



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

Isabella Aparecida Heinrich

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CULTURA  
ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATO PARA  
AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR  
DA LECTINA *Canavalia brasiliensis* (ConBr) EM UM MODELO  
*IN VITRO* DE ISQUEMIA CEREBRAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Dr. Rodrigo Bainy Leal  
Coorientadora: Dra. Débora Kurrle Rieger Venske

Florianópolis

2016

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

Heinrich, Isabella Aparecida  
PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CULTURA ORGANOTÍPICA DE  
HIPOCAMPO DE RATO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR  
DA LECTINA Canavalia brasiliensis (ConBr) EM UM MODELO IN  
VITRO DE ISQUEMIA CEREBRAL / Isabella Aparecida Heinrich ;  
orientador, Rodrigo Bainy Leal ; coorientadora, Débora  
Kurrle Rieger Venske. - Florianópolis, SC, 2016.

90 p.

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

Inclui referências

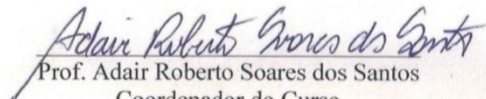
1. Neurociências. 2. Lectina. 3. Isquemia. 4. Cultura  
Organotípica Hipocampal. 5. Neuroproteção. I. Bainy Leal,  
Rodrigo. II. Kurrle Rieger Venske, Débora. III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Neurociências. IV. Título.

**ISABELLA APARECIDA HEINRICH**


**“PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE CULTURA ORGANOTÍPICA DE HIPOCAMPO DE RATO PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA LECTINA *CANAVALIA BRASILIENSIS* (CONBR) EM MODELO IN VITRO DE ISQUEMIA CEREBRAL”**

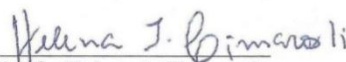
Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de Mestre em Neurociências na área de Neurobiologia Celular e Molecular no Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2016.

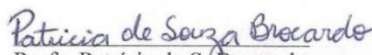
  
Prof. Adair Roberto Soares dos Santos  
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

  
Prof. Rodrigo Bairy Leal  
Orientador – UFSC

  
Prof. Helena I. Cimarosti  
Membro - UFSC

  
Prof. Manuella P. Kaster  
Membro - UFSC

  
Prof. Patricia de S. Brocardo  
Membro - UFSC

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Rodrigo Bainy Leal por me possibilitar trabalhar em seu laboratório e vivenciar esse mundo científico, por conceder a execução deste trabalho, pelos conselhos e ensinamentos que contribuíram muito para o meu progresso.

À minha coorientadora Débora, simpatia total, por ter me apresentado, de fato, a belíssima cultura organotópica e por ter me proporcionado tamanho aprendizado técnico-intelectual. Obrigada pelo suporte e dedicação! Você me inspira!

À querida Jade por ter colaborado muito com meus resultados. Agradeço todas as sugestões e incentivo. Obrigada por toda a ajuda com a linda imunohistoquímica!

Aos companheiros do laboratório Neuroquímica 3: Ana Paula, Filipe, Helena, Igor, Ingrid, Jhônatas, Mark e Priscilla, por me ensinarem as técnicas, quantificações (né Mark?! obrigada pela paciência!), pelas dicas, amizade e convivência. Obrigada por tornarem minha rotina mais alegre!

Aos demais laboratórios, colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Biotério Central da UFSC, em especial a admirável Arlete por toda a dedicação, capricho e organização. Obrigada pelos “bom-dias” simpáticos, pela alegria e prestatividade de sempre!

Ao PPG Neurociências pela oportunidade. Agradeço ao Nivaldo pela prontidão e simpatia.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, por promoverem um ótimo ambiente de estudo e trabalho.

Aos meus pais, Luiz Lauro e Vera Lúcia, pela vida, por tudo que me proporcionaram mediante muito trabalho. Obrigada por serem meus

exemplos de responsabilidade, dignidade e integridade. Amo profundamente vocês!

À minha amada família como um todo (tios, tias, primos e primas) por todos os maravilhosos momentos compartilhados, banquetes, “jogatinas” e todas as sensacionais aventuras! Valeu tio Luiz Carlos: o patriarca sempre à frente das divertidas programações!

À minha segunda família, os Golfetto-Ulianos, por terem me aceitado e me acolhido com muito carinho e amor. Obrigada pelo voto de confiança, por serem zelosos e gentis comigo!

A todos os meus amigos (de infância, do colégio, da graduação) que representaram parceria nos mais diversos momentos da minha vida e contribuíram muito para a minha formação pessoal e profissional.

Em especial ao meu porto seguro: Vinicius. Agradeço imensamente pela paciência, por sempre me receber com um sorriso, um carinho, mesmo que eu tenha demorado a chegar do laboratório... e também pelas vezes que me acompanhou quando precisei ir ao laboratório em horários complicados. Agradeço por ter me amparado nos meus momentos de choro, aflição, ansiedade mil. Muito obrigada pelo acalento, cumplicidade e por todo o amor!

A todos que me querem bem, que torceram e torcem por mim, meu muito obrigada!!!

## RESUMO

Lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos presentes em glicoconjugados podendo regular diversas funções celulares em eventos fisiológicos e patológicos. ConBr é uma lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis* e possui alta afinidade por glicose/manose. Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que ConBr apresenta efeito neuroprotetor em relação às convulsões induzidas por ácido quinolínico e à excitotoxicidade glutamatérgica em fatias de hipocampo por mecanismos que podem envolver inibição de receptores NMDA e a modulação da via PI3K/Akt. A isquemia cerebral está entre as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo, o que torna essa patologia alvo de muitos estudos para o entendimento dos mecanismos que desencadeiam morte neuronal e de estratégias de neuroproteção. Culturas organotípicas hipocâmpais (COH) submetidas à privação de oxigênio e glicose representam um modelo *in vitro* de isquemia cerebral e têm sido utilizadas para compreender as alterações neuroquímicas e celulares nesse processo bem como para pesquisar possíveis agentes neuroprotetores. O objetivo desse estudo foi padronizar, para as condições locais, a técnica de cultura organotípica hipocâmpal (COH) e investigar o potencial neuroprotetor de ConBr sobre essas culturas submetidas à privação de oxigênio e glicose e reperfusão (POG/Rep). Nossos resultados demonstram que o tratamento com ConBr (1 µg/mL) diminuiu significativamente a morte celular induzida por POG na região CA1 do hipocampo. Através das análises de imunohistoquímica, podemos observar alterações na morfologia dos astrócitos com escassez de ramificações no grupo POG. O tratamento com ConBr promoveu significativa melhora da viabilidade celular sendo capaz de manter a densidade e morfologia dos astrócitos positivos para GFAP semelhantes ao grupo controle. Além disso, POG induziu uma diminuição de células positivas para NeuN e o tratamento com ConBr foi capaz de reverter esse processo. Embora mais estudos sejam necessários para avaliar os mecanismos de neuroproteção de ConBr frente ao dano isquêmico, os resultados obtidos neste estudo indicam o potencial de lectinas de plantas como estratégia para neuroproteção.

**Palavras-chave:** Lectina, ConBr, Isquemia, Cultura organotípica hipocâmpal, GFAP, NeuN

## ABSTRACT

Lectins are carbohydrate-binding proteins that can recognize glycoconjugates, regulating many cell functions in physiological and pathological events. ConBr is a lectin isolated from *Canavalia brasiliensis* seeds that displays high affinity for mannose/glucose. Previous work by our group demonstrated that ConBr displays neuroprotective effect against seizures induced by quinolinic acid and glutamatergic excitotoxicity in hippocampal slices, through a mechanism involving NMDA inhibition and modulation of PI3K/Akt. Cerebral ischemia is one of the main causes of morbidity and mortality in the world, which makes this pathology target of many studies to understand the mechanisms that trigger neuronal death and to search strategies for neuroprotection. Organotypic hippocampal cultures (OHCs) subjected to oxygen and glucose deprivation has been applied as *in vitro* model to study the neurochemical and cellular alterations in the cerebral ischemia, as well as to search compounds with neuroprotective activity. The aim of this study was to adapt the technic of organotypic hippocampal cultures (OHC) for our local conditions and investigate the neuroprotective potential of ConBr on these cultures subjected to oxygen and glucose deprivation and reperfusion (OGD/Rep). Our results demonstrate that treatment with ConBr (1 $\mu$ g/mL) significantly decrease OGD-induced cell death in CA1 region of the hippocampus. Through immunohistochemical analysis, we can observe changes in the morphology of astrocytes with scarce ramifications in the OGD group. Treatment with ConBr promoted significant improvement in cell viability being able to maintain the density and morphology of the GFAP-positive astrocytes similar to the control group. In addition, we observed a decrease of NeuN-positive cells in the OGD group and treatment with ConBr was able to improve neuronal survival. Although further studies will be necessary to evaluate the neuroprotective mechanisms induced by ConBr against ischemic damage, the results obtained in the present study suggest the potential of plant lectins as a strategy for neuroprotection.

**Keywords:** Lectin, ConBr, Ischemia, Organotypic hippocampal culture, GFAP, NeuN

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Canavalia brasiliensis</i> (Feijão Bravo do Ceará).....	17
Figura 2. Estrutura global dos tetrâmeros de ConA e ConBr e a disposição das quatro subunidades.....	18
Figura 3. Visão geral dos mecanismos fisiopatológicos que ocorrem na isquemia .....	20
Figura 4. Técnica de roller drum.....	24
Figura 5. Técnica de interface.....	25
Figura 6. Esquema geral da ativação da via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) .....	30
Figura 7. Representação esquemática do protocolo de POG/Rep.....	37
Figura 8. Preparação da cultura organotípica hipocampal (COH) .....	43
Figura 9. Cultura organotípica hipocampal (COH) obtida de ratos.. ....	45
Figura 10. Avaliação da fosforilação de Akt, GSK-3 $\beta$ , p38 <sup>MAPK</sup> e da expressão de $\beta$ -catenina, após 6 horas de reperfusão, em COHs submetidas à POG/Rep .....	47
Figura 11. Avaliação da fosforilação de Akt, GSK-3 $\beta$ , p38 <sup>MAPK</sup> e da expressão de $\beta$ -catenina, após 12 horas de reperfusão, em COHs submetidas à POG/Rep .....	48
Figura 12. Efeito neuroprotetor da ConBr em COHs (região CA1) submetidas à POG/Rep .....	50
Figura 13. Avaliação da morte celular em COHs (região GD) submetidas à POG/Rep .....	51
Figura 14. Efeito da ConBr sobre a imunorreatividade para GFAP e morfologia dos astrócitos em COHs (região CA1) submetidas à POG/Rep .....	53
Figura 15. Imunorreatividade para GFAP em COHs (região GD) submetidas à POG/Rep .....	54
Figura 16. Efeito neuroprotetor da ConBr sobre a imunorreatividade para NeuN em COHs (região CA1) submetidas à POG/Rep.....	56
Figura 17. Imunorreatividade para NeuN em COHs (região GD) submetidas à POG/Rep .....	57



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA - Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico  
ANOVA - Análise de variância  
AQ - Ácido quinolínico  
ATP -Trifosfato de adenosina  
BHE - Barreira hematoencefálica  
BDNF - Fator neurotrófico derivado do encéfalo  
CA1 - Corno de Amon 1(*Cornu Ammonis1*)  
CA3 - Corno de Amon 3(*Cornu Ammonis3*)  
COH - Cultura organotípica hipocampal  
ConA - Concanavalina A, lectina extraída das sementes de *Canavalia ensiformis*  
ConBr - Lectina extraída das sementes de *Canavalia brasiliensis*  
CRD - Domínio de reconhecimento de carboidrato  
CREB - Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico  
DIV - Dias *in vitro*  
D.O. - Densidade óptica  
DNA - Ácido desoxirribonucléico  
EPD - Dia pós-natal equivalente  
EPM - Erro padrão da média  
ERK - Cinase regulada por sinal extracelular  
EROs - Espécies reativas ao oxigênio  
GABA - Ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
Gal-1 - Galectina-1  
GD - Giro denteado  
GFAP - Proteína glial fibrilar ácida  
GMPc - Guanosina monofosfato cíclico  
HBSS - Solução equilibrada de sais de Hank's  
HEPES - Ácido n-2-hidroxiethylpiperazina  
i.c.v. - Intracerebroventricular  
IP - Iodeto de propídeo  
JNK - c-Jun cinase amino-terminal  
MAPK - Proteína cinase ativada por mitógeno  
MAP2K - Cinase da proteína cinase ativada por mitógeno  
MAP3K - Cinase da cinase da proteína cinase ativada por mitógeno  
MEK - Cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular  
MEKK - Cinase da cinase da proteína cinase regulada por sinal extracelular  
Narp - Pentraxina regulada pela atividade neuronal

NeuN - Proteína nuclear neuronal específica  
NGF - Fator de crescimento do nervo  
NMDA - N-metil-D-aspartato  
PI3K - Fosfatidilinositol 3 cinase  
PBS - Tampão salina fosfato  
PKA - Proteína cinase A  
PKC - Proteína cinase C  
POG - Privação de oxigênio e glicose  
Rep - Reperfusão  
RTK - Receptor tirosina cinase  
SAPK - Proteína cinase ativada por estresse  
SDS - Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS  
SNC - Sistema nervoso central  
TA - Temperatura ambiente  
TBS - Tampão tris-salina  
TBS-T -Tampão tris-salina com Tween-20  
TNF - Teste do nado forçado  
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1	Lectinas.....	13
1.1.1	Lectinas endógenas.....	14
1.1.2	Lectinas extraídas de plantas .....	15
1.1.2.1	ConBr .....	17
1.2	Isquemia cerebral.....	19
1.3	Cultura organotípica .....	23
1.4	Sinalização celular .....	29
1.4.1	Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) .....	29
1.4.2	Via da fosfatidilinositol-3 cinase/Akt (PI3K/Akt).....	30
1.5	Astroglia e neurônios .....	31
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1	Objetivo geral .....	35
3.2	Objetivos específicos .....	35
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>36</b>
4.1	Purificação da lectina ConBr .....	36
4.2	Animais.....	36
4.3	Preparação das culturas organotípicas hipocampais (COH) ....	36
4.4	Privação de oxigênio e glicose e reperusão (POG/Rep) .....	37
4.5	Western Blotting .....	38
4.6	Avaliação de morte celular utilizando o iodeto de propídio ....	40
4.7	Imunohistoquímica .....	40
4.8	Análise Estatística.....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
5.1	CAPÍTULO 1 .....	42

5.1.1	Padronização da técnica de cultura organotípica hipocampal (COH).....	42
5.2	CAPÍTULO 2 .....	46
5.2.1	O modelo de privação de oxigênio e glicose e reperfusão (POG/Rep) quanto a modulação de Akt, GSK-3 $\beta$ , $\beta$ -catenina e p38 <sup>MAPK</sup> , após 6 e 12 h de reperfusão .....	46
5.2.2	Efeito da ConBr sobre a viabilidade celular de COHs submetidas à POG/Rep .....	49
5.2.3	Efeito da ConBr sobre a imunorreatividade para GFAP em COHs submetidas à POG/Rep .....	52
5.2.4	Efeito da ConBr sobre a imunorreatividade para NeuN em COHs submetidas à POG/Rep .....	54
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Lectinas

A partir de 1970, ficou bem estabelecido que a maioria das células apresentam sua superfície recoberta por carboidratos, na forma de glicoproteínas, glicolípídeos e proteoglicanos (COOK, 1986). Tornou-se, portanto, evidente o enorme potencial dos carboidratos em codificar informações biológicas (SHARON & LIS, 1989).

Glicanos têm sido reconhecidos como participantes de interações entre células neurais tanto no desenvolvimento como no sistema nervoso adulto. Receptores para proteínas de matriz extracelular, receptores para fatores neurotróficos, receptores glutamatérgicos, transportadores de neurotransmissores e canais iônicos possuem natureza glicoprotéica e as cadeias de açúcares presentes nestas proteínas parecem estar envolvidas em diversas funções nas células neuronais, tais como: migração celular, crescimento de neuritos, formação de sinapses e sua estabilização, modulação da eficácia sináptica e da neuroplasticidade (KLEENE & SCHACHNER, 2004).

O envolvimento dos carboidratos e glicoconjugados como bio-sinalizadores na comunicação intercelular e no controle de vias de sinalização intracelular tem estimulado o crescente número de estudos na área de glicobiologia, principalmente para determinar a natureza de suas interações em condições fisiológicas, bem como em condições patológicas (LIS & SHARON, 1993; OHTSUBO & MARTH, 2006; SOUZA et al., 2013). As informações presentes na estrutura dos oligossacarídeos conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células são reconhecidas por um grupo especializado de proteínas, as lectinas (LIU & RABINOVICH, 2005).

As lectinas representam um grupo de proteínas que apresentam pelo menos um sítio de ligação não catalítico que reconhece e liga seletivamente, de forma reversível, a carboidratos ou glicoconjugados (SHARON & LIS, 1995; MINKO, 2004).

A atividade de ligação a carboidratos da maioria das lectinas é determinada por resíduos de aminoácidos limitados designados como domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) (SHARON & LIS, 2004). O CRD tipicamente reconhece resíduos de carboidratos das glicoproteínas e glicolípídeos da membrana celular (MODY et al., 1995). A interação entre o carboidrato e as lectinas acontece através de

ligações de hidrogênio, associação de resíduos de monossacarídeos com metais ou ainda interações iônicas e hidrofóbicas, que contribuem para a afinidade de ligação (SHARON & LIS, 2004).

### 1.1.1 Lectinas endógenas

No sistema nervoso central (SNC) podem ser encontradas diversas lectinas envolvidas em uma enorme variedade de processos biológicos. Essas lectinas apresentam afinidade por diversos açúcares incluindo glicose/manose, N-acetil glicosamina e galactose (MARSCHAL et al., 1989; ALMKVIST & KARLSSON, 2004; ENDO, 2005; DANI & BROADIE, 2012). Contudo, as lectinas com afinidade por galactose (galectinas) têm se destacado como importantes moléculas moduladoras da função neural (SAKAGUCHI et al., 2011; STAROSSOM et al., 2012). Esta família de lectinas, composta por 15 proteínas hidrossolúveis, é caracterizada por possuir em sua estrutura um domínio responsável pela interação da proteína com carboidratos (RABINOVICH & CROCI, 2012).

Galectina-1 (Gal-1) foi a primeira proteína descoberta na família das galectinas. Gal-1 é uma pequena proteína de 14 kDa, que na sua forma dimérica apresenta capacidade de ligação a carboidratos, especialmente N-acetil-lactosamina, tem sido largamente estudada pelos seus efeitos no SNC (KAJITANI et al., 2009; QU et al., 2010; QU et al., 2011; DI LELLA et al., 2011). Essa lectina apresentou atividade neuroprotetora contra a neurotoxicidade produzida por glutamato em cultura de neurônios cerebelares, envolvendo alterações na expressão e composição de receptores glutamatérgicos (LEKISHVILI et al., 2006). Além disso, o aumento na expressão de Gal-1 pode conduzir uma série de respostas neuroprotetoras e sobre a neuroplasticidade que incluem: indução da diferenciação astrocitária (SASAKI et al., 2004); efeito neuroprotetor por induzir a expressão do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) (ENDO, 2005; QU et al., 2010); estímulo da neurogênese (SAKAGUCHI et al., 2006; ISHIBASHI et al., 2007; KAJITANI et al., 2009; SAKAGUCHI et al., 2010); inibição da astrogliose e proteção contra os danos celulares, como diminuição da perda neuronal, e funcionais pós-isquêmicos (QU et al., 2011).

Outra lectina expressa no SNC é a pentraxina regulada pela atividade neuronal (Narp). Ela pertence à família das pentraxinas que são constituídas por cinco subunidades idênticas e unidas por ligações não covalentes (SCHWALBE et al., 1992). Estas proteínas

caracterizam-se por uma sequência homóloga com um domínio de reconhecimento de carboidrato e dependência de  $\text{Ca}^{2+}$  para ligação, semelhante às lectinas de leguminosas.

A Narp é altamente expressa no hipocampo e no córtex, e está presente tanto em compartimentos pré quanto pós-sinápticos (RETI et al., 2002; CHANG et al., 2010). Narp está envolvida no recrutamento de receptores de glutamato do tipo AMPA com a formação de grandes agregados (DITYATEV & SCHACHNER, 2003). Vários estudos suportam a hipótese de que a proteína Narp desempenha um papel na formação de novas sinapses excitatórias, agregando esses receptores AMPA nas sinapses estabelecidas, e na plasticidade neuronal (TSUI et al., 1996; O'BRIEN et al., 1999; O'BRIEN et al. 2002).

Existem indícios de que Narp e a expressão de BDNF estão relacionadas em diferentes regiões e em vários estágios de desenvolvimento atuando na plasticidade sináptica (TONG et al., 2001, WIBRAND et al., 2006 e SPIEGEL et al., 2014). Um estudo recente demonstrou que uma diminuição da expressão de BDNF resulta em redução significativa da expressão de Narp, postulando que Narp é um alvo transcricional direto do BDNF. A sinalização de BDNF é ativada principalmente via MAPK, levando a um aumento na Narp, que coordena o processo de plasticidade na sinapse (MARIGA et al., 2015).

### **1.1.2 Lectinas extraídas de plantas**

Entre as lectinas mais estudadas estão as lectinas de plantas. Estas têm sido muito utilizadas como ferramentas no estudo das funções das cadeias de açúcares em uma variedade de fenômenos biológicos das células animais (CAVADA et al., 2001). As lectinas de plantas podem ser utilizadas com facilidade e com baixo custo não apenas como moléculas de reconhecimento de açúcares específicos expressos na superfície celular, mas também como ferramentas para modulação de diversas atividades biológicas, incluindo: atividades antitumorais (FU et al., 2011); atividade estimuladora da produção de óxido nítrico (ANDRADE et al., 1999); ação anti-inflamatória (CAVADA et al., 2001); atividade antinociceptiva (DE FREITAS PIRES et al., 2013).

As lectinas vegetais da família Leguminosae (Fabaceae) têm sido as mais estudadas, representando um grupo de proteínas similares estruturalmente, mas com diferentes especificidades a carboidratos. Elas possuem a capacidade potencial de modular alvos moleculares no SNC e podem estar envolvidas na regulação comportamental, na

neuroplasticidade, ou mesmo na resposta a determinadas drogas de ação central (LIN & LEVITAN, 1991; BOEHM & HUCK, 1998; RUSSI et al., 2012).

Dentro da família Leguminosae, a subtribo mais investigada é Diocleinae que compreende 13 principais gêneros, dentre eles observam-se: *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* dos quais lectinas têm sido purificadas e caracterizadas, sendo muitas de origem brasileira, como as extraídas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Dioclea violacea* (Dviol) e *Dioclea grandiflora* (DGL), entre outras (CAVADA et al., 2001).

A lectina Concanavalina A (ConA), obtida das sementes de *Canavalia ensiformis* (Família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae), foi a primeira lectina a ser purificada (SUMNER & HOWELL, 1936), sequenciada e cuja estrutura tridimensional foi resolvida por cristalografia de raios-x (EDELMAN et al., 1972; HARDMAN & AINSWORTH, 1972). ConA apresenta uma estrutura tetramérica, em que cada um dos seus monômeros contém 237 resíduos de aminoácidos. Tal lectina apresenta afinidade pelos monossacarídeos D-glicose e D-manose (CAVADA et al., 2001).

A partir do isolamento de ConA, diversas lectinas com similaridade estrutural e com propriedades físicas similares têm sido purificadas e caracterizadas de outras espécies da subtribo Diocleinae, como a ConBr extraída das sementes de *Canavalia brasiliensis* (MOREIRA & CAVADA, 1984), DguiL extraída das sementes de *Dioclea guianensis* (VASCONCELOS et al., 1991), Dviol extraída das sementes de *Dioclea violacea* (MOREIRA et al., 1996), ConGF extraída das sementes de *Canavalia grandiflora* (CECCATTO et al., 2002), ConM extraída das sementes de *Canavalia maritima* (GADELHA et al., 2005), CboL extraída das sementes de *Canavalia boliviana* (MOURA et al., 2009), ConV extraída das sementes de *Canavalia virosa* (OSTERNE et al., 2014), entre outras.

As lectinas da subtribo Diocleinae apresentam estruturas multiméricas compostas de monômeros de 25,5 kDa, além de exibirem a característica de equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH (CALVETE et al., 1999). Algumas lectinas pertencentes à subtribo Diocleinae são metaloproteínas que necessitam dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  para exibir sua atividade completa, uma vez que apresentam em sua estrutura sítios de ligação para estes íons divalentes. Cada subunidade, além de sítios de ligação para íons  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , contém uma cavidade hidrofóbica que interage com ligantes hidrofóbicos, assim como fitohormônios (SANZ-APARICIO et al., 1997; BARROSO-NETO et al., 2014).



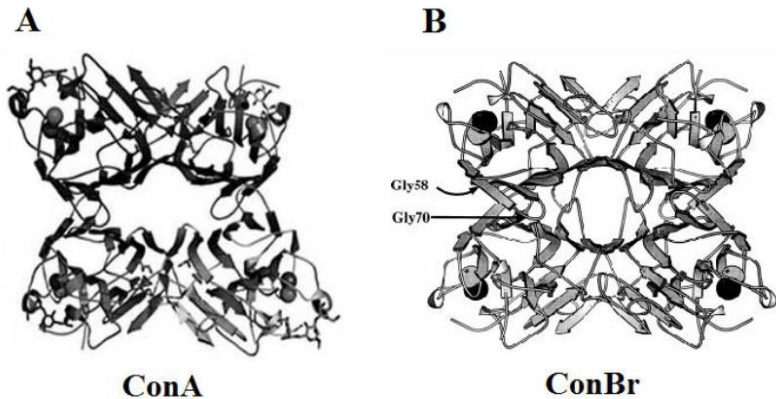
### 1.1.2.1 ConBr

A *Canavalia brasiliensis* é uma planta leguminosa herbácea, conhecida popularmente como feijão bravo do Ceará (Figura 1). Pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), Tribo Diocleae e subtribo Diocleinae (DAM et al., 1998), trata-se de uma planta nativa do continente americano, onde se encontra amplamente distribuída. No Brasil, *Canavalia brasiliensis* é encontrada nas regiões Sudeste e Nordeste, adaptando-se muito bem a solos de baixa fertilidade (CRUZ et al., 1995). Em regiões do Nordeste brasileiro, a semente é utilizada como nutriente em épocas de baixa disponibilidade de alimento (COBO et al., 2002).



**Figura 1. *Canavalia brasiliensis* (Feijão Bravo do Ceará) com ênfase em suas flores e sementes.** Fonte: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* ([www.fao.org](http://www.fao.org)); acesso em: 06/02/16.

A lectina isolada das sementes da leguminosa *Canavalia brasiliensis* (ConBr) apresenta 99% de homologia na sequência de aminoácidos com a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) com mesma especificidade a glicose/manose (SANZ-APARICIO et al., 1997). A estrutura da ConBr revela que somente dois resíduos de aminoácidos são substituídos com relação a ConA e esses resíduos não se localizam próximo do sítio de ligação a carboidratos (GRANGEIRO et al., 1997; SANZ-APARICIO et al., 1997) (Figura 2).



**Figura 2. Estrutura global dos tetrâmeros de ConA e ConBr e a disposição das quatro subunidades.** As posições dos resíduos de Gly 58 e Gly 70 em ConBr (Figura B) são substituídas por Asp e Ala em ConA (Figura A), respectivamente. As esferas cinza e preta representam os sítios de ligação dos metais de transição,  $Mn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , respectivamente (Adaptado de SANZ-APARICIO et al., 1997; LI et al., 2010).

Em nosso grupo, Barauna *et al.* (2006) demonstraram que ConBr é capaz de produzir uma modulação comportamental preditiva de ação antidepressiva em camundongos, avaliada através do teste do nado forçado (TNF), quando injetada por via intracerebroventricular (i.c.v.). O mecanismo dessa ação de ConBr foi dependente da ativação dos sistemas serotoninérgico (via receptores 5HT1 e 5HT2), adrenérgico (via receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos) e dopaminérgico (via receptores tipo D2). ConA, embora 99% similar, não teve efeito neste modelo. ConBr também foi capaz de potencializar a ação da fluoxetina, um antidepressivo inibidor da recaptação da serotonina.

Em outro estudo (RUSSI et al., 2012), ConBr apresentou efeito neuroprotetor em um modelo de neurotoxicidade induzida pelo ácido quinolínico (AQ) em camundongos. A lectina reverteu parcialmente as crises convulsivas, a morte celular e o aumento da fosforilação de JNK2/3 e das subunidades GluR1 do receptor AMPA induzidos pelo AQ. Além dessa ação, foi demonstrado em modelo de fatias de hipocampo que ConBr induz neuroproteção contra a excitotoxicidade glutamatérgica de maneira dependente da via PI3K/Akt (JACQUES et al., 2013).

Por fim, estudos recentes demonstraram que ConBr administrada centralmente exerce um efeito antidepressivo no TNF, por um mecanismo envolvendo a inibição de receptores NMDA, redução de óxido nítrico e diminuição da síntese de GMPc (RIEGER et al., 2014a). Além disso, de uma maneira dependente da sua estrutura nativa e do sítio de ligação a carboidrato (CRD), ConBr induz a ativação de PKA, Akt e ERK1, conduzindo um aumento na expressão de BDNF mediado pela ativação do fator de transcrição CREB (RIEGER et al., 2014b).

Portanto, temos um conjunto de evidências que indicam a capacidade de lectinas, como a ConBr, de modular a plasticidade do SNC e promover neuroproteção, possivelmente através da interação com receptores glutamatérgicos, com transportadores de neurotransmissores e pela modulação de vias de sinalização intracelular.

## 1.2 Isquemia cerebral

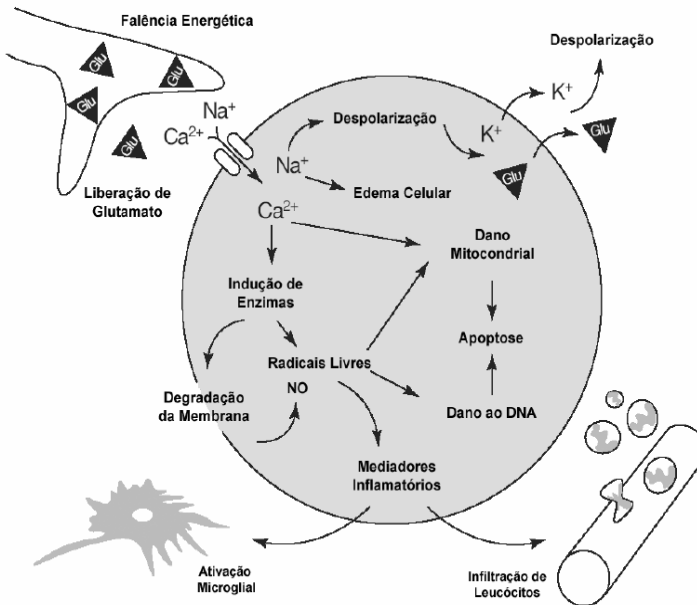
Acidente vascular cerebral (AVC) é a principal causa de incapacidade permanente (MOZAFFARIAN et al., 2016) e segunda principal causa de morte no mundo (FEIGIN et al., 2014). A cada ano, aproximadamente 795 mil pessoas vão sofrer um AVC e dentre esses 87% são isquêmicos (MOZAFFARIAN et al., 2016). Segundo dados da Organização Mundial de AVC (*World Stroke Organization*), um em cada seis indivíduos no mundo terá um AVC ao longo de seu curso de vida.

No Brasil, apesar do declínio nas taxas de mortalidade, o AVC representa a primeira causa de morte e incapacidade no País, o que gera grande impacto econômico e social (Ministério da Saúde, 2013).

Os dados apontam para um aumento expressivo da morbidade com aumento do número de pessoas com sequelas neuronais importantes, que na maioria dos casos estão associadas a alterações físicas, auditivas, visuais e intelectuais, decorrentes dos eventos de AVC

(MURRAY & LOPEZ, 1997; DONNAN et al., 2008). A incapacitação devido ao AVC afeta não somente o estado funcional dos indivíduos acometidos, mas também tem profundos efeitos emocionais e sociais sobre os pacientes e suas famílias além de importantes consequências econômicas (ZOROWITZ et al., 2009).

A lesão cerebral isquêmica resulta de uma interrupção permanente ou transitória do fornecimento de sangue arterial ao encéfalo por um êmbolo ou um trombo. Esta interrupção desencadeia uma série de processos neuroquímicos que são conhecidos como cascata isquêmica (DIRNAGL et al., 1999; TAOUIK & PROBERT, 2008) (Figura 3).



**Figura 3. Visão geral dos mecanismos fisiopatológicos que ocorrem na isquemia.** Devido à falha energética, ocorre despolarização neuronal, excessiva liberação e falha na recaptação do neurotransmissor glutamato, aumento massivo dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ , enquanto  $\text{K}^+$  é liberado no espaço extracelular. A elevação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular leva a ativação de diversos sistemas enzimáticos (proteases, lipases, endonucleases, entre outras). Há produção excessiva de radicais livres com o subsequente dano às membranas, mitocôndrias e DNA, depleção dos níveis de enzimas

antioxidantes, produção de mediadores inflamatórios que ativam a microglia e provocam infiltração de leucócitos, além da ativação de segundos-mensageiros envolvidos na sinalização da morte celular. Em função de todas essas modificações e da ativação de enzimas que danificam a estrutura das membranas celulares, ocorre abalo da homeostase celular e, finalmente, morte neuronal (Adaptado de DIRNAGL et al., 1999).

O encéfalo é altamente dependente de fluxo sanguíneo contínuo para o suprimento de oxigênio e glicose, e depende quase que exclusivamente da fosforilação oxidativa para produção de energia. Durante a isquemia a diminuição no fluxo de sangue prejudica o aporte desses substratos para o tecido cerebral, retardando ou impedindo a síntese de ATP através da glicólise e fosforilação oxidativa. A interrupção da fosforilação oxidativa também provoca um aumento na atividade da enzima ATP sintase, que nessa situação passa a consumir ATP, corroborando para diminuição do ATP intracelular (TAOUFIK & PROBERT, 2008). A principal consequência da diminuição do ATP é a inibição da bomba de  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase levando a perda do gradiente iônico e a consequente despolarização da membrana celular (DOYLE et al., 2008).

A despolarização da membrana celular aliada ao prejuízo do metabolismo celular leva à liberação massiva de glutamato para a fenda sináptica e prejuízo da captação astrocitária de glutamato (LO et al., 2003; DOYLE et al., 2008). O excesso de glutamato ativa seus receptores AMPA, cainato e NMDA, que por sua vez promovem despolarização, influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e mais consumo de ATP promovendo uma liberação ainda maior de glutamato. O glutamato apresenta um papel muito importante como mediador de sinapses excitatórias e a morte celular resultante das ações tóxicas do glutamato é referida como excitotoxicidade (LIPTON & ROSENBERG, 1994; LUO et al., 2013). Devido a sua elevada permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e incompleta dessensibilização, o receptor NMDA é considerado o principal mediador da excitotoxicidade glutamatérgica (CHOI, 1992; GONDA, 2012).

A excitotoxicidade neuronal, por sua vez, geralmente se refere ao dano e à morte de neurônios decorrente de exposição prolongada ao glutamato e associada ao influxo excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da célula (BERLIOCCHI et al., 2005). A entrada de grandes quantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  para o citoplasma pode levar a uma série de respostas que

conduzem a morte celular, como: indução de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, ativação de vias de sinalização celular pró-apoptótica e pró-inflamatória como algumas isoformas de p38<sup>MAPK</sup> e JNK (YANG et al., 1997; TAOUIK & PROBERT, 2008).

Portanto, processos agudos, como hipóxia, isquemia, traumatismo craniano-encefálico ou processos crônicos, como doenças neurodegenerativas, podem conduzir à extensiva liberação de glutamato e/ou diminuição da sua recaptção (especialmente glial) gerando o quadro de excitotoxicidade (MELDRUM, 2000; SEGOVIA et al., 2001).

As zonas periféricas do território isquêmico comprometido, chamada de penumbra isquêmica, sofrem danos mais amenos devido a uma reperfusão residual de sangue a partir dos vasos sanguíneos colaterais. Na área de penumbra a morte celular pode ser evitada se houver intervenção na cascata isquêmica. A diminuição da morte celular nessa área está associada com melhora neurológica e com recuperação do dano, sendo um alvo importante para tratamentos contra os danos da isquemia (BROUNS & DE DEYN, 2009; LIU et al., 2012).

Durante a reperfusão, a disponibilidade de oxigênio aumenta e as mitocôndrias, já debilitadas, geram uma grande quantidade de EROs, que levam a peroxidação lipídica das membranas dos neurônios (SANDERSON et al., 2013). Observa-se também uma redução nos antioxidantes endógenos e os que existem são usados na tentativa de consumir as espécies reativas que estão sendo produzidos (FRANTSEVA et al., 2001). Além disso, a ativação da microglia faz com que haja geração de espécies reativas e citocinas representando um quadro de neuroinflamação (LEE et al., 2014).

Respostas inflamatórias do cérebro pós-isquemia estão caracterizadas por uma rápida ativação de células, principalmente microgliais, seguida pela infiltração de células inflamatórias circulantes. Uma série de alterações na barreira hematoencefálica (BHE) ocorre após o insulto isquêmico, uma vez que as células endoteliais e os astrócitos que compõem esta barreira sofrem danos significativos. Assim, células inflamatórias podem atravessar a BHE e alcançar o parênquima cerebral (JIN et al., 2010).

Tais dados chamam atenção para a importância do desenvolvimento de estratégias terapêuticas como a melhoria do fluxo sanguíneo local, intervenções em processos como excitotoxicidade, estresse oxidativo, lesão microvascular e neuroinflamação e a prevenção de morte celular ou aumento da plasticidade neuronal.

### 1.3 Cultura organotípica

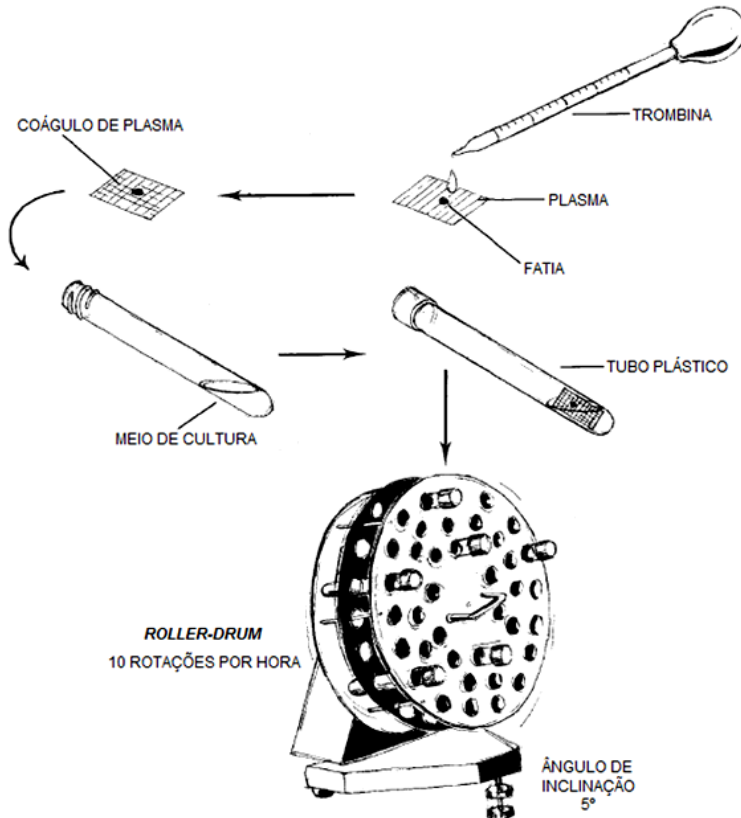
Modelos experimentais *in vitro* representam uma alternativa de particular importância na pesquisa, pois têm como vantagens a redução do número de animais utilizados por experimento, um maior controle sobre os parâmetros bioquímicos e/ou fisiológicos, maior facilidade de avaliar os mecanismos de ação para determinado efeito em nível celular e molecular, estabelecendo claras correlações entre estrutura e função, bem como a plasticidade de interações neurais em diferentes condições experimentais (GEBHARDT, 2000).

Dentre os modelos *in vitro*, o modelo de cultivo de tecidos garante a manutenção da integridade das células e organização do tecido. Além disso, estas preparações oferecem a possibilidade de uma fácil manipulação experimental. As fatias de diferentes regiões do cérebro são ferramentas muito válidas para o estudo das propriedades estruturais, fisiológicas e farmacológicas de circuitos neuronais, devido à comunicação interneuronal e entre neurônios e células da glia (HUMPEL, 2015).

Existem dois tipos principais de preparações de fatia na pesquisa em neurociências: as chamadas fatias "frescas" e as culturas organotípicas. As fatias "frescas" são muitas vezes simplesmente referidas como fatias e são normalmente de curta duração favoráveis a experiências no intervalo de algumas poucas horas. Já as culturas organotípicas permitem análises experimentais ao longo de vários dias ou semanas *in vitro*, possibilitando o estudo de efeitos de longo prazo (LOSSI et al., 2009).

O modelo de cultura organotípica foi primeiramente desenvolvido e detalhado por Gähwiler utilizando a técnica *roller drum* (GÄHWILER, 1981). Nessa técnica as culturas organotípicas de cérebro foram estabelecidas em tubos, conforme ilustrado na Figura 4. As fatias de tecido são colocadas em lamínulas de vidro e são incorporadas em um coágulo de plasma (plasma com adição de uma gota de trombina) ou em uma matriz de colágeno (GÄHWILER, 1981). Após esse processo que promove a "colagem" da fatia na lamínula, é possível a rotação lenta e contínua dos tubos que é característico desta técnica. Os tubos contêm uma pequena quantidade de meio de cultura e durante a rotação lenta (dez rotações por hora, com inclinação de aproximadamente 5° em relação ao eixo horizontal) o tecido é coberto por meio durante a metade de um ciclo, e assim segue uma alternância contínua de alimentação e aeração que determina a sobrevivência da fatia (GÄHWILER, 1984).

Entretanto, no protocolo *roller drum* as fatias parecem apresentar um menor grau de organização celular e perda parcial da anatomia cerebral quando comparada com a técnica de cultura organotípica de interface, desenvolvida posteriormente (BRASCHLER et al., 1989).

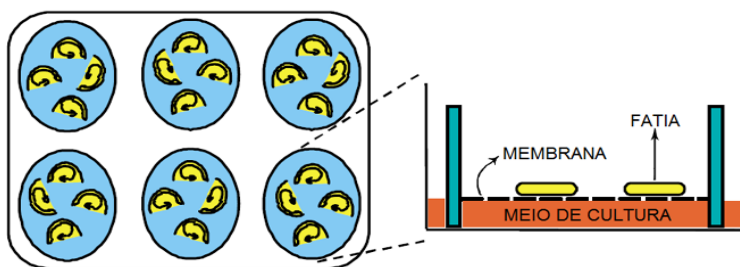


**Figura 4. Técnica de roller drum.** Adaptado de GÄHWILER, 1984.

Dessa forma, a técnica *roller drum* foi modificada e otimizada para uma cultura de interface por Stoppini e colaboradores, que determinaram que as fatias cerebrais organotípicas podem sobreviver bem, quando cultivadas em membranas semipermeáveis (STOPPINI et al., 1991). Na técnica de interface as fatias de tecido cerebral são colocadas diretamente sobre uma membrana semipermeável e o meio de cultivo é adicionado abaixo da membrana, em placa de cultura (Figura 5) (STOPPINI et al., 1991). O tamanho dos poros da membrana



possibilita a difusão dos substratos. O princípio da membrana é manter a interface entre o líquido e o ar: as fatias têm a nutrição adequada garantida pelo meio de cultivo no lado inferior da membrana e permanecem gaseificadas a partir da atmosfera no lado superior. O meio fornece a nutrição adequada ao tecido através da membrana por capilaridade (BERGOLD & CASACCIA-BONNEFIL, 1997). Este método oferece maior acessibilidade e facilita a manipulação experimental e, por manter as fatias de tecido na interface entre o ar e o meio de cultivo, permite que possam ser cultivadas durante várias semanas e serem submetidas a diferentes condições experimentais.



**Figura 5. Técnica de interface.** Adaptado de Sundstrom et al., 2005.

A cultura organotípica representa um modelo *in vitro* que mantém a identidade celular, as relações espaciais e a multiplicidade celular do tecido cerebral possibilitando a preservação das interações entre células gliais e neuronais presentes *in vivo* (GÄHWILER et al., 1997; EUGÈNE et al., 2014). Neste sistema, essas células sobrevivem por longo período de tempo “amadurecendo” em cultivo, permitindo o estudo de fatores fisiológicos e de compostos farmacológicos que possam contribuir com a sobrevivência celular e com a plasticidade sináptica, bem como a biologia de proteínas específicas e cascatas de sinalização celular (FROTSCHER et al., 1995; NORABERG et al., 2005; HOLOPAINEN, 2005).

Em termos de modelo experimental, a cultura organotípica apresenta uma série de vantagens para o estudo de toxicidade ou de neuroproteção, bem como, para a análise das alterações bioquímicas envolvidas nestes processos. As culturas organotípicas permitem, um maior controle sobre parâmetros como temperatura, oxigenação, disponibilidade de nutrientes ou mesmo de compostos (STOPPINI et al., 1991; BRUCE et al., 1996).

O fato de o cultivo organotípico assegurar as características do tecido cerebral *in vivo*, tais como um ambiente de múltiplos contatos celulares e arquitetura tecidual que mantêm as atividades múltiplas de neurotransmissão e plasticidade neural, justifica o termo “organotípica” que se deve justamente a essa a “organização típica do tecido *in vivo*” (GÄHWILER et al., 1997, ULLRICH et al., 2011).

Além disso, a cultura organotípica de fatias do cérebro permite a realização de experimentos com várias fatias obtidas a partir de um cérebro original, excluindo as influências dos animais por variações individuais (KIM et al., 2013).

As fatias de tecido podem ser mantidas em cultivo durante várias semanas. Porém, além de observar estritas condições de esterilidade, é necessário um meio de cultura adequado, oxigenação e incubação suficiente a uma temperatura estável de 36-37° C. Sob estas condições, as células nervosas continuam a diferenciar-se e desenvolver uma organização de tecido que se assemelha ao observado *in vivo* (LOSSI et al., 2009). Quanto ao meio de cultura, a maioria dos pesquisadores trabalham com um meio que consiste em cerca de 25% de soro de cavalo inativado, 50% de meio basal, tal como o meio basal Eagle (BME – *Eagle's Basal Medium*) ou meio mínimo essencial Eagle (MEM – *Eagle's Minimum Essential Medium*) e 25% de solução salina equilibrada de sais, suplementado com glicose (STOPPINI et al., 1991; BUCHS et al., 1993).

Nem todas as áreas do cérebro são passíveis de cultura organotípica. O método de cultura organotípica é ideal para regiões do cérebro com uma estrutura que pode ser alinhada ao plano de corte tal como o corpo estriado, cerebelo, hipocampo e córtex (SUNDSTROM et al., 2005).

Um fator importante no cultivo organotípico é a idade do animal que será utilizado para obtenção das fatias. As fatias oriundas de animais jovens são mais resistentes e têm plasticidade neuronal mais forte se comparadas com as de tecido de animal adulto (DAVIAUD et al., 2013). Em comparação com doadores embrionários, o cérebro de animais jovens é maior tornando mais fácil a dissecação. Além disso, o tecido derivado de animais fetais não apresenta uma boa organização morfológica no cultivo organotípico (GÄHWILER et al., 1997). Considerando esses fatores, o período pós-natal precoce (P0 a P10) é ideal para a cultura, pois aspectos essenciais da citoarquitetura já estão estabelecidos na maioria das áreas cerebrais, e as células nervosas têm maior probabilidade de manterem-se viáveis (GÄHWILER et al., 2001; LOSSI et al., 2009; EUGÈNE et al., 2014). Culturas organotípicas de

fatias do hipocampo, por exemplo, são geralmente preparadas a partir de animais de 6-8 dias de idade (P6 a P8), pois fornecem uma janela de tempo perfeito para o estabelecimento das fatias nas membranas e a sua sobrevivência durante vários dias (MARKSTEINER & HUMPEL, 2008; ALLARD et al., 2015).

Vários parâmetros influenciam a funcionalidade das células da glia e a sobrevivência dos neurônios, tal como a origem anatômica do tecido e idade dos animais, a composição do meio de cultivo, a velocidade de preparação, a esterilidade, a saúde dos animais doadores, entre outros. No entanto, para obter mais informações sobre a viabilidade celular, fatias de tecido devem ser contrastadas com agentes específicos de morte celular. Vários corantes fluorescentes são frequentemente utilizados para estudar diretamente a viabilidade das células em fatias, como por exemplo: iodeto de propídio (SIMÕES PIRES et al., 2014), brometo de etídio (MANCINI et al., 2009), corantes SYTOX (HUGHES et al., 2014), corantes Hoechst (FERRER-MARTÍN et al., 2014), laranja de acridina (KIM et al., 2002), DAPI (PINKERNELLE et al., 2013) e anexina V (XU et al., 2013).

Para determinar a idade das culturas organotípicas considera-se a idade do animal no momento em que as fatias são preparadas e colocadas em cultivo somado ao número de dias de permanência *in vitro*. Este somatório é denominado dia pós-natal equivalente (EPD – *equivalent postnatal day*) (BRUCE et al., 1995).

A área do cérebro mais explorada e melhor caracterizada em culturas organotípicas é o hipocampo. Vários grupos de pesquisa têm utilizado o modelo de culturas organotípicas de fatias hipocâmpais para estudar neuroinflamação, neurodegeneração e neuroproteção envolvendo: isquemia/privação de oxigênio e glicose (RAMÍREZ-SÁNCHEZ et al., 2015), estresse oxidativo (KIM et al., 2015), exposição crônica ao etanol (REYNOLDS et al., 2015), trauma cranioencefálico (DI PIETRO, 2015), epilepsia (BERDICHEVSKY et al., 2013), hipotermia (BICKLER et al., 2012), hipoglicemia (TANAKA et al., 2008), infecções (MAFFIOLI et al., 2012), bem como neurotoxicidade (YAMAZAKI et al., 2013), neurogênese (WEI et al., 2015) e neuroplasticidade (QUINTANA et al., 2015), incluindo também estudos com células tronco (LANCASTER et al., 2013; NEUSER et al., 2013; AVALIANI et al., 2014).

Em condições de cultura organotípica, as características anatômicas e organização morfológica do hipocampo são mantidas. Todos os tipos neuronais (células granulares, células piramidais e os

interneurônios) e células da glia que existem *in vivo* são bem preservados nas culturas e, de forma geral, mantém sua morfologia, exibindo transmissão sináptica normal e plasticidade (LOSSI et al., 2009).

A arborização dendrítica de células piramidais e de interneurônios é muito parecida com a da situação *in situ*, enquanto que os dendritos de células granulares são mais variáveis e consideravelmente mais curtos. Essa variação observada nos dendritos de células granulares provavelmente se deve à falta de aferentes que são derivadas do córtex entorrinal (HEIMRICH & FROTSCHER, 1991). Nas partes distais dos dendritos, que *in situ* recebem aferentes a partir de regiões extrahipocâmpais, a densidade das sinapses permanece consideravelmente inferior ao longo de todo o período de cultura (BUCHS et al., 1993). Já as proteínas importantes relacionadas à sinapse, tais como a sinaptofisina, proteína básica de mielina, as proteínas associadas aos microtúbulos e moléculas de adesão de células neuronais, são expressas em níveis constantes durante o cultivo organotípico (BAHR et al., 1995).

A ramificação de processos neuronais e as conexões entre os neurônios aumentam na primeira semana de cultivo e o desenvolvimento dessas sinapses *in vitro* chegam muito próximo da situação *in vivo* (FROTSCHER & GÄHWILER, 1988). Em particular, análises de microscopia confocal comprovaram que fatias (de ratos P5) cultivadas durante uma, duas, ou três semanas *in vitro* demonstraram equivalência a fatias cerebrais dissecadas no dia pós-natal 14, 17 ou 21, respectivamente, no número de ramos dendríticos primários, densidade das espinhas dendríticas de células piramidais, comprimento total de neurônios e crescimento de dendritos apicais (DE SIMONI et al., 2003).

A técnica de cultura organotípica de diferentes regiões do SNC tornou-se uma importante ferramenta para a investigação de dano celular, alterações na vulnerabilidade e plasticidade bem como a análise de potenciais compostos neuroprotetores nos mais variados estudos de alterações celulares e moleculares associadas a diferentes lesões e doenças neurodegenerativas (HOLOPAINEN, 2005; CAVALIERE et al., 2010).

Modelos *in vitro* de culturas organotípicas oferecem vantagens únicas por se aproximar da situação *in vivo* na medida em que mantêm o microambiente do tecido original e com isso demonstram um elevado grau de manutenção citoarquitetônica promovendo o metabolismo neuronal com circuitos sinápticos locais funcionais por períodos variáveis de tempo, de acordo com o procedimento de escolha (LOSSI et al., 2009).

Dessa maneira, a cultura organotípica constitui-se um excelente modelo para estudar a resposta dos neurônios, dos astrócitos e da microglia frente a insultos por apresentar fatias com ótima morfologia e viabilidade, boa estabilidade e homogeneidade, além de mostrar susceptibilidade aos diversos modelos de lesão (DAVIAUD et al., 2013).

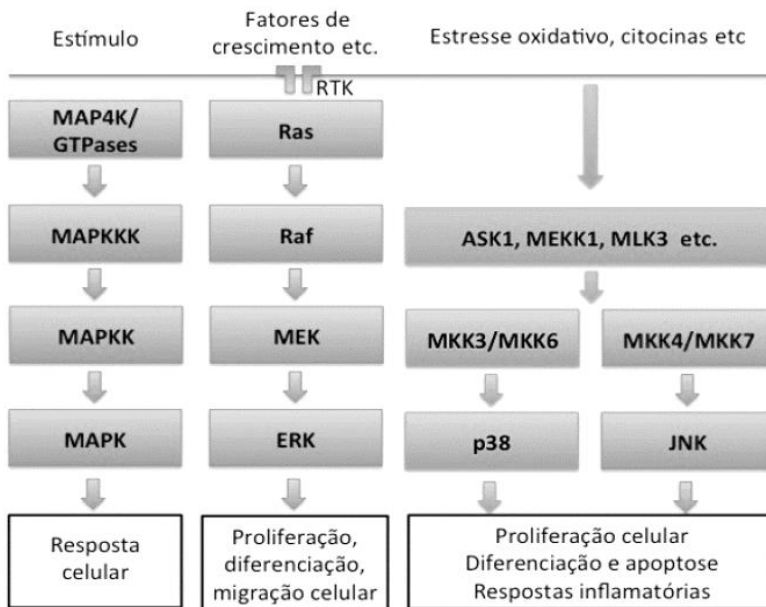
## **1.4 Sinalização celular**

### **1.4.1 Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs)**

As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) são um grupo de serina/treonina cinases amplamente distribuídas no SNC e são ativadas por fosforilação mediando a transdução de sinal intracelular em resposta a diferentes estímulos. As MAPKs participam na regulação das atividades celulares de crescimento, diferenciação, sobrevivência e morte (Figura 6). Os mamíferos expressam diversos grupos de MAPKs, entre eles, as cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) e as proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs), como a  $p38^{\text{MAPK}}$  e JNK 1/2/3 (CHEN et al., 2001; THOMAS & HUGANIR, 2004).

As  $p38^{\text{MAPK}}$  e JNK1/2/3, são classicamente reconhecidas como proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs) e têm sido relacionadas com mecanismos de inflamação, através de sua ativação por citocinas relacionadas a insultos citotóxicos, resposta a estresse e morte celular (MIELKE & HERDEGEN, 2000; TAKEDA & ICHIJO, 2002).

A  $p38^{\text{MAPK}}$ , portanto, é ativada por diversos estímulos, incluindo hormônios, ligantes de receptores acoplados a proteínas G e estresses. Está envolvida em processos inflamatórios e apoptóticos em diferentes tipos celulares, incluindo neurônios (MIELKE & HERDEGEN, 2000; MOLZ et al., 2008).



**Figura 6. Esquema geral da ativação da via de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs).** MAPKs operam em forma de cascata e medeiam a sinalização intracelular iniciada por fatores extracelulares ou intracelulares. MAP3Ks, que podem ser ativadas tanto por MAP4Ks ou GTPases, fosforilam MAP2Ks que por sua vez fosforilam e ativam MAPKs. Sendo ativadas, MAPKs fosforilam vários substratos, incluindo fatores de transcrição, regulando desta maneira uma variedade de atividades celulares, como proliferação, diferenciação, migração, respostas inflamatórias e morte celular. RTK: receptor tirosina cinase (Adaptado de KIM & CHOI, 2010).

#### 1.4.2 Via da fosfatidilinositol-3 cinase/Akt (PI3K/Akt)

A via da fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K)/Akt (ou PKB) pode ser ativada por fatores de crescimento e sua ativação desempenha um papel crítico na regulação do crescimento, proliferação, metabolismo e sobrevivência celular e também na neuroplasticidade (HANADA et al., 2004; VAN DER HEIDE et al., 2006).

Um dos alvos do segundo mensageiro gerado pela ativação da PI3K é a proteína Akt. Akt/PKB é uma serina/treonina cinase altamente expressa no SNC e regula a função de muitas proteínas celulares envolvidas em processos relacionados ao metabolismo, apoptose, proliferação e neuroplasticidade incluindo a glicogênio sintase cinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (SONG et al., 2005).

GSK-3 $\beta$  é uma serina/treonina cinase multifuncional especificamente expressa no SNC, particularmente em neurônios. Inicialmente foi descrita como uma peça chave no metabolismo do glicogênio pela sua habilidade de fosforilar e inativar a enzima glicogênio sintase, mas sabe-se também que ela regula diversas funções celulares como transcrição de genes, plasticidade sináptica e apoptose (JOPE, 2003; JOPE & ROH, 2006).

GSK-3 $\beta$  não é apenas um alvo *downstream* da via PI3K/Akt, mas também está envolvida na via de sinalização Wnt. Com a ativação da via PI3K/Akt, a atividade da GSK-3 $\beta$  pode ser reduzida por fosforilação no resíduo de Ser pela Akt. A fosforilação de Ser e subsequente inativação da GSK-3 $\beta$ , leva a acumulação de  $\beta$ -catenina e a sua translocação do citosol para o núcleo (DING et al., 2000).  $\beta$ -catenina é uma molécula importante na via Wnt, mediando os efeitos anti-apoptóticos através da regulação da expressão de vários genes anti-apoptóticos importantes. A GSK-3 $\beta$ , portanto, regula negativamente  $\beta$ -catenina através de fosforilação e degradação dessa proteína (LI et al., 2011).

## 1.5 Astroglia e neurônios

Os astrócitos, células gliais mais abundantes no SNC, correspondem a um grupo de células heterogêneas, com diferentes subtipos, que apresentam diferenças quanto à morfologia, desenvolvimento, metabolismo e fisiologia.

Entre as características gerais dos astrócitos maduros destaca-se a presença de prolongamentos com filamentos intermediários (fibrilas gliais), cujo componente principal é a proteína ácida fibrilar glial (GFAP); a proteína ligadora de cálcio, S-100 $\beta$  e a enzima conversora de glutamato em glutamina, glutamina sintetase (TANAKA et al., 1992).

Os astrócitos desempenham uma série de funções essenciais para a homeostase do SNC incluindo: manutenção dos níveis iônicos do meio extracelular, alterados com a descarga de potenciais de ação dos

neurônios; captação e liberação de diversos neurotransmissores, tendo um papel crítico no metabolismo dos neurotransmissores glutamato e GABA; secreção de fatores tróficos essenciais para a sobrevivência e diferenciação dos neurônios, participando do direcionamento de axônios e formação/funcionamento das sinapses; participação na formação da BHE (STIPURSKY et al., 2011; STIPURSKY et al., 2012). Também estão envolvidos na regulação do fluxo sanguíneo cerebral, bem como no auxílio na defesa imune, por meio da síntese e secreção de diversas citocinas inflamatórias (CHEN & SWANSON, 2003). Além disso, essas células têm grande impacto no controle energético cerebral, em razão do fornecimento de energia e metabólitos (ROUACH et al., 2008).

Os astrócitos ajudam a manter a concentração extracelular de  $K^+$ , importante para a manutenção da atividade neuronal (DJUKIC et al., 2007). Os astrócitos captam os íons liberados na fenda sináptica e os carregam para outras regiões, onde a concentração de  $K^+$  no meio extracelular é menor. Desta forma os astrócitos mantêm o balanço de  $K^+$  e consequentemente o meio adequado para os neurônios (BARRES, 1991; WALZ, 1997).

A observação de que os processos astrocíticos expressam uma série de receptores de neurotransmissores na sua superfície, incluindo receptores glutamatérgicos, GABAérgicos e purinérgicos, mostraram que essas células são responsivas às atividades neuronais, bem como podem modulá-las (PORTER & MCCARTHY, 1997). Em particular, os astrócitos apresentam muitos receptores glutamatérgicos em sua membrana plasmática e podem, então, responder ao glutamato liberado dos terminais sinápticos neuronais, aumentando a concentração interna de  $Ca^{2+}$  (ZHANG et al., 2003); os astrócitos têm a responsabilidade de recaptar o glutamato liberado pelos neurônios no meio extracelular (RICCI et al., 2009). Por outro lado, estas células gliais também podem liberar glutamato, em resposta ao aumento na concentração de  $Ca^{2+}$ , causando um aumento na concentração neuronal de  $Ca^{2+}$  através de um mecanismo mediado por receptores NMDA (MALARKEY & PARPURA, 2008).

Depois da absorção em astrócitos, os transmissores são convertidos por enzimas – como a glutamina sintetase – em precursores, tais como glutamina, e reciclado de volta para sinapses para conversão em transmissores ativos (SOFRONIEW & VINTERS, 2010). Foram encontrados altos níveis da enzima glutamina sintetase nos astrócitos que, em conjunto com o transportador de glutamato, removem o glutamato extracelular fornecendo glutamina, um substrato para o metabolismo neuronal (ZOU et al., 2010). As extensas redes de



astrócitos são capazes de dissipar rapidamente pequenas moléculas, tais como potássio e glutamato e impedir a sua acumulação potencialmente prejudicial (SEIFERT et al., 2006).

Os astrócitos captam a glicose e metabolizam até lactato ou alanina e só depois distribuem esses metabólitos para os neurônios. Além disso, há estoques de glicogênio quase exclusivos dos astrócitos, servindo como fonte de combustível para as células vizinhas (STOBART & ANDERSON, 2013).

Os processos astrocíticos sofrem um pequeno inchamento próximo aos capilares sanguíneos formando uma espécie de barreira ao redor dos vasos que, em conjunto com as células endoteliais, impedem que diversas substâncias ou moléculas presentes no sangue entrem no SNC (BANERJEE & BHAT, 2007).

Assim, as porções terminais de astrócitos, ao mesmo tempo em íntimo contato com a superfície neuronal, também estão associadas a capilares sanguíneos, desempenhando, portanto, um papel importante no transporte de nutrientes da corrente sanguínea para as células neuronais. Dados recentes revelam que os astrócitos produzem e liberam vários mediadores moleculares, tais como prostaglandinas, óxido nítrico, e ácido araquidônico, que podem aumentar ou diminuir o diâmetro do vaso sanguíneo e o fluxo sanguíneo de uma forma coordenada (GORDON et al., 2007; IADECOLA & NEDERGAARD, 2007). Portanto, os astrócitos podem ser importantes mediadores de mudanças no fluxo sanguíneo no SNC em resposta a alterações na atividade neuronal (KOEHLER et al., 2009).

## 2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que a isquemia cerebral é a principal causa de incapacidade e uma das principais causas de morte no mundo é de extrema importância o estudo dos processos neuroquímicos desencadeados e o aprofundamento na compreensão dos mecanismos envolvidos nos danos celulares resultantes, bem como a busca de estratégias de neuroproteção.

Os receptores para proteínas de matriz extracelular e fatores neurotróficos, receptores glutamatérgicos, transportadores de neurotransmissores e canais iônicos possuem natureza glicoprotéica. Tendo em vista que as cadeias de açúcares presentes nestas proteínas são alvos de interação com lectinas e que podem regular funções neurais importantes, torna-se pertinente estudar os mecanismos celulares e moleculares associados a estas interações.

Lectinas tem a capacidade de ligar a carboidratos com alta especificidade (CAVADA et al., 2001) e têm mostrado ação biológica sobre o SNC incluindo modulação da neurotransmissão e atividade neuroprotetora (HELMHOLZ et al., 2003). Estudos do nosso laboratório sugerem que ConBr pode modular sistemas de neurotransmissão e algumas vias de sinalização intracelular que culminam em efeitos neuroprotetores e de modulação da plasticidade sináptica (BARAUNA et al., 2006; RUSSI et al., 2012; JACQUES et al., 2013; RIEGER et al., 2014a; RIEGER et al., 2014b).

Dessa forma, baseado na literatura e em dados prévios de nosso grupo, se torna relevante o estudo dos efeitos biológicos de ConBr no SNC. Portanto, tencionamos investigar a capacidade neuroprotetora de ConBr em modelo de isquemia *in vitro*.

As culturas organotípicas mantêm a arquitetura tecidual preservando as diversas células e seus múltiplos contatos, a transmissão sináptica normal e a plasticidade. Paralelo a isso, as fatias em cultivo organotípico apresentam estabilidade bem como susceptibilidade em modelos de lesão, representando um excelente modelo *in vitro* para estudar a resposta das células neurais frente a insultos (DAVIAUD et al., 2013). Portanto, foram considerados dois aspectos: 1) a importância de padronizar a técnica de cultura organotípica para as condições locais; 2) através desse modelo, avaliar o efeito neuroprotetor de ConBr frente à privação de oxigênio e glicose, seguida de reperusão.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar os mecanismos celulares e moleculares associados à possível atividade neuroprotetora da lectina extraída das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) frente aos danos produzidos pela privação de oxigênio e glicose, seguida de reperfusão (POG/Rep) em culturas organotípicas hipocampais (COH).

#### 3.2 Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de cultura organotípica hipocampal (COH);
- Avaliar a viabilidade celular de COHs submetidas à POG/Rep bem como a capacidade neuroprotetora de ConBr;
- Verificar a modulação da resposta astrocitária (imunorreatividade para GFAP) e a sobrevivência neuronal (imunorreatividade para NeuN) em COHs submetidas à POG/Rep paralelo ao efeito do tratamento com ConBr sobre estas células;
- Investigar, através de *Western blotting*, a modulação de vias de sinalização como PI3K/Akt e MAPK por meio da avaliação da atividade de Akt, GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenina e p38<sup>MAPK</sup> com relação ao modelo de privação de oxigênio e glicose e reperfusão (POG/Rep) em COHs.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Purificação da lectina ConBr

A lectina ConBr foi fracionada e purificada por métodos previamente estabelecidos (MOREIRA & CAVADA et al., 1984; CAVADA et al., 2001) que incluem precipitação com sulfato de amônio e cromatografia por afinidade em Sephadex G-50. A purificação foi realizada pelo Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMol) coordenado pelo Prof. Dr. Benildo Cavada na Universidade Federal do Ceará (UFC). A lectina purificada e liofilizada foi enviada ao nosso laboratório para avaliação dos efeitos biológicos.

### 4.2 Animais

Foram utilizados ratos machos pós-natais (P7) da linhagem Wistar, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Cada animal foi manipulado e submetido a eutanásia obedecendo ao código de ética de utilização de animais para pesquisa, conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Protocolo PP00772/ CEUA-UFSC). Foram dirigidos todos os esforços no sentido de minimizar o número de animais utilizados bem como o sofrimento dos mesmos.

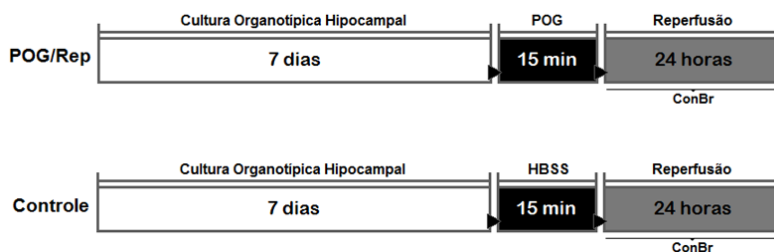
### 4.3 Preparação das culturas organotípicas hipocampais (COH)

As culturas foram preparadas de acordo com os métodos descritos por Stoppini et al., 1991 com algumas modificações. Resumidamente, os cérebros foram retirados e os hipocampus dissecados (4°C) e fatiados na espessura de 300µm, utilizando um cortador de tecidos (McIlwain Tissue Chopper). As fatias foram separadas em solução equilibrada de sais HBSS gelada (HBSS – *Hank's Balanced Salt Solution*) composto (em mM) de KCl 5,36, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,44, NaHCO<sub>3</sub> 4,1, NaCl 137,93, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,34, glicose 36,08, HEPES 25, 5µL/mL de antibiótico/antimicótico, pH 7,4. Foram colocadas as fatias em uma membrana de cultivo Millicell com poros de 0,4 µm (Millipore®) e mantidas durante 7 dias em placas de cultura de 6 poços contendo 1mL de meio de cultura composto de 50% de meio MEM

(*Eagle's Minimum Essential Medium*), 25% de soro fetal de cavalo inativado e 25% de solução salina HBSS, suplementado com glicose (36 mM), pH 7,3. As culturas organotípicas foram mantidas em estufa umidificada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias.

#### 4.4 Privação de oxigênio e glicose e reperusão (POG/Rep)

POG/Rep foi usado como um modelo *in vitro* de isquemia cerebral. As membranas contendo as fatias foram transferidas para uma placa estéril contendo 1mL de solução de POG, composta (em mM) por NaCl 137,93, KCl 5,36, NaHCO<sub>3</sub> 26, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, MgSO<sub>4</sub> 1,19, CaCl<sub>2</sub> 2, e 2-deoxiglicose 11. As culturas foram alocadas em uma câmara de anóxia e expostas durante 5 minutos a um fluxo contínuo de gás composto de 95% de N<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> para assegurar a privação de oxigênio. Depois disso, a câmara foi selada durante 15 minutos e mantida a 37°C. As culturas controle foram mantidas durante o mesmo período, sob uma atmosfera normóxica e em uma solução controle com a mesma composição da solução de POG, mas contendo glicose (15 mM) em vez de 2-deoxiglicose (PARADA et al., 2013). Após o período de POG, as culturas foram devolvidas às suas condições originais de cultivo por 24 horas (período de reperusão) e foi adicionado ao meio de cultivo ConBr previamente diluída em tampão HEPES-salino sem glicose, composto (em mM) por NaCl 124, KCl 4, MgSO<sub>4</sub> 1,2, HEPES 25, CaCl<sub>2</sub> 1, pH 7,4. A Figura 7 mostra um esquema do protocolo de POG/Rep para as COHs.



**Figura 7. Representação esquemática do protocolo de POG/Rep.** Ao mesmo tempo em que COHs foram expostas durante 15 minutos a POG, as COHs controle foram mantidas sob atmosfera normóxica em uma

solução controle (HBSS) com a mesma composição que a solução de POG, mas contendo glicose (15 mM) em vez de 2-deoxiglicose. Após isto, todas as COHs voltaram para as condições originais de cultivo durante 24 horas (período de reperfusão; Rep). O tratamento com ConBr foi realizado durante todo o período de Rep.

#### 4.5 Western Blotting

Após os tratamentos, as fatias hipocâmpais foram cuidadosamente removidas das membranas Millipore® e homogeneizadas em 100 µL de SDS 4%. Subsequentemente, o homogeneizado foi incubado por 6 minutos a 100°C. Sobre essa solução de amostra foi adicionado tampão de diluição na proporção de 1:4 (40% glicerol, 100 mM de Tris e azul de bromofenol) e β-mercaptoetanol na concentração final de 8%. As proteínas totais das amostras foram dosadas pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977). As proteínas foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) utilizando gel de separação com concentração de 10% e gel de entrada na concentração de 4% (CORDOVA et al., 2004; LEAL et al., 2007). A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 15 mA/placa e voltagem máxima de 140V durante aproximadamente 2,5 h, utilizando-se os tampões superior (glicina 190 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%) e inferior (Tris 50 mM; pH 8,3). Após a eletroforese, os géis foram submetidos à eletrotransferência usando um sistema *semi-dry* (1,2 mA/cm<sup>2</sup>; 1,5 h) como descrito por BJERRUM & HEEGAARD, 1989. Assim, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose. Por fim, as membranas foram coradas com Ponceau Stain (Ponceau 0,5% em ácido acético 1%) (LOPES et al., 2012). Primeiramente as membranas foram lavadas com solução salina tamponada com Tris (TBS; Tris 10 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5) e a seguir, foram bloqueadas por 1 h, à temperatura ambiente sob agitação constante, com leite desnatado 5% diluído em TBS. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos com TBS-T (Tween-20 0,1%; Tris 10 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5). As membranas foram incubadas, “*overnight*” à 4°C sob agitação constante, com anticorpos específicos contra formas fosforiladas ou totais conforme listado na **Tabela 1**. Os anticorpos secundários apropriados conjugados com peroxidase foram utilizados para detectar as proteínas por quimioluminescência (LEAL et al., 2002;

RIGON et al., 2008). Os valores densitométricos das bandas foram determinados através do programa Scion Image®.

**Tabela 1.** Massa molecular da proteína alvo, fabricante e diluição dos anticorpos utilizados para *Western blotting*.

ANTICORPO	MASSA MOLECULAR DA PROTEÍNA ALVO	FABRICANTE (CÓDIGO)	DILUIÇÃO
Anti-Akt	~ 60 kDa	Cell Signalling (#9272S)	1:2000
Anti-phospho-Akt	~ 60 kDa	Sigma(P4112)	1:2000
Anti-GSK-3 $\beta$	~ 46 kDa	Cell Signalling (#9315S)	1:2000
Anti-phospho-GSK-3 $\beta$	~ 46 kDa	Cell Signalling (#9336S)	1:2000
Anti- $\beta$ -catenina	~ 94 kDa	Sigma (C2206)	1:2000
Anti $\beta$ -actina	~ 43kDa	Santa Cruz Biotechnology (sc-47778)	1:2000
Anti-p38 <sup>MAPK</sup>	~ 38 kDa	Sigma (M0800)	1:10000
Anti-phospho-p38 <sup>MAPK</sup>	~ 38 kDa	Millipore (05-1059)	1:1000
Goat anti-mouse IgG, Peroxidase Conjugated secondary antibody	-	Millipore (AP308P)	1:2500
Goat anti-rabbit IgG, Peroxidase Conjugated secondary antibody	-	Millipore (AP132P)	1:5000

#### 4.6 Avaliação de morte celular utilizando o iodeto de propídio

O iodeto de propídio (IP) é um composto polar que entra apenas em células com a membrana plasmática bastante danificada. Uma vez dentro das células, o IP intercala-se com a molécula de DNA e induz uma intensa fluorescência vermelha (630nm) que é excitada por luz verde (495nm) (NORABERG et al., 1999).

Resumidamente, após os tratamentos as COHs foram incubadas com IP (1 µg/mL) e Hoechst (2 µg/mL) por 30 minutos à 37°C. Após esse período de incubação, foram feitas as análises de fluorescência. A coloração de Hoechst foi utilizada com o intuito de normalizar a fluorescência de IP com o número de núcleos. Níveis de fluorescência foram observados e as imagens capturadas em microscópio de epifluorescência invertido Zeiss. As imagens foram analisadas utilizando o programa Image J®. Para calcular a morte das células, o número de unidades arbitrárias de fluorescência IP foi dividido pelo o número de unidades arbitrárias de fluorescência Hoechst (EGEA et al., 2012).

#### 4.7 Imunohistoquímica

A preparação das COHs para as análises de imunohistoquímica foi realizada de acordo com os métodos descritos por de Oliveira et al., 2014 com algumas modificações. Após os tratamentos as COHs foram lavadas 3 vezes com PBS 0,1 M, por 10 minutos à temperatura ambiente (TA) e sob agitação constante, sendo a seguir fixadas em paraformaldeído 4% “*overnight*” à 4°C sob agitação constante. Após esse procedimento as COHs foram lavadas 3 vezes (nas mesmas condições anteriores) e cada fatia foi individualizada, através de cortes feitos delicadamente com um bisturi, nas membranas Millipore®. Então, cada fatia aderida em seu respectivo pedaço de membrana, foi submetida ao processo de bloqueio com 5% de soro de cavalo, diluído em PBS 0,1 M contendo 2% de Triton X-100, durante 2 horas à TA sob agitação constante. Em seguida, as fatias foram incubadas com os anticorpos anti-GFAP ou anti-NeuN durante 48 horas, à 4°C sob agitação constante. Após três lavagens (10 min cada) com PBS 0,1 M as fatias foram incubadas com o anticorpo Alexa fluor 488, durante 2 horas à TA sob agitação constante. Por fim, as fatias foram novamente lavadas 3 vezes nas mesmas condições já citadas e então montadas em lâminas



com meio de montagem CC/mount e cobertas com lamínulas. Os níveis de fluorescência bem como as imagens foram observados e a seguir capturados através de microscópio confocal Leica. As imagens foram analisadas utilizando o programa ImageJ®.

#### **4.8 Análise Estatística**

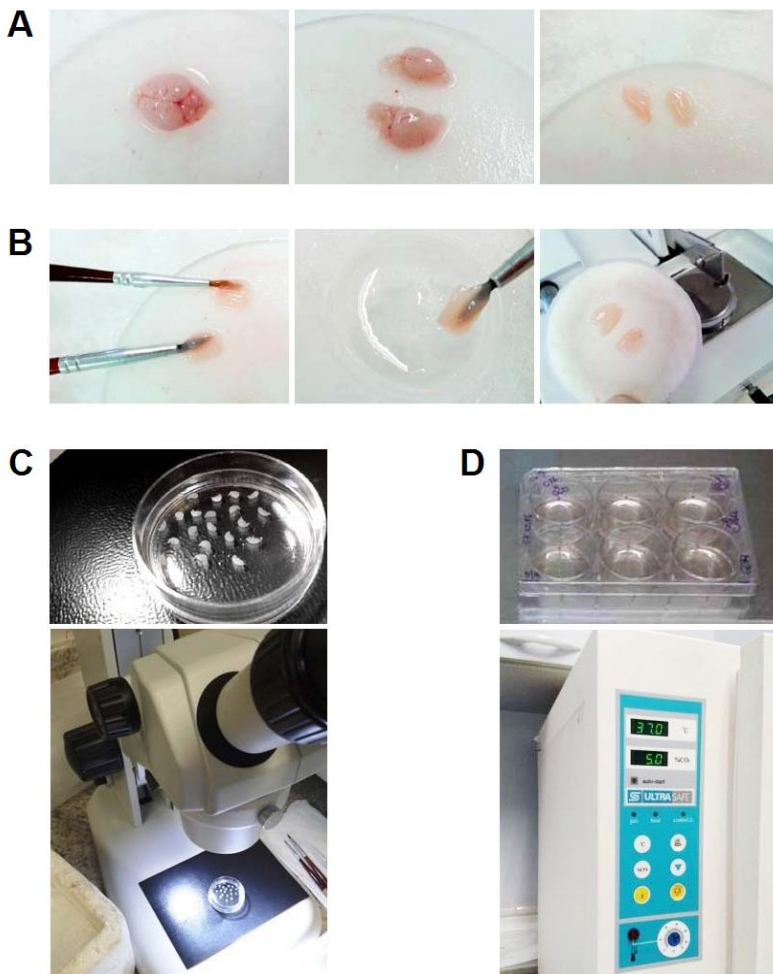
Nos experimentos de *Western blotting* os resultados foram analisados através do teste estatístico teste t não pareado. Nos demais experimentos, os resultados foram analisados através do teste estatístico ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *posthoc* de Duncan. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ . Os resultados obtidos foram expressos como a média + erro padrão da média (E.P.M.). As análises estatísticas foram feitas no programa STATISTICA 7.0 e os gráficos confeccionados no programa GraphPad Prism 6.0.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 CAPÍTULO 1**

#### **5.1.1 Padronização da técnica de cultura organotípica hipocampal (COH)**

Os passos iniciais na preparação de fatias para cultura organotípica são semelhantes aos utilizados para preparar fatias “frescas”. Resumidamente, o tecido foi dissecado (Figura 8A) e rapidamente colocado numa solução de sais equilibrada (Figura 8B), cuja composição se assemelha à do fluido cerebro-espinhal. Então, o tecido foi cortado em seções de 300 µm de espessura por meio de um fatiador de tecido de McIlwain (Figura 8B) e foi feita a montagem da cultura (Figura 8C e D). Em nosso caso, a cultura padronizada foi a cultura organotípica hipocampal (COH) e então seis fatias puderam ser cultivadas sobre uma mesma membrana.



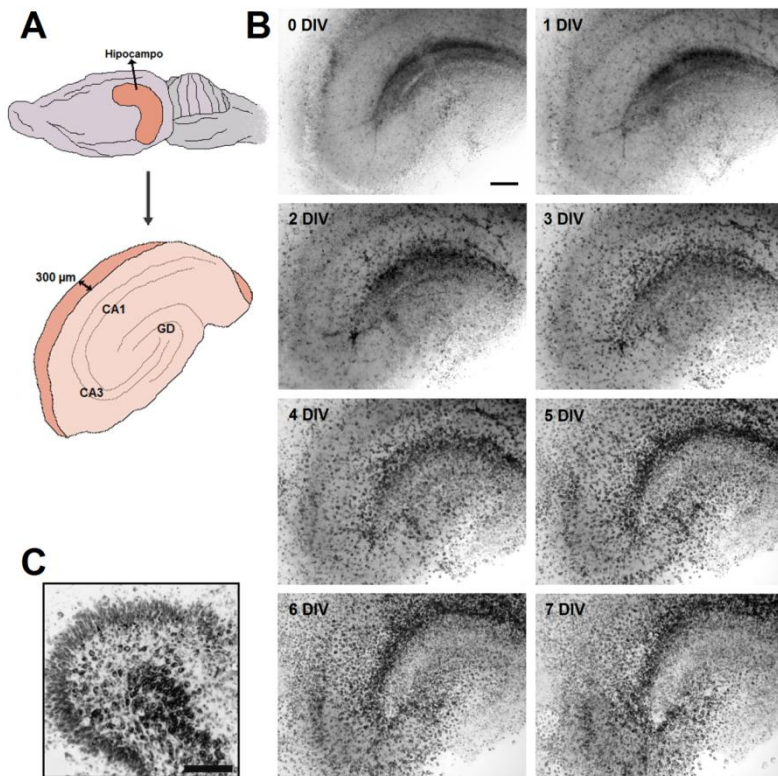
**Figura 8. Preparação da cultura organotípica hipocampal (COH).**

A) Dissecção do hipocampo a partir do encéfalo de ratos P7. B) Manutenção dos hipocampus isolados em uma solução de sais equilibrada; o hipocampo foi colocado na placa de corte com muito cuidado, sendo manipulado somente pela porção de córtex - mantida justamente para permitir a manipulação sem contato direto com o hipocampo - (imagem do meio); as fatias foram obtidas através do fatiador de tecidos de McIlwain (“McIlwain Tissue Chopper”; visto na

imagem da direita). C) Separação das fatias com o auxílio de lupa. D) Montagem da cultura em placa de 6 poços com colocação criteriosa das fatias sobre as membranas de Millicell®; A cultura foi mantida na estufa com atmosfera umidificada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

Durante a preparação de fatias do tecido, o corte de axônios é inevitável e muitas células ficam sem contatos pós-sinápticos. Em fatias organotípicas, no entanto, o corte de axônios conduz uma reorganização sináptica e esse enorme rearranjo/religação dos circuitos neuronais aliado à migração neuronal ocorre ao longo dos dias seguintes de cultivo (ULLRICH & HUMPEL, 2011; HUMPEL, 2015). Em fatias hipocampais, por exemplo, após o corte, a densidade das estruturas sinápticas da fatia diminui, mas, no decorrer da primeira semana de cultivo as árvores dendríticas dos neurônios já se tornam mais complexas, atrelado a isso há um aumento substancial na frequência das correntes sinápticas (DE SIMONI et al., 2003; LOSSI et al., 2009). Esta é uma das principais vantagens da cultura organotípica: permitir que o tecido se recupere do trauma do corte e que ocorra estabilização/adaptação das células no ambiente *in vitro*.

A Figura 9 mostra o nosso cultivo da cultura organotípica hipocampal durante o período de 0 a 7 dias. Foi observada, ao longo dos dias de cultivo, a ocorrência de um “achatamento” das fatias e a excrescência de células a partir da borda das fatias (Figura 9B). Esta característica da cultura organotípica é, inclusive, um parâmetro importante que determina boa qualidade de uma cultura (HUMPEL, 2015).



**Figura 9. Cultura organotípica hipocampal (COH) obtida de ratos.** (A) Figura ilustrativa destacando a localização do hipocampo e a fatia obtida após corte do tecido (300µm) com as regiões hipocampais GD, CA1 e CA3. (B) As fatias de rato (P7) foram cultivadas durante 7 dias; observa-se o “achatamento” das fatias em cultivo e também a excrescência de células a partir da borda das fatias ao longo do período de cultivo. Barra de escala: 200 µm. (C) Imagem obtida do trabalho de Victorov et al., 2001, de uma fatia hipocampal de rato (P8) cultivada durante 10 dias *in vitro* (DIV) para comparação com nossos resultados (B) e averiguação da morfologia característica da cultura organotípica hipocampal. Barra de escala: 200 µm.

## 5.2 CAPÍTULO 2

### 5.2.1 O modelo de privação de oxigênio e glicose e reperfusão (POG/Rep) quanto a modulação de Akt, GSK-3 $\beta$ , $\beta$ -catenina e p38<sup>MAPK</sup>, após 6 e 12 h de reperfusão

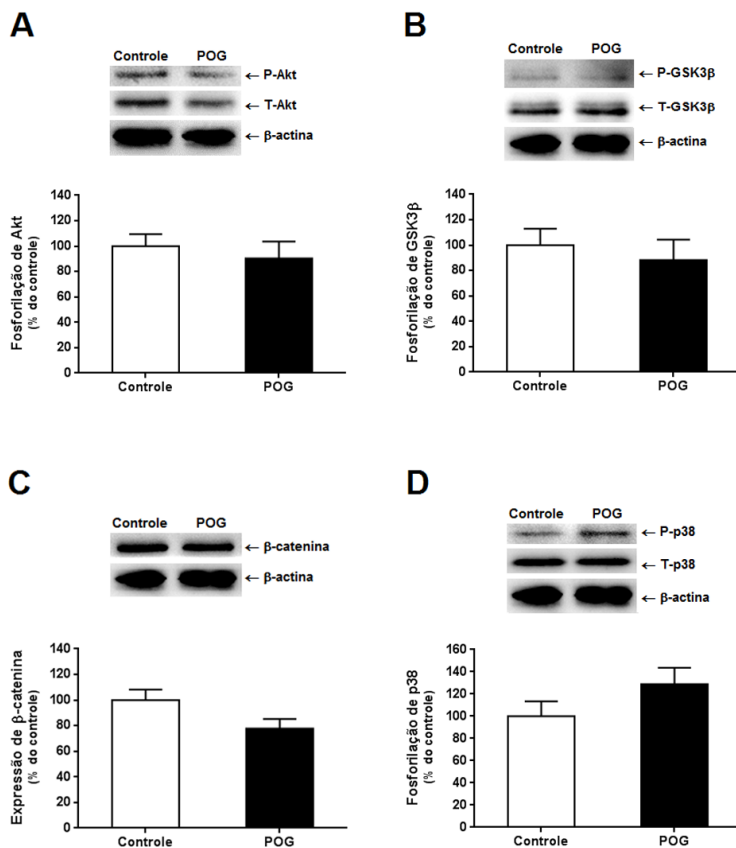
Alguns estudos têm demonstrado que a proteína cinase Akt desempenha um papel crítico na promoção da sobrevivência neuronal após isquemia cerebral (DE BUTTE-SMITH et al., 2012). Como um alvo abaixo (“*downstream*”) de Akt, a enzima glicogênio sintase cinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) também pode ser modulada neste tipo de lesão neuronal (XIONG et al., 2012). A atividade de GSK-3 $\beta$  é inibida através da sua fosforilação sobre o resíduo de Serina-9. Tanto a Akt quanto a via de sinalização Wnt podem inibir GSK-3 $\beta$ , que dessa forma não irá fosforilar a proteína  $\beta$ -catenina, evitando assim que a mesma seja degradada.  $\beta$ -catenina está envolvida na regulação da expressão de vários genes anti-apoptóticos importantes (LI et al., 2011).

As proteínas da família MAPK, por sua vez, tais como p38<sup>MAPK</sup> e JNK estão frequentemente envolvidas em sinalização de morte celular e processos inflamatórios (LI et al., 2016).

Considerando que a sinalização dependente de PI3K/Akt (RAMÍREZ-SÁNCHEZ et al., 2015), Wnt (SKARDELLY et al., 2011) e MAPK (ROY CHOUDHURY et al. 2014) pode ser modulada na isquemia cerebral, investigamos os níveis de fosforilação das proteínas Akt, GSK-3 $\beta$ , p38<sup>MAPK</sup> e a expressão de  $\beta$ -catenina após 6 e 12 horas de reperfusão em CHOs submetidas a 15 min de POG.

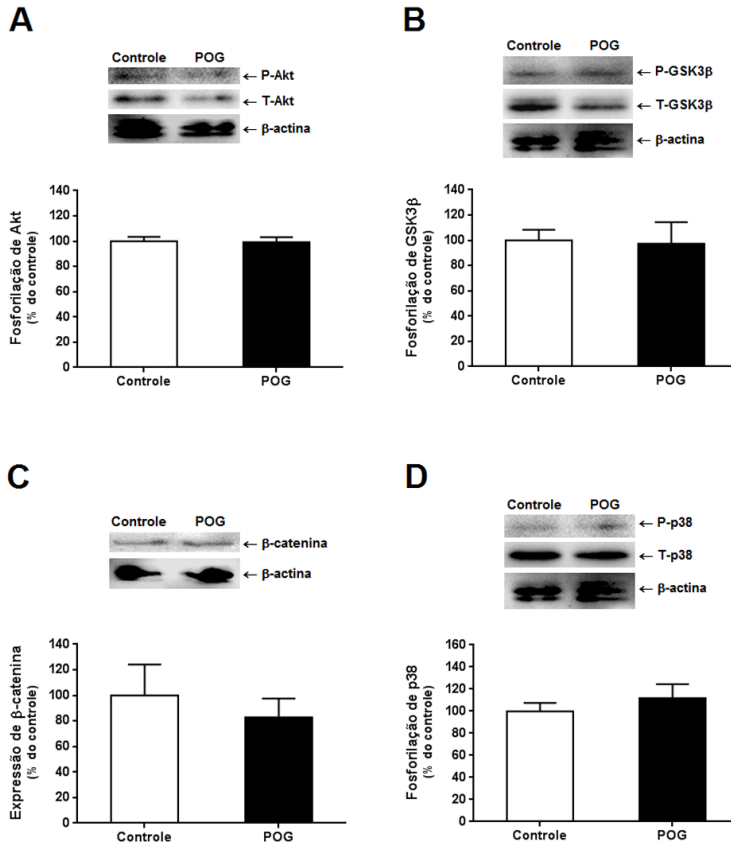
A Figura 10 mostra a fosforilação de Akt (A), GSK-3 $\beta$  (B), p38<sup>MAPK</sup> (D) e expressão de  $\beta$ -catenina (C), detectada por *Western Blotting*, após 6 h de reperfusão. Não foram verificadas alterações significativas na fosforilação das proteínas analisadas neste tempo quando comparados ao controle. Os resultados mostraram apenas uma tendência na diminuição no nível de expressão da  $\beta$ -catenina no grupo submetido à POG/Rep (POG: 77,80 % + 7,50; p=0,09; Figura 10C) e no aumento do nível de fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> (POG: 128,85 % + 14,80; p=0,20; Figura 10D).

A Figura 11 mostra a fosforilação de Akt (A), GSK-3 $\beta$  (B), p38<sup>MAPK</sup> (D) e expressão de  $\beta$ -catenina (C), detectada por *Western Blotting*, após 12 h de reperfusão. Não foram verificadas alterações significativas na fosforilação e expressão das proteínas analisadas neste tempo.



**Figura 10. Avaliação da fosforilação de Akt, GSK-3 $\beta$ , p38<sup>MAPK</sup> e da expressão de  $\beta$ -catenina, após 6 horas de reperfusão, em COHs submetidas à POG/Rep.** A) Immunoblottings representativos das formas fosforilada e total de Akt e análise quantitativa do nível de fosforilação de Akt. B) Immunoblottings representativos das formas fosforilada e total de GSK-3 $\beta$  e análise quantitativa do nível de fosforilação de GSK-3 $\beta$ . C) Immunoblottings representativos de  $\beta$ -catenina e  $\beta$ -actina e análise quantitativa da expressão de  $\beta$ -catenina. D) Immunoblottings representativos das formas fosforilada e total de p38 e análise quantitativa do nível de fosforilação de p38<sup>MAPK</sup>. A análise das proteínas foi realizada por *Western Blotting*. Os níveis de fosforilação foram determinados pela razão entre a densidade óptica (DO) da forma

fosforilada e a densidade óptica (DO) da forma total. Os valores densitométricos das bandas foram obtidos utilizando o programa Scion Image®. Os dados estão expressos como porcentagem do controle (considerado 100%) e são expressos como médias + E.P.M. de 4 experimentos independentes.



**Figura 11.** Avaliação da fosforilação de Akt, GSK-3 $\beta$ , p38<sup>MAPK</sup> e da expressão de  $\beta$ -catenina, após 12 horas de reperfusão, em COHs submetidas à POG/Rep. A) Immunoblottings representativos das formas fosforilada e total de Akt e análise quantitativa do nível de fosforilação de Akt. B) Immunoblottings representativos das formas fosforilada e total de GSK-3 $\beta$  e análise quantitativa do nível de fosforilação de GSK-3 $\beta$ . C) Immunoblottings representativos de  $\beta$ -



catenina e  $\beta$ -actina e análise quantitativa da expressão de  $\beta$ -catenina. D) Immunoblottings representativos das formas fosforilada e total de p38 e análise quantitativa do nível de fosforilação de p38<sup>MAPK</sup>. A análise das proteínas foi realizada por *Western Blotting*. Os níveis de fosforilação foram determinados pela razão entre a densidade óptica (DO) da forma fosforilada e a densidade óptica (DO) da forma total. Os valores densitométricos das bandas foram obtidos utilizando o programa Scion Image®. Os dados estão expressos como porcentagem do controle (considerado 100%) e são expressos como médias + E.P.M. de 4 experimentos independentes.

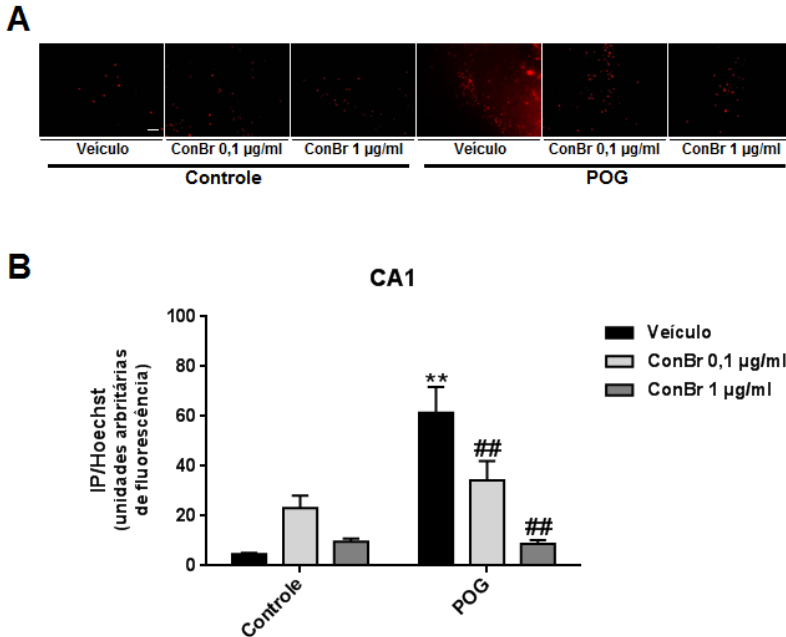
### **5.2.2 Efeito da ConBr sobre a viabilidade celular de COHs submetidas à POG/Rep**

Em estudos neuropatológicos de modelos animais, uma hierarquia de vulnerabilidade seletiva foi observada com o insulto isquêmico global. A área CA1 do hipocampo é geralmente a estrutura mais vulnerável, seguido pelo neocórtex e, em seguida, pelo estriado (caudado-putâmen) (SCHMIDT-KASTNER, 2015). Portanto, a primeira análise de viabilidade celular corresponde à região CA1 do hipocampo, tendo em vista que está bem documentado haver uma vulnerabilidade seletiva das células nesta região frente à lesão isquêmica (NORABERG et al., 2005).

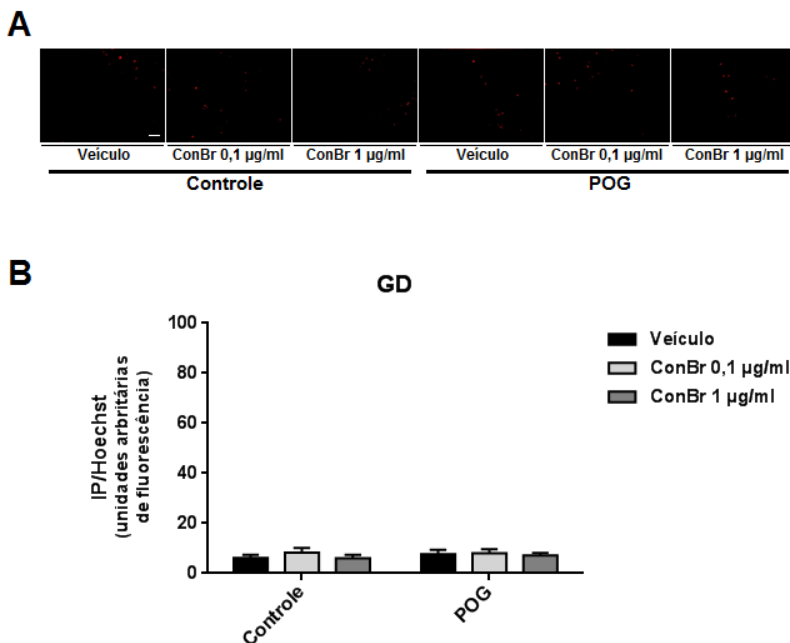
A exposição das culturas à POG/Rep causou um aumento massivo na morte celular, demonstrado pelo aumento na fluorescência de iodeto de propídio (IP) na região CA1 do hipocampo após 24 horas de reperfusão, em comparação com as culturas controle (Figura 12A). A quantificação de fluorescência de iodeto de propídio comprovou que a exposição à POG/Rep causou um dano significativo às células da região CA1 (POG veículo: 61,48 + 10,32;  $p < 0,01$ ; Figura 12B). Já a incubação das culturas com ConBr, durante o período de reperfusão, protegeu as células da morte nas concentrações 0,1  $\mu\text{g/mL}$  (POG + ConBr 0,1  $\mu\text{g/mL}$ : 34,27 + 7,75;  $p < 0,01$ ) e 1  $\mu\text{g/mL}$  (POG + ConBr 1  $\mu\text{g/mL}$ : 8,78 + 1,54;  $p < 0,01$ ). A neuroproteção de ConBr contra a morte celular causada pela POG/Rep mostrou-se mais eficaz na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$ , a qual foi escolhida para as análises subseqüentes de imunohistoquímica.

Para corroborar a validação do nosso modelo de privação de oxigênio e glicose nas culturas organotípicas, também avaliamos a região do giro denteado (GD) do hipocampo por fluorescência de IP. Todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de incorporação de

iodeto de propídio, como pode ser observado pela fluorescência nas fotomicrografias representativas da Figura 13A. Com isso, não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de morte celular entre os grupos (Figura 13B).



**Figura 12. Efeito neuroprotetor da ConBr em COHs (região CA1) submetidas à POG/Rep.** A) Fotomicrografias representativas (região CA1) marcadas com iodeto de propídio (IP) em COHs submetidas ou não à privação de oxigênio e glicose por 15 minutos e reperusão de 24 horas. Barra de escala: 100 µm. B) Análise quantitativa da morte celular determinada através da relação de fluorescência de iodeto de propídio (IP)/Hoechst. As imagens foram capturadas através do microscópio de epifluorescência invertido Zeiss após as 24 horas de reperusão e analisadas utilizando o programa Image J®. Os dados são expressos como médias + E.P.M. de 6 experimentos independentes; \*\* $p < 0,01$ , comparado com o grupo controle (veículo); ## $p < 0,01$ , comparado com o grupo POG (veículo) (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan).



**Figura 13. Avaliação da morte celular em COHs (região GD) submetidas à POG/Rep.** A) Fotomicrografias representativas da região do giro denteado (GD) marcadas com iodeto de propídio (IP) em COHs submetidas ou não à privação de oxigênio e glicose por 15 minutos e reperfusão de 24 horas. Barra de escala: 100  $\mu$ m. B) Análise quantitativa da morte celular determinada através da relação de fluorescência de iodeto de propídio (IP)/Hoechst. As imagens foram capturadas através do microscópio de epifluorescência invertido Zeiss após as 24 horas de reperfusão e analisadas utilizando o programa Image J®. Os dados são expressos como médias + E.P.M. de 6 experimentos independentes (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan).

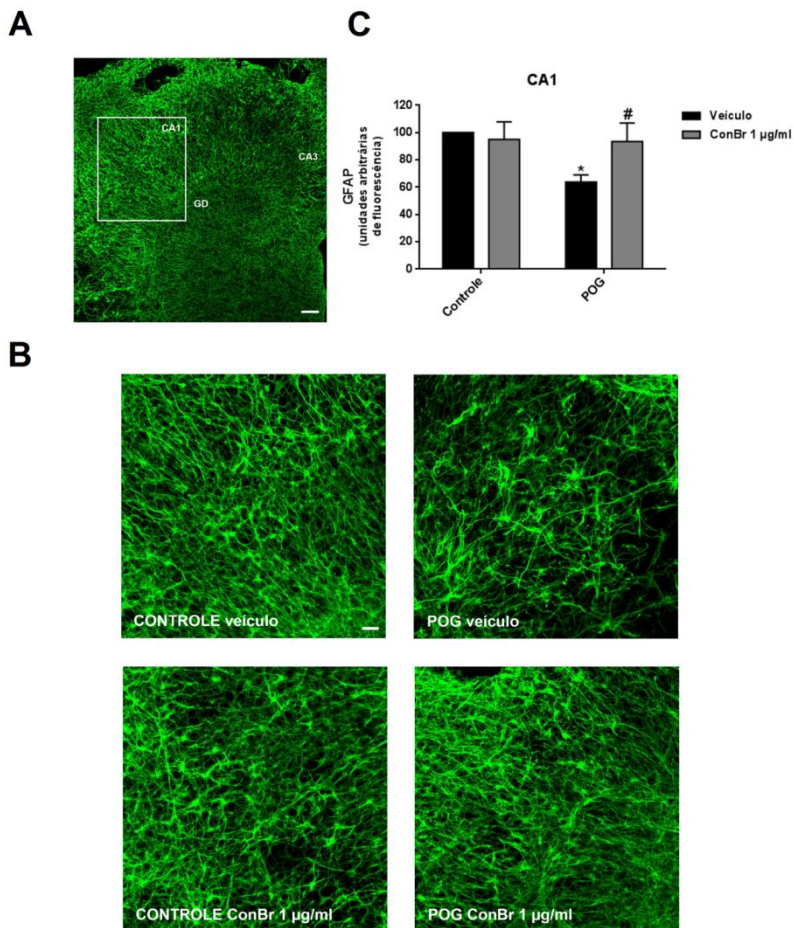
### 5.2.3 Efeito da ConBr sobre a imunorreatividade para GFAP em COHs submetidas à POG/Rep

As respostas a lesões e doenças no SNC envolvem vários tipos de células neurais incluindo os neurônios, astrócitos e células microgliais que interagem ao longo do tempo, em um esforço para manter a homeostase (BURDA & SOFRONIEW, 2014). Os astrócitos, maior classe de células gliais, estão criticamente envolvidos e respondem prontamente a todas as formas de acometimento ao SNC através de diversas alterações funcionais (SOFRONIEW, 2015).

Os astrócitos, portanto, estão envolvidos no metabolismo cerebral, contribuindo ativamente para o aporte energético, modulação da neurotransmissão e para a resposta imune no SNC (BARRES, 1991). Tendo em vista estes aspectos e sabendo que os astrócitos são responsáveis por processos de reparação após uma lesão, como inflamação e necrose (característicos na isquemia - PETITO & HALABY, 1993), foram examinadas as possíveis alterações nos astrócitos positivos para a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) através da técnica de imunohistoquímica.

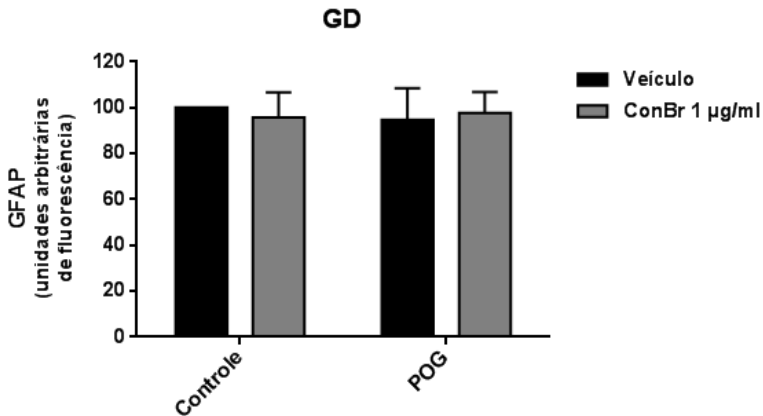
Observando a região CA1 do hipocampo, percebeu-se que as culturas controle apresentaram um aspecto saudável com astrócitos mais estrelados e uma extensa arborização densamente ramificada. Já a cultura exposta à POG/Rep apresentou um aspecto danificado com alterações severas na morfologia: astrócitos aglomerados com um padrão de distribuição bastante heterogêneo e escassez de ramificações. A cultura tratada com ConBr 1 µg/mL, durante o período de reperfusão, demonstrou astrócitos com morfologia semelhante à observada nas culturas controle (Figura 14B). No tempo investigado (após 24 horas de reperfusão) observamos uma diminuição de astrócitos viáveis na cultura submetida à POG/Rep, com relação à cultura controle, o que denotou quantitativamente em uma redução significativa no nível de imunorreatividade para GFAP (POG veículo: 63,79 % + 5,25;  $p < 0,05$ ; Figura 14C). Já a incubação das culturas com ConBr 1 µg/mL, durante o período de reperfusão, demonstrou uma imunorreatividade para GFAP semelhante à cultura controle (POG + ConBr 1 µg/mL: 93,45 % + 13,50).

Mantendo o mesmo padrão das análises de viabilidade celular, nesses estudos de imunohistoquímica também foi analisada a região GD. Todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de imunorreatividade para GFAP, não apresentando diferenças significativas entre os mesmos (Figura 15).



**Figura 14. Efeito da ConBr sobre a imunorreatividade para GFAP e morfologia dos astrócitos em COHs (região CA1) submetidas à POG/Rep.** A) Cultura organotípica hipocampal com a indicação da localização da área escolhida (CA1) para as fotomicrografias representativas. Barra de escala: 100 µm. B) Fotomicrografias representativas da imunorreatividade para GFAP em COHs submetidas ou não à privação de oxigênio e glicose por 15 minutos e reperusão de 24 horas. Barra de escala: 20 µm. C) Análise quantitativa da densidade de fluorescência de GFAP na região CA1 da cultura organotípica

hipocampal. As imagens foram capturadas através do microscópio confocal Leica e analisadas utilizando o programa Image J®. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (incubação com veículo, considerado 100%) e são expressos como médias + E.P.M. de 5 experimentos independentes; \* $p < 0,05$ , comparado com o grupo controle (veículo); # $p < 0,05$ , comparado com o grupo POG (veículo) (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan).



**Figura 15. Imunorreatividade para GFAP em COHs (região GD) submetidas à POG/Rep.** Análise quantitativa da densidade de fluorescência de GFAP na região do giro denteado (GD) da cultura organotípica hipocampal. As imagens foram capturadas através do microscópio confocal Leica e analisadas utilizando o programa Image J®. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (incubação com veículo, considerado 100%) e são expressos como médias + E.P.M. de 5 experimentos independentes; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan.

#### 5.2.4 Efeito da ConBr sobre a imunorreatividade para NeuN em COHs submetidas à POG/Rep

Durante o insulto isquêmico, com a privação de oxigênio e glicose, os neurônios são severamente danificados. Isso se deve principalmente ao grande aumento da concentração extracelular de glutamato levando a excitotoxicidade, com despolarização das células e

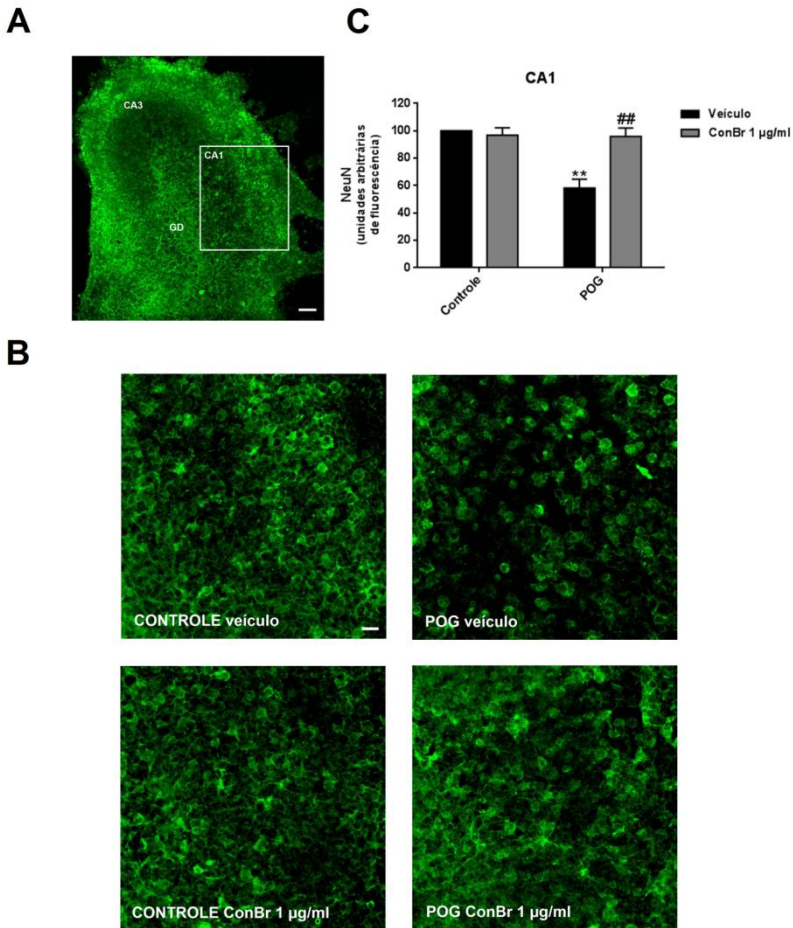
influxo excessivo de  $Ca^{2+}$ , levando a morte neuronal (PUYAL et al. 2013).

Já está bem estabelecido que no hipocampo as células da região CA1 e giro denteado (GD) apresentam vulnerabilidade diferencial frente à isquemia. Os neurônios granulares do GD são resistentes, enquanto que os neurônios piramidais da região CA1 são bem mais sensíveis (OUYANG et al., 2014).

Sabendo que os neurônios têm maior sensibilidade ao insulto isquêmico e que a atividade astrocitária é intimamente relacionada à atividade neuronal (RICCI et al., 2009), foram examinados os possíveis danos aos neurônios positivos para a proteína nuclear neuronal específica (NeuN) através da técnica de imunohistoquímica, de forma complementar à avaliação dos astrócitos da cultura organotípica hipocampal previamente descrita.

Observando a região CA1 do hipocampo, percebeu-se que as culturas controle apresentaram uma densa distribuição de neurônios demonstrada pela considerável quantidade de células positivas para NeuN. Já a cultura exposta à POG/Rep apresentou uma nítida diminuição de células positivas para NeuN. A cultura tratada com ConBr 1  $\mu\text{g/mL}$ , durante o período de reperfusão, promoveu sobrevida dos neurônios revelando um aspecto similar às culturas controle (Figura 16B). No tempo investigado (após 24 horas de reperfusão) há uma massiva perda neuronal na cultura submetida à POG/Rep, em relação ao controle, demonstrado quantitativamente pela diminuição significativa no nível de imunorreatividade para NeuN (POG veículo: 58,26 % + 6,46;  $p < 0,01$ ; Figura 16C). Notavelmente, a incubação das culturas com ConBr 1  $\mu\text{g/mL}$ , durante o período de reperfusão, demonstrou uma imunorreatividade para NeuN semelhante à cultura controle (POG + ConBr 1  $\mu\text{g/mL}$ : 95,85% + 6,21).

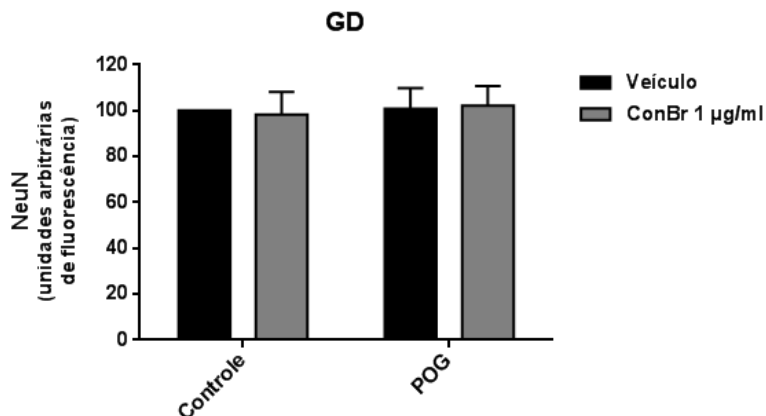
Com relação à região GD, todos os grupos apresentaram níveis semelhantes de imunorreatividade para NeuN, não tendo sido observado diferença significativa entre os mesmos (Figura 17).



**Figura 16. Efeito neuroprotetor da ConBr sobre a imunorreatividade para NeuN em COHs (região CA1) submetidas à POG/Rep.** A) Cultura organotípica hipocampal com a indicação da localização da área escolhida (CA1) para as fotomicrografias representativas. Barra de escala: 100 µm. B) Fotomicrografias representativas da imunorreatividade para NeuN em COHs submetidas ou não à privação de oxigênio e glicose por 15 minutos e reperusão de 24 horas. Barra de escala: 20 µm. C) Análise quantitativa da densidade de fluorescência de NeuN na região CA1 da cultura organotípica hipocampal. As imagens foram capturadas através do microscópio



confocal Leica e analisadas utilizando o programa Image J®. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (incubação apenas com veículo: meio de cultivo, considerado 100%) e são expressos como médias + E.P.M. de 5 experimentos independentes; \*\* $p < 0,01$ , comparado com o grupo controle (veículo); ## $p < 0,01$ , comparado com o grupo POG (veículo) (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan).



**Figura 17. Imunorreatividade para NeuN em COHs (região GD) submetidas à POG/Rep.** Análise quantitativa da densidade de fluorescência de NeuN na região do giro denteado(GD) da cultura organotípica hipocampal. As imagens foram capturadas através do microscópio confocal Leica e analisadas utilizando o programa Image J®. Os dados representam a porcentagem em relação ao controle (incubação apenas com veículo: meio de cultivo, considerado 100%) e são expressos como médias + E.P.M. de 5 experimentos independentes; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Duncan.

## 6 DISCUSSÃO

Os carboidratos presentes nos glicoconjugados sobre a superfície celular têm sido amplamente reconhecidos como elementos fundamentais na comunicação celular. Entretanto, é necessária uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares desencadeados pela interação dessas moléculas com ligantes específicos no SNC.

As lectinas representam um grupo estruturalmente heterogêneo de proteínas, que apresentam a propriedade comum de se unirem reversivelmente e com alta especificidade a carboidratos (CAVADA et al., 2001). Os carboidratos agem como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos e podem desencadear fenômenos de diferenciação e proliferação celular e interações entre células em condições fisiológicas e patológicas (LIU E RABINOVICH, 2005). Lectinas têm sido frequentemente utilizadas no estudo de diferentes sistemas biológicos, inclusive no SNC. Com isso, a proposta deste trabalho foi avaliar possíveis ações da lectina ConBr sobre COHs no modelo de POG/Rep.

Lectinas, especialmente aquelas obtidas de espécies da família Leguminosae, são importantes para estudo do papel da interação de proteínas com carboidratos. As lectinas da subtribo Diocleinae, bastante investigadas, são proteínas estruturalmente muito semelhantes, porém com diferenças significativas na potência e eficácia de suas atividades biológicas (BEZERRA et al., 2007).

Diferentes atividades biológicas já foram atribuídas a lectina obtida de *Canavalia brasiliensis*, ConBr. No presente trabalho foi avaliada a atividade biológica de ConBr em culturas organotípicas hipocámpais (COHs) frente a um dano isquêmico. Nossos resultados demonstraram que ConBr pode exercer efeitos neuroprotetores contra POG/Rep no modelo de COH.

O modelo de cultura organotípica, em comparação com outros modelos *in vitro*, se aproxima mais da situação *in vivo* uma vez que preserva bem todas as células em cultivo por vários dias. Neste tipo de preparação, a citoarquitetura e a organização da matriz extracelular são mantidas, criando um microambiente *in vitro* onde as conexões entre células neuronais e gliais são conservadas (GÄHWILER et al., 1997; GONG et al., 2001; MOLZ et al., 2008; EUGÈNE et al., 2014). As células individuais são organizadas em contato próximo e não há perda de mecanismos reguladores dependentes da densidade, arquitetura tridimensional, bem como de transporte e difusão (ULLRICH et al.,

2011). Observamos que, de fato, o modelo permite a fatia manter a sobrevivência e interação de diferentes tipos de células. Essa organização e integração celular proporcionam um modelo experimental acessível, eficaz e confiável para se estudar os mais variados danos e situações patológicas incluindo, isquemia cerebral, excitotoxicidade e processos neurodegenerativas (GÄHWILER et al., 1997; LOSSI et al., 2009).

Neste estudo, padronizamos em nosso laboratório um modelo de isquemia: a privação de oxigênio e glicose (POG) seguida de reperfusão (Rep) em culturas organotípicas hipocâmpais de ratos. O hipocampo foi utilizado por ser uma das áreas mais susceptíveis do SNC à isquemia, sendo que os neurônios da área CA1 são os mais vulneráveis (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991).

As COHs demonstraram ser uma excelente alternativa para o estudo dos mecanismos associados à isquemia cerebral. O modelo de POG em COH padronizado mimetizou as condições isquêmicas principalmente pelo fato de reproduzir a vulnerabilidade seletiva da região CA1. As COH submetidas à POG/Rep (POG veículo) apresentaram um aumento na morte celular na região CA1, comprovado pelo aumento da fluorescência por iodeto de propídio. Quando as COH são incubadas com ConBr, durante o período de reperfusão, foi observado uma diminuição significativa da morte celular induzida por POG/Rep. O estudo de compostos neuroprotetores frente o dano isquêmico é mais comum durante o período de reperfusão (período em que estudamos o tratamento com ConBr), visto que foi demonstrado que a reperfusão após insultos isquêmicos pode ser mais danosa às células neurais (SHARKEY et al., 1997).

Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que ConBr pode modular sistemas de neurotransmissão e algumas vias de sinalização intracelular que culminam com efeitos neuroprotetores e de modulação da neuroplasticidade (BARAUNA et al., 2006; RUSSI et al., 2012; JACQUES et al., 2013; RIEGER et al., 2014a; RIEGER et al., 2014b). Na tentativa de melhor estabelecer os efeitos de POG/Rep nas COH, foi investigado algumas das proteínas que participam de importantes vias de sinalização envolvidas na sobrevivência neuronal: Wnt/ $\beta$ -catenina e PI3K/Akt, além da MAPKs com análise em especial de p38<sup>MAPK</sup>.

A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina está envolvida com a diferenciação e sobrevivência neuronal na isquemia (SHRUSTER et al., 2012). Os níveis citoplasmáticos da  $\beta$ -catenina são regulados por

fosforilação de tal maneira que na sua forma não-fosforilada a  $\beta$ -catenina pode migrar para o núcleo e induzir a expressão de diversos genes envolvidos na sobrevivência e na homeostase neuronal ou ser direcionada às sinapses para modular o fortalecimento sináptico em resposta à despolarização (CARICASOLE et al., 2003). Entretanto, uma vez fosforilada a  $\beta$ -catenina é degradada (MACDONALD et al., 2009).

A via de sinalização PI3K é conhecida por ser importante na sobrevivência neuronal, e por ser alterada em ambientes de estresse oxidativo e inflamação (SONG et al., 2005; DE OLIVEIRA et al., 2012). Tem sido demonstrado que os efeitos protetores da via de sinalização PI3K são mediados principalmente por um dos seus alvos “*downstream*”, a proteína Akt. Akt tem efeitos diretos sobre a via de apoptose, por inibir diversas proteínas pró-apoptóticas, como a GSK-3 $\beta$  (PAP et al., 1998). A proteína GSK-3 $\beta$  é uma importante inter-relação entre as vias PI3K e Wnt/ $\beta$ -catenina, pois pode atuar diretamente na fosforilação da  $\beta$ -catenina (DOBLE & WOODGETT, 2003). Sendo assim, investigamos a fosforilação da proteína Akt, principal efetora da via PI3K. Os resultados mostraram que após 6 e 12 horas de reperfusão não houve alteração na fosforilação dessa proteína. Seguindo a via da PI3K/Akt, investigou-se a proteína pró-apoptótica GSK-3 $\beta$ . Com o mesmo perfil observado na Akt, também não houve alteração na fosforilação dessa proteína. Com relação à  $\beta$ -catenina, houve apenas uma tendência na diminuição no seu nível de expressão no grupo submetido à POG/Rep após 6 horas de reperfusão.

A fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> está frequentemente relacionada a estresse e morte celular e processos inflamatórios (MIELKE & HERDEGEN, 2000; COWAN E STOREY, 2003). Ativação da sinalização de p38<sup>MAPK</sup> após AVC isquêmico foi identificada em neurônios, astrócitos e microglia (NOZAKI et al., 2001; FERRER et al., 2003; KRUPINSKI et al., 2003; PIAO et al., 2003). Como há envolvimento da via de sinalização p38<sup>MAPK</sup> na astrogliose reativa induzida por AVC isquêmico, sugere-se que pode servir como um alvo para controlar a formação de cicatriz glial (ROY CHOUDHURY et al., 2014). A inibição da ativação de p38<sup>MAPK</sup> foi sugerida como neuroprotetora em diversos modelos experimentais de AVC isquêmico (BARONE et al., 2001; LEGOS et al., 2001; STRASSBURGER et al., 2008). No nosso estudo demonstramos que após 6 e 12 horas de reperfusão não houve alteração significativa na fosforilação dessa proteína. Os resultados mostraram apenas uma tendência no aumento no

nível de fosforilação de p38<sup>MAPK</sup> no grupo submetido à POG/Rep após 6 horas de reperfusão.

Uma possibilidade para não ter sido observado diferenças significativas na fosforilação e expressão das proteínas investigadas nas COH submetidas à POG/Rep, pode ser o fato de que as alterações estejam ocorrendo em tempos diferentes dos analisados ou ainda ocorram de forma muito transitória nesse modelo *in vitro*.

Culturas organotípicas representam ferramentas muito úteis para a análise da proliferação celular e morte em neurônios e células gliais principalmente pelo fato de manter a plasticidade sináptica durante os dias de cultivo (HUMPEL, 2015).

Os astrócitos exercem mecanismos de homeostase críticos para a manutenção do SNC saudável, incluindo a regulação do fluxo sanguíneo, a prestação de metabólitos de energia para neurônios, a participação na função e plasticidade sináptica, e manutenção do equilíbrio extracelular de íons, o equilíbrio de fluidos e neurotransmissores. Além disso, os astrócitos respondem a todas as formas de agressões ao SNC tais como infecção, trauma, isquemia e doenças neurodegenerativas (SOFRONIEW, 2009).

Alterações astrocitárias são, portanto, respostas comuns às diversas lesões cerebrais e são caracterizadas por alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares nos astrócitos. Durante um insulto isquêmico os astrócitos perdem a capacidade de exercer suas funções de suporte do tecido neural. Esse processo é ambíguo, já que em alguns casos exerce um efeito neuroprotetor e, em outros, um resultado danoso, culminando na perda sináptica e até na morte neuronal (BURDA et al., 2016).

No presente trabalho, foram confirmadas alterações na morfologia dos astrócitos observadas pelas modificações fenotípicas e regulação do seu principal componente do citoesqueleto, a proteína GFAP. Este panorama indica que os astrócitos expostos à POG/Rep sofreram danos e isso decorreu possivelmente do desencadeamento dos mecanismos fisiopatológicos da cascata isquêmica relatados na literatura (TAOUFIK & PROBERT, 2008). A ConBr por sua vez, demonstrou ser capaz de impedir este declínio da viabilidade/organização dos astrócitos comprovado pela manutenção dos processos astrocíticos e grau de ramificação.

Há estudos que demonstram que após danos no sistema nervoso, os astrócitos proliferam, sofrem extensiva hipertrofia do núcleo, do corpo e dos processos celulares e aumento da expressão da

proteína GFAP (KHAKH & SOFRONIEW, 2015). Entretanto, esse processo não é estereotípico, podendo variar em extensão, tempo de desenvolvimento, grau de hipertrofia ou hiperplasia e outras propriedades, dependendo da natureza da lesão e da área específica afetada do SNC (ANDERSON et al., 2014). Considerando isso, é provável que durante as horas de reperfusão os astrócitos tenham sofrido alterações graduais, mas no tempo analisado (após 24 horas de reperfusão) foi detectada uma diminuição no nível de unidades arbitrárias de fluorescência para GFAP nas COH submetidas à POG/Rep (POG veículo) indicando um possível quadro de degeneração dos astrócitos. Os tipos de distribuição das fibras gliais variam de acordo com a natureza e duração da lesão, podendo ser focal, nos casos em que a arquitetura básica do tecido é preservada, deixando uma cicatriz glial, ou pode ser uma resposta difusa, quando a arquitetura básica do tecido é destruída lentamente pelo processo patológico (RICCI et al., 2009).

Os astrócitos são suscetíveis à plasticidade assim como os neurônios e a remodelação dos processos astrocíticos está intimamente associada às alterações morfológicas em neurônios vizinhos (THEODOSIS et al., 2008). Dessa forma, neurônios sobrevivem em uma estreita interação com os astrócitos. Consequentemente, em qualquer local onde os astrócitos não consigam sobreviver, a sobrevivência neuronal será afetada e a remodelação sináptica comprometida. Nas regiões em que os astrócitos sobrevivem bem, ainda há a possibilidade para a remodelação sináptica e crescimento de neuritos para compensar a perda de neurônios (CHEN & SWANSON, 2003). As prováveis falhas nas funções dos astrócitos, apresentadas através dos experimentos de imunohistoquímica, podem ter contribuído para a degeneração neuronal também observada. As COH submetidas à POG/Rep (POG veículo) demonstraram uma queda de aproximadamente 40% na sobrevivência neuronal confirmada pela diminuição de células positivas para NeuN. A lectina ConBr, por sua vez, promoveu a manutenção da sobrevivência dos neurônios em níveis semelhantes ao controle.

Cada neurônio pode diferir com relação à extensão do dano oxidativo, à degeneração do citoesqueleto, à disfunção dos microtúbulos etc. Da mesma forma, o colapso energético pode ser variável. Isso poderia explicar a variabilidade de alterações morfológicas que podem ocorrer em grupos de células neuronais submetidas ao mesmo tempo de isquemia e reperfusão (LIPTON, 1999). O atraso na evolução da morte celular na região CA1 é inversamente proporcional à gravidade da lesão isquêmica (PETITO & HALABY, 1993).

Já é bem estabelecido que quando há um insulto, em resposta ao dano neuronal inicial, ocorre ativação de uma complexa resposta celular imune, envolvendo astrócitos e microglia (BAL-PRICE & BROWN, 2001). Os astrócitos promovem atividades essenciais que protegem o tecido e sua função, além de induzirem o reparo neuronal, a produção de substratos energéticos e neurotrofinas (CAMPBELL, 2004). Essa população de células é capaz de reduzir a liberação do glutamato e de radicais livres, restabelecer a BHE e promover a neurovascularização e a neurogênese (SUK, PARK & LEE, 2004). Os astrócitos exercem efeitos protetores do SNC lesionado através do aumento da produção do BDNF e o NGF, promovendo, assim, a sobrevivência neuronal.

Neste contexto, Galectina-1 (Gal-1) produzida por astrócitos, apresenta capacidade de ligação a carboidratos e destaca-se como uma molécula com potencial para prevenir danos neuronais após AVC (WANG et al., 2015). Estudos demonstraram que Gal-1 foi expressa principalmente por astrócitos ativados após a lesão isquêmica e o tratamento com Gal-1 exógena induziu a expressão e secreção do BDNF a partir de astrócitos corticais *in vivo* e *in vitro*. Além disso, o tratamento com Gal-1 suprimiu a morte neuronal e melhorou a recuperação funcional de ratos após a isquemia (QU et al., 2010).

Narp (pentraxina regulada pela atividade neuronal) é outra lectina neuronal expressa e secretada no espaço extracelular, especialmente no hipocampo (TSUI et al., 1996). Esta lectina exhibe afinidade por manose/glicose e apresenta, inclusive, um domínio de reconhecimento de carboidrato notavelmente homólogo ao da lectina vegetal obtida da semente de *Canavalia ensiformis*, Concanavalia A (ConA) (O'BRIEN et al., 1999). Narp demonstrou modular a atividade neural através da organização de receptores de glutamato (O'BRIEN et al., 2002; SCHWARZ et al., 2002), sendo que alguns estudos indicam a atividade de Narp na sinaptogênese excitatória (DITYATEV & SCHACHNER, 2003; CHANG et al., 2010).

Os mecanismos exatos que conduzem os diversos efeitos neuroprotetores promovidos ou mediados por Galectina-1, Narp e outras lectinas cerebrais ainda não estão bem elucidados. A grande maioria dos receptores, canais iônicos e transportadores de neurotransmissores de membrana são de natureza glicoprotéica e, portanto, capazes de interagir com lectinas, podem modular direta ou indiretamente enzimas intracelulares como MAPKs, PKA, PKC, PI3K/AKT e dessa forma regular expressão gênica, sobrevivência/morte celular e neuroplasticidade (THOMAS & HUGANIR, 2004). Desta forma,

diversas lectinas de plantas podem ser também capazes de modular vias de sinalização celular envolvidas na neuroplasticidade e neuroproteção. Inspirados nesses resultados verifica-se perspectivas promissoras na investigação dos mecanismos celulares envolvidos na neuroproteção promovida por ConBr frente ao dano isquêmico.



## 7 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi avaliada a atividade biológica de ConBr sobre culturas organotípicas hipocampais frente ao dano isquêmico. O tratamento com ConBr promoveu significativa melhora da viabilidade celular sendo capaz de manter o nível de densidade e a morfologia dos astrócitos GFAP positivos paralelamente mantendo a sobrevida dos neurônios da região CA1 do hipocampo.

O modelo de cultura organotípica hipocampal forneceu um sistema no qual a citoarquitetura e a conectividade de diferentes tipos celulares bem como suas interações funcionais foram bem preservadas. Em virtude disso, as fatias mantidas em cultivo foram capazes de simular características observadas *in vivo* permitindo avaliar o potencial neuroprotetor de ConBr frente ao dano isquêmico de forma eficiente.

O modelo *in vitro* de isquemia mostrou ser reprodutível em culturas organotípicas hipocampais, pois foi comprovada a vulnerabilidade seletiva das células da região CA1.

Em conjunto, os resultados demonstraram que ConBr é capaz de exercer efeito neuroprotetor contra o dano celular promovido pela à privação de oxigênio e glicose, e portanto, interferir no mecanismo de morte celular induzida pela isquemia *in vitro*.

## 8 REFERÊNCIAS

- ALLARD, JUSTINE, PAULA PACI, LUCE VANDER ELST, E LAURENCE RIS. 2015. “Regional and Time-Dependent Neuroprotective Effect of Hypothermia Following Oxygen-Glucose Deprivation”. **Hippocampus** 25 (2): 197–207.
- ALMKVIST, JENNY, E ANNA KARLSSON. 2004. “Galectins as Inflammatory Mediators”. **Glycoconjugate Journal** 19 (7-9): 575–81.
- ANDERSON, MARK A., YAN AO, E MICHAEL V. SOFRONIEW. 2014. “Heterogeneity of Reactive Astrocytes”. **Neuroscience Letters** 565: 23–9.
- ANDRADE, J. L., S. ARRUDA, T. BARBOSA, L. PAIM, M. V. RAMOS, B. S. CAVADA, E M. BARRAL-NETTO. 1999. “Lectin-Induced Nitric Oxide Production”. **Cellular Immunology** 194 (1): 98–102.
- AVALIANI, NATALIA, ANDREAS TOFT SØRENSEN, MARCO LEDRI, JOHAN BENGZON, PHILIPP KOCH, OLIVER BRÜSTLE, KARL DEISSEROTH, MY ANDERSSON, E MERAB KOKAIA. 2014. “Optogenetics Reveal Delayed Afferent Synaptogenesis on Grafted Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Progenitors”. **Stem Cells** 32 (12): 3088–98.
- BAHR, B. A., M. KESSLER, S. RIVERA, P. W. VANDERKLISH, R. A. HALL, M. S. MUTNEJA, C. GALL, E K. B. HOFFMAN. 1995. “Stable Maintenance of Glutamate Receptors and Other Synaptic Components in Long-Term Hippocampal Slices”. **Hippocampus** 5 (5): 425–39.
- BANERJEE, SWATI, E MANZOOR A. BHAT. 2007. “Neuron-Glial Interactions in Blood-Brain Barrier Formation”. **Annual Review of Neuroscience** 30: 235–58.
- BARAUNA, SARA C., MANUELLA P. KASTER, BETTINA T. HECKERT, KYRIA S. DO NASCIMENTO, FRANCESCO M. ROSSI, EDSON H. TEIXEIRA, BENILDO S. CAVADA, ANA LÚCIA S. RODRIGUES, E RODRIGO B. LEAL. 2006. “Antidepressant-like Effect of Lectin from *Canavalia Brasiliensis* (ConBr) Administered Centrally in Mice”. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior** 85 (1): 160–9.

- BARONE, F. C., E. A. IRVING, A. M. RAY, J. C. LEE, S. KASSIS, S. KUMAR, A. M. BADGER. 2001. "Inhibition of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Provides Neuroprotection in Cerebral Focal Ischemia". **Medicinal Research Reviews** 21 (2): 129–45.
- BARRES, B. A. 1991. "New Roles for Glia". **The Journal of Neuroscience** 11 (12): 3685–94.
- BARROSO-NETO, ITO LIBERATO, RAFAEL CONCEIÇÃO SIMÕES, BRUNO ANDERSON MATIAS ROCHA, MARIA JULIA BARBOSA BEZERRA, FRANCISCO NASCIMENTO PEREIRA-JUNIOR, VINICIUS JOSÉ SILVA OSTERNE, KYRIA SANTIAGO NASCIMENTO. 2014. "Vasorelaxant Activity of Canavalia Grandiflora Seed Lectin: A Structural Analysis". **Archives of Biochemistry and Biophysics** 543: 31–9.
- BERDICHEVSKY, YEVGENY, ALEXANDRA M. DRYER, YERO SAPONJIAN, MARK M. MAHONEY, CORRIN A. PIMENTEL, CORRINA A. LUCINI, MARIJA USENOVIC, E KEVIN J. STALEY. 2013. "PI3K-Akt Signaling Activates mTOR-Mediated Epileptogenesis in Organotypic Hippocampal Culture Model of Post-Traumatic Epilepsy". **The Journal of Neuroscience** 33 (21): 9056–67.
- BERGOLD, P. J., E P. CASACCIA-BONNEFIL. 1997. "Preparation of Organotypic Hippocampal Slice Cultures Using the Membrane Filter Method". **Methods in Molecular Biology** 72: 15–22.
- BERLIOCCHI, LAURA, DANIELE BANO, E PIERLUIGI NICOTERA. 2005. "Ca<sup>2+</sup> Signals and Death Programmes in Neurons". **Biological Sciences** 360 (1464): 2255–8.
- BEZERRA, GUSTAVO ARRUDA, TAIANÁ MAIA OLIVEIRA, FREDERICO BRUNO MENDES BATISTA MORENO, EMMANUEL PRATA DE SOUZA, BRUNO ANDERSON MATIAS DA ROCHA, RAQUEL GUIMARÃES BENEVIDES, PLÍNIO DELATORRE, WALTER FILGUEIRA DE AZEVEDO, E BENILDO SOUSA CAVADA. 2007. "Structural Analysis of Canavalia Maritima and Canavalia Gladiata Lectins Complexed with Different Dimannosides: New Insights into the Understanding of the Structure-Biological Activity Relationship in Legume Lectins". **Journal of Structural Biology** 160 (2): 168–76.
- BICKLER, PHILIP E., DANIEL E. WARREN, JOHN P. CLARK, PABLO GABATTO, MAREN GREGERSEN, E HEATHER

BROSNAN. 2012. “Anesthetic Protection of Neurons Injured by Hypothermia and Rewarming: Roles of Intracellular Ca<sup>2+</sup> and Excitotoxicity”. **Anesthesiology** 117 (2): 280–92.

BJERRUM, O. J., E N. H. HEEGAARD. 1989. “Has Immunoblotting Replaced Electroimmunoprecipitation? Examples from the Analysis of Autoantigens and Transglutaminase-Induced Polymers of the Human Erythrocyte Membrane”. **Journal of Chromatography** 470 (2): 351–67.

BOEHM, S., E S. HUCK. 1998. “Presynaptic Inhibition by Concanavalin A: Are Alpha-Latrotoxin Receptors Involved in Action Potential-Dependent Transmitter Release?” **Journal of Neurochemistry** 71 (6): 2421–30.

BRASCHLER, U. F., A. IANNONE, C. SPENGER, J. STREIT, E H. R. LÜSCHER. 1989. “A Modified Roller Tube Technique for Organotypic Cocultures of Embryonic Rat Spinal Cord, Sensory Ganglia and Skeletal Muscle”. **Journal of Neuroscience Methods** 29 (2): 121–9.

BROUNS, R., E P. P. DE DEYN. 2009. “The Complexity of Neurobiological Processes in Acute Ischemic Stroke”. **Clinical Neurology and Neurosurgery** 111 (6): 483–95.

BRUCE, A. J., B. MALFROY, E M. BAUDRY. 1996. “Beta-Amyloid Toxicity in Organotypic Hippocampal Cultures: Protection by EUK-8, a Synthetic Catalytic Free Radical Scavenger”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 93 (6): 2312–16.

BRUCE, A. J., S. SAKHI, S. S. SCHREIBER, E M. BAUDRY. 1995. “Development of Kainic Acid and N-Methyl-D-Aspartic Acid Toxicity in Organotypic Hippocampal Cultures”. **Experimental Neurology** 132 (2): 209–19.

BUCHS, P. A., L. STOPPINI, E D. MULLER. 1993. “Structural Modifications Associated with Synaptic Development in Area CA1 of Rat Hippocampal Organotypic Cultures”. **Brain Research** 71 (1): 81–91.

BURDA, JOSHUA E., ALEXANDER M. BERNSTEIN, E MICHAEL V. SOFRONIEW. 2016. “Astrocyte Roles in Traumatic Brain Injury”. **Experimental Neurology** 3: 305–15.

BURDA, JOSHUA E., E MICHAEL V. SOFRONIEW. 2014. “Reactive

Gliososis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease". **Neuron** 81 (2): 229–48.

CALVETE, J. J., H. H. THOLE, M. RAIDA, C. URBANKE, A. ROMERO, T. B. GRANGEIRO, M. V. RAMOS, I. M. ALMEIDA DA ROCHA, F. N. GUIMARÃES, E. B. S. CAVADA. 1999. "Molecular Characterization and Crystallization of Diocleinae Lectins". **Biochimica Et Biophysica Acta** 1430 (2): 367–75.

CAVADA, B. S., T. BARBOSA, S. ARRUDA, T. B. GRANGEIRO, E. M. BARRAL-NETTO. 2001. "Revisiting Proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins". **Current Protein & Peptide Science** 2 (2): 123–35.

CAVALIERE, FABIO, EDURNE SAN VICENTE, E CARLOS MATUTE. 2010. "An Organotypic Culture Model to Study Nigro-Striatal Degeneration". **Journal of Neuroscience Methods** 188 (2): 205–12.

CECCATTO, V. M., B. S. CAVADA, E. P. NUNES, N. A. P. NOGUEIRA, M. B. GRANGEIRO, F. B. M. B. MORENO, E. H. TEIXEIRA. 2002. "Purification and Partial Characterization of a Lectin from *Canavalia Grandiflora* Benth. Seeds". **Protein and Peptide Letters** 9 (1): 67–73.

CHANG, MICHAEL C., JOO MIN PARK, KENNETH A. PELKEY, HEIDI L. GRABENSTATTER, DESHENG XU, DAVID J. LINDEN, THOMAS P. SUTULA, CHRIS J. MCBAIN, E PAUL F. WORLEY. 2010. "Narp Regulates Homeostatic Scaling of Excitatory Synapses on Parvalbumin-Expressing Interneurons". **Nature Neuroscience** 13 (9): 1090–7.

CHEN, YONGMEI, E RAYMOND A. SWANSON. 2003. "Astrocytes and Brain Injury". **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism** 23 (2): 137–49.

CHEN, Z., T. B. GIBSON, F. ROBINSON, L. SILVESTRO, G. PEARSON, B. XU, A. WRIGHT, C. VANDERBILT, E M. H. COBB. 2001. "MAP Kinases". **Chemical Reviews** 101 (8): 2449–76.

CHOI, D. W. 1992. "Excitotoxic Cell Death". **Journal of Neurobiology** 23 (9): 1261–76.

COBO, JUAN, EDMUNDO BARRIOS, DONALD KASS, E

RICHARD THOMAS. 2002. "Nitrogen mineralization and crop uptake from surface-applied leaves of green manure species on a tropical volcanic-ash soil". **Biology and Fertility of Soils** 36 (2): 87–92.

CORDOVA, FABIANO M., ANA LÚCIA S. RODRIGUES, MARIA B. O. GIACOMELLI, CAMILA S. OLIVEIRA, THAÍS POSSER, PETER R. DUNKLEY, E RODRIGO B. LEAL. 2004. "Lead Stimulates ERK1/2 and p38MAPK Phosphorylation in the Hippocampus of Immature Rats". **Brain Research** 998 (1): 65–72.

CRUZ, M. S. D., E. PEREZ-URRIA, L. MARTIN, A. AVALOS, E C. VICENTE. 1995. "Factors Influencing Germination of *Canavalia Brasiliensis*, *Leucaena Leucocephala*, *Clitoria Ternatea* and *Calopogonium Mucunoides* Seeds". **Seed Science and Technology**

DAM, T. K., B. S. CAVADA, T. B. GRANGEIRO, C. F. SANTOS, F. A. DE SOUSA, S. OSCARSON, E C. F. BREWER. 1998. "Diocleinae Lectins Are a Group of Proteins with Conserved Binding Sites for the Core Trimannoside of Asparagine-Linked Oligosaccharides and Differential Specificities for Complex Carbohydrates". **The Journal of Biological Chemistry** 273 (20): 12082–8.

DANI, NEIL, E KENDAL BROADIE. 2012. "Glycosylated Synaptomatrix Regulation of Trans-Synaptic Signaling". **Developmental Neurobiology** 72 (1): 2–21.

DAVIAUD, NICOLAS, ELISA GARBAYO, PAUL C. SCHILLER, MIGUEL PEREZ-PINZON, E CLAUDIA N. MONTERO-MENEL. 2013. "Organotypic Cultures as Tools for Optimizing Central Nervous System Cell Therapies". **Experimental Neurology** 248: 429–40.

DE BUTTE-SMITH, M., R. S. ZUKIN, E A. M. ETGEN. 2012. "Effects of Global Ischemia and Estradiol Pretreatment on Phosphorylation of Akt, CREB and STAT3 in Hippocampal CA1 of Young and Middle-Aged Female Rats". **Brain Research** 1471: 118–28.

DE FREITAS PIRES, ALANA, ANA MARIA SAMPAIO ASSREUY, ÉRIKA AUGUSTA BATISTA LOPES, NATÁLIA ROCHA CELEDÔNIO, CARLOS EDUARDO ALVES SOARES, NATÁLIA VELLOSO FONTENELLE CAMELO RODRIGUES, PALOMA LEÃO SOUSA. 2013. "Opioid-like Antinociceptive Effects of Oral Administration of a Lectin Purified from the Seeds of *Canavalia Brasiliensis*". **Fundamental & Clinical Pharmacology** 27 (2): 201–9.

DE OLIVEIRA, JADE, EDUARDO LUIZ GASNHAR MOREIRA,

- DANÚBIA BONFANTI DOS SANTOS, TETSADÊ CAMBOIM PIERMARTIRI, RAFAEL CYPRIANO DUTRA, SIMONE PINTON, CARLA INÊS TASCA, MARCELO FARINA, RUI DANIEL SCHRÖDER PREDIGER, E ANDREZA FABRO DE BEM. 2014. "Increased Susceptibility to Amyloid- $\beta$ -Induced Neurotoxicity in Mice Lacking the Low-Density Lipoprotein Receptor". **Journal of Alzheimer's Disease** 41 (1): 43–60.
- DE SIMONI, ANNA, CLAUDIUS B. GRIESINGER, E FRANCES A. EDWARDS. 2003. "Development of Rat CA1 Neurones in Acute versus Organotypic Slices: Role of Experience in Synaptic Morphology and Activity". **The Journal of Physiology** 550 (Pt 1): 135–47.
- DI LELLA, SANTIAGO, VICTORIA SUNDBLAD, JUAN P. CERLIANI, CARLOS M. GUARDIA, DARIO A. ESTRIN, GERARDO R. VASTA, E GABRIEL A. RABINOVICH. 2011. "When Galectins Recognize Glycans: From Biochemistry to Physiology and Back Again". **Biochemistry** 50 (37): 7842–57.
- DING, V. W., R. H. CHEN, E F. MCCORMICK. 2000. "Differential Regulation of Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  by Insulin and Wnt Signaling". **The Journal of Biological Chemistry** 275 (42): 32475–81.
- DI PIETRO, VALENTINA, ANGELA MARIA AMORINI, GIACOMO LAZZARINO, KAMAL MAKRAM YAKOUB, SERAFINA D'URSO, GIUSEPPE LAZZARINO, E ANTONIO BELLI. 2015. "S100B and Glial Fibrillary Acidic Protein as Indexes to Monitor Damage Severity in an In Vitro Model of Traumatic Brain Injury". **Neurochemical Research** 40 (5): 991–99.
- DIRNAGL, U., C. IADECOLA, E M. A. MOSKOWITZ. 1999. "Pathobiology of Ischaemic Stroke: An Integrated View". **Trends in Neurosciences** 22 (9): 391–97.
- DITYATEV, ALEXANDER, E MELITTA SCHACHNER. 2003. "Extracellular Matrix Molecules and Synaptic Plasticity". **Nature Reviews Neuroscience** 4 (6): 456–68.
- DJUKIC, BILJANA, KRISTEN B. CASPER, BENJAMIN D. PHILPOT, LIH-SHEN CHIN, E KEN D. MCCARTHY. 2007. "Conditional Knock-out of Kir4.1 Leads to Glial Membrane Depolarization, Inhibition of Potassium and Glutamate Uptake, and Enhanced Short-Term Synaptic Potentiation". **The Journal of Neuroscience** 27 (42): 11354–65.

DOBLE, BRADLEY W., E JAMES R. WOODGETT. 2003. "GSK-3: Tricks of the Trade for a Multi-Tasking Kinase". **Journal of Cell Science** 116 (Pt 7): 1175–86.

DONNAN, GEOFFREY A., MARC FISHER, MALCOLM MACLEOD, E STEPHEN M. DAVIS. 2008. "Stroke". **Lancet** 371 (9624): 1612–23.

DOYLE, KRISTIAN P., ROGER P. SIMON, E MARY P. STENZEL-POORE. 2008. "Mechanisms of Ischemic Brain Damage". **Neuropharmacology** 55 (3): 310–18.

EDELMAN, G. M., B. A. CUNNINGHAM, G. N. REEKE, J. W. BECKER, M. J. WAXDAL, E J. L. WANG. 1972. "The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 69 (9): 2580–84.

EGEA, J., M. D. MARTÍN-DE-SAAVEDRA, E. PARADA, A. ROMERO, L. DEL BARRIO, A. O. ROSA, A. G. GARCÍA, E M. G. LÓPEZ. 2012. "Galantamine Elicits Neuroprotection by Inhibiting iNOS, NADPH Oxidase and ROS in Hippocampal Slices Stressed with Anoxia/reoxygenation". **Neuropharmacology** 62 (2): 1082–90.

ENDO, TAMAO. 2005. "Glycans and Glycan-Binding Proteins in Brain: Galectin-1-Induced Expression of Neurotrophic Factors in Astrocytes". **Current Drug Targets** 6 (4): 427–36.

EUGÈNE, EMMANUEL, FRANÇOISE CLUZEAUD, CARMEN CIFUENTES-DIAZ, DESDEMONA FRICKER, CAROLINE LE DUIGOU, STEPHANE CLEMENCEAU, MICHEL BAULAC, JEAN-CHRISTOPHE PONCER, E RICHARD MILES. 2014. "An Organotypic Brain Slice Preparation from Adult Patients with Temporal Lobe Epilepsy". **Journal of Neuroscience Methods** 235: 234–44.

FEIGIN, VALERY L., MOHAMMAD H. FOROUZANFAR, RITA KRISHNAMURTHI, GEORGE A. MENSAH, MYLES CONNOR, DERRICK A. BENNETT, ANDREW E. MORAN. 2014. "Global and Regional Burden of Stroke during 1990-2010: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010". **Lancet** 383 (9913): 245–54.

FERRER, I., B. FRIGULS, E. DALFÓ, E A. M. PLANAS. 2003. "Early Modifications in the Expression of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK/ERK), Stress-Activated Kinases SAPK/JNK and p38, and Their Phosphorylated Substrates Following Focal Cerebral Ischemia". **Acta**



**Neuropathologica** 105 (5): 425–37.

FERRER-MARTÍN, ROSA M., DAVID MARTÍN-OLIVA, ANA SIERRA, MARIA-CARMEN CARRASCO, MARÍA MARTÍN-ESTEBANÉ, RUTH CALVENTE, JOSÉ L. MARÍN-TEVA, JULIO NAVASCUÉS, E MIGUEL A. CUADROS. 2014. “Microglial Cells in Organotypic Cultures of Developing and Adult Mouse Retina and Their Relationship with Cell Death”. **Experimental Eye Research** 121: 42–57.

FRANTSEVA, M. V., P. L. CARLEN, E J. L. PEREZ VELAZQUEZ. 2001. “Dynamics of Intracellular Calcium and Free Radical Production during Ischemia in Pyramidal Neurons”. **Free Radical Biology & Medicine** 31 (10): 1216–27.

FROTSCHER, M., E B. H. GÄHWILER. 1988. “Synaptic Organization of Intracellularly Stained CA3 Pyramidal Neurons in Slice Cultures of Rat Hippocampus”. **Neuroscience** 24 (2): 541–51.

FROTSCHER, M., S. ZAFIROV, E B. HEIMRICH. 1995. “Development of Identified Neuronal Types and of Specific Synaptic Connections in Slice Cultures of Rat Hippocampus”. **Progress in Neurobiology** 45 (2): 143–64.

FU, LEI-LEI, CHENG-CHENG ZHOU, SHUN YAO, JIA-YING YU, BO LIU, E JIN-KU BAO. 2011. “Plant Lectins: Targeting Programmed Cell Death Pathways as Antitumor Agents”. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** 43 (10): 1442–49.

GADELHA, CARLOS ALBERTO DE ALMEIDA, FREDERICO BRUNO MENDES BATISTA MORENO, TATIANE SANTI-GADELHA, JOÃO BATISTA CAJAZEIRAS, BRUNO ANDERSON M. DA ROCHA, JOANE KATHELEN RODRIGUES RUSTIGUEL, BEATRIZ TUPINAMBA FREITAS. 2005. “Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of a Lectin from *Canavalia Maritima* Seeds”. **Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications** 61 (Pt 1): 87–89.

GÄHWILER, B. H. 1981. “Organotypic Monolayer Cultures of Nervous Tissue”. **Journal of Neuroscience Methods** 4 (4): 329–42.

GÄHWILER, B. H. 1984. “Slice Cultures of Cerebellar, Hippocampal and Hypothalamic Tissue”. **Experientia** 40 (3): 235–43.

GÄHWILER, B. H. 1988. “Organotypic Cultures of Neural Tissue”.

**Trends in Neurosciences** 11 (11): 484–89.

GÄHWILER, B. H., M. CAPOGNA, D. DEBANNE, R. A. MCKINNEY, E S. M. THOMPSON. 1997. “Organotypic Slice Cultures: A Technique Has Come of Age”. **Trends in Neurosciences** 20 (10): 471–77.

GÄHWILER, B. H., S. M. THOMPSON, E D. MULLER. 2001. “Preparation and Maintenance of Organotypic Slice Cultures of CNS Tissue”. **Current Protocols in Neuroscience** Chapter 6: Unit 6.11.

GEBHARDT, R. 2000. “In Vitro Screening of Plant Extracts and Phytopharmaceuticals: Novel Approaches for the Elucidation of Active Compounds and Their Mechanisms”. **Planta Medica** 66 (2): 99–105.

GONDA, XENIA. 2012. “Basic Pharmacology of NMDA Receptors”. **Current Pharmaceutical Design** 18 (12): 1558–67.

GORDON, GRANT R. J., SEAN J. MULLIGAN, E BRIAN A. MACVICAR. 2007. “Astrocyte Control of the Cerebrovasculature”. **Glia** 55 (12): 1214–21.

GRANGEIRO, T. B., A. SCHRIEFER, J. J. CALVETE, M. RAIDA, C. URBANKE, M. BARRAL-NETTO, E B. S. CAVADA. 1997. “Molecular Cloning and Characterization of ConBr, the Lectin of *Canavalia Brasiliensis* Seeds”. **European Journal of Biochemistry** 248 (1): 43–48.

HANADA, MASAHITO, JIANHUA FENG, E BRIAN A. HEMMINGS. 2004. “Structure, Regulation and Function of PKB/AKT-- a Major Therapeutic Target”. **Biochimica Et Biophysica Acta** 1697 (1-2): 3–16.

HARDMAN, K. D., E C. F. AINSWORTH. 1972. “Structure of Concanavalin A at 2.4-Å Resolution”. **Biochemistry** 11 (26): 4910–19.

HEIMRICH, B., E M. FROTSCHER. 1991. “Differentiation of Dentate Granule Cells in Slice Cultures of Rat Hippocampus: A Golgi/electron Microscopic Study”. **Brain Research** 538 (2): 263–68.

HELMHOLZ, HEIKE, SIMONE CARTELLIERI, LIZHONG HE, PETER THIESEN, E BERND NIEMEYER. 2003. “Process Development in Affinity Separation of Glycoconjugates with Lectins as Ligands”. **Journal of Chromatography** 1006 (1-2): 127–35.

HOLOPAINEN, IRMA E. 2005. “Organotypic Hippocampal Slice

Cultures: A Model System to Study Basic Cellular and Molecular Mechanisms of Neuronal Cell Death, Neuroprotection, and Synaptic Plasticity". **Neurochemical Research** 30 (12): 1521–28.

HUGHES, REBECCA H., VICTORIA A. SILVA, IJAZ AHMED, DAVID I. SHREIBER, E BARCLAY MORRISON. 2014. "Neuroprotection by Genipin against Reactive Oxygen and Reactive Nitrogen Species-Mediated Injury in Organotypic Hippocampal Slice Cultures". **Brain Research** 1543: 308–14.

HUMPEL, C. 2015. "Organotypic Brain Slice Cultures: A Review". **Neuroscience** 305: 86–98.

IADECOLA, COSTANTINO, E MAIKEN NEDERGAARD. 2007. "Glial Regulation of the Cerebral Microvasculature". **Nature Neuroscience** 10 (11): 1369–76.

ISHIBASHI, SATORU, TOSHIHIKO KUROIWA, MASANORI SAKAGUCHI, LIYUAN SUN, TOSHIHIKO KADOYA, HIDEYUKI OKANO, E HIDEHIRO MIZUSAWA. 2007. "Galectin-1 Regulates Neurogenesis in the Subventricular Zone and Promotes Functional Recovery after Stroke". **Experimental Neurology** 207 (2): 302–13.

JACQUES, AMANDA V., DÉBORA K. RIEGER, MARIANA MAESTRI, MARK W. LOPES, TANARA V. PERES, FILIPE M. GONÇALVES, DANIELA Z. PEDRO. 2013. "Lectin from *Canavalia Brasiliensis* (ConBr) Protects Hippocampal Slices against Glutamate Neurotoxicity in a Manner Dependent of PI3K/Akt Pathway". **Neurochemistry International** 62 (6): 836–42.

JIN, RONG, GUOJUN YANG, E GUOHONG LI. 2010. "Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells". **Journal of Leukocyte Biology** 87 (5): 779–89.

JOPE, RICHARD S. 2003. "Lithium and GSK-3: One Inhibitor, Two Inhibitory Actions, Multiple Outcomes". **Trends in Pharmacological Sciences** 24 (9): 441–43.

JOPE, RICHARD S., E MYOUNG-SUN ROH. 2006. "Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) in Psychiatric Diseases and Therapeutic Interventions". **Current Drug Targets** 7 (11): 1421–34.

JUAN GUILLERMO COBO, EDMUNDO BARRIOS. 2002. "Nitrogen mineralization and crop uptake from surface-applied leaves of green manure species on a tropical volcanic-ash soil". **Biology and Fertility**

**of Soils** 36 (2): 87–92.

KAJITANI, K., H. NOMARU, M. IFUKU, N. YUTSUDO, Y. DAN, T. MIURA, D. TSUCHIMOTO. 2009. “Galectin-1 Promotes Basal and Kainate-Induced Proliferation of Neural Progenitors in the Dentate Gyrus of Adult Mouse Hippocampus”. **Cell Death and Differentiation** 16 (3): 417–27.

KHAKH, BALJIT S., E MICHAEL V. SOFRONIEW. 2015. “Diversity of Astrocyte Functions and Phenotypes in Neural Circuits”. **Nature Neuroscience** 18 (7): 942–52.

KIM, EUN KYUNG, E EUI-JU CHOI. 2010. “Pathological Roles of MAPK Signaling Pathways in Human Diseases”. **Biochimica Et Biophysica Acta** 1802 (4): 396–405.

KIM, HYUNJEONG, EOSU KIM, MINSUN PARK, EUN LEE, E KEE NAMKOONG. 2013. “Organotypic Hippocampal Slice Culture from the Adult Mouse Brain: A Versatile Tool for Translational Neuropsychopharmacology”. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 41: 36–43.

KIM, JEONG-AH, KAYO MITSUKAWA, MAKI K. YAMADA, NOBUYOSHI NISHIYAMA, NORIO MATSUKI, E YUJI IKEGAYA. 2002. “Cytoskeleton Disruption Causes Apoptotic Degeneration of Dentate Granule Cells in Hippocampal Slice Cultures”. **Neuropharmacology** 42 (8): 1109–18.

KIM, UN JENG, RAN WON, E KYUNG HEE LEE. 2015. “Neuroprotective Effects of Okadaic Acid Following Oxidative Injury in Organotypic Hippocampal Slice Culture”. **Brain Research** 1618: 241–48.

KLEENE, RALF, E MELITTA SCHACHNER. 2004. “Glycans and Neural Cell Interactions”. **Nature Reviews Neuroscience** 5 (3): 195–208.

KOEHLER, RAYMOND C., RICHARD J. ROMAN, E DAVID R. HARDER. 2009. “Astrocytes and the Regulation of Cerebral Blood Flow”. **Trends in Neurosciences** 32 (3): 160–69.

KRUPINSKI, J., M. SLEVIN, E. MARTI, E. CATENA, F. RUBIO, E J. GAFFNEY. 2003. “Time-Course Phosphorylation of the Mitogen Activated Protein (MAP) Kinase Group of Signalling Proteins and Related Molecules Following Middle Cerebral Artery Occlusion

(MCAO) in Rats”. **Neuropathology and Applied Neurobiology** 29 (2): 144–58.

LANCASTER, MADELINE A., MAGDALENA RENNER, CAROL-ANNE MARTIN, DANIEL WENZEL, LOUISE S. BICKNELL, MATTHEW E. HURLES, TESSA HOMFRAY, JOSEF M. PENNINGER, ANDREW P. JACKSON, E JUERGEN A. KNOBLICH. 2013. “Cerebral Organoids Model Human Brain Development and Microcephaly”. **Nature** 501 (7467): 373–79.

LEAL, RODRIGO B., FABIANO M. CORDOVA, LYNN HERD, LARISA BOBROVSKAYA, E PETER R. DUNKLEY. 2002. “Lead-Stimulated p38MAPK-Dependent Hsp27 Phosphorylation”. **Toxicology and Applied Pharmacology** 178 (1): 44–51.

LEAL, RODRIGO B., THAÍS POSSER, ANA PAULA RIGON, CAMILA S. OLIVEIRA, CARLOS ALBERTO GONÇALVES, DANIEL P. GELAIN, E PETER R. DUNKLEY. 2007. “Cadmium Stimulates MAPKs and Hsp27 Phosphorylation in Bovine Adrenal Chromaffin Cells”. **Toxicology** 234 (1-2): 34–43.

LEE, YOUNGJEON, SANG-RAE LEE, SUNG S. CHOI, HYEON-GU YEO, KYU-TAE CHANG, E HONG J. LEE. 2014. “Therapeutically Targeting Neuroinflammation and Microglia after Acute Ischemic Stroke”. **BioMed Research International** 2014.

LEGOS, J. J., J. A. ERHARDT, R. F. WHITE, S. C. LENHARD, S. CHANDRA, A. A. PARSONS, R. F. TUMA, E F. C. BARONE. 2001. “SB 239063, a Novel p38 Inhibitor, Attenuates Early Neuronal Injury Following Ischemia”. **Brain Research** 892 (1): 70–77.

LEKISHVILI, TAMUNA, SHIRLEY HESKETH, MARCUS W. BRAZIER, E DAVID R. BROWN. 2006. “Mouse Galectin-1 Inhibits the Toxicity of Glutamate by Modifying NR1 NMDA Receptor Expression”. **The European Journal of Neuroscience** 24 (11): 3017–25.

LI, CHENGQIU, TING WANG, CHUNYUAN ZHANG, JICHANG XUAN, CHANGJIANG SU, E YUQI WANG. 2016. “Quercetin Attenuates Cardiomyocyte Apoptosis via Inhibition of JNK and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways”. **Gene** 577 (2): 275–80.

LI, CHUN-YANG, HUAI-LONG XU, BO LIU, E JIN-KU BAO. 2010.

“Concanavalin A, from an Old Protein to Novel Candidate Anti-Neoplastic Drug”. **Current Molecular Pharmacology** 3 (3): 123–28.

LI, JING, WANLI XUAN, RAN YAN, MICHAEL B. TROPAK, EMILIE JEAN-ST-MICHEL, WENBIN LIANG, RACHEL GLADSTONE, PETER H. BACKX, RAJESH K. KHARBANDA, E ANDREW N. REDINGTON. 2011. “Remote Preconditioning Provides Potent Cardioprotection via PI3K/Akt Activation and Is Associated with Nuclear Accumulation of  $\beta$ -Catenin”. **Clinical Science** 120 (10): 451–62.

LIN, S. S., E I. B. LEVITAN. 1991. “Concanavalin A: A Tool to Investigate Neuronal Plasticity”. **Trends in Neurosciences** 14 (7): 273–77.

LIPTON, P. 1999. “Ischemic Cell Death in Brain Neurons”. **Physiological Reviews** 79 (4): 1431–1568.

LIPTON, S. A., E P. A. ROSENBERG. 1994. “Excitatory Amino Acids as a Final Common Pathway for Neurologic Disorders”. **The New England Journal of Medicine** 330 (9): 613–22.

LIS, H., E N. SHARON. 1993. “Protein Glycosylation. Structural and Functional Aspects”. **European Journal of Biochemistry** 218 (1): 1–27.

LIU, FU-TONG, E GABRIEL A. RABINOVICH. 2005. “Galectins as Modulators of Tumour Progression”. **Nature Reviews Cancer** 5 (1): 29–41.

LIU, RAN, HUI YUAN, FANG YUAN, E SHAO-HUA YANG. 2012. “Neuroprotection Targeting Ischemic Penumbra and beyond for the Treatment of Ischemic Stroke”. **Neurological Research** 34 (4): 331–37.

LO, ENG H., TURGAY DALKARA, E MICHAEL A. MOSKOWITZ. 2003. “Mechanisms, Challenges and Opportunities in Stroke”. **Nature Reviews Neuroscience** 4 (5): 399–415.

LOPES, MARK WILLIAM, FLÁVIA MAHATMA SCHNEIDER SOARES, NELSON DE MELLO, JEAN COSTA NUNES, FABIANO MENDES DE CORDOVA, ROGER WALZ, E RODRIGO BAINY LEAL. 2012. “Time-Dependent Modulation of Mitogen Activated Protein Kinases and AKT in Rat Hippocampus and Cortex in the Pilocarpine Model of Epilepsy”. **Neurochemical Research** 37 (9): 1868–78.

- LOSSI, LAURA, SILVIA ALASIA, CHIARA SALIO, E ADALBERTO MERIGHI. 2009. "Cell Death and Proliferation in Acute Slices and Organotypic Cultures of Mammalian CNS". **Progress in Neurobiology** 88 (4): 221–45.
- MACDONALD, BRYAN T., KEIKO TAMAI, E XI HE. 2009. "Wnt/beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases". **Developmental Cell** 17 (1): 9–26.
- MAFFIOLI, CAROLA, DENIS GRANDGIRARD, STEPHEN L. LEIB, E OLIVIER ENGLER. 2012. "SiRNA Inhibits Replication of Langat Virus, a Member of the Tick-Borne Encephalitis Virus Complex in Organotypic Rat Brain Slices". **PloS One** 7 (9): e44703.
- MALARKEY, ERIK B., E VLADIMIR PARPURA. 2008. "Mechanisms of Glutamate Release from Astrocytes". **Neurochemistry International** 52 (1-2): 142–54.
- MANCINI, JAYME D., DAWN M. AUTIO, E WILLIAM D. ATCHISON. 2009. "Continuous Exposure to Low Concentrations of Methylmercury Impairs Cerebellar Granule Cell Migration in Organotypic Slice Culture". **Neurotoxicology** 30 (2): 203–8.
- MARIGA, ABIGAIL, JULIANE GLASER, LEO MATHIAS, DESHENG XU, MEIFANG XIAO, PAUL WORLEY, IPE NINAN, E MOSES V. CHAO. 2015. "Definition of a Bidirectional Activity-Dependent Pathway Involving BDNF and Narp". **Cell Reports** 13 (9): 1747–56.
- MARKSTEINER, J., E C. HUMPEL. 2008. "Beta-Amyloid Expression, Release and Extracellular Deposition in Aged Rat Brain Slices". **Molecular Psychiatry** 13 (10): 939–52.
- MARSCHAL, P., A. REEBER, J. R. NEESER, G. VINCENDON, E J. P. ZANETTA. 1989. "Carbohydrate and Glycoprotein Specificity of Two Endogenous Cerebellar Lectins". **Biochimie** 71 (5): 645–53.
- MELDRUM, B. S. 2000. "Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology". **The Journal of Nutrition** 130 (4S Suppl): 1007S – 15S.
- MIELKE, K., E T. HERDEGEN. 2000. "JNK and p38 Stresskinases--Degenerative Effectors of Signal-Transduction-Cascades in the Nervous System". **Progress in Neurobiology** 61 (1): 45–60.

MINKO, TAMARA. 2004. "Drug Targeting to the Colon with Lectins and Neoglycoconjugates". **Advanced Drug Delivery Reviews** 56 (4): 491–509.

MODY, R., S. JOSHI, E W. CHANEY. 1995. "Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer". **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods** 33 (1): 1–10.

MOLZ, SIMONE, HELENA DECKER, THARINE DAL-CIM, CARLA CREMONEZ, FABIANO M. CORDOVA, RODRIGO B. LEAL, E CARLA I. TASCA. 2008. "Glutamate-Induced Toxicity in Hippocampal Slices Involves Apoptotic Features and p38 MAPK Signaling". **Neurochemical Research** 33 (1): 27–36.

MOREIRA, R. A., E B. S. CAVADA. 1984. "Lectin from *Canavalia Brasiliensis* (MART.). Isolation, Characterization and Behavior during Germination". **Biologia Plantarum** 26 (2): 113–20.

MOREIRA, R. A., E. F. CORDEIRO, M. V. RAMOS, T. B. GRANGEIRO, J. L. MARTINS, J. T. A. OLIVEIRA, E B. S. CAVADA. 1996. "Isolation and partial characterization of a lectin from seeds of *Dioclea violacea*". **Research Gate** 8 (1): 23–29.

MOURA, TALES ROCHA, GUSTAVO ARRUDA BEZERRA, MARIA JULIA BARBOSA BEZERRA, CÍCERO SILVANO TEIXERA, EDUARDO HENRIQUE SALVIANO BEZERRA, RAQUEL GUIMARÃES BENEVIDES, BRUNO ANDERSON MATIAS DA ROCHA. 2009. "Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Analysis of the Lectin from *Canavalia Boliviana* Piper Seeds". **Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications** 65 (Pt 3): 213–15.

MOZAFFARIAN, DARIUSH, EMELIA J. BENJAMIN, ALAN S. GO, DONNA K. ARNETT, MICHAEL J. BLAHA, MARY CUSHMAN, SANDEEP R. DAS. 2016. "Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association". **Circulation** 133 (4): 447–54.

MURRAY, C. J., E A. D. LOPEZ. 1997. "Global Mortality, Disability, and the Contribution of Risk Factors: Global Burden of Disease Study". **Lancet** 349 (9063): 1436–42.

NEUSER, FRANZISKA, MARTIN POLACK, CHRISTINE ANNAHEIM, KERRY L. TUCKER, E MARTIN KORTE. 2013. "Region-Specific Integration of Embryonic Stem Cell-Derived Neuronal



Precursors into a Pre-Existing Neuronal Circuit”. **PLoS One** 8 (6): e66497.

NORABERG, JENS, FRANTZ ROM POULSEN, MORTEN BLAABJERG, BJARNE WINTHER KRISTENSEN, CHRISTIAN BONDE, MARIA MONTERO, MORTEN MEYER, JAN BERT GRAMSBERGEN, E JENS ZIMMER. 2005. “Organotypic Hippocampal Slice Cultures for Studies of Brain Damage, Neuroprotection and Neurorepair”. **Current Drug Targets** 4 (4): 435–52.

NORABERG, J., B. W. KRISTENSEN, E J. ZIMMER. 1999. “Markers for Neuronal Degeneration in Organotypic Slice Cultures”. **Brain Research Protocols** 3 (3): 278–90.

NOZAKI, K., M. NISHIMURA, E N. HASHIMOTO. 2001. “Mitogen-Activated Protein Kinases and Cerebral Ischemia”. **Molecular Neurobiology** 23 (1): 1–19.

O’BRIEN, RICHARD, DESHENG XU, RUIFA MI, XIAOPEI TANG, CARSTEN HOPF, E PAUL WORLEY. 2002. “Synaptically Targeted Narp Plays an Essential Role in the Aggregation of AMPA Receptors at Excitatory Synapses in Cultured Spinal Neurons”. **The Journal of Neuroscience** 22 (11): 4487–98.

O’BRIEN, R. J., D. XU, R. S. PETRALIA, O. STEWARD, R. L. HUGANIR, E P. WORLEY. 1999. “Synaptic Clustering of AMPA Receptors by the Extracellular Immediate-Early Gene Product Narp”. **Neuron** 23 (2): 309–23.

OHTSUBO, KAZUAKI, E JAMEY D. MARTH. 2006. “Glycosylation in Cellular Mechanisms of Health and Disease”. **Cell** 126 (5): 855–67.

OSTERNE, VINICIUS J. S., MAYARA Q. SANTIAGO, VANIR R. PINTO-JUNIOR, JOÃO B. CAJAZEIRAS, JORGE L. A. CORREIA, CINTIA C. F. LEITÃO, RÔMULO F. CARNEIRO. 2014. “Purification, Partial Characterization, and CNBr-Sepharose Immobilization of a Vasorelaxant Glucose/mannose Lectin from *Canavalia Virosa* Seeds”. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 172 (7): 3342–53.

OUYANG, YI-BING, LIJUN XU, SIBIAO YUE, SIWEI LIU, E RONA G. GIFFARD. 2014. “Neuroprotection by Astrocytes in Brain Ischemia: Importance of microRNAs”. **Neuroscience Letters** 565: 53–8.

PARADA, ESTHER, JAVIER EGEA, IZASKUN BUENDIA, PILAR

NEGREDO, ANA C. CUNHA, SILVIA CARDOSO, MIGUEL P. SOARES, E MANUELA G. LÓPEZ. 2013. "The Microglial  $\alpha$ 7-Acetylcholine Nicotinic Receptor Is a Key Element in Promoting Neuroprotection by Inducing Heme Oxygenase-1 via Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2". **Antioxidants & Redox Signaling** 19 (11): 1135–48.

PETERSON, G. L. 1977. "A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et Al. Which Is More Generally Applicable". **Analytical Biochemistry** 83 (2): 346–56.

PETITO, C. K., E I. A. HALABY. 1993. "Relationship between Ischemia and Ischemic Neuronal Necrosis to Astrocyte Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein". **International Journal of Developmental Neuroscience** 11 (2): 239–47.

PIAO, CHUN SHU, JUNG-BIN KIM, PYUNG-LIM HAN, E JAKYEONG LEE. 2003. "Administration of the p38 MAPK Inhibitor SB203580 Affords Brain Protection with a Wide Therapeutic Window against Focal Ischemic Insult". **Journal of Neuroscience Research** 73 (4): 537–44.

PINKERNELLE, JOSEPHINE, HISHAM FANSA, UWE EBMEYER, E GERBURG KEILHOFF. 2013. "Prolonged Minocycline Treatment Impairs Motor Neuronal Survival and Glial Function in Organotypic Rat Spinal Cord Cultures". **PloS One** 8 (8): e73422.

PORTER, J. T., E K. D. MCCARTHY. 1997. "Astrocytic Neurotransmitter Receptors in Situ and in Vivo". **Progress in Neurobiology** 51 (4): 439–55.

PUYAL, JULIEN, VANESSA GINET, E PETER G. H. CLARKE. 2013. "Multiple Interacting Cell Death Mechanisms in the Mediation of Excitotoxicity and Ischemic Brain Damage: A Challenge for Neuroprotection". **Progress in Neurobiology** 105: 24–48.

QUINTANA, PATRICE, DAVID SOTO, OLIVIER POIROT, MARZIEH ZONOZI, STEPHAN KELLENBERGER, DOMINIQUE MULLER, ROMAN CHRAST, E STUART G. CULL-CANDY. 2015. "Acid-Sensing Ion Channel 1a Drives AMPA Receptor Plasticity Following Ischaemia and Acidosis in Hippocampal CA1 Neurons". **The Journal of Physiology** 593 (19): 4373–86.

QU, WEN-SHENG, YI-HUI WANG, JUN-FANG MA, DAI-SHI TIAN, QIANG ZHANG, DENG-JI PAN, ZHI-YUAN YU, MIN-JIE

- XIE, JIAN-PING WANG, E WEI WANG. 2011. "Galectin-1 Attenuates Astroglisis-Associated Injuries and Improves Recovery of Rats Following Focal Cerebral Ischemia". **Journal of Neurochemistry** 116 (2): 217–26.
- QU, WEN-SHENG, YI-HUI WANG, JIAN-PING WANG, YING-XIN TANG, QIANG ZHANG, DAI-SHI TIAN, ZHI-YUAN YU, MIN-JIE XIE, E WEI WANG. 2010. "Galectin-1 Enhances Astrocytic BDNF Production and Improves Functional Outcome in Rats Following Ischemia". **Neurochemical Research** 35 (11): 1716–24.
- RABINOVICH, GABRIEL A., E DIEGO O. CROCI. 2012. "Regulatory Circuits Mediated by Lectin-Glycan Interactions in Autoimmunity and Cancer". **Immunity** 36 (3): 322–35.
- RAMÍREZ-SÁNCHEZ, JENEY, ELISA NICOLOSO SIMÕES PIRES, YANIER NUÑEZ-FIGUEREDO, GILBERTO L. PARDO-ANDREU, LUIS ARTURO FONSECA-FONSECA, ALBERTO RUIZ-REYES, ESTAEL OCHOA-RODRÍGUEZ. 2015. "Neuroprotection by JM-20 against Oxygen-Glucose Deprivation in Rat Hippocampal Slices: Involvement of the Akt/GSK-3 $\beta$  Pathway". **Neurochemistry International** 90: 215–23.
- RETI, IRVING M., RADHIKA REDDY, PAUL F. WORLEY, E JAY M. BARABAN. 2002. "Prominent Narp Expression in Projection Pathways and Terminal Fields". **Journal of Neurochemistry** 82 (4): 935–44.
- REYNOLDS, ANNA R., JENNIFER N. BERRY, LYNDIA SHARRETT-FIELD, E MARK A. PRENDERGAST. 2015. "Ethanol Withdrawal Is Required to Produce Persisting N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Dependent Hippocampal Cytotoxicity during Chronic Intermittent Ethanol Exposure". **Alcohol** 49 (3): 219–27.
- RICCI, G., L. VOLPI, L. PASQUALI, L. PETROZZI, E G. SICILIANO. 2009. "Astrocyte-Neuron Interactions in Neurological Disorders". **Journal of Biological Physics** 35 (4): 317–36.
- RIEGER, DÉBORA K., ANA PAULA COSTA, JOSIANE BUDNI, MORGANA MORETTI, SABRINA GIOVANA ROCHA BARBOSA, KYRIA S. NASCIMENTO, EDSON H. TEIXEIRA, BENILDO S. CAVADA, ANA LÚCIA S. RODRIGUES, E RODRIGO B. LEAL. 2014. "Antidepressant-like Effect of Canavalia Brasiliensis (ConBr) Lectin in Mice: Evidence for the Involvement of the Glutamatergic

System”. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior** 122: 53–60.

RIEGER, DÉBORA K., RODRIGO M. S. CUNHA, MARK WILLIAM LOPES, ANA PAULA COSTA, JOSIANI BUDNI, ANA LÚCIA S. RODRIGUES, ROGER WALZ. 2014. “ConBr, a Lectin from *Canavalia Brasiliensis* Seeds, Modulates Signaling Pathways and Increases BDNF Expression Probably via a Glycosylated Target”. **Journal of Molecular Recognition** 27 (12): 746–54.

RIGON, ANA PAULA, FABIANO M. CORDOVA, CAMILA S. OLIVEIRA, THAÍS POSSER, ANA PAULA COSTA, ILZA G. SILVA, DAIANE A. SANTOS, FRANCESCO M. ROSSI, JOÃO BATISTA T. ROCHA, E RODRIGO B. LEAL. 2008. “Neurotoxicity of Cadmium on Immature Hippocampus and a Neuroprotective Role for p38 MAPK”. **Neurotoxicology** 29 (4): 727–34.

ROUACH, NATHALIE, ANNETTE KOULAKOFF, VERONICA ABUDARA, KLAUS WILLECKE, E CHRISTIAN GIAUME. 2008. “Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission”. **Science** 322 (5907): 1551–55.

ROY CHOUDHURY, GOURAV, MYOUNG-GWI RYOU, ETHAN POTEET, YI WEN, RUNLIAN HE, FEN SUN, FANG YUAN, KUNLIN JIN, E SHAO-HUA YANG. 2014. “Involvement of p38 MAPK in Reactive Astrogliosis Induced by Ischemic Stroke”. **Brain Research** 1551: 45–58.

RUSSI, MICHAEL A., SAMUEL VANDRESEN-FILHO, DÉBORA K. RIEGER, ANA PAULA COSTA, MARK W. LOPES, RODRIGO M. S. CUNHA, EDSON H. TEIXEIRA. 2012. “ConBr, a Lectin from *Canavalia Brasiliensis* Seeds, Protects against Quinolinic Acid-Induced Seizures in Mice”. **Neurochemical Research** 37 (2): 288–97.

SAKAGUCHI, MASANORI, MAITHE ARRUDA-CARVALHO, NA HYEY KANG, YOICHI IMAIZUMI, FRANÇOISE POIRIER, HIDEYUKI OKANO, E PAUL W. FRANKLAND. 2011. “Impaired Spatial and Contextual Memory Formation in Galectin-1 Deficient Mice”. **Molecular Brain** 4: 33.

SAKAGUCHI, MASANORI, YOICHI IMAIZUMI, TETSURO SHINGO, HIROBUMI TADA, KO HAYAMA, OSAMU YAMADA, TSUYOSHI MORISHITA. 2010. “Regulation of Adult Neural Progenitor Cells by Galectin-1/beta1 Integrin Interaction”. **Journal of Neurochemistry** 113 (6): 1516–24.

- SAKAGUCHI, MASANORI, TETSURO SHINGO, TAKUYA SHIMAZAKI, HIROTAKA JAMES OKANO, MIEKO SHIWA, SATORU ISHIBASHI, HIDEYUKI OGURO. 2006. "A Carbohydrate-Binding Protein, Galectin-1, Promotes Proliferation of Adult Neural Stem Cells". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103 (18): 7112–17.
- SANDERSON, THOMAS H., CHRISTIAN A. REYNOLDS, RITA KUMAR, KARIN PRZYKLENK, E MAIK HÜTTEMANN. 2013. "Molecular Mechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury in Brain: Pivotal Role of the Mitochondrial Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Generation". **Molecular Neurobiology** 47 (1): 9–23.
- SANZ-APARICIO, J., J. HERMOSO, T. B. GRANGEIRO, J. J. CALVETE, E B. S. CAVADA. 1997. "The Crystal Structure of Canavalia Brasiliensis Lectin Suggests a Correlation between Its Quaternary Conformation and Its Distinct Biological Properties from Concanavalin A". **FEBS Letters** 405 (1): 114–18.
- SASAKI, TASUKU, JUN HIRABAYASHI, HIROSHI MANYA, KEN-ICHI KASAI, E TAMAO ENDO. 2004. "Galectin-1 Induces Astrocyte Differentiation, Which Leads to Production of Brain-Derived Neurotrophic Factor". **Glycobiology** 14 (4): 357–63.
- SCHMIDT-KASTNER, RAINALD. 2015. "Genomic Approach to Selective Vulnerability of the Hippocampus in Brain Ischemia-Hypoxia". **Neuroscience** 309: 259–79.
- SCHWALBE, R. A., B. DAHLBÄCK, J. E. COE, E G. L. NELSESTUEN. 1992. "Pentraxin Family of Proteins Interact Specifically with Phosphorylcholine And/or Phosphorylethanolamine". **Biochemistry** 31 (20): 4907–15.
- SCHWARZ, DAVID A., GUY BARRY, KENNETH B. MACKAY, FRANK MANU, GREGORY S. NAEVE, ALICIA M. VANA, GAIL VERGE, PAUL J. CONLON, ALAN C. FOSTER, E RICHARD A. MAKI. 2002. "Identification of Differentially Expressed Genes Induced by Transient Ischemic Stroke". **Brain Research** 101 (1-2): 12–22.
- SEGOVIA, G., A. PORRAS, A. DEL ARCO, E F. MORA. 2001. "Glutamatergic Neurotransmission in Aging: A Critical Perspective". **Mechanisms of Ageing and Development** 122 (1): 1–29.
- SEIFERT, GERALD, KARL SCHILLING, E CHRISTIAN

- STEINHÄUSER. 2006. “Astrocyte Dysfunction in Neurological Disorders: A Molecular Perspective”. **Nature Reviews Neuroscience** 7 (3): 194–206.
- SHARON, NATHAN, E HALINA LIS. 2004. “History of Lectins: From Hemagglutinins to Biological Recognition Molecules”. **Glycobiology** 14 (11): 53R – 62R.
- SHARON, N., E H. LIS. 1989. “Lectins as Cell Recognition Molecules”. **Science** 246 (4927): 227–34.
- SHARON, N., E H. LIS. 1995. “Lectins--Proteins with a Sweet Tooth: Functions in Cell Recognition”. **Essays in Biochemistry** 30: 59–75.
- SHRUSTER, ADI, TALI BEN-ZUR, ELDAD MELAMED, E DANIEL OFFEN. 2012. “Wnt Signaling Enhances Neurogenesis and Improves Neurological Function after Focal Ischemic Injury”. **PloS One** 7 (7): e40843.
- SIMÕES PIRES, ELISA NICOLOSO, RUDIMAR LUIZ FROZZA, JULIANA BENDER HOPPE, BRUNA DE MELO MENEZES, E CHRISTIANNE GAZZANA SALBEGO. 2014. “Berberine Was Neuroprotective against an in Vitro Model of Brain Ischemia: Survival and Apoptosis Pathways Involved”. **Brain Research** 1557: 26–33.
- SKARDELLY, MARCO, KHALED GABER, JOHANNES SCHWARZ, E JAVORINA MILOSEVIC. 2011. “Neuroprotective Effects of the Beta-Catenin Stabilization in an Oxygen- and Glucose-Deprived Human Neural Progenitor Cell Culture System”. **International Journal of Developmental Neuroscience** 29 (5): 543–47.
- SOFRONIEW, MICHAEL V. 2009. “Molecular Dissection of Reactive Astrogliosis and Glial Scar Formation”. **Trends in Neurosciences** 32 (12): 638–47.
- SOFRONIEW, MICHAEL V. 2015. “Astrocyte Barriers to Neurotoxic Inflammation”. **Nature Reviews Neuroscience** 16 (5): 249–63.
- SOFRONIEW, MICHAEL V., E HARRY V. VINTERS. 2010. “Astrocytes: Biology and Pathology”. **Acta Neuropathologica** 119 (1): 7–35.
- SONG, GANG, GAOLIANG OUYANG, E SHIDENG BAO. 2005. “The Activation of Akt/PKB Signaling Pathway and Cell Survival”. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** 9 (1): 59–71.

- SOUZA, MARIA A., FERNANDA C. CARVALHO, LUCIANA P. RUAS, RAFAEL RICCI-AZEVEDO, E MARIA CRISTINA ROQUE-BARREIRA. 2013. "The Immunomodulatory Effect of Plant Lectins: A Review with Emphasis on ArtinM Properties". **Glycoconjugate Journal** 30 (7): 641–57.
- SPIEGEL, IVO, ALAN R. MARDINLY, HARRISON W. GABEL, JEREMY E. BAZINET, CAMERON H. COUCH, CHRISTOPHER P. TZENG, DAVID A. HARMIN, E MICHAEL E. GREENBERG. 2014. "Npas4 Regulates Excitatory-Inhibitory Balance within Neural Circuits through Cell-Type-Specific Gene Programs". **Cell** 157 (5): 1216–29.
- STAROSSOM, SARAH C., IVAN D. MASCANFRONI, JAIME IMITOLA, LI CAO, KHADIR RADDASSI, SILVIA F. HERNANDEZ, RIBAL BASSIL. 2012. "Galectin-1 Deactivates Classically Activated Microglia and Protects from Inflammation-Induced Neurodegeneration". **Immunity** 37 (2): 249–63.
- STIPURSKY, JOICE, LUCIANA ROMÃO, VANESSA TORTELLI, VIVALDO MOURA NETO, E FLÁVIA CARVALHO ALCANTARA GOMES. 2011. "Neuron-Glia Signaling: Implications for Astrocyte Differentiation and Synapse Formation". **Life Sciences** 89 (15-16): 524–31.
- STIPURSKY, JOICE, TÂNIA CRISTINA LEITE DE SAMPAIO E. SPOHR, VIVIAN OLIVEIRA SOUSA, E FLÁVIA CARVALHO ALCANTARA GOMES. 2012. "Neuron-Astroglial Interactions in Cell-Fate Commitment and Maturation in the Central Nervous System". **Neurochemical Research** 37 (11): 2402–18.
- STOBART, JILLIAN L., E CHRISTOPHER M. ANDERSON. 2013. "Multifunctional Role of Astrocytes as Gatekeepers of Neuronal Energy Supply". **Frontiers in Cellular Neuroscience** 7: 38.
- STOPPINI, L., P. A. BUCHS, E D. MULLER. 1991. "A Simple Method for Organotypic Cultures of Nervous Tissue". **Journal of Neuroscience Methods** 37 (2): 173–82.
- STRASSBURGER, MARIA, HOLGER BRAUN, E KLAUS G. REYMANN. 2008. "Anti-Inflammatory Treatment with the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor SB239063 Is Neuroprotective, Decreases the Number of Activated Microglia and Facilitates Neurogenesis in Oxygen-Glucose-Deprived Hippocampal Slice Cultures". **European Journal of Pharmacology** 592 (1-3): 55–

61.

SUMNER, J. B., E S. F. HOWELL. 1936. "Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A". **Journal of Bacteriology** 32 (2): 227–37.

SUNDSTROM, LARS, BARCLAY MORRISON, MARK BRADLEY, E ASHLEY PRINGLE. 2005. "Organotypic Cultures as Tools for Functional Screening in the CNS". **Drug Discovery Today** 10 (14): 993–1000.

TAKEDA, KOHSUKE, E HIDENORI ICHIJO. 2002. "Neuronal p38 MAPK Signalling: An Emerging Regulator of Cell Fate and Function in the Nervous System". **Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms** 7 (11): 1099–1111.

TANAKA, H., M. ARAKI, E T. MASUZAWA. 1992. "Reaction of Astrocytes in the Gerbil Hippocampus Following Transient Ischemia: Immunohistochemical Observations with Antibodies against Glial Fibrillary Acidic Protein, Glutamine Synthetase, and S-100 Protein". **Experimental Neurology** 116 (3): 264–74.

TANAKA, YOICHIRO, TOSHIHIRO TAKATA, TOYOKA SATOMI, TAKASHI SAKURAI, E KOICHI YOKONO. 2008. "The Double-Edged Effect of Insulin on the Neuronal Cell Death Associated with Hypoglycemia on the Hippocampal Slice Culture". **The Kobe Journal of Medical Sciences** 54 (2): E97–107.

TAOUFIK, ERA, E LESLEY PROBERT. 2008. "Ischemic Neuronal Damage". **Current Pharmaceutical Design** 14 (33): 3565–73.

THOMAS, GARETH M., E RICHARD L. HUGANIR. 2004. "MAPK Cascade Signalling and Synaptic Plasticity". **Nature Reviews Neuroscience** 5 (3): 173–83.

TONG, L., H. SHEN, V. M. PERREAU, R. BALAZS, E C. W. COTMAN. 2001. "Effects of Exercise on Gene-Expression Profile in the Rat Hippocampus". **Neurobiology of Disease** 8 (6): 1046–56.

TSUI, C. C., N. G. COPELAND, D. J. GILBERT, N. A. JENKINS, C. BARNES, E P. F. WORLEY. 1996. "Narp, a Novel Member of the Pentraxin Family, Promotes Neurite Outgrowth and Is Dynamically Regulated by Neuronal Activity". **The Journal of Neuroscience** 16 (8): 2463–78.

ULLRICH, CELINE, NINA DASCHIL, E CHRISTIAN HUMPEL.



2011. “Organotypic Vibrosections: Novel Whole Sagittal Brain Cultures”. **Journal of Neuroscience Methods** 201 (1): 131–41.
- ULLRICH, CELINE, E CHRISTIAN HUMPEL. 2011. “Mini-Ruby Is Rapidly Taken up by Neurons and Astrocytes in Organotypic Brain Slices”. **Neurochemical Research** 36 (10): 1817–23.
- VAN DER HEIDE, LARS P., GEERT M. J. RAMAKERS, E MARTEN P. SMIDT. 2006. “Insulin Signaling in the Central Nervous System: Learning to Survive”. **Progress in Neurobiology** 79 (4): 205–21.
- VASCONCELOS, ILKA MARIA, BENILDO SOUSA CAVADA, RENATO DE AZEVEDO MOREIRA, E JOSE TADEU ABREU DE OLIVEIRA. 1991. “Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *dioclea guianensis*”. **Journal of Food Biochemistry** 15 (2): 137–54.
- VICTOROV, I. V., A. A. LYJIN, E O. P. ALEKSANDROVA. 2001. “A Modified Roller Method for Organotypic Brain Cultures: Free-Floating Slices of Postnatal Rat Hippocampus”. **Brain Research** 7 (1): 30–37.
- WALZ, W. 1997. “Role of Astrocytes in the Spreading Depression Signal between Ischemic Core and Penumbra”. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 21 (2): 135–42.
- WANG, JIAYIN, JINCHAO XIA, FENG ZHANG, YEJIE SHI, YUN WU, HONGJIAN PU, ANTHONY K. F. LIOU. 2015. “Galectin-1-Secreting Neural Stem Cells Elicit Long-Term Neuroprotection against Ischemic Brain Injury”. **Scientific Reports** 5: 9621.
- WEI, ZHAOXIA, JIACHENG LIAO, FENG QI, ZHAO MENG, E SUYUE PAN. 2015. “Evidence for the Contribution of BDNF-TrkB Signal Strength in Neurogenesis: An Organotypic Study”. **Neuroscience Letters** 606: 48–52.
- WIBRAND, KARIN, ELHOUCINE MESSAOUDI, BJARTE HÅVIK, VIBEKE STEENSLID, ROGER LØVLIE, VIDAR M. STEEN, E CLIVE R. BRAMHAM. 2006. “Identification of Genes Co-Upregulated with Arc during BDNF-Induced Long-Term Potentiation in Adult Rat Dentate Gyrus in Vivo”. **The European Journal of Neuroscience** 23 (6): 1501–11.
- XIONG, T., J. TANG, J. ZHAO, H. CHEN, F. ZHAO, J. LI, Y. QU, D. FERRIERO, E D. MU. 2012. “Involvement of the Akt/GSK-3 $\beta$ /CRMP-

2 Pathway in Axonal Injury after Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Neonatal Rat”. **Neuroscience** 216: 123–32.

XU, BIN, MING SHAN, FEI WANG, YU DENG, WEI LIU, SHU FENG, TIAN-YAO YANG, E ZHAO-FA XU. 2013. “Endoplasmic Reticulum Stress Signaling Involvement in Manganese-Induced Nerve Cell Damage in Organotypic Brain Slice Cultures”. **Toxicology Letters** 222 (3): 239–46.

YAMAZAKI, TAKESHI, MEGUMI YAMAMOTO, YASUHIRO ISHIHARA, SHOTA KOMATSU, EIJI MUNETSUNA, MASAHIRO ONIZAKI, ATSUHIKO ISHIDA, SUGURU KAWATO, E TAKAO MUKUDA. 2013. “De Novo Synthesized Estradiol Protects against Methylmercury-Induced Neurotoxicity in Cultured Rat Hippocampal Slices”. **PloS One** 8 (2): e55559.

YANG, D. D., C. Y. KUAN, A. J. WHITMARSH, M. RINCÓN, T. S. ZHENG, R. J. DAVIS, P. RAKIC, E R. A. FLAVELL. 1997. “Absence of Excitotoxicity-Induced Apoptosis in the Hippocampus of Mice Lacking the Jnk3 Gene”. **Nature** 389 (6653): 865–70.

ZHANG, QI, BO HU, SHENGGANG SUN, E ETANG TONG. 2003. “Induction of Increased Intracellular Calcium in Astrocytes by Glutamate through Activating NMDA and AMPA Receptors”. **Journal of Huazhong University of Science and Technology**. 23 (3): 254–57.

ZOROWITZ, RICHARD D., ER CHEN, KUO BIANCHINI TONG, E MARIANNE LAOURI. 2009. “Costs and Rehabilitation Use of Stroke Survivors: A Retrospective Study of Medicare Beneficiaries”. **Topics in Stroke Rehabilitation** 16 (5): 309–20.

ZOU, JIAN, YAN-XIA WANG, FANG-FANG DOU, HE-ZUO LÜ, ZHENG-WEN MA, PEI-HUA LU, E XIAO-MING XU. 2010. “Glutamine Synthetase down-Regulation Reduces Astrocyte Protection against Glutamate Excitotoxicity to Neurons”. **Neurochemistry International** 56 (4): 577–84.