



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MANOELA DE AGUIAR FERREIRA

**UM ESTUDO SOBRE GALECTINAS 1, 3, 4 E PAR-4 NA
MODULAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO**

Recife
2022

MANOELA DE AGUIAR FERREIRA

**UM ESTUDO SOBRE GALECTINAS 1, 3, 4 E PAR-4 NA
MODULAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Profa. Dra. Michelle Melgarejo da Rosa.

Co-orientador: Dr. Joelson Germano Crispim.

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Ferreira, Manoela de Aguiar.

Um estudo sobre galectinas 1, 3, 4 e PAR-4 na modulação da memória de medo / Manoela de Aguiar Ferreira. - Recife, 2022.

62 p : il.

Orientador(a): Michelle Melgarejo da Rosa

Cooorientador(a): Joelson Germano Crispim

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Galectinas. 2. PAR-4. 3. Memória. 4. Medo condicionado contextual. 5. Cognição. I. Rosa, Michelle Melgarejo da . (Orientação). II. Crispim, Joelson Germano. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

MANOELA DE AGUIAR FERREIRA

**UM ESTUDO SOBRE GALECTINAS 1, 3, 4 E PAR-4 NA
MODULAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr.....
Instituição/ Departamento

Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

Prof. Dr.
Instituição/ Departamento

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Dra. Michelle Melgarejo da Rosa, professora do Departamento de Bioquímica, do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco que me acolheu, ensinou, auxiliou e orientou dentro do espaço acadêmico, dando-me a oportunidade de iniciar-me à pesquisa científica, apesar da dificuldade fornecida tanto em virtude do período pandêmico como pelas tarefas estudantis habituais.

Ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino (NUPIT-SG) da UFPE que me integrou ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) da UFPE, onde tive a oportunidade de conhecer a minha orientadora e tantos profissionais que contribuíram para o meu projeto. Agradeço especialmente ao meu co-orientador Dr. Joelson Germano Crispim que se disponibilizou nesta jornada final e a Maria Clara que teve paciência e cedeu parte de seu valioso tempo para me ensinar.

Agradeço também a professora Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão e equipe que auxiliou-me durante os experimentos. Ainda ao professor Dr. Filipe Silveira Duarte do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental e demais integrantes que permitiram a realização do projeto.

Também agradeço à Propesqi da UFPE juntamente à CNPQ pela bolsa de iniciação científica (PIBIC) ofertada, voltada aos docentes da UFPE da categoria Recém– Doutor que serviu como incentivo à pesquisa científica.

Sou grata à Universidade Federal de Pernambuco por ser favorecida pela programa de Moradia Estudantil da UFPE e por isso, ser moradora e bolsista da Casa do Estudante Mista. O programa foi imprescindível para minha manutenção no espaço universitário.

Gostaria de agradecer também a minha querida família que sempre me apoiou e confiou em mim quando se fez necessário. Sabemos quanto tempo, esforço, abdicções e recursos foram necessários para alcançar esta realização.

A minha amiga Karolaine que esteve comigo antes mesmo do início e me ajudou sempre com boa vontade e sua inteligência admirável. A Jussara que me cedeu uma chance e se tornou um elemento essencial para uma boa graduação. A Álex que somou-se às anteriores e compartilhou conosco as conquistas e

infortúnios.

As minhas colegas de quarto Evellyn, Deysielen e Raelli que tornaram a minha vivência como moradora da Casa do Estudante Mista da UFPE mais refrescante e calorosa.

E não menos importante agradeço a Deus pela sabedoria que me foi entregue e a resiliência necessária para concluir este grande objetivo de graduar-me.

FERREIRA, Manoela De Aguiar. **Um estudo sobre galectinas 1, 3, 4 e PAR-4 na modulação da memória de medo**. 2022. 62 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

As galectinas são proteínas ligadoras de resíduos de carboidratos reconhecidas por exercerem importantes funções anti e pró-inflamatórias. No Sistema Nervoso Central (SNC), estudos mostram que a expressão de galectina 1 nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo se correlaciona positivamente às habilidades cognitivas visto que camundongos mutados deficientes para galectina 1 mostraram prejuízo de aprendizado na tarefa de labirinto aquático e aprendizado de medo contextual. Quanto à galectina 3, estudos mostram que regula negativamente a formação da memórias dependente do hipocampo por intermédio da inibição da sinalização de integrina e sua fosforilação, ademais apresenta papel neuroinflamatório. Por outro lado a galectina 4 foi sugerida como capaz de regular o crescimento de neuritos, a biogênese das bainhas de mielina e o transporte axonal de glicoproteínas sinápticas, o que confere um possível densenvolvimento neuroprotetor da galectina 4. Ainda não se sabe se a galectina 4 tem ação pró-inflamatória ou anti-inflamatória. Outra proteína de interesse científico é a PAR-4, proteína de resposta apoptótica 4, ela é expressa ubiquamente nos tecidos com função pró-apoptótica, mas também influencia a proliferação tumoral. Ainda são escassas as informações sobre o envolvimento de galectinas e PAR-4 na consolidação de memórias. Assim, neste trabalho, buscamos investigar o envolvimento de galectinas e proteína PAR-4 na consolidação de memórias aversivas, utilizando a tarefa de medo condicionado contextual. Para tal, camundongos machos foram treinados na tarefa de condicionamento de medo contextual e sacrificados em 30 minutos, 3 horas ou 6 horas pós treino, para análise da janela temporal de modulação das proteínas na fase de consolidação da memória. O treinamento na tarefa de medo condicionado contextual envolve a exposição do animal a um estímulo condicionado (EC-contexto) e a exposição a um estímulo incondicionado (EI - choque) para que um traço de memória seja formada entre o reconhecimento do EC associado a um EI. Esta associação é reconhecida como um parâmetro de formação de memórias aversivas. Após o sacrifício dos animais nos tempos propostos, os hipocampus dos camundongos foram homogeneizados ou parafeinizado para análise da expressão de galectinas 1, 3, 4 e PAR-4 pelas técnicas de western blot ou imunohistoquímica, respectivamente. Como resultados, os níveis proteicos de galectina 1, 3 e PAR-4 nos hipocampus dos animais treinados não demonstraram diferença relevante quando comparado com o controle em quaisquer tempos avaliados. No entanto, visualizou-se uma menor expressão de galectina 4 no tempo de 3 horas após o treino. Sugere-se um possível papel neuroprotetor que condicione a redução dos processos neuroinflamatórios durante a fase de consolidação da memória. Amejou-se aqui, identificar novas vias neuromoleculares importantes para a consolidação de memórias aversivas e com isso identificar novas ferramentas de intervenção para minimizar a consolidação destas memórias.

Palavras-chave: Galectinas. PAR-4. Memória. Medo condicionado contextual. Cognição.

FERREIRA, Manoela de Aguiar. **A study on galectins 1, 3, 4 and par-4 in fear memory modulation**. 2022. 62 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

Galectins are carbohydrate residue-binding proteins recognized for exerting important anti- and pro-inflammatory functions. In the Central Nervous System (CNS), studies show that the expression of galectin 1 in the CA1 and CA3 regions of the hippocampus is positively correlated with cognitive abilities since mutated mice deficient for galectin 1 showed learning impairment in the water maze task and fear learning contextual. As for galectin 3, studies show that it negatively regulates the formation of hippocampus-dependent memory through the inhibition of integrin signaling and its phosphorylation, in addition to having a neuroinflammatory role. On the other hand, galectin 4 has been suggested to regulate neurite outgrowth, the biogenesis of myelin sheaths and the axonal transport of synaptic glycoproteins, which confers a possible neuroprotective development of galectin 4. It is not yet known whether galectin 4 has pro-inflammatory or anti-inflammatory action. Another protein of scientific interest is PAR-4, prostate apoptosis response 4, it is an protein ubiquitously expressed in tissues with pro-apoptotic function, but also influences tumor proliferation. There is still little information about the involvement of galectins and PAR-4 in the consolidation of memories. Thus, in this work we seek to investigate the involvement of galectins and PAR-4 protein in the consolidation of aversive memories, using the contextual conditioned fear task. For this, male mice were trained in the contextual fear conditioning task and sacrificed at 30 minutes, 3 hours or 6 hours post-training, to analyze the temporal window of protein modulation in the memory consolidation phase. Training in the contextual conditioned fear task involves exposing the animal to a conditioned stimulus (CS - context) and exposure to an unconditioned stimulus (US - shock) so that a memory trace is formed between the recognition of the CS associated with an US. This association is recognized as a parameter for the formation of aversive memories. After the animals were sacrificed at the proposed times, the animals' hippocampi were homogenized or paraffinized for analysis of the expression of galectins 1, 3, 4 and PAR-4 by western blot or immunohistochemical techniques, respectively. As a result, the protein levels of galectin 1, 3 and PAR-4 in the hippocampus of the trained animals did not show relevant difference when compared with the control in any evaluated times. However, a lower expression of galectin 4 was seen at 3 hours after training. A possible neuroprotective role is suggested that conditions the reduction of neuroinflammatory processes during the memory consolidation phase. The aim here was to identify new important neuromolecular pathways for the consolidation of aversive memories and with that to identify new intervention tools to minimize the consolidation of these memories.

Key words: Galectins. PAR-4. Memory. Fear conditioning. Cognition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Classificação das galectinas segundo sua estrutura em: prototípica, tandem-repeat e quimera . Organização espacial e ligação a B-galactosídeos.....15
- Figura 2** - A) Análise de Western blot com a expressão das galectinas 1, 3 e 7 no bulbo olfatório (OB), córtex frontal (CF), estriado (ST), amígdala (Amy) e hipocampo (Hip) no cérebro de rato. B) Análise quantitativa do western blot para as galectinas 1, 3 e 7. C) Imunohistoquímica focada na galectina 3 na região CA1 do hipocampo de rato e NeuN.24
- Figura 3** - Expressão proteica do homogenato do hipocampo de camundongos após o treino da tarefa de medo condicionado contextual, pela técnica de western blot. Na imagem, C1 representa um animal controle, isto é, aquele que não foi treinado na tarefa de medo condicionado contextual, representando a expressão endógena de proteínas. Enquanto que T representa os animais que foram submetidos ao treino na tarefa e que após 30 minutos do treino foram sacrificados. Foram representados três animais tratados: T1, T2 e T3. Eles representam a expressão de proteínas do processo de consolidação da memória de medo.40
- Figura 4** - Expressão proteica do homogenato do hipocampo de camundongos após o treino da tarefa de medo condicionado contextual, pela técnica de western blot. Na imagem, C representa animais controles, isto é, aquele que não foi treinado na tarefa de medo condicionado contextual, representando a expressão endógena de proteínas. Foram representados três animais controles: C1, C2 e C3. Enquanto que T representa os animais que foram submetidos ao treino na tarefa e que após 3 horas do treino foram sacrificados. Foram representados três animais tratados: T1,

T2 e T3. Eles representam a expressão de proteínas do processo de consolidação da memória de medo.41

Figura 5 - Expressão proteica do homogenato do hipocampo de camundongos após o treino da tarefa de medo condicionado contextual, pela técnica de western blot. Na imagem, C representa animais controles, isto é, aquele que não foi treinado na tarefa de medo condicionado contextual, representando a expressão endógena de proteínas. Foram representados dois animais controles: C1 e C2. Enquanto que T representa os animais que foram submetidos ao treino na tarefa e que após 6 horas do treino foram sacrificados, foram representados três animais tratados: T1 e T2 Eles representam a expressão de proteínas do processo de consolidação da memória de medo.43

Figura 6 - Análise de preparação histológica de hipocampus de camundongos treinados. Na figura 6A é representado o tecido processado e na figura 6B foi utilizada a coloração de hematoxilina-eosina, confirmando morfologia normal dos hipocampus dos animais.44

Figura 7 - Fotografias obtidas da imunohistoquímica por meio de microscopia eletrônica. Foram utilizados anticorpos anti-galectina 1 (gal 1), anti-PAR-4, anti-galectina 4 (gal 4), o marcador nuclear 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), um controle positivo com um corte tecidual previamente positivo para a proteína específica e um controle negativo com um corte tecidual ausente da proteína específica. O controle 1 refere-se ao animal que não foi submetido à tarefa de medo condicionado e o tratado 1 refere-se ao animal que realizou a tarefa de medo condicionado.45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CRD	Domínio de Reconhecimento de Carboidratos
D2DR	Receptor da Dopamina D2
DA	Doença de Alzheimer
DAPI	4,6-diamino-2-fenilindol
DP	Doença de Parkinson
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
Ei	Estímulo Incondicionado
EC	Estímulo Contextual
Gal-1	Galectina 1
Gal-3	Galectina 3
Gal-4	Galectina 4
IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
LacNAc	N-acetilactosamina
LDCL	Linhagens Celulares Derivadas de Linfócitos
MCL1	Proteína de Diferenciação Celular de Leucemia Mielóide Induzida 1
MEC	Matrix Extracelular
NCAM	Molécula de Adesão de Células Neurais
NFKB	Fator Nuclear KB
NMDA	N-metil D-Aspartato
PAR-4	Proteína de Resposta Apoptótica 4
PR3	Proteinase 3
PS1	Presenilina 1
SNC	Sistema Nervoso Central
TREG	Célula T reguladora
TLR4	Receptor Toll-Like 4
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Galectinas	14
1.1.1 Galectina 1	16
1.1.1.1 Neuroinflamação e atuação em doenças neurodegenerativas	17
1.1.1.2 Cognição, memória e estresse	19
1.1.2 Galectina 3	20
1.1.2.1 Principais funções no sistema nervoso central e atuação em doenças neurodegenerativas	20
1.1.2.2 Cognição, memória e estresse	23
1.1.3 Galectina 4	25
1.1.3.1 Inflamação	26
1.1.3.2 Atuação no sistema nervoso central	26
1.2 Proteína de resposta apoptótica 4	28
1.2.1 Principais Funções no Sistema Nervoso Central	28
1.3 Memória	30
1.3.1 Medo Condicionado Contextual e o Estudo das Memórias Aversivas em Roedores	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3 METODOLOGIA	34
3.1 Desenho Experimental	35
3.2 Animais	35
3.3 Medo Condicionado Contextual	35
3.4 Western Blot	36
3.5 Histologia e Imunohistoquímica	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICES	57
APÊNDICE A	57
ANEXOS	59
ANEXO A	59
ANEXO B	62

1 Introdução

Pertencentes à uma extensa família de lectinas, as galectinas são proteínas reconhecidas por se envolverem em diversas atividades biológicas, exercendo papéis no que concerne a inflamação, adesão celular, diferenciação celular, entre outras (BARONDES et al., 1994; BLANCHARD et al., 2016). Há a presença de um domínio de reconhecimento de carboidratos que promove a ligação das galectinas a B-galactosídeos celulares (BARONDES et al., 1994). Ao todo foram descobertas quinze tipos diferentes de galectinas (BLANCHARD et al., 2016), todavia, ao que tange o SNC são as galectinas 1, 3, 4, 8 e 9 as mais presentes.

Estudos sobre a galectina 1 (gal-1) indicaram a expressão da proteína nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo correlacionada positivamente às habilidades cognitivas (SAKAGUCHI et al., 2011). Por outro lado, foi observado que há baixa expressão da proteína no hipocampo de animais treinados na tarefa de medo condicionado contextual (CHEN et al., 2017). Ademais, outro estudo relata que níveis elevados de gal-1 induzem a expressão do fator neurotrófico do cérebro (BDNF), promovendo no SNC a recuperação de lesões, e diminui a perda neuronal ocorrente em pacientes com a doença de Alzheimer (QU et al., 2010).

Similarmente a gal-1, os níveis de galectina 3 (gal-3) também também se apresentaram diminuídos após a tarefa de medo condicionado contextual (CHEN et al., 2017). Neste estudo foi demonstrado que ela regula negativamente a formação da memória dependente do hipocampo (CHEN et al., 2017). Além disso, a gal-3 foi exposta como molécula pró-inflamatória aumentando o número de células gliais, macrófagos, linfócitos e citocinas no SNC (HENDERSON E SETHI, 2009). Outrossim, os autores correlacionam seu papel pró-inflamatório com superexcitação glial e declínio nas habilidades cognitivas (HENDERSON E SETHI, 2009).

De maneira distinta, são escassos os estudos sobre o papel da galectina 4 (gal-4) no SNC. Entretanto, foi anteriormente comprovada a sua expressão em diversas áreas encefálicas, como em áreas corticais, hipocampais, neurônios olfativos e gânglios da raiz dorsal (STANCIC et al., 2012). Além disso, foi sugerida a capacidade dela de regular o crescimento de neuritos, a biogênese das bainhas de mielina e o transporte axonal de glicoproteínas sinápticas (STANCIC et al., 2012), o que lhe confere um possível desenvolvimento neuroprotetor. Ainda, as ações pró-inflamatória ou anti-inflamatória de gal-4 permanecem um campo de debate na

literatura (DA ROSA, 2021).

Outra proteína que em estudos anteriores pareceu ter um papel interessante no âmbito no SNC foi a Proteína de Resposta Apoptótica 4 (PAR-4). Ela tem como principal função sua característica pró-apoptótica (SELLS et al., 1997; EL-GUENDY et al., 2003). Ela possui um domínio zíper de leucina no seu terminal carbóxi que exerce sua atividade pró-apoptótica ao inibir a atividade do fator de transcrição NF-kB, importante para a sobrevivência celular, e condiciona a ativação do receptor de morte Fas e FasL. Em um estudo feito com um modelo animal da doença de Alzheimer, observou-se uma expressão aumentada de PAR-4 em neurônios vulneráveis à apoptose (GUO et al., 1998). Entretanto, informações sobre o envolvimento de PAR-4 no SNC tanto sobre processos cognitivos quanto memórias aversivas são ainda incipientes.

As memórias aversivas são facilmente criadas durante a rotina diária, haja visto o estresse ao qual a população humana é submetida constantemente. O estresse atual por si só já foi relacionado com diversas alterações psicológicas e problemas cognitivos e de desenvolvimento (MAENG et al., 2010). Modelos animais possibilitam estudar a influência de moléculas na fase de consolidação de memórias aversivas.

O modelo de medo condicionado contextual é um tipo de condicionamento pavloviano que visa formar memórias aversivas associadas a um contexto. Por exemplo, neste teste animais são expostos a um estímulo incondicionado aversivo (EI), isto é, um estímulo aversivo independente que é associado a um contexto, ou seja, um estímulo contextual (EC). Esta associação induz a formação de um traço de memória traumática relacionado a EC-EI. A retenção da memória é avaliada quando os animais são reexpostos ao contexto horas ou dias após a exposição inicial. Animais que lembram a associação EC-EI apresentam uma maior percentagem de respostas de medo, representadas pela ausência de movimentos dos animais, com exceção de movimentos respiratórios (CHAAYA et al., 2018).

Isto posto, este estudo visará avaliar o envolvimento das galectinas 1, 3, 4 PAR-4 na modulação da memória de medo a partir da técnica de medo condicionado contextual, western blot e imunohistoquímica.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Galectinas

Constituintes de uma grande família dentro das lectinas, as galectinas estão associadas com diversas atividades biológicas de apoptose, adesão celular, inflamação, diferenciação celular, entre outras (BARONDES et al., 1994; BLANCHARD et al., 2016).

No total existem cerca de 15 galectinas (BLANCHARD et al., 2016; VASTA, 2012) que foram nomeadas e numeradas de acordo com a ordem de descobrimento. Elas são expressas em organismos multicelulares ao que tange tanto vertebrados, quanto invertebrados (COOPER, 2002). Johannes e colegas (2018) selecionaram na literatura e apresentaram a distribuição nos tecidos e espécies das galectinas e proteínas relacionadas a galectinas.

As galectinas são proteínas solúveis, majoritariamente não glicosiladas, estão presentes no espaço intracelular no citoplasma e núcleo, onde exercem suas funções biológicas. Entretanto, também podem ser encontradas no espaço extracelular. Apesar de não apresentarem uma sequência sinal, elas são capazes de serem secretadas por um mecanismo de secreção não-clássico (COOPER, 2002)

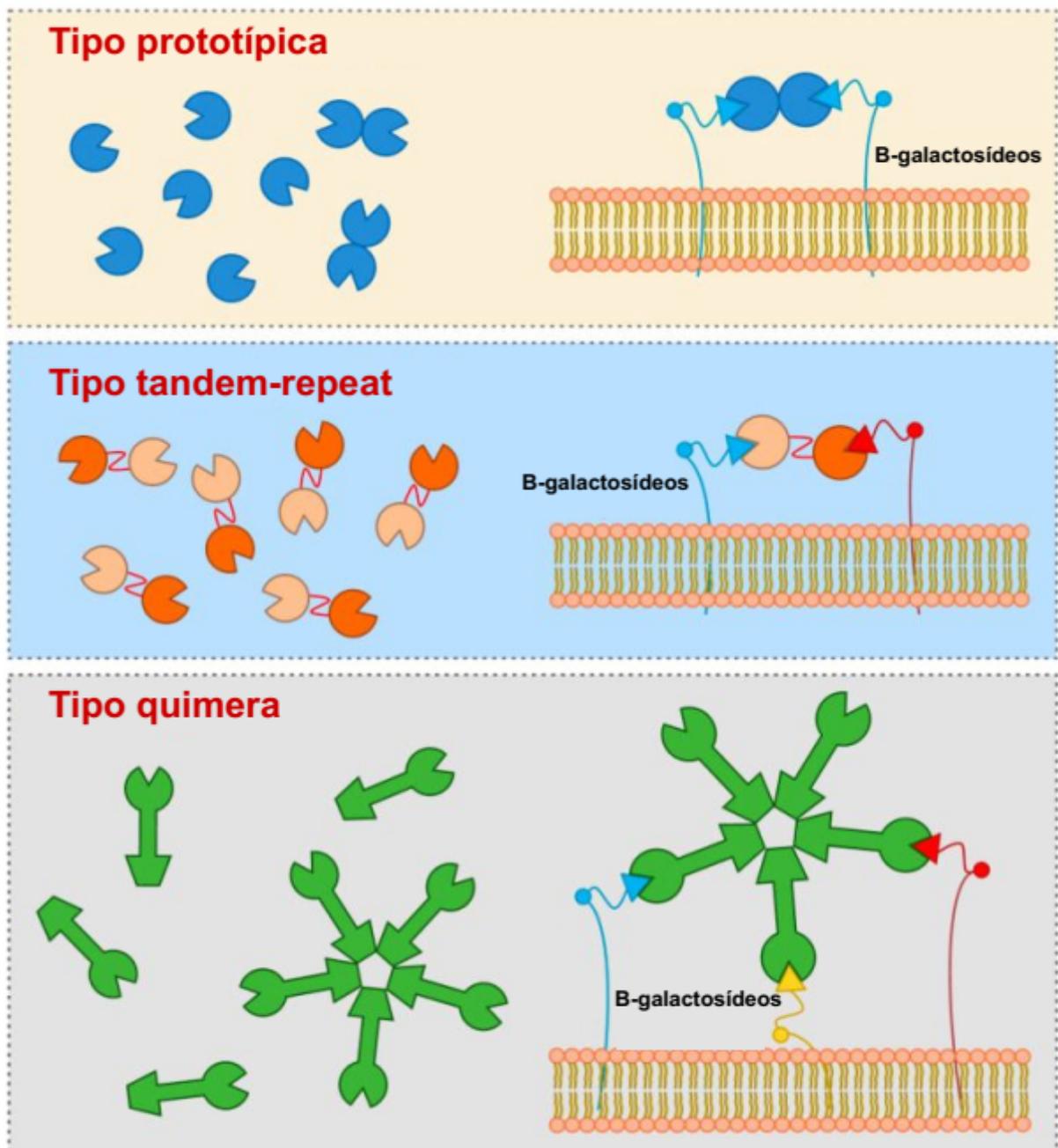
Como representantes das lectinas, as galectinas são aptas a ligarem-se a B-galactosídeos de carboidratos (BARONDES et al., 1994) e assim exercerem suas funções. Essas proteínas se ligam aos carboidratos por intermédio de domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) conservados que estão presentes em todas as galectinas e é usado como critério de classificação estrutural entre elas (YANG et al., 2008). Yang *et al.* (2008) abordam as galectinas agrupando-as de acordo com a semelhança estrutural quanto aos CRDs e as divide em três grupos: prototípica, tipo tandem-repeat e o tipo quimera.

A maioria das galectinas concentram-se no grupo prototípica, são as galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13 e 15. Nesta classe, as galectinas apresentam apenas um CRD. No tipo tandem-repeat são caracterizadas as galectinas 4, 6, 8, 9 e 12. Sua estrutura contém dois CRDs que são homólogos em uma cadeia polipeptídica e apresenta um ligante, de até 70 aminoácidos, que os separa. E o último grupo é o tipo quimera que tem como única representante a galectina 3. Ao analisar a estrutura da galectina 3, ela apresenta um CRD na região C-terminal e difere das

demais por conter uma região N-terminal não-lectina rica em prolina e glicina que é ligada ao CRD (VASTA, 2012; YANG et al., 2008). A estrutura das galectinas permite que muitas delas consigam se organizar para se ligarem a vários carboidratos, tornando-as bivalentes ou multivalentes, elas podem se organizar como dímeros e no caso da galectina 3, que é classificada como tipo quimera, ela consegue se organizar em pentâmeros (BREWER, 2002; SACCHETTINI et al., 2001), podendo ser visto na figura 1.

Ao que tange o SNC algumas são marcadamente mais expressas, são as galectinas 1, 3, 4, 8 e 9 (STANCIC et al., 2011). Essa família de proteínas despertou interesse científico principalmente por influírem em atividades inflamatórias e apoptóticas que podem exercer funções pertinentes em condições fisiológicas, como processos cognitivos e de memória, mas também em processos patológicos como já observado em doenças de Alzheimer (DA) (DA ROSA et al., 2021), doença de Parkinson (DP) (BOZA-SERRANO et al., 2014), Isquemia cerebral (DOVERHAG et al., 2010) e outras.

Figura 1: Classificação das galectinas segundo sua estrutura em: prototípica, tandem-repeat e quimera. Organização espacial e ligação a B-galactosídeos.



Fonte: SREJOVIC, I.

1.1.1 Galectina 1

A primeira galectina identificada, a gal-1, está agrupada pela sua natureza estrutural nas galectinas prototípicas (VASTA, 2012). Dentre suas funções mais reconhecidas, ela exibiu, tanto intra como extracelularmente, a capacidade de inibir

a adesão de células imunes, alterar a sinalização e expressão de citocinas no contexto inflamatória (SUNDBLAD et al., 2017).

1.1.1.1 Neuroinflamação e atuação em doenças neurodegenerativas

Vastamente discutida como uma molécula imunomoduladora, a gal-1 possui diversas atividades extracelulares e intracelulares. Ela exerce funções relacionadas a atividade imunossupressora e anti-inflamatória, seja na inflamação aguda ou crônica. Para mais, a sua atuação anti-inflamatória é possibilitada principalmente devido à ativação de macrófagos (SUNDBLAD et al., 2017).

No entanto, estudos recentes discutem seu papel para além da atividade anti-inflamatória e a postulam também como pró-resolutiva. No estudo de Yaseen *et al.* (2020) camundongos ausentes de gal-1 demonstraram hiperinflamação durante a resolução de uma peritonite mediada por zymosan A, onde houve redução numérica de macrófagos, redução de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10, e aumento de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 12. Ademais, a enzima pró-resolução 12/15-lipoxigenase demorou a ser expressa em macrófagos em contraposição aos altos níveis da proteinase 3 (PR3) no líquido peritoneal de camundongos nulos para gal-1.

Autores do Reino Unido, Law e colegas (2020), também usaram de zymosan para ocasionar peritonite em camundongos nulos para a proteína. Durante o estudo, animais receberam administração de gal-1 recombinante e após 24 e 48 horas do pico de inflamação houve redução do número de neutrófilos. O tratamento resultou no aumento da apoptose de neutrófilos, o que reforçou o seu envolvimento pró-resolutivo.

Assim como a gal-1 incita a resposta anti-inflamatória em macrófagos, também gera essa resposta no sistema nervoso central a nível de micróglia (STAROSSOM et al., 2012), mostrando, portanto, envolvimento na neuroinflamação. Starossom e parceiros (2012) avaliaram a influência que a proteína exerce no SNC e os mecanismos relacionados à ativação de microglia dentro do modelo animal de esclerose múltipla, a encefalomielite autoimune experimental (EAE), encontrando que a gal-1 desativa a microglia classicamente ativada e protege da neurodegeneração induzida por inflamação.

Diversos estudiosos do nicho de estudos neurodegenerativos dissertam sobre a importância da neuroinflamação em processos neurodegenerativos. Com isto, eles puderam direcionar as galectinas como agentes de potencial terapêutico conforme o abarcamento na inflamação, haja vista que, é inferido que a neuroinflamação contribui para danos neuronais e, conseqüentemente, o processo de neurodegeneração (RAMÍREZ HERNÁNDEZ, et al., 2020; RAMÍREZ HERNÁNDEZ, et al., 2022).

Em detrimento do caráter anti-inflamatório da gal-1, esta proteína foi apontada como molécula de potencial terapêutico, porém, não somente ela parece evitar a neurodegeneração, mas também é responsável por estimular a secreção de fatores neurotróficos pelos astrócitos, a exemplo do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (SASAKI et al., 2004) e promover a regeneração neuronal (ISHIBASHI et al., 2007).

No caso da esquizofrenia como doença neuropsiquiátrica que pode ser degenerativa, a pesquisadora Yüksel *et al.* (2020) realizaram uma pesquisa com pacientes com esquizofrenia, irmãos não afetados e controles saudáveis. Foi relatado que os níveis séricos de gal-1 eram estatisticamente maiores nos irmãos não afetados quando comparado com o grupo de pacientes e o grupo controle saudável.

Em modelos para a DP também buscou-se avaliar a interação da gal-1 com a condição neurodegenerativa. Em um trabalho foram usadas células MN9D, uma cultura de célula modelo para o estudo da DP. As células MN9D foram submetidas a nocaute de gal-1, o que gerou uma redução da propriedade de neuroproteção das células T reguladoras (TREGs). Ademais, a proteína interage com CD45 dentro de um mecanismo de contato célula a célula direcionando à transferência adotiva de TREGs que protegem os neurônios dopaminérgicos no modelo animal de DP (HUANG et al., 2020).

Outro estudo sobre a DP mostrou que a gal-1 minimizou o estado inflamatório ao inibir a ativação da microglia e diminuir a secreção de citocinas pró-inflamatórias e outros agentes pró-inflamatórios, além de melhorar o processo neurodegenerativo (LI et al., 2020b).

Também foram feitas pesquisas correlacionando a ligação da proteína com a neuropatogênese e evolução da DA. Uma dessas pesquisas foi realizada por Presa *et al.* (2019) em um modelo animal da DA, onde a proteína foi administrada por

cerca de três semanas. Os efeitos foram melhora cognitiva dos animais com DA. Além disso, houve redução da ativação da micróglia e indício do aumento da depuração de placas B-amilóides que se acumulam nas paredes vasculares hipocâmpais. Esses resultados se mostram positivos, já que o que os autores compreendem que a neuroinflamação e deposição de peptídeos B-amilóides são pontos-chaves na DA.

1.1.1.2 Cognição, memória e estresse

Chen *et al.* (2014) relataram que a gal-1 está expressa em diversas regiões encefálicas como cerebelo, prosencéfalo, bulbo olfatório, zona subventricular, neurônios, neurônios motores, células gliais e células de Schwann. Contudo, apenas a descoberta de sua expressão em áreas cerebrais relacionadas com a formação da memória encorajaram o início de estudos que buscam um possível envolvimento da gal-1 em processos cognitivos e na memória.

Neste espectro, Sakaguchi *et al.* (2011) observou que essa proteína é expressa nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Valendo-se do conhecimento de que o hipocampo é um importante local para a formação da memória, os pesquisadores buscaram avaliar a performance da gal-1 na memória hipocâmpal. Desta forma, foram usados camundongos mutantes nulos de gal-1 (gal-1^{-/-}) e camundongos selvagens, os quais foram submetidos a testes de aprendizado e memória. Verificou-se que ao comparar os camundongos selvagens com os camundongos gal-1^{-/-} que os camundongos nulos exibiram aprendizado prejudicado de acordo com os testes de labirinto aquático e o teste de medo condicionado contextual. Além disso, os autores confirmaram com outros testes que não houve influência de outros aspectos que provocam os déficits de aprendizagem espacial e contextual, logo, reforçando o envolvimento da galectina na memória dependente de hipocampo.

Contudo, na literatura são observadas discordâncias sobre o efeito da gal-1 na formação da memória. Foi abordado em um estudo ela é expressa em um tipo de células progenitoras neurais e regula negativamente a neurogênese no hipocampo adulto. O estudo valia-se do fato de células-tronco neuronais proliferarem no giro dentado do hipocampo. No estudo foi confirmada a sua expressão em células-tronco e que ela regula o processo de neurogênese negativamente, naquela região, em

animais adultos (IMAIZUMI et al., 2011).

Um diferente estudo produzido por Chen e parceiros (2017) trabalhou com ratos nulos de gal-1 e ratos selvagens, onde foi demonstrado que o treinamento de medo condicionamento contextual diminuiu significativamente o nível de expressão de gal-1 na área CA1 dos animais, enquanto que os animais com nocaute apresentaram uma boa retenção de memória. Logo, o que sugere uma modulação negativa na memória da proteína. Não obstante, os autores alegam que esses dados são discrepantes com a literatura anterior e conseqüentemente refletem que outros fatores podem ter encaminhado sua pesquisa para tais resultados como a própria metodologia empregada. O que não torna claro se sua presença prejudica a formação da memória.

Outro objeto de pesquisa da neurociência também foi avaliado e correlacionado com a implicação da gal-1, o estresse. Um estudo trabalhou com animais nulos para a proteína, neste caso, camundongos, e os submetem a testes comportamentais como teste do campo aberto, teste de natação forçada, teste de suspensão da cauda e teste de enterrar mármore. A comparação dos animais nulos com animais selvagens permitiu discernir que os animais sem expressão de gal-1 se mostravam prejudicados ao enfrentar o estresse. Além do mais, a ausência da proteína aumentava o comportamento compulsivo. Por conseguinte, os autores sugeriram que pode existir envolvimento de gal-1 com a neurobiologia da depressão e do comportamento obsessivo-compulsivo (SARTIM et al., 2020).

1.1.2 Galectina 3

Classificada estruturalmente como do tipo químera, a gal- 3 apresenta possibilidade de formar pentâmeros e fazer ligações com diversos carboidratos concomitantemente (YANG et al., 2008). Ela possui diversas funções. como adesão celular, apoptose, migração, sobrevivência e proliferação celular, respostas imunes e inflamação. Está presente em compartimentos intracelulares e também pode ser secretada para o espaço extracelular, exercendo funções em ambos os espaços (DONG et al., 2018; RAHIMIAN et al., 2018).

1.1.2.1 Principais funções no sistema nervoso central e atuação em doenças neurodegenerativas

A gal-3 é expressa em diversos tecidos do corpo e mostrou que também é expressa no SNC. Yoo *et al.* (2017), um grupo de pesquisadores da República da Coreia, averiguaram que não somente ela é expressa em células ependimárias, astrócitos da zona subventricular (COMTE *et al.*, 2011) e oligodendrócitos em desenvolvimento (Pasquini *et al.*, 2011). O estudo focou no cérebro de ratos e verificou a expressão da gal-3 em várias áreas hipotalâmicas, locais relacionados com essas áreas hipotalâmicas e com o sistema nervoso autônomo. Já Chen *et al.* (2017) avaliaram especificamente a sua expressão no córtex frontal, bulbo olfatório, corpo estriado, amígdala e hipocampo. Neste caso, a expressão de gal-3 é cerca de 2,5 a 6 vezes maior no hipocampo do que nas demais áreas.

No SNC, a proteína demonstrou estar envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos (SREJOVIC, 2020). No desenvolvimento normal do SNC trabalhos sugeriram a sua atuação na estimulação do crescimento de neuritos, adesão de células, migração de neuroblastos e diferenciação de oligodendrócitos (SHIN, 2013).

Por exemplo, no estudo de Pasquini *et al.* (2011) foram utilizados camundongos nulo para gal-3 e camundongos selvagens, onde avaliaram a expressão da proteína nos estágios de diferenciação dos oligodendrócitos e a frequência de mielinização dos axônios e as lamelas de mielina. Logo, foi visto que a gal-3 é expressa em vários estágios de diferenciação pelos oligodendrócitos, promovendo a sua diferenciação. Este último é necessário também a atuação de micróglia e astrócitos. Além disso, tanto a mielinização era menor nos axônios dos animais deficientes da proteína, quanto a mielina também se apresentava mais frouxa quando comparada com os animais selvagens. Desta forma, a gal-3 promove diferenciação de oligodendrócitos e mantém a integridade da mielina e sua função.

O papel mais estudado da gal-3 no SNC é sua atuação inflamatória, pois ela promove ativação de microglia (RAHIMIAN *et al.*, 2021). Logo, diversas sinalizações foram estudadas buscando entender os mecanismos pelos quais ela exerce seu efeito pró-inflamatório. Outro mecanismo seria o proposto por Boza-Serrano *et al.* (2019), através de seus achados, inferem que a proteína se liga ao receptor expresso nas células mielóides 2 (TREM2) levando à inflamação por intermédio de

células mieloides como neutrófilos, monócitos e macrófagos. Também Burguillos *et al.* (2015) demonstrou que a gal-3 se liga ao receptor toll-like 4 (TLR4) que é um receptor canônico na resposta inflamatória.

Ao desempenhar um papel pró-inflamatório, a galectina foi estudada sob diversas condições patológicas. Isto pois, as doenças neurodegenerativas tem como elemento chave a neuroinflamação, sugerindo que a gal-3 pode exercer um papel crucial no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Ela foi estudada dentro deste aspecto correlacionando-a com doenças como a esclerose múltipla, DP, DA e outras (GE *et al.*, 2022; RAHIMIAN *et al.*, 2021; SREJOVIC *et al.*, 2020). Todavia, é importante enfatizar que, segundo autores, a gal-3 pode atuar com papel dual dentro da patogênese de diversas doenças neurodegenerativas (RAHIMIAN *et al.*, 2019)

Um estudo focado para a esclerose múltipla investigou a atuação da gal-3 através do modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) em camundongos, mostrou que a deficiência da proteína minimizou a EAE devido a atenuação da inflamação do SNC, onde a expressão de citocinas pró-inflamatórias se encontrava reduzida e houve polarização Th2 das células dendríticas (JIANG, 2009). Ademais, a gal-3 já havia se mostrado aumentada em macrófagos e micróglia nos locais com injúrias (REICHERT; ROTSHENKER, 1999). Para mais, Rotshenker (2009) posteriormente visualizou que há uma expressão aumentada de gal-3 na microglia que fagocita a mielina e, ao contrário, animais nulos da proteína tiveram inibição das micróglia que fagocitam mielina, o que consequentemente piora a degeneração.

Na DP, a expressão de gal-3 foi encontrada aumentada em pacientes com a doença, relacionando-se com a gravidade clínica da doença (WU *et al.*, 2021). Em oposição, quando a galectina foi inibida ou houve deleção do gene da proteína, se obteve inibição da microglia mediada pela α -sinucleína e redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (SREJOVIC, 2020). Estes achados tornam clara, para os autores, a possibilidade da gal-3 atuar em novas alternativas terapêuticas na DP.

Quanto a DA, uma série de pesquisadores analisaram que a gal-3 promove a ativação da micróglia e atua como proteína pró-inflamatória o que favorece a neuroinflamação que possui caráter essencial na doença (BOZA-SERRANO *et al.*, 2019; RAMÍREZ *et al.*, 2019; SEKI *et al.*, 2020). Não apenas a expressão dessa proteína está aumentada na doença, quanto a ausência de galectina ou inibição dela

gerou, conseqüente, diminuição da inflamação (BOZA-SERRANO et al., 2019). Além disso, a ausência de gal-3 promove menor sedimentação de peptídeos B-amilóides e conseqüentemente placas B-amilóide menores. Em contrapartida, a presença da gal-3 está associada com placas maiores (BOZA-SERRANO et al., 2022) Esses achados foram concomitantes com uma melhora cognitiva dos camundongos do estudo (BOZA-SERRANO et al., 2019). Outros autores também avaliaram que a gal-3 é responsável por promover oligomerização de peptídeos B-amilóides, mas também toxicidade in vivo (PUIGDELLÍVOL et al., 2020; TAO et al., 2020).

1.1.2.2 Cognição, memória e estresse

O ramo da pesquisa que estuda a cognição apropriou-se da gal-3 como um possível alvo terapêutico, principalmente devido sua expressão à nível hipocampal e o papel do hipocampo na aprendizagem e na memória. Foi visto anteriormente que danos ao hipocampo afetam prejudicialmente as habilidades cognitivas, refletindo isto na aprendizagem e na memória espacial e contextual (GIOVANELLO et al., 2009; HITTI; SIEGELBAUM, 2014; MORRA et al., 2009).

Tendo isso em vista, Lowther *et al.* (2020) objetivaram verificar se o volume hipocampal poderia ser predito de acordo com os níveis séricos da proteína. Os autores obtiveram uma predição significativa dos níveis de gal-3 com o volume hipocampal esquerdo, porém o resultado não foi significativo com o hemisfério esquerdo. Diante da atividade pró-inflamatória dessa proteína, os pesquisadores sugeriram que ela pode se tornar um possível biomarcador. Este pensamento é justificado, pois os biomarcadores neuroinflamatórios já são conhecidos por estarem relacionados com o volume cerebral e hipocampal (GU et al., 2017). Assim, o estudo de Lowther *et al.* (2020) reforça o que foi visto anteriormente na literatura por Henderson e Sethi (2009) que já direcionavam a natureza inflamatória da gal-3 como importante dentro do declínio das habilidades cognitivas e superexcitação glial.

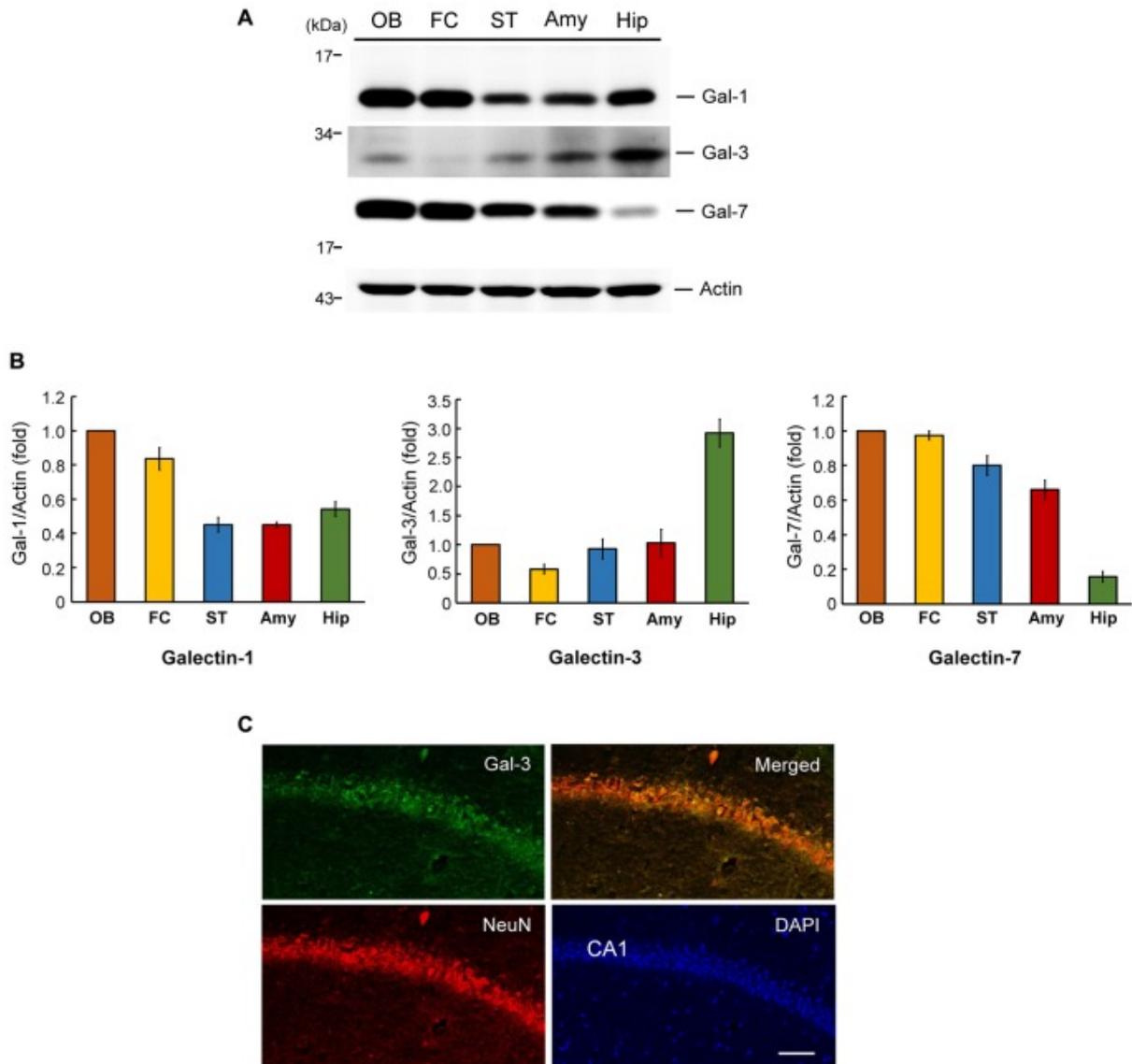
Além disso, como foi visto anteriormente, ela é expressa em diversas áreas cerebrais como o córtex frontal, bulbo olfatório, corpo estriado, amígdala e hipocampo. O estudo de Chen *et al.* (2017) mostrou que a sua expressão no hipocampo pode ser de até 6 vezes maior comparado com as outras áreas citadas, como pode ser visto na figura 2. Também foi discriminado que a proteína regula negativamente a memória contextual de medo e a formação da memória espacial

através da inibição da sinalização da integrina $\alpha 3$. Neste estudo, ratos que passaram pelo treino de medo condicionado contextual, treinamento espacial ou mesmo injeção de N-metil D-Aspartato (NMDA) na área CA1 apresentavam diminuição significativa da sua expressão. Enquanto que ratos nulos de gal-3 apresentavam prejuízo da memória, além da maior retenção da memória de medo e espacial.

Além disto, ainda no trabalho de Chen *et al.* (2017) viu-se que o mecanismo que regula negativamente a memória ocorre por intermédio da inibição da sinalização da integrina $\alpha 3$ que se apresentava diminuída após o treino de medo condicionado contextual. Para mais, níveis menores de gal-3 fosforilada na serina da posição 6 (Ser-6) foram encontrados após o treinamento de condicionamento de medo. Ao bloquear a fosforilação da galectina na serina obteve-se uma melhora da memória de medo. Logo, a inibição da sinalização da integrina $\alpha 3$ e fosforilação da galectina parecem ser os mecanismos que a gal-3 exerce para regular negativamente a memória dependente do hipocampo, tornando-a um biomarcador com potencial em novas terapêuticas voltadas ao declínios cognitivos e mnemônicos.

Além da gal-1, um mesmo estudo também avaliou o envolvimento da gal-3 no estresse. Neste trabalho, os animais com nulos da proteína 3 demonstraram prejuízos ao enfrentar o estresse quando comparados com os animais selvagens. Para mais, a deficiência da proteína estava correlacionada com o aumento do comportamento compulsivo. Logo, os pesquisadores informam que a gal-3 está ligada à neurobiologia da depressão e do comportamento obsessivo-compulsivo (SARTIM *et al.*, 2020).

Figura 2: A) Análise de Western blot com a expressão das galectinas 1, 3 e 7 no bulbo olfatório (OB), córtex frontal (CF), estriado (ST), amígdala (Amy) e hipocampo (Hip) no cérebro de rato. B) Análise quantitativa do western blot para as galectinas 1, 3 e 7. C) Imunohistoquímica focada na galectina 3 na região CA1 do hipocampo de rato e NeuN.



Fonte: CHEN, Y. C. et al.

1.1.3 Galectina 4

Classificada dentro das galectinas como tandem-repeat devido sua configuração estrutural, a gal-4 apresenta dois CDRs que são passíveis de ligarem-se a diferentes carboidratos simultaneamente (VASTA, 2012). Tal característica permitiu implicar que ela estabiliza jangadas lipídicas, isto pois, ela possui afinidade e se liga a glicoproteínas sulfatadas e glicoproteínas não sulfatadas e não sialilados concomitantemente com a ligação com glicoesfingolipídeos (BREWER et al., 2002). Ademais, a proteína desempenha atividades importantes como na progressão tumoral, tráfego apical de proteínas, cicatrização de feridas,

adesão celular, inflamação intestinal e outras que foram revisadas por Cao e Guo (2016).

1.1.3.1 Inflamação

Dentre as atividades biológicas mais características das galectinas está o envolvimento da família em mecanismos inflamatórios (BLANCHARD et al., 2016). Não obstante, a gal-4 não se consolidou em um papel dentro do contexto da inflamação. Um dos estudos realizados com um modelo de colite experimental divulgou que ela incitou a apoptose de células T da mucosa, em contraposição quando a proteína foi bloqueada por oligonucleotídeos antisense houve redução da morte de células T. Para mais, reduziu-se a secreção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 7 (IL-7) e melhorou a inflamação da mucosa (PACLIK et al., 2008). Apontando, assim, a galectina como molécula anti-inflamatória, ao menos, no âmbito intestinal.

Por outro lado, foi demonstrado anteriormente em uma pesquisa, também voltada à região intestinal, que a gal-4 é responsável por ampliar a produção de interleucina 6 (IL-6) por intermédio de células T CD4 + em condições intestinais inflamatórias. Isto coloca essa proteína como pró-inflamatória, uma vez que houve agravamento da colite crônica e prolongou-se a recuperação da lesão intestinal aguda (HOKAMA et al., 2004). Assim, há uma incerteza se a gal-4 pode assumir ambos papéis, pró-inflamatória e anti-inflamatória, ou se existem outros interferentes que justificam a discrepância. Ademais, não existem estudos suficientes que respondam adequadamente ao dilema.

1.1.3.2 Atuação no sistema nervoso central

Embora os estudos que concernem a gal-4 majoritariamente a estudem correlacionando-a ao trato gastrointestinal (BRINCHMANN et al., 2018), ela também é expressa no SNC. Storan e colegas (2004) alegam que ela é expressa por axônios olfatórios primários ao longo de seu crescimento da cavidade nasal para o bulbo olfatório. Também está presente a nível de córtex, hipocampo, gânglios da raiz dorsal (STANCIC et al., 2012), além dos oligodendrócitos (WEI et al., 2007).

Entretanto, a expressão em áreas cerebrais não ocorre aleatoriamente segundo Velasco *et al.* (2013). É possível ser encontrada dentro de segmentos intracelulares e associados, mas também pela extensão da superfície axonal dos neurônios corticais e hipocampais.

Mediante sua afinidade por glicoproteínas sulfatadas e terminais não sialilados de N-glicanos, a gal-4 regula a adesão de células aos componentes da matriz extracelular (MEC). Além disso, ela exerce um papel interessante no tráfego da membrana de axônios por intermédio da molécula de adesão de células neuronais (NCAM) L1. Isto pois, a NCAM L1 possui extremidades de ramificação de N-acetilactosamina (LacNAc) de L1 N-glicanos nos axônios, locais os quais a proteína se liga com especificidade e são essenciais para regular o processo de transporte axonal de glicoproteínas sinápticas (VELASCO *et al.*, 2013). Não obstante, ela também influi no crescimento de axônios. Foi provado que a gal-4 também aumenta o número e o tamanho do agrupamento de NCAM L1 na membrana do axônio (VELASCO *et al.*, 2013).

Um trabalho de Stancic *et al.* (2012) avaliou outro papel da gal-4 no sistema nervoso central ao demonstrarem sua expressão durante a diferenciação de oligodendrócitos, o que também os orientou a questionarem sobre uma provável habilidade dela de regular a diferenciação de oligodendrócitos e também o processo de mielinização. Díez-Revuelta *et al.* (2017) reforça a veracidade das hipóteses e direciona a atividade da gal-4 na mielinização ao afirmar que ela inibe a mielinização quando se liga aos oligodendrócitos pré-mielinizantes.

Ainda ao que tange o sistema nervoso central, essa proteína foi alvo de pesquisa com pacientes com DP em estágio inicial, estágios avançados e um grupo controle. No estudo foi visto que os pacientes do estágio inicial possuíam níveis séricos mais baixos ao comparar os pacientes de estágios mais avançados. Já quando comparou-se o grupo controle saudáveis com os pacientes, os primeiros apresentavam menores níveis séricos de gal-4. Através da análise de curva ROC os autores propuseram que a proteína apresenta potencial como marcador não invasivo como ferramenta para identificação da DP e estágios avançados da doença (CENGIZ *et al.*, 2019).

1.2 Proteína de resposta apoptótica 4

Proteína de resposta apoptótica 4 (PAR-4) é uma proteína da classe de proteínas PAR. Essa proteína também é nomeada como proteína de resposta de apoptose da próstata 4, haja visto, que sua identificação deu-se em células cancerígenas de próstata em apoptose (SELLS et al., 1994). Ela é expressa globalmente expressa nos tecidos e localiza-se majoritariamente no citoplasma (SELLS et al., 1997; EL-GUENDY et al., 2003).

Ela é uma proteína de aproximadamente 40 kDa que apresenta em sua estrutura um domínio zíper de leucina no seu terminal carbóxi que é conhecido como domínio de morte da proteína e é responsável pela interação da PAR-4 com demais proteínas (EL-GUENDY et al., 2003).

É capaz de promover a apoptose por via intrínseca e extrínseca. Seu domínio zíper de leucina atua inibindo a atividade do fator nuclear KB (NFkB) que é importante para a sobrevivência celular, mas também direciona à ativação do receptor de morte Fas e FasL. Em detrimento disto, a PAR-4 é capaz de regular a regressão da proliferação tumoral (EL-GUENDY et al., 2003).

Sua atividade supressora de tumor culminou em diversos estudos que avaliaram os efeitos da PAR-4 dentro do processo carcinogênico humano como no câncer de cólon, câncer de pâncreas, câncer de mama, renal, glioma e outros (LEE et al., 2010; NGUYEN et al., 2017; SHRESTHA-BHATTARAI et al, 2013; ZHUANG et al., 2011).

1.2.1 Principais Funções no Sistema Nervoso Central

Embora a proteína PAR-4 esteja presente à nível de SNC e envolvida em processos neurodegenerativos, pouco se sabe de fato sobre os mecanismos neuromoleculares aos quais a proteína pode estar envolvida nesses processos (GUO et al., 2001). Foi incutido que ela pode exercer uma atividade pró-apoptótica na morte tumoral de doenças como a DA, DP, no acidente vascular cerebral, esclerose lateral amiotrófica e outras (CULMSEE et al., 2001; DUAN et al., 1999; GUO et al., 1998; PEDERSEN et al., 2000). Todavia, poucos estudos conseguiram construir um esclarecimento de como ela atua nessas doenças. Algumas das doenças melhores descritas são retratadas a seguir.

A proteína PAR-4 foi avaliada dentro da neuropatogênese da esquizofrenia devido seu papel na sinalização com o receptor da dopamina DA2 (D2DR) (PARK et al., 2005). No trabalho de Amar *et al.* (2008), cérebros post-mortem foram estudados no formato de linhagens celulares derivadas de linfócitos (LDCL) de pacientes com esquizofrenia e a expressão proteica foi avaliada por western blot. Apesar da hipótese sugerida pelos autores sobre o envolvimento da PAR-4 na esquizofrenia juntamente com outras proteínas, os níveis proteicos de PAR-4 não demonstraram diferença significativa. Outros estudos também avaliaram o seu gene em populações japonesas e chinesas com esquizofrenia. O estudo de pacientes japoneses não apontou variação no gene PAR-4 (KISHI et al., 2008), enquanto que os pacientes chineses com esquizofrenia possuíam dois polimorfismos de nucleotídeo único missense do gene (WANG et al., 2008).

Os estudos sobre a proteína na modulação da dopamina mostraram-se mais promissores quando estudados dentro do campo da depressão. Foram feitos testes de nado forçado e suspensão da cauda em camundongos mutantes para PAR-4. Esses modelos foram usados para o estudo da depressão desses animais e foi-se constatado comportamentos de congelamento nos testes, o que conferem comportamentos anômalos. Os autores crêem que os camundongos mutantes apresentavam uma sinalização D2DR prejudicada e que isto justifica a resposta comportamental referente à depressão (PARK et al., 2005).

Outro estudo verificou os níveis proteicos de PAR-4, DADR e calmodulina pelo método de western blot usando-se do córtex temporal do cérebro de indivíduos post-mortem com esquizofrenia, depressão maior e transtorno bipolar. Foi constatado, com isso, que a proteína se encontrava reduzida em 67% ao compará-la com controles normais ao que refere-se o grupo com depressão maior. Isto reforça o envolvimento da PAR-4 com a sinalização da D2DR que parece se encontrar alterada na depressão maior, já apontada por Park *et al.* (2005).

Focando-se em outra doença neurodegenerativa, a DA foi investigada por diversas ópticas quanto a uma plausível participação da PAR-4 na doença. Valendo-se da morte neuronal presente na neuropatogênese da DA (JAYARAMAN et al., 2021) e o papel pró-apoptótico da proteína (SELLS et al., 1994), pesquisas verificaram um possível papel direto da PAR-4 na DA.

Um dos modelos de DA que foi estudado por Guo e colegas (1998) demonstrou que PAR-4 tem sua expressão aumentada em neurônios vulneráveis à

apoptose.

Outro trabalho baseou-se na mutação de genes que codificam a presenilina 1 (PS1), o que gera desregulação da homeostase do cálcio do retículo endoplasmático. Essas mutações forjam diversas consequências como a perturbação da homeostase de cálcio sináptico que leva à ativação de cascatas pró-apoptóticas relacionadas com a produção de PAR-4, além de ativação de caspase e disfunção mitocondrial (MATTSON et al., 2001). Neste caso, os casos de DA causados pela mutação da PS1 podem ter a PAR-4 como um elemento importante que se regulado poderia diminuir a morte neuronal.

Posteriormente, a PAR-4 foi estudada associadamente com a ceramida, onde a elevação de ceramida e expressão de PAR-4 incitaram apoptose em células progenitoras neurais (BIEBERICH et al., 2003; BIEBERICH et al., 2004). Em continuidade, Wang e parceiros (2012) demonstraram que o peptídeo beta amilóide que tem papel chave na doença de Alzheimer conduz à secreção de PAR-4 e ceramida por astrócitos. A exposição dos astrócitos ao peptídeo amilóide gera a secreção de exossoma, vesículas lipídicas que se mostraram preenchidas por PAR-4 e ceramida, que são liberadas e antecedem a morte glial. Os autores hipotetizaram que a secreção de exossomos sirva como um meio de eliminar dos astrócitos o máximo de PAR-4 e ceramida pró-apoptóticos. Assim, os autores apontam um novo mecanismo pró-apoptótico por intermédio de exossomos liberados após a exposição à proteína amilóide.

1.3 Memória

Defini-se “memória” como a “faculdade de reter ideias, sensações, impressões, adquiridas anteriormente”. Durante a vida cotidiana o ser humano é exposto a diversos estímulos diariamente e interage com uma quantidade significativa de informações que são essenciais para realizar desde atividades simples até trabalhos complexos, além da formação da própria identidade. A capacidade de adquirir informações, armazená-las e evocá-las quando necessário é o propósito da memória.

Robertson (2002) classifica a memória inicialmente em dois tipos: as memórias explícitas e implícitas. As explícitas são as memórias conscientes, enquanto que as implícitas são informações e experiências que se obtêm e

recuperam de maneira inconsciente. Além disso, as memórias explícitas também são classificadas de acordo com o tempo como a memória de curto prazo que pode durar segundos, minutos ou horas e a memória de longo prazo que pode perdurar por anos (MCGAUGH, 2000).

A formação da memória depende da integração de circuitos neuronais que processam a informação para diferentes regiões cerebrais até seu armazenamento. As memórias a longo prazo para serem formadas passam por uma fase de consolidação que consiste em um momento onde as informações são estabilizadas, priorizadas e podem ser transformadas em novas experiências. A consolidação ainda é representada por dois níveis processuais: a consolidação celular e a consolidação de sistemas (DUDAI et al., 2015)

A consolidação celular é o nível onde ocorrem mudanças na estrutura de sinapse. Por outro lado, a consolidação em nível de sistemas se faz através das alterações na distribuição das representações da memória nas regiões do cérebro (DUDAI et al., 2015; FRANKLAND; BONTEMPI, 2005; KANDEL et al., 2014). Nokia e Pehtonen (2022) trazem as regiões do neocórtex, o tálamo e o hipocampo como base para a consolidação da memória.

1.3.1 Medo Condicionado Contextual e o Estudo das Memórias Aversivas em Roedores

Tendo em vista o padrão de vida moderno do ser humano do século XXI a vivência em sociedade está cerceada de frustrações diárias que envolvem os âmbitos profissional, econômico, educacional, sanitário, social e pessoal.

Apesar de evolutivamente o estresse ter apresentado papel crucial para a sobrevivência humana, a exposição excessiva aos diversos eventos que envolvam algum grau de frustração tem acarretado altas cargas de estresse. Dentro deste contexto, eventos que induzem estresse após algum trauma intensificam a consolidação de memórias traumáticas (BREWIN, 2018).

As memórias traumáticas operam como Shohamy e Adcock (2010), que as descrevem como a capacidade de selecionar especificamente as informações relevantes e armazená-las em prol de se adequar a situações de risco e superar situações problemáticas baseadas em experiências anteriores.

Não obstante, níveis demasiados de estresse foram relacionados com

alterações psicológicas e problemas de cognição e desenvolvimento (ADHIKARI et al., 2010; ROOZENDAAL et al., 2003). Só no Brasil, o transtorno de estresse pós-traumático afeta 45,5% da população e cerca de 86,5% apresentavam ansiedade, porém as alternativas terapêuticas adequadas permanecem desconhecidas (BRASIL, 2020).

A fim de estudar a formação e consolidação de memórias aversivas em roedores, um modelo pavloviano é bastante adotado conhecido como medo condicionado contextual (CHAAYA et al., 2018; FANSELOW, 2010; MAENG et al., 2010). O teste de medo condicionado contextual é baseado na exposição de roedores a dois tipos de estímulos paralelamente.

O primeiro estímulo é o estímulo condicionado sendo um estímulo originalmente neutro, como um som ou uma informação visual. O segundo estímulo é o estímulo incondicionado que projeta-se como um estímulo aversivo ao animal como um choque elétrico. Na presença no estímulo aversivo é comumente observado um comportamento de congelamento pelos animais (MAREN, 2001).

O teste de medo condicionado contextual é um modelo de condicionamento pavloviano bastante empregado para o estudo de memórias aversivas em roedores (CHAAYA et al., 2018). Ele funciona para que memórias traumáticas sejam associadas a um contexto, este contexto que inicialmente era um estímulo neutro. Por exemplo, o animal é exposto a algum estímulo sensorial como uma imagem, sendo este o estímulo contextual que é um estímulo originalmente neutro, ao mesmo tempo que é exposto a um estímulo aversivo como um choque elétrico. O método funciona de maneira a combinar os dois estímulos e promover a associação entre ambos pelo animal. Em condições de estímulo aversivo o animal usualmente responde com imobilidade. Ao associar os estímulos, mesmo ao ser submetido exclusivamente ao estímulo condicionado, ou seja, sem o estímulo aversivo, o animal reage com uma resposta de imobilidade demonstrando a formação da memória aversiva associativa (CHAAYA et al., 2018; LEDOUX, 2014; MAREN et al., 2013).

Sem embargo, ainda não é totalmente claro quais são os mecanismos neuromoleculares intrínsecos na formação de memórias traumáticas. Desse modo, compreender a neurofisiologia da formação das memórias aversivas pode condicionar o descobrimento e utilização de medidas terapêuticas eficientes para o tratamento de indivíduos com transtorno do estresse pós-traumático e estresse

crônico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se as galectinas 1, 3, 4 e a proteína PAR-4 estão envolvidas na consolidação de memórias traumáticas.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar se galectinas 1, 3, 4, e PAR-4 estão expressas no hipocampo de camundongos submetidos ao treino da tarefa de medo condicionado contextual;
- Avaliar por western blot, se há alteração significativa da expressão de galectinas 1, 3, 4 e PAR-4 no hipocampo de camundongos submetidos ao treino da tarefa de medo condicionado contextual;
- Avaliar por imunohistoquímica, se há alteração significativa da expressão de galectinas 1, 3, 4 e PAR-4 no hipocampo de camundongos submetidos ao treino da tarefa de medo condicionado contextual;
- Determinar a janela temporal de expressão de galectinas 1, 3, 4 e PAR-4 no hipocampo de camundongos submetidos ao treino da tarefa de medo condicionado contextual.

3 METODOLOGIA

3.1 Desenho Experimental

A priori, camundongos machos foram submetidos à técnica de medo condicionado contextual. Adiante, os animais foram sacrificados após o treino através de deslocamento cervical em diferentes janelas temporais nos tempos de 30 minutos, 3 horas e 6 horas pós treino. Desta forma, visou-se analisar a expressão de galectinas e PAR-4 na consolidação da memória aversiva nos diferentes janelas temporais.

Seguida a eutanásia, os hipocampus dos animais foram extraídos e armazenados a -80°C . Um grupo de animais teve seus hipocampus homogeneizados utilizando tampão de lise celular com inibidores de protease, para a técnica de western blot. Enquanto que um segundo grupo de hipocampus foram parafinizados para a técnica de imunohistoquímica.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos, adultos, de 6 – 8 semanas, de 25-40g, fornecidos pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram mantidos no biotério climatizado ($22-26^{\circ}\text{C}$, umidade constante) e submetidos a um ciclo de iluminação de 12h claro / 12h escuro. Receberam ração padronizada e água fresca fornecidas *ad libitum*. Os animais foram mantidos no biotério do departamento de Fisiologia e Farmacologia na UFPE. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o processo aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal de Pernambuco de número 0013/2020 CEUA/UFPE. Todos os procedimentos experimentais com animais vivos envolveram o mínimo de desconforto ou sofrimento.

3.3 Medo Condicionado Contextual

O teste de medo condicionado contextual é realizado em um aparelho de condicionamento de paredes de acrílico, parede frontal de vidro e o assoalho formado por barras de metal, que conduzem corrente elétrica quando acionada

externamente. Pode-se controlar tanto a intensidade dos impulsos elétricos quanto sua duração. Para o teste, os animais foram condicionados ao aparato onde permaneceram por 6 minutos, semelhante ao que foi realizado por Da Rosa *et al.* (2012), com algumas alterações. Assim que adentra o aparato o camundongo é deixado livre no espaço para exploração por cerca de 3 minutos. Após o período de exploração, uma corrente elétrica foi ligada e o animal a percebe através das grades de metal como um choque elétrico. Nesta técnica, o intuito é gerar um estímulo incondicionado (EI) aversivo que corresponde ao choque elétrico e o associá-lo a um contexto, o estímulo contextual (EC), neste caso associa-se ao ambiente em que está inserido, ou seja, o aparelho de condicionamento (PAMMI; SRINIVASAN, 2013).

Em totalidade foram disparados três choques elétricos, cada choque consistia em uma corrente de 0.6 mA e com duração de 2 segundos (CANTO-DE-SOUZA; MATTIOLI, 2016), com intervalo de 50 segundos entre os choques administrados. Os animais permaneceram na caixa de condicionamento por 60 segundos após o término dos choques. Para o teste de medo condicionado contextual, 24 horas após o treinamento (apresentação aos contextos) os animais seriam reexpostos ao aparato e suas respostas de imobilidade seriam contabilizadas. As respostas de imobilidade representam um maior traço de memória formada entre a associação EC-EI (MAREN *et al.*, 2013). Para este trabalho, não houve teste do medo condicionado contextual, 24h após o treino, uma vez que, o objetivo do trabalho é a análise da fase de consolidação da memória (pós-treino).

3.4 Western Blot

Após o teste de medo condicionado contextual os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. A ordem de sacrifício foi de acordo com a divisão dos três grupos de tempos, assim, os animais foram sacrificados após 30 minutos, 3 horas e 6 horas findo o treino. Seguido do sacrifício dos animais, os mesmos tiveram seus hipocampus retirados e homogeneizados com tampão de lise celular em 50 uL contendo tampão fosfato de Na^{2+} 20 mM com KCl 140 mM, pH 7.4 com Na_2HPO_4 e com inibidores de protease. Após essa etapa foi feita uma centrifugação de 60 segundos em uma rotação de 11.000 RPM e o pellet foi ressuspenso em 60 uL de tampão de lise. Desta forma, o homogenato foi usado para quantificação das concentrações proteicas de cada amostra por meio do

método de Bradford.

Após a quantificação proteica padronizou-se os extratos proteicos para uma concentração de 30 µg por alíquota. Os extratos, então, foram submetidos à desnaturação com tampão 7,5 % Tris 2M pH 6,8; 0,5 % SDS; 5 % azul de bromofenol; 26 % glicerol; 16,5 % de 2-mercaptoetanol. Subsequentemente foi realizada a eletroforese em gel de SDS-PAGE 10% em tampão de corrida Tris-Glicina (3,0 g/l Tris-Base; 14,5 g/l Glicina, 0,1 % de SDS) para separação das proteínas. Para a corrida, utilizou-se de uma corrente elétrica de 3 A, voltagem de 100V e potência de 300W por 1 hora e 30 minutos. Finda a corrida foi realizada a transferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose por 50 minutos a 15V. A transferência concluída, passa-se para a etapa de bloqueio, isto é, as membranas serão bloqueadas em solução de 5% de leite desnatado em TBS-T em agitação por 16 horas a 4°C. Uma vez que o bloqueio ocorreu, passou-se para o momento de incubação. Nesta fase foram utilizados cerca 5mL anticorpos primários na concentração de 1:1000 de galectina 1, 3, 4 e PAR-4 onde foram incubados por 2 horas em temperatura ambiente. Ademais, realizaram-se quatro lavagens consecutivas por 5 minutos com 5mL TBS-T e uma lavagem com TBS-T por 10 minutos. Depois disso seguiu-se uma nova incubação de 1 hora à temperatura ambiente utilizando anticorpos secundários na concentração de 1:2000 de acordo com os anticorpos primários já utilizados anteriormente. Uma fase de lavagens seguiu-se novamente e então adiantou-se para a fase de detecção das proteínas na membrana. Esta fase ocorre mediante o uso do kit ECL™ Western Blotting Detection Reagents por quimioluminescência segundo o protocolo da Abcam (ABCAM, 2020). Foi a revelação da membrana ao expô-la ao filme de raio-X Amershan Hiper film™ ECL em temperatura ambiente por 2-5 minutos. Com a revelação foi facultado analisar a expressão das proteínas alvo no tecido hipocampal, mas também a proteína beta-actina colocando-a como controle.

3.5 Histologia e Imunohistoquímica

Inicialmente, os hipocampos foram fixados com formalina a 10%. Posteriormente, foi feita a desidratação com álcool absoluto e em seguida o clareamento com xilol. Após, realizou-se a inclusão na parafina e assim os cortes estruturais puderam ser feitos por secções no micrótomo semi-automático na espessura de 5 micrometros e

são adicionados em lâminas com ovalbumina, sendo levadas para a estufa para após 24 horas a 45°C passar pelo processo de desparafinização.

Nesta etapa, algumas lâminas foram direcionadas para a fase de coloração com os corantes hematoxilina eosina e em seguida pode-se visualizar e diferenciar as estruturas do corte histológico (SANTOS et al., 2021). Tinha-se como almejo observar se houve qualquer alteração morfológica na estrutura tecidual do hipocampo.

As demais lâminas foram armazenadas e utilizadas posteriormente para a técnica de imunohistoquímica. Desta maneira, para tais lâminas utilizou-se de banhos sucessivos com xilol por 10 minutos na estufa e em seguida outro banho com xilol por 10 minutos em temperatura ambiente para desparafinização. Depois na fase de reidratação, foram feitos banhos com etanol nas concentrações de 100% por 5 minutos duas vezes, um banho com etanol 95% por 3 minutos, um banho com etanol 70% por 1 minuto e um com etanol 50% por 1 minuto.

Tendo isto feito, foi realizada a recuperação antigênica, onde as lâminas são submetidas ao banho maria a 96°C por 20 minutos inseridas em tampão citrato 100 mM pH 6.0. Ao concluir esta fase, as lâminas foram resfriadas para executar o bloqueio da peroxidase endógena à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguimento é a realizada a fase de bloqueio das peroxidases endógenas com o bloqueador à temperatura ambiente por 10 minutos.

Findo este ponto, incubou-se com 50µl por lâmina de anticorpos primários na concentração de 1:1000 por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação foram realizadas três lavagens consecutivas com PBS-Tween 20 (0,05%), cada lavagem com duração de 5 minutos. Depois disso foi feita uma nova incubação usando 50µl por lâmina de anticorpos secundários na concentração de 1:1000 por 1 hora em temperatura ambiente. Da mesma forma, após a incubação foram feitas três novas lavagens com PBS-Tween 20 (0,05%) por 5 minutos cada. Logo adiante os cortes histológicos foram submetidos a DAB e incubados por 10 min em temperatura ambiente. Após a incubação com DAB foram feitas três lavagens assim como as anteriores.

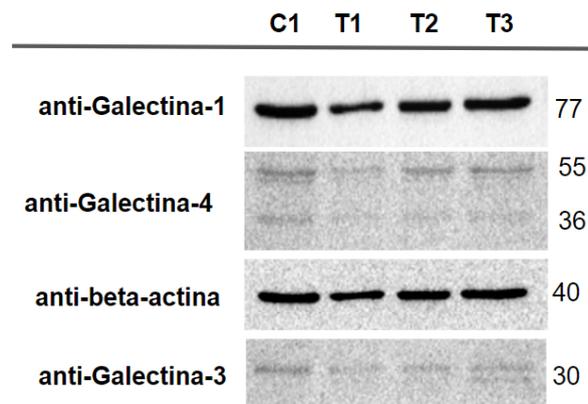
Em seguida, as lâminas seguiram para a fase de desidratação com sucessivos banhos na sequência de etanol 95% por 1 minuto, etanol absoluto 1 por 1 minuto, etanol absoluto 2 por 1 minuto, xilol 1 por 1 minuto e xilol 2 por 1 minuto, posteriormente com resquícios de xilol colocou-se uma gota de entellan na borda da

lâmina e aplicou-se uma lamínula sobre ela. Após secagem as lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência e fotografias foram retiradas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em primeiro momento foi feito o teste de medo condicionado com o grupo de camundongos que passaram pelo testes e foram sacrificados 30 minutos após o treino. Usando do homogenato dos hipocampus foi executada a técnica de western blot com o almejo de visualizar a expressão proteica dos animais na consolidação da memória que pode ser visualizada na figura 3.

Figura 3: Expressão proteica do homogenato do hipocampo de camundongos após o treino da tarefa de medo condicionado contextual, pela técnica de western blot. Na imagem, C1 representa um animal controle, isto é, aquele que não foi treinado na tarefa de medo condicionado contextual, representando a expressão endógena de proteínas. Enquanto que T representa os animais que foram submetidos ao treino na tarefa e que após 30 minutos do treino foram sacrificados. Foram representados três animais tratados: T1, T2 e T3. Eles representam a expressão de proteínas do processo de consolidação da memória de medo.



Com a revelação do western blot foi observado que o grupo de animais eutanasiados após 30 minutos do treino não apresentou diferença relevante na expressão de galectina 1, 3 ou 4 comparando animais não treinados (controle) com animais treinados.

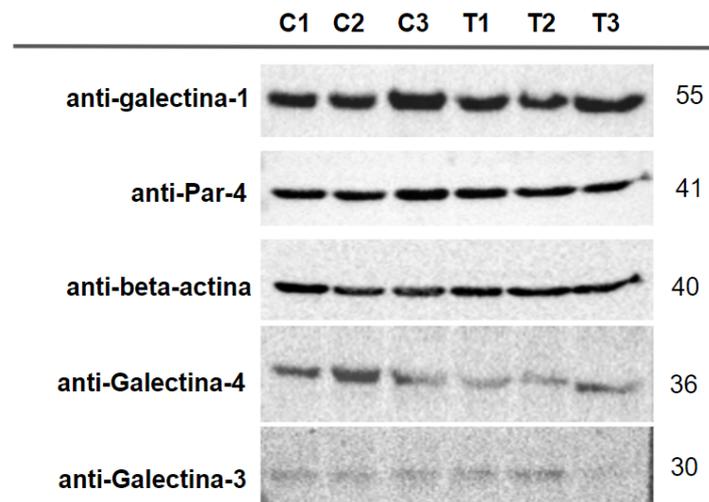
Embora previamente tenha sido visto tanto a expressão dessas proteínas no hipocampo, como o envolvimento dessas proteínas nos processos cognitivos e seus papéis como agentes na inflamação (CHEN ET AL., 2017; RAMIREZ et al., 2019; SAKAGUCHI et al., 2011), neste trabalho não se observou expressão significativa destas moléculas 30 minutos pós-treino.

Também é importante enfatizar que não foi observado perfil de banda de PAR-4 no tempo de 30 minutos e a beta actina foi usada com o intuito de agir como um controle proteico no western blot (LIN et al., 2012).

Ainda, dois elementos importantes foram notados. Um deles foi que a galectina 1 demonstrou alteração de seu peso molecular. E o outro elemento importante foi que a galectina 4 configurou-se em duas bandas características. Essas mudanças sugerem que as duas galectinas passaram por processos de modificação translacional ao decorrer dos experimentos comportamentais. Segundo Gao *et al.* (2017) são alterações passíveis de ocorrerem em experimentos comportamentais quanto às galectinas. Pensa-se que durante os experimentos podem ocorrer alterações da expressão gênica, síntese proteica ou até a ligação a outras proteínas durante o modelo animal, induzindo mudanças estruturais como clivagem, fosforilação, metilação ou acetilação após a transcrição das moléculas (GAO et al., 2017).

Findo o primeiro grupo, avaliou-se em seguida um grupo de camundongos que executaram a tarefa de medo condicionado contextual e foram sacrificados após 3 horas. Os camundongos tiveram o homogenato de seus hipocampus preparados para técnica de western blot e avaliou-se a expressão das galectinas 1, 3 e 4 e PAR-4 conforme a figura 4.

Figura 4: Expressão proteica do homogenato do hipocampo de camundongos após o treino da tarefa de medo condicionado contextual, pela técnica de western blot. Na imagem, C representa animais controles, isto é, aquele que não foi treinado na tarefa de medo condicionado contextual, representando a expressão endógena de proteínas. Foram representados três animais controles: C1, C2 e C3. Enquanto que T representa os animais que foram submetidos ao treino na tarefa e que após 3 horas do treino foram sacrificados. Foram representados três animais tratados: T1, T2 e T3. Eles representam a expressão de proteínas do processo de consolidação da memória de medo.



De maneira semelhante ao primeiro grupo de animais, na figura 4, a expressão de galectina 1 e 3 no hipocampo de animais que foram sacrificados após 3 horas do treino de medo condicionado contextual obtiveram níveis semelhantes entre animais controle e treinados.

Anteriormente na literatura a galectina 1 foi sugerida como proteína neuroprotetora dependente de concentração, e a galectina 3 como responsável por gerar prejuízo cognitivo (CHEN et al., 2017), no entanto, com a metodologia abordada neste trabalho a expressão das proteínas após 30 minutos e também 3 horas após a aquisição da memória não segue o mesmo padrão visto na literatura. É provável que a consolidação de memórias aversivas ocorra indiretamente à galectina 1 e 3 considerando a consolidação após 30 minutos e 3 horas do treino.

Todavia, o nível protéico de galectina 4 se mostrou superior para o controle fazendo a comparação com os camundongos que foram treinados. Ainda que a galectina 4 seja majoritariamente estudada no espaço intestinal (BRINCHMANN et al., 2018) voltando-se principalmente para mecanismos de migração celular e como molécula imunomediadora (BELO et al., 2013; HOKAMA et al., 2004; PACLIK et al., 2008), menores níveis de galectina 4 em camundongos após o treinamento de medo condicionado quando comparados com o controle pode conotar um mecanismo neural protetor no cérebro com a condição de reduzir a neuroinflamação durante a fase de consolidação de memória.

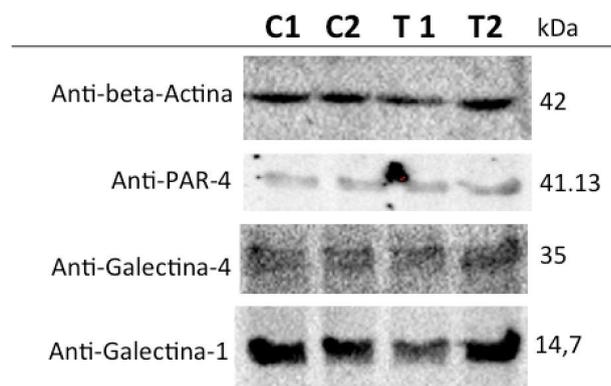
Para o segundo agrupamento de animais, bandas da proteína PAR-4 passaram a ser vistas, porém animais tratados e controle não apresentaram real diferença

quanto à expressão da proteína no hipocampo. Ou seja, a morte celular programada não foi alterada 3 horas pós-treino.

Valendo-se das atividades imunomoduladoras das galectinas e PAR-4 em processos de morte celular, decidiu-se averiguar a nível hipocampal a proteína de diferenciação celular de leucemia mielóide induzida (MCL1). A MCL1 relaciona-se com a regulação da morte celular conhecida como apoptose (LI et al., 2020a; TSENG et al., 2020) e não foi observada a expressão de MCL1 com a metodologia abordada.

Em um terceiro momento, camundongos foram submetidos a tarefa de medo condicionado contextual e foram sacrificados após 6 horas do treino. De forma semelhante, tiveram o homogenato de hipocampus utilizados para a técnica de western blot e a expressão proteica foi avaliado de acordo com a figura 5.

Figura 5: Expressão proteica do homogenato do hipocampo de camundongos após o treino da tarefa de medo condicionado contextual, pela técnica de western blot. Na imagem, C representa animais controles, isto é, aquele que não foi treinado na tarefa de medo condicionado contextual, representando a expressão endógena de proteínas. Foram representados dois animais controles: C1 e C2. Enquanto que T representa os animais que foram submetidos ao treino na tarefa e que após 6 horas do treino foram sacrificados, foram representados três animais tratados: T1 e T2 Eles representam a expressão de proteínas do processo de consolidação da memória de medo.

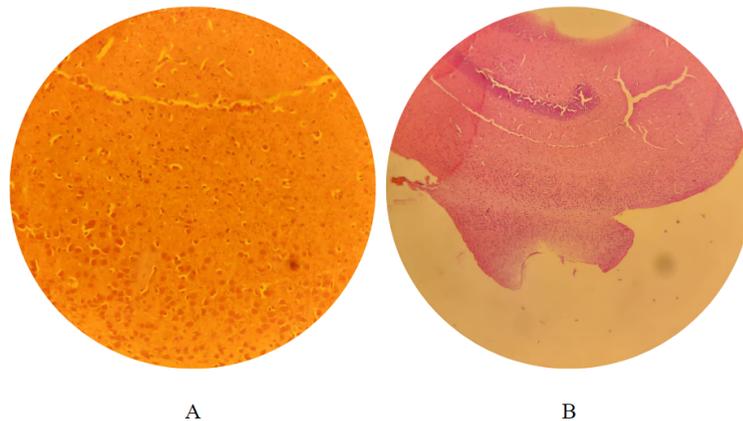


Neste caso, a galectina 1 e PAR-4 comportaram-se como nos grupos anteriores, onde controle e tratados demonstraram não ter grandes diferenças em expressão dessas proteínas no hipocampo. Quanto à galectina 3, a proteína não foi detectada após 6 horas. No entanto, a galectina 4 que apresentou resultados mais interessantes, para essa marcação temporal de 6 horas não demonstrou no western blot variação significativa entre os animais controle e tratados. É possível que após o

período de 6 horas da realização do teste de medo condicionado contextual as galectinas e PAR-4 não influem de maneira direta na consolidação da memória aversiva ou dentro da metodologia utilizada.

Para mais, animais deste último grupo tiveram seus hipocampus retirados para uma preparação histológica, onde se objetivava analisar a estrutura morfológica do hipocampo. Com isso foi visto que não houve alterações morfológicas no tecido constituinte do hipocampo e foram tiradas fotografias da preparação histológica dos hipocampus como pode ser visto nas figuras 6A e 6B.

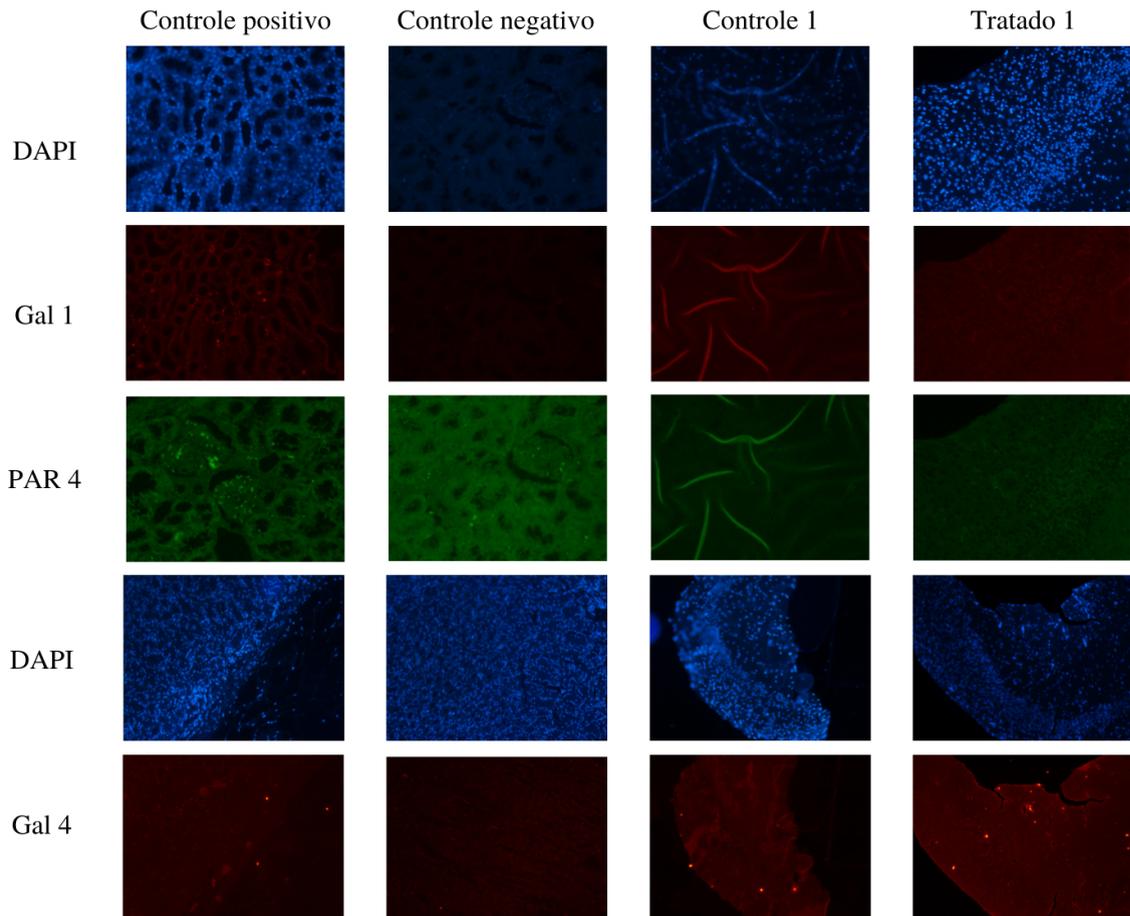
Figura 6: Análise de preparação histológica de hipocampus de camundongos treinados. Na figura 6A é representado o tecido processado e na figura 6B foi utilizada a coloração de hematoxilina-eosina, confirmando morfologia normal dos hipocampus dos animais.



A avaliação das fotografias da preparação histológica representada na figura 6 não identificou alterações morfológicas significativas na estrutura tecidual mediante os modelos estudados.

Não menos importante, a técnica de imunohistoquímica foi empregada se utilizando de cortes histológicos de hipocampus de camundongos com o uso de anticorpos anti-galectina 1, anti-PAR4 e galectina-4. Os hipocampus pertenciam aos animais que passaram pelo teste de medo condicionado contextual e foram sacrificados após 6 horas e com a imunohistoquímica obteve-se fotografias da microscopia de fluorescência, como visto na figura 7. O anticorpo anti-galectina-3 não é sensível à metodologia de imunohistoquímica.

Figura 7: Fotografias obtidas da imunohistoquímica por meio de microscopia de fluorescência. Foram utilizados anticorpos anti-galectina 1 (gal 1), anti-PAR-4, anti-galectina 4 (gal 4), o marcador nuclear 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), um controle positivo com um corte tecidual previamente positivo para a proteína específica e um controle negativo com um corte tecidual ausente da proteína específica. O controle 1 refere-se ao animal que não foi submetido à tarefa de medo condicionado e o tratado 1 refere-se ao animal que realizou a tarefa de medo condicionado.



Através dos resultados apresentados pela técnica de imunohistoquímica, pode-se notar que não houve expressão proteica das proteínas testadas quando comparado com o controle. A não detecção proteica pode ser relativa à sensibilidade dos anticorpos utilizados e a baixa expressão de proteínas como comprovado por western blot.

Utilizou-se 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) um marcador fluorescente que revela a estrutura do núcleo celular (KAPUSCINSKI, 1995).

Para mais, adotou-se o uso de um controle positivo que consistia em uma lâmina com um corte histológico sabidamente positivo para a proteína específica, o qual

comparou-se com os cortes histológicos dos animais deste projeto. Também utilizou-se um controle negativo, neste caso, uma lâmina com um corte histológico que se apresentava ausente da proteína específica, também para método de comparação.

Fatores diversos podem ter influenciado nos resultados emitidos. Isto é, o tempo específico analisado de 6 horas ao fim do teste de medo condicionado contextual, a sensibilidade da técnica e o número de animais que foram tomados como amostrais. Portanto, é imprescindível que estudos posteriores considerem essas variáveis e as contornem, especialmente quanto ao número amostral para uma melhor representação. Em suma, aponta-se que as galectinas 1, 3 e 4 e PAR-4 não estão relacionadas diretamente à fase de consolidação de memórias após 6 horas da aquisição da memória.

5 CONCLUSÃO

Neste projeto, almejou-se avaliar o envolvimento das galectinas 1, 3 e 4 e PAR-4 no processo de consolidação de memórias aversivas. Os níveis proteicos de galectina 1, 3 e PAR-4 nos hipocampos dos animais treinados não demonstraram diferença relevante quando comparado com o controle em quaisquer tempos avaliados. Em contrapartida, foi revelada uma menor expressão de galectina 4 no hipocampo de animais que foram sacrificados após 3 horas do treino.

A diminuição dos níveis de galectina 4 no período de tempo relatado pode indicar um provável papel de mecanismo neuroprotetor pelo qual haja redução dos processos neuroinflamatórios durante a fase de consolidação da memória. Ainda, pode-se propor a ausência de mecanismos de morte celular programada diante das variáveis avaliadas.

Dessa forma, apontamos que novas abordagens metodológicas direcionadas à investigação de galectina 4 devem ser empregadas para o esclarecimento de como a proteína atua na regulação do processo de consolidação de memórias aversivas. Com isso, aprofunda-se o conhecimento sobre os mecanismos neuromoleculares na consolidação da memória e condiciona-se o alcance de novas alternativas que reduzam a consolidação de memórias aversivas.

REFERÊNCIAS

- ABCAM. AB133406 – ECL Substrate kit (High Sensitivity): instructions for use. **Abcam**. [Inglaterra], 09 dez. 2020. Disponível em: [https://www.abcam.com/ps/products/133/ab133406/documents/ECL-Substrate-Kit-protocol-book-v4-ab133406%20\(website\).pdf](https://www.abcam.com/ps/products/133/ab133406/documents/ECL-Substrate-Kit-protocol-book-v4-ab133406%20(website).pdf). Acesso em: 04 out. 2022.
- ADHIKARI, A.; TOPIWALA, M.A.; GORDON, J.A. Synchronized activity between the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex during anxiety. **Neuron**, 65:257–269, 2010. doi: 10.1016/j.neuron.2009.12.002.
- AMAR, S. et al. Possible involvement of post-dopamine D2 receptor signalling components in the pathophysiology of schizophrenia. **Int J Neuropsychopharmacol.**, v. 11, n. 2, p. 197-205, 2008. doi: 10.1017/S1461145707007948.
- BLANCHARD, H. et al. Galectin-1 inhibitors and their potential therapeutic applications: a patent review. **Expert Opin. Ther. Pat.**, v. 26, n. 5, p. 537–554, 2016. doi: 10.1517/13543776.2016.1163338.
- BARONDES, S. H. et al. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell**, v. 76, n. 4, p. 597–598, 1994. doi: 10.1016/0092-8674(94)90498-7.
- BELO, A. I. et al. Galectin-4 reduces migration and metastasis formation of pancreatic cancer cells. **PLoS One**, v. 8, e65957, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0065957.
- BIEBERICH, E. et al. Regulation of cell death in mitotic neural progenitor cells by asymmetric distribution of prostate apoptosis response 4 (PAR-4) and simultaneous elevation of endogenous ceramide. **J. Cell Biol.**, v. 162, p. 469–479, 2003. doi: 10.1083/jcb.200212067.
- BIEBERICH, E. et al. Selective apoptosis of pluripotent mouse and human stem cells by novel ceramide analogues prevents teratoma formation and enriches for neural precursors in ES cell-derived neural transplants. **J. Cell Biol.**, v. 167, p. 723–734, 2004. doi: 10.1083/jcb.200405144.
- BOZA-SERRANO, A. et al. Galectin-3, a novel endogenous TREM2 ligand, detrimentally regulates inflammatory response in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol**, v. 138, n. 2, p. 251–273, 2019. doi: 10.1007/s00401-019-02013-z.
- BOZA-SERRANO, A. et al. Galectin-3 is elevated in CSF and is associated with A β deposits and tau aggregates in brain tissue in Alzheimer's disease. **Acta Neuropathol.**, v. 144, n. 5, p. 843-859, 2022. doi: 10.1007/s00401-022-02469-6.
- BREWER, C. F. Binding and cross-linking properties of galectins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, p. 255-262, 2002. doi: 10.1016/s0304-4165(02)00312-4.
- BREWIN, C. R. Memory and Forgetting. **Curr Psychiatry Rep.**, v. 20, n. 87, 2018. doi: 10.1007/s11920-018-0950-7.

BRINCHMANN, M. F.; PATEL, D. M.; IVERSEN, M. H. The role of galectins as modulators of metabolism and inflammation. **Mediat. Inflamm.**, n. 9186940, 2018. doi: 10.1155/2018/9186940.

BURGUILLOS, M. A. et al. Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation. **Cell Rep.**, v. 10, p. 1626-1638, 2015. doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.012.

CANTO-DE-SOUZA, L.; MATTIOLI, R. The consolidation of inhibitory avoidance memory in mice depends on the intensity of the aversive stimulus: The involvement of the amygdala, dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex. **Neurobiol Learn Mem**, v. 130, p. 44-51, 2016. doi: 10.1016/j.nlm.2016.01.012.

CAO, Z. Q.; GUO, X. L. The role of galectin-4 in physiology and diseases. **Protein Cell**, v. 7, n. 5, p. 314-24, 2016. doi: 10.1007/s13238-016-0262-9.

CENGIZ, T. et al. The roles of galectin-3 and galectin-4 in the idiopathic Parkinson disease and its progression. **Clin Neurol Neurosurg.**, v. 184, n. 105373, 2019. doi: 10.1016/j.clineuro.2019.105373.

CHAAYA, N.; BATTLE, A. R.; JOHNSON, L. R. An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 92, p. 43-54, 2018. doi: 10.1016/j.neubiorev.2018.05.013.

CHEN, Y. C. et al. Galectin-3 negatively regulates hippocampus- dependent memory formation through inhibition of integrin signaling and galectin-3 phosphorylation. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 10, n. 217, 2017. doi:10.3389/fnmol.2017.00217.

CHEN, H. L. et al. Galectins and Neuroinflammation. **Adv in Neurobiol.**, v. 9, p. 517–542, 2014. doi: 10.1007/978-1-4939-1154-7_24.

COMTE, I. et al. Galectin-3 maintains cell motility from the subventricular zone to the olfactory bulb. **J Cell Sci**, v. 124, p. 2438–2447, 2011. doi:10.1242/jcs.079954.

COOPER, D.N. Galectinomics: finding themes in complexity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1572, p. 209–231, 2002. doi: 10.1016/s0304-4165(02) 00310-0.

CULMSEE, C. et al. Evidence for the involvement of Par-4 in ischemic neuron cell death. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 21, 3p. 34–343, 2001. doi: 10.1097/00004647-200104000-00002.

DA ROSA, M. M. et al. Alzheimer's disease: Is there a role for galectins? **Eur J Pharm**, v. 909, n. 174437, 2021. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174437.

DA ROSA, M. M. et al. Opioid mechanisms are involved in the disruption of arcaine-induced amnesia by context pre-exposure. **Neurobiology of Learning and Memor**, v. 97, p. 294-300, 2012. doi: 10.1016/j.nlm.2012.02.002.

DÍEZ-REVUELTA, N. et al. Neurons define non-myelinated axon segments by the regulation of galectin-4-containing axon membrane domains. **Sci. Rep.**, v. 7, n. 12246, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-12295-6.

DONG, R. et al. Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). **Int J Mol Med.**, 41, n.2, p. 599-614, 2018. doi: 10.3892/ijmm.2017.3311.

DOVERHAG, C. et al. Galectin-3 contributes to neonatal hypoxic-ischemic brain injury. **Neurobiol. Dis.**, v. 38, n. 1, p. 36–46, 2010. doi: 10.1016/j.nbd.2009.12.024.

DUAN, W. et al. Participation of prostate apoptosis response-4 in degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, v. 46, p. 587–597, 1999. doi: 10.1002/1531-8249(199910)46:4<587::AID-ANA6>3.0.CO;2-M.

DUDAI Y, KARNI A, BORN J. The Consolidation and Transformation of Memory. **Neuron**, v. 88, p. 20-32, 2015. doi: 10.1016/j.neuron.2015.09.004.

EL-GUENDY, N. et al. Identification of a unique core domain of par-4 sufficient for selective apoptosis induction in cancer cells. **Mol Cell Biol**, v. 23, p. 5516– 5525, 2003. doi: 10.1128/MCB.23.16.5516-5525.2003.

FANSELOW, M. S. From contextual fear to a dynamic view of memory systems. **Trends Cogn Sci**, v. 14, p. 7-15, 2010. doi: 10.1016/j.tics.2009.10.008.

FRANKLAND, P. W.; BONTEMPI, B. The organization of recent and remote memories. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 6, p. 119–130, 2005. doi: 10.1038/nrn1607.

GAO, X. et al. Cleavage and phosphorylation: important post-translational modifications of galectin-3. **Cancer Metastasis Rev**, v. 36, p. 367–374, 2017. doi: 10.1007/s10555-017-9666-0.

GE, M. M. et al. Galectin-3 in microglia-mediated neuroinflammation: implications for central nervous system diseases. **Curr Neuropharmacol.**, v. 20, n. 11, p. 2066-2080, 2022. doi: 10.2174/1570159X20666220201094547.

GIOVANELLO, K. S.; SCHNYER, D.; VERFAELLIE, M.. Distinct hippocampal regions make unique contributions to relational memory. **Hippocampus**, v. 19, p. 111–117, 2009. doi: 10.1002/hipo.2049.

GU, Y. et al. Circulating inflammatory biomarkers in relation to brain structural measurements in a non-demented elderly population. **Brain. Behav. Immun.**, v. 65, p. 150–160, 2017. doi: 10.1016/j.bbi.2017.04.022.

GUO, Q. et al. Par-4 is a mediator of neuronal degeneration associated with the pathogenesis of Alzheimer disease. **Nat. Med.**, v. 4, p. 957–962, 1998. doi: 10.1038/nm0898-957.

GUO, Q. et al. Par-4 is a synaptic protein that regulates neurite outgrowth by altering

calcium homeostasis and transcription factor AP-1 activation. **Brain Res.**, v. 903, p. 13-25, 2001. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02304-6.

HENDERSON, N. C.; SETHI, T. The regulation of inflammation by galectin-3. **Immunol Rev.**, v. 230, p. 160-171, 2009. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00794.x.

HITTI, F. L.; SIEGELBAUM, S. A. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. **Nature**, v. 508, p. 88–92, 2014. doi: 10.1038/nature13028.

HOKAMA, A. et al. Induced reactivity of intestinal CD4(+) T cells with an epithelial cell lectin, galectin-4, contributes to exacerbation of intestinal inflammation. **Immunity**, v. 20, n. 6, p. 681–693, 2004. doi: 10.1016/j.immuni.2004.05.009.

HUANG, Y. et al. Treg Cells Attenuate Neuroinflammation and Protect Neurons in a Mouse Model of Parkinson's Disease. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 15, p. 224–237, 2020. doi: 10.1007/s11481-019-09888-5.

IMAIZUMI, Y. et al. Galectin-1 is expressed in early-type neural progenitor cells and downregulates neurogenesis in the adult hippocampus. **Mol. Brain**, v. 4, n. 7, 2011. doi: 10.1186/1756-6606-4-7.

ISHIBASHI, S. et al. Galectin-1 regulates neurogenesis in the subventricular zone and promotes functional recovery after stroke. **Exp Neurol.**, v. 207, n. 2, p. 302–313, 2007. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.06.024.

JAYARAMAN, A. TNF-mediated neuroinflammation is linked to neuronal necroptosis in Alzheimer's disease hippocampus. **Acta Neuropathol Commun.**, v. 9, n. 159, 2021 doi: 10.1186/s40478-021-01264-w.

JIANG, H. R. et al. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. **J. Immunol.**, v. 182, p. 1167–1173, 2009. doi: 10.4049/jimmunol.182.2.1167.

JOHANNES, L.; JACOB, R., LEFFLER, H. Galectins at a glance. **J Cell Sci.**, v. 131, jcs208884, 2018. doi: 10.1242/jcs.208884.

KANDEL, E. R.; DUDAI, Y.; MAYFORD, M. R. The molecular and systems biology of memory. **Cell**, v. 157, p. 163–186, 2014. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.001.

KAPUSCINSKI, J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. **Biotech Histochem.**, v. 70, n. 5, p. 220-33, 1995. doi: 10.3109/10520299509108199.

KISHI, T. et al. No association between prostate apoptosis response 4 gene (PAWR) in schizophrenia and mood disorders in a Japanese population. **Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.**, v. 147B, n. 4, p. 531–534, 2008. doi: 10.1002/ajmg.b.30634.

LAW, H. L. et al. A Pro-resolving Role for Galectin-1 in Acute Inflammation. **Front. Pharmacol.**, v. 11, n. 274, 2020. doi: 10.3389/fphar.2020.00274.

LEDOUX, J. E. Coming to terms with fear. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 111, n. 8, p. 2871-2878, 2014. doi: 10.1073/pnas.1400335111.

LEE, T. J. et al. Overexpression of par-4 sensitizes trail-induced apoptosis via inactivation of nf-kappab and akt signaling pathways in renal cancer cells. **J Cell Biochem.**, v. 109, p. 885-95, 2010. doi: 10.1002/jcb.22504.

LI, C.; SONG, Y.; LI, P. MCL1 regulates cell death, tumor growth and chemosensitivity to sabutoclax in ovarian adenocarcinoma. **Cell Tissue Res.**, v. 379, n. 3, p. 625-633, 2020a. doi: 10.1007/s00441-019-03105-8.

LI, Y. et al. Galectin-1 attenuates neurodegeneration in Parkinson's disease model by modulating microglial MAPK/I κ B/NF κ B axis through its carbohydrate-recognition domain. **Brain Behav Immun.**, v. 83, p. 214-225, 2020b. doi: 10.1016/j.bbi.2019.10.015.

LIN, J.; REDIES, C. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. **Dev Genes Evol.**, v. 222, n. 6, p. 369-76, 2012. doi: 10.1007/s00427-012-0420-x.

LOWTHER, M. K. et al. Relationship between inflammatory biomarker galectin-3 and hippocampal volume in a community study. **J Neuroimmunol.**, v. 348, n. 577386, 2020. doi: 10.1016/j.jneuroim.2020.577386.

MAENG, L. Y; WADDELL, J.; SHORS, T. J. The Prefrontal Cortex Communicates with the Amygdala to Impair Learning after Acute Stress in Females but Not in Males. *Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 48, p. 16188-16196, 2010. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2265-10.2010.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annu Rev Neurosci.**, v. 24, p. 897-931, 2001. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.897.

MAREN, S; PHAN, K. L.; LIBERZON, I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. **Nat. Rev. Neurosci**, v. 14, p. 417–428, 2013. doi: 10.1038/nrn3492.

MATTSON, M. P. Perturbed endoplasmic reticulum function, synaptic apoptosis and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochem Soc Symp.**, v. 67, p. 51-62, 2001. doi: 10.1042/bss0670151.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, v. 287, P. 248-51, 2000. doi: 10.1126/science.287.5451.248.

MEMÓRIA. In: DICIO, Dicionário Online de Português. Porto: 7Graus, 2022. Disponível em: <https://www.dicio.com.br/memoria/>. Acesso em: 06 nov. 2022.

MORRA, J. H. et al. Automated 3D mapping of hippocampal atrophy and its clinical correlates in 400 subjects with Alzheimer's disease, mild cognitive impairment, and elderly controls. **Hum. Brain Mapp.**, v. 30, p. 2766–2788, 2009. doi: 10.1002/hbm.20708.

NGUYEN, J. Q.; IRBY, R. B. TRIM21 is a novel regulator of Par-4 in colon and pancreatic cancer cells. **Cancer Biol Ther.**, v. 18, n. 1, p. 16-25, 2017. doi: 10.1080/15384047.2016.1252880.

NOKIA, M. S.; PENTTONEN, M. Rhythmic Memory Consolidation in the Hippocampus. **Front Neural Circuits**, v. 16, n. 885684, 2022. doi: 10.3389/fncir.2022.885684.

PACLIK, D. et al. Galectin-4 controls intestinal inflammation by selective regulation of peripheral and mucosal T cell apoptosis and cell cycle. **PLoS One**, v. 3, n. e2629. doi: doi: 10.1371/journal.pone.0002629.

PAMMI, C.; SRINIVASAN, N. Contextual and social influences on valuation and choice. In: ENGELMANN, J. B.; HEIN, G. **Decision Making: Neural and Behavioural Approaches**. 1 ed. Progress in Brain Research, 2013. p. 215-237.

PARK, S. K. et al. Par-4 links dopamine signaling and depression. **Cell.**, v. 122, n. 2, p. 275–287, 2005. doi: 10.1016/j.cell.2005.05.031.

PASQUINI, L. A. et al. Galectin-3 drives oligodendrocyte differentiation to control myelin integrity and function. **Cell Death Differ.**, v. 18, p. 1746–1756, 2011. doi: 10.1038/cdd.2011.40.

PEDERSEN, W.A. et al. The prostate apoptosis response-4 protein participates in motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. **FASEB J.**, v. 14, p. 913–924, 2000. doi: 10.1096/fasebj.14.7.913.

PRESA, L. P. et al. Galectin-1 improves cognition and reduces amyloid- β deposits in an animal model of Alzheimer's disease possibly by modulating microglia phenotype and increasing A β clearance. **IBRO Reports**, 2019. doi: 10.1016/j.ibror.2019.07.1502.

PUIGDELLÍVOL, M.; ALLENDORF, D. H.; BROWN, G. C. Sialylation and Galectin-3 in Microglia-Mediated Neuroinflammation and Neurodegeneration. **Front Cell Neurosci.**, v. 14, n. 162, 2020. doi: 10.3389/fncel.2020.00162.

RAHIMIAN, R. et al. Delayed galectin-3-mediated reprogramming of microglia after stroke is protective. **Mol Neurobiol.**, v. 56, n. 9, p. 6371-6385, 2019. doi: 10.1007/s12035-019-1527-0.

RAHIMIAN, R. et al. Microglia-derived galectin-3 in neuroinflammation; a bittersweet ligand? **Med Res Rev.**, v. 41, n. 4, p. 2582-2589, 2021. doi: 10.1002/med.21784.

RAHIMIAN, R.; BELAND, L. C.; KRIZ, J. Galectin-3: mediator of microglia responses in injured brain. **Drug Discov Today.**, v. 23, n. 2, p. 375- 381, 2018. doi: 10.1016/j.drudis.2017.11.004.

RAMÍREZ HERNÁNDEZ, E. et al. Neuroinflammation and galectins: a key relationship in neurodegenerative diseases. **Glycoconj J.**, v. 39, n. 5, p. 685-699.,

2022 doi: 10.1007/s10719-022-10064-w.

RAMÍREZ, E. et al. Neuroinflammation induced by the peptide amyloid- β (25-35) increase the presence of galectin-3 in astrocytes and microglia and impairs spatial memory. **Neuropeptides**, v. 74, p. 11–23, 2019. doi: 10.1016/j.npep.2019.02.001.

RAMÍREZ HERNÁNDEZ, E. et al. The therapeutic potential of galectin-1 and galectin-3 in the treatment of neurodegenerative diseases. **Expert Rev Neurother**, v. 20, n. 5, p. 439–448, 2020. doi: 10.1080/14737175.2020.1750955.

REICHERT, F.; ROTSHENKER, S. Galectin-3/MAC-2 in experimental allergic encephalomyelitis. **Exp. Neurol.**, v. 160, p. 508–514, 1999. doi: 10.1006/exnr.1999.7229.

ROBERTSON, L. T. Memory and the brain. **J Dent Educ.**, v. 66, p. 30–42, 2022. doi: 10.1002/j.0022-0337.2002.66.1.tb03506.x.

ROOZENDAAL, B. et al. The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: dependence on the basolateral amygdala. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 1328–1333, 2003. doi: 10.1073/pnas.0337480100.

ROTSHENKER, S. The role of Galectin-3/MAC-2 in the activation of the innate-immune function of phagocytosis in microglia in injury and disease. **J. Mol. Neurosci.**, v. 39, p. 99–103, 2009. doi: 10.1007/s12031-009-9186-7.

SACCHETTINI, J. C.; BAUM, L. G.; BREWER, C. F. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. **Biochemistry**, v. 40, p. 3009–3015, 2001. doi: 10.1021/bi002544j.

SAKAGUCHI, M. et al. Impaired spatial and contextual memory formation in galectin-1 deficient mice. **Mol. Brain**, v. 4, n. 33, 2011. doi: 10.1186/1756-6606-4-33.

SANTOS, K. R. P. et al. Manual de técnica histológica de rotina e de colorações. Vitória de Santo Antão, 2021. 32 p. (1,51 MB); il. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/40530>. Acesso em: 04 out. 2022.

SARTIM, A. G. et al. Impaired emotional response to stress in mice lacking galectin-1 or galectin-3. **Physiol Behav.**, v. 220, n. 112862, 2020. doi: 10.1016/j.physbeh.2020.112862.

SASAKI, T. et al. Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor. **Glycobiology**, v. 14, p. 357–363, 2004. doi: 10.1093/glycob/cwh043.

SELLS, S. F. et al. Expression and function of the leucine zipper protein Par-4 in apoptosis. **Mol. Cell Biol**, v. 17, p. 3823–3832, 1997. doi: 10.1128/MCB.17.7.3823.

SEKI, T. Galectin 3-binding protein suppresses amyloid- β production by modulating β -cleavage of amyloid precursor protein. **J. Biol. Chem.**, v. 295, n. 11, p. 3678–3691,

2020. doi: 10.1074/jbc.RA119.008703.

SHIN, T. The pleiotropic effects of galectin-3 in neuroinflammation: a review. **Acta histochemica.**, v. 15, p. 407–411, 2013. doi: 10.1016/j.acthis.2012.11.010.

SHOHAMY, D.; ADCOCK, R. A. Dopamine and adaptive memory. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 14, p. 464–472, 2010. doi: 10.1016/j.tics.2010.08.002.

SHRESTHA-BHATTARAI, T.; HEBBAR, N.; RANGNEKAR, V. M. Par(-4)oxysm in breast cancer. **Cancer Cell**, v. 24, n. 1, p. 3-5, 2013. doi: 10.1016/j.ccr.2013.06.010.

SREJOVIC, I. Galectin-3: Roles in neurodevelopment, neuroinflammation, and behavior. **Biomolecules**, v. 10, n. 798, 2020. doi: 10.3390/biom10050798.

STANCIC, M. et al. Galectin-4, a novel neuronal regulator of myelination. **Glia**, v. 60, n. 6, p. 919–935, 2012. doi: 10.1002/glia.22324.

STANCIC, M. et al. Increased expression of distinct galectins in multiple sclerosis lesions. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 37, n. 6, p. 654–671, 2011. doi: 10.1111/j.1365-2990.2011.01184.x.

STAROSSOM, S. C. et al. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. **Immunity**, v. 37, n. 2, p. 249–263, 2012. doi: 10.1016/j.immuni.2012.05.023.

STORAN, M. J. et al. Expression and putative role of lactoseries carbohydrates present on NCAM in the rat primary olfactory pathway. **J. Comp. Neurol.**, v. 475, n. 3, p. 289–302, 2004. doi: 10.1002/cne.20167.

SUNDBLAD, V. et al. Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation. **J Immunol.**, v. 199, n. 11, p. 3721-3730, 2017. doi: 10.4049/jimmunol.1701172. PMID: 29158348.

TAO, C. C. et al. Galectin-3 promotes A β oligomerization and A β toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. **Cell Death Differ.**, v. 27, n. 1, p. 192-209, 2020. doi: 10.1038/s41418-019-0348-z.

TSENG, H. Y. et al. Co-targeting bromodomain and extra-terminal proteins and MCL1 induces synergistic cell death in melanoma. **Int J Cancer**, v. 147, n. 8, p. 2176-2189, 2020. doi: 10.1002/ijc.33000.

VASTA, G. R. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 946, p. 21–36, 2012. doi: 10.1007/978-1-4614-0106-3_2.

VELASCO, S. et al. Neuronal Galectin-4 is required for axon growth and for the organization of axonal membrane L1 delivery and clustering. **J. Neurochem.**, v. 125, p. 49–62, 2013. doi: 10.1111/jnc.12148.

WANG, G et al. Astrocytes secrete exosomes enriched with proapoptotic ceramide

and prostate apoptosis response 4 (PAR-4): potential mechanism of apoptosis induction in Alzheimer disease (AD). **J Biol Chem.**, v. 287, n. 25, p. 21384-21395, 2012. doi: 10.1074/jbc.M112.340513.

WANG, L. H et al. Association of missense variants of the PRKC, apoptosis, WT1, regulator (PAWR) gene with schizophrenia. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v. 32, n. 3, p. 870–875, 2008. doi: 0.1016/j.pnpbp.2008.01.003.

WEI, Q. et al. Galectin-4 is involved in p27-mediated activation of the myelin basic protein promoter. **J. Neurochem.**, 101, 1214–1223, 2007. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04488.x.

WU, H. C. et al. Alterations of plasma Galectin-3 and C3 levels in patients with Parkinson's disease. **Brain Sci.**, v. 11, n. 1515, 2021. doi: 10.3390/brainsci11111515.

YANG, R.Y.; RABINOVICH, G.A.; LIU, F.T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. **Expet Rev. Mol. Med.**, v. 10, e17, 2008. doi: 10.1017/S1462399408000719.

YASEEN, H. et al. Galectin-1 Facilitates Macrophage Reprogramming and Resolution of Inflammation Through IFN- β . **Front Pharmacol.**, v. 11, n. 901, 2020. doi: 10.3389/fphar.2020.00901.

YOO, H. I. et al. Neuroanatomical distribution of galectin–3 in the adult rat brain. **J. Mol. Histol.**, v. 48, p. 133–146, 2017. doi: 10.1007/s10735-017-9712-9.

YÜKSEL, R. N. et al. Galectin-1 and Galectin-3 Levels in Patients with Schizophrenia and their Unaffected Siblings. **Psychiatr Q.**, v. 91, n. 3, p. 715-725, 2020. doi: 10.1007/s11126-020-09731-8.

ZHUANG, D. et al. Tmz-induced prpc/par-4 interaction promotes the survival of human glioma cells. **Int J Cancer**, v. 130, p. 309-18, 2011. doi: 10.1002/ijc.25985.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Artigo publicado

European Journal of Pharmacology 909 (2021) 174437



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

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



Alzheimer's disease: Is there a role for galectins?

Michelle Melgarejo da Rosa^{a,b,*}, Manoela de Aguiar Ferreira^d,
Crysване Araújo de Oliveira Lima^d, Anna Claudia Santos Mendonça^d, Yasmim Meneses Silva^d,
Muhammad Sharjeel^e, Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego^a, Michelly Cristiny Pereira^{b,c},
Maira Galdino da Rocha Pitta^a

^a Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^b Center for Therapeutic Innovation - Suelly Galdino (NUPIT-SG), Recife, Brazil

^c Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^d Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^e King Edward Medical University, Lahore, Pakistan

ARTICLE INFO

Keywords:
Alzheimer's disease
Galectins
Inflammation
Neuroprotection

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the world's leading cause of neurological dysfunction, cognitive decline, and neuronal loss in the elderly. The sedimentation of beta amyloid (A β)-containing plaque, and formation of tau-containing neurofibrillary tangles (NFTs) along with extensive neuroinflammation, are the events that characterize the pathogenesis of AD. Galectins (gal) are carbohydrate-containing-ligand molecules recognized as potential modulators of the brain microglia polarization, immunosurveillance, neuroinflammation, and neuroprotection. Galectins 1, 3, 4, 8, and 9 are amongst the 15 members of the galectin family which are expressed in the brain. These galectins possess a significant correlation with neuromodulation through the glial cell-induced cytokine production that plays either a complementary or antagonistic role in the disturbance of the CNS physiology. Therefore, elaborating the hypothesis of galectins in the development of AD is of potential interest. This review aims at discussing the interaction between galectins and the neuropathophysiology of AD. An understanding about how galectins communicate with AD progression could lead to the development of improved diagnostic and therapeutic strategies for this leading cause of dementia worldwide.

Fonte: Disponível em

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299921005902?via%3Dihub>.

ANEXOS

ANEXO A

Cópia do parecer do Comitê de Ética Animal da UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife – PE – Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 05 de maio de 2020

Ofício nº 24/20

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Michelle Melgarejo da Rosa**

Centro de Biociências/ Departamento de bioquímica – Núcleo de Pesquisa
 para Inovação Terapêutica – Suely Galdino - NUPIT
 processo nº0013/2020

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação in vivo e in vitro de mecanismos neuromoleculares envolvidos nos efeitos mnemônicos de PAR-4 e Galectinas**”. registrado com o nº0013/2020 sob a responsabilidade da **Prof. Michelle Melgarejo da Rosa** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 28/04/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Abril de 2020 a dezembro de 2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico
Nº de animais	102
Peso/Idade	25-40g/6-8 semanas
Sexo	Macho (102)
Origem: Biotério de Criação	Biotério Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério Departamento de Fisiologia e Farmacologia

ANEXO B
Normas da revista do artigo publicado



EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.4



ISSN: 0014-2999

DESCRIPTION

The *European Journal of Pharmacology* publishes research papers covering all aspects of **experimental pharmacology** with focus on the mechanism of action of **structurally identified compounds** affecting **biological systems**.

The scope includes: **Behavioural pharmacology, Neuropharmacology and psychopharmacology, Cardiovascular pharmacology, Pulmonary, gastrointestinal and urogenital pharmacology, Endocrine pharmacology, Immunopharmacology and inflammation, Molecular and cellular pharmacology, Regenerative pharmacology, Biologicals and biotherapeutics, Translational pharmacology and Nutraceutical pharmacology.**

The journal publishes full-length papers and reviews. Ethnopharmacological studies with plant extracts or mixtures are not in scope of this journal.

The table of contents for this journal is now available pre-publication, via e-mail, as part of the free ContentsDirect service from Elsevier. Please send an e-mail message to cdhelp@elsevier.co.uk for further information about this service.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

[backbanner.gifScienceDirect Backfiles](#)

AUDIENCE

Pharmacologists, Toxicologists, Neuroscientists, Molecular Biologists, Medicinal Chemists

IMPACT FACTOR

2021: 5.195 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

Fonte: disponível em

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506087?generatepdf=true