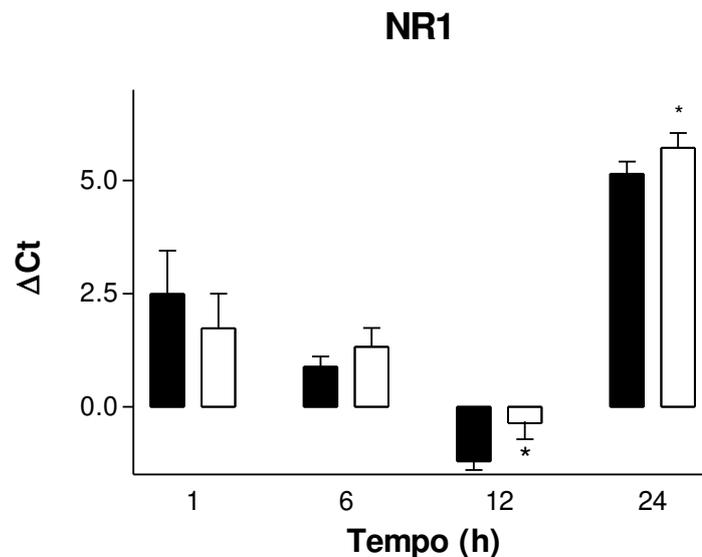


Figura 74 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão NR1, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de NR1 dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 12 e 24 horas.

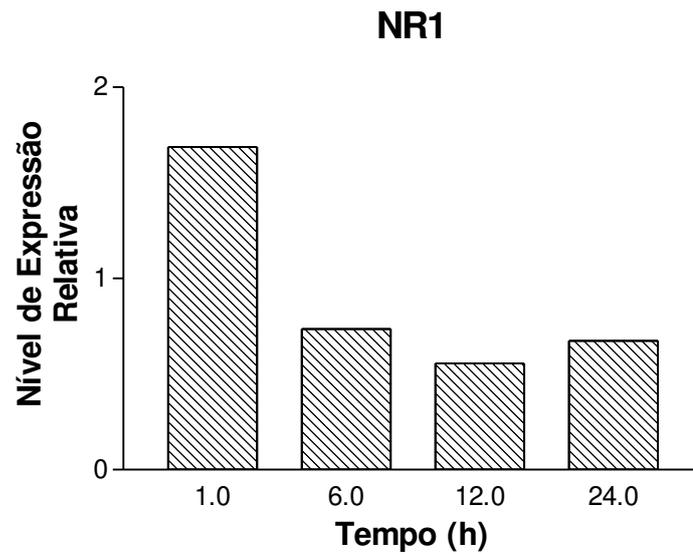


Figura 75 - Nível de expressão relativa de NR1 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

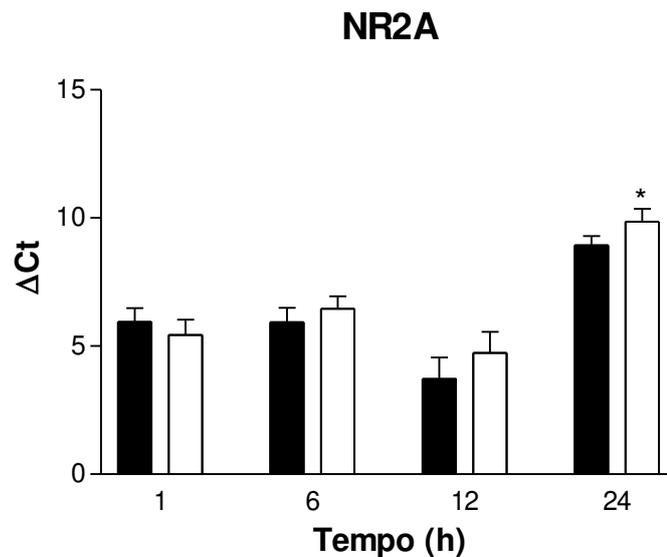


Figura 76 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão NR2A, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de NR2A dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 24 horas.

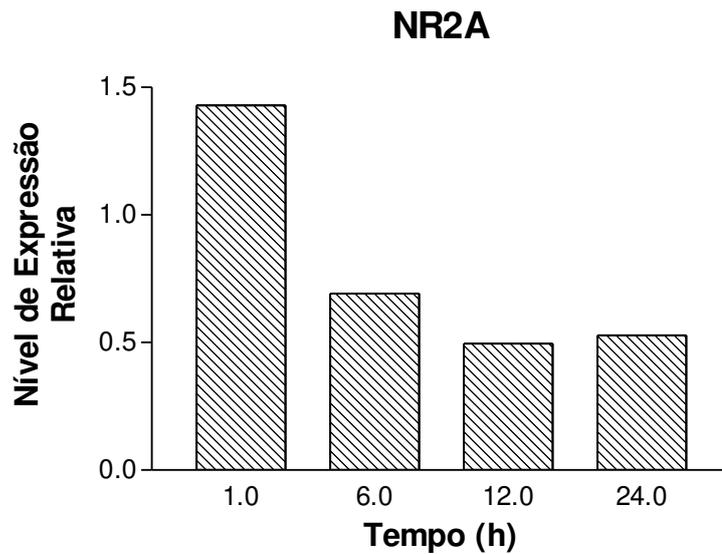


Figura 77 - Nível de expressão relativa de NR2A em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

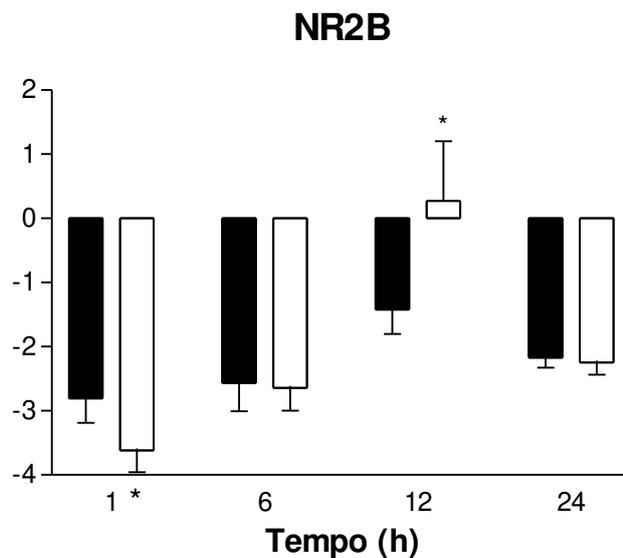


Figura 78 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão NR2B, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de NR2B dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 e 12 horas.

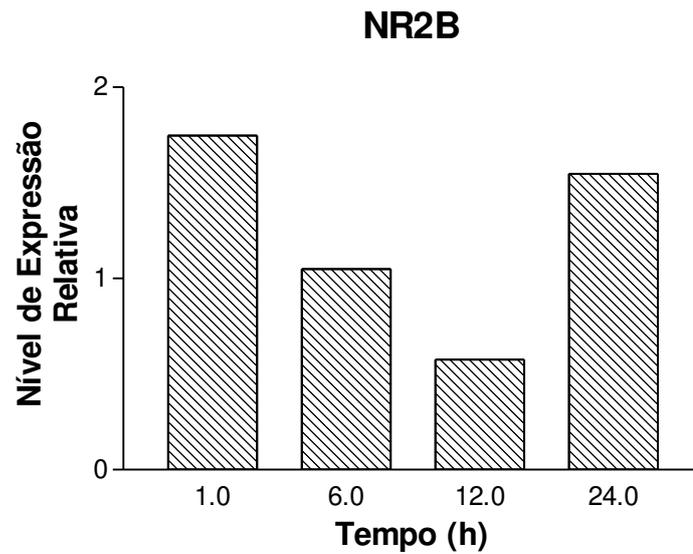


Figura 79 - Nível de expressão relativa de NR2B em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

O gene pró-apoptótico BAD foi positivamente regulado por VML nos tempos de 1 e 6 horas, nos demais tempos manteve o nível de expressão igual aos das amostras controle (Figura 80 e Figura 81). Além disso, houve um aumento de 3X na expressão no gene pro-inflamatório Cox-2 nos animais após uma hora de tratamento com VML (Figura 84 e Figura 85). O gene anti-apoptótico BCL2 foi regulado positivamente em 1 hora e reduzido no tempo de 12 horas (Figura 82 e Figura 83). O gene da hem-oxigenase foi alterado apenas após 24 horas de tratamento, tendo um leve aumento de 33% (Figura 86 e Figura 87).

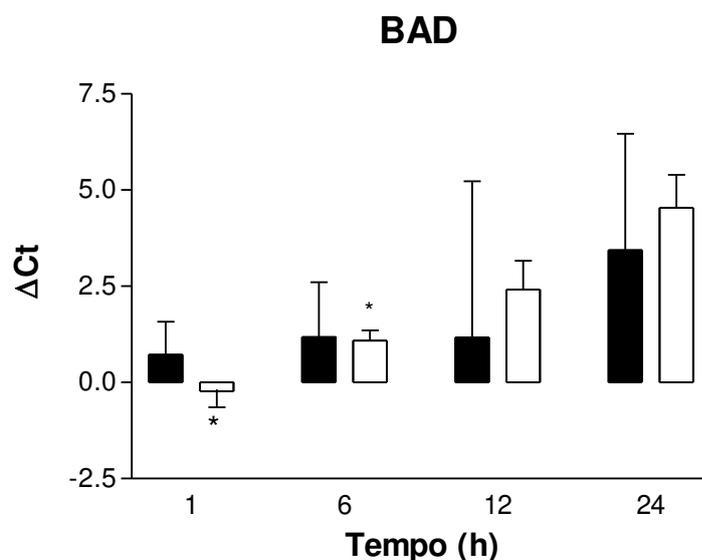


Figura 80 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão BAD, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de

BAD dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 e 6 horas.

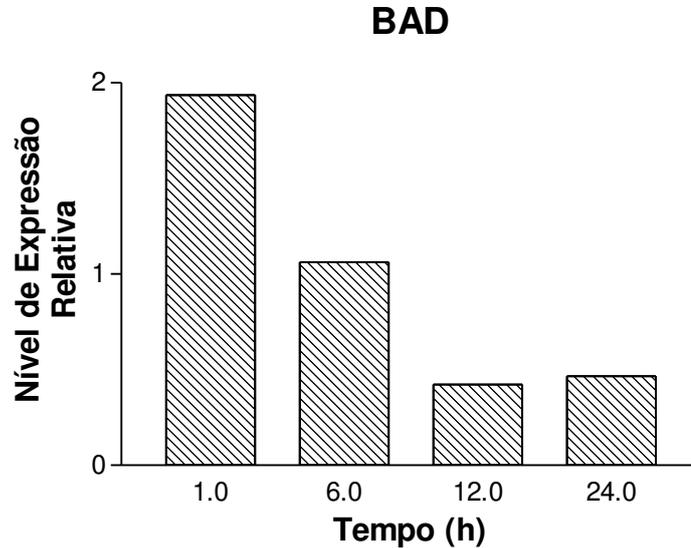


Figura 81 - Nível de expressão relativa de BAD em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

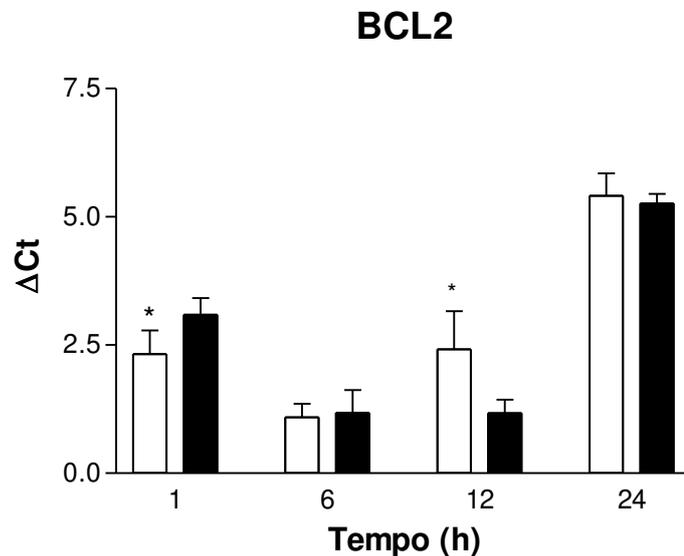


Figura 82 - Valores da média do Delta-Ct (ΔCt) do nível de expressão BCL2, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do ΔCt de BCL2 dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student (n=4). *P<0,05 comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 e 12 horas.

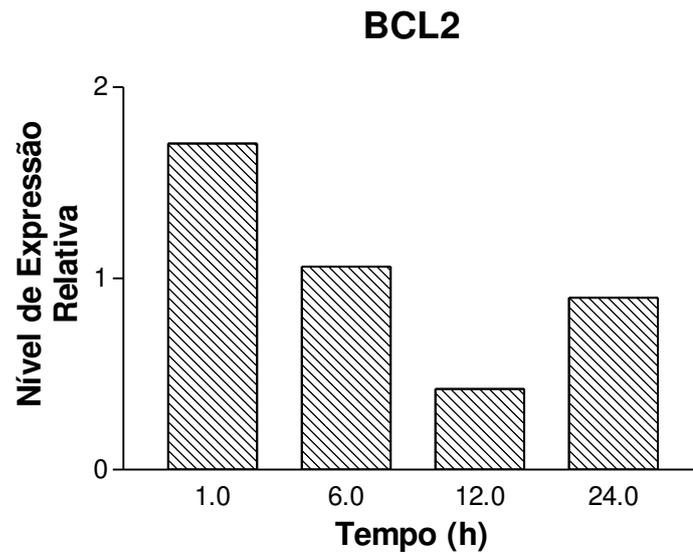


Figura 83 - Nível de expressão relativa de BCL2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

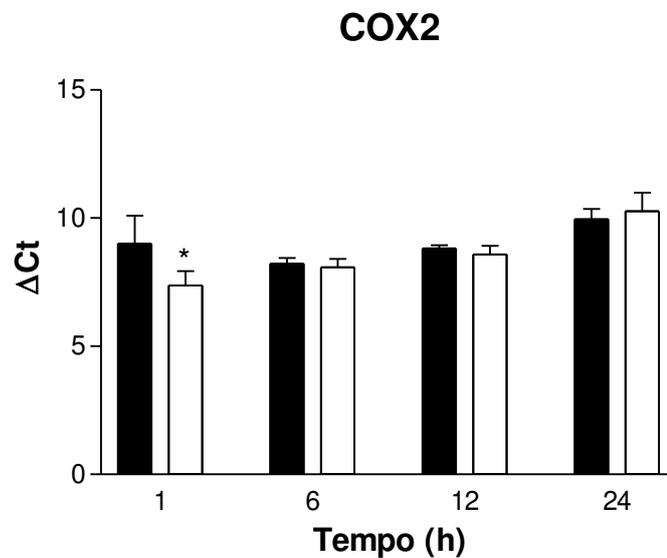


Figura 84 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão COX2, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de COX2 dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos nos tempos de 1 hora.

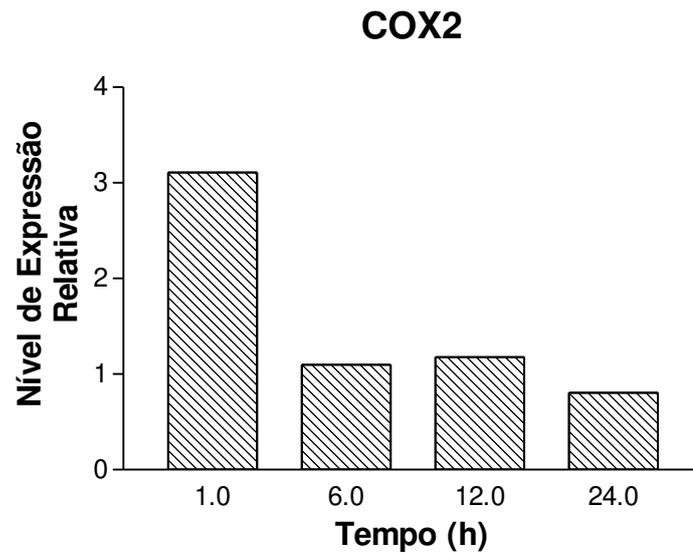


Figura 85 - Nível de expressão relativa de COX2 em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

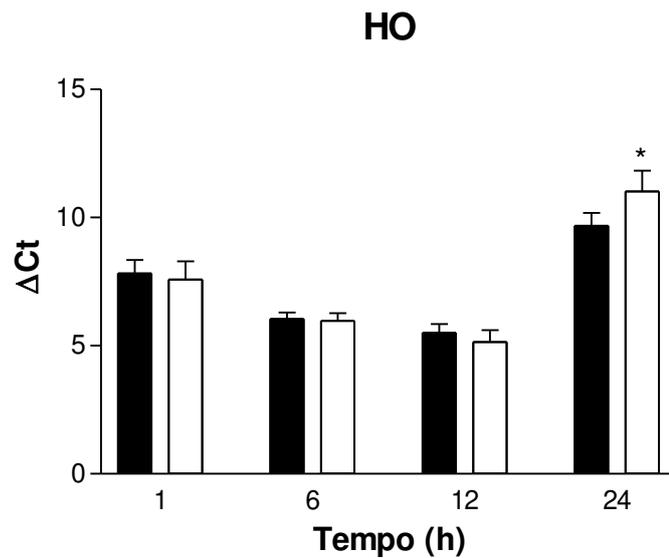


Figura 86 - Valores da média do Delta-Ct (Δ Ct) do nível de expressão HO, em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) nativa ou VML desnaturada (controle). O nível de transcrição de HPRT foi utilizado para a normalização dos dados. Os valores expressam a média \pm D.P. do Δ Ct de HO dos animais controle (■) e dos animais tratados com VML nativa (□). Os dados foram analisados através do teste t-student ($n=4$). * $P<0,05$ comparado com o respectivo controle. Observa-se que houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo de 24 hora.

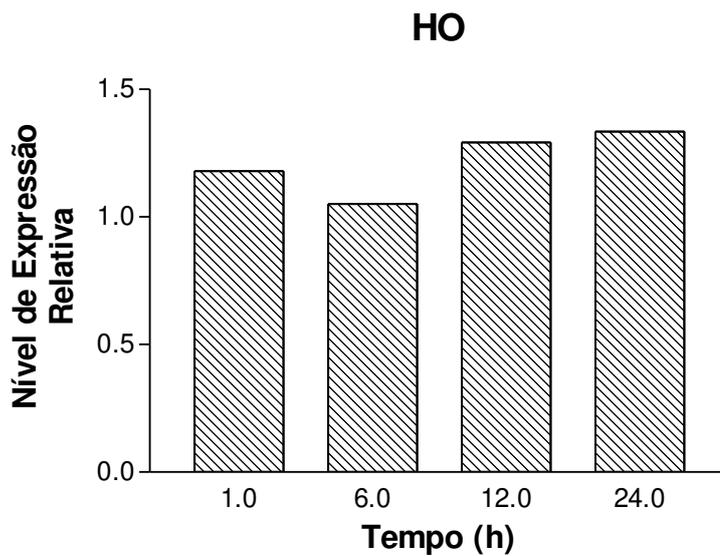


Figura 87 - Nível de expressão relativa de HO em hipocampo de camundongos (*Mus musculus*) submetidos ao tratamento com lectina de *Vatairea macrocarpa* - VML em comparação à expressão do mesmo gene em animais submetidos à VML desnaturada. Cálculo realizado através do método de Livak e colaboradores (2001).

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO

Podemos concluir que as lectinas de sementes de *Canavalia brasiliensis* e de *Vaitarea macrocarpa* são capazes de induzir alterações no perfil de expressão de diversos genes de células hipocâmpais de camundongos (*Mus musculus*). Contudo, os efeitos gerados pelas duas lectinas diferem tanto em aspectos quantitativos quanto em qualitativos.

As duas lectinas modularam vias completamente distintas e com diferentes consequências para as células. A ConBr foi capaz de induzir a expressão de uma série de genes com efeitos positivos para célula. A expressão de uma série de genes foi aumentada após 12 horas de tratamento. O tratamento do hipocampo com ConBr elevou a expressão de todos os transcritos de BDNF, alternativos e pan-BDNF, TrkB, SNAP-25, c-fos, c-jun, Lagls-3, NR2B, BCL2, no tempo de 12 horas. Assim podemos sugerir que ConBr é capaz de atuar na regulação de diversos genes do metabolismo celular hipocâmpal, modulando a sobrevivência neuronal, neuroplasticidade, neuroproteção e atividade neuronal. Outro aspecto importante é o aumento de transcrição, em tempos diferentes, de EAAT1 e EAAT2 demonstrando que ConBr pode ter uma papel importante na manutenção dos níveis externos de glutamato, prevenindo a excitotoxicidade.

A VML não foi capaz de induzir a expressão dos genes na mesma magnitude que a ConBr. Além disso, o tratamento com VML elevou a expressão dos genes pró-apoptótico e pró-inflamatórios, sugerindo um efeito negativo à sobrevivência neuronal. Além disso, o perfil total de genes expressos foi menos afetado em VML. A expressão de panBDNF foi alterada para baixo, demonstrando que VML não foi capaz de induzir o aumento global de expressão da neurotrofina. As maiores alterações induzidas por VML foram nos tempos de 1 hora, que pode estar ligada ao procedimento experimental de injeção da lectina, e em 12 horas, com uma clara depressão do metabolismo das células hipocâmpais.

Infelizmente, não sabemos o(s) exato(s) mecanismo(s) celulares que acarretaram na expressão destes genes. Contudo, observando os efeitos opostos gerados por ConBr e VML, podemos perceber que as lectinas específicas para glicose/manose possuem um futuro biotecnológico promissor na indução da neuroplasticidade, neuroproteção e incremento das sinapses.

REFERÊNCIAS

ABARBANEL, H. D. I.; HAAS, J. S.; TALATHI, S. S. Synapses and Neurons: Basic Properties and Their Use in Recognizing Environmental Signals. In: GRABEN, P. B., et al. **Lectures in Supercomputational Neurosciences**. [S.l.]: [s.n.], 2008.

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanism of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, p. 180-187, 2001.

ABRAHAM, W. C. et al. Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. **Neuroscience**, v. 56, p. 717–727, 1993.

AGULHON, C. et al. What is the role of astrocyte calcium, in neurophysiology. **Neuron Review**, v. 59, p. 932-946, 2008.

AID, T. et al. Mouse and Rat BDNF gene structure and expression revisited. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, p. 525-535, 2007.

AITKEN, A. 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. **Trends Cell Biol**, v. 6, p. 341–347, 1996.

ALDER, J. et al. Early presynaptic and late postsynaptic components contribute independently to brain-derived neurotrophic factor-induced synaptic plasticity. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 3080–3085, 2005.

ALENCAR, N. M. N. et al. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **The international journal of biochemistry and cell biology**, v. 35, p. 1674-1681, 2003.

ALENCAR, N. M. N. et al. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leucocyte infiltration. **Protein and Peptide Letters**, v. 11, p. 195-200, 2004.

ALENCAR, N. M. N. et al. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 374, p. 275-282, 2007.

ALESSI, D. R. E. A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. **EMBO J.**, v. 15, p. 6541–551, 1996.

ALKOM, D. L.; MIAO-KUM, S.; NELSON, T. J. PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease. **Trends in Pharm. Sciences.**, v. 28, 2006.

ALLEN, W. F. Effects of ablating the frontal lobe, hippocampi and occipito-parietotemporal (excepting pyriform areas) lobes on positive and negative olfactory conditioned reflexes. **Am J. Physiology.**, v. 132, p. 8-91, 1940.

ALTMAN, J.; BAYER, S. A. Migration and distribution of two populations of hippocampal granule cell precursors during the perinatal and postnatal periods. **J. Comp. Neurol.**, p. 365-381, 1990.

ALVES-FILHO, J. G. **Clonagem, sequenciamento e caracterização parcial dos genes relacionados à lectina de Vatairea macrocarpa**. Dissertação de mestrado. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2008.

ANDERSEN, P. et al. **The Hippocampus Book**. New York: Oxford University Press, 2007.

ANDERSON, C. M.; SWANSON, R. A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia**, v. 32, p. 1–14, 2000.

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

ANGEL, P.; KARIN, M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell- proliferation and transformation. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1072, p. 129–157, 1991.

ARRIZA, L. J. et al. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. **Proc Natl Acad Sci**, v. 94, p. 4155–4160, 1997.

ASSREUY, A. et al. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 201-210, 1997.

ASSREUY, A. M. S. et al. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. Naunyn-Schmiedeberg's. **Archives of Pharmacology**, v. 380, p. 509-521, 2009.

ATTWELL, D. Brain uptake of glutamate: food for thought. **J Nutr** , v. 130, p. 1023S–1025S, 2000.

BALAN, V. et al. Galectin-3: A novel substrate for c-Abl kinase. **Bioch. Et Biophysica Acta.**, 2010.

BARAUNA, S. C. et al. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 160-169, 2006.

BARBOSA, T. et al. Lymphocyte activation and apoptosis induction in BALB/c mice treated with plant lectins. **Celular Immunology**, 1999.

BARONDES, S. H. et al. Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, v. 76, p. 597–598, 1994.

BARRAL-NETO, M. et al. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleinae tribe. **Immunological Investigation**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BARRIA, A.; MALINOW, R. Subunit-specific NMDA receptor trafficking to synapses. **Neuron**, v. 35, p. 345–353, 2002.

BEAR, M. F. A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. **Proc. Natl Acad Sci**, v. 26, p. 13453-13459, 1996.

BEART, P. M.; O'SHEA, R. D. Transporters for L-glutamate: An update on their molecular pharmacology and pathological involvement. **British Journal for Pharmacology**, v. 150, p. 5-17, 2007.

BENEDETTI M, L. A. C. M. Differential expression of nerve growth factor receptors leads to altered binding affinity and neurotrophin responsiveness. **Proc Natl Acad Sci**, v. 90, p. 7859–7863, 1993.

BENTO, C. A. M. et al. Rat paw edema and leucocyte immigration induced by plant lectins. **Agents and Actions**, v. 38, p. 48-54, 1993.

BERG, D.; RIESS, O.; BORNEMANN, A. Specific localization of 14-3-3 proteins in Lewy bodies. **Ann Neurol**, v. 54, p. 135, 2003.

BERRIDGE, M. J. Discovery of the InsP3–Ca²⁺ pathway. A personal reflection. **Phosphoprotein Res**, v. 26, p. 1–7, 1992.

BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Molecular Cell Biology**, v. 1, p. 11-21, 2000.

BIES, C.; LEHR, C.-M. A. W. J. F. Mediated-lectin drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 425–435, 2004.

BIRD, C. M.; BURGESS, N. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, p. 182-194, 2008.

BLISS, T. V. P.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of perforant path. **J. Physiol.**, p. 331-356, 1973.

BLUME-JENSEN, P. & H. T. Oncogenic kinase signalling. **Nature**, v. 411, p. 355–65, 2001.

BOURRITCHOULADZE, R. et al. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. **Learn and Mem**, v. 5, p. 365-374, 1998.

BRAMHAM, C. R. M. E. BDNF Function in Adult Synaptic Plasticity: the Synaptic Consolidation Hypothesis. **Prog. Neurobiol.**, v. 76, p. 99-125, 2005.

BRINDA, K. V.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Insights into the quaternary association of proteins through structure graphs: a case study of lectins. **Biochem. J.**, v. 391, p. 1–15, 2005.

BRODAL, A. The hippocampus and the sense of smell. **Brain** , v. 70, p. 179 – 222, 1947.

BRUNGER, A. T. et al. Single-Molecule studies os neuronal SNARE fusion machinery. **Annu. Rev Biochemic**, v. 78, p. 903-928, 2009.

BUNNEY, T. D.; VAN DEN WIJNGAARD, P. W.; DE BOER, A. H. 14-3-3 protein regulation of proton pumps and ion channels. **Plant Mol. Biol.**, v. 50, p. 1041–1051, 2002.

CAGNOL, S.; CHAMBARD, J. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence. **FEBS Journal**, v. 277, p. 2-21, 2010.

CALDEIRA, M. V. et al. BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultures hippocampal neurons. **Molecular and Celular Neuroscience**, v. 35, p. 208-219, 2007.

CALVETE, J. J. et al. Amino acid sequence, glycan structure, and proteolytic processing of the lectin of Vatairea macrocarpa seeds. **FEMS Letters** , v. 425, p. 286-292, 1998.

CALVETE, J. J. et al. Molecular characterization and crystalization of Diocleinae lectins. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1430, p. 367-375, 1999.

CARLEZON, W. A. The many faces of CREB. **Trends Neurosci**, v. 28, p. 436–445, 2005.

CAVADA, B. S. et al. Purification and characterization of a lectin from seeds of Vatairea macrocarpa duke. **Phytochemistry**, v. 49, p. 675-680, 1998.

CHAISUKSUNT, V. et al. Expression of regeneration-related molecules in injured and regenerating striatal and nigral neurons. **J. Neurocytol**, v. 32, p. 161–183, 2003.

CHAO, M. V. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. **Nat Rev Neurosci** , v. 4, p. 299-309, 2003.

CHARLES, A. C. Glia-neuron intercellular calcium signaling. **Dev Neurosci** , v. 16, p. 196–206, 1994.

CHARLES, A. C.; KODALI, S. K.; TYNDALE, R. F. Intercellular calcium waves in neurons. **Mol Cell Neurosci**, v. 7, p. 337–353, 1996.

CHATTERTON, J. E. et al. Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. **Nature**, v. 415, p. 793–798, 2002.

CHEN, W. et al. Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. **Science** , v. 302, p. 885– 889, 2003.

CHEN, X. E. A. Constitutively active Akt is an important regulator of TRAIL sensitivity in prostate cancer. **Oncogene** , v. 20, p. 6073–83, 2001.

CHEN, X. et al. Endoplasmic reticulum Ca^{2+} dysregulation and endoplasmic reticulum stress following in vitro neuronal ischemia: role of Na^{+} – K^{+} – Cl^{-} -cotransporter. **J. Neurochem.**, v. 106, p. 1563–1576, 2008.

CHEN, Z. Y. et al. Sortilin controls intracellular sorting of brain-derived neurotrophic factor to the regulated secretory pathway. **J. Neurosci.**, v. 25, p. 6156–6166, 2005.

CHIN, D.; MEANS, A. R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends Cell Biol.**, v. 10, p. 322–328, 2000.

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

CLAPHAM, D. E. Calcium Signalling. **Cell**, v. 131, p. 1047–1060, 2007.

COLBRAN, R. J. Protein phosphatases and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent synaptic plasticity. **Journal of Neurosciences**, v. 24, p. 8404–8409, 2004.

CONG, J. et al. The role of autolysis in activity of the Ca^{2+} -dependent proteinases (μ -calpain and m-calpain). **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 10096–10103, 1989.

CONKRIGHT, A. D.; CANETTIERI, G.; SCREATON, R. TORCs: transducers of regulated CREB activity. **Molecular Cell**, v. 12, p. 413–423, 2003.

CONNER, J. M. et al. Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 2295–2313, 1997.

COOK, G. M. W. Cell surface carbohydrates: molecules in search of a function. **J. Cell Sci. Suppl.**, v. 4, p. 45–70, 1986.

COOPER, J. D. et al. Delayed death of septal cholinergic neurons after excitotoxic ablation of hippocampal neurons during early postnatal development in the rat. **Exp Neurol.**, v. 139, p. 143–155, 1996.

CULL-CANDY, S. G.; LESZKIEWICZ, D. N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. **Sci STKE**, v. 16, 2004.

CUMMINGS, R. D.; LIU, F. T. Galectins. In: VARKI, A., et al. **Essentials of Glycobiology**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.

DAIKHIN, Y. . Y. M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1026S–1031S, 2000.

DAM, T. K. et al. Binding Studies of α -GalNAc-specific Lectins to the α -GalNAc (Tn-antigen) Form of Porcine Submaxillary Mucin and Its Smaller Fragments. **The Journal OF Biological Chemistry**, v. 282, p. 28256–28263, 2007.

- DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol**, v. 65, p. 1–105, 2001.
- DANI, J. W.; CHERNJAVSKY, A.; SMITH, S. J. Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. **Neuron**, v. 8, p. 429–440, 1992.
- DAVIS, H. P.; SQUIRRE, L. R. Protein synthesis and memory: a review. **Psychol Bull**, v. 96, p. 518-559, 1984.
- DIAMOND J. S., J. C. E. Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale. **J Neuroscience** , v. 17, p. 4672–4687, 1997.
- DUDAI, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 16, p. 174–178 , 2006.
- DUDAI, Y. The neurobiology of consolidation, or, how stable is the engram? **Annu Rev. Psychol**, v. 55, p. 51-86, 2004.
- DURAM, A.; DIAZ-MECO, M. T.; MOSCAT, J. Essential role of RelA Ser133 phosphorylation by zPKC in NF-kB transcriptional activation. **The EMBO Journal**, v. 22, p. 3910-3918, 2003.
- DWIVEDI, Y. Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 5, p. 433-449, 2009.
- EGAN, M. F. et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. **Cell**, v. 112, p. 257-269, 2003.
- EHLERS, M. D. Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin–proteasome system. **Nat. Neurosci.**, v. 6, p. 231–242, 2003.
- ERECINSKA, M. & S. I. A. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. **Prog. Neurobiol.** , v. 35, p. 245–296, 1990.
- ERNFORS, P. et al. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. **Neuron** , v. 5, p. 511–526, 1990.
- ESPOSITO, D.; PATEL, P.; STEPHENS, R. M. The cytoplasmic and transmembrane domains of the p75 and Trk A receptors regulate high affinity binding to nerve growth factor. **J Biol Chem.**, v. 276, p. 32687–32695, 2001.
- FENG, W.; ZHANG, M. Organization and dynamics of PDZ-domains-related supramodules in the postsynaptic density. **Neuroscience**, v. 10, p. 87-99, 2009.
- FERNANDEZ-CHACON, R. et al. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. **Nature**, v. 410, p. 41–49, 2001.
- FERRIER, D. **The functions of the brain**. London: [s.n.], 1876.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 40, p. 617–647, 2000.

GABIUS, H. J. Animal lectins. **Eur. J. Biochem.**, v. 243, p. 543-576, 1997.

GALEGO, F. et al. Lectinas: Encarregadas de decifrar los códigos a los glúcidos. **Investigación y Ciencia**, p. 58-67, 2006.

GARLAND, T. . J. A. K. S. Phenotypic plasticity and experimental evolution. **The Journal of Experimental Biology** , v. 209, p. 2344-2361, 2006.

GAS, P.; RIVA, M. CREB, neurogenesis and depression. **BioEssays**, 2007.

GERVASONI, N. et al. Partial normalization of serum brain- derived neurotrophic factor in remitted patients after a major depressive episode. **Neuropsychobiology**, v. 51, p. 234-238, 2005.

GHALAMBOR, C. K.; WALKER, J. A.; REZNICK, D. N. Multi-trait selection, adaptation, and constraints on the evolution of burst swimming performance. **Integr. Comp. Biol.**, v. 43, p. 431-438, 2003.

GOLDSTEIN, I. J.; PORETZ, R. D. Isolation and properties of lectins. In: LIENER, I. C.; SHARON, N.; **The Lectins: properties, functions and applications in biology and medicine**. New York: Academic Press, 1986. 600p p.

GOMES, J. C. et al. Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from Brazilian plants comparison with concanavalin A. **Agents and Actions**, v. 41, p. 132-135, 1994.

GORDON, W. C. **in Information Processing in Animals: Memory Mechanisms**. New Jersey: [s.n.], 1981. 319–343 p.

GOULD, E. et al. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. **Nature Neurosciences**, v. 2, p. 260-265, 1999.

GRANGEIRO, T. B. et al. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **Eur. J. Biochem.**, v. 248, p. 43-48, 1997.

GREWAL, S. S.; YORK, R. D.; STORK, P. J. Extracellular-signal- regulated kinase signalling in neurons. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 9, p. 544 - 553, 1999.

GROC, L.; BARD, L. C. D. SURFACE TRAFFICKING OF N-METHYL-D-ASPARTATE RECEPTORS: PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL PERSPECTIVES. **Neurosciences**, v. 158, p. 4-18, 2009.

HACKER, H.; KARIN, M. Regulation and Function of IKK and IKK-related Kinases. **Science Signalling**, 2006.

HAI, T. . H. M. G. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. **Gene** , v. 273, p. 1–11, 2001.

HANSEN, M. R. et al. Ca²⁺/ calmodulin-dependent protein kinases II and IV function similarly in neurotrophic signaling but differ in their effects on neurite growth in spiral ganglion neurons. **J. Neurosci. Res.** , v. 72, p. 169–184, 2003.

HARDINGHAM, G. E.; FUKUNAGA, Y.; BADING, H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. **Nat. Neurosci.**, v. 5, p. 405–414, 2002.

HARDMAN, K. D.; AINSWORTH, C. F. Structure of Concanavalin A at 2,4Å resolution. **Biochemistry** , v. 11, p. 4910-4919, 1972.

HARLOW, M. L. et al. The architecture of active zone material at the frog's neuromuscular junction. **Nature**, v. 409, p. 479–84, 2001.

HATA, R. et al. Attenuated C-fos mRNA induction after middle cerebral artery occlusion in CREB knockout mice does not modulate focal ischemic injury. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 18, p. 1325–1335, 1998.

HAWKINS, R. D.; KANDEL, E. R.; SIEGELBAUM, S. A. Learning to modulate transmitter release: themes and variations in synaptic plasticity. **Annu Rev Neurosci**, v. 16, p. 625-665, 1993.

HE, X. L.; GARCIA, K. C. Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75. **Science**, v. 304, p. 870–875, 2004.

HEIMER, L.; VAN GOESEJN, G. W. The limbic lobe and its output channels: Implication for emotional function and adaptative behavior. **Neuroscience and Biobehavior Reviews**, v. 30, p. 126-147, 2006.

HELENIUS, A.; AEBI, M. Intracellular functions of N-linked glycans. **Science** , v. 291, p. 2364–2369, 2001.

HEMPSTEAD, B. L. et al. High-affinity NGF binding requires co-expression of the trk proto-oncogene and the low-affinity NGF receptor. **Nature**, v. 350, p. 678–683, 1991.

HENESSY, B. T. et al. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. **Nature Reviews**, v. 4, p. 988-1004, 2005.

HERDEGEN, T.; LEAH, J. D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. **Brain Res. Rev.**, v. 28, p. 370–490, 1998.

HERSON, P.; ASHFORD, M. Reduced glutathione inhibits b-NAD⁺-activated non-selective cation currents in the CRI-G1 rat insulin-secreting cell line. **J Physiol** , v. 514, p. 47–57, 1999.

HERZOG, E. E. A. Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. **Neuroscience** , v. 123, p. 983–1002, 2004.

HEUSER, J. E.; REESE, T. E. The structure of the synapse. In: KANDEL, E. R. . G. S. R. . M. V. B. . B. J. M. **Cellular Biology of Neurons**. [S.l.]: Am. Physiol. Soc., 1977. p. 261–94.

HOLLMANN, M.; S., H. Cloned glu- tamate receptors. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 17, p. 31–108, 1994.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.** , v. 72, p. 609-642, 2003.

IMPEY, S.; OBRIETAN, K.; STORM, D. R. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. **Neuron**, v. 23, p. 11–14, 1999.

IRVINE, R. F. 20 years of Ins(1,4,5)P₃, and 40 years before. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 4, p. 586–90, 2003.

IVANOV, A. et al. Opposing role of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in regula- tion of the extracellular signal-regulated kinases (ERK) activity in cultured rat hippocampal neurons. **J Physiol**, v. 572, p. 789–798, 2006.

IZQUIERDO, I. M. J. H. Memory formation - the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connectio to activity in other brain structures. **Neurobiology Lear Mem**, v. 68, p. 285-316, 2007.

JENSEN, K. F. et al. Nuclear and axonal localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type Gr in rat cerebellar cortex. **Proc Nat Acad Sci**, v. 88, p. 2850-2853, 1991.

Jl, R. et al. MAP Kinase and pain. **Brain research reviews**, v. 60, p. 135-148, 2009.

Jl, R. R.; WOOLF, C. J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. **Neurobiol. Dis.**, v. 8, p. 1–10, 2001.

JOCHUM, W.; PASSEGUE, E.; WAGNER, E. F. AP-1 in mouse development and. **Oncogene** , v. 20, p. 2401–2412, 2001.

JOHNSON, L. N.; LEWIS, R. J. Structural basis for control by phosphorylation. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 2209–2242, 2001.

JOHNSON, L. N.; NOBLE, M. E. M.; OWEN, D. J. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. **Cell**, v. 85, p. 149–158, 1996.

KALB, R. The protean actions of neurotrophins and their receptors on the life and death of neurons. **Trends Neurosci** , v. 28, p. 5-11, 2005.

KANAI, Y. A.; HEDIGER, M. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. **Pflugers Arch**, v. 447, p. 469–479, 2004.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage, a dialogue between genes and synapses. **Science**, v. 294, p. 1030-1038, 2001.

KAPLAN, F. D.; MILLER, D. R. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 10, p. 381-391, 2000.

KAREGE, F. et al. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 136, p. 29-37, 2005.

KASTER, M. et al. The inhibition of different types of potassium channels underlies the antidepressant-like effect of adenosine in the mouse forced swimming test. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 31, p. 690-696, 2007.

KATOH-SEMBA, R. et al. Distribution of brain- derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. **J. Neurochem**, v. 69, p. 34–42, 1997.

KAWAKAMI, Y. E. A. Protein kinase C β II regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus- specific fashion. **J. Biol. Chem.**, v. 279, 2004.

KENNEDY, M. B.; BENNETT, M. K.; ERONDU, N. E. Biochemical and immunological evidence that the “major postsynaptic density protein” is a subunit of a calmodulin-dependent protein kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 80, p. 7357–7361, 1983.

KILPATRICK, D. C.; GREEN, C. Lectins as blood typing reagents. **Adv. Lectin Res.**, v. 5, p. 51-94, 1992.

KINDY, M. S. et al. Ischemic induction of protooncogene expression in gerbil brain. **J. Mol. Neurosci.**, v. 2, p. 217–228, 1991.

KIRNER, A. et al. Concanavalin A application to the olfactory epithelium reveals different sensory neuron populations for the odour pair D and L carvone. **Behav Brain Res**, v. 138, p. 201–6, 2003.

KITAGAWA, K. CREB an camp response element-mediated gene expression in the ischemic brain. **FEBS Journal**, v. 274, p. 3210-3217, 2007.

KNABLE, M. B. et al. Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. **Mol. Psychiatry**, v. 9, p. 609-620, 2004.

KOCKEL, L. et al. Jun in Drosophila development: redundant and nonredundant functions and regulation by two MAPK signal transduction pathways. **Genes Dev.**, v. 11, p. 1748–1758, 1997.

KOHR, G. NMDA receptor function: subunit composition and versus spatial distribution. **Cell Tissue Research**, v. 326, p. 439-446, 2006. ISSN 2.

KUBIE, J. L.; MULLER, R. U. Multiple representations in the hippocampus. **Hippocampus**, v. 1, p. 240-242, 1991.

LAURIE, D. J.; SEEBURG, P. H. Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. **J Neurosci**, v. 14, p. 3180–3194, 1994.

LAZARIS-KARATZAS, A.; MONTINE, K. S.; SONENBERG, N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. **Nature**, v. 345, p. 544–547, 1990.

LEE, R. et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. **Science**, v. 294, p. 1945- 1948, 2001.

LESSMANN, V.; HEUMANN, R. Modulation of unitary glutamatergic synapses by neurotrophin-4/5 or brain-derived neurotrophic factor in hippocampal microcultures: presynaptic enhancement depends on pre-established paired-pulse facilitation. **Neuroscience**, v. 86, p. 399–413, 1998.

LEVINE, E. S. et al. Brain-derived neurotrophic factor modulates hippocampal synaptic transmission by increasing N-methyl-D-aspartic acid receptor activity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 95, p. 10235–10239, 1998.

LEWIN, G. R.; BARDE, Y. A. Physiology of the neurotrophins. **Annu Rev Neurosci**, v. 19, p. 289–317, 1996.

LIEPINSH, E. et al. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. **EMBO J.**, v. 16, p. 4999–5005, 1997.

LIN, S. Y. et al. BDNF acutely increases tyrosine phosphorylation of the NMDA receptor subunit 2B in cortical and hippocampal postsynaptic densities. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 55, p. 20–27, 1998.

LIN, Y. et al. Activity-dependent regulation of inhibitory synapse development by Npas4. **Nature**, v. 455, p. 1198– 1204, 2008.

LIU, A., ZHUANG, Z., HOFFMAN, P.W., et al. Functional analysis of the rat N-methyl-D-aspartate receptor 2A promoter: multiple transcription start points, positive regulation by Sp factors, and translational regulation. **J Biol Chem** 278, 26423–26434. 2003.

LIU, A.; HOFFMAN, P. W.; LU, W.; BAI, G. NF-kappaB site interacts with Sp factors and up-regulates the NR1 promoter during neuronal differentiation. **J. Biol. Chem.** 279: 17449–17458; 2004.

LIU, Q. R. et al. Rodent BDNF genes, novel promoters, novel splice variants, and regulation by cocaine. **Brain Res.**, v. 1067, p. 1–12, 2006.

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, p. 402-8, 2001.

LOEW, L. M. et al. Physiological cytosolic Ca²⁺ transient evoke concurrent mitochondrial depolarization. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 12579–12583, 1994.

LOPES, A. C. P. et al. Aspectos moleculares da transmissão sináptica, 1999.

LOPES, F. C. et al. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins On the histamine release induced by plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** , v. 38, p. 935-941, 2005.

LORENTE DE NÓ, R. Studies on structure of cerebral cortex. II. Continuation of the study on the Ammonic system. **Journal of Psychology and Neurology** , v. 46, p. 117-177, 1934.

LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, p. 603–614, 2005.

LUNDY-EKMAN, L. **Neurociência: Fundamentos para a reabilitação**. [S.l.]: Elsevier, 2008.

LUO, J.; MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. **Cancer Cell**, v. 4, p. 257–62, 2003.

LYNCH, D. K. et al. Integrin-linked kinase regulates phosphorylation of serine 473 of protein kinase B by an indirect mechanism. **Oncogene**, v. 18, p. 8024–32, 1999.

LYNCH, G. S. et al. Intracellular injections of EGTA block the induction of hippocampal long-term potentiation. **Nature**, v. 305, p. 719–721, 1983.

MAISONPIERRE, P. C. et al. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. **Genomics** , v. 10, p. 558–568, 1991.

MAISONPIERRE, P. C. et al. NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. **Neuron** , v. 5, p. 501–509, 1990.

MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of leguminoseae seeds. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, v. 35, p. 1-156, 1957.

MALEK, R. et al. Role of nuclear factor kB in the central nervous system. **Pharmacological Reports**, v. 59, p. 25-33, 2007.

MALLINOW, R.; MALENKA, R. C. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. **Annu Rev Neurosci**, v. 25, p. 103-126, 2002.

MANEV, H. et al. Delayed increase of Ca influx elicited by glutamate: role in neuronal death. **Mol. Pharmacol.**, v. 36, p. 106–112, 1989.

MANNING, B.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB Signalling: navigation downstream. **Cell**, v. 129, p. 1261-1272, 2007.

MARCOUX, F. W.; PROBERT JR, A. W.; WEBER, M. L. Hypoxic neuronal injury in tissue culture is associated with delayed calcium accumulation. **Stroke**, v. 21, p. 71–74, 1990.

MARGOTTIL, E.; DOMENICI, L. NR2A but not NR2B N-methyl-D- aspartate receptor subunit is altered in the visual cortex of BDNF-knock- out mice. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 23, p. 165–174, 2003.

MARTIN, S. J.; CLARCK, R. E. The rodente hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, p. 401-431, 2007.

MARTINEZ, C. R. et al. The interaction of *Vatairea macrocarpa* and *Rhizobium tropici*: net H⁺ efflux stimulus and alteration of extracellular Na⁺ concentration. **FEMS microbiology Letters**, v. 238, p. 17-22, 2004.

MARTINOWICH, K. et al. DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. **Science** , v. 302, p. 890–893, 2003.

MARTINS, A. M. C. et al. Renal effects induced by the lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 1329-1334, 2005.

MATSUMOTO, T. et al. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. **Nat. Neurosci.** , v. 11, p. 131-133, 2008.

MAYER, M. C.; WESTBROOK, G. L.; GUTHRIE, P. B. Voltage dependent block by magnesium of NMDA responses in spinal cord neurones. **Nature**, v. 309, p. 261–267, 1984.

MAYER, M. L., AND L. VYKLICKY, JR. Concanavalin A selectively reduces desensitization of mammalian neuronal quisqualate receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 86:1411–1415. 1989.

MCALLISTER, A. K. Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. **Cell Mol Life Sci.**, v. 58, p. 1054–1060, 2001.

MCCLUNG, C. A.; NESTLER, E. J. Neuroplasticity mediated by altered gene expression. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 3-17, 2008. ISSN 1.

MCDONALD, B. J.; MOSS, S. J. Differential phosphorylation of intracellular domains of γ -aminobutyric acid type A receptor subunits by calcium/calmodulin type 2-dependent protein kinase and cGMP-dependent protein kinase. **J Biol Chem** , v. 269, p. 18111–18117, 1994.

MEFFERT, M. K. . B. D. Physiological functions for brain NF- κ B. **Trends in Neurosciences**, v. 28, 2005.

MEIRI, N.; ROSENBLUM, K. Lateral ventricle injection of the protein syntehsis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in spatial memory task. **Brain Res**, v. 789, p. 48-55, 1998.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **Jouranal Nutr**, v. 120, p. 1007S - 1015S, 2000.

MELLOR, H.; PARKER, P. J. The extended protein kinase C superfamily. **Biochem. J.**, v. 332, p. 281–292, 1998.

MELLSTROM, B. et al. Differential expression of the jun family members in rat brain. **Oncogene**, v. 6, p. 1959–1964, 1991.

MERZENICH, M. M. Somatosensory cortical map changes following digit amputation in adult monkeys. **J Comp Neurol**, v. 224, p. 591-605, 1984.

MESSERLI, M. A. et al. Periodic increases in elongation rate precede increases in cytosolic Ca²⁺ during pollen tube growth. **Dev Biol.**, San Diego, v. 222, p. 84-98, 2000.

MILNER, B. Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. **Annau Review Neurosciences**, v. 19, p. 421-446, 1972.

MISANIN, J. R.; MILLER, R. R.; LEWIS, D. J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shockafter reactivation of a consolidated memory trace. **Science**, v. 3, p. 554-555, 1968.

MITSUI, K. et al. Purification and characterization of calmodulin-dependent protein kinase III from rabbit reticuloocytes and rat pancreas. **Journal Biol Chem**, v. 268, p. 13422-13433, 1993.

MORA, A. et al. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. **Seminar in Cell e Development Biology**, v. 15, p. 161-170, 2004.

MURPHY, A. N.; FISKUM, G. B. M. F. Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, v. 19, p. 145–231, 1999.

MUZET, M.; DUPONT, J. L. Enhancement of NMDA receptor maturation by BDNF in cultured mouse cerebellar granule cells. **NeuroReport**, v. 7, p. 548–552, 1996.

NADER, K. Memory traces unbound. **Trends Neurosci.**, v. 26, p. 65–72 , 2003.

NADER, K.; SCHAPE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 17, p. 686-687, 2000.

NAKAMURA, T. et al. Synergistic release of Ca²⁺ from IP₃-sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with backpropagating action potentials. **Neuron**, v. 24, p. 727–737, 1999.

NARANJO, J. R. et al. Molecular pathways of pain: Fos/Jun-mediated activation of a noncanonical AP-1 site in the prodynorphin gene. **Neuron**, v. 6, p. 607–617, 1991.

NASE, G. et al. Genetic and epigenetic regulation of NMDA receptor expression in the rat visual cortex. **Eur. J. Neurosci.**, v. 11, p. 4320–4326, 1999.

NELSON, T. J. et al. Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. **Eur J Pharmacol**, v. 585, p. 76–87, 2008.

NEWTON, A. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. **Biochem J**, v. 370, p. 361-371, 2003.

NILSSON, L. C. **Lectins: Analytical Technologies**. Tallahassee: Elsevier, 2007.

NISHIMOTO, S.; NISHIDA, E. MAPK signaling: ERK5 versus ERK1/2. **EMBO reports**, v. 7, 2006.

NISWENDER, C. M.; CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology and disease. **Annu. Rev. Pharmacology and Toxicology**, v. 50, p. 295- 322, 2010.

NIU, J. E. A. RGS3 interacts with 14-3-3 via the N-terminal region distinct from the RGS (regulator of G-protein signalling) domain. **Biochem. J.**, v. 365, p. 677–684, 2002.

NOGUEIRA, N. A. **Purificação e caracterização biológica da lectina recombinante de *Canavalia brasiliensis* (rConBr) produzida em *Escherichia coli***. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1999. Tese de Doutorado.

NOWAK, L. et al. Magnesium-gated glutamate-activated channels in mouse central neurones. **Nature**, v. 307, p. 462–465, 1984.

NUMAKAWA, T. et al. BDNF function and intracellular signaling in neurons. **Histology and Histopathology**, v. 25, p. 237-258, 2010.

O'SHEA, D. R. Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 29, p. 1018–1023, 2002.

O'KEEFE, J. The hippocampal cognitive map and navigational strategies. In: J., P. **Brain and Space**. Oxford: Oxford Univ Press, 1991. p. 273-295.

OHIRA, K.; HAYASHI, M. A new aspect of the TrkB signalling pathway in neural plasticity. **Current Neuropharmacology**, v. 7, p. 276-285, 2009.

OKABE, S. Molecular anatomy of the postsynaptic density. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 34, p. 503-518, 2007.

OKAMOTO, S., SHERMAN, K., BAI, G., LIPTON, S. A. Effect of the ubiquitous transcription factors, SP1 and MAZ, on NMDA receptor subunit type 1 (NR1) expression during neuronal differentiation **Brain Res. Mol. Brain Res.** 107, 89–96. 2002.

OLNEY, J. W. Brain Lesions, Obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science** , v. 164, p. 719–721, 1969.

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, p. 31670– 31678, 1996.

ORREGO, F.; VILLANUEVA, S. The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. **Neuroscience** , v. 56, p. 539–555 , 1993.

PALADE, G. E.; PALAY, S. Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. **Anat. Rec.**, v. 118, p. 335, 1954.

PANG, P. T. et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. **Science** , v. 306, p. 487-491, 2004.

PAPADIA, S.; HARDINGHAM, G. E. The dichotomy of NMDA receptor Signalling. **The Neuroscientist**, v. 13 , p. 572 – 579, 2007.

PAWSON, T. & S. J. D. Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. **Science** , v. 278, p. 2075–2080, 1997.

PENG, J. E. A. Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 21003–21011, 2004.

PENG, S. et al. ERK in Learning and Memory: A Review os recent research. **Int. Journal of Mole. Science**, v. 11, p. 222-232, 2010.

PINES, G. et al. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. **Nature** , v. 360, p. 464–467, 1992.

PISANI, A. et al. Involvement of intracellular calcium stores during oxygen/glucose deprivation in stri- atal large aspiny interneurons. **J. Cereb. Blood Flow Metab**, v. 20, p. 839–846, 2000.

PLATT, S. R. The role of glutamate in central nervous system health and disease – A review. **The veterinary journal**, v. 173, p. 278-286, 2007.

POBBATI, A. V.; STEIN, A.; FASSHAUER, D. N- to C-terminal SNARE complex assembly promotes rapid membrane fusion. **Science**, v. 313, p. 673–76, 2006.

POLUNOVSKY, V. A. E. A. Translational control of the antiapoptotic function of Ras. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 24776– 24780, 2000.

POTTORF, W. et al. Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane Ca²⁺ pump activity in rat hippocampal neurons. **J Neurochem**, v. 98, p. 1646-56, 2006.

POW D. V., B. N. L. Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. **Neurosci Lett**, v. 280, p. 21–24, 2000.

PRICE, R. D. . M. S. A.; SHARKEY, J.; MATSUOKA, N. Advances in small molecules promoting neurotrophic function. **Pharmacology e Therapeutics**, v. 115, p. 292 – 306, 2007.

PRYBYLOWSKI, K. et al. The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. **Neuron**, v. 47, p. 845–857, 2005.

QUEVEDO, J. et al. Protein synthesis, PKA and Map Kinase are differentially involved in short and long-term memory in rats. **Behav Brain Res**, v. 154, p. 339-343, 2004.

QUINLAN, E. M. et al. Rapid, experience-dependent expression of synaptic NMDA receptors in visual cortex in vivo. **nature**, 1999.

RACAY, P. et al. Mitochondrial calcium transport and mitochondrial dysfunction after global brain ischemia in rat hippocampus. **Neurochem. Res.**, v. 34, p. 1469–1478, 2009.

RAIVICH, G. et al. The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. **Neuron**, v. 43, p. 57–67, 2004.

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

RAMON, M. C. C. S. **Histologie du Systeme Nerveux de l'Homme et des vertebres**. Paris: [s.n.], v. 2, 1911.

RAMOS, M. V. et al. Further characterization of the glyca-binding specificity of the seed lectin from *Vaitarea macrocarpa* and its dependence of pH. **Protein and Peptide Letters**, v. 7, p. 241-248, 2000.

REICHARDT, L. R. Neurotrophin-regulated signaling pathways. **Philosophical Trans. R. Soc B.**, v. 361, p. 1545-1564, 2006.

RENKONEN, K. O. Studies on hemagglutinins present in seeds of some representatives of Leguminosae. **Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.**, v. 26, p. 66-72, 1948.

RETAMAL, M. A. et al. S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 4475–4480, 2006.

RIES, F. A.; LANGWORTHY, O. R. A study of the surface structure of the brain of whale. **J. Comp Neuron.**, v. 68, p. 1 - 47. 1937.

ROBERTS, E. B.; RAMOA, A. S. Enhanced NR2A subunit expression and decreased NMDA receptor decay time at the onset of ocular dominance plasticity in the ferret. **J. Neurophysiol**, v. 81, p. 2587–2591, 1999.

RODRIGUEZ, D. et al. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 25, p. 823-826, 1992.

ROLLS, E. T. Memory systems in the brain. **Annu Rev Psychol**, v. 51, p. 599-630, 2000.

ROSAS, S.; VARGAS, M. A.; LOPEZ-BAYGHEN, E.; ORTEGA, A. Glutamate-dependent transcriptional regulation of GLAST/EAAT1: a role for YY1 **Journal of Neurochemistry**, 101, 1134–1144. 2007.

ROSENMUND, C.; RETTIG, J.; BROSE, N. Molecular mechanisms of active zone function. **Curr. Opin. Neurobiol**, v. 13, p. 509–19, 2003.

SAEZ, M. et al. The therapeutic potential of the calpain family: new aspects. **Drug Discovery Today**, p. 917-23, 2006.

SAKABA, T. et al. Distinct kinetic changes in neurotransmitter release after SNARE protein cleavage. **Science**, v. 309, p. 491–94, 2005.

SANACORA, G. et al. Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. **Nature reviews**, v. 7, p. 426-436, 2008.

SANDOVAL, S.; PIGAZZI, M.; SAKAMOTO, K. M. CREB: a key regulator of normal and neoplastic hematopoiesis. **Advances in hematology**, 2009.

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 Letters**, v. 405, p. 114-118, 1997.

SARBASSOV DOS, D. et al. Phosphorylation and regulation of Akt/ PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, p. 1098–101, 2005.

SATTLER, R. et al. Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. **J. Neurochem**, v. 71, p. 2349–2364, 1998.

SCHÄBITZ, W. R. et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. **Stroke**, v. 31, p. 2212- 2217, 2000.

SCHIKORSKI, T.; STEVENS, C. F. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapses. **J. Neurosci.**, p. 17, 5858–67 1997.

SCHINDER, A. et al. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. **J Neurosci** , v. 16, p. 6125–6133, 1996.

SCHLICHTING, C. D. The Evolution of phenotypic plasticity in Plants. **R. ev. Ecol. Syst.**, v. 17, p. 667-693, 1986.

SCHMELZLE, T.; HALL, M. N. TOR, a central controller of cell growth. **Cell** , v. 103, p. 253–262, 2000.

SCREATON, R. A.; CONKRIGHT, M. D.; KATOH, Y. The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP- sensitive coincidence detector. **Cell**, v. 119, p. 61–74, 2004.

SEE, V. et al. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase type IV (CaMKIV) inhibits apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. **FASEB**, v. 15, p. 134-144, 2001.

SEIDAH, N. G. et al. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. **FEBS Lett.**, v. 379, p. 247–250, 1996.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: size of the combining site loops and their primary specificity. **J. Mol. Biol.**, v. 267, p. 433-445, 1997.

SHARON, N. Carbohydrates. **Scientific American**, v. 243, p. 80-97, 1980.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. 2º Edição. ed. [S.l.]: Kluwer Academic Publishers, 2003.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. **FASEB J.**, v. 4, p. 3198-3207, 1990.

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– 861, 1999.

SHEPHERD, G. M.; KOCH, C. Introduction to synaptic circuits. In: SHEPHERD, G. M. **Synaptic Organization of the Brain**. New York: Oxford University Press, 1997. p. 1-36.

SHOOTER, E. M. Early days of the nerve growth factor proteins. **Annu Rev Neurosci** , v. 24, p. 601-629, 2001.

SILVA, W. C. F. N. **Inibição da síntese de mRNA no hipocampo prejudica a consolidação e reconsolidação de memória espacial**. Tese de Doutorado. [S.l.]: UFRGS, 2010.

SILVERMAN-GAVRILA, L. B.; LEW, R. Regulation of the tip-high [Ca²⁺] gradient in growing hyphae of the fungus *Neurospora crassa*. **Eur J Cell Biol**, Stuttgart, v. 80, p. 379-390, 2001.

SINERVO, B.; CALSBEEK, R. Physiological epistasis, ontogenetic conflict and natural selection on physiology and life history. **Integr. Comp. Biol.**, v. 43, p. 419-430, 2003.

SKWAREK, L. C.; BOULIANNE, G. L. Great expectations for PIP: Phosphoinositides as regulators of signaling during development and disease. **Developmental Cell Review**, v. 16, 2009.

SOFRONIEW, M. V. et al. Survival of adult basal cholinergic neurons after loss of target neurons. **Science**, v. 247, p. 338–342, 1990.

SONG, D. K. et al. Brain-derived neurotrophic factor rapidly potentiates synaptic transmission through NMDA, but suppresses it through non-NMDA receptors in rat hippocampal neuron. **Brain Res**, v. 799, p. 176–179, 1998.

SORENSEN, J. B. et al. The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 1627–32, 2002.

SQUIRE, L. R. The neuropsychology of human memory.. **Annu. Rev. Neurosci.** , v. 5, p. 241–273, 1982.

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory system. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 13515-13522, 1996.

STORCK, T. et al. Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. **Proc. Natl. Acad. Sci.** , v. 89, p. 10955–10959, 1992.

STRACK, S. et al. Translocation of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II to the PSD. **J. Bio. Chem**, v. 272, p. 13467-13470, 1997.

STRYNADKA, N. C.; JAMES, M. N. Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 951-998, 1989.

SUDHOF, T. C. The synaptic vesicle cycle. **Annu Rev. Neurosci.** , v. 27, p. 509-547, 2004.

SUEN, P. C. et al. Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances phosphorylation of the postsynaptic N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 8191–8195, 1997.

SWALLOW, J. G.; GARLAND, T. J. Selection experiments as a tool in evolutionary and comparative physiology: insights into complex traits – an introduction to the symposium. **Integr. Comp. Biol.**, v. 45, p. 387-390, 2005.

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

SZYDLOWSKA, K.; TYMIANSKI, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 47, p. 122-129, 2010.

TAKAYASU, Y. et al. Glial glutamate transporters maintain one-to-one relationship at the climbing fiber–Purkinje cell synapse by preventing glutamate spillover. **J Neuroscience**, v. 26, p. 6563–6572, 2006.

TAKEI, N. et al. Brain-derived neurotrophic factor induces rapid and transient release of glutamate through the non-exocytotic pathway from cortical neurons. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 27620–27624, 1998.

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, p. 1123–1129, 1994.

TAPIERO, H. et al. Glutamine and glutamate. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 446–457, 2002.

TAVARES, A. L. A. **Padrões De Descarga Neuronal Na Região De CA1 Do Hipocampo De Pacientes Com Epilepsia Do Lobo Temporal E De Ratos Com Epilepsia Induzida Pela Pilocarpina: Um Estudo Comparativo.** Tese de Doutorado. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

TAYLOR, S. S.; RADZIO-ANDZELM, E. Three protein kinase structures define a common motif. **Structure** 2, p. 345–355, 1994.

TIMMUSK, T. et al. Multiple promoters direct tissue-specific expression of the rat BDNF gene. **Neuron** , v. 10, p. 475–489, 1993.

TISCHMEYER, W. et al. Sequence-specific impairment of learning by c-jun antisense oligonucleotides. **Neuroreport** , v. 5, p. 1501–1504, 1994.

TISCHMEYER, W.; GRIMM, R. Activation of immediate early genes and memory formation. **Cell Mol Life Sci**, v. 574, p. 564--574, 1999.

TOSKA, K. E. A. Regulation of tyrosine hydroxylase by stress- activated protein kinases. **J. Neurochem.**, v. 83, p. 775–783 , 2002.

TOVAR, K. R.; WESTBROOK, G. L. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 4180–4188, 1999.

TRONSON, N. C. et al. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on maygdalar protein kinase A. **Nat Neurosci**, v. 9, p. 167-169, 2006.

TRONSON, N. C.; TAYLOR, J. R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, p. 262-275, 2007.

TURNER DA, B. E. H. N. E. N. R. Morphological features of the entorhinal-hippocampal connection. **Prog Neurobiol** , v. 55, p. 537- 562, 1998.

TYMIANSKI, M. et al. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. **J. Neurosci.**, v. 13, p. 2085–2104, 1993.

VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, p. 575-692, 1998.

VAN DAMME, E. J. M. et al. The Bark of Robinia pseudoacacia Contains a Complex Mixture of Lectins. **Plant Physiol**, v. 107, p. 833-843, 1995.

VAN HEMERT, M. J.; VAN HEUSDEN, G. P.; STEENSMA, H. Y. Yeast 14-3-3 proteins. **Yeast**, v. 18, p. 889–895, 2001.

VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D. R. The PI3K-PDKq connection: more than just a road to PKB. **Biochem. J.**, v. 346, p. 561-576, 2000.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories. **Glycobiology**, v. 3, p. 97–130, 1993.

VARKI, A. et al. **Essentials in Glycobiology**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

VAROQUI, H. et al. Identification of the differentiation- associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicularglutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. **J. Neurosci.**, v. 22, p. 142–155, 2002.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nature Rev. Cancer**, v. 2, p. 489–501, 2002.

WAGNER, B.; HAYES. T.; HOBAN. C.; COCHRAN, B. The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. **Embo J** 9: 4477–84. 1990.

WALTON, M.; DRAGUNOW, M. Is CREB a key to neuronal survival?. **TINS**, v. 23, p. 48-52, 2000.

WANG, K. H. et al. In vivo two-photon imaging reveals a role of Arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. **Cell**, v. 126, p. 389–402, 2006.

WANG, Q. E. A. Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 36602–610, 2002.

WANG, S. H.; MORRIS, R. G. M. Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation and reconsolidation. **Annu Rev. Psychol**, v. 61, p. 29-79, 2010.

WAYMAN, G. A. et al. Calmodulin-Kinases: modulators of neuronal development and plasticity. **Neuron Review**, v. 59, p. 914-930, 2008.

WENDEL, H. G. Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. **Nature**, v. 428, p. 332–337, 2004.

WENTHOLD, R. J. et al. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 1982–1989, 1996.

WESTHEIMER, F. H. Why nature chose phosphates. **Science**, v. 235, p. 1173–1178, 1987.

WISDEN W, S. P. Mammalian ionotropic glutamate receptors. **Curr. Op. Neurobiol.**, v. 3, p. 291–98, 1993.

WISDEN, W. et al. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. **Neuron**, v. 4, p. 603–614, 1990.

WU, H.; ZHOU, Y.; XIONG, Z. Q. Transducer of regulated CREB and late phase long-term synaptic potentiation. **The FEBS Journal**, v. 274, p. 3218–3223, 2007.

WU, W. M.; PARDRIDGE, D. Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 254–259, 1999.

YAFFE, M. B. How do 14-3-3 proteins work? — Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. **FEBS Lett.**, v. 513, p. 53–57, 2002.

YANG, J. et al. Neuronal release of proBDNF. **Nat. Neurosci.**, v. 12, p. 113–115, 2009.

YANG, R. Y.; LIU, F. T. Galectins in cell growth and apoptosis. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 60, p. 267–276, 2003.

YANG, R. Y.; RABINOVICH, G. A.; LIU, F. T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expert review in molecular medicine**, vol 10. 2008.

YASHIRO, K.; PHILPOT, B. D. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. **Neuropharmacology**, v. 55, p. 1081–1094, 2008.

YUSTE, R. et al. Neuronal domains in developing neocortex: mechanisms of coactivation. **Neuron**, v. 14, p. 7–17, 1995.

ZHANG, X.; POO, M. M. Progress in neural plasticity. **Sci China Life Sci**, v. 53, p. 322–329, 2010.

ZHU, J. J. et al. Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. **Nat Neurosci**, v. 3, p. 1098–1106, 2000.