

**Geórgia de Sousa Ferreira Soares**

**Potencial Efeito Protetor Cerebral Da Lectina Da *Canavalia*  
*ensiformis*: Análises Eletrofisiológica E Imuno-histoquímica  
Em Ratos Sob Diferentes Condições De Lactação.**

**Recife**

**2014**

**Geórgia de Sousa Ferreira Soares**

**Potencial Efeito Protetor Cerebral Da Lectina Da *Canavalia*  
*ensiformis*: Análises Eletrofisiológica E Imuno-histoquímica  
Em Ratos Sob Diferentes Condições De Lactação.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

**Orientador: Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes**

**Recife**

**2014**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S676p      Soares, Geórgia de Sousa Ferreira.  
Potencial efeito protetor cerebral da lectina da *Canavalia ensiformis*: análises eletrofisiológica e imuno-histoquímica em ratos sob diferentes condições de lactação / Geórgia de Sousa Ferreira Soares. – Recife: O autor, 2014.  
123 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Rubem Carlos Araújo Guedes.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2014.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Lectina. 2. Concanavalina A. 3. Eletrofisiologia. 4. Microglia. I. Guedes, Rubem Carlos Araújo (Orientador). II. Título.

612.3      CDD (23.ed.)      UFPE (CCS2014-028)

**Geórgia de Sousa Ferreira Soares**

**Potencial efeito protetor da lectina da *Canavalia enformis*: análises eletrofisiológica e imunohistoquímica em ratos sob diferentes condições de lactação**

Tese aprovada em 21 de fevereiro de 2014

---

Profº Drº Vivaldo Moura Neto / Departamento de Anatomia / UFRJ

---

Profº Drº Raul Manhães de Castro / Departamento de Nutrição / UFPE

---

Profª Drª Angela Amâncio dos Santos / Departamento de Fisiologia e Farmacologia / UFPE

---

Profª Drª Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa / Departamento de Fisiologia e Farmacologia / UFPE

---

Profª Drª Ana Paula Rocha de Melo / Departamento de Nutrição / UFPE

**Recife**

**2014**

*Dedico este trabalho aos meus pais, Lgia e Leonardo, e  
ao meu orientador, professor Rubem Guedes*

## AGRADECIMENTOS

À Deus e Nossa Senhora Aparecida, por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Agradeço imensamente aos órgãos de fomento pelas bolsas concedidas: Capes e CNPq, sem eles seria difícil (talvez impossível) a minha total dedicação a este trabalho.

Aos meus, pais e irmãos, por tudo que representam em minha vida.

Ao Prof. Rubem Guedes, não apenas pela grande contribuição acadêmica conduzida sempre de maneira muito responsável, por sua paciência, humildade e também pela colaboração científica que estreitou consideravelmente a distância entre a idéia e o trabalho realizado. Professor, obrigada por todos os ensinamentos de vida.

À professora Maria José de Carvalho Costa, que me orientou durante os meus primeiros passos na iniciação científica, a que me introduziu na carreira científica, pelos conhecimentos repassados e por estar sempre disponível a ajudar-me.

À Prof<sup>a</sup> Ana Paula Rocha de Melo, pela atenção recebida quando a procurei para fazer o doutorado.

À estagiária Liliane Cabral Cavalcanti pela grande colaboração, cumplicidade e lealdade durante a realização deste trabalho, agindo sempre de maneira responsável.

A professora Mônica Osório e ao Professor Raul Manhães pelo excelente desempenho junto à coordenação do Programa de Pós-graduação em Nutrição da UFPE. Meus sinceros agradecimentos, a Neci e a Cecília.

Ao professor Bernardo Castellano, pela orientação durante o doutorado sanduíche, e a todos os amigos que compõem a Unidade de Histologia Médica, da Universidade Autônoma de Barcelona.

À amiga e sempre companheira Cássia Borges e sua filha Talita, por todos os momentos, desde os cafés que tomamos até as discussões dos artigos, além dos seus bons conselhos e lealdade durante estes quatro anos.

À Professora Ângela Amâncio, pela disponibilidade em ensinar algumas das técnicas utilizadas neste trabalho.

Aos amigos da Pós-graduação, Daline, Jossana, Andrei, Leonardo, Isabelle.

Aos amigos do LAFINNT, Rose, Andrea, Regina, Nora, Elian, Ricardo, Mariana e Thays pelos momentos de descontração e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao veterinário Edeones França, pela colaboração no fornecimento e no manuseio dos animais.

Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência.

Aos professores e aos funcionários do Departamento de Nutrição, pela Presteza.

Agradeço ao amigo Jefferson Maul, pelas críticas pertinentes.

Agradeço aos amigos professores Charlie Salvador e Leucio Duarte pelas colaborações científicas e agradável convivência.

Ao meu Esposo e Amigo, Anderson Reis Albuquerque, por sua paciência, companheirismo, dedicação, compreensão e apoio incondicional antes, durante e depois na elaboração desta tese.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

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

**José de Alencar**



## RESUMO

A lectina Concanavalina A (ConA), obtida das sementes de *Canavalia ensiformis*, é uma proteína que se liga especificamente à manose e glicose (e estruturas mais complexas, como receptores celulares, que contenham resíduos expostos desses carboidratos). Essa lectina possui várias atividades biológicas, incluindo a modulação de propriedades imunológicas e eletrofisiológicas do cérebro. No presente estudo, foi caracterizada a ação da ConA sobre o fenômeno dependente da excitabilidade cerebral conhecido como Depressão Alastrante Cortical (DAC); estudou-se também a imunomarcagem da microglia com um anticorpo policlonal contra a proteína Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*). Ratos Wistar machos (n = 89) foram amamentados em condições favoráveis ou desfavoráveis de lactação, representadas respectivamente por ninhadas com 6-7 filhotes (grupo N6) ou 12-14 filhotes (grupos N12). Do 5º ao 24º dia pós-natal, foram tratados por via intraperitoneal com 1 mg/kg ou 10 mg/kg de ConA (grupos L1 e L10, respectivamente), ou com solução salina NaCl 0,9% (grupo Sal), ou sem nenhum tratamento (grupo Ingênuo). Aos 90-120 dias de idade, a DAC foi quimicamente induzida no córtex frontal e registrada em dois pontos da região parietal durante 4 h, e seus parâmetros de velocidade de propagação, amplitude e duração das ondas foram mensurados. Após o registro da DAC, os cérebros foram perfundidos e fixados, seguidos de seções cerebrais para reação com anticorpos anti-Iba1 para quantificação da imunomarcagem da microglia. Os grupos N12 apresentaram maior velocidade de propagação da DAC que os grupos N6. Em ambas as condições de lactação, o tratamento sistêmico com a ConA resultou em diminuição significativa, dose-dependente, da velocidade de propagação da DAC ( $p < 0,05$ ), em comparação aos grupos controle (Salina e Ingênuo). A amplitude e duração do componente negativo da variação lenta de voltagem da DAC permaneceram inalterados. Em um grupo adicional de ratos adultos, a aplicação tópica de ConA à superfície cortical também reduziu reversivelmente a velocidade de propagação da DAC. A imunorreatividade da microglia, avaliada no córtex e hipocampo, foi menor nos grupos tratados com ConA, em comparação com os respectivos controles. O hemisfério cerebral no qual a DAC foi repetidamente induzida apresentou maior imunorreatividade em comparação com o hemisfério oposto, principalmente no córtex. Podemos concluir que a atenuação na propagação da DAC e a diminuição da imunorreatividade na microglia em ratos adultos em decorrência da aplicação da lectina ConA (1 mg/kg e 10 mg/kg) durante o período de lactação (fase de grande plasticidade e neurogênese), indicam que essa lectina pode influenciar o desenvolvimento cerebral com ação protetora duradoura no cérebro de ratos. Essa ação não foi dificultada pela condição desfavorável de lactação. Desse modo, a lectina ConA apresentou-se como uma proteína com potencial ação protetora no cérebro, a julgar pelos efeitos sobre a DAC e sobre a reação microglial.

**Palavras-chave:** Lectina. ConA. Eletrofisiologia cerebral. Estado nutricional. Microglia. Depressão alastrante cortical. Imunomarcagem Iba1.

## ABSTRACT

The lectin concanavalin A (ConA) is a carbohydrate-binding protein extracted from a leguminous, *Canavalia ensiformis*, with several biological activities, including the modulation of immunological and electrophysiological properties of the brain. Here we characterized, in the rat, the action of ConA on the brain excitability-dependent phenomenon known as cortical spreading depression (CSD), and on microglia immunolabeled with a polyclonal antibody against ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba1). Male Wistar newborn rats (n = 89) were suckled under favorable or unfavorable conditions, represented by litters with 6-7 pups or 12-14 pups (groups N6 and N12, respectively). From postnatal day 5 to 24, they were treated intraperitoneally with 1 mg/kg or 10 mg/kg ConA (groups L1 and L10, respectively), or with saline solution (group Sal), or no treatment (group Naïve). At 90-120 days of age, CSD was recorded at two parietal points for 4 h, and CSD parameters (velocity of propagation and amplitude and duration of the DC slow potential change) were measured. Fixative perfused brain sections were reacted with anti-Iba1 antibodies to quantify immunolabeled microglia. The velocity of propagation, amplitude, and duration of the negative slow potential change of the CSD wave were calculated. Compared with the control groups, systemic ConA treatment dose-dependently decreased the CSD propagation velocity ( $p < 0.05$ ), with no effect on the amplitude and duration of the CSD negative slow potential shift. In an additional group, topical application of ConA to the cortical surface also reversibly reduced CSD propagation ( $p < 0.05$ ). Microglia IBA-1 immunoreactivity was lower in both nutritional groups treated with ConA, in comparison with the control groups. The CSD-hemisphere presented with higher immunoreactivity compared with the CSD-free hemisphere. Attenuation in CSD propagation and microglia reaction was associated in adulthood with ConA treatment during brain development, indicating that the lectin can affect the electrophysiological and microglial development, and suggesting long-lasting protective action of the lectin on the rat brain, which is not influenced by the unfavorable suckling condition.

**Keywords:** Lectin. ConA. Brain electrophysiology. Nutritional status. Microglia. Spreading Depression. Iba1 immunolabeling.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1:** (a) Folhas e vagem com sementes da *Canavalia ensiformis*, das quais são extraídas a lectina ConA. A estrutura do monômero da ConA (b), PDB 3CNA (HARDMAN e AINSWORTH, 1972), e dos carboidratos manose (c) e glicose (d).....20

**Figura 2:** Equilíbrio químico entre as formas tetraméricas e diméricas da ConA em função do pH. Em pH > 5.5, o tetrâmero é a estrutura quaternária mais abundante, enquanto que, em pH mais ácido (< 5.5), a estrutura dimérica são predominantes. Ambas as formas apresentam a mesma afinidade por manose e glicose.....20

**Figura 3:** Ciclo de eventos reversíveis que ocorrem durante a depressão alastrante cortical. Seqüência de passos (A-F) que caracterizam da DAC no córtex cerebral de rato (apenas um dos hemisférios cerebrais é mostrado). Em A, o tecido cortical é estimulado no ponto marcado por um \* e um episódio de DAC é originado nesse ponto. O círculo cinza marcado em B mostra a área inicialmente deprimida, com conseqüente propagação concêntrica para outras áreas do córtex (passos C e D). O círculo na cor bege, mostrado em E, indica a área inicialmente recuperada após a DAC. A recuperação é um processo gradual que se estende para áreas remotas (passo F) e finalmente o tecido cortical retorna à condição inicial pré-DAC, como em A. A área em cinza-escuro representa a refratariedade cortical após a DAC, e antes da total recuperação. À direita é mostrado o eletrocorticograma com a variação lenta de potencial da DAC. Os pontos temporais correspondentes às condições dos passos A-F são marcados no eletrocorticograma com as respectivas letras.....23

**Figura 4:** Esquema do delineamento experimental completo. Após o nascimento os ratos foram amamentados em condições favoráveis ou desfavoráveis de lactação, representadas respectivamente por ninhadas com 6-7, ou 12-14 filhotes (grupos N-6 e N-12). Do 5º ao 24º dia após o nascimento, os ratos receberam injeções diárias de lectina ConA diluída em solução salina nas doses de 1 mg/kg (grupo L1) ou 10 mg/kg (grupo L10). Dois grupos controles foram utilizados: um tratado apenas com o veículo (solução salina 0,9%; grupo Sal), e outro, grupo ingênuo (I), sem qualquer tratamento. Do desmame (25º dia) até a data do registro da DAC (90-120 dias), ambos os grupos N6 e N12 receberam a mesma dieta, contendo 23% de proteína. Após o registro da DAC, os cérebros foram perfundidos, cortados e marcados imuno-histoquimicamente. Todos os detalhes experimentais são apresentados nas seções seguintes.....28

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                     |                                                      |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------|
| AMPA.....                           | alfa-amino-3-hidróxi-metilsoxazolepropionato         |
| ANOVA.....                          | Análise de variância                                 |
| BB( <i>buffer block</i> ).....      | Tampão de bloqueio                                   |
| CA1.....                            | região hipocampal denominada “cornus Amoni” 1        |
| ConA.....                           | Lectina Concanavalina A                              |
| ConBr.....                          | Lectina da <i>Canavalia brasiliensis</i>             |
| DAB.....                            | 3,3'-diaminobenzidina                                |
| DAC.....                            | Depressão alastrante cortical                        |
| ECoG.....                           | Eletrocorticograma                                   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ..... | Peróxido de hidrogênio                               |
| I.....                              | Ingênuo                                              |
| i.p.....                            | Intraperitoneal                                      |
| IL (4,6,10,12).....                 | Interleucinas                                        |
| INF- $\gamma$ .....                 | Interferon gama                                      |
| KCl.....                            | Cloreto de potássio                                  |
| L1.....                             | Tratamento com lectina 1 mg/kg                       |
| L10.....                            | Tratamento com lectina 10 mg/kg                      |
| LAFINNT.....                        | Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio |
| NaCl.....                           | Cloreto de Sódio                                     |
| Nv.....                             | Naïve                                                |
| Sal.....                            | Solução salina                                       |
| SNC.....                            | Sistema Nervoso Central                              |
| TBS.....                            | Solução salina tamponada com Tris                    |
| TNF- $\alpha$ .....                 | Fator de necrose tumoral                             |
| Tris.....                           | tris(hidroximetil)aminometano                        |
| VLV.....                            | Variação lenta de voltagem                           |
| UFPE.....                           | Universidade Federal de Pernambuco                   |

# SUMÁRIO

|                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>1. APRESENTAÇÃO.....</b>                                                         | <b>12</b>  |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>                                               | <b>15</b>  |
| 2.1. <i>Nutrição e Sistema Nervoso.....</i>                                         | <i>15</i>  |
| 2.2. <i>Lectinas.....</i>                                                           | <i>17</i>  |
| 2.2.1 <i>Lectina de Sementes da <i>Canavalia ensiformis</i>: ConA.....</i>          | <i>19</i>  |
| 2.3. <i>Depressão Alastrante Cortical .....</i>                                     | <i>22</i>  |
| <b>3. MÉTODOS.....</b>                                                              | <b>27</b>  |
| 3.1. <i>Lectina .....</i>                                                           | <i>27</i>  |
| 3.2. <i>Animais e Delineamento Experimental.....</i>                                | <i>27</i>  |
| 3.3. <i>Aplicação Sistêmica de Lectina ConA.....</i>                                | <i>28</i>  |
| 3.4. <i>Registro da Depressão Alastrante Cortical.....</i>                          | <i>29</i>  |
| 3.5. <i>Aplicação Tópica Cortical da Lectina ConA.....</i>                          | <i>30</i>  |
| 3.6. <i>Determinações Ponderais: Medidas dos Pesos Corporais e Encefálicos.....</i> | <i>30</i>  |
| 3.7. <i>Estudo Imuno-histoquímico do Córtex e Hipocampo.....</i>                    | <i>31</i>  |
| 3.8. <i>Análise Estatística.....</i>                                                | <i>32</i>  |
| <b>4. RESULTADOS .....</b>                                                          | <b>33</b>  |
| <b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                 | <b>34</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                            | <b>36</b>  |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                                 | <b>112</b> |
| <i>Anexo A -Submissão do Artigo I.....</i>                                          | <i>113</i> |
| <i>Anexo B -Submissão do Artigo II.....</i>                                         | <i>114</i> |
| <i>Anexo C -Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE .....</i>        | <i>115</i> |
| <i>Anexo D -Produção Científica Durante o Doutorado.....</i>                        | <i>116</i> |

## 1. APRESENTAÇÃO

A triagem de extratos de plantas, bem como de compostos do metabolismo secundário, para evidenciar a presença de novas substâncias com atividades biológicas é uma fonte potencial de medicamentos mais eficientes (NASCIMENTO et al., 2000). Dentre essas substâncias, podemos destacar as lectinas, que são proteínas de origem não imune contendo pelo menos um domínio não catalítico que se liga de forma específica e reversível a carboidratos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Há décadas as lectinas são usadas como modelo para o estudo de interações proteína-carboidrato devido à surpreendente afinidade por uma variedade de carboidratos, além da sua fácil obtenção e purificação (GABIUS et al., 2002). Embora tenham sido descobertas há mais de um século, apenas nas últimas décadas essas moléculas passaram a ser consideradas como insumos básicos de grande importância em biotecnologia, principalmente as lectinas de origem vegetal (SHARON; LIS, 2003).

Embora os efeitos tóxicos das lectinas de leguminosas possam geralmente ser eliminados por tratamento térmico apropriado, as leguminosas de maneira geral podem conter fatores antinutricionais e outras substâncias nocivas à saúde, de modo que as leguminosas não convencionais com grande potencialidade de uso na alimentação devem ser testadas primeiramente em animais antes da sua utilização em humanos (PROLL et al., 1998).

A Concanavalina (ConA), obtida das sementes de *Canavalia ensiformis* (Família Fabacea), popularmente conhecida no Brasil como “feijão-de-porco”, foi a primeira lectina a ser isolada e ter sua sequência de aminoácidos e estrutura tridimensional determinadas por cristalografia de raios-X. A ConA é uma lectina D-glicose/D-manose específica, e seu monômero contém 237 resíduos de aminoácidos. Muitos estudos fizeram desta proteína a lectina de planta melhor caracterizada do ponto de vista bioquímico, biofísico e estrutural (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; BOEHM; HUCK, 1998; CAVADA et al., 2001; SHARON; LIS, 2003; FAY; BOWIE, 2006; GEMEINER et al., 2009). Tem-se estudado muitos dos seus efeitos sobre diferentes sistemas biológicos, dentre os quais o sistema nervoso central (SNC) (HELMHOLZ et al., 2003). Nesse contexto, a lectina ConA têm sido utilizada como ferramenta no isolamento de glicoproteínas (HELMHOLZ et al., 2003), no estudo de receptores

glutamatérgicos, especialmente AMPA e Kainato (PARTIN et al., 1993; YUE et al., 1995; EVERTS; VILLMAN; HOLLMANN, 1997; HOFFMAN et al., 1998), na determinação do papel de neurexinas e outros receptores na liberação de transmissores (BOEHM; HUCK, 1998) e no estudo da plasticidade no SNC (LIN; LEVITAN, 1991; SCHERER; UDIN, 1994).

Considerando a capacidade dos carboidratos em influenciar diversos fenômenos fisiológicos e patológicos nas células (BLOEM et al., 2013; BORN et al., 2013), é possível entender que proteínas que se ligam a resíduos de carboidratos de forma específica e seletiva, podem se tornar importantes para o desenvolvimento e modulação de eventos como comunicação, diferenciação e proliferação celular. Os efeitos farmacológicos da ConA têm sido demonstrados sob vários aspectos ao longo das últimas décadas (MAYER ; VYKLICKY, 1989; HUETTNER, 1990; WONG; MAYER, 1993; YUE et al. 1995; EVERTS et al. 1997, 1999; PATERNAIN et al. 1998; GORITYALA et. al, 2012; ZHANG et. al, 2014).

Dadas suas interações com receptores na superfície de membranas celulares, é razoável supor que as lectinas podem também modular a comunicação celular na neuroglia. Sabe-se que lectinas endógenas como a Galectina-1, de ligação específica à  $\beta$ -galactosídeos, é constitutiva do sistema nervoso central (SNC) e exibe funções neuroprotetoras (FAY; BOWIE, 2006; YUE et. al, 1995; JACQUES et. al, 2013). Lectinas exógenas, como a ConA, também são capazes de modular receptores glutamatérgicos em neurônios pré-sinápticos (READ; PARSONS, 2000; LEHMENKUHLE; GROTEMEYER; TEGTMEIER, 1993).

Tendo em vista as diversas ações biológicas de lectinas vegetais sobre células de mamíferos, torna-se importante a caracterização dos efeitos biológicos de lectinas de origem vegetal, amplamente cultivadas no Brasil, sobre o desenvolvimento e funções do sistema nervoso central (SNC). Nesse contexto, nenhum resultado na literatura foi encontrado quanto aos efeitos de qualquer lectina sobre padrões eletrofisiológicos descritos pelo fenômeno da “depressão alastrante da atividade elétrica cortical”, ou simplesmente “Depressão Alastrante Cortical” (DAC), fenômeno descoberto pelo cientista brasileiro Aristides Leão, em 1944, e estudado no nosso grupo de pesquisa.

Considera-se a hipótese de que a lectina ConA aplicada durante o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso, altera o fenômeno da DAC e atividade microglial e de que tais efeitos poderiam ser modificados pelo estado nutricional. Para testar esta hipótese, utilizamos o fenômeno da Depressão Alastrante Cortical (DAC), relacionado à excitabilidade cerebral.

Assim, esse trabalho tem como um dos objetivos descrever pela primeira vez possíveis ações eletrofisiológicas da lectina Concanavalina A (ConA), utilizando para isto o modelo da DAC; um outro objetivo refere-se ao estudo da reação microglial por meio da marcação imuno-histoquímica com anticorpos contra a proteína Iba1. Por fim, investigou-se em animais submetidos a diferentes condições de aleitamento se as ações da ConA são modificadas por condições desfavoráveis de lactação.

É de importância consolidar os conhecimentos *in vivo* e *in vitro* sobre efeitos da lectina ConA no sistema nervoso central e da DAC durante o período de desenvolvimento do cérebro, bem como avaliar se tais efeitos são modulados por condições desfavoráveis de lactação e ao mesmo tempo contribuir para a formação de recursos humanos nessa área do conhecimento.

Toda a manipulação experimental *in vivo* referente à aplicação sistêmica e tópica da lectina ConA, bem como os registros da DAC, foram realizadas no Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob orientação do professor Dr. Rubem Guedes, enquanto que as análises imuno-histoquímicas foram realizadas na Unidade de Histologia Médica do Instituto de Neurociências da Universidade Autônoma de Barcelona (UAB), sob supervisão do professor Dr. Bernardo Castellano, na vigência de uma bolsa “doutorado-sanduíche no Exterior” concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PDSE). Os resultados pioneiros deste trabalho estão contidos em dois artigos originais, intitulados: *Potential brain protective effect of the lectin from Canavalia ensiformis: an electrophysiological and microglia labeling analysis in the rat* (**Apêndice A**) e *Characterization of brain effects of the lectin from Canavalia ensiformis in adult rats suckled in small and large litters: a spreading depression- and microglia immunolabeling study* (**Apêndice B**).



## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Nutrição e Sistema Nervoso**

A nutrição pode ser definida como o processo biológico em que os organismos assimilam nutrientes para que consigam realizar as suas funções vitais. Nesse contexto, para a obtenção de um bom estado nutricional é necessária uma alimentação equilibrada e que atenda a todos os requerimentos do organismo (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2005).

Um estado nutricional adequado é de fundamental importância para o desenvolvimento e a organização do sistema nervoso, considerando que a produção de energia e de nutrientes é necessária para o desenvolvimento de suas estruturas celulares e processos metabólicos (MORGANE et al., 1993).

Os desequilíbrios nutricionais são freqüentemente produzidos pela deficiência de macro-nutrientes (proteínas, carboidratos e lipídeos) e micronutrientes (vitaminas, metais e co-fatores). Estas deficiências são seguidas de alterações fisiopatológicas que se refletem em prejuízo funcional e danos bioquímicos e físicos. Na infância, a ingestão inadequada de nutrientes pode levar a consequências desastrosas para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do organismo. Quando ocorrem no início da vida, os efeitos das condições desfavoráveis de lactação podem persistir a longo-prazo e/ou tornarem-se permanentes, a depender do período, da duração, da intensidade e do tipo de desnutrição (DOBBING, 1968; MORGANE et al., 1993; GUEDES et al., 1996). Além disso, em animais de laboratório submetidos a condições desfavoráveis de lactação tem-se descrito mudanças epigenéticas e alterações na expressão de receptores para glicocorticóides, alterando a resposta ao estresse nos filhotes (MEANEY; SZYF, 2005).

Em humanos, o período de rápido desenvolvimento do sistema nervoso ocorre do último trimestre de gestação até aproximadamente o segundo ano de vida. No rato, animal experimental utilizado neste estudo, esse período ocorre durante as três primeiras semanas após o nascimento e corresponde ao período do aleitamento (MORGANE et al., 1993). É neste período que ocorre o pico de atividade de eventos específicos da neurogênese, gliogênese, migração celular e diferenciação celular, consequência dos processos neuroquímicos e neuroanatômicos típicos do seu desenvolvimento

(DOBBING, 1968). De acordo com Morgan (1990), as etapas de crescimento e desenvolvimento cerebral são dependentes do tempo e ocorrem em fases cronologicamente específicas; estas, uma vez passadas, não podem ser mais recuperadas. Assim, tentativas de reabilitação nutricional após o período crítico de desenvolvimento cerebral terão menos efeito do que quando feitas no período crítico.

Adicionalmente, resultados experimentais têm demonstrado que o córtex cerebral é muito sensível a mudanças nutricionais e de plasticidade (LEUBA; RABINOWICZ 1979; BORBA; ARAÚJO; PICANÇO-DINIZ, 2000; SANTOS-MONTEIRO; TEODÓSIO, GUEDES, 2000). Esse fato tem sido confirmado no modelo da Depressão Alastrante Cortical (DAC) com ratos submetidos a condições desfavoráveis lactação (ROCHA-DE-MELO et al, 2006).

Vários modelos experimentais para induzir condições desfavoráveis de lactação em animais de laboratório vêm sendo utilizados há décadas no LAFINNT. As três formas mais comuns de induzir a condições desfavoráveis de lactação em ratos consistem: 1) na redução da quantidade e/ou qualidade de nutrientes na dieta da mãe lactante; 2) na separação dos filhotes de suas mães lactantes por períodos diários determinados, ou 3) no aumento do tamanho da ninhada. Esta última técnica foi o modelo adotado neste estudo, e consiste no aumento do número de filhotes que serão amamentados por uma única mãe. Esse modelo foi reportado por De Lucca et al. (1977), e seu impacto sobre a propagação da DAC foi descrito primeiramente de forma sistemática por Rocha-de-Melo et al. (2006). Segundo Morgane et al (1978), nessas condições a qualidade do leite é mantida, mas ocorre redução da quantidade recebida por cada filhote, resultando em deficiência nutricional. Esse modelo experimental foi também adotado por Yoshioka et al.(1995). Esses autores também determinaram, em ratos, que o período que compreende as três primeiras semanas de vida após o nascimento, é o período mais crítico em que o cérebro está mais vulnerável a alterações nutricionais. Eles verificaram ainda uma irreversibilidade de alguns danos cerebrais em ratos submetidos a condições desfavoráveis de lactação em diferentes períodos de desenvolvimento cerebral, mesmo sendo posteriormente seguido de uma reabilitação nutricional.

Os efeitos tardios de condições desfavoráveis de lactação podem causar diferenças significativas nos indivíduos na fase adulta, de modo que os animais com livre acesso ao leite materno podem atingir um maior tempo de vida e uma maior

capacidade de se reproduzir. Desta forma, os indivíduos que enfrentam maior competição por leite materno sofrem desvantagens evolutivas. (RODEL et al., 2008).

Outros fatores como a administração de fármacos, podem interagir de forma sinérgica, aditiva ou antagônica ao estado nutricional e modular de forma diferenciada a excitabilidade cerebral. Partindo-se deste princípio, investigamos os efeitos eletrofisiológicos cerebrais da lectina ConA, utilizando como modelo a DAC. Como já mencionado, essa molécula é de origem vegetal, encontrada em uma leguminosa comestível de regiões tropicais. Nenhuma informação está disponível na literatura acerca de efeitos de qualquer lectina sobre a DAC durante o período de desenvolvimento do cérebro. Assim decidimos investigar também a possível interação entre a ConA e condições desfavoráveis de lactação, representada pela amamentação em grandes ninhadas. Nas próximas seções, apresentamos uma revisão da literatura sobre a lectina ConA com base na sua estrutura, propriedades bioquímicas e fisiológicas.

## 2.2. Lectinas

Lectinas (do latim *legere*, que significa “selecionar”) são proteínas de origem não imune que possuem elevada afinidade e especificidade por carboidratos, capazes de mediar importantes processos fisiológicos (VAN DAMME, 1998). Historicamente, as lectinas foram identificadas em plantas no início do século XX. Foram inicialmente caracterizadas por sua capacidade de promover a aglutinação de eritrócitos, sendo por muito tempo chamadas de fito-hemaglutininas (SHARON e LIS, 1989). Entretanto, sabe-se que as lectinas constituem um grande grupo de proteínas estruturalmente heterogêneas, encontradas em vírus, bactérias, fungos, plantas e animais (LIS; SHARON, 1998; VAN DAMME, 1998). Como principal característica, essa classe de proteínas liga-se, quimicamente, com elevada especificidade e de forma não-covalente e reversível a carboidratos livres, conjugados, ou mesmo na forma de estruturas complexas de açúcares, nas membranas celulares (VAN DAMME, 1998).

Existe uma crescente lista de lectinas estruturalmente bem caracterizadas capazes de reconhecer estruturas específicas de glicanas endógenas e por isso mediar funções de sinalização celular. As lectinas tipicamente contêm um ou mais sítios de reconhecimento de carboidrato por monômero. Além disso, podem possuir estruturas quaternárias complexas, formando dímeros, trímeros ou tetrâmeros, capazes de ligar-se simultaneamente a estruturas complexas de glicanas. De acordo com sua especificidade

por uma determinada classe de açúcares, as lectinas podem ser classificadas como sendo do tipo: (i) Manose lectinas (e.g. ConA, da *Canavalia ensiformis*); (ii) Galactose / N-acetilgalactosamina lectinas (e.g. AIL-Jacalina, da *Artocarpus integrifolia*); (iii) N-acetilglicosamina lectinas (e.g. WGA, da *Triticum vulgaris*); (iv) Ácido N-acetilneuramínico lectinas (e.g. SNA, da *Sambucus nigra*); e (v) Fucose lectinas (e.g. AAL, da *Aleuria aurantia*) (LIS e SHARON, 1998).

Com toda sua versatilidade estrutural, os polissacarídeos podem exercer uma ampla variedade de funções nas comunicações celulares (LIS; SHARON, 1993; VARKI, 1993; VARKI e MARTH, 1995; GAHMBERG; TOLVANEN, 1996). Essa versatilidade é enriquecida pela combinação entre polissacarídeos com proteínas e lipídeos, podendo influenciar desde o sistema imunológico (processos de comunicação e adesão celular) à capacidade operativa de agentes infecciosos (FUJIMOTO; GREEN, 2012; XUE et al, 2012).

Muitos patógenos, dentre os quais vírus, bactérias, fungos, helmintos e protozoários iniciam, ou mantêm, sua interações com células de vertebrados por meio de lectinas do tipo hemaglutininas ou adesinas, que reconhecem estruturas glicanas com elevada especificidade (KARLSSON, 1995; SHARON, 1996).

Devido a suas propriedades físico-químicas destacadas, as lectinas são usadas como ferramentas biotecnológicas no estudo do reconhecimento de superfícies celulares (GEMEINER et. al, 2009), consistindo em um sensível sistema de detecção para mudanças nos padrões de glicosilação e expressão de carboidratos que podem ocorrer durante a embriogêneses, crescimento celular e algumas doenças (CAMPOS et al., 2006). Por exemplo, as lectinas vêm sendo utilizadas com sucesso como marcadores histológicos (CAMPOS et al., 2006), na modelagem racional de carreadores de fármacos (GORITYALA et. al, 2012), como biossensores para detecção de glicoproteínas circulantes - com limite de detecção da ordem de  $10^{-18}$  mol.L<sup>-1</sup> (BERTOK, 2013), em sistemas cromatográficos de purificação, enriquecimento e identificação de glicoproteínas (KWANYOUNG, 2013), na identificação de células tumorais (ZHANG et. al, 2014).

Em animais, as lectinas participam de inúmeras funções relacionadas ao reconhecimento celular, tais como: fertilização, regulação do tecido conectivo, apoptose, respostas inflamatórias em infecções locais, e na determinação e diferenciação tecidual na fase embrionária (GABIUS, 1997; SHARON; LIS, 2001, 2004). Como

exemplo de lectinas de animais, as galectinas (ligam-se especificamente à  $\beta$ -galactosídeos) têm sido identificadas em vários órgãos e sistemas em humanos, e suas principais ações estão relacionadas com: adesão celular, apoptose, supressão da ativação de receptores de células T e transcrição do mRNA (LIU; PATTERSON; WANG, 2002).

Em plantas, as lectinas podem estar presentes em todos os tecidos e participam do controle da germinação, transporte e armazenamento de açúcares, alongamento da parede celular, proteção contra insetos e microorganismos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). A maioria das lectinas têm sido purificadas e caracterizadas a partir de sementes de leguminosas, representando cerca de 10% do conteúdo de proteína total, embora várias lectinas também sejam isoladas de raízes e entrecasca, frutos (PEUMANS et al., 2000), bulbos (MO et al., 1994), rizomas (PEUMANS et al., 2000), folhas (RATANAPO, NGAMJUNYAPORN; CHULAVATNATOL, 2001) e tubérculos (ALLEN et al., 1996; ASHFORD; ALLEN; NEUBERGER, 1982). As lectinas de plantas têm recebido especial atenção devido ao fato de que, em geral, possuem elevada atividade biológica quando comparado com lectinas de origem animal.

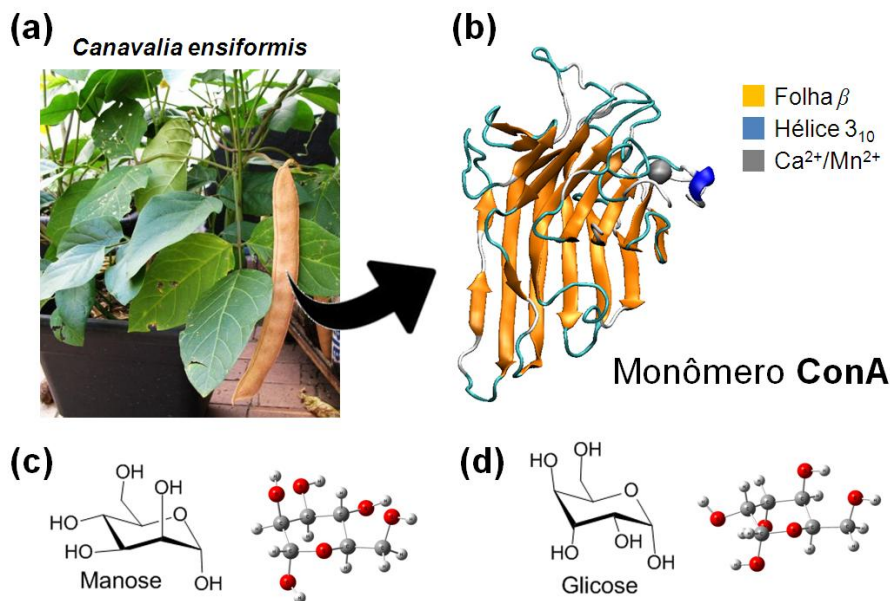
Dentre as lectinas de origem vegetal, a lectina Concanavalina A (ConA) foi a primeira lectina de leguminosas a ter sua estrutura estudada (no início do século XX), e ainda hoje desperta atenção na comunidade científica devido à sua atividade anti-proliferativa e antitumoral em vários tipos de células cancerígenas, além de outras atividades biológicas.

### **2.2.1 Lectina de Sementes da *Canavalia ensiformis*: ConA**

Em muitos estudos científicos envolvendo lectinas, aquela conhecida como Concanavalina A (ConA), obtida de sementes de *Canavalia ensiformis*, tem sido escolhida como modelo. Por ter sido a primeira lectina isolada (em 1916) e ter sua estrutura tridimensional e seqüenciamento de carboidratos bem caracterizada (HARDMAN, 1972; HARDMAN, 1982), ela está disponível comercialmente com elevado grau de pureza, na sua forma livre de carboidratos.

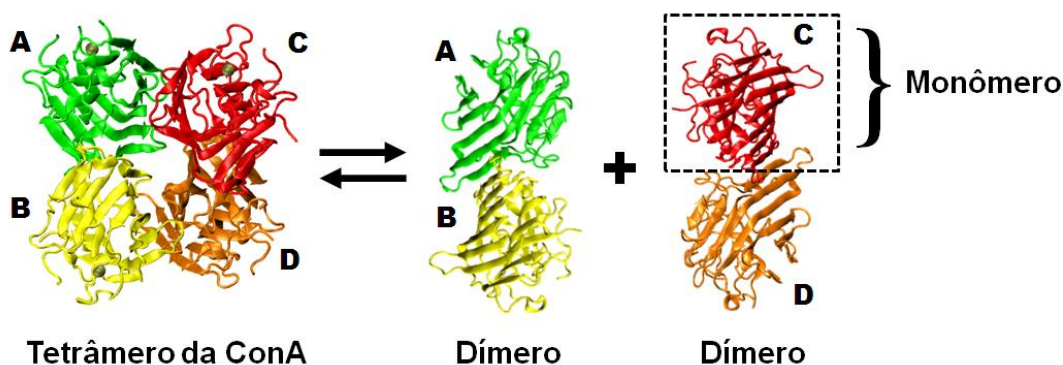
Estruturalmente a ConA é uma proteína  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -dependente, que se liga especificamente à  $\alpha$ -D-manose,  $\alpha$ -D-glicose e glicopiranosídeos (LI et al., 2011) formando um complexo carboidrato-ConA na proporção de 4:1 (ANZAI; KOBAYASHI, 2000). Os monômeros da ConA são compostos por 237 resíduos de

aminoácidos que formam duas folhas  $\beta$  antiparalelas, compostos por 6 e 7 fileiras paralelas de seqüências de aminoácidos estendidas em cada uma delas, respectivamente. A formação dos dímeros é dada pelo emparelhamento adjacente e antiparalelo dos monômeros, como mostrado na **Figura 1**.



**Figura 1:** (a) Folhas e vagem com sementes da *Canavalia ensiformis*, das quais são extraídas a lectina ConA. A estrutura do monômero da ConA (b), PDB 3CNA (HARDMAN; AINSWORTH, 1972), e dos carboidratos manose (c) e glicose (d).

Em meio fisiológico a ConA possui estrutura quaternária tetramérica, com peso molecular de 416-448 KDa e ponto isoelétrico na faixa de pH 4.5-5.5. A ConA também pode ser descrita como um dímero de dímeros (**Figura 2**), cuja dissociação reversível é dada pela mudança de pH, de modo que suas subunidades sofrem apenas uma pequena perturbação estrutural, mantendo igual afinidade pelos açúcares em ambas as formas, dimérica (pH < 5.5) ou tetramérica (pH > 5.5).



**Figura 2:** Equilíbrio químico entre as formas tetraméricas e diméricas da ConA em função do pH. Em pH > 5.5, o tetrâmero é a estrutura quaternária mais abundante, enquanto que, em pH mais ácido (< 5.5), a estrutura dimérica é predominante. Ambas as formas apresentam a mesma afinidade por manose e glicose.

Ao nível molecular de interação lectina/receptor, é sabido que a ConA pode ligar-se especificamente a diferentes resíduos de manose e glicose em estruturas mais complexas (LI et al., 2011), modulando vários eventos, tais como: neuroplasticidade (LIN e LEVITAN, 1991; SCHERER e UDIN, 1994; EVERTS et al., 1999), limiar de resposta em receptores ionotrópicos de glutamato (THALHAMMER; EVERTS; HOLLMANN, 2002; BOEHM; HUCK, 1998) efeitos inibitórios no transporte de 5-HT (5-hidroxitriptamina, ou serotonina) antagonizado por  $\alpha$ -metil-D-manose (IKEGAMI et al., 1991), inibição pré-sináptica em neurônios (BOEHM; HUCK, 1998), e dessensibilização no transporte de dopamina (HUANG et al, 2003).

Em geral, as lectinas também apresentam muitos efeitos imunológicos, disparando diferentes vias de inflamação, dependente do tipo e da dose da lectina (XU et al., 2006). Por exemplo, a ConA pode exercer uma imunomodulação dose-dependente, levando a mudanças entre o balanço de citocinas anti-inflamatórias (IL-6, IL-10) e pró-inflamatórias (IL-4, IL-12, TNF- $\alpha$ , and INF- $\gamma$ ) (XU et al., 2006).

O efeito potente da ConA contra células tumorais hepáticas foi demonstrado por Ley e Chang (2009). Os primeiros achados apontam para uma internalização da ConA, preferencialmente para as mitocôndria, após ligar-se a resíduos de manose na superfície celular, disparando uma morte autofágica das células tumorais, com subsequente ativação linfocitária.

Dadas suas interações com receptores e superfícies de membrana celular, é razoável supor que algumas lectinas podem também modular a comunicação celular na neuroglia. De fato, a lectina endógena Galectina-1, de ligação específica à  $\beta$ -galactosídeos, é constitutiva do sistema nervoso central (SNC) e exibe funções neuroprotetoras (SAKAGUCHI et. al, 2006; ISHIBASHI et al, 2007; QU et al, 2010, 2011) pela produção de fatores neurotróficos (SASAKI et al, 2004). Além disso, desenvolvem importante papel na memória hipocampal e potente atividade contra neuro-inflamação (SAKAGUCHI et. al, 2011). A lectina de *Araucaria angustifolia* tem supostamente um efeito protetor contra a hiper-excitabilidade cerebral (VASCONCELOS et al., 2009). No entanto, nenhuma informação está disponível na literatura com relação a efeitos da ConA sobre excitabilidade cerebral.

A lectina exógena ConA também é capaz de modular receptores glutamatérgicos em neurônios pré-sinápticos (FAY; BOWIE, 2006; YUE et al, 1995). Recentemente, foi descrito que uma lectina homóloga à ConA, a ConBr extraída da *Canavalia brasiliensis*, é capaz de proteger o hipocampo de ratos contra a neurotoxicidade do glutamato por um sistema de interação lectina/glutamato (JACQUES et al, 2013) resultando em atividade antidepressiva e neuroprotetora. Por outro lado, outras lectinas exógenas também são capazes de desencadear resposta neuroinflamatória em ratos, mas com efeito do tipo depressor (YUE et al, 1995).

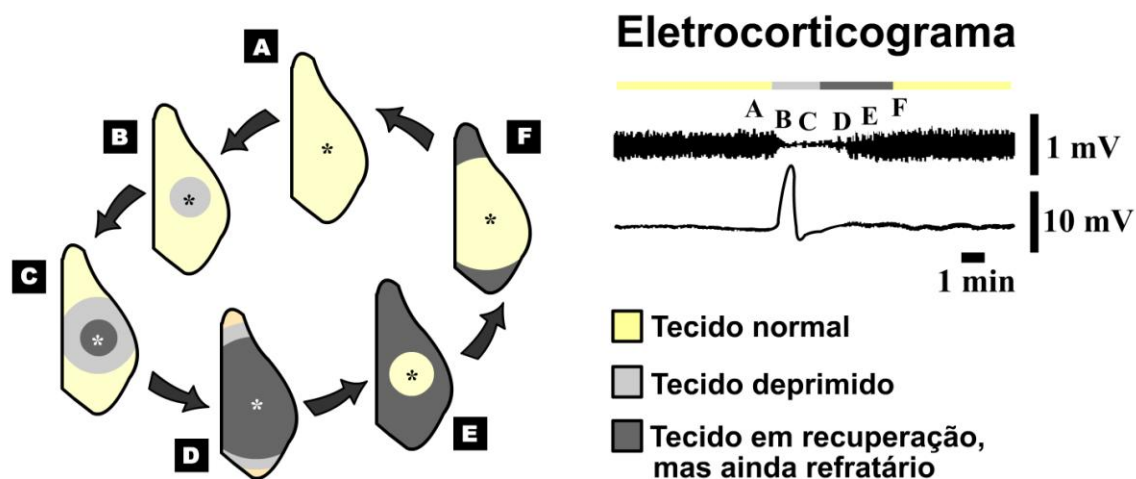
A contradição em muitos efeitos biológicos observados para lectinas homólogas reforça o fato de que não há uma maneira simples de equacionar as relações entre estrutura e atividade biológica, de modo que cada nova atividade deve ser investigada sistematicamente para cada lectina. Foi nesse contexto que descrevemos pela primeira vez os efeitos do tratamento sistêmico e tópico da lectina ConA sobre o fenômeno da DAC, o qual será apresentado na próxima seção.

### **2.3. Depressão Alastrante Cortical**

A DAC foi inicialmente descrita pelo neurocientista brasileiro Aristides Leão em 1944 durante estudos sobre epilepsia experimental, nos quais se registrava a atividade elétrica cortical de coelhos anestesiados (LEAO, 1944). O termo “Depressão Alastrante” advém da massiva e sincronizada diminuição da atividade elétrica espontânea, observada no eletrocorticograma, resultando de uma despolarização e repolarização das células neuronais na região afetada.

A diminuição da atividade elétrica cortical na DAC propaga-se concêntricamente em resposta à estimulação química, elétrica ou mecânica de um ponto do tecido cortical. Em seguida, o local inicialmente deprimido começa a se recuperar e em torno de 10 a 15 minutos o tecido encontra-se completamente recuperado (LEÃO, 1972; MARTINS-FERREIRA, 1974), o que torna este fenômeno absolutamente reversível, como mostrado no esquema da **Figura 3**.





**Figura 3:** Ciclo de eventos reversíveis que ocorrem durante a depressão alastrante cortical. Seqüência de passos (A-F) que caracterizam da DAC no córtex cerebral do rato (apenas um dos hemisférios cerebrais é mostrado). Em A, o tecido cortical é estimulado no ponto marcado por um \* e um episódio de DAC é originado deste ponto. O círculo cinza marcado em B mostra a área inicialmente deprimida, com conseqüente propagação concêntrica para outras áreas do córtex (passos C e D). A área em cinza-escuro representa a região cortical em recuperação após a DAC, mas que ainda se encontra refratária, incapaz de produzir um segundo episódio de DAC. O círculo na cor bege, mostrado em E, indica a área inicialmente recuperada após a DAC. A recuperação é um processo gradual que se estende para áreas remotas (passo F) e finalmente todo o tecido cortical retorna à condição inicial pré-DAC, como em A. À direita é mostrada a diminuição (depressão) do eletrocorticograma com a variação lenta de potencial, característica da DAC. Os pontos temporais correspondentes às condições dos passos A-F são marcados no eletrocorticograma com as respectivas letras.

A DAC não se limita ao córtex, podendo também ser observada na substância cinzenta de outras estruturas extra e sub-corticais (LEÃO, 1972; BURE; BURE OVÁ; KRIVÁNEK, 1974; DO CARMO; MARTINS-FERREIRA, 1984; GUEDES et al., 2005).

A propagação das ondas na DAC envolve grandes mudanças nas concentrações e redistribuições iônicas, principalmente de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (MARTINS-FERREIRA; NEDERGAARD; NICHOLSON, 2000). Uma vez que os coeficientes de difusão desses íons são praticamente constantes, outros fatores endógenos devem explicar o aumento ou diminuição na velocidade de propagação da DAC observados experimentalmente. Dentre esses fatores, podemos citar a integridade do tecido, os tipos de células envolvidas, variação no volume extracelular, distribuição de canais para íons nas membranas e seus potenciais de corrente (MIURA; HUANG; WYLIE, 2007).

Além da difusão iônica através do espaço extracelular (GUEDES; DO CARMO, 1980; SIESJÖ; BENGTSSON, 1989), outras espécies químicas como radicais livres produzidos no tecido nervoso também resultam em efeitos distintos sobre a DAC (ABADIE-GUEDES et al., 2008; EL-BACHÁ; LIMA-FILHO; GUEDES, 1998, NETTO; MARTINS-FERREIRA, 1989). À medida que esses compostos se difundem através do espaço extracelular, deflagram o fenômeno nas células vizinhas que, uma vez deprimidas eletricamente, passam a liberar estes mesmos fatores que deprimem outras células, caracterizando uma propagação automantida e sustentada (LEHMENKÜHLER; GROTEMEYER; TEGTMEIER, 1993).

A DAC já foi demonstrada experimentalmente em diferentes espécies de vertebrados, desde peixes a mamíferos, inclusive o homem. Independente da espécie estudada, observam-se velocidades de propagação notavelmente baixas (de 2 a 5 mm/min), em comparação com a ordem de grandeza da velocidade de propagação dos impulsos nervosos em axônios (até dezenas de m/s). Entretanto, muitas propriedades das ondas da DAC são análogas à propagação do potencial de ação em axônios (MIURA; HUANG; WYLIE, 2007); por exemplo, possuem resposta do tipo “tudo-ou-nada”, e apresentam refratariedade, de modo que os pontos recém-estimulados são incapazes de propagar um novo evento até que o tecido esteja recuperado. Essas características são responsáveis pela frente de onda concêntrica gerada no tecido cortical, como mostrado na **Figura 3**.

O Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT), do Departamento de Nutrição do CCS/UFPE, onde este estudo foi desenvolvido, vem investigando a DAC como fenômeno potencialmente relevante para o melhor conhecimento dos mecanismos de doenças neurológicas humanas importantes, como as epilepsias, a enxaqueca com aura e a isquemia cerebral. Inúmeras evidências clínicas têm sugerido o envolvimento da DAC com essas doenças (LEÃO, 1944; LEÃO, 1972; GUEDES; CAVALHEIRO, 1997; RICHTER; LEHMENKÜHLER, 2008; GORJI, 2001).

Nessa linha de pesquisa, tem-se demonstrado em ratos que alterações nutricionais precoces (no aleitamento), tanto no sentido das condições favoráveis e desfavoráveis de lactação, alteram a propagação da DAC em sentidos opostos e esses efeitos persistem até a idade adulta (ROCHA-DE-MELO et al, 2006).

A susceptibilidade cortical ao fenômeno parece ser influenciada pelas condições em que o tecido cerebral se encontra. Assim como o estado nutricional, outras condições de relevância clínica que influenciam a excitabilidade neuronal podem interferir com a incidência da DAC e sua propagação.

Dentre os fatores que aumentam a velocidade da DAC podemos mencionar: a desnutrição (GUEDES; ANDRADE; CABRAL-FILHO, 1987; ANDRADE; GUEDES; TEODÓSIO, 1990; ROCHA-DE-MELO; GUEDES, 1997; ROCHA-DE-MELO et al., 2006), a diminuição da concentração extracelular de cloreto (GUEDES; DO CARMO, 1980), a privação do sono paradoxal (VASCONCELOS et al., 2004; GUEDES; VASCONCELOS, 2008), o consumo de etanol (GUEDES; FRADE, 1993; ABADIE-GUEDES et al., 2008), o tratamento com agonistas do GABA (GUEDES et al., 1992), a hipoglicemia (XIMENES-DA-SILVA; GUEDES, 1991; COSTA-CRUZ; GUEDES, 2001); o hipertireoidismo (SANTOS, 2000), a privação sensorial (SANTOS-MONTEIRO, 2002; TENÓRIO et al., 2009) e o tratamento precoce com certos aminoácidos, como a arginina (MAIA et al., 2008) a glutamina (LIMA et al., 2009) e o glutamato mono-sódico (LIMA et al., 2013).

Igualmente, há fatores que diminuem a velocidade de propagação da DAC, como: o tratamento dietético com lítio (GUEDES et al., 1989), o envelhecimento (GUEDES et al., 1996), a facilitação da atividade serotoninérgica (CABRAL-FILHO; TRINDADE-FILHO; GUEDES, 1995; GUEDES et al., 2002; AMÂNCIO-DOS-SANTOS et al., 2006), o uso de anestésicos (GUEDES; BARRETO, 1992), o hipotireoidismo (GUEDES; PEREIRA-DASILVA, 1993), a hiperglicemia (XIMENES-DA-SILVA; GUEDES, 1991; COSTA-CRUZ; GUEDES, 2001; COSTA-CRUZ; AMÂNCIO-DOS-SANTOS; GUEDES, 2006), a epilepsia crônica provocada pela pilocarpina (GUEDES; CAVALHEIRO, 1997; COSTA-CRUZ et al., 2006), a estimulação ambiental (SANTOS-MONTEIRO et al., 2000) e a estimulação elétrica periférica (DO MONTE-SILVA et al., 2007).

Sabe-se que depressão alastrante é um fenômeno não apenas neuronal, mas envolve também a despolarização glial. Em muitos processos de injúria no cérebro a microglia e os astrócitos são transformados em glia reativa (CAGGIANO; KRAIG, 1996). Zhou et al. (2010) demonstraram por técnicas de microscopia associadas à DAC que os astrócitos sofrem alterações induzidas pelo  $[K^+]$  extracelular, mas sem as

alterações que ocorrem nos neurônios como aumento no volume celular, diminuição do pH (acidificação) intracelular, e despolarização mitocondrial. No que tange à microglia, sabe-se que a depressão alastrante pode aumentar sua ativação, aumentando a liberação de citocinas a partir destas células. Grinberg, Milton e Kraig (2011) observaram um aumento significativo da movimentação microglial em ratos adultos, horas após a depressão alastrante, como uma resposta mal-adaptativa ao fenômeno. Caggiano e Kraig (1996) observaram um aumento na imunorreatividade microglial no hemisfério cortical em que a depressão alastrante é induzida, em um processo que pode ser modulado por eicosanóides e óxido nítrico, sendo a microglia mais sensível à essas alterações que os astrócitos. Cui et al. (2009) também verificaram *in vivo* uma ativação microglial predominante no hemisfério ipsilateral de ratos após oito dias da cirurgia e estimulação da DAC, por meio de monitoramento de imagens e imunomarcção contra a proteína PBR; esta proteína é expressa em maior quantidade nas mitocôndrias da microglia ativada.

Deve-se ressaltar que, apesar do reconhecido aumento da reatividade microglial com a depressão alastrante, pouco se sabe sob os efeitos tardios em uma janela de tempo maior que 30 dias entre a estimulação da DAC e as respostas microgliais em animais submetidos à condições desfavoráveis de lactação durante os primeiros 25 dias de vida. Adicionalmente, não foram encontrados na literatura os efeitos da lectina ConA sob a ativação microglial ou seus efeitos durante aplicação no período crítico de desenvolvimento cerebral.

Diante do exposto, a DAC apresenta-se como um modelo experimental extremamente reprodutível que envolve distintos mecanismos neuronais e gliais. Apesar dos questionamentos em aberto quanto ao fenômeno, há fortes evidências de validação dos modelos experimentais *in vivo* com animais de laboratório e suas manifestações em humanos. Assim, a investigação de novos fatores que influenciam a DAC pode ser alvo para terapias de controle de desordens neurológicas, associadas ao uso de novas moléculas com atividade neural, sob distintos estados nutricionais. É neste contexto que propusemos estudar os efeitos da lectina ConA sob a depressão alastrante cortical *in vivo* em ratos adultos previamente submetidos a diferentes condições de lactação.

Nas próximas seções, descreveremos os métodos experimentais utilizados neste trabalho.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. Lectina

Para este estudo utilizou-se a lectina da *Canavalia ensiformis*, Concanavalina A (ConA). Essa leguminosa é popularmente conhecida como “feijão de porco” (em inglês: “jack beans”). A lectina foi obtida na forma de pó (Sigma-Aldrich, 99% de pureza), e armazenada sob refrigeração, em ambiente seco e ao abrigo de luz até a sua utilização.

#### 3.2. Animais e Delineamento Experimental

Foram estudados ratos machos, da linhagem Wistar ( $n = 97$ ), oriundos da Colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Após confirmação da fecundação através do esfregaço vaginal, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais. Os filhotes, após o desmame, também foram mantidos em gaiolas de polipropileno, à temperatura ambiente de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , com ciclo claro-escuro de 12-12 h (início da fase clara às 6:00 h) e com livre acesso à ração e água.

Os procedimentos descritos para o manejo e o cuidado dos animais seguiram normas semelhantes às estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Os experimentos foram iniciados após a aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (Processo nº 23076.031272/2010-53; Anexo C).

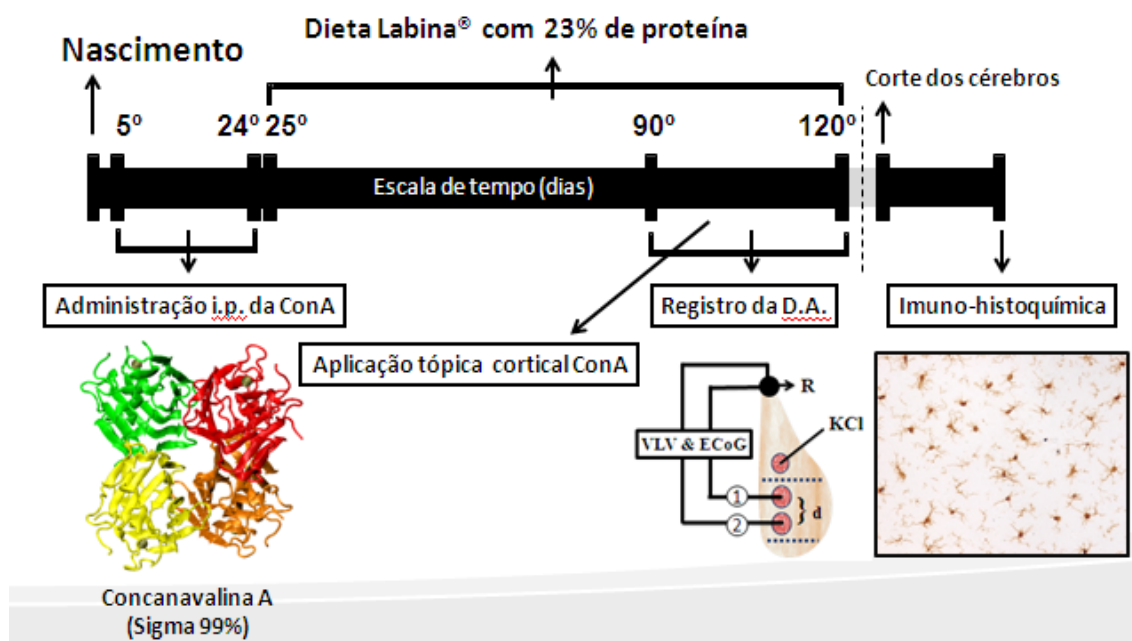
Para o início do aleitamento, os filhotes de várias mães foram reunidos e aleatoriamente distribuídos para constituir os dois seguintes grupos, nutricionalmente distintos, segundo a técnica de manipulação do tamanho das ninhadas (DE LUCA; CIOFFI; BURES, 1977; ROCHA-DE-MELO et al., 2006):

- **Lactação em condições favoráveis:** no qual os filhotes foram amamentados em ninhadas de tamanho normal, formadas por 6-7 filhotes (**grupo N6**);
- **Lactação em condições desfavoráveis:** no qual os filhotes foram amamentados em ninhadas de tamanho grande, formadas por 12- 14 filhotes (**grupo N12**). Esse procedimento induz deficiência nutricional nos filhotes durante esse período de intenso desenvolvimento cerebral (ROCHA-DE-MELO et al., 2006).

O delineamento experimental é mostrado esquematicamente na **Figura 4**, e detalhado nas seções posteriores.

### 3.3. Aplicação Sistêmica de Lectina ConA

Do 5º ao 24º dia após o nascimento, em cada condição de aleitamento, dois grupos de ratos receberam injeções diárias da lectina ConA por via intraperitoneal diluída em solução salina nas doses de 1 mg/kg (grupo L1) ou 10 mg/kg (grupo L10). Dois outros grupos foram utilizados como controle: um tratado apenas com o veículo (solução salina 0,9%; grupo Sal), e outro, sem qualquer tratamento (grupo ingênuo). Constituiu-se assim os oito (8) grupos de animais deste estudo, sendo 4 em condições de lactação favorável e 4 em condições desfavoráveis de lactação (**Figura 4**). Após o desmame (25º dia) todos os grupos receberam a dieta anteriormente oferecida às mães, contendo 23 % de proteína. Após o registro da DAC, os cérebros foram perfundidos, cortados e processados para marcação imuno-histoquímica da microglia.



**Figura 4:** Esquema do delineamento experimental. Após o nascimento os ratos foram amamentados em ninhadas com 6-7 ou 12-14 filhotes, configurando respectivamente lactação em condições favoráveis e desfavoráveis (grupos N-6 e N-12). Do 5º ao 24º dia após o nascimento, os ratos receberam injeções diárias da lectina ConA diluída em solução salina nas doses de 1 mg/kg (grupo L1) ou 10 mg/kg (grupo L10). Em cada condição de aleitamento, dois grupos controle foram utilizados: um tratado apenas com o veículo (solução salina 0,9%; grupo Sal), e outro, sem qualquer tratamento (grupo ingênuo). Do 25º dia até a data do registro da DAC (90-120 dias), todos os grupos receberam a mesma dieta, anteriormente oferecida às mães, contendo 23 % de proteína. Após o registro da DAC, os cérebros foram perfundidos, cortados e processados para marcação imuno-histoquímica da microglia.

### 3.4. Registro da Depressão Alastrante Cortical

No dia do registro (90 a 120 dias após o nascimento), os animais foram anestesiados, por via intraperitoneal, com 10 ml/Kg de peso corporal de uma solução de Uretana a 10% + Cloralose a 0,4%, perfazendo a dose de 1g/Kg de Uretana +40mg/kg de cloralose. O animal foi colocado em decúbito ventral, sobre um aquecedor elétrico para manter a temperatura retal estável em torno de  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . A cabeça do animal foi fixada à base de um aparelho estereotáxico modelo 900 (David Kopf). Uma incisão na pele da cabeça ao nível da linha média permitiu a remoção do periósteo e exposição da calota craniana que foi então trepanada, obtendo-se 3 orifícios ao nível do hemisfério direito. O primeiro orifício de 2-3 mm de diâmetro, na região frontal, foi utilizado para a estimulação necessária à deflagração da DAC. Os outros dois, de 3-4 mm de diâmetro, na região parietal, foram destinados à colocação de dois eletrodos através dos quais realizou-se o registro eletrofisiológico. Os orifícios foram alinhados na direção fronto-occipital e paralelos à linha média.

A cada 20 minutos, a DAC foi desencadeada por estimulação química: uma pelota de algodão, embebida em solução de KCl a 2%, foi colocada em contato com a superfície cortical, através do orifício de estimulação, durante um minuto. Após esse tempo, o estímulo químico foi retirado e a região enxugada com algodão a fim de remover o excesso de KCl. Essa estimulação, realizada na região frontal, provoca usualmente uma única “onda” de DAC que, ao se propagar, é registrada pelos eletrodos colocados na região parietal.

A atividade elétrica cortical (ECoG) e a variação lenta de voltagem (VLV) que acompanha a DAC foram registradas continuamente por um período de 4 horas. Os dois eletrodos utilizados para o registro e o eletrodo de referência comum (localizado no osso nasal) foram do tipo “prata-cloreto de prata”. Eles foram obtidos promovendo-se, por eletrólise, a formação de uma fina camada de cloreto de prata, em um fio de prata de 3 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro. Em seguida, duas pipetas cônicas de plástico (5cm de comprimento, diâmetro inferior de 1mm e superior de 5mm) já fixadas entre si e com distância entre as suas pontas conhecida (variando entre 4 e 6 mm para distintos pares de pipetas), foram preenchidas com solução de agar-ringer a 0,5%, na qual os fios cloretados foram imersos. Esse par de eletrodos foi fixado ao segurador de eletrodos do aparelho estereotáxico, de modo que os eletrodos puderam ser baixados e postos em

contato com a superfície cortical de forma suave, evitando-se pressão excessiva sobre a mesma.

Os registros foram realizados em polígrafo GRASS Modelo 7D (Grass Medical Instruments) e em um sistema digital (EMG systems do Brasil Ltda), que permite o registro e armazenamento dos dados em computador.

A velocidade de propagação da DAC foi calculada dividindo-se a distância entre os dois pontos corticais de registro (distância fixa para cada experimento) pelo tempo necessário para que uma onda da DAC percorra essa distância.

### **3.5. Aplicação Tópica Cortical da Lectina ConA**

Um grupo adicional de ratos adultos com (90-120 dias; n=8) foi submetido à aplicação tópica de lectina, na concentração de 1mg/ml. Previamente a esta aplicação, foi realizado, por um período de uma hora o registro eletrofisiológico da DAC, denominado de registro “basal”, durante o qual a velocidade da DAC foi medida em intervalos de 20 minutos. Cerca de 10 minutos após a última medida do registro basal, estando a dura-máter intacta, a solução de lectina a 1 mg/mL foi aplicada, sobre a superfície dos dois orifícios, usados para o registro eletrofisiológico. Esta concentração da solução de lectina equivale à concentração do grupo L10 aplicado sistemicamente. A lectina permanecia em contato com a superfície cortical por aproximadamente 10 minutos. Após este procedimento o córtex foi enxugado e nova DAC foi deflagrada com KCl. Mais duas aplicações subseqüentes de lectina foram realizadas da mesma maneira, com objetivo de obter outras duas medidas da velocidade de propagação da DAC. Estas velocidades foram comparadas com aquelas do período basal, no mesmo animal.

### **3.6. Determinações Ponderais: Medidas dos Pesos Corporais e Encefálicos**

A evolução ponderal foi obtida, pesando-se os animais aos 7, 14, 21, 30, 60 e 90 dias de vida em todos os grupos, com o auxílio de uma balança eletrônica (Marte, Mod.54.000), com sensibilidade de até 0,1g. Os animais foram pesados também no dia do registro eletrofisiológico.



O peso dos encéfalos perfundidos foi obtido ao término do registro eletrofisiológico, após o mesmo ter sido removido do crânio, mediante duas incisões: uma incisão anterior, no limite entre os hemisférios cerebrais e o bulbo olfatório, excluindo-o, e outra incisão tangenciando a borda inferior do cerebelo, incluindo-o. Estes encéfalos foram pesados em balança analítica modelo Bosh, S-2000 com sensibilidade até 0,1 mg.

### **3.7. Estudo Imuno-histoquímico do Córtex e Hipocampo**

Os cérebros, perfundidos com solução salina a NaCl 0,9 % seguido por paraformaldeído a 4% diluído em 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,4), foram conservados em paraformaldeído a 4%, armazenados em condições apropriadas e analisados na Universitat Autònoma de Barcelona durante o período do Doutorado Sanduíche.

Cortes seriados longitudinais com 30 micrometros de espessura foram obtidos a -20 ° C com um criostato (Leica-1850). Os cortes foram imunomarcados com anti-IBA-1, proteína expressa nas células microgliais (anti-Iba1, #019-19741; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japão). Secções com flutuação livre foram sujeitas a bloqueio da peroxidase endógena (2% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 70% metanol, durante 10 min). Depois, as secções foram incubadas durante 1 h em solução tampão de bloqueio (BB) contendo 0,05 M de solução salina tamponada com Tris (TBS), pH 7,4, 10% de soro fetal de vitelo, 3% de albumina de soro bovino, e Triton X – 100 a 1%. Em seguida, as secções foram incubadas durante toda a noite a 4° C com anticorpo de coelho anti-Iba1 (1:1.500 diluída em solução BB). Após três lavagens com TBS, mais 1% de Triton, as secções foram incubadas à temperatura ambiente durante 1 h com anticorpos secundários anti-coelho biotinilado (1:500). As secções foram então lavadas em TBS com Triton 1% e incubadas com um conjugado com peroxidase de estreptavidina (1:500). A reação de peroxidase foi visualizada ao incubar as secções em tampão Tris, contendo 0,5 mg/mL de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e 0,33 ul/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por fim, as seções foram montadas em lâminas de vidro, desidratadas em álcoois graduados e xileno, e cobertas com lamínulas e Entellan®.

A análise densitométrica do córtex cerebral e hipocampo (região “cornu Amoni” 1- CA1) foi realizada bilateralmente para cada animal. O padrão de imunomarcção do hemisfério direito, que sofreu episódios repetidos de DAC, foi

comparado com o do hemisfério esquerdo (controle). Em cada secção foram analisadas fotomicrografias de quatro campos dentro do córtex parietal e três campos na região da camada molecular do hipocampo, região CA1, usando o software Image J (National Institutes of Health, EUA; versão 1.46r). Um microscópio Leica-LMG acoplado a uma câmera colorida de alta resolução Samsung (modelo SHC-410NAD) foi utilizada para obtenção das imagens digitais das seções cerebrais. As imagens do córtex e hipocampo foram obtidas com uma objetiva 20×. Para obtenção das imagens digitais, foram utilizadas as mesmas condições de intensidade de luz, em todos os grupos. Como parâmetros, foram analisadas a percentagem da área ocupada pelas células imunomarcadas, bem como a imunorreatividade total expressa em unidades arbitrárias.

### **3.8. Análise Estatística**

Os pesos corporal e cerebral, bem como a velocidade de propagação da DAC, amplitudes e durações da sua variação lenta de voltagem foram comparadas entre os grupos utilizando ANOVA seguido de um teste post hoc (Holm-Sidak), quando indicado. A análise imuno-histoquímica quantitativa foi realizada utilizando ANOVA de duas vias incluindo o fator tratamento (Salina, Ingênuo, L-1 e L-10) e hemisfério controle e DAC como fatores, seguido de um teste post-hoc (Holm-Sidak), quando indicado. O efeito de aplicação tópica da lectina na velocidade de propagação da DAC foi analisada através do teste t pareado comparando as velocidades da DAC antes e após o tratamento no mesmo animal. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P \leq 0,05$ . Todos os valores são apresentados no texto como média  $\pm$  desvio padrão. Foi utilizado o software estatístico SigmaStat Versão 3.10 para todas as análises.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados pioneiros deste trabalho estão contidos em dois artigos originais, intitulados: *Potential brain protective effect of the lectin from Canavalia ensiformis: an electrophysiological and microglia labeling analysis in the rat* (**Apêndice A**) e *Characterization of brain effects of the lectin from Canavalia ensiformis in adult rats suckled in small and large litters: a spreading depression- and microglia immunolabeling study* (**Apêndice B**).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, nós identificamos as mudanças eletrofisiológicas e microgliais produzidas pela lectina ConA, da *Canavalia ensiformis*, no córtex de ratos. Nossos achados confirmam a efetividade da ConA em desacelerar a propagação da DAC e reduzir o conteúdo de Iba1-1 expresso na micróglia. Demonstramos ainda que tais efeitos também ocorrem em animais previamente amamentados em condições de lactação desfavoráveis (N12). Esses dois fatores (i.e., ConA e lactação desfavorável) parecem ser determinantes para a redução do peso corporal nas primeiras etapas de vida, e para a alteração da DAC e da microglia relatados neste estudo. Esses dados reforçam nossa hipótese inicial de que a administração da ConA durante o desenvolvimento cerebral altera os processos cerebrais envolvidos nos efeitos eletrofisiológicos (DAC) e imuno-histoquímicos observados. Uma vez que existem alterações na velocidade de propagação da DAC, com a administração da ConA no período inicial da vida dos ratos, bem como a reatividade microglial observada em animais adultos, nós sugerimos que os efeitos desta lectina são permanentes, ou pelo menos de longa duração.

- ✓ A administração sistêmica da ConA nos primeiros dias de vida não afetou a evolução ponderal e nem o peso encefálico dos animais, mas diminuiu a velocidade de propagação da DAC e a imuno-marcação microglial, de modo dose-dependente, na idade adulta, sem alteração da sua amplitude e duração;
- ✓ A condição desfavorável de lactação (N12) não modulou o efeito da ConA sobre a propagação da DAC, mas aumentou sua amplitude e reduziu sua duração;
- ✓ A aplicação tópica da ConA também acarreta uma diminuição reversível da velocidade de propagação da DAC, demonstrando efeito direto dessa lectina;
- ✓ A condição desfavorável de lactação (N12) reduziu os pesos corporais e encefálicos e aumentou a velocidade de propagação da DAC, em comparação com os correspondentes grupos N6, confirmando observações anteriores de nosso grupo e de outros autores.

- ✓ A imunorreatividade da microglia neocortical e do hipocampo são diferencialmente diminuídas pela ConA, (diminuição maior no córtex do que no hipocampo) quando comparado com os grupos controle;
- ✓ O hemisfério cerebral que sofreu a DAC apresentou maior imunorreatividade em relação ao hemisfério contralateral, livre do fenômeno, o que sugere uma ativação microglial induzida pela DAC.

Estes resultados contribuem para um melhor entendimento dos mecanismos eletrofisiológicos cerebrais e alterações histológicas induzida por lectinas e, ao mesmo tempo, contribuem no desenvolvimento de estratégias terapêuticas futuras com base no desenvolvimento de novas-moléculas para aplicação em distúrbios neurológicos humanos, associados ou não a deficiências nutricionais.

O presente estudo, pioneiro nesse tema, permite-nos sugerir as seguintes perspectivas:

Correlacionar a suplementação de antioxidantes (ácido ascórbico), via gavagem, e aplicação de lectina ConA (via Intraperitoneal) com seus efeitos eletrofisiológicos em ratos sob condições favoráveis e desfavoráveis de Lactação. Os experimentos para essa investigação já estão em andamento;

Prosseguir à análise histoquímica referente a outros imuno-marcadores neuronais e gliais;

Avaliar o efeito da aplicação tópica simultânea da lectina ConA + Manose/Glicose + Glutamato. A elevada afinidade destes carboidratos com a lectina poderia deslocá-la dos seus sítios receptores no tecido neural e reverter seu efeito protetor da Depressão Alastrante Cortical. Este experimento poderia elucidar, a nível molecular, os efeitos da ConA sobre os parâmetros eletrofisiológicos;

Avaliar o efeito de outras lectinas, com afinidades por diferentes tipos carboidratos, sobre a Depressão Alastrante Cortical;

Investigar padrões de comportamento de animais nas mesmas condições de tratamento e de lactação (favoráveis e desfavoráveis).

## REFERÊNCIAS

ABADIE-GUEDES, R; SANTOS, S. D; CAHÚ, T. B; GUEDES, R. C. A; BEZERRA, R.S. Dose-dependent effects of astaxanthin on cortical spreading depression in chronically ethanol-treated adult rats. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v.32, n.8, p.1417-1421, 2008.

ALLEN, N. K; BOLWELL, G. P; BROWN, D. S; SIDEBOTTOM, C; SLABAS, A. R. Potato lectin: a three-domain glycoprotein with novel hydroxyproline-containing sequences and sequence similarities to wheat-germ agglutinin. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.28, n.11, p.1285-1291, 1996.

AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A; PINHEIRO, P. C .F; LIMA, D. S. C; OZIAS, M. G; OLIVEIRA, M. B, GUIMARÃES, N. X; GUEDES, R. C. A. Fluoxetine inhibits cortical spreading depression in weaned and adult rats suckled under favorable and unfavorable lactation conditions. **Experimental Neurology**, v.200, n.2, p.275-282, 2006.

ANDRADE, A. F. D; GUEDES, R. C. A; TEODÓSIO, N. R. Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.23, n.9, p.889-893, 1990.

ANZAI, J; KOBAYASHI, Y. Construction of multilayer thin films of enzymes by means of sugarlectin interactions. **Langmuir**, v.16, n.6, p.2851–56, 2000.

ASHFORD, D; ALLEN, A. K; NEUBERGER, A. The production and properties of an antiserum to potato (*Solanum tuberosum*) lectin. **Biochemistry Journal**, v.201, n.3, p.641- 645, 1982.

BERTOK, T; KLUKOVA, L; SEDIVA, A; KASÁK, P; SEMAK, V; MICUSIK, M.; OMASTOVA, M; CHOVANOVÁ, L; VLČEK, M; IMRICH, R; VIKARTOVSKA, A.;

TKAC, J. Ultrasensitive Impedimetric Lectin Biosensors with Efficient Antifouling Properties Applied in Glycoprofiling of Human Serum Samples. **Analytical Chemistry**, v.85, n.15, p. 7324–7332, 2013.

BLOEM, K; VUIST, I. M; VAN DER PLAS, A. J; KNIPPELS, L. M. J; GARSEN, J; GARCIA-VALLEJO, J. J; VAN VLIET, S. J; VAN KOOYK, Y. Ligand Binding and Signaling of Dendritic Cell Immunoreceptor (DCIR) Is Modulated by the Glycosylation of the Carbohydrate Recognition Domain. **Plos One**, v.8, n.6, p.1-10, 2013.

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

BORBA, J. M. C; ARAUJO, M. S; PICANÇO-DINIZ, C. W. Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. **Brain Research Bulletin**, v.53, n.2, p.193–201, 2000.

BORN, J. M; MARTENS, M. J. I; LEMMENS, S. G. T; GOEBEL, R; WESTERTEP-PLANTENGA, M.S. Protein v. carbohydrate intake differentially affects liking- and wanting-related brain signalling. **British Journal of Nutrition**, v.109, n.2, p.376-381, 2013.

BURE, J; BURE.OVÁ, O; KRIVÁNEK, J. **The Mechanisms and Applications of Leao's Spreading Depression of Eletroencephalografic Activity**. Praga: Academia, 1974. 410p.

CABRAL-FILHO, J. E; TRINDADE-FILHO, E. M; GUEDES, R. C. A. Effect of dfenfluramine on cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.28, n.3, p.347-350, 1995.

CAGGIANO, A. O.; KRAIG, R. P. Eicosanoids and nitric oxide influence induction of reactive gliosis from spreading depression in microglia but not astrocytes. **Journal of Comparative Neurology**, v.369, n.1, p.93–108, 1996.

CAMPOS, L. M; CAVALCANTI, C. L.; LIMA-FILHO, J. L.; CARVALHO, L. B. ; BELTRÃO, E. I. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. **Biomarkers**, v.11, n.5, p.480-4, 2006.

CAVADA, B. S; BARBOSA, T; ARRUDA, S; GRANJEIRO, T. B; BARRAL NETTO, M. Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoidae. **Prep. Biochemical & Biotechnology**, v.30, n.4, p.271-280 2001.

COSTA-CRUZ, R. R. G.; GUEDES, R. C. A. Cortical spreading depression during streptozotocin-induced hyperglycemia in nutritionally normal and early-malnourished rats. **Neuroscience Letters**, v.303, n.3, p.177-180, 2001.

COSTA-CRUZ, R. R. G; AMÂNCIO-DOS-SANTOS, A; GUEDES, R. C. A. Characterization of cortical spreading depression in adult well-nourished and malnourished rats submitted to the association of pilocarpine-induced epilepsy plus streptozotocin-induced hyperglycemia. **Neuroscience Letters**, v.401, n.3, p.271-275, 2006.

CUI, Y.; TAKASHIMA, T.; TAKASHIMA-HIRANO, M.; WADA, Y.; SHUKURI, M.; TAMURA, Y.; DOI, H.; ONOE, H.; KATAOKA, Y.; WATANABE, Y. 11C-PK11195 PET for the in vivo evaluation of neuroinflammation in the rat brain after cortical spreading depression. **The Journal of Nuclear Medicine**, v.50, n.11, p. 1904-1911, 2009.

DE LUCA, B; CIOFFI, L.A; BURES, J. Cortical and caudate spreading depression as an indicator of neural changes induced by early malnutrition in rats. **Activitas Nervosa Superior**, v. 19, n.2, p. 130-131, 1977.

DO CARMO, R. J; MARTINS-FERREIRA, H. Spreading depression of Leao probed with ion-selective microelectrodes in isolated chick retina. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.56, n.4, p.401-421, 1984.

DO MONTE-SILVA, K. K; ASSIS, F. L. D. N; LEAL, G. M. A; GUEDES, R.C.A Nutrition-dependent influence of peripheral electrical stimulation during brain



development on cortical spreading depression in weaned rats. **Nutritional Neuroscience**, v.10, n. (3-4), p.187-194, 2007.

DOBBING, J. Vulnerable periods in developing brain. In: DAVISON A. N.; DOBBING J. **Applied Neurochemistry**. Oxford: Blackwell, 1968. p. 287-316.

EL-BACHÁ, R. S; LIMA-FILHO, J. L, GUEDES, R. C. A. Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photo-activated riboflavin. **Nutrition Neuroscience**; v.1, n.3, p.205–12, 1998.

EVERTS, I, PETROSKI R, KIZELSZTEIN, P, TEICHBERG, V. I, HEINEMANN, S. F; HOLLMANN, M. Lectin-induced inhibition of desensitization of the kainate receptor GluR6 depends on the activation state and can be mediated by a single native or ectopic N-linked carbohydrate side chain. **Journal Neuroscience**, v.19, n.3, p.916–927, 1999.

EVERTS, I; VILLMAN, C.; HOLLMANN, M. N-glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. **Molecular Pharmacology**, v.52, n.5, p.861-873, 1997.

FAY, A. M; BOWIE, D. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. **The Journal of Physiology**, v.572, n.1, p.201–13, 2006.

FRAZÃO, M. F.; MAIA, L. M. S. S.; GUEDES, R. C. A. Early malnutrition, but not age, modulates in the rat the L-Arginine facilitating effect on cortical spreading depression. **Neuroscience Letters**, v.447, n.1, p.26-30, 2008.

GABIUS, H. J. Animal Lectins. **European Journal of Biochemistry**, v.243, n.3, p.543-576, 1997.

GABIUS, H. J; ANDRE, S; KALTNER, H; SIEBERT, H. C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica Et Biophysica Acta – General Subjects**, Amsterdam, v.1572, n. (2-3), p.165-177, 2002.

GAHMBERG, C. G. A; TOLVANEN, M. Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v.21, n.8, p.308–311, 1996.

GEMEINER, P; MISLOVICOVÁ, D; TKÁC, J; SVITEL, J; PATOPRSTÝ, V; HRABÁROVÁ, E; KOGAN, G; KOZÁR, T. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostic. **Biotechnology Advances**, v.27, n.1, p.1-15, 2009.

GORITYALA, B. K; LU, Z; LEOW, M. L; MA, J; LIU, X. Design of a “Turn-Off/Turn-On” Biosensor: Understanding Carbohydrate-Lectin Interactions for Use in Noncovalent Drug Delivery. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.134, n.37, p 15229–15232, 2012.

GORJI, A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. **Brain Research Reviews**, v.38, n. (1-2), p.33-60, 2001.

GRINBERG, Y. Y; MILTON, J. G.; KRAIG, R. P. Spreading depression sends microglia on Lévy flights. **PLoS One**, v.6, n.4, p.1-9, 2011.

GUEDES, R. C. A. Electrophysiological methods: application in Nutritional Neuroscience. In: Harris R. Lieberman, Robin Kanarek and Chandan Prasad. (Org). **Nutritional Neuroscience: Overview of an emerging field**. 1 ed. New York: CRC Press, 2005, 39- 54 p.

GUEDES, R. C. A; AMANCIO-DOS-SANTOS, A; MANHÃES-DE-CASTRO, R; COSTA-CRUZ, R. R. G. 2002. Citalopram has an antagonistic action on cortical spreading depression in well-nourished and earlymalnourished adult rats. **Nutrition Neuroscience**. v.5, n.2, p.115–123, 2002.

GUEDES, R. C. A; AMORIM, L. F; MEDEIROS, M. C; SILVA, A. T; TEODÓSIO, N. R. Effect of dietary lithium on cortical spreading depression. **Journal of Medicine and Biological Research**, v.22, n.7, p.923-925, 1989.

GUEDES, R. C. A; ANDRADE, A. F. D; CABRAL-FILHO, J. E. Propagation of cortical spreading depression in malnourished rats: facilitatory effect of dietary protein

deficiency. **Journal of Medicine and Biological Research Brazilian**, v.20, n.5, p.639-642, 1987.

GUEDES, R. C. A; BARRETO, J. M. Effect of anesthesia on the propagation of cortical spreading depression in rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v.25, n.4, p.393-397, 1992.

GUEDES, R. C. A; CAVALHEIRO, E. A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy Research**, v.27, n.1, p.33-40, 1997.

GUEDES, R. C. A; DO CARMO, R. J. Influence of ionic alterations produced by gastric washing on cortical spreading depression. **Experimental Brain Research**, v.39, n.3, p.341-349, 1980.

GUEDES, R. C. A; FRADE, S. Effect of ethanol on cortical spreading depression. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v.26, n.11, p.1241-1244, 1993.

GUEDES, R. C. A; PEREIRA-DA-SILVA, M. S. Effect of pre- and postnatal propylthiouracil administration on the propagation of cortical spreading depression of adult rats. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v.26, n.10, p.23-8, 1993.

GUEDES, R. C. A; SANTOS-MONTEIRO, J; TEODÓSIO, N. R. Malnutrition and brain functions: experimental studies using the phenomenon of cortical spreading depression. **Revista Brasileira de Biologia**, v.56, n. (1-2), p.293-301, 1996.

GUEDES, R.C.A; VASCONCELOS, C.A. Sleep-deprivation enhances in adult rats the antagonistic effects of pilocarpine on cortical spreading depression: a dose-response study. **Neuroscience Letters**, v.442, n.2, p.118-122, 2008.

HARDMAN, K .D; AGARWAL, R. C; FREISER, M. J Manganese and calcium binding sites of concanavalin A, **The Journal of Molecular Biology**, v 157, n.1, p.69–86, 1982.

HARDMAN, K. D; AINSWORTH, C. F. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry**, v.11, n.26, p.4910–19, 1972.

HELMHOLZ, H.; CARTELLIERI, S.; HE L.; THIESEN, P.; NIEMEYER, B. Process development in affinity separation of glycoconjugates with lectins as ligands. **Journal of Chromatography A**, v.1006, n. (1-2), p.127-135, 2003.

HOFFMAN, K. B; KESSLER, M.; TA, J.; LAM, L.; LYNCH, G. Mannose-specific lectins modulate ligand binding to AMPA-type glutamate receptors. **Brain Research**, v.795, n. (1-2), p.105-111, 1998.

HUANG, C. L; HUANG, N. K; SHYUE, S. K; CHERN, Y. Hydrogen peroxide induces loss of dopamine transporter activity: a calcium-dependent oxidative mechanism. **Journal of Neurochemistry**, v.86, n.5, p.1247–59, 2003.

HUETTNER, J.E. Glutamate receptor channels in rat dorsal root ganglion neurons: activation by kainate and quisqualate, and blockade of desensitization by concanavalin A. **Neuron**, v. 5, p.255–266, 1990.

IKEGAMI, Y; NISHIO, H; FUKUDA, T; NAKATA, Y; SEGAWA. Effect of concanavalin-A on intracellular calcium-concentration in single blood-platelets. **Journal Pharmacology**, v.5, n.3, p.233– 241, 1991.

ISHIBASHI, S; KUROIWA, T; SAKAGUCHI, M; SUN, L; KADOYA, T; OKANO H. Galectin-1 regulates neurogenesis in the subventricular zone and promotes functional recovery after stroke. **Experimental Neurology**, v.207, n.2, p.302–13, 2007.

JACQUES, A. V; RIEGER, D. K; MAESTRI, M; LOPES, M. W; PERES, T. V; GONÇALVES, F. M. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**, v.62, n.6, p.836-42, 2013.

KARLSSON, K. A. Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. **Current Opinion in Structural Biology**, v.5, n.5, p.622–635, 1995.

KWANYOUNG, J; WONRYEON, C. H. O. Serial Affinity Chromatography as a Selection Tool in Glycoproteomics. **Analytical Chemistry**, v.85, n.5, p.7125–7132, 2013.

LEÃO, A. A. P. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. **Journal of Neurophysiology**, v.7, n.6, p.359-390, 1944.

LEÃO, A. A. P. Spreading depression. In: PURPURA, D. P. et al (Org). **Experimental Models of Epilepsy**, New York: Raven Press, 1972, 173-195 p.

LEHMENKUEHLER, A; GROTEMEYER, K.H; TEGTMEIER, F. **Migraine: Basic Mechanisms and Treatment**, Urban and Schwarzenberg, Munich, 1993, 355–366 p.

LEUBA, G; RABINOWICZ, T. Long-Term Effects of Postnatal Undernutrition and Maternal Malnutrition on Mouse Cerebral-Cortex. 1. Cellular Densities, Cortical Volume and Total Numbers of Cells. **Experimental Brain Research**, v.37, n.2, p.283-298, 1979.

LEY, H. Y; CHANG, C.P. "Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent". **Journal of Biomedical Science**, v.16, n.1, p.1- 10, 2009.

LI, W; YU, J; XU, H; BAO, J. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.414, n.2, p.282–86, 2011.

LIMA, C. B; SOARES, G. S. F; VITOR, S. M; ANDRADE-DA-COSTA, B. L; CASTELLANO, B; GUEDES, R. C. Spreading depression features and Iba1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate. **International Journal of Developmental Neuroscience**. v.33, p.98-105, 2013.

LIMA, D. S. C; MAIA, L. M. S. S; BARBOZA, E. A; DUARTE, R. A; SOUZA, L. S; GUEDES, R. C. A. L glutamine supplementation during the lactation period facilitates cortical spreading depression in well-nourished and early-malnourished rats. **Life Sciences**, v.85, n. (5-6), p.241–7, 2009.

LIN, S. S; LEVITAN, I. B. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. **Trends Neuroscience**, v.14, n.7, p.273–277, 1991.

LIS, H; SHARON, N. Lectins: carbohydrates specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v.98, n.2, p.637-674, 1998.

LIS, H; SHARON, N. Protein glycosylation—structural and functional aspects. **European Journal of Biochemistry**, v.218, n.1, p.1–27, 1993.

LIU, F, PATTERSON, R. J; WANG, J. L. Intracellular functions of galectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572, n. (2-3), p.263–273, 2000.

MAHAN, L. K; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 11 ed. São Paulo: Roca, 2005, 1242 p.

MAIA, L. M. S. S; FRAZÃO, M. F; SOUZA, T. K. M; SILVA, M. B; ROCHA-DE-MELO, A. P; PICANÇO-DINIZ, C. W; GUEDES, R. C. A L-Arginine treatment early in life influences NADPH-diaphorase neurons in visual cortex of normal and early malnourished adult rats. **Brain Research**, v.1072, n.1, p.19–25, 2006.

MAIA, L. M; AMANCIO-DOS-SANTOS, A; DUDA-DE-OLIVEIRA, D; ANGELIM, M. K; GERMANO, P. C; SANTOS, S. F; GUEDES, R. C. LArginine administration during rat brain development facilitates spreading depressionpropagation: evidence for a dose- and nutrition-dependent effect. **Nutrition Neuroscience**, v.12, n.2, p.73-80, 2009.

MARTINS-FERREIRA, H; DE OLIVEIRA, CASTRO, G; STRUCHINERC, J; RODRIGUES, P.S. Circling spreading depression in isolated chick retina. **Journal of Neurophysiology**, v.37, n.1, p.773-784, 1974.

MARTINS-FERREIRA, H; NEDERGAARD, M; NICHOLSON, C. Perspectives on spreading depression. **Brain Research Review**, v.32, n.1, p. 215-234, 2000.

MAYER, M. L; VYKLICKY, L. Concanavalin A selectively reduces desensitization of mammalian neuronal quisqualate receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, n.4, p.1411–1415, 1989.

MEANEY, M. J; SZYF, M. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. **Dialogues Clinic Neuroscience**, v.7, n.2, p.103–123, 2005.

MIURA, R. M; HUANG, H; WYLIE, J. J. Cortical spreading depression: An enigma. **European Physical Journal**, v.147, n.1, p.287-302, 2007.

MO, H; VAN DAMME, E. J. P; PEUMANS, W. J; GOLDSTEIN, I. J. Purification and characterization of a mannose-specific lectin from sallow (*Salix alba*) bulbs; **Achieves of Biochemistry and Biophysics**, v.306, n.2, p. 431-438, 1994.

MORGAN, B. L. G. Nutritional Requirements for Normative Development of the Brain and Behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.603, n.1, p.127-132, 1990.

MORGANE, P. J; BRONZINO, J. D; TONKISS, J; DIAZ-CINTRA, S; CINTRA, L; KEMPER, T; GALLER, J. R Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.17, n.1, p.91-128, 1993.

MORGANE, P. J; MILLER, M; KEMPER, T; STEIN, W; FORBES, W; HALL R.; BRONZINO, J.; KISSANE, J.; HAWRYLEWICZ, E.; RESNICK, O. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.2, n.3 p.137-230, 1978.

MORGANE, P. J; MOKLER, D. J; GALLER, J. R. Effects of protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.26, n.4, p.471- 483, 2002.

NASCIMENTO, G. F. G; LOCATELLI, J; FREITAS, P. C; SILVA, G. L. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, n.2, p.247-256, 2000.

NETTO, M; MARTINS-FERREIRA, H. Elicitation of spreading depression by rose bengal photodynamic action. **The Journal of Photochemistry and Photobiology**. v. 50, n.2, p.229–34, 1989.

PARTIN, K. M; PATNEAU, D. K; WINTERS, C. A., MAYER, M. L; BUONANNO, A. Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. **Neuron**, v.11, n.16, p.1069-1082, 1993.

PATERNAIN, A. V, RODRIGUEZ-MORENO, A, VILLARROEL, A; LERMA, J. Activation and desensitization properties of native and recombinant kainate receptors. **Neuropharmacology**, v.37, n. (10-11), p.1249–1259, 1998.

PEUMANS, W. J; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, n.2, p.347-352, 1995.

PEUMANS, W. J; ZHANG, W; BARRE, A; ASTOUL, C. A; BALINTI-KURTI, P. J; ROVIRA, P; ROUGÉ, P; MAY, G. D; VAN LEUVEN, F; TRUFFA-BACHI, P; VAN DAMME, E. J. M. Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta**, Berlin, v.221, n.6, p.546-554, 2000.

PROLL, J; PETZKE, J; EZEAGU, E.I; METGES, C.C. Low nutritional quality of unconventional tropical crop seeds in rats. **Journal of Nutrition**, v.128, n.11, p.2014-2022, 1998.

QU, W.S; WANG, Y.H; WANG, J.P; TANG, Y.X; ZHANG, Q; TIAN, D.S. Galectin-1 enhances astrocytic BDNF production and improves functional outcome in rats following ischemia. **Neurochemistry Research**, v.35, n.11, p.1716–24, 2010.

RATANAPO, S; NGAMJUNYAPORN, W; CHULAVATNATO, L, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. Syringae pv mori*. **Plant Science**, v.160, n.4, p.739-744, 2001.



READ, S. J; PARSONS, A. A. Sumatriptan modifies cortical free radical release during cortical spreading depression. A novel antimigraine action for sumatriptan? **Brain Research**, v.870, n. (1-2), p.44–53, 2000.

RICHTER, F; LEHMENKÜHLER, A. Cortical spreading depression (CSD): Ein neurophysiologisches Korrelat der Migräneaura. **Schmerz**, v.22, n. 5, p.544-546, 2008.

ROCHA-DE-MELO, A. P; CAVALCANTI, J. B; BARROS, A. S; GUEDES, R. C. A. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. **Nutritional Neuroscience**, v.9, n. (3-4), p.155-160, 2006.

ROCHA-DE-MELO, A. P; GUEDES, R. C. A. Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, n.5, p.663-669, 1997.

RODEL, H. G; PRAGER, G; STEFANSKI, V; VON HOLST, D; HUDSON, R. Separating maternal and litter-size effects on early postnatal growth in two species of altricial small mammals. **Physiology Behavior**, v.93, n. (4-5), p.826–834, 2008.

SAKAGUCHI, M; ARRUDA-CARVALHO. M; KANG, N. H; IMAIZUMI, Y, POIRIER, F; OKANO, H. Impaired spatial and contextual memory formation in galectin-1 deficient mice. **Molecular Brain**, v.4, n.33, p.1-10, 2001.

SAKAGUCHI, M; SHINGO, T; SHIMAZAKI, T; OKANO, H .J; SHIWA, M; ISHIBASH, I. S. A carbohydrate binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, n.18, p.7112–7, 2006.

SANTOS-MONTEIRO, J. S. **Nutrição, Privação Sensorial Específica e Plasticidade Cerebral**. Recife: UFPE, 2000. Tese de doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, 2002. 96 p.

SANTOS-MONTEIRO, J; TEODÓSIO, N. R; GUEDES, R. C. A.. Long-lasting effects of early environmental stimulation on cortical spreading depression in normal and early malnourished adult rats. **Nutritional Neuroscience**, v.3, n.1, p.29-40, 2000.

SASAKI, T; HIRABAYASHI, J, MANYA, H; KASAI, K; ENDO, T. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. **Glycobiology**, v.14, n.4, p.357–63, 2004.

SCHERER, W. J; UDIN, S. B. Concanavalin A reduces habituation in the tectum of the frog. **Brain Research**, v.667, n.2, p.209–15, 1994.

SHARON, N. Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. **Advances in experimental medicine and biology**, v.408, n.2, p.1–8, 1996.

SHARON, N; LIS, H. Lectins as Cell Recognition Molecules. **Science**, v.246, n.4927, p.227-234, 1989.

SHARON, N; LIS, H. **Lectins. Second Edition.** Dordresh/Netherlands. Kluwer Academic Publishers, 2003, 454p.

SIESJO, B. K; BENGTSSON, F. Calcium Fluxes, Calcium Antagonists, and Calcium-Related Pathology in Brain Ischemia, Hypoglycemia, and Spreading Depression: A Unifying Hypothesis. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.9, p.127–140, 1989.

TENÓRIO, A. S; MOURA, F. R; SILVA, L. P; GUEDES, R. C. Lasting facilitatory effects of neonatal vibrissae removal on the propagation of corticals preading depression: an electrophysiological study in well-nourished and early-malnourished adult rats. **Nutrition Neuroscience**, v.12, n.6, p.281-8, 2009.

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

VAN DAMME, E. J; PEUMANS, W. J; BARRE, A; ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.17, n.6, p.575–692, 1998.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**, v.3, n.2, p.97–130, 1993.

VARKI, A; MARTH, J. Oligosaccharides in vertebrate development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v.6, n.2, p.127–138, 1995.

VASCONCELOS, C. A. C; DE OLIVEIRA, J. A, DE OLIVEIRA, COSTA, T. L.A, GUEDES, R. C. Malnutrition and REM-sleep Deprivation Modulate in Rats the Impairment of Spreading Depression by a Single Subconvulsing Dose of Pilocarpine. **Nutritional Neuroscience**, v.7, n.3, p.163-170, 2004.

VASCONCELOS, S. M. M; LIMA, S. R; SOARES, P. M; ASSREUY, A. M. S; DE SOUSA, F. C. F; LOBATO, R. F. G; VASCONCELOS, G. S; SANTI-GADELHA, T; BEZERRA, E. H. S; CAVADA, B. S. Central action of *Araucaria angustifolia* seed lectin in mice. **Epilepsy & Behavior**, v.15, n.4, p.291-293, 2009.

WONG, L. A; MAYER, M. L. Differential modulation by cyclothiazide and concanavalin A of desensitization at native alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid- and kainate-preferring glutamate receptors. **Molecular Pharmacology**, v.44, n.3, p.504–510, 1993.

XIMENES-DA-SILVA, A.; GUEDES, R. C. A. Differential effect of changes in blood glucose levels on the velocity of propagation of cortical spreading depression in normal and malnourished rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.24, n.12, p.1277-1281, 1991.

XU, X; WEI, H; DONG, Z; CHEN, Y; TIAN, Z. The differential effects of low dose and high dose concanavalin A on cytokine profile and their importance in liver injury. **Inflammation**, v.55, n.4, p.144 52, 2006.

XUE, J; GAO, Y; HOORELBEKE, B; KAGIAMPAKIS, I; ZHAO, B; DEMELER, B; LIWANG, P.J. The Role of Individual Carbohydrate-Binding Sites in the Function of the Potent Anti-HIV Lectin Griffithsin. **Molecular Pharmaceutics**, v.9, n.9, p.2613–2625, 2012.

YOSHIOKA, H; YOSHIDA, A; OKANO, S; YAMAZOE, I; NISHIKI, T; KOTANI, H; SAWADA, T; KUSUNOKI, T. Effects of Early Undernutrition and Subsequent Nutritional Rehabilitation on Brain-Development.1: The Most Critical Period. **Developmental Brain Dysfunction**, v.8, n.1, p.66-72, 1995.

YUE, K. T; MACDONALD, J. F; PEKHLETSKI, R; HAMPSON, D.R. Differential effects of lectins on recombinant glutamate receptors. **European Journal of Pharmacology**. v.291, n.3, p.229-235, 1995.

YUKIJI, K; FUJIMOTO; DAVID, F; GREEN. Carbohydrate Recognition by the Antiviral Lectin Cyanovirin-N. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.134, n.48, p.19639–19651, 2012.

ZHANG, W; PENG, B; TIAN, F; QIN, W; QIAN, X. Facile Preparation of Well-Defined Hydrophilic Core–Shell Upconversion Nanoparticles for Selective Cell Membrane Glycan Labeling and Cancer Cell Imaging. **Analytical Chemistry**, v.86, n.1, p.482–489, 2014.

ZHOU, N.; GORDON, G. R. J.; FEIGHAN, D.; MACVICAR, B. A. Transient swelling, acidification, and mitochondrial depolarization occurs in neurons but not astrocytes during spreading depression. **Cerebral Cortex**, v.20, n.11, p. 2614-2624, 2010.

# APÊNDICES

Apêndice A-

Artigo submetido para a revista *European Journal of Pharmacology*, sob número EJP-39311 (Anexo A).

**Potential brain protective effect of the lectin from *Canavalia ensiformis*: an electrophysiological and microglia labeling analysis in the rat**



**Geórgia Sousa Ferreira Soares**, Cássia B Lima, Liliane C Cabral, Nadia Villacampa,  
Bernardo Castellano, Rubem C.A. Guedes\*

**Potential brain protective effect of the lectin from *Canavalia ensiformis*: an electrophysiological and microglia labeling analysis in the rat**

Geórgia de Sousa Ferreira **Soares**<sup>a</sup>, Cássia Borges **Lima**<sup>a</sup>, Liliane Cabral **Cavalcanti**<sup>a</sup>,  
Nadia **Villacampa**<sup>b</sup>, Bernardo **Castellano**<sup>b</sup>, Rubem Carlos Araújo **Guedes**<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife,  
Brazil*

<sup>b</sup>*Unit of Medical Histology, Autonomous University of Barcelona, 08193, Bellaterra,  
Spain*

\* Corresponding author:

Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife,  
Brazil.

E-mails: rguedes@ufpe.br ; guedes.rca@gmail.com.

Phone: +55-81-21268936

Fax: +55-81-21268473

**Abstract**

The lectin concanavalin A (ConA) is a carbohydrate-binding protein extracted from the leguminous *Canavalia ensiformis* with several biological activities, including the modulation of immunological and electrophysiological properties of the brain. Here we characterized, in the rat, the action of ConA on the brain excitability-dependent phenomenon known as cortical spreading depression (CSD), and on microglia immunolabeled with a polyclonal antibody against ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1). Rat pups (5–24 days old) were treated intraperitoneally with 1 mg/kg or 10 mg/kg ConA (groups L1 and L10, respectively), or with an equivalent volume of saline solution (group Sal), or no treatment (group Naïve). At 90–120 days of age, CSD was elicited in the frontal cortex with 2% KCl and recorded at two parietal points for 4 h. The velocity of propagation, amplitude, and duration of the negative potential change of the CSD wave were calculated. Fixative-perfused brain sections were immunolabeled with anti-Iba1 antibodies to quantify microglia. Systemic ConA treatment dose-dependently decreased the CSD propagation velocity ( $p < 0.05$ ), with similar amplitude and duration of the CSD negative slow potential shift. In an additional group, topical application of ConA to the cortical surface also reversibly reduced CSD propagation ( $p < 0.05$ ). Microglia immunolabeling was enhanced in the hemisphere experiencing CSD, and attenuated in rats treated with ConA. Results support the hypothesis that the lectin ConA impaired CSD propagation and reduced Iba1-labeling, highlighting the importance of lectin as molecules with potential brain protective action.

**Keywords:** lectin, ConA, brain electrophysiology, microglia



## Introduction

Lectins constitute a wide group of structurally diverse glycoproteins of non-immune origin, present in plants, animals, and fungi. The biosignaling properties of glycoproteins enable them to perform key roles in the brain development, mainly associated with neuroplasticity and synaptic modulation (Best et al., 2010; Kato, 2007; Matthies et al., 1999), and thus can be modulated by lectin coupling.

Concanavalin A (ConA) is one of the most studied lectins. It is a tetrameric molecule (Fig. 1) that is obtained from the seeds of *Canavalia ensiformis*, and was the first lectin to be isolated and have its three-dimensional structure characterized (Hardman and Ainsworth, 1972; Reeke et al., 1975). ConA can bind specifically to different membrane receptors containing mannose and glucose residues (Li et al., 2011), regulating several physiological events in the mammalian nervous system, such as neuroplasticity (Kirner et al., 2003), inhibitory effect on 5-HT transport (Ikegami et al., 1991) and sympathetic neurons (Boehm and Huck, 1998), and dopamine transporter desensitization (Huang et al., 2003). Concerning its immunological effect, ConA exerts dose-dependent immunomodulation, which depends on changes in the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines (Xu et al., 2006).

**Please insert Figure 1 about here**

Given the above facts, it is reasonable to suppose that lectins might modulate the electrophysiological properties of neurons, as well as events related to cell communication, differentiation, and proliferation. The lectin from *Araucaria angustifolia* reportedly has a protective effect against hyper-excitability in the

pentylentetrazole- and strychnine-induced seizure models (Vasconcelos et al., 2009). Therefore, we decided to investigate the effect of ConA on the excitability-related phenomenon known as cortical spreading depression (CSD; Leão, 1944). CSD has been associated with important human diseases, such as migraine (Rogawski, 2008), brain ischemia (Busija et al., 2008), and epilepsy (Guedes and Cavalheiro, 1997). The phenomenon was initially described by Leão (1944) as a reversible response of the cerebral cortex provoked by stimulation of the cortical tissue. This response is characterized by a marked diminution of the cortical electrical activity lasting 1–2 min. CSD is dependent on neuron-glia interactions and can be affected by several conditions, including pharmacological and nutritional manipulations (Amancio-dos-Santos et al., 2013; Rocha-de-Melo et al., 2006). Drugs or experimental conditions that facilitate or impair the brain's ability to trigger and propagate CSD might be helpful to understanding the electrophysiological processes dependent on brain excitability and related diseases (Leão, 1972; Guedes et al., 2009; Dreier, 2011). Using CSD as a neurophysiologic parameter and Iba1 immunolabeling as a tool to detect changes in microglia, we investigated in the rat the neural effects of treatment with ConA. Specifically, this work aimed to determine whether treatment with ConA during the suckling period would influence CSD propagation in adult animals. We tested two routes of administration: systemic (intraperitoneal), and topical (on the intact dura mater). We also examined how early administration of ConA affects microglia by analyzing Iba1 immunolabeled cells in the cortex and hippocampus of adult rats.

## **Materials and Methods**

### ***Animals***

Male Wistar rat pups (n=42) were handled in accordance with the norms of the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil (Approval Protocol nº 23076.031272/2010-53), which complies with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The animals were housed in polypropylene cages (51×35.5×18.5 cm) in a room with temperature maintained at 22±1°C with a 12:12-h light–dark cycle (lights on at 7:00 a.m.), and with free access to water and a lab chow diet with 23% protein (Purina do Brazil Ltd.).

### ***Experimental Groups and Systemic Lectin Treatment***

Four groups of animals were formed. The naïve group received no treatment (Nv group; n=11). The other three groups were treated intraperitoneally with 1 mg/kg/day lectin ConA (L1 group; n=11), 10 mg/kg/day ConA (L10 group; n=10), or an equivalent volume of saline solution (NaCl 0.9%; Sal group; n=10). Pure lectin ConA was purchased from Sigma (St. Louis, MO). Injections were applied daily from the 5<sup>th</sup> to the 24<sup>th</sup> postnatal day.

### ***Cortical Topical ConA Treatment***

In another group of adult rats (postnatal days 90–120; n=8), after a 1-h baseline CSD recording, lectin solution (1 mg/ml) was topically applied to the intact dura mater. Lectin application was performed three times during three consecutive, KCl-elicited CSD episodes, in order to treat the two circular cortical regions (3–4 mm diameter) where the recording electrodes were located. The lectin solution was applied during the last 10 min of the 20-min interval between two consecutive KCl stimulations. At the

end of each 10-min topical lectin application, the treated region was dried with a piece of cotton. After that, SD was elicited by KCl (CSD recording below).

After the effect of ConA had been documented, the topically treated region was flushed with saline and three subsequent CSD episodes were elicited and recorded to document the recovery of CSD features. CSD propagation velocities recorded after the topical application of lectin were compared with the mean values obtained from the same animals during the baseline period.

Topical application of the vehicle (saline) was completed immediately before lectin treatment in order to provide an additional control.

### ***CSD Recording***

In all groups, CSD was recorded at adult age (postnatal days 90–120) for a 4-h period. During the recording session, rectal temperature was continuously monitored and maintained at  $37\pm1^{\circ}\text{C}$  with a heating blanket. Under anesthesia (1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose, intraperitoneal), three trephine holes (2–3 mm diameter) were drilled on the right side of the skull. In the first hole, on the frontal bone, CSD was triggered at 20-min intervals by applying a cotton ball (1–2 mm diameter) soaked in 2% KCl solution for 1 min. The slow potential change, typical of the propagating CSD wave, was recorded at the two parietal points on the cortical surface using a pair of Ag/AgCl agar-Ringer electrodes separated by a fixed distance for each pair (4–5.5 mm for different pairs). These electrodes are plastic conic pipettes (5 cm length, 0.5 mm tip inner diameter) filled with Ringer solution and solidified with the addition of 0.5% agar, into which a chlorided silver wire was inserted. A third electrode of the same type was placed on the nasal bones and used as a common reference. For all CSD episodes, we

calculated the amplitude and duration of the negative slow potential shifts of the CSD waves, as previously described (Lima et al., 2013).

### ***Body Weights***

Body weights were measured at postnatal days 7, 14, 21, 30, 60, and 90. Brains were weighed on the day of CSD recording.

### ***Iba1 Immunolabeling of Microglia***

Sixteen rats from the four experimental groups (n=4 from each group) were perfused with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4. After being immersed in the fixative for 4 h, the perfused brains were transferred to a 30% (w/v) sucrose solution for cryoprotection. Longitudinal serial sections (30- $\mu$ m thickness) were obtained at -20°C with a cryoslicer (Leica-1850). Sections were immunolabeled with a polyclonal antibody against the ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) to detect microglia (anti-Iba1, #019-19741; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan). Free-floating sections were subjected to endogenous peroxidase blocking (2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 70% methanol for 10 min); then, sections were incubated for 1 h in blocking buffer solution (BB) containing 0.05 M Tris-buffered saline (TBS), pH 7.4; 10% fetal calf serum; 3% bovine serum albumin; and 1% Triton X-100. Next, sections were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-Iba1 (1:1,500 diluted in BB solution). After three washes with TBS plus 1% Triton, sections were incubated at room temperature for 1 h with biotinylated anti-rabbit (1:500) secondary antibodies. Sections were then rinsed in TBS plus 1% Triton and incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (1:500). The peroxidase reaction was visualized by incubating the sections in Tris buffer containing 0.5 mg/ml 3,

3'-diaminobenzidine (DAB) and 0.33  $\mu\text{l/ml}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Finally, sections were mounted, dehydrated in graded alcohols and xylene, and coverslipped in Entellan®.

Densitometric analysis of the cerebral cortex was performed bilaterally for each animal. The immunolabeling pattern of the right hemisphere, which suffered repeated episodes of CSD, was compared with that of the left hemisphere (control). In each section, we analyzed photomicrographs of four fields within the parietal cortex and three fields within the hippocampal CA1 molecular layer region using Image J software (National Institutes of Health, USA; version 1.46r). A Leica-DMLS microscope coupled to a Samsung high-level color camera (model SHC-410NAD) was used to obtain digital images from brain sections. Images from the parietal cortex immunoreacted for Iba1 were obtained with a 20 $\times$  microscope objective. Care was taken to obtain the digital images using the same light intensity conditions. We analyzed the percentage of the area occupied by Iba1-labeled cells, as well as their total immunoreactivity expressed in arbitrary units.

### **Statistics**

Body and brain weights, as well as CSD propagation rates, amplitudes, and durations, were compared between groups using one-way ANOVA followed by a *post hoc* (Holm–Sidak) test when indicated. Quantitative immunohistochemical analysis was performed using two-way ANOVA including treatment (Saline, naïve, L1, and L10) and hemisphere (control and CSD hemisphere) as factors, followed by a *post hoc* (Holm–Sidak) test when indicated. The effect of topical lectin application on the velocity of CSD propagation was analyzed using the paired *t*-test comparing CSD velocities before and after treatment in the same animal. Differences were considered

significant when  $P \leq 0.05$ . All values are presented in the text as mean  $\pm$  standard deviations. The Sigmastat® version 3.10 statistical software was used for all analysis.

## Results

### *Body and Brain Weights*

Saline-treated and naïve animals displayed similar body weights. At the 21st postnatal day, significant weight loss was observed in animals subjected to L10 (but not L1) treatment, compared with the saline and naïve controls (Fig. 2A,B). Lectin treatment did not affect the brain weights of adult animals (Fig. 2C).

**Please insert Figure 2 about here**

### *Early Systemic Lectin Treatment and CSD Propagation*

In all groups, the stimulation of a circular area (2–3 mm diameter) of the frontal cortical surface with 2% KCl for 1 min consistently elicited one CSD episode, which propagated and was recorded by the two recording electrodes (marked as 1 and 2 in Fig. 3C). We observed that in all recordings the CSD slow potential change returned to the baseline value after 1–2 min (Fig. 3A). In the adult rat (90–120 days old), early systemic treatment with 1 mg/kg and 10 mg/kg lectin resulted in longer latencies for a CSD wave to cross the interelectrode distance compared with the saline and naïve conditions (Fig. 3A, dashed lines). For each group, the CSD velocity of propagation was calculated as a mean of 10 to 12 consecutive CSD episodes elicited at 20-min intervals in each animal. The mean CSD velocities are shown in Figure 3B.

Early systemic lectin treatment resulted in a statistically significant decrease of CSD velocity compared with the saline-treated group, which was similar to the naïve

group. At 90–120 postnatal days, CSD velocities (mean  $\pm$  standard deviation, in mm/min) were: Sal,  $3.41 \pm 0.10$ ; Nv,  $3.40 \pm 0.09$ ; L1,  $3.12 \pm 0.14$ ; and L10,  $2.82 \pm 0.18$ . CSD velocity was reduced in a dose-dependent manner in the lectin-treated groups ( $p < 0.05$ ).

**Please insert Figure 3 about here**

### ***Duration and Amplitude of CSD Waves***

Table 1 lists the durations and amplitudes of CSD waves of naïve, saline-treated, and lectin-treated (L1 and L10) groups measured at the two recording points (point 1 and point 2) in the parietal cortex. ANOVA revealed no significant between-group or between-point differences in duration or amplitude, indicating that there were no changes in the profile of the propagating wave. The mean amplitudes (in mV) were: Nv,  $10.53 \pm 2.89$ ; Sal,  $10.89 \pm 3.74$ ; L1,  $10.10 \pm 3.07$ ; and L10,  $9.11 \pm 3.30$  for point 1; and Nv,  $10.01 \pm 2.98$ ; Sal,  $10.99 \pm 3.40$ ; L1,  $11.75 \pm 3.72$ ; and L10,  $11.79 \pm 2.52$  for point 2. The durations (in s) for the controls Nv and Sal, and for L1 and L10 groups were: Nv,  $57.52 \pm 8.86$ ; Sal,  $57.36 \pm 6.68$ ; L1,  $57.27 \pm 6.31$ ; and L10,  $57.86 \pm 5.26$  for point 1; and Nv,  $59.06 \pm 6.18$ ; Sal,  $58.59 \pm 6.89$ ; L1,  $59.57 \pm 7.64$ ; and L10,  $57.59 \pm 6.54$  for point 2.

**Please insert Table 1 about here**

### ***Topical Cortical Lectin Treatment***

Figure 4 shows the effect of topical cortical treatment of adult rats with ConA (1 mg/mL). Initially, we elicited three CSD episodes at 20-min intervals and determined that the baseline velocity of CSD propagation was  $3.31 \pm 0.08$  mm/min. This was



followed by three CSD episodes under the action of ConA applied topically to recording point 1; the mean CSD velocity fell to  $2.79 \pm 0.19$  mm/min ( $p < 0.05$ ). Finally, we removed the lectin and recorded three more CSD episodes (recovery period), during which the CSD velocity increased to  $3.21 \pm 0.07$  ( $p < 0.05$ ). After documenting the recovery from the effect of ConA application at recording point 1, we applied ConA to recording point 2; the CSD velocity decreased to  $2.88 \pm 0.28$  mm/min ( $p < 0.05$ ). After removing ConA from point 2, we elicited three more CSD episodes (recovery period), during which the CSD velocity increased to  $3.17 \pm 0.23$  mm/min ( $p < 0.05$ ).

**Please insert Figure 4 about here**

#### ***Iba1 Immunohistochemistry and Densitometric Analysis***

Figure 5 depicts representative photomicrographs of specific immunolabeling of the calcium-binding protein Iba1 in the microglial cells of the parietal cortex (n=4) and the CA1 region of the hippocampus (n=4) from adult rats treated systemically early in life with no injection (naïve group), saline solution, and ConA (1 mg/kg, L1; or 10 mg/kg, L10). Quantitative analysis of both hemispheres revealed an interhemispheric difference: the hemisphere in which CSD was elicited was more reactive than the contralateral hemisphere (Fig. 6). The same interhemispheric difference was observed in the hippocampus, although it was smaller than the difference observed in the neocortex. Compared with the controls, animals treated with 10 mg/ml ConA presented with a lower percentage of labeled area and lower immunoreactivity (expressed in arbitrary units) in both the parietal cortex and the hippocampal CA1 region.

**Please insert Figures 5 and 6 about here**

## Discussion

We electrophysiologically identified *in vivo* neural activity changes produced in rats by applying the lectin ConA during a critical period of nervous system development. We also immunohistochemically demonstrated changes in Iba1-containing microglia. Our findings indicate that ConA applied during development impaired CSD propagation, as indicated by reduced CSD velocities and reduced Iba1 immunolabeling of microglia. We suggest that intraperitoneal ConA injections early in development led to CNS alterations that are involved (at least in part) in our described impairment of CSD propagation and microglia reaction.

Lectin treatment was associated with a body weight reduction at 21 postnatal days that recovered from 30 days onwards. No intergroup weight difference was detected when the rats reached adulthood. In the rat, the suckling period is a critical phase for brain structural and functional maturation. This period is characterized by the rapid execution of brain developmental processes, including gliogenesis, neuronal migration, and myelination (Rocha-de-Melo et al., 2006). It represents the synaptogenic period, equivalent to the human synaptogenic stage during the third trimester of prenatal development (Dobbing, 1968; Morgane et al., 1978, 1993). Changes in the Iba1 immunolabeling pattern observed in the present study indicate that the lectin ConA might have altered glial development, despite the absence of brain weight changes.

The glial cell appears to participate in the resistance that the cortical tissue normally presents to CSD propagation (Largo et al., 1997). Cortical resistance to CSD can be reduced or augmented through experimental manipulations that result in higher or lower propagation velocities, respectively (Guedes, 2011; Rocha-de-Melo et al., 2006). Determining the velocity of CSD propagation under CSD-facilitating or CSD-

impairing conditions is a simple and useful method for estimating brain CSD susceptibility and understanding the electrophysiological processes that underlie brain excitability changes and related diseases (e.g., epilepsy) (Leão, 1972; Guedes and Cavalheiro, 1997; Guedes et al., 2009). The present data implicate ConA treatment as a CSD-impairing condition. Intraperitoneal ConA treatment is the assumed cause of the here-described diminution of CSD propagation and microglial changes. This causal link cannot be attributed to injection stress because the saline-injected control groups did not present with those alterations. In addition, the treatment-naïve group, which did not undergo injection, presented with CSD and microglial features similar to the saline-treated controls. Moreover, one additional group that was subjected to CSD recording during topical cortical ConA application displayed changes in CSD propagation velocity comparable to the groups that were systemically treated with ConA. Therefore, it is reasonable to hypothesize that exposure to ConA led to cerebral alterations that are involved, respectively, in the impairment of CSD propagation and the reduced microglial reaction.

The mechanisms involved in the effects of ConA on the CSD are not yet fully understood. One possibility that deserves specific comment is the modulation of one or more neurotransmitter systems, as suggested regarding lectins from *Araucaria angustifolia* (Vasconcelos et al., 2009) and *Canavalia brasiliensis* (Jacques et al., 2013). The modulating properties of ConA in the carbohydrates of cell membranes may have participated in the deceleration of CSD in both systemically and topically ConA-treated animals. ConA is able to modulate glutamatergic receptors in presynaptic neurons (Fay and Bowie, 2006; Yue et al., 1995), and can also bind to NMDA-type (Meng et al, 2005; Pahl, 1999), AMPA-type (Kudus et al, 2000; Uemura and Gandhi, 2001), and Kainate-type (Grütz, 2005; Meng et al, 2005; Nishikage et al, 1999) glutamatergic

receptors. A similar lectin-glutamate system interaction has been recently reported for a lectin from *Canavalia brasiliensis* that protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity (Jacques et al., 2013). Interestingly, the modulation of glutamatergic receptors (Guedes et al, 1988; Lima et al., 2013; Marrannes et al., 1988) and glial activity (Larrosa et al., 2006) can influence the CSD phenomenon.

Concerning Iba1-containing microglia, we observed a decrease in immunoreactivity associated with systemic lectin administration. Iba1 protein is restricted to microglia both in vitro and in vivo, and is involved in regulating microglial function (especially in activated cells) in response to various environmental stimuli; Iba1 is upregulated in nerve injury, CNS ischemia, and several other brain diseases (Ito et al., 1998; Pérez-Álvarez et al., 2012). As recently reported by others (Pérez-Álvarez et al., 2012) regarding the effects of estradiol on the microglia, we observed that the attenuating effects of ConA on Iba1 immunolabeling were more pronounced in the neocortex than in the hippocampus, which suggests an inter-regional difference in terms of microglial sensitivity. In addition, comparing Iba1 immunoreactivity between hemispheres revealed higher levels in the hemisphere that was subjected to CSD, which suggests modulation of the microglial reaction by CSD. Again, this effect was more intense in the cortex than in the hippocampus, as expected. Recently, we verified that microglia in the rat neocortex is dosedependently activated by systemically treating the animals with a harmful dose of monosodium glutamate (Lima et al, 2013). In that study, in addition to enhancing microglial labeling, monosodium glutamate accelerated CSD. In the present study, we observed an opposite effect (i.e., ConA decreased microglial activation and decelerated CSD), which may suggest neuroprotection. In agreement with this hypothesis, microglial activation is reduced as part of the anti-inflammatory action of docosahexaenoic acid after focal ischemia (Chang et al., 2013). Interestingly,

lower doses of ConA are associated with the release of the anti-inflammatory cytokines IL-6 and IL-10 (Xu et al., 2006).

The possible relevance of the present findings to human health deserves some comment in relation to the protective action of lectins via the glutamatergic system (Jacques et al., 2013). Glutamate is one of the principal mediators in the CNS; approximately 80% of all synapses are glutamatergic (Russi et al., 2012). Excessive glutamatergic activation can result in excitotoxicity, with subsequent neuronal cell death, and both processes can be involved in several neurological diseases. In this context, molecules that impede the excessive activation of glutamatergic receptors, or—even better—prevent glutamate release can become important tools to prevent pathological neuronal cell death; this seems to be the case regarding lectins (Jacques et al., 2013). Our findings stress the importance of continuing to search for the molecular mechanisms underlying the effects of ConA on the brain's electrophysiological and microglial properties. It would also be pertinent to investigate the effects of other carbohydrate-binding lectins on CSD and microglial cell features.

In summary, this study documents a novel action of ConA on the CSD phenomenon and Iba1-containing microglia. The results allow us to draw the following four primary conclusions: first, systemic treatment with ConA dose-dependently impairs CSD propagation; second, topical application of ConA also reversibly decelerates CSD; third, the neocortical and hippocampal immunoreactivity of the Iba1-containing microglia are differentially diminished by ConA (neocortical immunoreactivity reduction > hippocampal reduction); and fourth, the cerebral hemisphere that suffers CSD presents with higher immunoreactivity than the contralateral (CSD free) hemisphere, suggesting a CSD-activating action on the microglia. These findings advance the understanding of the mechanisms of cerebral

electrophysiological and histological alterations induced by lectins, and therefore might help to develop future strategies based on newly discovered molecules with beneficial action in opposition to brain diseases.

### **Acknowledgements**

The authors thank the following Brazilian agencies for financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PDSE 1648-12-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Projeto Universal (CNPq 014/2010- 474126/2010-2), Instituto Brasileiro de Neurociências (IBN-Net/Finep no. 4191), and Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INCT nº 573604/2008-8). R.C.A. Guedes is a Research Fellow from CNPq (nº 301190/2010-0).

## References

- Amancio-dos-Santos, A., Maia, L.M.S.S., Germano, P.C.P.S., Negrao, Y.D.S., Guedes, R.C.A., 2013. Tianeptine facilitates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *Eur. J. Pharmacol.* 706, 70–75.
- Best, T., Kemps, E., Bryan, J., 2010. Saccharide effects on cognition and well-being in middleaged adults: a randomized controlled trial. *Dev. Neuropsychol.* 35, 66–80.
- Bø, L., Vedeler, C.A., Nyland, H.I., Trapp, B.D., Mørk, S.J., 2003. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 723–732.
- Boehm, S., Huck, S., 1998. Presynaptic inhibition by concavalin A: are alphalatrotoxin receptors involved in action potential-dependent transmitter release? *J. Neurochem.* 71, 2421–2430.
- Busija, D.W., Bari, F., Domoki, F., Horiguchi, T., Shimizu, K., 2008. Mechanisms involved in the cerebrovascular dilator effects of cortical spreading depression. *Prog. Neurobiol.* 86, 379–395.
- Chang, C.Y., Kuan, Y.H., Li, J.R., Chen, W.Y., Ou, Y.C., Pan, H.C., Liao, S.L., Raung, S.L., Chang, C.J., Chen, C.J., 2013. Docosahexaenoic acid reduces cellular inflammatory response following permanent focal cerebral ischemia in rats. *J. Nutr. Biochem.* 24, 2127–2137.
- Dobbing, J., 1968. Vulnerable periods in developing brain, in: Davison, A.N., Dobbing, J. (Eds.), *Applied Neurochemistry*. Blackwell, Oxford, pp. 287–316.
- Dreier, J.P., 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat. Med.* 17, 439–447.

- Fay, A.M., Bowie, D., 2006. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. *J. Physiol.* 572, 201–213.
- Grütz, G., 2005. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* 77, 3–15.
- Guedes, R.C.A., 2011. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition, in: Preedy, V.R., Watson, R.R., Martin, C.R. (Eds.), *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. Springer, London, pp. 2343–2355.
- Guedes, R.C.A., Andrade, A.F.D., Cavalheiro, E.A., 1988. Excitatory amino acids and cortical spreading depression, in: Cavalheiro, E.A., Lehman, J., Turski, L. (Eds.), *Frontiers in excitatory amino acid research*. Alan R. Liss. Inc., New York, pp. 667–670.
- Guedes, R.C.A., Cavalheiro, E.A., 1997. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epilepsy Res.* 27, 33–40.
- Guedes, R.C.A., Oliveira, J.A., Amancio-dos-Santos, A., Garcia-Cairasco, N., 2009. Sexual differentiation of cortical spreading depression propagation after acute and kindled audiogenic seizures in the Wistar audiogenic rat (WAR). *Epilepsy Res.* 83, 207–214.
- Hardman, K.D., Ainsworth, C.F., 1972. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry.* 11, 4910–4919.
- Huang, C.L., Huang, N.K., Shyue, S.K., Chern, Y., 2003. Hydrogen peroxide induces loss of dopamine transporter activity: a calcium-dependent oxidative mechanism. *J. Neurochem.* 86, 1247–1259.
- Humphrey, W., Dalke, A.; Schulten, K., 1996. "VMD - Visual Molecular Dynamics". *J. Molec. Graphics.* 14, 33–38.



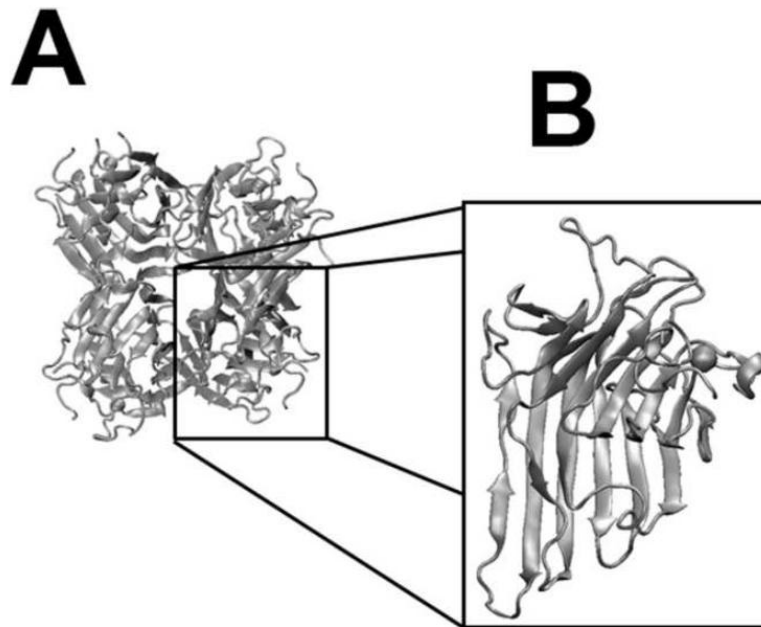
- Ikegami, Y., Nishio, H., Fukuda, T., Nakata, Y., Segawa, T., 1991. Effect of concanavalin-A on intracellular calcium-concentration in single blood-platelets. *Jpn J Pharmacol.* 57, 233–241.
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., Kohsaka, S., 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* 57, 1–9.
- Jacques, A.V., Rieger, D.K., Maestri, M., Lopes, M.W., Peres, T.V., Gonçalves, F.M., Pedro, D.Z., Tasca, C.I., López, M.G., Egea, J., Nascimento, K.S., Cavada, B.S., Leal, R.B., 2013.
- Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. *Neurochem. Int.* 62, 836–842.
- Kato, K., 2007. Glycobiological approach to understanding neural plasticity. *Trends Glycosci. Glyc.* 19, 99–112.
- Kirner, A., Deutsch, S., Weiler, E., Polak, E.H., Apfelbach, R., 2003. Concanavalin A application to the olfactory epithelium reveals different sensory neuron populations for the odour pair D- and L-carvone. *Behav. Brain. Res.* 138, 201–206.
- Kuddus, R.H., Nalesnik, M.A., Subbotin, V.M., Rao, A.S., Gandhi, C.R., 2000. Enhanced synthesis and reduced metabolism of endothelin-1 (ET-1) by hepatocytes – an important mechanism of increased endogenous levels of ET-1 in liver cirrhosis. *J. Hepatol.* 33, 725–32.
- Largo, C., Ibarz, J.M., Herreras, O., 1997. Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ. *J. Neurophysiol.* 78, 295–307.

- Larrosa, B., Pastor, J., López-Aguado, L., Herreras, O., 2006. A role for glutamate and glia in the oscillations preceding spreading depression. *Neurosci.* 141, 1057–1068.
- Leão, A.A.P., 1944. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 7, 359–90.
- Leão, A.A.P., 1972. Spreading depression, in: Purpura, D.P., Penry, K., Tower, D.B., Woodbury, D.M., Walter, R.D. (Eds.). *Experimental Models of Epilepsy*. Raven Press, New York, pp. 173–195.
- Li, W., Yu, J., Xu, H., Bao, J., 2011. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 282–286.
- Lima, C.B., Soares, G.S.F., Vitor, S.M., Castellano, B., Andrade-da-Costa, B.L.S., Guedes, R.C.A., 2013. Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex. *Life Sci.* 93, 388–392.
- Marrannes, R., Willems, R., De Prins, E., Wauquier, A., 1988. Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res.* 457, 226–240.
- Matthies Jr, H., Kretlow, J., Matthies, H., Smalla, K.H., Staak, S., Krug, M., 1999. Glycosylation of proteins during a critical time window is necessary for the maintenance of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region. *Neurosci.* 91, 75–183.
- Meng, Y., Kang, S., So, J., Reierstad, S., Fishman, D.A., 2005. Translocation of Fas by LPA prevents ovarian cancer cells from anti-Fas-induced apoptosis. *Gynecol. Oncol.* 96, 462–469.

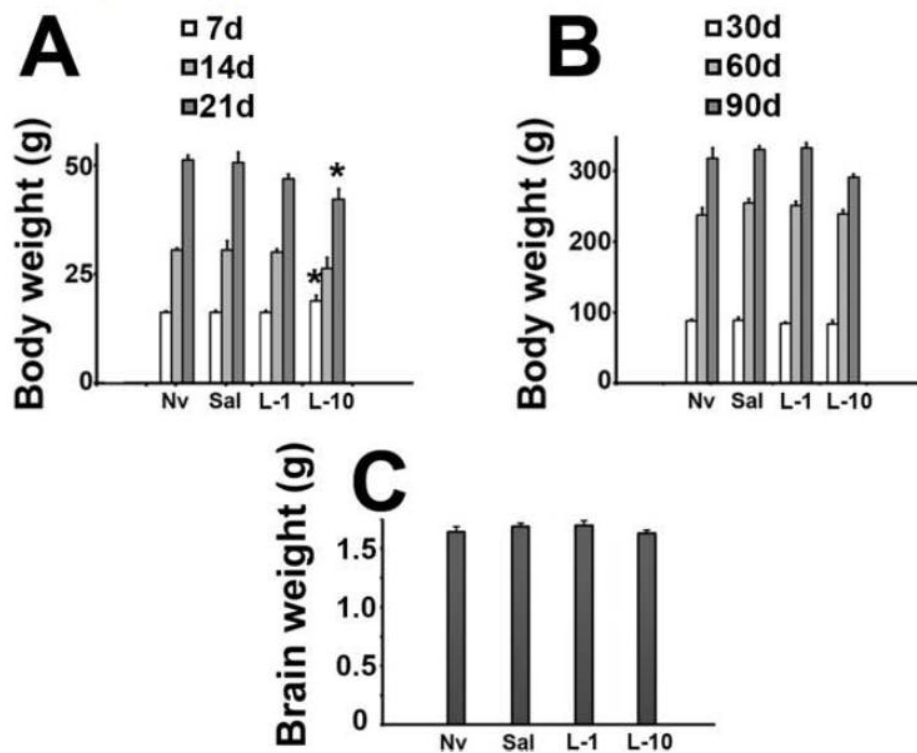
- Morgane, P.J., Austin-LaFrance, R.J., Bronzino, J., Tonkiss, J., Diaz-Cintra, S., Cintra, L., Kemper, T., Galler, J.R., 1993. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17, 91–128.
- Morgane, P.J., Miller, M., Kemper, T., Stern, W., Forbes, W., Hall, R., Bronzino, J., Kissane, J., Hawlyrewicz, E., Resnick, O., 1978. The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2, 137–230.
- Nishikage, T., Seki, S., Toyabe, S., Abo, T., Kagata, Y., Iwai, T., Hiraide, H., 1999. Inhibition of concanavalin A-induced hepatic injury of mice by bacterial lipopolysaccharide via the induction of IL-6 and the subsequent reduction of IL-4: the cytokine milieu of concanavalin A hepatitis. *J. Hepatol.* 31, 18–26.
- Pahl, H.L., 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 18, 6853–6866.
- Pérez-Álvarez, M.J., Maza Mdel, C., Anton, M., Ordoñez, L., Wandosell, F., 2012. Post ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia. *J. Neuroinflammation.* 9, 157–170.
- Reeke, G.N., Becker, J.W., Edelman, G.R., 1975. The covalent and three dimensional structure of concanavalin A. IV. Atomic coordinates, hydrogen bonding, and quaternary structure. *J. Biol. Chem.* 250, 1525–1547.
- Rocha-de-Melo, A.P., Cavalcanti, J.B., Barros, A.M.S., Guedes, R.C.A., 2006. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr. Neurosci.* 9, 155–160.
- Rogawski, M.A., 2008. Common pathophysiologic mechanisms in migraine and epilepsy. *Arch. Neurol.* 65, 709–714.

- Russi, M.A., Vandresen-Filho, S., Rieger, D.K., Costa, A.P., Lopes, M.W., Cunha, R.M., Teixeira, E.H., Nascimento, K.S., Cavada, B.S., Tasca, C.I., Leal, R.B., 2012. ConBr, a Lectin from *Canavalia brasiliensis* Seeds, Protects Against Quinolinic Acid-Induced Seizures in Mice. *Neurochem Res.* 37, 288-297.
- Uemura, T., Gandhi, C.R., 2001. Inhibition of DNA synthesis in cultured hepatocytes by endotoxin-conditioned medium of activated stellate cells is transforming growth factor beta and nitric oxide-independent. *Br. J. Pharmacol.* 133, 1125–1133.
- Vasconcelos, S.M., Lima, S.R., Soares, P.M., Assreuy, A.M., de Sousa, F.C., Lobato Rde, F., Vasconcelos, G.S., Santi-Gadelha, T., Bezerra, E.H., Cavada, B.S., Patrocínio, M.C., 2009. Central action of *Araucaria angustifolia* seed lectin in mice. *Epilepsy Behav.* 15, 291-293.
- Xu, X., Wei, H., Dong, Z., Chen, Y., Tian, Z., 2006. The differential effects of low dose and high dose concanavalin A on cytokine profile and their importance in liver injury. *Inflamm.* 55, 144–152.
- Yue, K.T., MacDonald, J.F., Pekhletski, R., Hampson, D.R., 1995. Differential effects of lectins on recombinant glutamate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 291, 229–235.

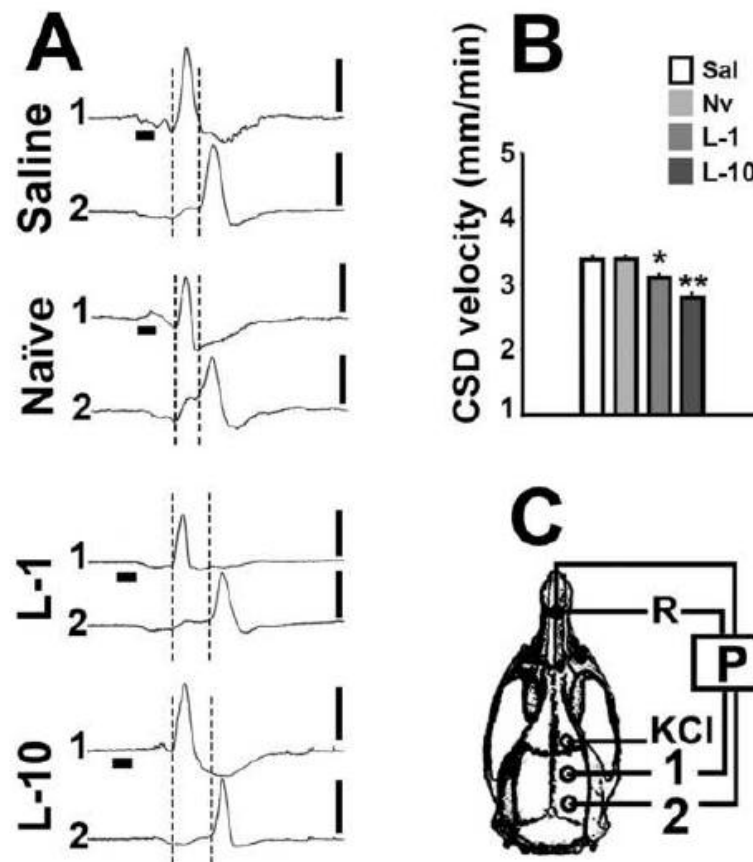
## Figure Legends



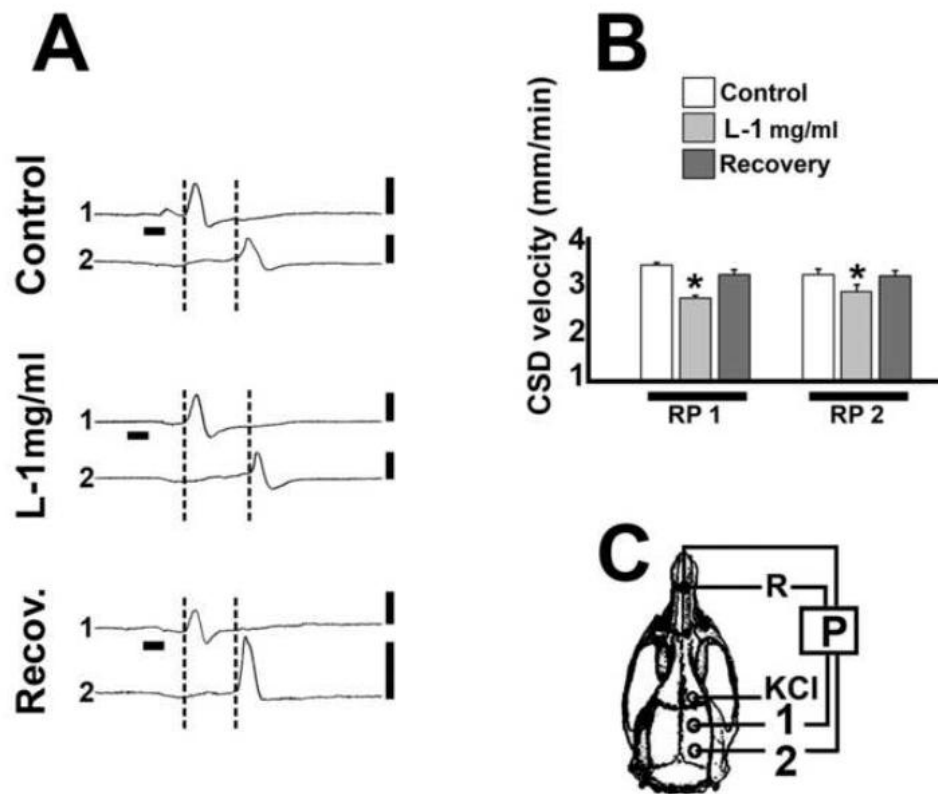
**Fig. 1.** (A) The ConA tetramer: the quaternary structure of ConA is composed of four monomers. (B) A ConA monomer. PDB file number 3CNA (Hardman and Ainsworth, 1972). The structures were built using Visual Molecular Dynamics (VMD) software (Humphrey et al., 1996).



**Fig. 2.** Body weights of young (postnatal day 7–21; A) and adult (postnatal day 30–90; B) rats, and brain weights at the 90–120th postnatal day (C). Rats were subjected to intraperitoneal injection as pups during the suckling period. Nv, naïve (not treated at all); Sal, intraperitoneal saline injection; L1, 1 mg/kg ConA; and L10, 10 mg/kg ConA. Data are mean  $\pm$  S.E.M. # indicates a significant difference in the L10 group when compared with the control groups (ANOVA plus Holm-Sidak-test;  $P < 0.05$ ).

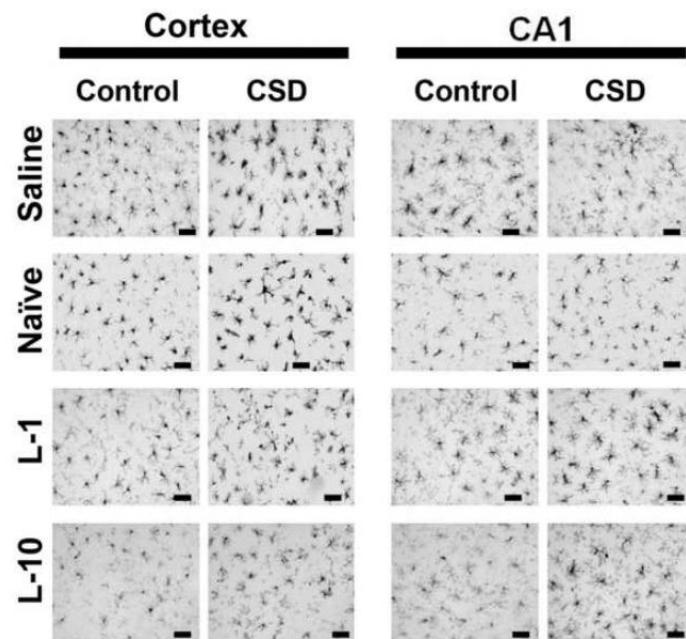


**Fig. 3.** Slow potential change (P) recordings of CSD (A) in four adult rats subjected to intraperitoneal injection as pups during the suckling period. Nv, naïve (not treated at all); Sal, intraperitoneal saline injection; L1, 1 mg/kg ConA; and L10, 10 mg/kg ConA. (B) The CSD velocities for all groups. \* $p < 0.05$  compared with the Sal and Nv controls. \*\* $p < 0.05$  compared with the other three groups. (C) Traces 1 and 2 were taken at recording positions near and remote from the stimulation site, respectively. R indicates the common reference electrode. CSD was chemically elicited by applying 2% KCl to the frontal cortex for 1 min. The horizontal bars under the 1-traces indicate the stimulation period (1 min). The vertical bars correspond to 10 mV (negative upward).

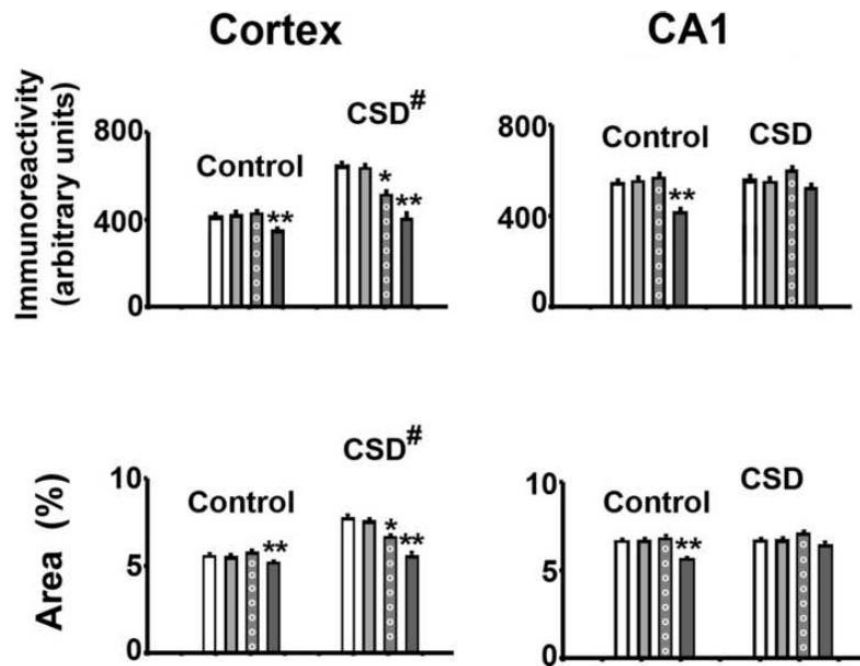


**Fig. 4.** Topical cortical application of 1 mg/ml ConA. (A) Slow potential change (P) recordings of CSD in a normal adult rat demonstrate the effects of topical application of a ConA solution (1 mg/ml in saline; L1). The horizontal bars under the 1-traces indicate the stimulation period (1 min). The vertical bars correspond to 10 mV (negative upward). The control and recovery traces were recorded, respectively, 30 min before L1 application and 20 min after L1 removal. (B) The mean  $\pm$  S.E.M. CSD velocities in the control, L1, and recovery conditions ( $n=8$ ). RP1 and RP2 refer to recording points 1 and 2, respectively. \*  $p<0.05$  compared with the control and recovery values; paired  $t$ -test. (C) Traces 1 and 2 in panel A were taken at the recording positions near and remote from the stimulation site, respectively. R indicates the common reference electrode.





**Fig. 5.** Representative grayscale digital images of Iba1-immunolabeled microglia in coronal sections through the neocortex and the hippocampal CA1 region of four adult rats subjected to different intraperitoneal injections as pups during the suckling period. Naïve, no injection; Saline, intraperitoneal saline injection; L-1, 1 mg/kg ConA; and L-10, 10 mg/kg ConA. CSD, the brain hemisphere in which CSD was elicited. Control, the contralateral hemisphere, in which CSD was not elicited. Scale bar, 20  $\mu$ m.



**Fig. 6.** Quantitative measures of immunoreactivity (expressed as arbitrary units) and percent area occupied by the Iba1-labeled microglia in the neocortex and the hippocampal CA1 region of adult rats subjected to intraperitoneal injection as pups during the suckling period (n=4 per treatment group): Naïve, no intraperitoneal injection (light gray bars); Saline, intraperitoneal saline injection (white bars); L1, 1 mg/kg ConA (white circle bars), or L10, 10 mg/kg ConA (dark gray bars). The CSD values refer to the brain hemisphere in which CSD was elicited, while Control values refer to the contralateral hemisphere, in which CSD was not elicited. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. \* $p$ <0.05 compared with the saline and naïve controls. \*\* $p$ <0.05 compared with the other three groups. # indicates a significant difference in the CSD hemisphere compared with the control hemisphere.

**Table 1.** Amplitudes and durations of the negative slow potential shifts of CSD in rats treated with 1 mg/kg (L1) and 10 mg/kg ConA lectin (L10). They were compared with control groups treated with saline, or without any treatment (naïve). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. The number of rats per group are in parentheses. No significant differences were observed in all groups.

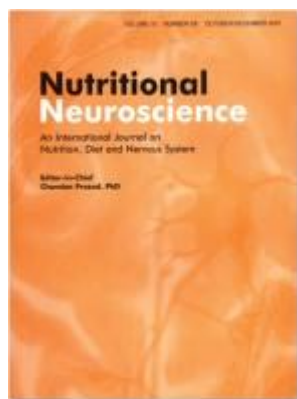
| Groups (N) | CSD amplitude (mV) |                  | CSD duration (s) |                  |
|------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
|            | Point 1            | Point 2          | Point 1          | Point 2          |
| Naïve (10) | 10.53 $\pm$ 2.89   | 10.01 $\pm$ 2.98 | 57.52 $\pm$ 8.86 | 59.06 $\pm$ 6.18 |
| Saline (8) | 10.89 $\pm$ 3.74   | 10.99 $\pm$ 3.40 | 57.36 $\pm$ 6.68 | 58.59 $\pm$ 6.89 |
| Lec-1 (9)  | 10.10 $\pm$ 3.07   | 11.75 $\pm$ 3.72 | 57.27 $\pm$ 6.31 | 59.57 $\pm$ 7.64 |
| Lec-10 (8) | 9.11 $\pm$ 3.30    | 11.79 $\pm$ 2.52 | 57.86 $\pm$ 5.26 | 57.59 $\pm$ 6.54 |

## **APÊNDICE-B**

Apêndice B-

Artigo submetido para a revista *Nutritional Neuroscience*, sob número NNS-S-14-00009 (Anexo B).

**Brain effects of the lectin from *Canavalia ensiformis* in adult rats previously suckled in favorable and unfavorable conditions: a spreading depression- and microglia immunolabeling study**



**Geórgia de Sousa Ferreira Soares**, Cássia Borges Lima, Liliane Cabral Cavalcanti, Bernardo Castellano, Rubem Carlos Araújo Guedes\*

**Title:** Brain effects of the lectin from *Canavalia ensiformis* in adult rats previously suckled in favorable and unfavorable conditions: a spreading depression- and microglia immunolabeling study

**Authors:** Geórgia de Sousa Ferreira Soares<sup>a</sup>, Cássia Borges Lima<sup>a</sup>, Liliane Cabral Cavalcanti<sup>a</sup>, Bernardo Castellano<sup>b</sup>, Rubem Carlos Araújo Guedes<sup>a\*</sup>

**Affiliation:** <sup>a</sup>Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife, Brazil

<sup>b</sup>Unit of Medical Histology, Autonomous University of Barcelona, 08193, Bellaterra, Spain

\* Corresponding author at:

Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901, Recife, Brazil.

E-mails: [rguedes@ufpe.br](mailto:rguedes@ufpe.br); [guedes.rca@gmail.com](mailto:guedes.rca@gmail.com).

Phone: +55-81-21268936

Fax: +55-81-21268473

## Abstract

**Objective:** To evaluate in adult rats, previously suckled under favorable and unfavorable conditions, the brain electrophysiological and microglial effects of the treatment early in life with the lectin (ConA) from *Canavalia ensiformis*.

**Methods:** Male Wistar newborn rats (n = 89) were suckled under favorable or unfavorable conditions, represented by litters with 6-7 pups or 12-14 pups (groups N6 and N12, respectively). From postnatal day 5 to 24, they were treated intraperitoneally with 1 mg/kg or 10 mg/kg ConA (groups L1 and L10, respectively), or with saline solution (group Sal), or no treatment (group Naïve). At 90–120 days of age, CSD was recorded at two parietal points for 4 h, and CSD parameters (velocity of propagation and amplitude and duration of the DC slow potential change) were measured. Fixative-perfused brain sections were reacted with anti- Iba1 antibodies to quantify immunolabeled microglia.

**Results:** Compared with the control groups, ConA-treated animals dose-dependently presented with reduced CSD propagation velocities and increased amplitude and duration of the CSD slow potential change. Microglia IBA-1 immunoreactivity was lower in both nutritional groups treated with ConA, in comparison with the control groups. The CSD-hemisphere presented with higher immunoreactivity compared with the CSD-free hemisphere.

**Discussion:** Attenuation in CSD propagation and microglia reaction was associated in adulthood with ConA treatment during brain development, indicating that the lectin can affect the electrophysiological and microglial development, and suggesting long-lasting protective action of the lectin on the rat brain, which is not impeded by the unfavorable suckling condition.

**Keywords:** lectin, ConA, brain electrophysiology, nutritional state, microglia

## Introduction

Lectins are proteins of non-immune origin that have the ability of specifically bind on carbohydrate-based structures and mediate important physiological processes in living organism. They constitute a wide group of structurally diverse proteins, present in plants, animals, and fungi, which binds reversibly and specifically with free and conjugated carbohydrates or even with complex sugar structures.<sup>1</sup> Because of their remarkable physico-chemical properties, lectins are used as biotechnological tool in studies of cell-surface recognition,<sup>2,3</sup> providing a sensitive detection system for changes in glycosylation and carbohydrate expression that may occur during embryogenesis, growth and disease.<sup>4</sup>

The Concanavalin A (ConA) obtained from the seeds of *Canavalia ensiformis* has been chosen as a lectin model in several studies. ConA was the first well isolated and characterized lectin, available commercially in a high pure degree, free of carbohydrate.<sup>5</sup> ConA is a tetrameric protein in physiological environment that binds specifically to  $\alpha$ -D-mannose,  $\alpha$ -D-glucose and glucopyranosides,<sup>6</sup> forming a highly specific 4:1 carbohydrate–ConA complex.<sup>7</sup> The structure of the ConA, built using Visual Molecular Dynamics (VMD) software<sup>8</sup> is shown in Fig.1.

**(Please insert Figure 1 about here)**

ConA can bind specifically to different mannose and glucose residues,<sup>6</sup> modulating several events such as neuroplasticity,<sup>9-11</sup> current responses of ionotropic glutamate receptors,<sup>12,13</sup> presynaptic inhibition in sympathetic neurons,<sup>14</sup> and dopamine



transporter desensitization.<sup>15</sup> Lectins also present several immunological effects, exerting a dose-dependent immunomodulation which depends on changes in the balance between pro-inflammatory (IL-4, IL-12, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ ) and anti-inflammatory (IL-6, IL-10) cytokines.<sup>16</sup>

From their receptor and cell-surface binding properties, it is reasonable to suppose that lectins may modulate neuronal cell communication, or even their differentiation and proliferation. Indeed, the endogenous lectin Galectin-1, a  $\beta$ -galactoside-binding protein, exhibits neuroprotective functions<sup>17-21</sup> and potent activity against neuroinflammation.<sup>22,23</sup> Exogenous lectins like ConA are able to modulate glutamatergic receptors in presynaptic neurons,<sup>24,25</sup> and ConBr, the lectin from *Canavalia brasiliensis*, protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity,<sup>26</sup> displaying neuroprotective and antidepressant activity. However, the possible effects of exogenous lectins on the microglia reaction (as an indicator of inflammatory response), as well as brain excitability have not been much investigated.

The excitability-related phenomenon known as Cortical Spreading Depression (CSD), initially reported by Leão (1944),<sup>27</sup> has been characterized as a phenomenon in which the neuronal excitability of the cerebral cortex is reversibly altered. CSD occurrence depends on the neuron–glial interactions. CSD can be provoked by electrical, mechanical or chemical stimulation.<sup>28</sup> This response is characterized by a marked diminution (depression) of the cortical spontaneous or evoked electrical activity, lasting 1–2 min. Changes on the CSD wave features (velocity of propagation, intensity and duration) can be caused by many different classes of drugs and nutritional/physiological conditions.<sup>29</sup> Several reports suggest that CSD seems to be involved in various pathophysiological events with clinical importance for humans, such as ischemia,<sup>30</sup> migraine,<sup>31,32</sup> and epilepsy.<sup>33</sup>

Several studies indicate that malnutrition early in life leads to biochemical,<sup>34</sup> structural<sup>35</sup> and electrophysiological<sup>36</sup> changes of the nervous system as during development the brain presents a higher degree of plasticity. Early nutritional insults can have important effects on brain electrophysiological activity<sup>37</sup>, including a facilitation effect on the propagation of CSD.<sup>36</sup> The early-malnourished brain may also respond differently to pharmacological treatments, concerning the CSD responses as compared with the normal brain responses.<sup>38</sup>

In order to improve the knowledge about brain lectin effects, we investigated here the microglia and CSD responses produced by the systemic treatment early in life with the lectin ConA in rats subjected to favorable and unfavorable lactation conditions, represented respectively by suckling the pups in small-size and large size litters. Part of these data has been presented elsewhere.<sup>39</sup>

## **Materials and methods**

### ***Animals***

Male Wistar newborn rats (n = 89) from distinct dams were randomly distributed on two groups regarding the nutritional conditions during the suckling period: (a) suckled in small litters, with 6-7 pups (group N6, with 41 pups), and (b) suckled in large litters, with 12-14 pups (group N12, with 48 pups). Decreasing or increasing the number of pups to be suckled by one dam is an easy and interesting method to produce positive or negative nutritional impact early in life, with modulation of brain electrophysiological and histological organization.<sup>37,40,41</sup>

The animals were handled in accordance with the norms of the Ethics Committee for Animal Research of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil

(Approval Protocol nº 23076.031272/2010-53), which complies with the “Principles of Laboratory Animal Care” (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The animals were housed in polypropylene cages (51×35.5×18.5 cm) in a room with temperature maintained at 22±1°C with a 12:12-h light–dark cycle (lights on at 7:00 a.m.), and with free access to water and a lab chow diet with 23% protein (Purina do Brazil Ltd.).

### ***Experimental groups and lectin treatment***

The animals were treated from the 5<sup>th</sup> to the 24<sup>th</sup> day of postnatal life with daily intraperitoneal injections of saline (N6-Sal and N12-Sal groups; n=10 for each group) or 1mg/kg lectin ConA or 10 mg/kg lectin (purchased from Sigma Co., St Louis, MO, USA) dissolved in, saline (groups N6-L1 and N12-L1, and Groups N6-L10 and N12-L10; n=10, 10, 10 and 17, respectively). Two groups of “naive” (non-injected) pups were used as additional controls (groups N6-Nv and N12-Nv; n=11 and 11, respectively).

### ***CSD Recording***

When the pups became adults (postnatal days 90–120), CSD was recorded, for a 4-h period, as previously described.<sup>42</sup> Briefly, under anesthesia (1 g/kg urethane plus 40 mg/kg chloralose, intraperitoneal), three trephine holes (2–3 mm diameter) were drilled on the right side of the skull. In the first hole, on the frontal bone, CSD was triggered at 20-min intervals by applying a cotton ball (1–2 mm diameter) soaked in 2% KCl solution for 1 min. The amplitude of electrocorticographic depression and the slow potential change, typical of a propagating CSD wave, were recorded simultaneously at two parietal points on the cortical surface using a pair of Ag/AgCl agar-Ringer electrodes separated by a fixed distance for each pair (4–5.5 mm for different pairs).

These electrodes are plastic conic pipettes (5 cm length, 0.5 mm tip inner diameter) filled with Ringer solution and solidified with the addition of 0.5% agar, into which a chlorided silver wire was inserted. A third electrode of the same type was placed on the nasal bones and used as a common reference. During the recording session, rectal temperature was continuously monitored and maintained at  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  with a heating blanket. For all CSD episodes, we calculated the amplitude and duration of the negative slow potential shifts of the CSD waves, as well as their velocity of propagation, based on the time spent for a CSD wave to cross the interelectrode distance.

### ***Body and brain weights***

Body weights were measured at postnatal days 7, 14, 21, 30, 60, and 90. Brains were weighed on the day of CSD recording (90-120 d).

### ***Iba1 Immunolabeling of Microglia***

Thirty-two rats from the eight experimental groups (four N6 groups and four N12 groups;  $n=4$  from each group) were perfused with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4. After being immersed in the fixative for 4 h, the perfused brains were transferred to a 30% (w/v) sucrose solution for cryoprotection. Longitudinal serial sections (30- $\mu\text{m}$  thickness) were obtained at  $-20^{\circ}\text{C}$  with a cryoslicer (Leica-1850). Sections were immunolabeled with a polyclonal antibody against the ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) to detect microglia (anti-Iba1, #019-19741; Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan). Free-floating sections were subjected to endogenous peroxidase blocking (2%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 70% methanol for 10 min); then, sections were incubated for 1 h in blocking buffer solution (BB) containing 0.05 M Tris-buffered saline (TBS), pH 7.4; 10% fetal

calf serum; 3% bovine serum albumin; and 1% Triton X-100. Next, sections were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-Iba1 (1:1,500 diluted in BB solution). After three washes with TBS plus 1% Triton, sections were incubated at room temperature for 1 h with biotinylated anti-rabbit (1:500) secondary antibodies. Sections were then rinsed in TBS plus 1% Triton and incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (1:500). The peroxidase reaction was visualized by incubating the sections in Tris buffer containing 0.5 mg/ml 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) and 0.33  $\mu$ l/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finally, sections were mounted, dehydrated in graded alcohols and xylene, and coverslipped in Entellan®. Densitometric analysis of the cerebral cortex was performed bilaterally for each animal. The immunolabeling pattern of the right hemisphere, which suffered repeated episodes of CSD, was compared with that of the left hemisphere (control). In each section, we analyzed photomicrographs of four fields within the parietal cortex using Image J software (National Institutes of Health, USA; version 1.46r). A Leica-DMLS microscope coupled to a Samsung high-level color camera (model SHC-410NAD) was used to obtain digital images from brain sections. Images from the parietal cortex immunoreacted for Iba1 were obtained with a 20 $\times$  microscope objective. Care was taken to obtain the digital images using the same light intensity conditions. We analyzed the percentage of the area occupied by Iba1-labeled cells, as well as their total immunoreactivity expressed in arbitrary units.

### **Statistics**

Body and brain weights, as well as CSD propagation rates, amplitudes, and durations, and quantitative immunohistochemical analysis were compared between groups using two-way ANOVA, including litter size (N6 and N12) and treatment (naïve, saline, L1 and L10) as factors, followed by a *post hoc* (Holm–Sidak) test when

indicated. Differences were considered significant when  $P \leq 0.05$ . All values are presented in the text as mean  $\pm$  standard deviations. The Sigmastat® version 3.10 statistical software was used for all analysis.

## Results

### *Impact of the suckling conditions on the body and brain weight*

In the N12 condition, the body weights were lower ( $p < 0.05$ ) than in the N6 condition up to the 30th day of postnatal life (Fig. 2 A and B). The mean  $\pm$  sd weights (in g) in the N12 groups in the postnatal days 7, 14, 21 and 30 were respectively  $15.0 \pm 2.0$ ,  $23.6 \pm 2.6$ ,  $34.1 \pm 4.0$  and  $55.0 \pm 6.1$  for the naïve group;  $14.1 \pm 1.5$ ,  $22.8 \pm 2.8$ ,  $34.1 \pm 4.5$  and  $70.8 \pm 4.3$  for the saline group;  $15.3 \pm 2.3$ ,  $24.3 \pm 2.7$ ,  $37.9 \pm 4.0$  and  $60.8 \pm 7.2$  for the L1 group;  $14.0 \pm 1.6$ ,  $20.1 \pm 2.8$ ,  $28.0 \pm 4.3$  and  $59.9 \pm 10.3$  for the L10 group. In the N6 condition, the weights were  $16.3 \pm 0.7$ ,  $30.6 \pm 1.0$ ,  $51.2 \pm 3.1$  and  $91.6 \pm 5.8$  for the naïve group;  $16.3 \pm 1.2$ ,  $32.2 \pm 2.0$ ,  $53.8 \pm 3.2$  and  $94.0 \pm 7.2$  for the saline group;  $16.3 \pm 1.0$ ,  $30.0 \pm 1.9$ ,  $46.8 \pm 3.4$  and  $84.6 \pm 6.8$  for the L1 group;  $18.8 \pm 3.3$ ,  $28.5 \pm 6.9$ ,  $41.7 \pm 6.2$  and  $87.7 \pm 13.5$  for the L10 group. In each suckling condition, saline-treated and naïve animals displayed similar body weights, indicating no effect of saline injection. At 90d of life, L10, but not L1, treatment was associated with lower body weights compared with the corresponding control groups. The brain weights were reduced in the N12 condition (range: from  $1.5760 \pm 0.0879$ g to  $1.6075 \pm 0.0854$ g) compared with the N6 groups (range: from  $1.6620 \pm 0.0192$ g to  $1.7343 \pm 0.0346$ g). Lectin treatment did not affect the brain weights of adult animals (Fig. 2C).

**(Please insert Figure 2 about here)**

### ***Impact of the early lectin treatment and suckling conditions on CSD propagation***

CSD was successfully elicited in all groups by KCl 2% solution applied for 1 min through the hole (2-3 mm in diameter) drilled on the frontal bone. The KCl-elicited CSD wave propagated and was recorded by the two electrodes (marked as 1 and 2 in the diagram of Fig 3). In all recordings the CSD slow potential change returned to the baseline value after 1-2 minutes. The early systemic treatment with 1 mg/kg and 10 mg/kg lectin resulted, in both nutritional states, in longer latencies for a CSD wave to cross the interelectrode distance, as compared with the saline and naïve conditions; these latencies are delimited by the interrupted lines in the CSD traces of Fig. 3.

**(Please insert Figure 3 about here)**

For each group, the CSD velocity of propagation was calculated as a mean of 10 to 12 consecutive CSD episodes (elicited at intervals  $\geq 20$  min) in each animal. The mean CSD velocities are shown in the Fig.4. At 90-120 days of life, CSD propagation velocities (mean  $\pm$  standard deviation, in mm/min) in the small-size litter groups were: N6-Sal =  $3.41 \pm 0.10$ , N6-Nv =  $3.40 \pm 0.09$ , N6-L1 =  $3.12 \pm 0.14$  and N6-L10 =  $2.82 \pm 0.18$ . Compared with the corresponding L6 groups, the L12 animals presented with higher CSD velocities ( $p < 0.05$ ), confirming the facilitating effect of the unfavorable suckling condition. The values for the L12 groups (in mm/min) were: N12-Sal =  $4.26 \pm 0.16$ , N12-Nv =  $4.22 \pm 0.19$ , N12-L1 =  $3.74 \pm 0.13$  and N12-L10 =  $3.25 \pm 0.16$ . ANOVA showed that in both L6 and L2 suckling conditions the early systemic lectin-treatment dose-dependently decreased the CSD velocity ( $p < 0.05$ ) when compared to the corresponding saline-treated and naïve controls.

**(Please insert Figure 4 about here)**

The mean CSD amplitudes (in mV) and durations (in s) are presented in Table 1. In the N12 condition, ANOVA revealed that treatment with 10 mg/kg/d lectin (group L10) increased the amplitude and duration of CSD compared with the L1, and the saline and naïve controls. In addition, all N12 groups presented with shorter duration compared with the corresponding N6 group.

### **Iba1 Immunohistochemistry and Densitometric Analysis**

Figure 5 depicts representative photomicrographs of specific immunolabeling of the calcium-binding protein Iba1 in the microglial cells of the parietal cortex from adult rats (N=4 for each group) treated systemically early in life with saline solution, ConA (1 mg/kg, L-1; or 10 mg/kg, L-10) or no injection (naïve group). Quantitative analysis of both hemispheres revealed an interhemispheric difference: the hemisphere in which CSD was elicited was more reactive than the contralateral hemisphere (Fig. 6). Compared with the controls, animals treated with 10 mg/ml ConA presented with a lower percentage of labeled area and lower immunoreactivity (expressed in arbitrary units) ( $p < 0.05$ ; ANOVA followed by the Holm-Sidak test).

**(Please insert Figure 5 and 6 about here)**

### **Discussion**



In the present study, we extended our previous investigation on the identification of electrophysiological and microglial changes produced in the rat cortex by ConA, the lectin from *Canavalia ensiformis*. Our findings confirm the effectiveness of ConA in decelerating CSD and reducing immunolabeling of Iba1-containing microglia, and demonstrate that such effects also occur in animals previously suckled in unfavorable (N12) condition. These two factors (i.e., ConA and unfavorable suckling) seem to be important determinants of the reduction in body weight, and in the CSD and microglia alteration as reported here, and they were not previously combined in a single study involving CSD. Data reinforce our previous suggestion that ConA administration during CNS development altered brain processes that are involved in the observed electrophysiological (CSD) and immunohistochemical (microglia labeling) effects. As ConA treatment occurred early in life and CSD acceleration, as well as the microglial reaction was observed at adulthood, we suggest that these effects of ConA are permanent, or at least long lasting.

The ConA treatment early in life contributed also for body weight impairment, but did not affect the brain weights. Despite the absence of changes in brain weight, the ConA treatment during the suckling period might have altered glial development as indicated by changes in the Iba1 immunolabeling pattern presently observed. The suckling period is a critical phase for structural and functional maturation of the rat brain. The rapid execution of the normally programmed brain developmental processes results in adequate neuronal migration, myelination and gliogenesis;<sup>37</sup> under the lactation conditions of the present study, the ConA treatment might have attenuated microglia reaction, as our Iba1 findings suggest. Changes in glial cells are relevant for the CSD findings as there is evidence<sup>43</sup> indicating that glial cells participate in the resistance that the cortical tissue normally presents to CSD propagation. Experimental

manipulations can reduce or augment the cortical resistance to CSD, resulting respectively in higher or lower propagation rates.<sup>36</sup> Therefore, the estimation of changes in brain CSD susceptibility can be easily achieved by determining the velocity of CSD propagation under CSD-facilitating or CSD-impairing conditions, and this contributes for the understanding of the electrophysiological processes that underlie brain excitability changes and related diseases (e.g., epilepsy).<sup>33,44</sup> The present data reinforce the implication of ConA treatment as a CSD-impairing and microglia reaction reducing factor.

To the best of our knowledge, there is no available information in the literature on the long-lasting electrophysiological effects of ConA on the CSD phenomenon. The mechanisms by which ConA influences CSD are unknown. One possible mechanism would be via modulation of the glutamatergic system. The regulation of brain excitability in both humans<sup>45</sup> and laboratory animals<sup>46,47</sup> is a process dependent on the glutamatergic system. Recent experimental evidence suggests that the lectin from *Canavalia brasiliensis* can protect hippocampal slices against glutamate neurotoxicity.<sup>26</sup> Interestingly, ConA can modulate the glutamatergic system,<sup>48</sup> which supports the glutamate hypothesis for the ConA action on CSD. It is important to mention that both glutamate receptors modulation<sup>42,49</sup> and glial activity<sup>50</sup> can influence the CSD phenomenon. However, at the moment one cannot exclude the possibility of other mechanisms, as for example the direct or indirect lectin action on nitroergic- and free radical formation processes.<sup>51</sup>

Under brain energy-demanding conditions such as CSD, microglia reportedly can be transformed into *reactive glia*.<sup>51</sup> Our Iba1 labeling data confirm this assertion: in all groups, the hemisphere that suffered CSD presented with higher Iba1 immunoreactivity when compared with the contralateral, CSD-free hemisphere (see Figs. 5 and 6). In this

scenario, the treatment with ConA in the lactation period attenuated microglial Iba1 immunolabeling, suggesting a long lasting protective action of ConA that could be detected at adulthood. Our novel Iba1 data in the cortex of ConA-treated rats compellingly require a new line of investigation to elucidate whether the CSD changes described here are a consequence of alterations in microglial reactivity.

In our study, suckling in large litters (N12 groups) certainly led to some degree of nutritional deficiency, confirming previous reports.<sup>37</sup> We can conclude that the increase in the number of pups during the lactation period was effective in producing malnutrition, which was confirmed by the lower brain and body weights, observed in the malnourished groups, when compared to their respective well-nourished controls. The decreased number and/or size of cell elements, as well as alterations in the events that cause neuronal maturation (e.g., reduction of processes like dendritic development, synapse formation and myelination), are probably the causal factors of early malnutrition.<sup>37,52</sup> The malnourished rat brain is more susceptible to CSD as indexed by the higher CSD velocities compared with the normally suckled animal.<sup>53</sup> Early malnutrition also increases brain cell packing density, impairs myelin formation and gliogenesis,<sup>37</sup> and reduces brain glutamate uptake,<sup>54</sup> which increases the extracellular glutamate. All these malnutrition-induced effects facilitate CSD propagation,<sup>36</sup> and this has been confirmed presently.

Regarding the possible application of the present findings to human health, the protective action of lectins via the glutamatergic system<sup>26</sup> deserves some comment. It is important to highlight that about 80% of all synapses are glutamatergic.<sup>55</sup> Therefore, excitotoxicity can be generated from excessive glutamatergic activation, leading to neurological diseases, and lectin molecules that counteract excessive glutamatergic activity can be important putative tools to treat or prevent brain diseases. This appears

to be the case of ConA and ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis*, a lectin with the same carbohydrate affinity and with extensive amino acid sequence similarity to ConA.<sup>55</sup> We believe that searching for the cellular and molecular mechanisms underlying the action of ConA and other carbohydrate-binding lectins on the brain's electrophysiological and microglial properties is a very important task that shall be continued.

In summary, we characterized brain electrophysiological (CSD) and immunohistochemical (Iba1 microglia labelling) effects of the lectin ConA, from *Canavalia ensiformis*, comparing them in favorable and unfavorable suckling conditions. We conclude that ConA dose-dependently decelerates CSD propagation, and attenuates immunoreactivity of the Iba1-containing microglia. These effects are not impeded by unfavorable suckling (N12) condition. Finally, the presence of CSD in one cerebral hemisphere was associated with increased microglial reaction. As data advance the understanding of the mechanisms of cerebral electrophysiological and histological alterations induced by lectins, they might be helpful in developing novel therapeutic strategies devoted to treat excitability-related brain disorders.

## Acknowledgements

The authors thank the following Brazilian agencies for financial support: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-PDSE 1648-12-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Projeto Universal (CNPq 014/2010- 474126/2010-2), Instituto Brasileiro de Neurociências (IBN-Net/Finep no. 4191), and Instituto Nacional de Neurociência Translacional (INCT nº 573604/2008-8). R.C.A. Guedes is a Research Fellow from CNPq (nº 301190/2010-0).

## References

- <sup>1</sup> Van Damme EJ, Peumans WJ, Barre A, Rougé P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit. Rev Plant Sci.* 1998;17:575–692.
- <sup>2</sup> Gemeiner P, Mislovicová D, Tkác J, Svitel J, Pätöprstý V, Hrabárová E, *et al.* Lectinomics II: A highway to biomedical/clinical diagnostics. *Biotechnol Adv.* 2009;27:1-15.
- <sup>3</sup> Reuter G, Gabius HJ. Eukaryotic glycosylation: whim of nature or multipurpose tool? *Cell Mol Life Sci.* 1999;55:368–422.
- <sup>4</sup> Campos, L. M.; Cavalcanti, C. L.; Lima-Filho, J. L.; Carvalho, L. B. & Beltrão, E. I. Acridinium ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers*, 11(5):480-4, 2006.
- <sup>5</sup> Hardman KD, Ainsworth CF. Structure of concanavalin A at 2.4-Å resolution. *Biochemistry.* 1972;11:4910–19.
- <sup>6</sup> Li W, Yu J, Xu H, Bao J. Concanavalin A: A potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;414:282–86.
- <sup>7</sup> Anzai J, Kobayashi Y. Construction of multilayer thin films of enzymes by means of sugar-lectin interactions. *Langmuir* 2000;16(6):2851–56.
- <sup>8</sup> Humphrey W, Dalke A, Schulten K. "VMD - Visual Molecular Dynamics". *J Molec Graphics.* 1996;14:33-38.
- <sup>9</sup> Kirner A, Deutsch S, Weiler E, Polak EH, Apfelbach R. Concanavalin A application to the olfactory epithelium reveals different sensory neuron populations for the odour pair D- and L-carvone. *Behav Brain Res.* 2003;138:201–6.
- <sup>10</sup> Lin SS, Levitan IB. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. *Trends Neurosci.* 1991;14:273–7.

- <sup>11</sup> Scherer WJ, Udin SB. Concanavalin A reduces habituation in the tectum of the frog. *Brain Res.* 1994;667:209–15.
- <sup>12</sup> Everts I, Petroski R, Kizelsztejn P, Teichberg VI, Heinemann SF, Hollmann M. Lectin-induced inhibition of desensitization of the kainate receptor GluR6 depends on the activation state and can be mediated by a single native or ectopic n-linked carbohydrate side chain. *J Neurosci.* 1999;19:916–27.
- <sup>13</sup> Thalhammer A, Everts I, Hollmann M. Inhibition by lectins of glutamate receptor desensitization is determined by the lectin's sugar specificity at kainate but not AMPA receptors. *Mol Cell Neurosci.* 2002;21:521–33.
- <sup>14</sup> Boehm S, Huck S. Presynaptic inhibition by concavalin A: are alphalatrotoxin receptors involved in action potential-dependent transmitter release? *J Neurochem.* 1998;71:2421–30.
- <sup>15</sup> Huang CL, Huang NK, Shyue SK, Chern Y. Hydrogen peroxide induces loss of dopamine transporter activity: a calcium-dependent oxidative mechanism. *J Neurochem.* 2003;86:1247–59.
- <sup>16</sup> Xu X, Wei H, Dong Z, Chen Y, Tian Z. The differential effects of low dose and high dose concanavalin A on cytokine profile and their importance in liver injury. *Inflamm.* 2006;55:144–52.
- <sup>17</sup> Sakaguchi M, Shingo T, Shimazaki T, Okano HJ, Shiwa M, Ishibashi S, *et al.* A carbohydrate-binding protein, Galectin-1, promotes proliferation of adult neural stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:7112–7.
- <sup>18</sup> Ishibashi S, Kuroiwa T, Sakaguchi M, Sun L, Kadoya T, Okano H, *et al.* Galectin-1 regulates neurogenesis in the subventricular zone and promotes functional recovery after stroke. *Exp Neurol.* 2007;207:302–13.
- <sup>19</sup> Qu WS, Wang YH, Wang JP, Tang YX, Zhang Q, Tian DS, *et al.* Galectin-1 enhances astrocytic BDNF production and improves functional outcome in rats following ischemia. *Neurochem Res.* 2010;35:1716–24.

- <sup>20</sup> Qu WS, Wang YH, Ma JF, Tian DS, Zhang Q, Pan DJ, *et al.* Galectin-1 attenuates astroglialosis-associated injuries and improves recovery of rats following focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2011;116:217–226.
- <sup>21</sup> Sasaki T, Hirabayashi J, Manya H, Kasai K, Endo T. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. *Glycobiology* 2004;14:357–63.
- <sup>22</sup> Sakaguchi M, Arruda-Carvalho M, Kang NH, Imaizumi Y, Poirier F, Okano H, *et al.* Impaired spatial and contextual memory formation in galectin-1 deficient mice. *Mol Brain.* 2011;4:33.
- <sup>23</sup> Starossom SC, Mascanfroni ID, Imitola J, Cao L, Raddassi K, Hernandez SF, *et al.* Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity.* 2012;37:249–63.
- <sup>24</sup> Fay AM, Bowie D. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. *J Physiol.* 2006;572:201–13.
- <sup>25</sup> Yue KT, MacDonald JF, Pekhletski R, Hampson DR. Differential effects of lectins on recombinant glutamate receptors. *Eur J Pharmacol.* 1995;291:229–35.
- <sup>26</sup> Jacques AV, Rieger DK, Maestri M, Lopes MW, Peres TV, Gonçalves FM, *et al.* Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. *Neurochem Int.* 2013;62:836–42.
- <sup>27</sup> Leao AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex, *J Neurophysiol.* 1944;7:359–390.
- <sup>28</sup> Berger M, Speckmann EJ, Pape HC, Gorji A. Spreading depression enhances human neocortical excitability in vitro. *Cephalalgia* 2008;28:558–62.
- <sup>29</sup> Charles AC, Baca SM. Cortical spreading depression and migraine. *Nat Rev Neurol.* 2013;9:637–44.

- <sup>30</sup> Takano K, Latour LL, Formato JE, Carano RAD, Helmer KG, Hasegawa Y, *et al.* The role of spreading depression in focal ischemia evaluated by diffusion mapping, *Ann Neurol.* 1996;39:308–18.
- <sup>31</sup> Read SJ, Parsons AA. Sumatriptan modifies cortical free radical release during cortical spreading depression. A novel antimigraine action for sumatriptan? *Brain Res.* 2000;870:44–53.
- <sup>32</sup> Lehmenkuhler A, Grotemeyer KH, Tegtmeier F. *Migraine: Basic Mechanisms and Treatment*, Urban and Schwarzenberg, Munich, 1993.
- <sup>33</sup> Guedes RCA, Cavaleiro EA. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epil Res.* 1997;27:33–40.
- <sup>34</sup> Bonatto F, Polydoro M, Andrades MA *et al.* Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. *Neurosci Lett* 2006;406:281–4.
- <sup>35</sup> Borba JMC, Araujo MS, Picanço-Diniz CW *et al.* Permanent and transitory morphometric changes of NADPH-diaphorase containing neurons in the rat visual cortex after early malnutrition. *Brain Res Bull* 2000;53:193–201.
- <sup>36</sup> Guedes RCA. Cortical Spreading Depression: A Model for Studying Brain Consequences of Malnutrition, in: Preedy VR, Watson RR, Martin CR, editors. *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. London: Springer; 2011. p. 2343-55.
- <sup>37</sup> Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, *et al.* The effects of protein malnutrition on the developing nervous system in the rat. *Neurosci Biobehav Rev.* 1978;2(3):137–230.
- <sup>38</sup> Guedes RCA, Rocha-de-Melo AP, Lima KR, Albuquerque JMS, Francisco ES. Early malnutrition attenuates the impairing action of naloxone on spreading depression in young rats. *Nutr Neurosci.* 2013;16(4):142-6.
- <sup>39</sup> Soares GSF, Cabral-Cavalcanti L, Guedes R. Treatment early in life with the lectin con-A decelerates spreading depression in well-nourished and early-malnourished

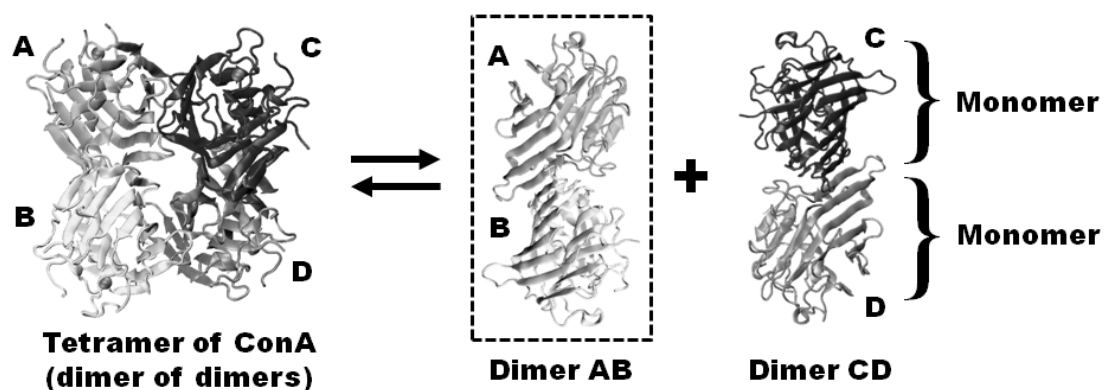


adult rats, in: XI European Meeting on Glial cells in Health and Disease, Berlin. Abstract book Glia- Supplement 1. Hoboken : Wiley Blackwell; 2013. p. 70.

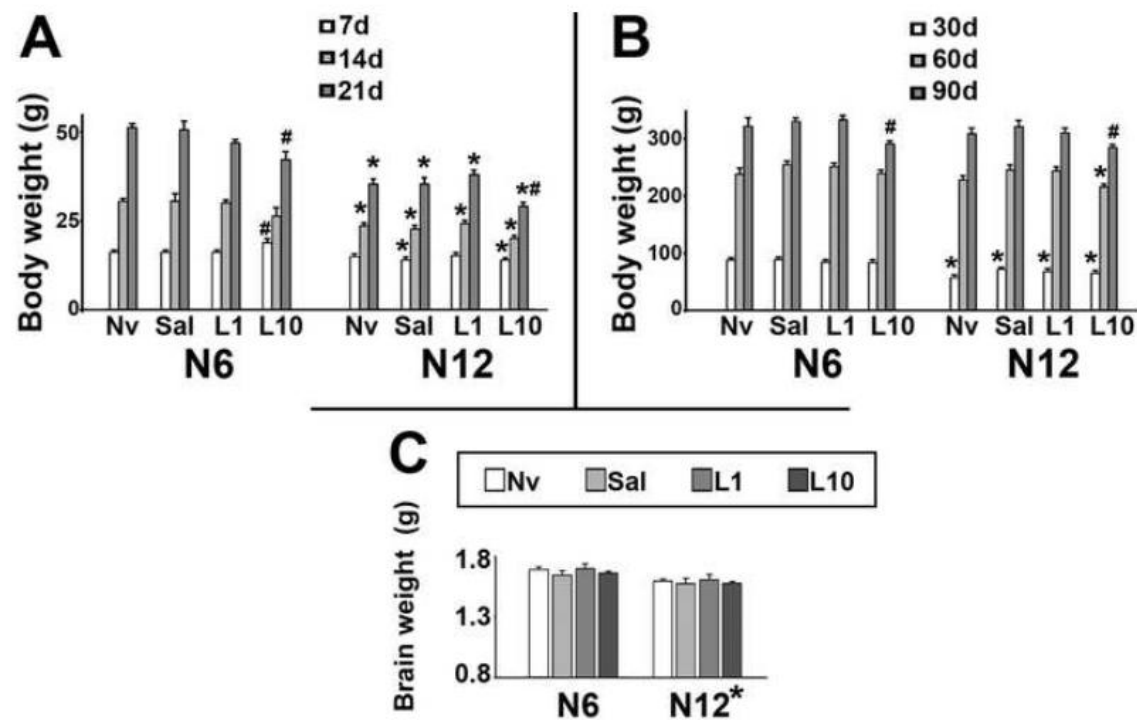
- <sup>40</sup> Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Ziska T, et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *J Neuroendocrinol* 1999;11:541–6.
- <sup>41</sup> Rocha-de-Melo AP, Picanco-Diniz CW, Borba JMC, Santos-Monteiro J, Guedes RCA. NADPH-diaphorase histochemical labeling patterns in the hippocampal neuropil and visual cortical neurons in weaned rats reared during lactation on different litter sizes. *Nutr Neurosci* 2004;7:207–16.
- <sup>42</sup> Lima CB, Soares GSF, Vitor SM, Castellano B, Andrade-da-Costa BLS, Guedes RCA. Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex. *Life Sci.* 2013;93:388–392.
- <sup>43</sup> Largo C, Ibarz JM, Herreras O. Effects of the gliotoxin fluorocitrate on spreading depression and glial membrane potential in rat brain in situ. *J Neurophysiol.* 1997;78:295-307.
- <sup>44</sup> Leao AAP. Spreading depression, in: Purpura DP, Penry K, Tower DB, Woodbury BM, Water RD, editors. *Experimental Models of Epilepsy*. New York: Raven Press; 1972. p. 173–195.
- <sup>45</sup> Stagg CJ, Bestmann S, Constantinescu AO, Moreno LM, Allman C, Meckle R, et al. Relationship between physiological measures of excitability and levels of glutamate and GABA in the human motor cortex. *J Physiol.* 2011;589:5845-55.
- <sup>46</sup> El-Hassar L, Hagenston AM, D'Angelo LB, Yeckel MF. Metabotropic glutamate receptors regulate hippocampal CA1 pyramidal neuron excitability via  $\text{Ca}^{2+}$  wave-dependent activation of SK and TRPC channels. *J Physiol.* 2011;589:3211-29.
- <sup>47</sup> Lopez-Perez, S.J., Ureña-Guerrero, M.E., Morales-Villagran, A. Monosodium glutamate neonatal treatment as a seizure and excitotoxic model. *Brain Res.* 2010;1317:246–256.

- <sup>48</sup> Fay AM, Bowie D. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. *J Physiol.* 2006;572:201–213.
- <sup>49</sup> Marrannes R, Willems R, De Prins E, Wauquier A. Evidence for a role of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in cortical spreading depression in the rat. *Brain Res.* 1988;457:226–240.
- <sup>50</sup> Larrosa B, Pastor J, López-Aguado L, Herreras O. A role for glutamate and glia in the oscillations preceding spreading depression. *Neurosci.* 2006;141:1057–1068.
- <sup>51</sup> Caggiano AO, Kraig RP. Eicosanoids and Nitric Oxide Influence Induction of Reactive Gliosis From Spreading Depression in Microglia but not Astrocytes. *J Comp Neurol.* 1996; 369: 93–108.
- <sup>52</sup> Picanço-Diniz CW, Araújo MS, Borba JMC, Guedes RCA. NADPH-diaphorase containing neurons and biocytin-labelled axon term terminals in the visual cortex of adult rats malnourished during development. *Nutr Neurosci.* 1998;1:35-48.
- <sup>53</sup> Rocha-de-Melo AP, Cavalcanti JB, Barros AMS, Guedes RCA. Manipulation of rat litter size during suckling influences cortical spreading depression after weaning and at adulthood. *Nutr Neurosci.* 2006;9:155–60.
- <sup>54</sup> Feoli AM, Siqueira I, Almeida LMV, Tramontina AC, Battu C, Wofchuk ST, et al. Brain glutathione content and glutamate uptake are reduced in rats exposed to pre- and postnatal protein malnutrition *J Nutr.* 2006;136,2357-236.
- <sup>55</sup> Russi MA, Vandresen-Filho S, Rieger DK, Costa AP, Lopes MW, Cunha RM, et al. ConBr, a Lectin from Canavalia brasiliensis Seeds, Protects Against Quinolinic Acid-Induced Seizures in Mice. *Neurochem Res.* 2012;37:288-297.

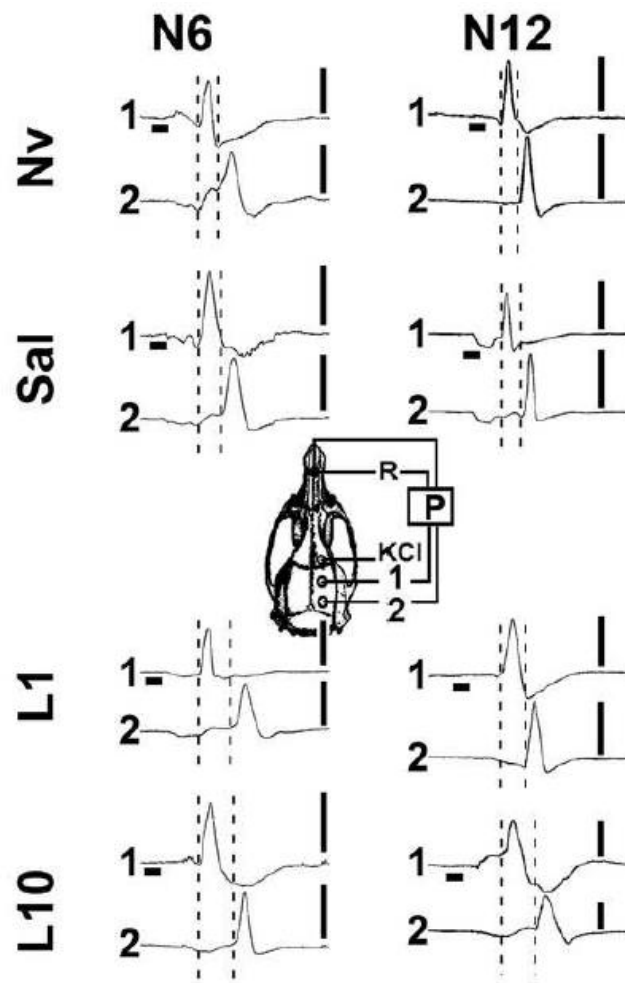
## Legends



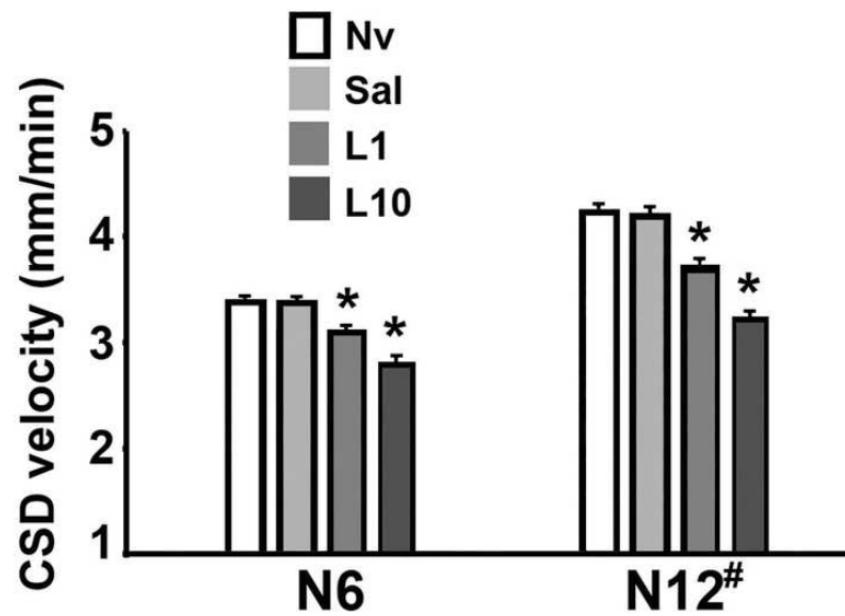
**Fig. 1.** The ConA tetramer, composed by the equal subunits A to D, can be described as a dimer of dimers (AB and CB) in chemical equilibrium under pH change. Both forms have the same affinity by glucose and mannose. PDB file number 3CNA.<sup>5</sup> The structures were built using Visual Molecular Dynamics (VMD) software.<sup>8</sup>



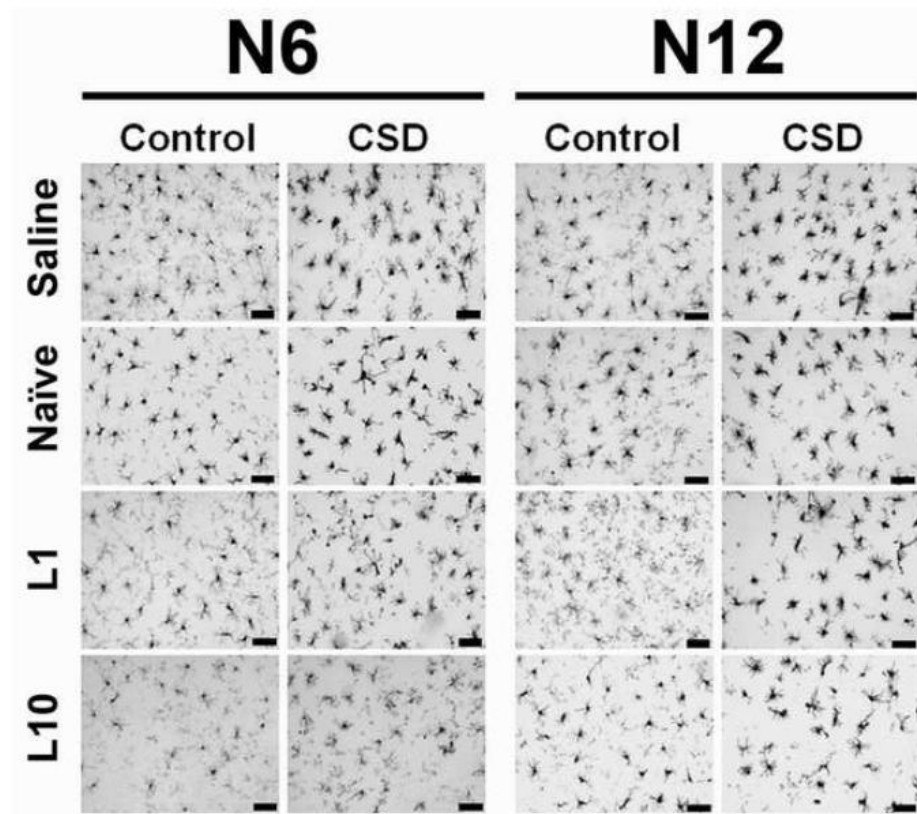
**Fig. 2.** Body weights (mean  $\pm$  SD) of rats suckled in litters formed by 6-7 pups or 12-14 pups (respectively N6 and N12 groups) that were submitted to systemic lectin ConA administration (1mg/kg – L1; or 10mg/kg – L10), or saline (NaCl 0.9%) solution, or not submitted to any treatment (Naive group). The weights were measured at the postnatal days 7, 14 and 21 (panel A), and 30, 60 and 90 (panel B). The brain weights (panel C) were obtained at adulthood (90-120 days of life). Data are expressed as mean $\pm$ s.e.m. \* $p$ <0.05 compared with the corresponding N6 group. # $p$ <0.05 compared with the other treatment group in the same suckling condition (two-way ANOVA followed by Holm-Sidak test).



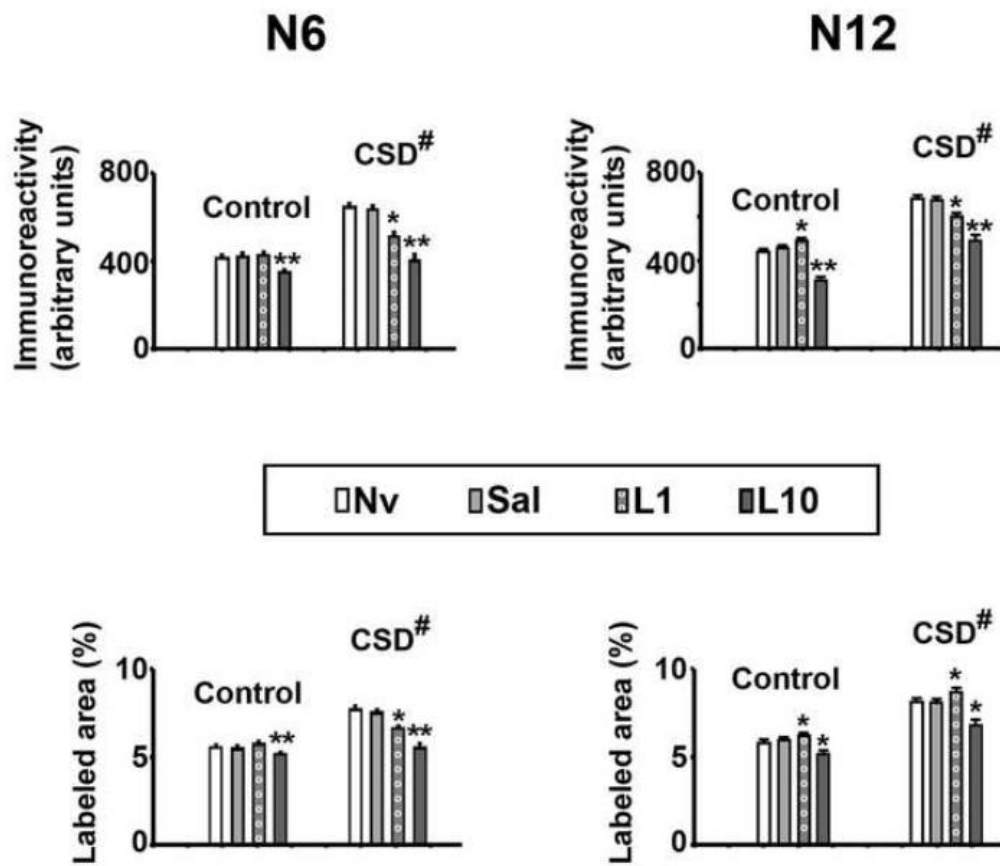
**Fig. 3.** Examples of recordings of the slow potential change (P), typical of CSD, on two points of the right hemisphere of eight 90–120-day-old rats representative of the eight groups of this study. N6 and N12 are the two suckling conditions (suckling in litters with 6-7 and 12-14 pups, respectively). Nv, naïve group (no treatment); Sal, L1 and L10 are groups injected intraperitoneally with saline, 1 mg/kg/d lectine and 10 mg/kg/d lectine, respectively. The horizontal bars indicate the period (1 minute) of stimulation with 2% KCl on the frontal region of the right hemisphere, to elicit CSD. The vertical bars correspond to 10 mV (negative upwards). The vertical dashed lines delimitate the time spent for a CSD episode to propagate from recording point 1 to 2. The skull diagram shows the point of KCl application, the point where the reference electrode (R) was placed, and the recording positions 1 and 2, from which the traces marked with the same numbers were obtained. The distance between the two recording points is 4.5mm in all cases.



**Fig. 4.** CSD velocities of propagation in adult rats (90–120-day-old) suckled in litters with 6-7 or 12-14 pups (respectively groups N6 and N12), and treated during the lactation period with saline (Sal), 1mg/kg/d lectine (L1) and 10 mg/kg/d lectine (L10). Nv, naïve group. Values are means  $\pm$  s.e.m. \* $p < 0.05$  compared with the controls (Sal and Nv) in the same suckling condition. # $p < 0.05$  compared with the N6 groups. (ANOVA plus Holm-Sidak test).



**Fig. 5.** Representative grayscale digital images of Iba1-immunolabeled microglia in coronal sections through the neocortex of eight adult rats, representative of the eight groups of this study. N6 and N12 are the two suckling conditions (suckling in litters with 6-7 and 12-14 pups, respectively). Nv, naïve group (no treatment); Sal, L1 and L10 are groups injected intraperitoneally with saline, 1 mg/kg/d lectine and 10 mg/kg/d lectine, respectively. CSD, the brain hemisphere in which CSD was elicited. Control, the contralateral hemisphere, in which CSD was not elicited. Scale bar, 20  $\mu$ m.



**Fig. 6.** Quantitative measures of immunoreactivity (expressed as arbitrary units) and percent area occupied by the Iba1-labeled microglia in the neocortex of adult rats (90–120-day-old) suckled in litters with 6-7 or 12-14 pups (respectively groups N6 and N12), and treated during the lactation period with saline (Sal), 1mg/kg/d lectine (L1) and 10 mg/kg/d lectine (L10). Nv, naïve group. Data are expressed as means  $\pm$  S.E.M. of four animals per group (four brain sections per animal; four microscopic fields per section). The CSD values refer to the brain hemisphere in which CSD was elicited, while Control values refer to the contralateral hemisphere, in which CSD was not elicited. \* $p < 0.05$  compared with the saline and naïve controls. \*\* $p < 0.05$  compared with the other three groups. # indicates a significant difference in the CSD hemisphere compared with the control hemisphere.



**Table 1.** Amplitudes and durations of the negative slow potential shifts of CSD in adult rats previously suckled under favorable and unfavorable conditions (respectively N6 and N12) and treated with 1 mg/kg (L-1) and 10 mg/kg ConA lectin (L-10). They were compared with control groups treated with saline (Sal), or without any treatment (naïve; Nv). Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. The number of rats per group is in parentheses. \* $p < 0.05$  compared with the other treatment groups in the same suckling (N12) condition. # $p < 0.05$  compared with the corresponding N6 value (ANOVA plus Holm-Sidak test).

| Groups | Treatment        | Amplitude (mV)   | Duration (s)     |
|--------|------------------|------------------|------------------|
| N6     | Nv ( $n = 8$ )   | $10.4 \pm 1.8$   | $57.7 \pm 6.2$   |
|        | Sal ( $n = 10$ ) | $11.5 \pm 2.9$   | $58.8 \pm 5.8$   |
|        | L1 ( $n = 9$ )   | $10.5 \pm 2.7$   | $58.5 \pm 5.4$   |
|        | L10 ( $n = 8$ )  | $10.4 \pm 2.0$   | $57.1 \pm 5.3$   |
| N12    | Nv ( $n = 8$ )   | $10.2 \pm 3.3$   | $42.8 \pm 5.0\#$ |
|        | Sal ( $n = 9$ )  | $10.9 \pm 3.6$   | $41.4 \pm 3.2\#$ |
|        | L1 ( $n = 8$ )   | $11.5 \pm 2.9$   | $46.5 \pm 4.1\#$ |
|        | L10 ( $n = 10$ ) | $15.5 \pm 3.8^*$ | $53.4 \pm 4.7\#$ |

## **ANEXOS**

## Anexo A -Submissão do Artigo I

----- Forwarded message -----

From: **The European Journal of Pharmacology** <[ejp-office@pharm.uu.nl](mailto:ejp-office@pharm.uu.nl)>

Date: 2014/1/7

Subject: A manuscript number has been assigned to Potential brain protective effect of the lectin from Canavalia ensiformis: an electrophysiological and microglia labeling analysis in the rat

To: [guedes.rca@gmail.com](mailto:guedes.rca@gmail.com), [rguedes@ufpe.br](mailto:rguedes@ufpe.br)

Dear Prof. Guedes,

Your submission entitled "Potential brain protective effect of the lectin from Canavalia ensiformis: an electrophysiological and microglia labeling analysis in the rat" has been assigned the following manuscript number: EJP-39311.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author.

The URL is <http://ees.elsevier.com/ejp/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

EJP Editorial Office

Editorial Office

European Journal of Pharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

**Anexo B -Submissão do Artigo II**

----- Forwarded message -----

From: **Editorial Office,Nutritional Neuroscience** <[v.coulter@maneypublishing.com](mailto:v.coulter@maneypublishing.com)>

Date: 2014/1/21

Subject: Your submission NNS304

To: R C A Guedes <[guedes.rca@gmail.com](mailto:guedes.rca@gmail.com)>

Dear Professor Guedes

Your submission "Brain effects of the lectin from Canavalia ensiformis in adult rats previously suckled in favorable and unfavorable conditions: a spreading depression- and microglia immunolabeling study" to Nutritional Neuroscience has been assigned the manuscript number: NNS304.

The paper is now with an Editor and we will contact you again once referees' comments are received. You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is <http://nns.edmgr.com/>.

Your username is: \*\*\*\*\*

Your password is: \*\*\*\*\*

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards

Vanessa Coulter

Editorial Administrator/Assistant

Nutritional Neuroscience

## Anexo C -Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPE

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 05 de agosto de 2010.

Ofício nº 300/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Prof: Rubem Carlos Araújo Guedes**  
Departamento Nutrição - CCS  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.031272/2010-53

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"NOVAS MOLÉCULAS, DE ALIMENTOS VEGETAIS, COM AÇÃO NEURAL: EFEITOS ELETROFISIOLÓGICOS DA LECTINA DE *Canavalia ensiformis*(ConA) EM RATOS NUTRIDOS E DESNUTRIDOS."**

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

**Observação:**

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição,  
Animais: Ratos( *Rattus norvegicus*), linhagem Wistar: sexo:  
Machos; Idade: adulta(90 a 120 dias); Nº de Animais :  
80(Oitenta).

Atenciosamente,

*Maria Teresa Jansen*



Profa. Maria Teresa Jansen  
Presidente do CEEA

## **Anexo D -Produção Científica Durante o Doutorado**

### **Artigos submetidos em revistas indexadas:**

**SOARES, GEÓRGIA DE SOUSA FERREIRA, LIMA, CÁSSIA BORGES, CAVALCANTI, LILIANE CABRAL, VILLACAMPA, NADIA, CASTELLANO, BERNARDO, GUEDES, RUBEM CARLOS ARAÚJO..** Guedes. Potential brain protective effect of the lectin from *Canavalia ensiformis*: an electrophysiological and microglia labeling analysis in the rat. ***European Journal of Pharmacology***.

**SOARES, GEÓRGIA DE SOUSA FERREIRA, LIMA, CÁSSIA BORGES, CAVALCANTI, LILIANE CABRAL, CASTELLANO, BERNARDO, GUEDES, RUBEM CARLOS ARAÚJO.** Brain effects of the lectin from *Canavalia ensiformis* in adult rats previously suckled in favorable and unfavorable conditions: a spreading depression- and microglia immunolabeling study. ***Nutritional Neuroscience***.

## Artigos publicados em revistas indexadas:

LIMA, CÁSSIA BORGES; SOARES, GEORGIA DE SOUSA FERREIRA; VITOR, SUÊNIA MARCELE; ANDRADE-DA-COSTA, BELMIRA LARA DA SILVEIRA; CASTELLANO, BERNARDO; GUEDES, RUBEM CARLOS ARAUJO. Spreading depression features and Iba1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 33, p. 98-105, 2014.

Int. J. Devl Neuroscience 33 (2014) 98–105



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Developmental Neuroscience

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijdevneu](http://www.elsevier.com/locate/ijdevneu)



## Spreading depression features and Iba1 immunoreactivity in the cerebral cortex of developing rats submitted to treadmill exercise after treatment with monosodium glutamate



Cássia Borges Lima<sup>a</sup>, Georgia de Sousa Ferreira Soares<sup>b</sup>, Suênia Marcelle Vitor<sup>b</sup>,  
Belmira Lara da Silveira Andrade-da-Costa<sup>a</sup>, Bernardo Castellano<sup>c</sup>,  
Rubem Carlos Araujo Guedes<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901 Recife, Brazil

<sup>b</sup> Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670901 Recife, Brazil

<sup>c</sup> Unit of Medical Histology, Institute of Neuroscience and Dept Cell Biology, Physiology and Immunology, Autonomous University of Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 July 2013

Received in revised form 9 November 2013

Accepted 18 December 2013

#### Keywords:

Brain development  
Brain electrophysiology  
Cortical spreading depression  
Food flavoring agents  
Rats  
Treadmill exercise

### ABSTRACT

Physical exercise and excessive consumption of monosodium glutamate (MSG) can affect the morphological and electrophysiological organization of the brain during development. However, the interaction of both factors remains unclear. We analyzed the effect of this interaction on the excitability-related phenomenon known as cortical spreading depression (CSD) and the microglial reaction expressed as Iba1-immunolabeled cells in the rat motor cortex. MSG (2 g/kg or 4 g/kg) was administered every other day during the first 14 postnatal days. Treadmill exercise started at 21–23 days of life and lasted 3 weeks, 5 days/week, for 30 min/day. At 45–60 days, CSD was recorded for 4 h at two cortical points and the CSD parameters (velocity, amplitude, and duration of the negative potential change) calculated. Confirming previous observations, exercised rats presented with lower CSD velocities ( $3.29 \pm 0.18$  mm/min) than the sedentary group ( $3.80 \pm 0.18$  mm/min;  $P < 0.05$ ). MSG increased CSD velocities in the exercised rats compared to saline-treated and exercised animals in a dose-dependent manner ( $3.49 \pm 0.19$ ,  $4.05 \pm 0.18$ , and  $3.27 \pm 0.26$  for 2 g/kg MSG, 4 g/kg MSG, and saline, respectively;  $P < 0.05$ ). The amplitude (ranging from  $14.3 \pm 5.9$  to  $18.7 \pm 6.2$  mV) and duration ( $46.7 \pm 11.1$  to  $60.5 \pm 11.6$  s) of the negative slow potential shift of the CSD were similar in all groups. Both exercise and MSG treatment increased Iba1 immunolabeling. The results confirm that physical exercise decelerates CSD propagation. However, it does not impede the CSD-accelerating action of MSG. These effects were accompanied by a cortical microglia reaction. Therefore, the data suggest that treadmill exercise early in life can influence the development of cortical electrical activity.

© 2013 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

LIMA, CÁSSIA BORGES; SOARES, GEÓRGIA DE SOUSA FERREIRA; VITOR, SUÊNIA MARCELE; CASTELLANO, BERNARDO; ANDRADE DA COSTA, BELMIRA LARA DA SILVEIRA; GUEDES, RUBEM CARLOS ARAÚJO. Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex. *Life Sciences*, v. 93, p. 388-392, 2013.

Life Sciences 93 (2013) 388–392



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lifescie](http://www.elsevier.com/locate/lifescie)



## Neonatal treatment with monosodium glutamate lastingly facilitates spreading depression in the rat cortex

Cássia Borges Lima<sup>a</sup>, Geórgia de Sousa Ferreira Soares<sup>a</sup>, Suênia Marcelle Vitor<sup>a</sup>, Bernardo Castellano<sup>b</sup>, Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa<sup>c</sup>, Rubem Carlos Araújo Guedes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Nutrition, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>b</sup> Unit of Medical Histology, Autonomous University of Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 April 2013

Accepted 10 July 2013

#### Keywords:

Food flavoring agent  
Brain development  
Brain electrophysiology  
Glutamatergic system  
Rat

### ABSTRACT

**Aims:** Monosodium glutamate (MSG) is a neuroexcitatory amino acid used in human food to enhance flavor. MSG can affect the morphological and electrophysiological organization of the brain. This effect is more severe during brain development. Here, we investigated the electrophysiological and morphological effects of MSG in the developing rat brain by characterizing changes in the excitability-related phenomenon of cortical spreading depression (CSD) and microglial reaction.

**Main methods:** From postnatal days 1–14, Wistar rat pups received 2 or 4 g/kg MSG (groups MSG-2 and MSG-4, respectively;  $n = 9$  in each group), saline ( $n = 10$ ) or no treatment (naïve group;  $n = 5$ ) every other day. At 45–60 days, CSD was recorded on two cortical points for 4 h. The CSD parameters velocity, and amplitude and duration of the negative potential change were calculated. Fixative-perfused brain sections were immunolabeled with anti-IBA-1 antibodies to identify and quantify cortical microglia.

**Key findings:** MSG-4 rats presented significantly higher velocities ( $4.59 \pm 0.34$  mm/min) than the controls (saline,  $3.84 \pm 0.20$  mm/min; naïve,  $3.71 \pm 0.8$  mm/min) and MSG-2 group ( $3.75 \pm 0.10$  mm/min). The amplitude ( $8.8 \pm 2.2$  to  $11.2 \pm 1.9$  mV) and duration ( $58.2 \pm 7.1$  to  $73.6 \pm 6.0$  s) of the negative slow potential shift was similar in all groups. MSG-treatment dose-dependently increased the microglial immunolabeling.

**Significance:** The results demonstrate a novel, dose-dependent action of MSG in the developing brain, characterized by acceleration of CSD and significant microglial reaction in the cerebral cortex. The CSD effect indicates that MSG can influence cortical excitability, during brain development, as evaluated by CSD acceleration. Data suggest caution when consuming MSG, especially in developing organisms.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.



DA SILVA GERMANO, PAULA CATIRINA PEREIRA; SILVA, DÉBORA DE LIMA E; SOARES, GEÓRGIA DE SOUSA FERREIRA; DOS SANTOS, ÂNGELA AMÂNCIO; GUEDES, RUBEM CARLOS ARAÚJO. Hypercaloric high-lipid diet and brain development: Effects on cortical spreading depression in adult rats. *Nutritional Neuroscience*, v. 16, p. 275-281, 2013.

Original research paper

## Hypercaloric high-lipid diet and brain development: Effects on cortical spreading depression in adult rats

Paula Catirina Pereira da Silva Germano<sup>1</sup>, Débora de Lima e Silva<sup>2</sup>,  
Geórgia de Sousa Ferreira Soares<sup>1</sup>, Ângela Amâncio dos Santos<sup>2</sup>,  
Rubem Carlos Araújo Guedes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife PE, Brazil, <sup>2</sup>Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife PE, Brazil

Nutritional conditions early in life constitute one of the environmental factors that can influence brain electrophysiology, as evaluated through the phenomenon denominated as cortical spreading depression (CSD).

**Objective:** To evaluate the effects of hypercaloric diet intake in different phases of life on CSD features in adult rats.

**Methods:** Newborn Wistar rats were suckled by dams fed a high-lipid (cafeteria) hypercaloric diet during the lactation period. After suckling, part of the pups remained in the high-lipid diet until the end of the experiment in adulthood (group 'full-life' FL), and the other part received the control (lab chow) diet (group L). A third group received the hypercaloric diet only at adulthood (group Ad). When the animals reached 90–93 days of life, CSD was recorded.

**Results:** CSD propagation velocities (in mm/minute) and CSD amplitudes (in mV) were reduced ( $P < 0.05$ ) in the groups L ( $2.77 \pm 0.07$  and  $7.1 \pm 2.0$  for velocity and amplitude, respectively) and FL ( $3.05 \pm 0.17$  and  $8.5 \pm 1.9$ ), but not in the group Ad ( $3.36 \pm 0.11$  and  $10.7 \pm 2.0$ ), in comparison with a control group (C), fed the lab chow diet during the entire life ( $3.52 \pm 0.18$  and  $10.8 \pm 2.2$ ).

**Discussion:** CSD velocity changes observed in adulthood were associated with the hypercaloric dietary treatment during brain development, constituting evidence in favor of permanent or at least long-lasting electrophysiological effects related to the prevailing nutritional status during the period of brain growth spurt.

**Keywords:** Central nervous system, Cortical spreading depression, High-energy diet



**SOARES, GEÓRGIA DE SOUSA FERREIRA;** GUEDES, RUBEM CARLOS ARAÚJO. Antagonistic effect of the lectin ConA on cortical spreading depression in well-nourished and previously malnourished adult rats. In: **XXVII Reunião Anual Da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia -São Paulo, 2012.** XXVII Reunião Anual Da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2012.



ALVES, A.; SALVADOR, C.; **SOARES, GEÓRGIA DE SOUSA FERREIRA.** Foto Estimulação do Córtex Cerebral Utilizando Pulsos de Laser. In: **XXX Encontro de Físicos do Norte e Nordeste, Salvador, 2012.** XXX Encontro de Físicos do Norte e Nordeste, 2012.



## Trabalhos apresentados em Congressos

**SOARES, GEÓRGIA DE SOUSA FERREIRA.** La biodiversitat vegetal i la seva relació amb la nutrició i les línies de recerca i desenvolupament en la nutrició del Brasil. *Palestra apresentada na Universitat de Barcelona-UB, Barcelona, 2013.*



Doutoranda Geórgia de Sousa Ferreira Soares ministra conferência na Universidade de Barcelona

Durante o evento Alimentação e Nutrição al Brasil - Conferências e Tallers Gastronòmics, da Universidade de Barcelona, a doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Nutrição da UFPE, Geórgia de Sousa Ferreira Soares apresentou a conferência "La biodiversitat vegetal i la seva relació amb la nutrició i les línies de recerca i desenvolupament en la nutrició del Brasil".

**SOARES, G. S. F.; CAVALCANTI, L. C.; GUEDES, R. C. A.; SOUSA FERREIRA SOARES, GEÓRGIA.** Treatment early in life with the lectin ConA decelerates spreading depression in well-nourished and early-malnourished adult rats. *XI European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, Berlim, Alemanha, 2013.*

**SOARES, GEORGIA DE SOUSA FERREIRA;** Guedes,R.C.A. Antagonistic effect of the lectin ConA on cortical spreading depression in well-nourished and previously malnourished adult rats. *XXVII Reunião Anual Da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia -São Paulo, 2012.*

ALVES, A; SALVADOR, C; GUEDES, R.; **SOARES, GEORGIA DE SOUSA FERREIRA.** Foto Estimulação do Córtex Cerebral Utilizando Pulsos de Laser. *XXX Encontro de Físicos do Norte e Nordeste, Salvador, 2012.*