



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

RENATO RODRIGUES ROMA

**EFEITO NEUROPROTETOR DA LECTINA DE *Canavalia ensiformis* (ConA) VIA
SÍTIO DE LIGAÇÃO A AMINOÁCIDOS EM CÉLULAS DA LINHAGEM PC12 Adh**

FORTALEZA

2025

RENATO RODRIGUES ROMA

EFEITO NEUROPROTETOR DA LECTINA DE *Canavalia ensiformis* (ConA) VIA SÍTIO
DE LIGAÇÃO A AMINOÁCIDOS EM CÉLULAS DA LINHAGEM PC12 Adh

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira

FORTALEZA

2025

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

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

R661e Roma, Renato Rodrigues.

Efeito neuroprotetor da lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) via sítio de ligação a aminoácidos em células da linhagem PC12 adh / Renato Rodrigues Roma. – 2025.

74 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira.

1. Excitotoxicidade. 2. Neuroproteção. 3. Sítio de ligação a aminoácidos. 4. PC12. 5. Lectina. I. Título.

CDD 572

RENATO RODRIGUES ROMA

EFEITO NEUROPROTETOR DA LECTINA DE *Canavalia ensiformis* (ConA) VIA SÍTIO
DE LIGAÇÃO A AMINOÁCIDOS EM CÉLULAS DA LINHAGEM PC12 Adh

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Aprovado em __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claudener Souza Teixeira (Orientador)
Universidade Federal do Cariri (UFCA)

Prof. Dr. Rômulo Farias Carneiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UECE)

Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva
Universidade Ceuma (UNICEUMA)

Prof. Dr. Victor Diógenes Amaral da Silva
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Aos meus avós paternos, Olga de Abreu Viana
Roma e José de Ribamar Viana Roma (*In
memoriam*)
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, a fonte da vida e de todas as bênçãos que tornaram esta jornada não apenas possível, mas também extraordinária em seus detalhes;

Minha eterna gratidão à minha amada família, com um carinho especial pelos meus avós paternos, Olga de Abreu Viana Roma e José de Ribamar Viana Roma, e minhas tias, Raimunda Orlandina Viana Roma e Orlanilde Viana Roma Chaves, cujo apoio e incentivo foram pilares fundamentais nesta trajetória;

Ao meu orientador, Claudener Souza Teixeira, expresso minha sincera gratidão pela amizade, pelos ensinamentos e pela confiança que sempre depositou em mim;

A minha namorada Janylla Jossana, cujo apoio constante e crença no meu potencial foram um farol nos momentos difíceis desta jornada, principalmente essenciais para enfrentar a distância de casa;

A todos os meus companheiros do Laboratório de Biologia Estrutural e Molecular (LaBEM) em especial, Ana Lúcia, Maria Helena, Romério, Adrielle, Fábio, Jayane, Daiany, Gerlânia, Israel, Jainaldo e Yasmim pelo companheirismo e sempre proporcionarem um ambiente saudável e amigoso de trabalho;

A todos que conheci no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq), Irlã, Fernanda, Raquel, Flávia, professor Victor e em especial a professora Silvia por acreditar neste trabalho e a Erica Novaes por toda paciência, ensinamentos e auxílio durante a realização deste trabalho;

Ao professor Wanius Garcia da Universidade Federal do ABC, por abraçar entusiasmado a ideia deste trabalho;

Aos professores Bruno Anderson Matias da Rocha, Rômulo Farias Carneiro e Alice Maria Costa Martins que generosamente cederam seus laboratórios para o começo desta jornada;

A todas as amigas construídas e, principalmente, a Taison, Caio, Tiago, Wesley e Demilson, cuja presença constante tornou os momentos de descontração ainda melhores e me fortaleceu nesta caminhada;

Ao programa de pós-graduação em bioquímica da Universidade Federal do Ceará por sediar este ideal;

A Universidade Federal do Cariri pelo acolhimento e amigas feitas;

A Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) pela concessão da bolsa de doutorado que auxiliou toda a realização deste sonho;

Ao CNPq e CAPES por acreditar nas nossas pesquisas e pelo apoio financeiro;

A cada professor que marcou minha trajetória acadêmica, desde o ensino básico até a pós-graduação, e que contribuíram para o meu crescimento e para a concretização deste doutorado;

A todos que de forma direta ou indiretamente ajudaram a realização desse trabalho. Se algum nome ficou de fora, peço desculpas, mas saibam que minha gratidão é sincera e se estende a cada um de vocês.

“O progresso da ciência depende de novas técnicas, novas descobertas e novas ideias, provavelmente na ordem inversa.” (Sydney Brenner, Nature, 5 de maio de 1980).

RESUMO

O glutamato, principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, desempenha um papel crucial em diversas funções fisiológicas. No entanto, o excesso de glutamato na fenda sináptica induz a excitotoxicidade, um processo associado a várias doenças e condições neuropatológicas. A busca por medicamentos em compostos bioativos de plantas, como as lectinas, torna-se essencial para o bem-estar humano. As lectinas, proteínas que se ligam especificamente e reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados, demonstram atividades promissoras ao sistema nervoso central como, antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras. Contudo, seus mecanismos neuroprotetores focam apenas no domínio de reconhecimento a carboidratos, negligenciando outros sítios de ligação. Por isso, este estudo investigou o efeito neuroprotetor *in vitro* da lectina de *Canavalia ensiformis* - ConA em células PC12 e *in silico* sua interação com glutamato através de um sítio diferente do domínio de reconhecimento a carboidratos. A ConA foi testada quanto à neuroproteção contra a toxicidade induzida por glutamato em células PC12 utilizando ensaios de MTT. Técnicas de espectroscopia de fluorescência e docking molecular foram utilizadas para avaliar a interação e a afinidade entre a ConA e o glutamato. Os resultados revelaram que o efeito neuroprotetor da ConA, não é dose-dependente e independe do seu domínio de reconhecimento a carboidratos. O mecanismo de ação descoberto envolve o sequestro direto do glutamato através do sítio de ligação a aminoácidos da ConA. As análises de espectroscopia e docking molecular confirmaram essa interação por este sítio hidrofóbico. Essas descobertas ampliam o potencial terapêutico das lectinas vegetais no tratamento de doenças do sistema nervoso central, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias mais direcionadas e inovadoras.

Palavras-chave: excitotoxicidade; neuroproteção; sítio de ligação a aminoácidos; PC12; lectina.

ABSTRACT

Glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the central nervous system, plays a crucial role in various physiological functions. However, excess glutamate in the synaptic cleft induces excitotoxicity, a process associated with several neuropathological diseases and conditions. The search for drugs from bioactive plant compounds, such as lectins, becomes essential for human well-being. Lectins, proteins that specifically and reversibly bind to carbohydrates and glycoconjugates, demonstrate promising activities in the central nervous system, such as antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective effects. However, their neuroprotective mechanisms focus only on the carbohydrate-recognition domain, neglecting other binding sites. Therefore, this study investigated the *in vitro* neuroprotective effect of *Canavalia ensiformis* lectin - ConA in PC12 cells and its *in silico* interaction with glutamate through a site different from the carbohydrate-recognition domain. ConA was tested for neuroprotection against glutamate-induced toxicity in PC12 cells using MTT assays. Fluorescence spectroscopy and molecular docking techniques were used to evaluate the interaction and affinity between ConA and glutamate. The results revealed that the neuroprotective effect of ConA is not dose-dependent and is independent of its carbohydrate-recognition domain. The mechanism of action discovered involves the direct sequestration of glutamate through ConA's amino acid binding site. Spectroscopy and molecular docking analyses confirmed this interaction through this hydrophobic site. These findings expand the therapeutic potential of plant lectins in the treatment of central nervous system diseases, opening new perspectives for the development of more targeted and innovative therapies.

Keywords: excitotoxicity; neuroprotection; amino acid binding site; PC12; lectin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Metabolismo do glutamato. Diversidade de funções do glutamato, desde precursor de outros aminoácidos e moléculas até sua função como neurotransmissor excitatório	20
Figura 2 -	Receptores glutamatérgicos. As duas grandes classes de receptores de glutamato e suas diferenças nos mecanismos de ativação	21
Figura 3 -	Ciclo glutamato-glutamina. Este ciclo garante que o glutamato seja reciclado e que sua concentração na fenda sináptica seja mantida em níveis adequados para a neurotransmissão	22
Figura 4 -	Representação esquemática das demais vias de neurotransmissão glutamatérgica. Em amarelo encontrasse o EAAT, responsável pela liberação não vesicular de glutamato, cujo em condições patológicas assume o papel de reversão de seu funcionamento, liberando glutamato para o espaço extracelular. O acúmulo de glutamato extracelular pode levar à danos neuronais. Em Azul temos o antiportador cistina-glutamato que recolhe cistina extracelular e envia glutamato intracelular. A cistina é essencial para a síntese de glutathione, um importante antioxidante que protege as células contra o estresse oxidativo	23
Figura 5 -	Excitotoxicidade glutamatérgica clássica, cujo ocorre a saturação dos receptores de glutamato e um influxo massivo de íons, culminando em estresse oxidativo e resultando em danos celulares	25
Figura 6 -	Excitotoxicidade glutamatérgica via antiportador cistina-glutamato, o excesso de glutamato extracelular inibe a entrada de cistina na célula, assim diminuindo os níveis de GSH e aumentando o número de espécies reativas a oxigênio, levando a apoptose	26
Figura 7 -	Estrutura tridimensional da ConA complexada com trimanosídeo (PDB ID: 1CVN). O trimanosídeo interage com o CRD que é estabilizado pelo MBS, os íons cálcio (verde) e manganês (roxo) são mostrados ao fundo. A: Representação monomérica. B: Representação tetramérica	30
Figura 8 -	Estrutura tridimensional da CGL (PDB ID: 2D7F), enfatizando a presença do AABA na interface do dímero canônico das lectinas ConA-like	31

Figura 9 -	Representação de algumas atividades biológicas descritas para a ConA ..	34
Figura 10 -	Modelo de ensaio neuroprotetor <i>in vitro</i> utilizando células PC12	36
Figura 11 -	Curva de toxicidade do L-glutamato em células PC12. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT 24 horas após os tratamentos. Os experimentos foram feitos em triplicatas e em três ocasiões diferentes. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (CT), considerado 100% onde a significância foi considerada ($*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni)	52
Figura 12 -	Curva de citotoxicidade da ConA em células PC12. (A) = Forma nativa. (B) = Forma desmetalizada. A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de MTT 24 horas após o tratamento. Cada experimento foi feito em triplicata e repetido em três momentos diferentes. Os resultados foram apresentados como uma porcentagem do controle (CT), que foi considerado 100% onde a significância foi considerada ($*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni)	53
Figura 13 -	Ensaio de neuroproteção da ConA em células PC12. (A) = Forma nativa com 10 mM de glutamato. (B) = Forma desmetalizada com 10 mM de glutamato. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT 24 horas após os tratamentos. Triplicatas foram realizadas em três ocasiões distintas. Os resultados são comparados ao glutamato (GLU) onde a significância foi considerada ($*p \leq 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni)	54
Figura 14 -	Ensaio de neuroproteção da ConA exclusivamente nas concentrações que protegeram a cultura de células PC12 da excitotoxicidade por L-glutamato. (A) = Ensaio de neuroproteção da ConA 15,6 µg/mL nas formas nativa e desmetalizada com 10 mM de L-glutamato. Os experimentos foram realizados em triplicatas, em três ocasiões distintas. A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de MTT 24 h pós-tratamento. Os resultados foram comparados ao L-glutamato (GLU) onde a significância foi considerada ($*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni). (B) = Análise microscópica de células PC12 após tratamento com 10 mM de L-glutamato, 10 mM de L-glutamato com ConA nativa 15,6 µg/mL, 10 mM de L-glutamato com ConA	

desmetalizada 15,6 µg/mL, e controle negativo. Objetiva ×40. Escala = 100 µm 55

Figura 15 - Ensaio de neuroproteção da ConA com adição de aMM em células PC12. (A) = Curva de citotoxicidade de aMM. A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de MTT 24 h pós-tratamento. Triplicatas foram realizadas em três ocasiões distintas. Os resultados foram comparados ao controle (CT) (* $p < 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni). (B) = Ensaio de neuroproteção da ConA 15,6 µg/mL nas formas nativa e desmetalizada com 10 mM de L-glutamato e 6,25 mM de aMM. Os experimentos foram realizados em triplicatas, em três momentos distintos. Os resultados foram comparados ao L-glutamato (GLU) onde a significância foi considerada (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni). (C) = Análise microscópica de células PC12 após tratamento com 10 mM de L-glutamato + 6,25 mM de aMM, 10 mM de L-glutamato com ConA nativa 15,6 µg/mL + 6,25 mM de aMM, 10 mM de L-glutamato com 15,6 µg/mL de ConA desmetalizada + apenas 6,25 mM de aMM, 6,25 mM de aMM, e um controle negativo. Objetiva ×40. Escala = 100 µm 57

Figura 16 - Espectroscopia de fluorescência intrínseca. (A) = Espectros de emissão da ConA na presença de diferentes concentrações de L-glutamato (0 a 2,4 mM). Inserção superior: Gráfico de Stern-Volmer ($R^2 = 0,984$). Inserção inferior: Gráfico logarítmico duplo de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log(\text{L-glutamato})$ derivado do quenching de fluorescência da ConA induzido por L-glutamato. (B) = Espectros de emissão da ConA na presença de diferentes concentrações de aMM (0 a 1,0 mM). Inserção superior: Gráfico de Stern-Volmer ($R^2 = 0,995$). Inserção inferior: Gráfico logarítmico duplo de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log(\text{aMM})$ derivado do quenching de fluorescência da ConA induzido por aMM. (C) = Espectros de emissão da ConA na presença de 1 mM de aMM e diferentes concentrações de L-glutamato (0 a 2,4 mM). Inserção superior: Gráfico de Stern-Volmer ($R^2 = 0,975$). Inserção inferior: Gráfico logarítmico duplo de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log(\text{L-glutamato})$ derivado do quenching de fluorescência da ConA induzido por L-glutamato 59

Figura 17 - *Docking* Molecular. (A) = Interação 3D dos resíduos de aminoácidos pertencentes ao sítio de ligação de aminoácidos da ConA que interagem com o L-glutamato e suas respectivas distâncias de ligação. Ligações verdes correspondem a interações polares e ligações amarelas a interações apolares. (B) = Interação 2D dos resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de aminoácidos da ConA com o L-glutamato. Ligações verdes correspondem a interações polares e ligações amarelas a interações apolares. (C) = L-Glutamato ligado à estrutura da ConA, evidenciando que o sítio de ligação de aminoácidos está localizado na interface do dímero canônico das lectinas ConA-like. A estrutura da ConA foi obtida do PDB com o código de acesso 1CVN. (D) = L-Glutamato interagindo com a cavidade do sítio de ligação de aminoácidos da ConA 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resíduos de aminoácidos que compõem o bolso hidrofóbico do AABA, mostrando a conservação de sequência nas lectinas ConA-like. Em vermelho, os aminoácidos não conservados em relação ao sítio de ligação original do AABA	31
Tabela 2 -	Atividade hemaglutinante da ConA em suas formas nativa e desmetalizada, na presença e ausência de L-glutamato	50
Tabela 3 -	Resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com L-glutamato	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AABA	Ácido α -aminobutírico
AIF	Fator indutor de apoptose mitocondrial
Ala	Alanina
aMM	α -metil-D-manopiranosídeo
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Cálcio
CaBo	Lectina de <i>Canavalia bonariensis</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
cAMP	AMP cíclico
Cbol	Lectina de <i>Canavalia boliviana</i>
CGL	Lectina de <i>Canavalia gladiata</i>
cm	Centímetros
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConA-like	Lectinas semelhantes a ConA
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
ConGF	Lectina de <i>Canavalia grandiflora</i>
ConM	Lectina de <i>Canavalia marítima</i>
ConV	Lectina de <i>Canavalia virosa</i>
CRD	Domínio de reconhecimento a carboidratos
DLL	Lectina de <i>Dioclea lasiocarpa</i>
DlyL	Lectina de <i>Dioclea lasiophylla</i>
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DrfL	Lectina de <i>Dioclea reflexa</i>
Dvir	Lectina de <i>Dioclea virgata</i>
DVL	Lectina de <i>Dioclea violaceae</i>
EAATs	Transportadores de aminoácidos excitatórios

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERN	Espécies reativas a nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FBS	Soro fetal bovino
<i>g</i>	Força Gravitacional
g	Gramma
Glc α	α -glicose
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
GSH	Glutathiona
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
His	Histidina
HS	Soro equino
HU	Unidades hemaglutinantes
iGluRs	Receptores ionotrópicos
IL	Interleucina
KARs	Kainato
kcal/mol	Quilocalorias por mol
kDa	QuiloDalton
Leu	Leucina
M	Molar
Man α	α -manose
MBS	Sítio de ligação a metais
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mGluRs	Receptores metabotrópicos
MIC	Concentração inibitória mínima
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mn ²⁺	Manganês

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NGF	Fator de crescimento nervoso
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintase
°C	Grau Celsius
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Fosfatidilinositol
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
TLR4	Toll-like receptor 4
Tris	Hidroximetil aminometano
Tyr	Tirosina
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
v/v	Volume por volume
Val	Valina
VGLUTs	Transportadores vesiculares de glutamato
VML	Lectina de <i>Vatairea macrocarpa</i>
w/v	Massa por volume
xCT	Antiportador cistina-glutamato
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1	Glutamato	19
1.2	Receptores glutamatérgicos	20
1.3	Neurotransmissão glutamatérgica	21
1.4	Excitotoxicidade glutamatérgica	23
1.5	Prospecção de moléculas neuroprotetoras	26
1.6	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i> (ConA)	28
<i>1.6.1</i>	<i>Histórico</i>	<i>28</i>
<i>1.6.2</i>	<i>Purificação e afinidade de ligação</i>	<i>28</i>
<i>1.6.3</i>	<i>Estrutura tridimensional</i>	<i>29</i>
<i>1.6.4</i>	<i>Atividades biológicas</i>	<i>32</i>
1.7	Modelo de estudo: células PC12	34
2	HIPÓTESE	38
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	CAPÍTULO 2: ARTIGO PUBLICADO	40
4.1	Introdução	43
4.2	Materiais e métodos	44
<i>4.2.1</i>	<i>Produtos químicos e reagentes</i>	<i>44</i>
<i>4.2.2</i>	<i>Purificação da lectina de <i>C. ensiformis</i> – ConA</i>	<i>44</i>
<i>4.2.3</i>	<i>Inativação do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD)</i>	<i>45</i>
<i>4.2.4</i>	<i>Cultura e tratamentos das células PC12</i>	<i>46</i>
<i>4.2.5</i>	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	<i>46</i>
<i>4.2.6</i>	<i>Ensaio de neuroproteção</i>	<i>47</i>
<i>4.2.7</i>	<i>Ensaio de neuroproteção na presença de carboidrato</i>	<i>47</i>
<i>4.2.8</i>	<i>Atividade hemaglutinante e inibição na presença de L-glutamato</i>	<i>48</i>
<i>4.2.9</i>	<i>Espectroscopia de fluorescência intrínseca</i>	<i>48</i>
<i>4.2.10</i>	<i>Docking molecular</i>	<i>49</i>
<i>4.2.11</i>	<i>Análise estatística</i>	<i>49</i>
4.3	Resultados e discussão	50

4.3.1	<i>Purificação da ConA</i>	50
4.3.2	<i>Ensaio de citotoxicidade</i>	51
4.3.3	<i>Efeito neuroprotetor da ConA</i>	53
4.3.4	<i>Atividade hemaglutinante e inibição na presença de L-glutamato</i>	58
4.3.5	<i>ConA se liga ao L-glutamato</i>	58
4.3.6	<i>Análise do docking molecular</i>	59
4.4	Conclusões	62
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE A - DADOS SUPLEMENTARES	72

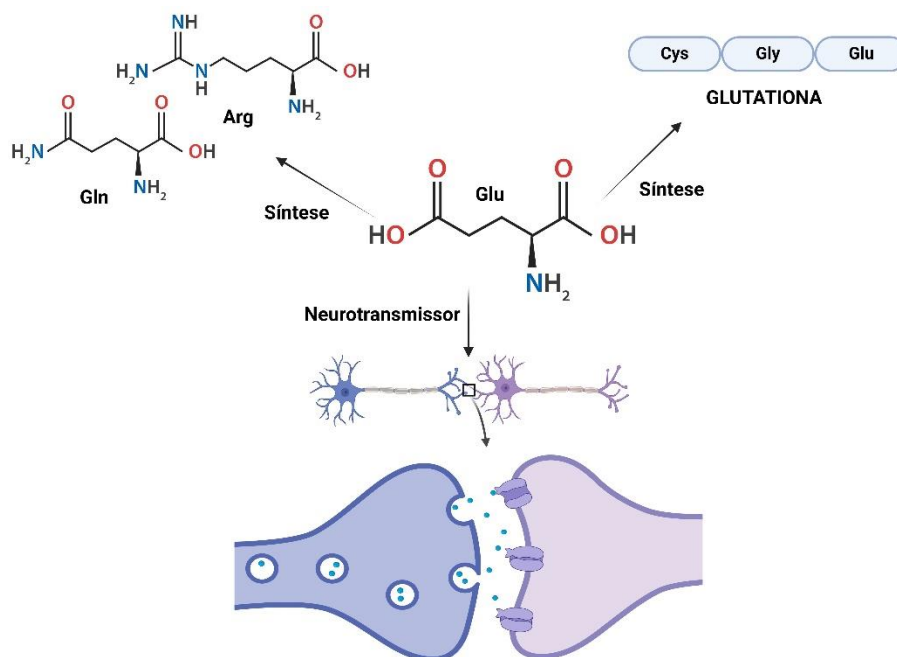
1. CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Glutamato

O glutamato é um aminoácido não essencial, que desempenha um papel crucial em diversas vias metabólicas celulares (Figura 1) (Loi & Cynober, 2022). Sua participação é fundamental no ciclo do ácido tricarboxílico, atuando como um importante doador de carbono para a síntese de macromoléculas biológicas, como proteínas, carboidratos e lipídios. Além disso, o glutamato atua como doador de nitrogênio, sendo precursor na biossíntese de nucleotídeos, glucosamina e outros aminoácidos não essenciais, através de reações de transaminação e desaminação. Adicionalmente, o glutamato ainda é um precursor chave na síntese de moléculas antioxidantes, como a glutathiona (GSH) (Zhang, Hua & Li, 2024).

Contudo, sua principal função no sistema nervoso central é atuar como o principal neurotransmissor excitatório. A neurotransmissão glutamatérgica, mediada por uma complexa rede de receptores e transportadores, é essencial diversas funções fisiológicas, incluindo processos de aprendizagem, memória, movimento, coordenação, visão, audição, tato, controle da frequência cardíaca e respiração. Manter os níveis de glutamato no espaço extracelular dentro de uma faixa fisiológica é, portanto, crucial para assegurar a transmissão sináptica eficiente e a viabilidade neuronal (Neves et al., 2023). A disfunção na homeostase do glutamato, caracterizada por desequilíbrios em sua síntese, liberação, recaptação ou metabolismo, acarreta consequências neuropatológicas significativas e tem sido implicada no desenvolvimento e progressão de diversas doenças neurológicas e neurodegenerativas, como epilepsia, esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e doença de Parkinson (Lovino, Tremblay & Civiero, 2020; Daniele et al., 2021).

Figura 1 - Metabolismo do glutamato. Diversidade de funções do glutamato, desde precursor de outros aminoácidos e moléculas até sua função como neurotransmissor excitatório.



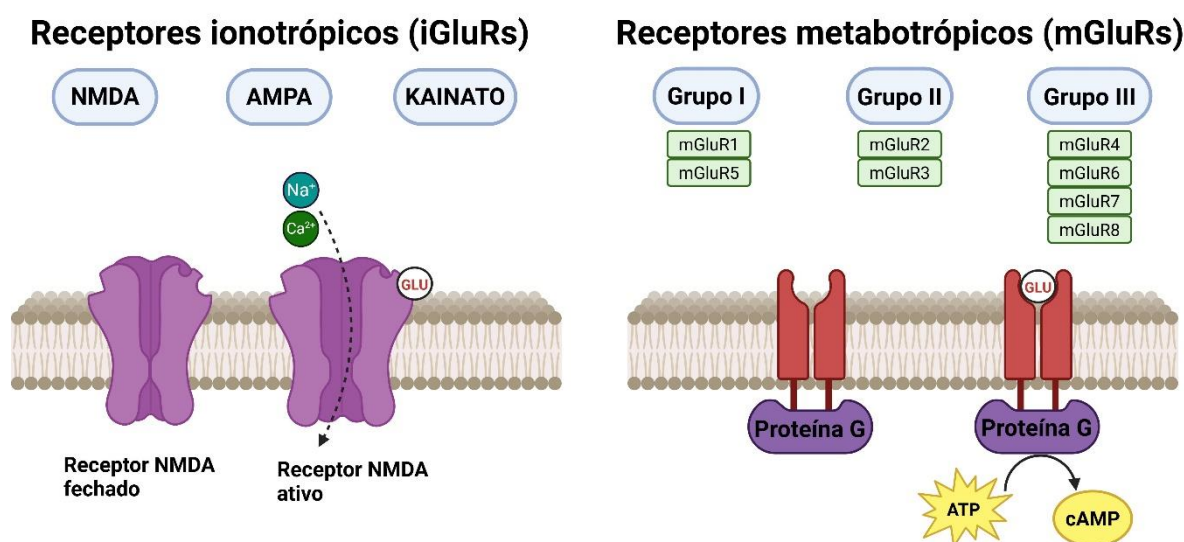
Fonte: Autor. Créditos: Biorender.

1.2 Receptores glutamatérgicos

Devido ao seu papel como principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central, o glutamato interage com uma rede de receptores, que são classicamente divididos em duas classes principais: receptores ionotrópicos (iGluRs) e receptores metabotrópicos (mGluRs) (Figura 2) (Zhang, Chu & Wong, 2022). Os receptores ionotrópicos (iGluRs) são canais iônicos dependentes de ligantes, ou seja, sua ativação é diretamente controlada pela ligação do glutamato. Eles formam complexos receptor-canais, permitindo a passagem rápida de íons através da membrana celular. Os iGluRs são subdivididos em três famílias principais: receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), receptores AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico), e receptores de kainato (KARs). A ativação desses receptores resulta em efeitos excitatórios rápidos, devido ao influxo de cátions, principalmente sódio (Na^+) nos AMPARs e KARs, e Na^+ e cálcio (Ca^{2+}) nos NMDARs (Willard & Koochekpour, 2013; Martami & Holton, 2023).

Os receptores metabotrópicos (mGluRs), por sua vez, são receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Ao contrário dos iGluRs, eles não formam canais iônicos diretamente. A ligação do glutamato aos mGluRs aciona a proteína G, que desencadeia uma cascata de sinalização intracelular envolvendo segundos mensageiros, como o AMP cíclico (cAMP) e o fosfatidilinositol (PI). Oito subtipos de mGluRs foram identificados (mGluR1 a mGluR8), os quais são agrupados em três grupos (Grupo I, Grupo II e Grupo III) com base em sua homologia de sequência, mecanismos de transdução de sinal e farmacologia. O Grupo I (mGluR1 e mGluR5) está geralmente associado à excitação neuronal mais lenta, mediada principalmente pelo aumento do cálcio intracelular. Os Grupos II (mGluR2 e mGluR3) e III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) estão predominantemente associados à inibição pré-sináptica da liberação de neurotransmissores, através da inibição da adenilato ciclase e consequente redução dos níveis de cAMP. (Willard & Koochekpour, 2013; Gonçalves-Ribeiro et al., 2019; Martami & Holton, 2023).

Figura 2 - Receptores glutamatérgicos. As duas grandes classes de receptores de glutamato e suas diferenças nos mecanismos de ativação.



Fonte: Autor. Créditos: Biorender.

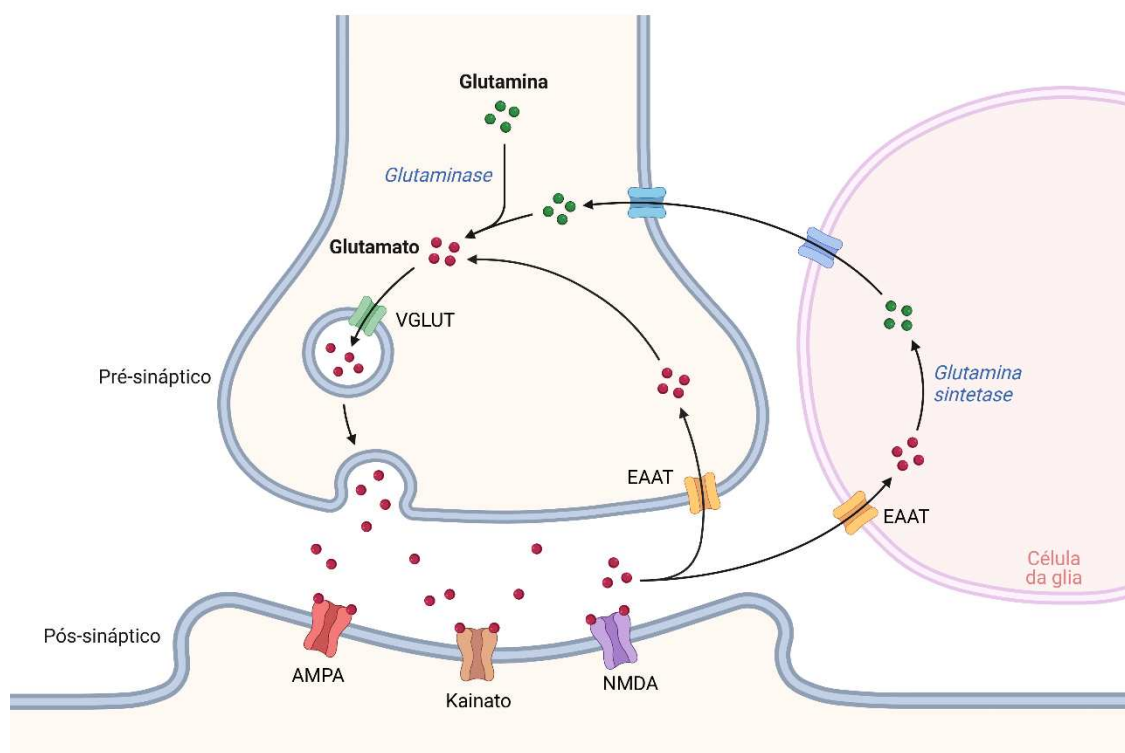
1.3 Neurotransmissão glutamatérgica

Durante a transmissão sináptica, o glutamato liberado pelos neurônios pré-sinápticos ativa os receptores de glutamato nos neurônios pós-sinápticos, mediando a neurotransmissão excitatória. O ciclo glutamato-glutamina desempenha um papel fundamental nesse processo,

garantindo a remoção eficiente do glutamato da fenda sináptica e mantendo sua concentração extracelular em níveis fisiológicos (Andersen et al., 2021).

A liberação de glutamato ocorre por dois mecanismos principais: vesicular e não vesicular. Liberação vesicular ou ciclo glutamato-glutamina (Figura 3) compreende o mecanismo, conhecido como exocitose dependente de vesículas, sendo o principal modo de liberação de glutamato em condições fisiológicas. Um potencial de ação no neurônio pré-sináptico causa a despolarização da membrana e a ativação de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. O influxo de Ca^{2+} desencadeia a fusão das vesículas sinápticas, que contêm glutamato, com a membrana pré-sináptica, liberando o neurotransmissor na fenda sináptica. Após a liberação, o glutamato é rapidamente recaptado por transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs), presentes principalmente em astrócitos e células da glia. Dentro dos astrócitos, o glutamato é convertido em glutamina pela enzima glutamina sintetase. A glutamina, então, é transportada de volta para os neurônios pré-sinápticos, onde é convertida novamente em glutamato pela enzima glutaminase, completando o ciclo (Lovino, Tremblay & Civiero, 2020; Zhang, Chu & Wong, 2022).

Figura 3 - Ciclo glutamato-glutamina. Este ciclo garante que o glutamato seja reciclado e que sua concentração na fenda sináptica seja mantida em níveis adequados para a neurotransmissão.

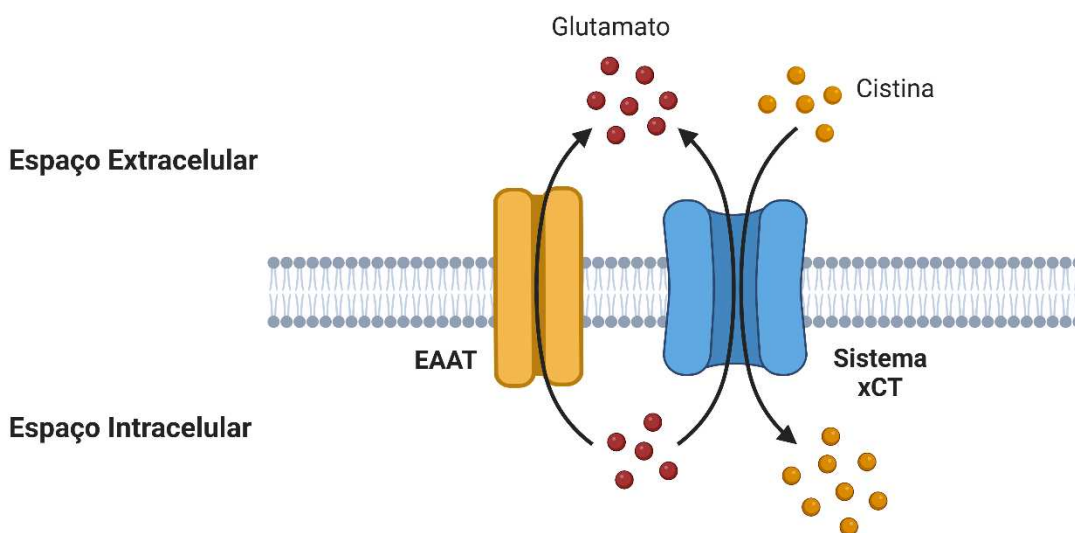


Fonte: Autor. Créditos: Biorender.

Já a liberação não vesicular (Figura 4), ocorre principalmente em condições patológicas, como isquemia, trauma ou inflamação. Envolve diferentes vias, incluindo a liberação por canais aniônicos, cujo sua abertura na membrana neuronal pode levar à liberação de glutamato e o efluxo reverso pelos EAATs que em certas condições, como alta concentração extracelular de glutamato ou alterações no gradiente iônico, os EAATs podem operar em reverso, liberando glutamato na fenda sináptica levando a excitotoxicidade (Zhang, Hua & Li, 2024).

Além dos transportadores EAAT e vesiculares de glutamato (VGLUTs), existe ainda o antiportador cistina-glutamato (xCT) (Figura 4), presente em neurônios e glia, que supre cistina para a síntese de glutathiona (GSH) ao trocar glutamato intracelular por cistina extracelular. O acúmulo extracelular de glutamato pode bloquear o xCT, inibindo a síntese de glutathiona (GSH) e resultando em estresse oxidativo e morte celular (Green, Dos Santos & Fontana, 2021).

Figura 4 - Representação esquemática das demais vias de neurotransmissão glutamatérgica. Em amarelo encontra-se o EAAT, responsável pela liberação não vesicular de glutamato, cujo em condições patológicas assume o papel de reversão de seu funcionamento, liberando glutamato para o espaço extracelular. O acúmulo de glutamato extracelular pode levar à danos neuronais. Em Azul temos o antiportador cistina-glutamato que recolhe cistina extracelular e envia glutamato intracelular. A cistina é essencial para a síntese de glutathiona, um importante antioxidante que protege as células contra o estresse oxidativo.



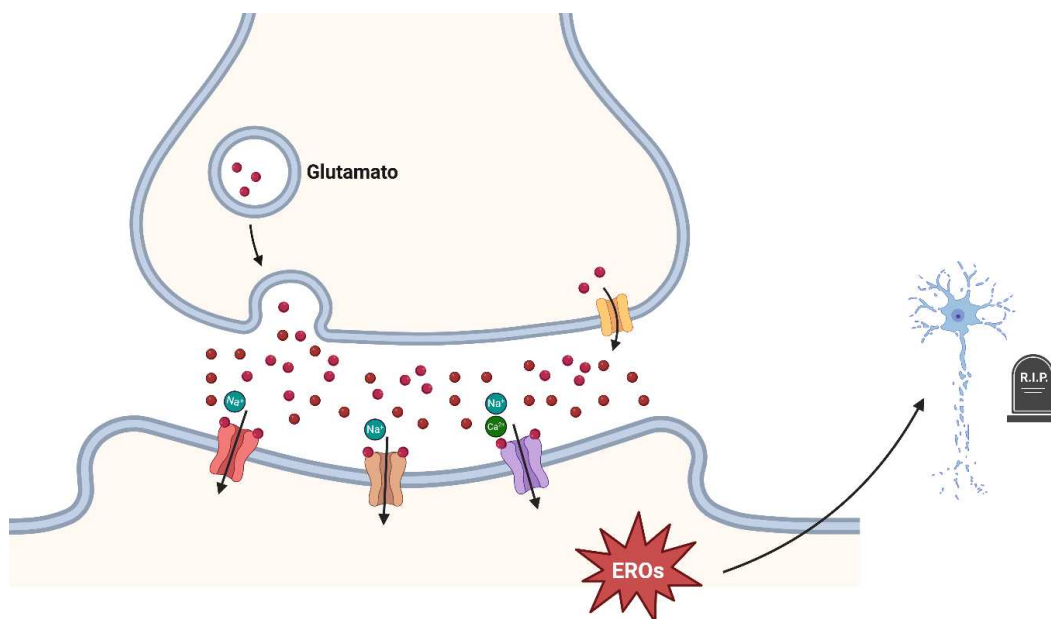
Fonte: Autor. Créditos: Biorender.

1.4 Excitotoxicidade glutamatérgica

A neurotransmissão glutamatérgica, requer um controle preciso da concentração de glutamato na fenda sináptica. A ativação excessiva e prolongada dos receptores de glutamato em neurônios pós-sinápticos desencadeia a excitotoxicidade, levando à neurodegeneração. Para evitar esse dano, o glutamato liberado na fenda sináptica é rapidamente removido por mecanismos de recaptação (Gonçalves-Ribeiro et al., 2019). Em condições fisiológicas, os astrócitos, células da glia especializadas, são os principais responsáveis por essa remoção, capturando cerca de 90% do glutamato presente na fenda sináptica através de transportadores de alta afinidade, como os EAATs, principalmente EAAT1 e EAAT2, prevenindo o acúmulo excessivo do neurotransmissor e a consequente excitotoxicidade (Satarker et al., 2022). No entanto, quando esse sistema de regulação falha, seja por liberação excessiva de glutamato ou por recaptação ineficiente, ocorre um acúmulo extracelular que pode levar à degeneração e morte neuronal (Prasansuklab, Brimson & Tencomnao, 2020; Nicosia et al., 2024).

A excitotoxicidade glutamatérgica pode ocorrer por duas vias principais: dependente ou independente de receptor. A via dependente de receptor ou clássica (Figura 5), envolve a ativação excessiva dos receptores de glutamato, principalmente os receptores NMDA (Neves et al., 2023). O aumento da concentração de glutamato extracelular resulta em um influxo maciço de íons Na^+ e Ca^{2+} para o interior dos neurônios pós-sinápticos (Choi, 2020). O influxo de sódio causa edema celular, geralmente reversível. No entanto, o influxo de cálcio desencadeia uma cascata de eventos que levam à lesão excitotóxica irreversível. Após o influxo inicial de cálcio, outros mecanismos intracelulares amplificam a elevação do cálcio citosólico, contribuindo para a morte neuronal por meio da ativação excessiva de proteases, como as calpaínas, despolarização da membrana plasmática e aumento do estresse oxidativo. A ativação desses processos consome grandes quantidades de adenosina trifosfato (ATP), levando à depleção energética celular e comprometendo ainda mais a função dos transportadores de glutamato, criando um ciclo vicioso de excitotoxicidade (Daniele et al., 2021; Verma, Lizama & Chu, 2022).

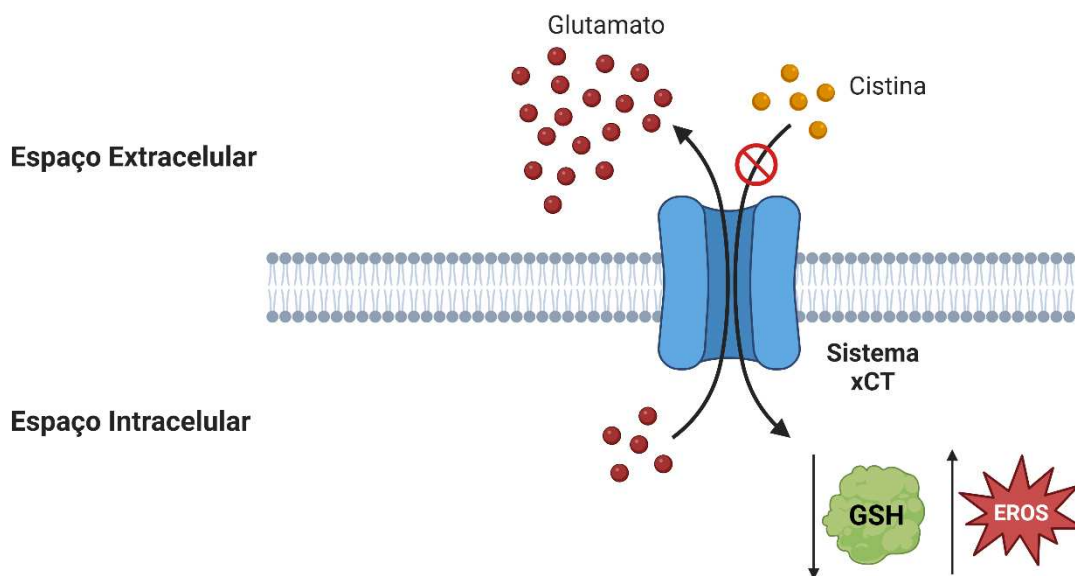
Figura 5 - Excitotoxicidade glutamatérgica clássica, cujo ocorre a saturação dos receptores de glutamato e um influxo massivo de íons, culminando em estresse oxidativo e resultando em danos celulares.



Fonte: Autor. Créditos: Biorender.

A via independente de receptor ou via do antiportador cistina-glutamato (Figura 6) é mediada pelo transportador xCT, também conhecido como sistema SLC7A11, um antiportador que transporta glutamato para fora da célula em troca de cistina para o interior celular. O acúmulo extracelular de glutamato pode saturar o xCT, inibindo a entrada de cistina na célula. A cistina é um precursor limitante na síntese de GSH, impedindo sua ação antioxidante (Prasansuklab, Brimson & Tencomnao, 2020). A redução da captação de cistina resulta em diminuição dos níveis de GSH, o que leva a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, consequentemente, ao estresse oxidativo celular. O excesso de EROs causa danos à estrutura e função das mitocôndrias, comprometendo a produção de energia celular e facilitando a ativação de vias de morte celular programada, como a sinalização do fator indutor de apoptose mitocondrial (AIF) (Green, Dos Santos & Fontana, 2021).

Figura 6 - Excitotoxicidade glutamatérgica via antiportador cistina-glutamato, o excesso de glutamato extracelular inibe a entrada de cistina na célula, assim diminuindo os níveis de GSH e aumentando o número de espécies reativas a oxigênio, levando a apoptose.



Fonte: Autor. Créditos: Biorender.

Neste contexto, o glutamato passou a ser visto como uma molécula crítica subjacente à patogênese das doenças neurodegenerativas, logo terapias que visam a restauração da homeostase glutamatérgica, através do aumento da expressão, inibição ou atividade regulada/auxílio da função dos transportadores, ou captação seletiva de glutamato pode atenuar a excitotoxicidade e, conseqüentemente, retardar e impedir a morte neuronal (Prasansuklab, Brimson & Tencomnao, 2020; Arnold et al., 2024).

1.5 Prospeção de moléculas neuroprotetoras

Em todo o mundo, as plantas medicinais têm ganhado espaço como uma importante alternativa terapêutica, especialmente no tratamento de doenças neurodegenerativas. Embora a medicina convencional tenha apresentado avanços significativos, os compostos ativos presentes nestas plantas continuam a desempenhar um papel crucial na promoção do bem-estar humano (Wadhwa et al., 2022). Diversas plantas se destacam por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e pela capacidade de modular a atividade de neurotransmissores. Um exemplo notável é a *Moringa oleifera*, cujos efeitos benéficos são atribuídos à rica composição de

metabólitos secundários presentes em todas suas partes, como compostos fenólicos e flavonoides (Worku & Tolossa, 2024).

Os flavonoides são caracterizados por uma estrutura central de benzopirona, contendo grupos fenólicos ou polifenólicos em diversas posições (Ullah et al., 2020). Essa diversidade estrutural permite a classificação dos flavonoides em diferentes subclasses, como flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianinas. A distinção entre essas classes se baseia nas substituições e no grau de oxidação do anel pirano heterocíclico (Al-Khayri et al., 2022). Eles atuam como antioxidantes exógenos, combatendo EROs e espécies reativas a nitrogênio (ERN), por meio da inibição de enzimas como a óxido nítrico sintase (NOS) e a xantina oxidase (XO), além da regulação de canais iônicos. Essa ação antioxidante contribui para a modulação de diversas enzimas envolvidas em processos oxidativos (Ullah et al., 2020). Adicionalmente, os flavonoides interagem com a sinalização glial e outras vias celulares, exercendo efeitos benéficos sobre a função neuronal e potencialmente promovendo a regeneração neuronal (Uddin et al., 2020).

Além dos metabólitos secundários, metabólitos primários, como as lectinas vegetais, também têm sido explorados como ferramentas farmacológicas em neurobiologia. Lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam reversivelmente a carboidratos e glicoconjugados, exibindo diversas atividades biológicas, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras (Araújo et al., 2020). A lectina das sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA), por exemplo, demonstrou induzir neuroplasticidade (Lin & Levitan, 1991) e modular receptores glutamatérgicos, como AMPA e kainato (Thalhammer, Everts & Hollmann, 2002; Fay & Bowie, 2006). Já a lectina das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr), por sua vez, apresenta atividade neuroprotetora contra a excitotoxicidade induzida por glutamato em fatias de hipocampo murino (Jacques et al., 2013) e influencia a regulação comportamental (Rieger et al., 2014). Apesar da relativa semelhança na composição de aminoácidos e especificidade de ligação a carboidratos entre as diferentes lectinas, os mecanismos de ação variam consideravelmente (Cavada et al., 2019a). A lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML), por exemplo, demonstrou induzir efeitos depressivos, aumentando a expressão de proteínas relacionadas à inflamação e promovendo reatividade glial, apresentando efeitos potencialmente tóxicos no hipocampo de camundongos, aparentemente mediados por respostas neuroinflamatórias (Gonçalves et al., 2013; Cavada et al., 2019a; Araújo et al., 2020). Essa diversidade de efeitos demonstra a complexidade da interação das lectinas com o sistema nervoso central. Os mecanismos pelos quais as lectinas exercem seus efeitos no sistema nervoso

são variados e complexos e a compreensão detalhada desses mecanismos é fundamental para o desenvolvimento de terapias direcionadas.

1.6 Lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA)

1.6.1 Histórico

A lectina isolada das sementes de *C. ensiformis* (ConA) possui um papel histórico significativo na bioquímica de macromoléculas, sendo a primeira lectina a ser purificada e cristalizada por James B. Sumner em 1919, a partir da fração de globulinas. Este feito a consagrou como a lectina mais estudada e caracterizada até hoje. Devido à sua caracterização inicial e semelhança estrutural, as demais lectinas da subtribo Diocleinae são denominadas "ConA-like" (Lagarda-Diaz, Guzman-Partida & Vazquez-Moreno, 2017; Cavada et al., 2019a).

Em 1974, a sequência completa de aminoácidos da ConA foi determinada por meio de degradação de Edman e foi simultaneamente confirmado por dados cristalográficos obtidos por difração de raios X, revelando que ela é composta por 237 aminoácidos dispostos em duas grandes folhas β antiparalelas, o que consagrou a ConA como a primeira lectina com sequência completa e estrutura tridimensional determinadas. A mesma publicação também estabeleceu o local exato de clivagem da cadeia polipeptídica durante o seu processamento pós-traducional (Cavada et al., 2018; Cavada et al., 2019b). Em 1983, foi elucidado que sua biossíntese envolve uma modificação pós-traducional complexa: a proteína é inicialmente sintetizada como uma pré-pró-lectina, que sofre clivagens proteolíticas sequenciais para gerar a pró-lectina, precursora da lectina nativa. Tal processamento é chamado de permutação circular (Cavada et al., 2019b).

1.6.2 Purificação e afinidade de ligação

Sua purificação é dada por cromatografia de afinidade em matriz Sephadex, geralmente utilizada a G-50, onde o pico não retido é eluído com a solução de equilíbrio, e a proteína ligada a resina é eluída por alteração do pH do meio, utilizando um tampão ácido suave, como a glicina-HCl, pH 2,6 ou por competição utilizando um carboidrato inibidor com maior molaridade, como a manose 0,1M. Outra maneira de purificar a ConA é utilizando um sistema aquoso de duas fases (ATPS) e ambos métodos resultam em um alto grau de pureza da amostra

(Cavada et al., 2019a). Seu perfil eletroforético é composto por três bandas de peso molecular aparente é de 25, 13 e 12 kDa e não possui glicosilações em sua estrutura. (Souza Teixeira et al., 2012)

A ConA apresenta especificidade para os monossacarídeos manose e glicose. Estudos demonstraram que os grupos hidroxila nas posições C-3, C-4 e C-6 da manose são cruciais para a interação com a lectina, enquanto a hidroxila em C-2 não é essencial. O α -metil-D-manopiranosídeo (aMM), um monossacarídeo altamente específico para a ConA, é capaz de inibir a atividade lectínica em menores concentrações, refletido pela baixa energia livre de ligação. Além de monossacarídeos, a ConA também reconhece e se liga a dimanosídeos, trimanosídeos e glicoconjugados complexos que possuem resíduos de Man α (α -manose) ou Glc α (α -glicose) nas extremidades terminais e semi-terminais (Cavada et al., 2018a).

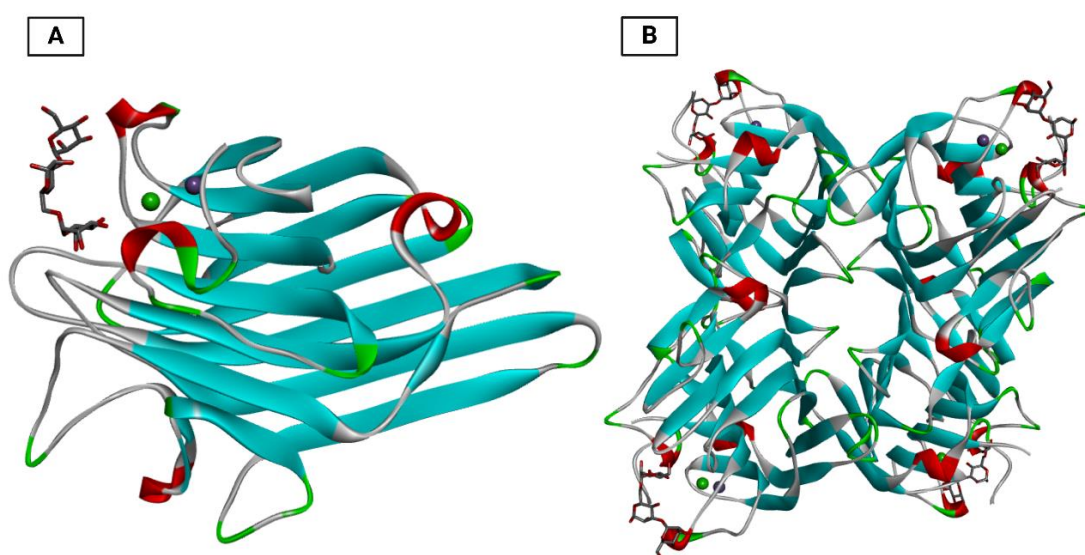
1.6.3 Estrutura tridimensional

A obtenção de cristais de ConA foi relatado desde o seu isolamento inicial em 1919 (Sumner, 1919). Desde então, diversos estudos de cristalização e co-cristalização foram conduzidos, permitindo a elucidação, por difração de raios X, de características estruturais importantes, como as dimensões do grupo espacial, da célula unitária, localização e o arranjo dos domínios de reconhecimento a carboidratos (CRDs) e dos sítios de ligação a metais (MBSs) (Figura 7), além da identificação da cavidade hidrofóbica. Essas análises cristalográficas foram cruciais para validar as características físico-químicas previamente descritas para a ConA, confirmando sua dependência de metais para a atividade e a influência do pH em seu estado de oligomerização: em pHs inferiores a 5,8, a ConA se apresenta como um dímero, enquanto que em valores de pHs superiores, ela se associa em um tetrâmero (Cavada et al., 2018; Cavada et al., 2019a).

Na estrutura monomérica da ConA (Figura 7), o CRD está localizado em uma depressão na superfície da proteína. Este sítio é composto pelos resíduos de aminoácidos Asp14, Leu99, Tyr100, Gly98, Ala207, Asp208 e Arg228, que interagem com carboidratos por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, conferindo a especificidade de ligação. Na vizinhança do CRD encontra-se o MBS (Figura 7), que acomoda dois íons metálicos: um íon manganês (Mn²⁺), coordenado pelos resíduos Glu8, Asp10, Asp19, His24 e duas moléculas de água; e um íon Ca²⁺, coordenado por Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19 e também duas moléculas de água. A presença desses cátions é essencial para a manutenção da conformação “cis” da

ligação peptídica entre o dipeptídeo Ala207-Asp208. Essa conformação, por sua vez, modula o arranjo espacial do CRD, sendo que a ausência dos metais resulta na perda da capacidade da lectina de reconhecer e se ligar a carboidratos. (Loris, 1998; Cavada et al., 2019b). Além do CRD e do MBS, a ConA apresenta um sítio hidrofóbico adicional pouco explorado (Delatorre et al., 2007).

Figura 7 - Estrutura tridimensional da ConA complexada com trimanosídeo (PDB ID: 1CVN). O trimanosídeo interage com o CRD que é estabilizado pelo MBS, os íons cálcio (verde) e manganês (roxo) são mostrados ao fundo. A: Representação monomérica. B: Representação tetramérica.

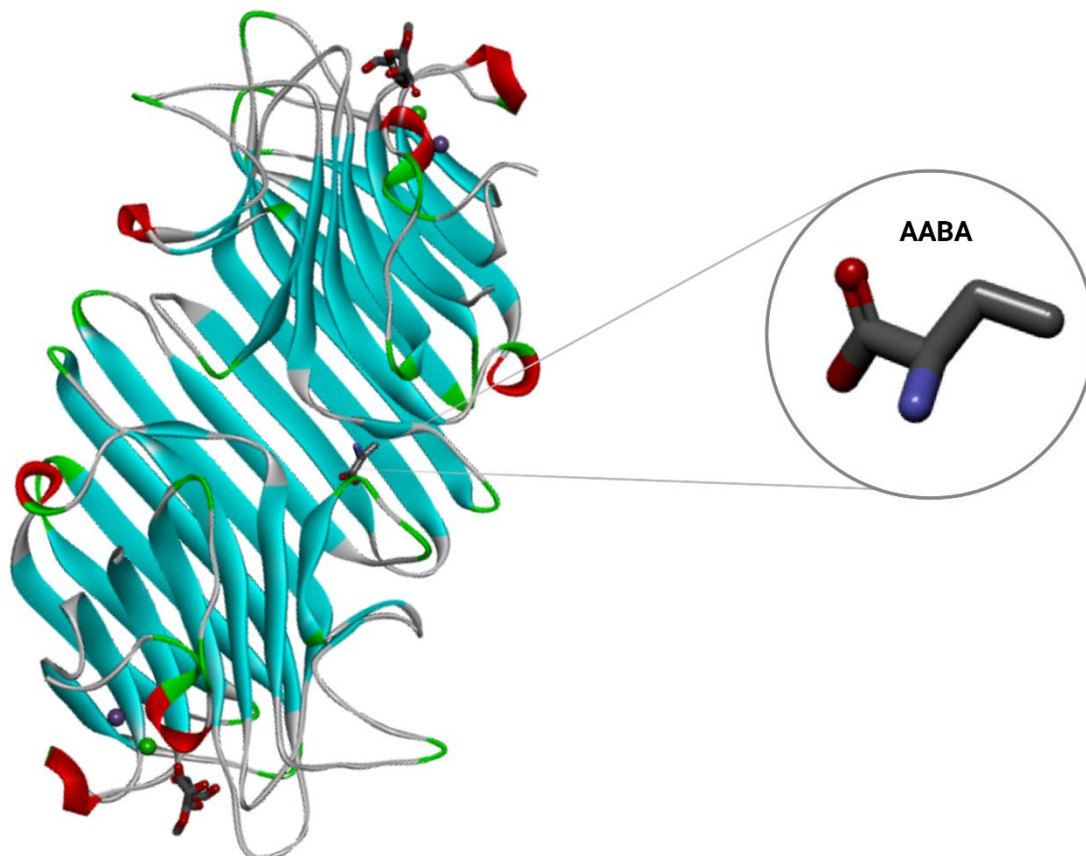


Fonte: Autor. Créditos: Discovery Studio Vizualizer e Biorender.

Delatorre e colaboradores (2007), ao resolverem a estrutura cristalográfica da lectina das sementes de *Canavalia gladiata* (CGL) (PDB ID: 2D7F) (Figura 8), descreveram um sítio hidrofóbico altamente conservado em lectinas semelhantes à ConA (Tabela 1). A análise revelou a presença de um aminoácido não proteico, o ácido α -aminobutírico (AABA), interagindo entre os dímeros canônicos da CGL. Essa interação contribui para a estabilização eletrônica da região. Os resíduos de aminoácidos que compõem este bolso hidrofóbico incluem Asn124, Ala125, Leu126 e Val179 de um monômero, além de Gln137 e Asp139 de outro monômero do dímero. A presença do AABA foi correlacionada com um aumento na resposta de hipersensibilidade, sugerindo um possível papel adicional da lectina na defesa da planta. Essa descoberta abre novas perspectivas para a compreensão da função das lectinas ConA-like, levantando a possibilidade de que esse sítio de ligação a aminoácidos, frequentemente

negligenciado em relação à atividade primária do CRD, desempenhe um papel biológico relevante.

Figura 8 - Estrutura tridimensional da CGL (PDB ID: 2D7F), enfatizando a presença do AABA na interface do dímero canônico das lectinas ConA-like.



Fonte: Autor. Créditos: Discovery Studio Vizualizer e Biorender.

Tabela 1 - Resíduos de aminoácidos que compõem o bolso hidrofóbico do AABA, mostrando a conservação de sequência nas lectinas ConA-like. Em vermelho, os aminoácidos não conservados em relação ao sítio de ligação original do AABA.

LECTINAS	RESÍDUOS					
<i>C. gladiata</i> - CGL	Asn124	Ala125	Leu126	Gln137	Asp139	Val179
<i>C. ensiformis</i> - ConA	Asn124	Ala125	Leu126	Gln137	Asp139	Val179
<i>C. brasiliensis</i> - ConBr	Asn124	Ala125	Leu126	Gln137	Asp139	Val179
<i>C. maritima</i> - ConM	Asn124	Ala125	Leu126	Gln137	Asp139	Val179

<i>C. boliviana</i> - Cbol	Asn124	Ala125	Leu126	Gln137	Asp139	Val179
<i>C. bonariensis</i> - CaBo	Asn124	Ala125	Leu126	Gln137	Asp139	Val179
<i>C. grandiflora</i> - ConGF	Asn124	Ala125	Leu126	Gln137	Asp139	Val179
<i>C. virosa</i> - ConV	Asn124	Ala125	Leu126	Gln137	Asp139	Val179
<i>Dioclea lasiocarpa</i> - DLL	Asn124	Ser125	Leu126	Pro137	Asp139	Val179
<i>D. lasiophylla</i> - DlyL	Asn124	Ser125	Leu126	Pro137	Asp139	Val179
<i>D. reflexa</i> - DrfL	Asn124	Ser125	Leu126	Pro137	Asp139	Val179
<i>D. violaceae</i> - DVL	Asn124	Ser125	Leu126	Pro137	Asp139	Val179
<i>D. virgata</i> - Dvir	Asn124	Ser125	Leu126	Pro137	Asp139	Val179

1.6.4 Atividades biológicas

Historicamente, a ConA foi utilizada como ferramenta padrão em ensaios biológicos, logo possuindo numerosas investigações, revelando uma diversidade de atividades biológicas (Figura 9). Por exemplo, ela exerce um papel dual na resposta imune, atuando tanto como promotora quanto como inibidora da inflamação. Quando administrada localmente, induz edema e recrutamento de neutrófilos, características típicas de uma resposta inflamatória aguda. No entanto, a administração sistêmica da lectina pode resultar em um efeito anti-inflamatório, sugerindo a existência de mecanismos complexos que modulam sua ação imune (Cavada et al., 2018).

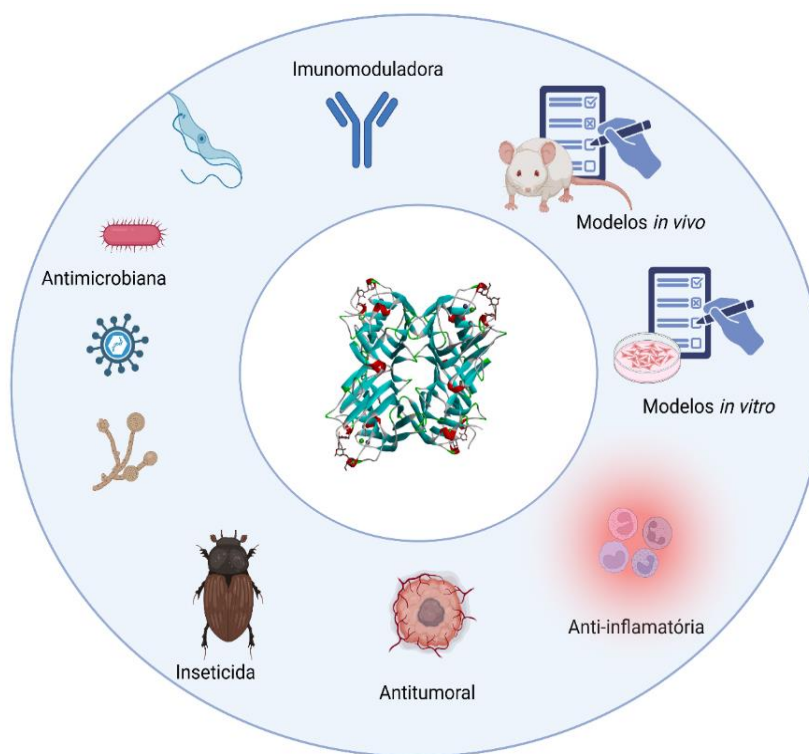
Além da via de aplicação da ConA em ensaios, sua concentração deve ser cuidadosamente controlada. Estudos demonstraram que doses iguais ou superiores a 50 µg/mL podem induzir efeitos tóxicos nos hepatócitos *in vitro* e causar danos sistêmicos adversos em camundongos *in vivo*. Portanto, o uso racional e controlado é essencial para alcançar resultados benéficos (Chen et al., 2020; Zhao et al., 2023).

A ConA é reconhecida por sua potente capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T, atuando como um mitógeno. Essa atividade é atribuída à sua alta afinidade por carboidratos presentes na superfície celular, desencadeando uma cascata de sinalização que

culmina na ativação celular. A mitogenicidade da ConA a torna uma ferramenta valiosa em estudos imunológicos e abre perspectivas para seu uso em terapias imunomoduladoras (Huldani et al., 2022). A ConA também foi investigada como um potencial agente anticancerígeno devido à sua capacidade de induzir apoptose e autofagia em células tumorais. A ligação da lectina a glicoproteínas presentes na membrana plasmática de células cancerígenas pode desencadear mecanismos que levam à morte celular (Huldani et al., 2022).

Estudos demonstram ainda, que a ConA possui atividade antibacteriana, antifúngica e antibiofilme. O mecanismo proposto para essa ação envolve a ligação da lectina a glicanos presentes na superfície celular dos microrganismos, interferindo em processos essenciais para sua sobrevivência (Cavada et al., 2018). Embora menos explorados que as investigações anteriormente descritas, os efeitos da ConA no sistema nervoso central são promissores. Pesquisas indicam que a lectina pode influenciar o crescimento neuronal, a regeneração axonal e na plasticidade sináptica (Araújo et al., 2020). No entanto, a maioria destes estudos demonstra que a pré-incubação da ConA com seus carboidratos específicos inibe parcialmente ou totalmente seus efeitos, sugerindo que a atividade do CRD é fundamental para suas respostas biológicas (Cavada et al., 2018). Toda via, a exploração de sítios secundários da ConA pode auxiliar no desenvolvimento de novas metodologias e aprofundar o conhecimento sobre os efeitos da ConA no sistema nervoso central potencializando seus efeitos terapêuticos e reduzindo o risco de efeitos colaterais.

Figura 9 - Representação de algumas atividades biológicas descritas para a ConA.



Fonte: Autor. Créditos: Biorender.

1.7 Modelo de estudo: células PC12

Estudos recentes sobre neurotoxicidade em doenças do sistema nervoso dependem principalmente de modelos *in vivo*. Esses experimentos estão associados a questões éticas, além de serem onerosos, trabalhosos e, por vezes, levar a resultados que exigem interpretação adicional. Toda via, métodos *in vitro*, são formas relativamente rápidas e menos exigentes de testar produtos químicos e moléculas ativas quanto às suas propriedades neurotóxicas e capacidades neuroprotetoras (Bal-Price et al., 2018; Wiatrak et al., 2020).

As células PC12, derivadas de um feocromocitoma adrenal de rato (Greene & Tischler, 1976), representam uma linhagem celular amplamente utilizada em pesquisas biomédicas, com destaque para as áreas de neurociência e toxicologia. Sua relevância reside na capacidade de mimetizar aspectos fisiológicos e bioquímicos de neurônios, oferecendo um modelo *in vitro* robusto e versátil.

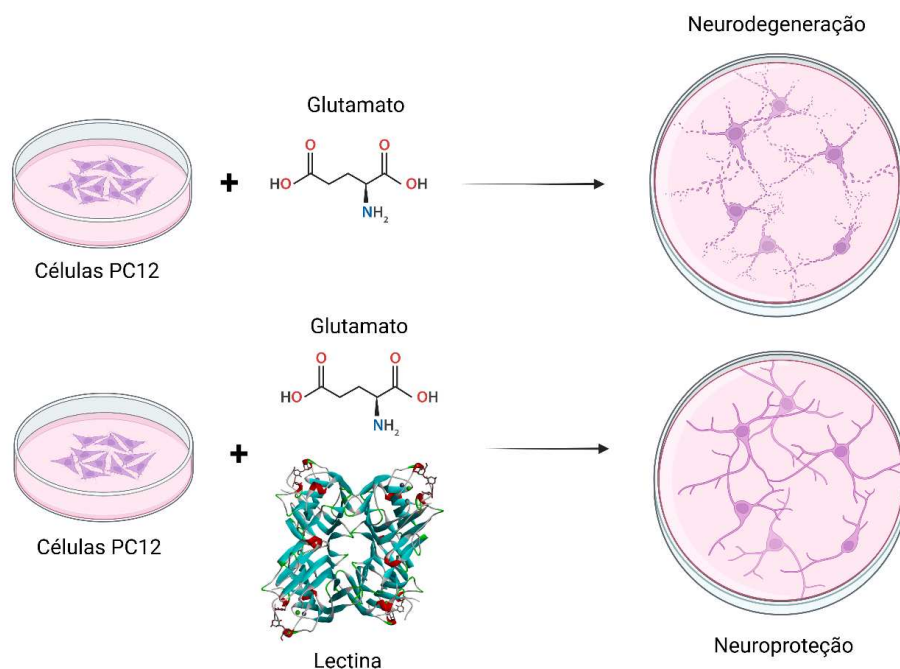
Por serem oriundas de um tumor da glândula adrenal que secreta catecolaminas, as células PC12 possuem a capacidade de armazenar e secretar dopamina e norepinefrina,

neurotransmissores que desempenham papéis cruciais na comunicação entre os neurônios e em diversas funções cerebrais (Greene & Tischler, 1976). Outra característica crucial é sua origem celular monoclonal que garante uniformidade genética, o que simplifica a interpretação dos resultados experimentais e reduz a variabilidade. Essa característica, aliada à sua capacidade de mimetizar neurônios em cultura, as torna ideais para investigar mecanismos de morte celular neuronal em condições como doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson) e lesões cerebrais (Greene & Tischler, 1976; Oprea et al., 2022).

Adicionalmente, as células PC12 são empregadas para avaliar a toxicidade de diversas substâncias (neurotoxinas) sobre os neurônios, contribuindo para o desenvolvimento de terapias neuroprotetoras (Figura 10). Sua versatilidade permite aos pesquisadores explorar tanto os mecanismos básicos da função neuronal quanto os processos patológicos complexos envolvidos em doenças neurológicas. (Greene & Tischler, 1976; Xie et al., 2023).

As células PC12 podem ser divididas em dois tipos, diferenciadas e indiferenciadas, quanto ao modelo de cultivo. As células PC12 indiferenciadas são aglomerados de células flutuantes, pequenas, de formato irregular, ou células dispersas levemente aderidas (Xie et al., 2023). Elas são cultivadas em um ambiente sem a adição de fatores de crescimento, como o fator de crescimento nervoso (NGF). Nessas condições, elas mantêm suas características intrínsecas, como a capacidade de sintetizar e armazenar catecolaminas. Essas células apresentam um fenótipo mais semelhante a células cromafins, precursoras das células neuronais (Wiatrak et al., 2020).

Figura 10 - Modelo de ensaio neuroprotetor *in vitro* utilizando células PC12.



Fonte: Autor. Créditos: Biorender.

Quando cultivadas na presença de fatores de crescimento, como o NGF, as células PC12 sofrem um processo de diferenciação, adquirindo características semelhantes às de neurônios. Esse processo é acompanhado por mudanças morfológicas, como a formação de prolongamentos denominados neuritos, que se assemelham a axônios e dendritos de neurônios. Além disso, as células PC12 diferenciadas passam a expressar diferentes neurotransmissores, como a acetilcolina, e desenvolvem a capacidade de estabelecer comunicação sináptica (Tominami et al., 2024).

Ademais, a membrana das células PC12 possuem receptores NMDA como receptores que regulam a neurotransmissão excitatória. A falha dessa condução nervosa mediada por esses receptores pode levar ao envelhecimento cerebral precoce, danos à neuroplasticidade e disfunção cognitiva. Assim, tornando as células PC12 um modelo valioso e versátil para estudos que visam reverter e modular a neurotoxicidade do glutamato (Xie et al., 2023). Outra alternativa, é a utilização das células PC12 em modelos neurobiológicos mais complexos, incluindo o uso de co-culturas com outros tipos de células. Devido à presença de receptores TLR4 (Toll-like receptor 4), as células PC12 são utilizadas, entre outros, para o estudo da neuroinflamação, especialmente através de co-culturas com microglia ou astrócitos, onde a

resposta inflamatória é potencializada pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como, IL-1 e IL-6 (de Almeida et al., 2020; Wakulik et al., 2020).

2. HIPÓTESE

Hipotetizamos que o glutamato pode interagir diretamente com o sítio de ligação de aminoácidos da ConA e essa interação reduzirá a disponibilidade extracelular de glutamato, protegendo as células PC12 da excitotoxicidade independentemente da atividade do CRD.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito neuroprotetor *in vitro* da lectina de *C. ensiformis* (ConA) via sítio de ligação a aminoácidos frente a excitotoxicidade glutamatérgica em células da linhagem PC12 Adh e comprovar *in silico* a interação ConA-glutamato.

3.2 Objetivos específicos

Investigar a interação molecular entre o glutamato e a ConA;

Demonstrar o efeito neuroprotetor da ConA em células PC12 expostas à concentração tóxica de glutamato;

Elucidar o papel do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) na atividade neuroprotetora da ConA;

Investigar a influência do sítio de ligação a aminoácidos na atividade neuroprotetora da ConA;

Analisar se as atividades do sítio de ligação de aminoácidos e do CRD são independentes e mutuamente não interferentes;

Quantificar a interação do glutamato com o sítio de ligação a aminoácidos da ConA.

4. CAPÍTULO 2: ARTIGO PUBLICADO

Este capítulo apresenta uma versão adaptada para o português do artigo originalmente publicado na **International Journal of Biological Macromolecules**, periódico com fator de impacto 7.7. O conteúdo foi ligeiramente modificado para assegurar a conformidade com as diretrizes de direitos autorais da revista mantendo a integridade da pesquisa e seguindo as normas acadêmicas da Universidade Federal do Ceará (UFC). O artigo original pode ser acessado em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143463>.

Interações ConA-glutamato: novos insights sobre seu efeito neuroprotetor

Renato R. Roma^a, Fábio S.A. Oliveira^b, Diógenes G.S. Fernandes^c, Wanius Garcia^c, Erica N. Soares^d, Silvia Lima Costa^d, Claudener S. Teixeira^{a,b*}

^a Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

^b Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade, Universidade Federal do Cariri, Crato, Ceará, Brasil.

^c Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, Brasil.

^d Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

Autor para correspondência:

Claudener S. Teixeira, Centro de Ciências Agrárias e da Biodiversidade – CCAB, Universidade Federal do Cariri, e-mail: claudener@gmail.com, Tel.: +55 88 3221 9590; Fax: +55 88 3221 9590

Resumo

O L-glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro. No entanto, níveis excessivos de L-glutamato levam a um fenômeno conhecido como excitotoxicidade mediada por L-glutamato, que está associado a várias doenças como Alzheimer e Parkinson. Moléculas que modulam a excitotoxicidade por L-glutamato são de grande interesse, especialmente aquelas derivadas de plantas com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Nesse contexto, a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) é utilizada como ferramenta modelo entre as lectinas para estudos no sistema nervoso central. Assim, este estudo teve como objetivo analisar *in vitro* o potencial efeito neuroprotetor da ConA contra a excitotoxicidade glutamatérgica e *in silico* elucidar qual domínio proteico e mecanismos estão envolvidos. Para isso, foram utilizadas ConA nativa e desmetalizada. Ambas as formas de ConA foram testadas quanto à citotoxicidade e, posteriormente, em ensaios de neuroproteção usando células PC12. Metodologias de docking molecular e espectroscopia de fluorescência também foram empregadas. Como resultados, a ConA demonstrou biocompatibilidade com células PC12, não possuindo citotoxicidade nas concentrações testadas (1-50 mM), e as protegeu da excitotoxicidade glutamatérgica na concentração de 15,6 µg/mL. Foi observado um aumento significativo na viabilidade celular, subindo de 80% no grupo exposto ao glutamato para níveis acima de 90% após pré-incubação com a lectina. Além disso, verificamos que o domínio de reconhecimento de carboidratos não estava envolvido no processo de neuroproteção, um resultado corroborado por ensaios de afinidade e ligação, onde evidenciamos o envolvimento do sítio de ligação de aminoácidos no efeito neuroprotetor. Nossas descobertas concluem que a ConA possui potencial neuroprotetor contra a excitotoxicidade glutamatérgica em células PC12, por meio de um mecanismo de sequestro de L-glutamato mediado pelo sítio de ligação de aminoácidos.

Palavras-chaves: *Canavalia ensiformis*; excitotoxicidade glutamatérgica; células PC12; sítio de ligação de aminoácidos; desmetalizada.

4.1 Introdução

O L-Glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no cérebro, desempenhando papéis cruciais na cognição, aprendizagem, memória, dor, emoção e regulação motora (Pal, 2021). Como principal mediador da excitação neuronal, o L-glutamato atua por meio de vários receptores distribuídos por todo o sistema nervoso central. Esses receptores são categorizados em dois tipos principais: receptores ionotrópicos (iGluRs) e receptores metabotrópicos (mGluRs). Os iGluRs são canais iônicos dependentes de ligante que incluem os receptores NMDA, AMPA e kainato, enquanto os mGluRs são receptores acoplados à proteína G (Martami & Holton, 2023).

Níveis excessivos de L-glutamato podem causar a superativação dos receptores de L-glutamato, levando a um acúmulo de altas concentrações intracelulares de cálcio, ativação de cascatas apoptóticas e, por fim, à morte celular. Esse processo é conhecido como excitotoxicidade mediada por L-glutamato (Martami & Holton, 2023; Ge et al., 2022). Desregulações na homeostase glutamatérgica têm sido implicadas em várias doenças neurológicas, incluindo acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico, aneurisma, esclerose lateral amiotrófica (ELA), glioma e doença de Parkinson (Pal, 2021; Martami & Holton, 2023; Ge et al., 2022; Kawakita et al., 2022).

Moléculas que modulam as cascatas de sinalização intracelular envolvidas na excitotoxicidade por L-glutamato podem potencialmente mitigar as causas primárias da morte neuronal. Consequentemente, metabólitos vegetais, particularmente aqueles com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, têm sido extensivamente investigados como potenciais agentes terapêuticos para doenças neurológicas (Lima Pereira et al., 2017; Ferreira et al., 2023; Dos Santos Souza et al., 2018; Ferreira et al., 2021).

As lectinas vegetais são um grupo diversificado de proteínas não imunológicas capazes de reconhecer e se ligar especificamente a carboidratos e glicoconjugados (Van Damme, 2022). A Concanavalina A (ConA), uma lectina extraída das sementes de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (feijão-de-porco), exibe afinidade por manose e glicose e foi a primeira lectina a ser purificada e caracterizada estruturalmente (Huldani et al., 2022).

Desde a década de 1990, a ConA tem servido como um modelo valioso para estudar o isolamento de proteínas sinápticas (Partin et al., 1993), liberação de neurotransmissores (Boehm & Huck, 1998), neuroplasticidade (Lin & Levitan, 1991), vias de sinalização intracelular associadas à neuroproteção (Li et al., 2022) e os mecanismos subjacentes à ligação

e modulação de receptores glutamatérgicos (Fay & Bowie 2006). Embora estudos anteriores tenham se concentrado principalmente nas propriedades de reconhecimento lectina-carboidrato das lectinas, essas investigações oferecem uma visão limitada. Lectinas ConA-like têm sido relatadas por possuírem um sítio de ligação adicional, denominado sítio de ligação de aminoácidos, que também pode estar envolvido em diversas atividades biológicas (Delatorre et al., 2007).

O primeiro relato desse sítio de ligação de aminoácidos foi baseado na estrutura cristalográfica da lectina de *Canavalia gladiata*, que revelou uma interação entre o ácido α -aminobutírico (AABA) e resíduos específicos (Asn124, Ala125, Leu126, Gln137, Asp139 e Val179). Essa interação foi caracterizada por uma densidade eletrônica estável dentro das alças dessa região (Delatorre et al., 2007). Com base nesse achado, Delatorre e colegas (2007) levantaram a hipótese que outros aminoácidos não proteicos, estruturalmente semelhantes ao AABA, poderiam se ligar a essa região. Isso inclui isômeros de AABA, ácido β -aminobutírico (BABA), ácido γ -aminobutírico (GABA), e até mesmo o L-glutamato, dado seu papel como principal precursor da síntese de GABA.

Diante do exposto, este estudo investigou *in vitro* o potencial efeito neuroprotetor da ConA contra a excitotoxicidade mediada por L-glutamato em células de feocromocitoma murino, e *in silico* a elucidação do possível envolvimento do sítio de ligação de aminoácidos.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Produtos químicos e reagentes

O Cloreto de sódio (S9888), Cloreto de cálcio (C5080), Cloreto de magnésio (449164), Sephadex G-75 (G75120), albumina de soro bovino (A7030), tripsina (T4799), ácido etilenodiaminotetracético (E9884), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (475989), dodecil sulfato de sódio (71736), α -metil-D-mannopiranosídeo (67770) e L-glutamato (G8415) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA. O Meio de Eagle Modificado por Dulbecco foi obtido da Gibco (Grand Island, Erie Co., NY, EUA), enquanto a L-glutamina, soro fetal bovino inativado (FBS), soro equino inativado (HS), penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Cultilab, SP, Brasil.

4.2.2 Purificação da lectina de *C. ensiformis* – ConA

A purificação da lectina da *C. ensiformis* foi realizada de acordo com Santos e colaboradores (Santos et al., 2021). As sementes foram obtidas da empresa Piraí Sementes (SP, Brasil) e subsequentemente moídas em um moinho elétrico até a obtenção de um pó de granulação fina, conhecido como farinha. Em seguida, as proteínas totais da farinha foram extraídas com solução de NaCl 0,15 M por 4 horas, na proporção de 1:10 (m/v).

Logo após, a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente (25 °C) e o sobrenadante, denominado extrato bruto, foi filtrado através de papel de filtro qualitativo 80g, 40x40 cm (Cequimica Ltda, Ceará, Brasil) e coletado. Subsequentemente, 10 mL do extrato bruto de *C. ensiformis* foram aplicados a uma coluna de Sephadex G-75 (5 x 10 cm) previamente equilibrada com NaCl 0,15 M, contendo 5 mM de CaCl₂ e MgCl₂. Após a remoção completa da fração não retida, a fração retida foi eluída com glicina 0,1 M pH 2,6. Todas as frações foram coletadas em tubos de ensaio com 1,5 mL a uma vazão de 30 mL.h⁻¹, e as alíquotas foram monitoradas em um espectrofotômetro a 280 nm (Genesys 10S UV–Vis spectrophotometer, Thermo Scientific, EUA).

Após o processo de purificação, a lectina foi dialisada (Dialysis sacks D6066 Sigma-Aldrich Co. St. Louis, EUA) com água destilada por um período de 10 horas sob agitação constante, por meio de um agitador magnético (C-MAG, Cequimica Ltda, Ceará, Brasil), com a água sendo trocada a cada hora. Em seguida, foi liofilizada (Liotop Freeze Dryer L101, Liobras, Brasil) para os testes restantes. A pureza da amostra da lectina foi avaliada por eletroforese em SDS-PAGE a 12,5% conforme descrito por Laemmli (1970). A concentração de proteínas solúveis totais foi estimada pelo método de Bradford (1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão.

4.2.3 Inativação do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD)

A lectina de *C. ensiformis* (ConA) foi solubilizada em água destilada na proporção de 1:1, sendo 10 mg em 10 mL (p/v), e extensivamente dialisada contra ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), na proporção de 1:100 (v/v) por 10 horas. A solução do agente quelante foi substituída a cada hora por uma nova. Todo o processo foi auxiliado por um agitador magnético. Posteriormente, a ConA foi dialisada contra água destilada para remover o excesso de EDTA e preparar a amostra para ser novamente liofilizada e utilizada em ensaios biológicos.

A atividade hemaglutinante da amostra desmetalizada foi verificada. As amostras foram solubilizadas em NaCl 0,15 M na concentração de 125 µg/mL, e o ensaio foi realizado com eritrócitos de coelho nativos (não tratados enzimaticamente) a 3%. Para fins de comparação, a ConA nativa foi utilizada seguindo os mesmos parâmetros.

4.2.4 Cultura e tratamentos das células PC12

A linhagem celular de feocromocitoma murino PC12 Adh foram adquiridaa do Banco de Células ATCC. Essas células foram cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), 10% de soro equino inativado (HS), 1% de penicilina e 1% de estreptomicina.

As células PC12 foram cultivadas em placas de poliestireno (TPP, Trasadingen, Suíça), com trocas de meio a cada 48 horas até atingirem a confluência. Em seguida, as células foram descoladas da placa usando uma solução de 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA diluída em PBS. Posteriormente, as células foram plaqueadas em placas de cultura de poliestireno de 96 poços (Kasvi, Brasil) a uma densidade de 1×10^4 células/cm² e mantidas em estufa com atmosfera umidificada de 95% de ar e 5% de CO₂ a 37 °C por 24 horas (Heracell Vios 160i, Thermo Fisher Scientific, EUA) (Pereira et al., 2017). Após 24 horas, o meio foi trocado e a ConA e/ou L-glutamato, diluídos em meio sem soro, foram adicionados diretamente à cultura de células PC12. O grupo controle negativo recebeu apenas meio sem soro.

4.2.5 Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade da ConA (nas suas formas nativa e desmetalizada) e do L-glutamato em células PC12 foi determinada utilizando o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT). As células PC12 foram cultivadas por 24 horas em placas de 96 poços (TPP, Trasadingen, Suíça). O meio de cultura foi removido, e as células foram tratadas com concentrações crescentes de L-glutamato (1; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 mM) e de lectina nativa e desmetalizada (15,625; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL). O grupo controle negativo foi mantido em meio de cultura sem soro.

O ensaio de MTT foi realizado 24 horas após os tratamentos. Uma solução de MTT (100 µL) foi diluída em meio DMEM e adicionada a cada poço para uma concentração final de 1 µg/mL. As placas foram incubadas por 2 horas em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂

a 37 °C. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de dodecil sulfato de sódio puro (SDS) foram adicionados para lisar as células e solubilizar o formazan. Formazan é um produto colorido resultante da redução de sais de tetrazólio, como o MTT, por enzimas mitocondriais ativas dentro das células vivas. A quantidade de formazan formada é proporcional ao número de células viáveis. Após 12 horas em temperatura ambiente, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 595 nm (Thermo Varioscan, Finlândia). A inibição da redução do MTT indica diminuição da viabilidade celular (Mosmann, 1983). Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em três dias diferentes.

4.2.6 Ensaio de neuroproteção

Para avaliar o efeito neuroprotetor da ConA (nas suas formas nativa e desmetalizada) contra a excitotoxicidade induzida por L-glutamato, células PC12 foram cultivadas por 24 horas em placas de 96 poços. A lectina, tanto na forma nativa quanto na desmetalizada, em concentrações de 15,625; 31,25; 62,5 e 125 µg/mL, foi incubada por 1 hora com 10 mM de L-glutamato. Em seguida, o meio de cultura foi removido, e as células foram tratadas concomitantemente com ConA nativa e L-glutamato, e ConA desmetalizada e L-glutamato. Ambas as soluções foram diluídas em meio sem soro. O grupo controle de toxicidade positiva recebeu apenas 10 mM de L-glutamato, e o controle negativo foi mantido apenas com meio de cultura suplementado sem soro. O efeito da lectina e suas formas nativa e desmetalizada contra o dano neuronal induzido por L-glutamato foi medido usando o teste de MTT, conforme descrito anteriormente. A morfologia das células no ensaio de excitotoxicidade por L-glutamato também foi analisada por microscopia de contraste de fase.

4.2.7 Ensaio de neuroproteção na presença de carboidrato

Para avaliar se a atividade neuroprotetora da ConA é independente do domínio de reconhecimento de carboidratos, o ensaio de MTT foi repetido conforme descrito anteriormente, com a adição do carboidrato α -metil-D-mannopiranosídeo (aMM). Primeiramente, uma curva de toxicidade foi delimitada para verificar se o carboidrato nas concentrações de (6,25 e 12,5 M) apresentava toxicidade para as células PC12. Após a escolha da concentração ideal de aMM que não fosse tóxica para a cultura celular e fosse capaz de inibir a atividade da lectina, a ConA (15,6 µg/mL) em suas formas nativa e desmetalizada foi incubada

por 1 hora com aMM 6,25 mM e 10 mM de L-glutamato, sendo então adicionados concomitantemente à cultura celular.

4.2.8 Atividade hemaglutinante e inibição na presença de L-glutamato

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados conforme descrito por Santos e colaboradores (Santos et al., 2019), com algumas adaptações, utilizando diluições seriadas de eritrócitos nativos de coelho a 3% e adicionando a concentração tóxica escolhida de L-glutamato (10 mM). Os resultados foram expressos em unidades hemaglutinantes (HU), onde uma HU representa a concentração mínima de proteína (mg/mL) necessária para induzir a formação de uma rede de células aglutinadas, visível a olho nu.

A especificidade de ligação da lectina a carboidratos foi definida como a menor concentração de açúcar capaz de inibir completamente a aglutinação. Diluições seriadas (concentração inicial de 100 mM) de α -metil-D-mannopiranosídeo (aMM) foram preparadas em solução fisiológica. ConA (4 HU) e a concentração tóxica designada de L-glutamato (10 mM) também foram adicionadas a cada diluição. Variações na atividade hemaglutinante, inibição da atividade hemaglutinante e viabilidade dos eritrócitos foram avaliadas, em comparação com o grupo controle sem a presença de L-glutamato.

4.2.9 Espectroscopia de fluorescência intrínseca

Para investigar a interação ConA-L-glutamato, foram realizadas medições de espectroscopia de fluorescência intrínseca em um espectrofotômetro de fluorescência Varian-Cary Eclipse de estado estacionário, equipado com um sistema de controle de temperatura. Foi utilizada uma solução de ConA (2,0 μ M) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,4 contendo NaCl 150 mM. Os resíduos de aminoácidos aromáticos da ConA foram excitados a 290 nm, e os espectros de emissão de fluorescência foram registrados de 300 a 450 nm a 20 °C. O L-glutamato foi titulado na solução de ConA (ou ConA contendo 1 mM de aMM) para concentrações finais variando de 0,0 a 2,4 mM. As intensidades de emissão foram corrigidas para a fluorescência de fundo causada pelo tampão e substratos, para diluição e para efeitos de filtro interno. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) foram estimados usando a relação (modelo de ligação de um sítio): $\log(F_0 - F/F) = \log(K_b) + n \cdot \log(\text{L-glutamato ou aMM})$ onde F_0 e F são as

intensidades de fluorescência na ausência e presença de L-glutamato (ou aMM), respectivamente (Lakowicz, 2006).

4.2.10 Docking molecular

Estudo de *docking* molecular foi conduzido utilizando o AutoDock 4.2.6 e o Autodock Vina 1.1.2, ambos componentes do pacote de software AutoDockTools 1.5.7. A estrutura tridimensional da ConA, com código de acesso PDB 1CVN, foi obtida do Protein Data Bank (PDB). A estrutura do ligante, L-glutamato, foi obtida do banco de dados ChemSpider.

A primeira etapa do *docking* consistiu na preparação da proteína e do ligante, ou seja, determinar a protonação, calcular as cargas e especificar a ligação do ligante e da proteína para definir a posição da caixa de grade e suas dimensões, utilizando o software AutoDock 4.2.6. A caixa de grade foi delimitada como 42x52x34 Å (x, y e z), com dimensões 7,151, -1,828 e 15,162, respectivamente, utilizando os resíduos de Asn124, Ala125, Leu126, Gln137, Asp139 e Val179 do sítio de ligação de aminoácidos da cadeia C como uma região de ligação específica.

Subsequentemente, os arquivos de proteína e ligante foram salvos no formato PDBQT, que é um pré-requisito para o *docking* usando o Autodock Vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2010). Cem execuções individuais do algoritmo foram realizadas com diferentes combinações de configurações de parâmetros ou configurações personalizadas. O algoritmo Lamarckiano foi empregado em todas as simulações para otimizar a pose do ligante (Morris et al., 1998). Imagens da interação de ligação da proteína foram feitas usando o software Biovia Discovery Studio 2024.

4.2.11 Análise estatística

Para as análises estatísticas dos testes *in vitro*, empregou-se o software GraphPad Prism 6.0. Cada ensaio foi realizado em triplicata e repetido em três momentos distintos. A análise dos dados foi feita por meio de ANOVA de uma via, complementada pelo teste post hoc de Bonferroni. Nos ensaios de citotoxicidade, os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão, tendo como referência o controle negativo (definido como 100% de viabilidade). Já para os testes de neuroproteção, os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão em relação ao grupo controle positivo de toxicidade (GLU). Adotou-se um nível de significância de $p \leq 0,05$.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Purificação da ConA

A lectina de *C. ensiformis* (ConA) foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de Sephadex G-75. A análise eletroforética subsequente revelou um perfil composto por três bandas distintas com pesos moleculares de 25, 13 e 12 kDa (Figura Suplementar 1). Esse padrão de múltiplas bandas é atribuído a modificações pós-traducionais, uma característica marcante de lectinas pertencentes à subtribo Diocleinae, conforme já relatado (Cavada et al., 2019a; Cavada et al., 2019b).

Através do ensaio de hemaglutinação utilizando eritrócitos de coelho, a ConA nativa exibiu um título de hemaglutinação de 32 HU, e sua atividade foi inibida pelo carboidrato aMM com uma concentração inibitória mínima (MIC) de 6,25 mM. Em contraste, a ConA desmetalizada apresentou uma atividade hemaglutinante residual significativamente menor (8 HU), e sua atividade não foi inibida pelo carboidrato na concentração de 100 mM (Tabela 2).

Essa diferença nas atividades é atribuída ao fato de que as lectinas dependentes a metais, como a ConA, são metaloproteínas que contêm íons Ca^{2+} e Mn^{2+} em suas estruturas. Esses íons metálicos, presentes no sítio de ligação de metais, contribuem para a formação de uma cavidade hidrofóbica que acomoda o carboidrato e estabiliza a conformação do domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD). A ausência desses íons pode levar à desestabilização da estrutura terciária da proteína e à redução da afinidade pelo glicano (Osterne et al., 2017; Cavada et al., 2019b).

Tabela 2 - Atividade hemaglutinante da ConA em suas formas nativa e desmetalizada, na presença e ausência de L-glutamato.

Lectina ¹	Atividade	Inibição da
	hemaglutinante (H.U.)	hemaglutinação (MIC) ³
ConA Nativa	32	6,25
ConA Desmetalizada	8	NI
Presença de L-glutamato ²		
ConA Nativa	32	6,25
ConA Desmetalizada	8	NI

- 1: ConA na concentração de 125 µg/mL.
- 2: L-glutamato na concentração de 10 mM.
- 3: α-metil-D-mannopiranosídeo (αMM) na concentração de 0,1 M.

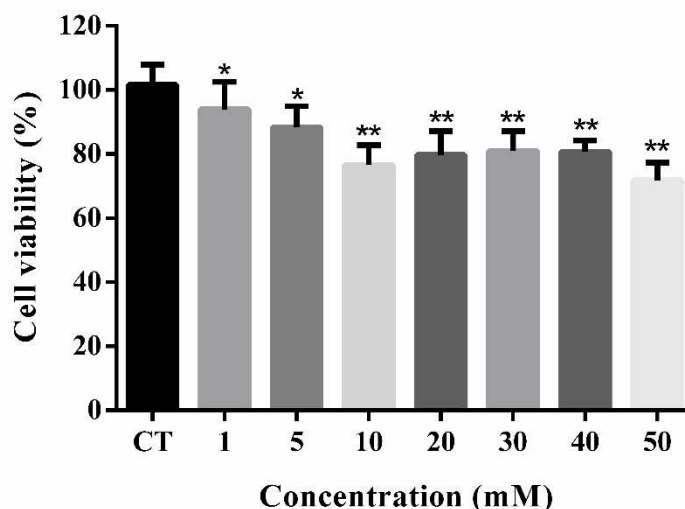
Cada cátion bivalente (Mn^{2+} e Ca^{2+}) interage com um conjunto específico de resíduos de aminoácidos e moléculas de água, formando uma complexa rede de ligações coordenadas. O Mn^{2+} é coordenado aos resíduos Glu8, Asp10, Asp19 e His24, enquanto o Ca^{2+} interage com Tyr12, Asn14, Asp208 e Arg228. Uma molécula de água faz a ponte entre Asn14 e Ca^{2+} , e outra molécula de água faz a ponte entre Asp208 e Ca^{2+} , formando uma ligação de hidrogênio com o carbonila de Asp208. Essa interação induz uma mudança conformacional crucial: a isomerização da ligação peptídica *cis-trans* entre os resíduos Ala207 e Asp208 (conforme ilustrado na Figura Suplementar 2). Essa alteração estrutural é essencial para a integridade do CRD, pois posiciona adequadamente os resíduos Asn14 e Arg228, que são cruciais para a ligação específica de carboidratos (Loris et al., 1998).

4.3.2 Ensaio de citotoxicidade

O L-glutamato reduziu a viabilidade das células PC12 em todas as concentrações testadas (1, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mM) (Figura 11). A concentração de 10 mM de L-glutamato diminuiu a viabilidade em aproximadamente 20% em comparação com o controle dentro de 24 horas, e esse nível de toxicidade foi mantido até a maior concentração testada. Portanto, L-glutamato (10 mM) foi selecionado como a concentração mais apropriada para os ensaios subsequentes de neuroproteção.

Essa redução na viabilidade das células PC12 induzida pelo L-glutamato provavelmente se deve tanto à desregulação da atividade dos receptores de L-glutamato quanto à saturação do antiportador cistina/glutamato, o que leva à superprodução de espécies reativas de oxigênio. Ambos os mecanismos podem, em última instância, resultar em morte celular (Choi, 2020; Prasansuklab, Brimson & Tencomnao, 2020).

Figura 11 - Curva de toxicidade do L-glutamato em células PC12. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT 24 horas após os tratamentos. Os experimentos foram feitos em triplicatas e em três ocasiões diferentes. Os resultados foram expressos como porcentagem do controle (CT), considerado 100% onde a significância foi considerada (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).

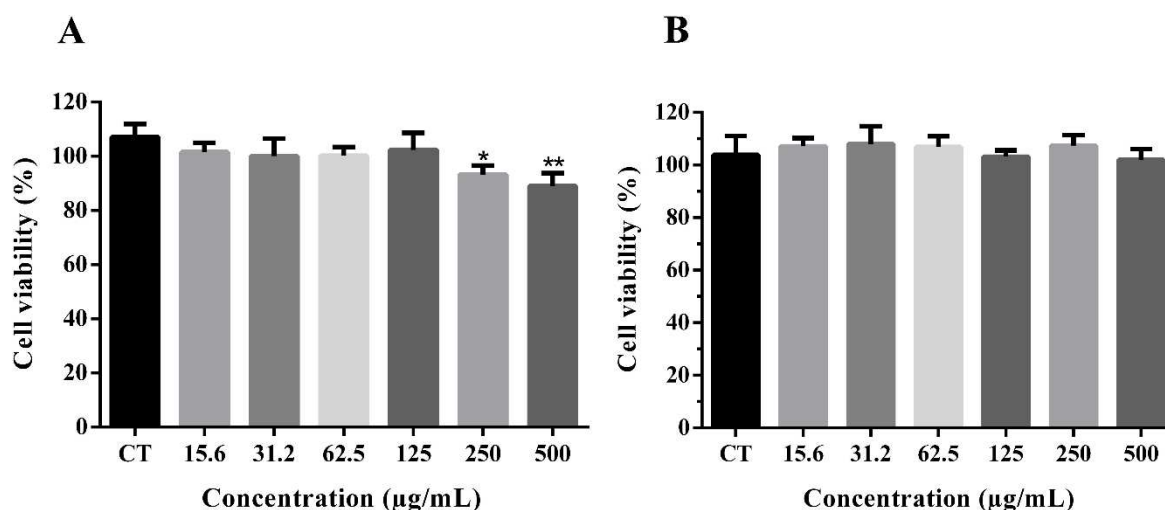


Concentrações aproximadas de 10 mM são rotineiramente empregadas em ensaios de citotoxicidade induzida por L-glutamato. Por exemplo, Chang et al. (2020) utilizaram 20 mM de L-glutamato para induzir toxicidade em células PC12, enquanto Hu et al. (Hu et al., 2016) administraram 25 mM de L-glutamato a células PC12 diferenciadas. Similarmente, Wang et al. (2016) implementaram 20 mM de L-glutamato em células Y-79 diferenciadas. Esses achados ressaltam a necessidade de concentrações elevadas de L-glutamato em ensaios *in vitro*, atribuíveis a fatores como a ausência de mecanismos endógenos de recaptação de L-glutamato inerentes ao cérebro, bem como disparidades na sensibilidade da linhagem celular. É de suma importância reconhecer que a viabilidade celular pode ser modulada por variáveis incluindo a duração da incubação, a concentração de L-glutamato, o fenótipo da linhagem celular e o número de passagens (Kritis et al., 2015; Chang et al., 2020; Hu et al., 2016; Wang et al., 2016).

A ConA nativa exibiu toxicidade nas concentrações mais elevadas testadas (250 e 500 $\mu\text{g/mL}$), enquanto sua forma desmetalizada não induziu toxicidade quando adicionada à cultura de células (Figura 12). Portanto, as concentrações de 15,625, 31,25, 62,5 e 125 $\mu\text{g/mL}$ foram selecionadas para os ensaios de neuroproteção. Nossos achados sugerem que o efeito citotóxico da ConA em células PC12 é dependente do CRD. Esses resultados corroboram outros estudos que mostram que a ConA exibe toxicidade e genotoxicidade em *Drosophila melanogaster* via CRD (de Oliveira dos Santos et al., 2022). Adicionalmente, Huldani et al. (2022) demonstraram

que a ConA exibe toxicidade em células tumorais, induzindo tanto vias dependentes quanto independentes de caspase, promovendo autofagia.

Figura 12 - Curva de citotoxicidade da ConA em células PC12. (A) = Forma nativa. (B) = Forma desmetalizada. A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de MTT 24 horas após o tratamento. Cada experimento foi feito em triplicata e repetido em três momentos diferentes. Os resultados foram apresentados como uma porcentagem do controle (CT), que foi considerado 100% onde a significância foi considerada ($*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).



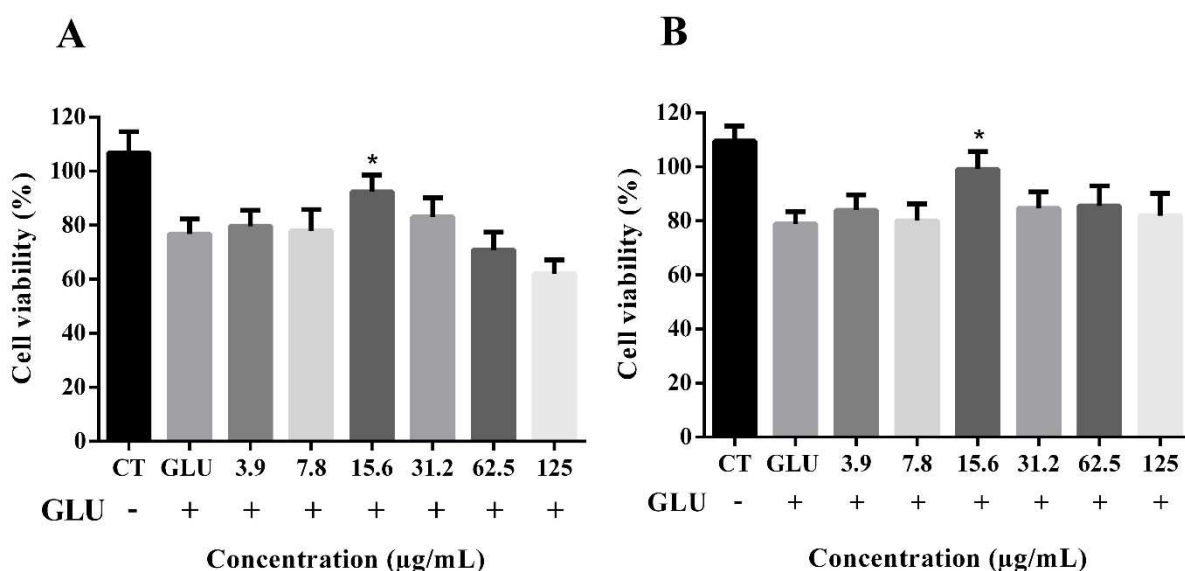
4.3.3 Efeito neuroprotetor da ConA

Tanto a ConA nativa quanto a desmetalizada exerceram efeitos neuroprotetores contra a excitotoxicidade induzida por L-glutamato na concentração de 15,6 µg/mL (Figura 13), indicando que o efeito não é dose-dependente. A ConA desmetalizada elevou a viabilidade celular para 95%, enquanto a ConA nativa atingiu 93%, em comparação com 80% nas células expostas apenas ao L-glutamato. Esses achados indicam um potencial significativo para futuras atividades neuroprotetoras. O efeito neuroprotetor observado neste experimento pode estar relacionado à capacidade de algumas lectinas interagirem com aminoácidos em um sítio de ligação específico. Lectinas ConA-like possuem um sítio de ligação para o aminoácido não proteico AABA, como já descrito para lectinas de *Dioclea wilsonii* (Rangel et al., 2012), *Cymbosema roseum* (Rocha et al., 2011), *C. gladiata* (Delatorre et al., 2007) e *C. brasiliensis* (Bezerra et al., 2011).

Portanto, acreditamos que a ConA pode ter interagido com o L-glutamato via seu sítio de ligação de aminoácidos, protegendo assim as células PC12 da excitotoxicidade induzida por

L-glutamato. A atividade biológica observada provavelmente surge de uma competição pelo sítio de ligação de aminoácidos na ConA. A ConA purificada apresenta o aminoácido AABA ligado a esse sítio. No entanto, devido à maior disponibilidade e, possivelmente, maior afinidade pelo glutamato, este aminoácido possa interagir com o mesmo sítio. Cada molécula de ConA, sendo um tetrâmero, pode interagir com até quatro moléculas de L-glutamato. Cada monômero de ConA possui um sítio de ligação de aminoácidos, cuja acessibilidade é modulada pela oligomerização dos dímeros, posicionando o sítio em uma região interna da estrutura do dímero.

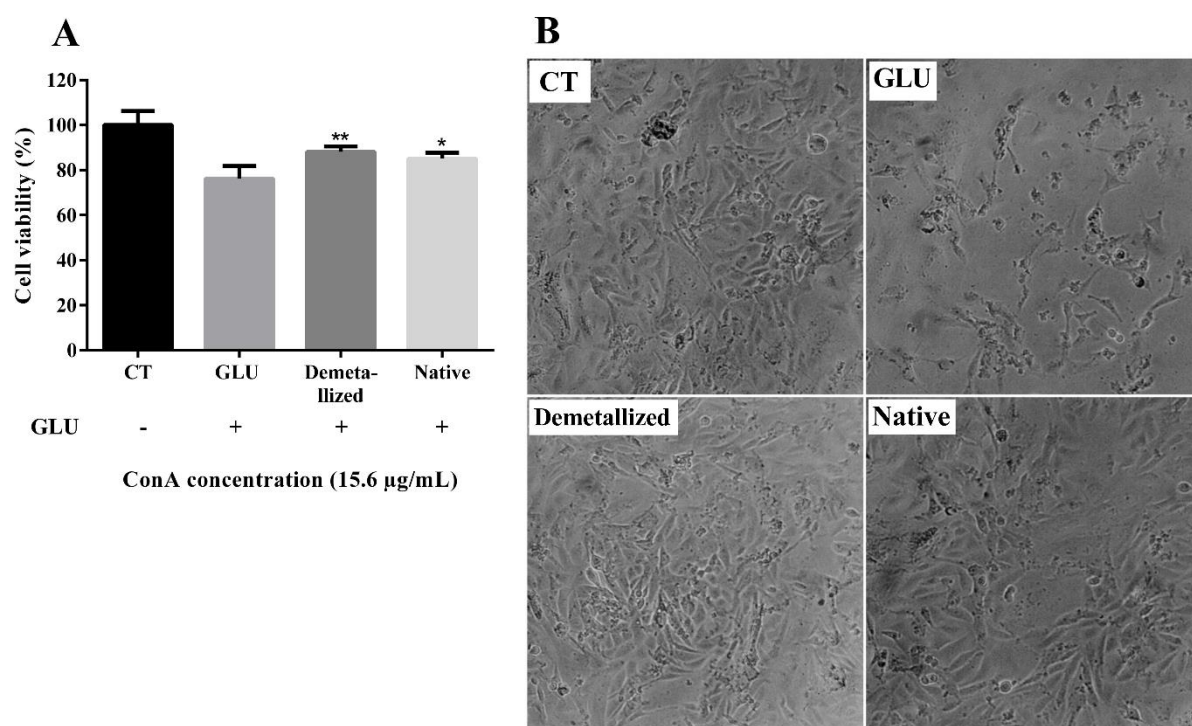
Figura 13 - Ensaio de neuroproteção da ConA em células PC12. (A) = Forma nativa com 10 mM de glutamato. (B) = Forma desmetalizada com 10 mM de glutamato. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT 24 horas após os tratamentos. Triplicatas foram realizadas em três ocasiões distintas. Os resultados são comparados ao glutamato (GLU) onde a significância foi considerada ($*p \leq 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni).



Ao analisar o ensaio de neuroproteção por microscopia de contraste de fase (Figura 14), as células neuronais PC12 em condições controle exibiram uma morfologia poligonal, formaram aglomerados, quase não apresentavam neuritos e permaneceram aderidas à superfície, indicando viabilidade celular. Células expostas a 10 mM de L-glutamato, contudo, mostraram uma redução na contagem celular, aumento do espaçamento e dano celular. No entanto, quando as células PC12 foram pré-tratadas com ConA nativa ou desmetalizada antes da exposição ao L-glutamato, a morfologia e a viabilidade celular foram restauradas aos níveis próximos do controle, sugerindo um efeito neuroprotetor. Os resultados presentes corroboram

estudos anteriores que demonstram o potencial da ConA em pesquisa neurobiológica (Partin et al., 1993; Boehm & Huck, 1998; Lin & Levitan, 1991; Li et al., 2022; Fay & Bowie 2006; Araújo et al., 2020). Contudo, a investigação de efeitos neuroprotetores utilizando culturas de células e lectinas vegetais permanece limitada, em contraste com os efeitos observados com galectinas animais (Araújo et al., 2020; Siew & Chern, 2018) e outros compostos naturais. Por exemplo, Pereira et al. (2017) relataram efeitos neuroprotetores do extrato de *Amburana cearensis* em células PC12, enquanto Dos Santos Souza et al. (2018) e Ferreira et al. (2021) descreveram os efeitos benéficos da agatisflavona e da rutina em modelos de cultura neuronal.

Figura 14 - Ensaio de neuroproteção da ConA exclusivamente nas concentrações que protegeram a cultura de células PC12 da excitotoxicidade por L-glutamato. (A) = Ensaio de neuroproteção da ConA 15,6 µg/mL nas formas nativa e desmetalizada com 10 mM de L-glutamato. Os experimentos foram realizados em triplicatas, em três ocasiões distintas. A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de MTT 24 h pós-tratamento. Os resultados foram comparados ao L-glutamato (GLU) onde a significância foi considerada (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni). (B) = Análise microscópica de células PC12 após tratamento com 10 mM de L-glutamato, 10 mM de L-glutamato com ConA nativa 15,6 µg/mL, 10 mM de L-glutamato com ConA desmetalizada 15,6 µg/mL, e controle negativo. Objetiva ×40. Escala = 100 µm.



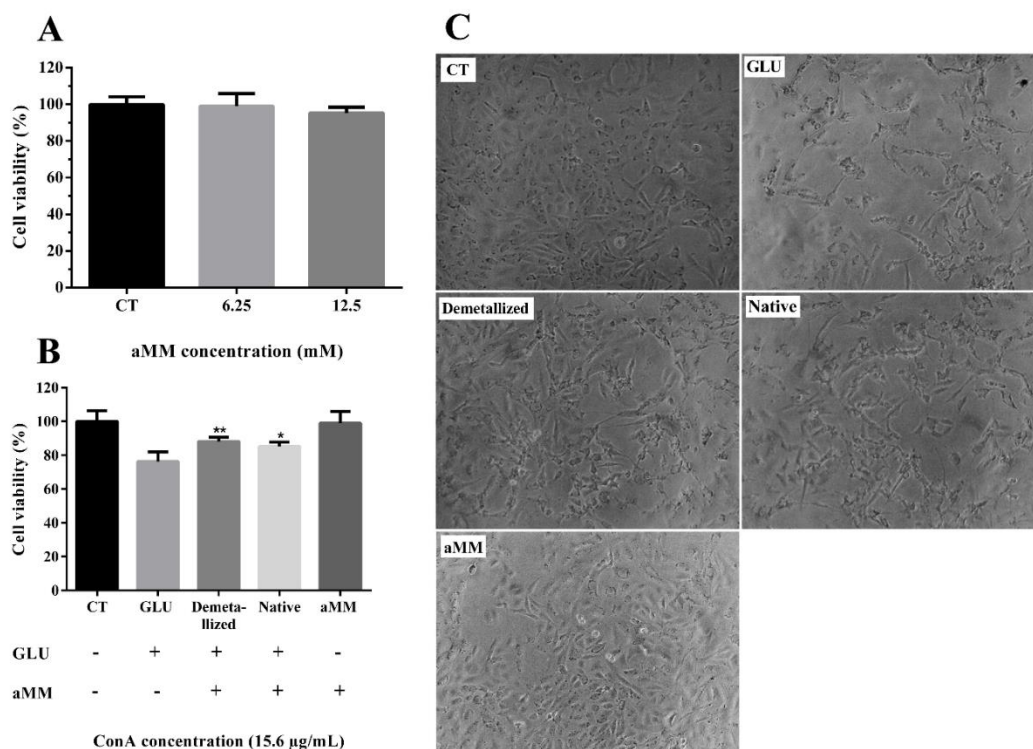
Para investigar o papel do CDR no efeito neuroprotetor da ConA, empregamos o aMM, um conhecido inibidor do CDR da ConA (Cavada et al., 2019a). Dado que a ConBr, uma lectina

estruturalmente similar, exerce neuroproteção via seu CDR (Jacques et al., 2013), hipotetizamos que o bloqueio do CDR da ConA atenuaria seu efeito neuroprotetor.

No entanto, a adição de aMM não diminuiu a atividade neuroprotetora da ConA em sua forma nativa nem desmetalizada, sugerindo que o CDR não é essencial para este efeito (Figura 15). Nossas descobertas aprimoram a compreensão do efeito neuroprotetor da ConA, revelando que ele não se deve primariamente à interação com carboidratos, mas sim a um mecanismo alternativo: o sequestro de L-glutamato através do sítio de ligação de aminoácidos. Essa conclusão confirma nossa hipótese inicial e encontra suporte no estudo de Delatorre et al. (2007), que demonstrou o potencial do sítio de ligação de aminoácidos para modular atividades biológicas. Portanto, nossos resultados desvendam um novo mecanismo de ação para a ConA e lectinas ConA-like, expandindo significativamente a compreensão do papel dessas proteínas em processos biológicos (Delatorre et al., 2013).

Análises morfológicas (Figura 15) revelaram ainda que células PC12 tratadas com ConA (tanto nativa quanto desmetalizada) exibiram um padrão de crescimento comparável ao grupo controle, o que demonstrou viabilidade celular. Este resultado sugere que, além de sua capacidade de modular a disponibilidade de glutamato no meio extracelular, a ConA pode exercer um efeito mitogênico significativo nessas células.

Figura 15 - Ensaio de neuroproteção da ConA com adição de aMM em células PC12. (A) = Curva de citotoxicidade de aMM. A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio de MTT 24 h pós-tratamento. Triplicatas foram realizadas em três ocasiões distintas. Os resultados foram comparados ao controle (CT) ($*p < 0,05$, ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni). (B) = Ensaio de neuroproteção da ConA 15,6 $\mu\text{g/mL}$ nas formas nativa e desmetalizada com 10 mM de L-glutamato e 6,25 mM de aMM. Os experimentos foram realizados em triplicatas, em três momentos distintos. Os resultados foram comparados ao L-glutamato (GLU) onde a significância foi considerada ($*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$ ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni). (C) = Análise microscópica de células PC12 após tratamento com 10 mM de L-glutamato + 6,25 mM de aMM, 10 mM de L-glutamato com ConA nativa 15,6 $\mu\text{g/mL}$ + 6,25 mM de aMM, 10 mM de L-glutamato com 15,6 $\mu\text{g/mL}$ de ConA desmetalizada + apenas 6,25 mM de aMM, 6,25 mM de aMM, e um controle negativo. Objetiva $\times 40$. Escala = 100 μm .



Essa descoberta é consistente com estudos anteriores que demonstraram a influência da ConA na neuroplasticidade e na promoção do crescimento de neuritos (Lin & Levitan, 1991). Além disso, Huldani et al. (2022) reconheceram a ConA como um potente agente mitogênico em linfócitos e uma promissora molécula terapêutica. Li et al. (2022) observam que a atividade mitogênica da ConA, no entanto, pode variar dependendo do tipo celular e das vias de sinalização envolvidas. Dada a natureza pioneira de nossos achados, este resultado representa uma importante hipótese que servirá de base para futuros estudos. Especificamente, são necessárias mais investigações para avaliar minuciosamente o potencial mitogênico da ConA em células neurais, além de sua capacidade de modular o L-glutamato.

4.3.4 Atividade hemaglutinante e inibição na presença de L-glutamato

Os ensaios de hemaglutinação e inibição por carboidrato foram replicados suplementando a solução com L-glutamato (10 mM) (Tabela 2) contudo, nenhuma discrepância foi observada em comparação com o ensaio realizado na ausência de L-glutamato. Isso confirma que a atividade do CRD permanece inalterada pelo sítio de ligação de aminoácidos da lectina. Delatorre et al. (2007), ao elucidar a presença de AABA na estrutura da lectina de *C. gladiata*, observaram que ele estava complexado com o carboidrato aMM, indicando que se tratam de sítios distintos e que suas atividades não são correlacionadas, o que está em consonância com nossos achados.

4.3.5 ConA se liga ao L-glutamato

A espectroscopia de fluorescência intrínseca foi utilizada para estudar a interação entre L-glutamato e ConA. A absorbância do L-glutamato foi desprezível em todas as concentrações testadas, mesmo na concentração mais alta medida (2,4 mM), e a intensidade de emissão de fluorescência também foi desprezível (Figura 16a). O espectro de emissão da ConA a 20 °C e pH 7,4 exibiu um pico com intensidade máxima em 338 nm, característico de resíduos aromáticos parcialmente expostos ao tampão circundante (Figura 16a).

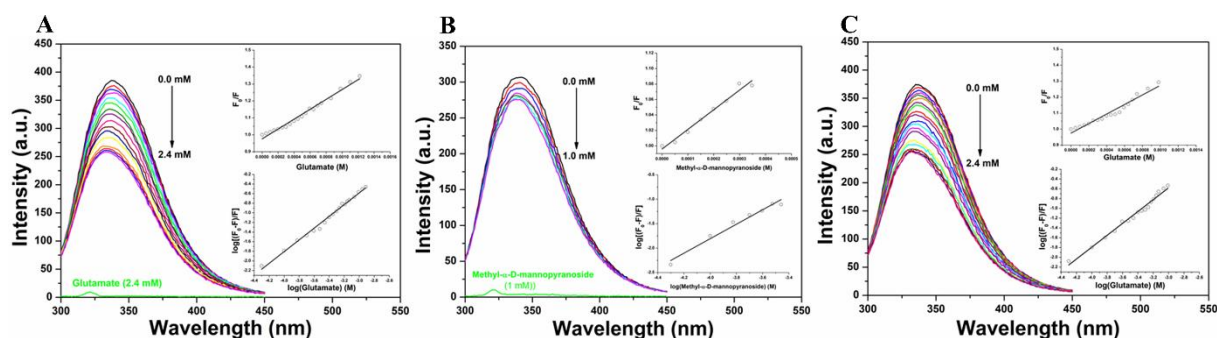
Concentrações crescentes de L-glutamato diminuem gradualmente a intensidade de fluorescência da ConA (Figura 16a). O gráfico de Stern-Volmer (inserção superior, Figura 16a) mostrou uma correlação linear, indicando um único mecanismo de quenching dominante induzido pelo L-glutamato. Para caracterizar a interação L-glutamato-ConA, a constante de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n) foram estimados assumindo sítios de ligação independentes (inserção inferior, Figura 16a). Os dados foram ajustados a um modelo de ligação de um sítio. Os valores estimados para n e K_b foram de $1,2 \pm 0,1$ e $1,21 \pm 0,12 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. O n em torno de 1 sugere um sítio de ligação para L-glutamato para cada monômero de ConA. É notável que o K_b obtido para a interação L-glutamato-ConA é comparável ao valor previamente relatado para a interação entre albumina sérica bovina e L-glutamato ($K_b = 1,29 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$).

Para investigar se o L-glutamato interage com o CRD, realizamos experimentos utilizando aMM. Concentrações crescentes de aMM também levaram a uma diminuição gradual na fluorescência da ConA, embora menos pronunciada do que com o L-glutamato

(Figura 16b). Nossas análises, usando um modelo de ligação de um sítio, estimaram um K_b de $1,29 \pm 0,13 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($n = 1,3 \pm 0,1$) para a interação entre aMM e ConA (inserção, Figura 16b), um valor consistente ($K_b = 1,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Portanto, como esperado, o K_b para a interação ConA-aMM é uma ordem de magnitude maior que o K_b para a interação ConA-L-glutamato.

Para garantir que todos os CRDs estivessem ocupados, realizamos a titulação de L-glutamato na ConA na presença de 1 mM de aMM. Novamente, concentrações crescentes de L-glutamato diminuíram gradualmente a intensidade de fluorescência da ConA (Figura 16c). O gráfico de Stern-Volmer (inserção superior, Figura 16c) mostrou novamente uma correlação linear e os valores estimados para n e K_b foram $1,2 \pm 0,1$ e $1,14 \pm 0,11 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectivamente (inserção inferior, Figura 16c). O K_b estimado para a interação L-glutamato-ConA na ausência e presença de aMM são muito semelhantes, sugerindo que o L-glutamato se liga ao sítio de ligação de aminoácidos da ConA e não ao CRD, confirmando nossa hipótese de interação do L-glutamato com o sítio de ligação de aminoácidos.

Figura 16 - Espectroscopia de fluorescência intrínseca. (A) = Espectros de emissão da ConA na presença de diferentes concentrações de L-glutamato (0 a 2,4 mM). Inserção superior: Gráfico de Stern-Volmer ($R^2 = 0,984$). Inserção inferior: Gráfico logarítmico duplo de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log(\text{L-glutamato})$ derivado do quenching de fluorescência da ConA induzido por L-glutamato. (B) = Espectros de emissão da ConA na presença de diferentes concentrações de aMM (0 a 1,0 mM). Inserção superior: Gráfico de Stern-Volmer ($R^2 = 0,995$). Inserção inferior: Gráfico logarítmico duplo de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log(\text{aMM})$ derivado do quenching de fluorescência da ConA induzido por aMM. (C) = Espectros de emissão da ConA na presença de 1 mM de aMM e diferentes concentrações de L-glutamato (0 a 2,4 mM). Inserção superior: Gráfico de Stern-Volmer ($R^2 = 0,975$). Inserção inferior: Gráfico logarítmico duplo de $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log(\text{L-glutamato})$ derivado do quenching de fluorescência da ConA induzido por L-glutamato.



4.3.6 Análise do docking molecular

O ligante, L-glutamato, interagiu com a ConA por meio de ligações de hidrogênio com Ser113, Asn124 e His180 (cadeia C), e Gln137 (cadeia D). Uma ligação carbono-hidrogênio também foi observada com Val179 (cadeia C) (Tabela 3). É importante notar que este sítio de ligação de aminoácidos está localizado na interface dos monômeros, formando o dímero canônico característico das lectinas vegetais. Essa interação apresentou a menor (melhor) energia de ligação de -5,7 kcal/mol, com um RMSD de 0.

Tabela 3 - Resíduos de aminoácidos envolvidos na interação com L-glutamato.

Resíduos de aminoácidos	L-Glutamato	Distância (Å)
Ligações polares (pontes de hidrogênio)		
Ser113 O	H3	2.26
Asn124 O	H3	2.88
Asn124 O	H4	2.38
Asn124 HD21	O8	2.11
Gln137 HE22*	O8	2.8
His180 HD1	O8	2.04
His180 HN	O1	2.15
Ligações apolares (Carbono – hidrogênio)		
Val179 CA	O1	2.81

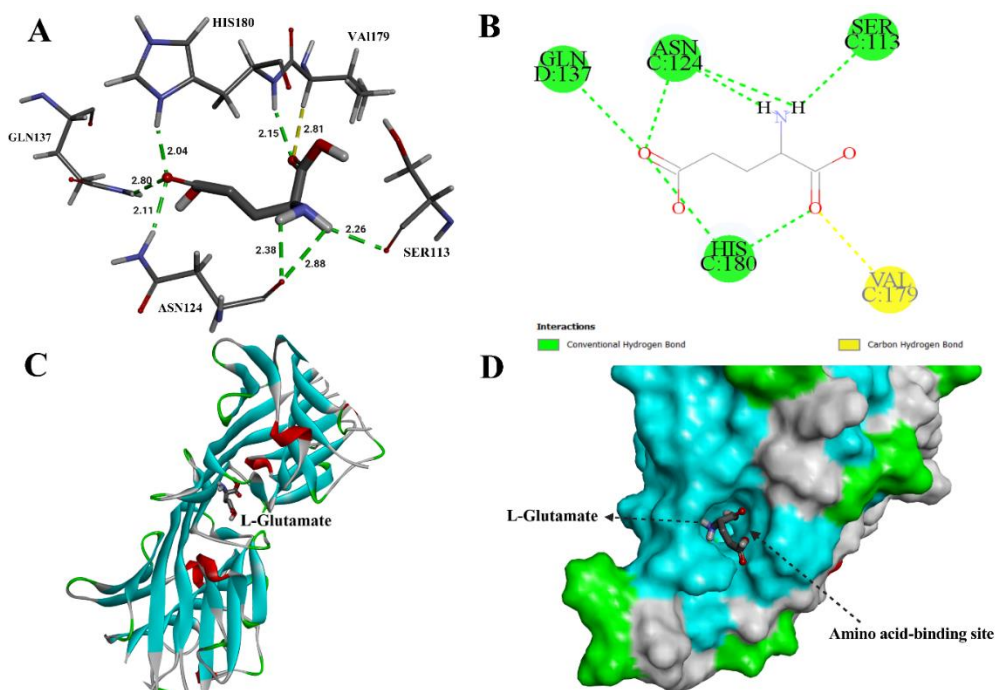
*Gln137, destacando que o sítio de ligação de aminoácidos está localizado na interface dos monômeros que constituem o dímero canônico.

A interação do L-glutamato com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de aminoácidos da ConA foi muito semelhante à interação do AABA na estrutura da lectina de *C. gladiata* (Figura 17). Isso se deve ao contato hidrofílico do átomo de hidrogênio (HE22) da Gln137 com o átomo de oxigênio (O8) do L-glutamato e ao contato hidrofóbico do carbono (CA) da Val179 com o oxigênio (O1) do L-glutamato (Tabela 3). Essas interações efetivamente ancoram o ligante, permitindo o aumento dos contatos intermoleculares e estabilizando o dímero canônico, assim como ocorre com o AABA (Delatorre et al., 2007).

Desde 2006, (Komath, Kavitha & Swamy, 2006) já apontavam a necessidade de investigar a interação de moléculas não glicídicas com os sítios hidrofóbicos das lectinas vegetais. Explorar esses sítios abriria novas perspectivas para aplicações das lectinas, permitindo estudos mais direcionados. A descoberta do AABA complexado à estrutura da CGL por

Delattore et al. (2007) reforçou essa hipótese, sugerindo que outros aminoácidos poderiam interagir com o sítio de ligação de aminoácidos e modular respostas biológicas. Neste estudo, confirmamos essa hipótese demonstrando o mecanismo de sequestro de L-glutamato pelo sítio de ligação de aminoácidos da ConA e seu efeito neuroprotetor *in vitro* em células PC12 (Figura Suplementar 3).

Figura 17 - *Docking Molecular*. (A) = Interação 3D dos resíduos de aminoácidos pertencentes ao sítio de ligação de aminoácidos da ConA que interagem com o L-glutamato e suas respectivas distâncias de ligação. Ligações verdes correspondem a interações polares e ligações amarelas a interações apolares. (B) = Interação 2D dos resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de aminoácidos da ConA com o L-glutamato. Ligações verdes correspondem a interações polares e ligações amarelas a interações apolares. (C) = L-Glutamato ligado à estrutura da ConA, evidenciando que o sítio de ligação de aminoácidos está localizado na interface do dímero canônico das lectinas ConA-like. A estrutura da ConA foi obtida do PDB com o código de acesso 1CVN. (D) = L-Glutamato interagindo com a cavidade do sítio de ligação de aminoácidos da ConA.



Esse mecanismo possibilita o uso direcionado da ConA para a detecção e modulação dos níveis de L-glutamato. Portanto, perspectivas futuras que apliquem refinamento à sua utilização, por meio da criação de peptídeos bioinspirados (Souza et al., 2022) e biossensores (Colvin et al., 2023), podem representar um avanço significativo no desenvolvimento de ferramentas terapêuticas e diagnósticas para doenças neurodegenerativas. Esses achados reforçam o papel do sítio de ligação de aminoácidos na utilização da ConA em atividades

biológicas, mitigando assim o foco singular no CRD ao aplicar lectinas vegetais em ensaios biológicos que envolvem interações lectina-célula.

4.4 Conclusões

Os achados deste estudo demonstram que a ConA exibe efeitos neuroprotetores contra a excitotoxicidade induzida por L-glutamato em células PC12, via sítio de ligação de aminoácidos. A independência desse efeito neuroprotetor da atividade do CRD revela um novo mecanismo de ação para esta lectina, com implicações significativas para o desenvolvimento de terapias inovadoras para doenças neurodegenerativas. No entanto, mais investigações são necessárias para elucidar completamente os mecanismos moleculares subjacentes e identificar os alvos celulares específicos da ConA.

Embora este estudo tenha sido conduzido *in vitro*, os resultados são promissores e justificam a realização de estudos *in vivo* para avaliar o potencial terapêutico da ConA em modelos animais de doenças neurodegenerativas. Além disso, a exploração de outras lectinas com propriedades semelhantes pode elucidar novas classes de compostos bioativos com aplicações em neuroproteção.

Agradecimentos

Este estudo foi parcialmente financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Código Financeiro 001, e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), referente aos Bolsistas de Produtividade em Pesquisa Wanius Garcia, Silvia Lima Costa e Claudener S. Teixeira.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições dos Autores

Conceituação: Renato R. Roma, Erica N. Soares e Silvia L. Costa;

Metodologia, investigação, análise de dados, análise formal e recursos: Renato R. Roma, Fábio S.A. Oliveira, Diógenes G.S. Fernandes, Wanius Garcia, Erica N. Soares, Silvia L. Costa e Claudener S. Teixeira;

Redação, supervisão, administração do projeto e aquisição de financiamento: Renato R. Roma, Wanius Garcia, Silvia L. Costa e Claudener S. Teixeira.

REFERÊNCIAS

- AL-KHAYRI, Jameel Mohammed *et al.* Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 27, n. 9, p. 2901, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27092901>. Acesso em: 10 jul. 2024.
- ANDERSEN, Jens Velde *et al.* Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 196, p. 108719, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719>. Acesso em: 05 jul. 2024.
- ARAÚJO, João Ronielly Campêlo *et al.* Animal Galectins and Plant Lectins as Tools for Studies in Neurosciences. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 202–215, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1570159X17666191016092221>. Acesso em: 07 jul. 2024.
- ARNOLD, Frederick Joseph *et al.* Revisiting Glutamate Excitotoxicity in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Age-Related Neurodegeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 5587, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25115587>. Acesso em: 05 jan. 2025.
- BAL-PRICE, Anna *et al.* Strategies to improve the regulatory assessment of developmental neurotoxicity (DNT) using *in vitro* methods. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 354, p. 7–18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.02.008>. Acesso em: 25 jun. 2024.
- BEZERRA, Eduardo Henrique Salviano *et al.* Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 408, n. 4, p. 566–570, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.04.061>. Acesso em: 05 Jan 2025.
- BOEHM, Stefan; HUCK, Sigismund. Presynaptic inhibition by concanavalin A: are alpha-latrotoxin receptors involved in action potential-dependent transmitter release?. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 2421–2430, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71062421.x>. Acesso em: 24 dez. 2024.
- BRADFORD, Marion Mckinley. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, p. 248–254, 1976. Disponível em: https://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford_assay.pdf. Acesso em: 21 dez. 2024.
- CAVADA, Benildo Sousa *et al.* ConA-Like Lectins: High Similarity Proteins as Models to Study Structure/Biological Activities Relationships. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 30, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20010030>. Acesso em: 02 dez. 2024.
- CAVADA, Benildo Sousa *et al.* ConBr, the Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Seeds: Forty Years of Research. **Current Protein & Peptide Science**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 600–613,

2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389203720666190104123210>. Acesso em: 09 dez. 2024.

CAVADA, Benildo Sousa *et al.* One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 134, p. 901–911, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100>. Acesso em: 09 dez. 2024.

CHANG, Chi-Huang *et al.* Astaxanthin Protects PC12 Cells against Homocysteine- and Glutamate-Induced Neurotoxicity. **Molecules** (Basel, Switzerland), v. 25, n. 1, p. 214, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25010214>. Acesso em: 12 dez. 2024.

CHEN, Anna *et al.* Identification and characterization of dynamically regulated hepatitis-related genes in a concanavalin A-induced liver injury model. **Aging**, [s. l.], v. 12, n. 22, p. 23187–23199, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/aging.104089>. Acesso em: 06 jul. 2024.

CHOI, Dennis. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 14, p. 579953, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.579953>. Acesso em: 10 ago. 2024.

COLVIN, Lydia *et al.* A Polarity-Sensitive Far-Red Fluorescent Probe for Glucose Sensing through Skin. **Biosensors**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 788, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bios13080788>. Acesso em: 16 jan. 2025.

DE ALMEIDA, Monique Marylin Alves *et al.* Phytoestrogen Agathisflavone Ameliorates Neuroinflammation-Induced by LPS and IL-1 β and Protects Neurons in Cocultures of Glia/Neurons. **Biomolecules**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 562, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom10040562>. Acesso em: 26 jul. 2024.

DE OLIVEIRA DOS SANTOS, Antônio Marcos *et al.* *Canavalia ensiformis* lectin induced oxidative stress mediate both toxicity and genotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 222, Pt B, p. 2823–2832, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.061>. Acesso em: 17 jan. 2025.

DELATORRE, Plínio *et al.* Interactions between indole-3-acetic acid (IAA) with a lectin from *Canavalia maritima* seeds reveal a new function for lectins in plant physiology. **Biochimie**, [s. l.], v. 95, n. 9, p. 1697–1703, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.05.008>. Acesso em: 26 out. 2024.

DELATORRE, Plínio *et al.* Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Structural Biology**, [s. l.], v. 7, p. 52, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6807-7-52>. Acesso em: 15 jun. 2024.

DOS SANTOS SOUZA, Cleide *et al.* Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity. **Neurotoxicology**, [s. l.], v. 65, p. 85–97, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.02.001>. Acesso em: 08 nov. 2024.

FAY, Anna Marie; BOWIE, Derek. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational changes in the intact GluR6 kainate receptor. **The Journal of Physiology**, [s. l.], v. 572, n. Pt 1, p. 201–213, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.103580>. Acesso em: 26 nov. 2024.

FERREIRA, Rafael Short *et al.* *Amburana cearensis* seed extract stimulates astrocyte glutamate homeostatic mechanisms in hippocampal brain slices and protects oligodendrocytes against ischemia. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 154, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-023-03959-0>. Acesso em: 07 jan. 2025.

FERREIRA, Rafael Short *et al.* Rutin improves glutamate uptake and inhibits glutamate excitotoxicity in rat brain slices. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 1475–1483, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06145-y>. Acesso em: 10 jan. 2025.

GE, Lijun *et al.* Research Progress on Neuroprotection of Insulin-like Growth Factor-1 towards Glutamate-Induced Neurotoxicity. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 666, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11040666>. Acesso em: 10 jul. 2025.

GONÇALVES, Felipe Marques *et al.* *Vatairea macrocarpa* lectin (VML) induces depressive-like behavior and expression of neuroinflammatory markers in mice. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 38, n. 11, p. 2375–2384, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1150-9>. Acesso em: 19 dez. 2024.

GONÇALVES-RIBEIRO, Joana *et al.* Glutamate Transporters in Hippocampal LTD/LTP: Not Just Prevention of Excitotoxicity. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 13, p. 357, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00357>. Acesso em: 15 out. 2024.

GREEN, Jennifer Leigh; DOS SANTOS, Wagner Ferreira; FONTANA, Andréia Cristina Karklin. Role of glutamate excitotoxicity and glutamate transporter EAAT2 in epilepsy: Opportunities for novel therapeutics development. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 193, p. 114786, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114786>. Acesso em: 16 set. 2024.

GREENE, Lloyd; TISCHLER, Arthur S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 73, n. 7, p. 2424–2428, 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.73.7.2424>. Acesso em: 21 jul. 2024.

HU, Shuang *et al.* Mitochondria Related Pathway Is Essential for Polysaccharides Purified from *Sparassis crispa* Mediated Neuro-Protection against Glutamate-Induced Toxicity in Differentiated PC12 Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 133, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms17020133>. Acesso em: 21 out. 2024.

HULDANI, Huldani *et al.* Concanavalin A as a promising lectin-based anti-cancer agent: the molecular mechanisms and therapeutic potential. **Cell Communication and Signaling: CCS**,

[s. l.], v. 20, n. 1, p. 167, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00972-7>. Acesso em: 17 out. 2024.

JACQUES, Amanda virtuoso *et al.* Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochemistry International**, [s. l.], v. 62, n. 6, p. 836–842, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.02.020>. Acesso em: 02 mar. 2025.

KAWAKITA, Fumihiro *et al.* Roles of glutamate in brain injuries after subarachnoid hemorrhage. **Histology and Histopathology**, [s. l.], v. 37, n. 11, p. 1041–1051, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.14670/HH-18-509>. Acesso em: 26 dez. 2024.

KOMATH, Sneha Sudha; KAVITHA, Marapakala; SWAMY, Musti. Beyond carbohydrate binding: new directions in plant lectin research. **Organic & Biomolecular Chemistry**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 973–988, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b515446d>. Acesso em: 13 jan. 2024.

KRITIS, Aristeidis *et al.* Researching glutamate—Induced cytotoxicity in different cell lines: A comparative/collective analysis/study. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 9, p. 91, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00091>. Acesso em: 02 dez. 2024.

LAEMMLI, Ulrich. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/227680a0>. Acesso em: 06 nov. 2024.

LAGARDA-DIAZ, Irlanda; GUZMAN-PARTIDA, Ana Maria; VAZQUEZ-MORENO, Luz. Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1242, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>. Acesso em: 29 jul. 2024.

LAKOWICZ, Joseph Raymond. **In Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. Baltimore: Springer. 2006.

LI, Jing-Zhou *et al.* Concanavalin A promotes angiogenesis and proliferation in endothelial cells through the Akt/ERK/Cyclin D1 axis. **Pharmaceutical Biology**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 65–74, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13880209.2021.2013259>. Acesso em: 21 nov. 2024.

LIMA PEREIRA, Érica Patrícia *et al.* *Amburana cearensis* seed extract protects brain mitochondria from oxidative stress and cerebellar cells from excitotoxicity induced by glutamate. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 209, p. 157–166, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.07.017>. Acesso em: 06 out. 2024.

LIN, Stephen; LEVITAN, Irwin. Concanavalin A: a tool to investigate neuronal plasticity. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 273–277, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(91\)90136-i](https://doi.org/10.1016/0166-2236(91)90136-i). Acesso em: 05 dez. 2024.

LOÏ, Cécile; CYNOBER, Luc. Glutamate: A Safe Nutrient, Not Just a Simple Additive. **Annals of Nutrition & Metabolism**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 133–146, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000522482>. Acesso em: 01 jan. 2025.

LORIS, Remy *et al.* Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology**, [s. l.], v. 1383, p. 9-36, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0167-4838\(97\)00182-9](https://doi.org/10.1016/s0167-4838(97)00182-9). Acesso em: 14 out. 2024.

LOVINO, Ludovica; TREMBLAY, Marie-Ève; CIVIERO, Laura. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 144, n. 3, p. 151–164, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2020.07.011>. Acesso em: 26 set. 2024.

MARTAMI, Fahimeh; HOLTON, Kathleen. Targeting Glutamate Neurotoxicity through Dietary Manipulation: Potential Treatment for Migraine. **Nutrients**, [s. l.], v. 15, n. 18, p. 3952, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu15183952>. Acesso em: 20 out. 2024.

MORRIS, Garrett *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14%3C1639::AID-JCC10%3E3.0.CO;2-B). Acesso em: 06 jan. 2025.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4). Acesso em: 18 nov. 2024.

NEVES, Diogo *et al.* Molecular mechanisms of ischemia and glutamate excitotoxicity. **Life Sciences**, [s. l.], v. 328, p. 121814, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121814>. Acesso em: 09 jul. 2024.

NICOSIA, Noemi *et al.* Glutamate-Mediated Excitotoxicity in the Pathogenesis and Treatment of Neurodevelopmental and Adult Mental Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 12, p. 6521, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25126521>. Acesso em: 05 jan. 2025.

OPREA, Daniela *et al.* PC-12 Cell Line as a Neuronal Cell Model for Biosensing Applications. **Biosensors**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 500, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bios12070500>. Acesso em: 30 out. 2024.

OSTERNE, Vinicius Jose Silva *et al.* Structural characterization of a lectin from *Canavalia virosa* seeds with inflammatory and cytotoxic activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 94, Pt A, p. 271–282, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.10.020>. Acesso em: 04 nov. 2024.

PAL, Mia Michaela. Glutamate: The Master Neurotransmitter and Its Implications in Chronic Stress and Mood Disorders. **Frontiers in Human Neuroscience**, [s. l.], v. 15, p. 722323, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnhum.2021.722323>. Acesso em: 25 nov. 2024.

PARTIN, Kathryn *et al.* Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainate receptors by cyclothiazide and concanavalin A. **Neuron**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1069–1082, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90220-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90220-1). Acesso em: 17 out. 2024.

PEREIRA, Erica Patricia Lima *et al.* *Amburana cearensis* seed extracts protect PC-12 cells against toxicity induced by glutamate. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 199–205, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.010>. Acesso em: 15 set. 2024.

PRASANSUKLAB, Anchalee; BRIMSON, James; TENCOMNAO, Tewin. Potential Thai medicinal plants for neurodegenerative diseases: A review focusing on the anti-glutamate toxicity effect. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 301–308, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2020.03.003>. Acesso em: 29 out. 2024.

RANGEL, Thaiz Batista Azevedo *et al.* Crystal structure of a pro-inflammatory lectin from the seeds of *Dioclea wilsonii* Standl. **Biochimie**, [s. l.], v. 94, n. 2, p. 525–532, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.001>. Acesso em: 02 out. 2024.

RIEGER, Débora Venske *et al.* Antidepressant-like effect of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) lectin in mice: evidence for the involvement of the glutamatergic system. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, [s. l.], v. 122, p. 53–60, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.03.008>. Acesso em: 08 mar. 2025.

ROCHA, Bruno Anderson Matias Da *et al.* Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie**, [s. l.], v. 93, n. 5, p. 806–816, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.01.006>. Acesso em: 16 set. 2024.

SANTOS, Ana Lúcia Estevam dos *et al.* Purification and biophysical characterization of a mannose/N-acetyl-d-glucosamine-specific lectin from *Machaerium acutifolium* and its effect on inhibition of orofacial pain via TRPV1 receptor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 664, p. 149–156, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.009>. Acesso em: 24 jun. 2024.

SANTOS, Valdenice Ferreira Dos *et al.* Enhanced antibacterial activity of the gentamicin against multidrug-resistant strains when complexed with *Canavalia ensiformis* lectin. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 152, p. 104639, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104639>. Acesso em: 29 set. 2024.

SATARKER, Sairaj *et al.* Astrocytic Glutamatergic Transmission and Its Implications in Neurodegenerative Disorders. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1139, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells11071139>. Acesso em: 17 dez. 2024.

SIEW, Jian Jing; CHERN, Yijuang. Microglial Lectins in Health and Neurological Diseases. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 11, p. 158, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00158>. Acesso em: 06 out. 2024.

SOUZA TEIXEIRA, Claudener *et al.* Crystal structure of the lectin of *Camptosema pedicellatum*: implications of a conservative substitution at the hydrophobic subsite. **Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 152, n. 1, p. 87–98, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jb/mvs047>. Acesso em: 02 jan. 2025.

SOUZA, Larissa Alves Lopes De *et al.* JcTI-PepI, a synthetic peptide bioinspired in the trypsin inhibitor from *Jatropha curcas*, presents potent inhibitory activity against *C. krusei*, a neglected pathogen. **Biochimie**, [s. l.], v. 200, p. 107–118, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.05.014>. Acesso em: 05 nov. 2024.

SUMNER, James Batcheller. The globulins of the jack bean, *Canavalia ensiformis*: preliminary paper. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 37, p. 137, 1919. Disponível em: <https://digitalcommons.rockefeller.edu/pamphlets-offprints-and-reprints/47>. Acesso em: 09 out. 2024.

THALHAMMER, Agnes; EVERTS, Inga; HOLLMANN, Michael. Inhibition by lectins of glutamate receptor desensitization is determined by the lectin's sugar specificity at kainate but not AMPA receptors. **Molecular and Cellular Neurosciences**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 521–533, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1137>. Acesso em: 17 dez. 2024.

TOMINAMI, Kanako *et al.* Physical Stimulation Methods Developed for *In Vitro* Neuronal Differentiation Studies of PC12 Cells: A Comprehensive Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 772, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms25020772>. Acesso em: 20 fev. 2025.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, [s. l.], v. 31, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>. Acesso em: 01 ago. 2024.

UDDIN, Md Sahab *et al.* Molecular Insight into the Therapeutic Promise of Flavonoids against Alzheimer's Disease. **Molecules** (Basel, Switzerland), [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1267, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25061267>. Acesso em: 13 set. 2024.

ULLAH, Asad *et al.* Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. **Molecules** (Basel, Switzerland), [s. l.], v. 25, n. 22, p. 5243, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25225243>. Acesso em: 28 out. 2024.

VAN DAMME, Els. 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine. **Glycoconjugate Journal**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 83–97, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10719-021-10015-x>. Acesso em: 18 set. 2024.

VERMA, Manish; LIZAMA, Britney; CHU, Charleen. Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. **Translational Neurodegeneration**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 3, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00278-7>. Acesso em: 16 set. 2024.

WADHWA, Karan *et al.* Mechanistic Insights into the Pharmacological Significance of Silymarin. **Molecules** (Basel, Switzerland), [s. l.], v. 27, n. 16, p. 5327, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27165327>. Acesso em: 07 out. 2024.

WAKULIK, Karolina *et al.* Effect of Novel Pyrrolo[3,4-d]pyridazinone Derivatives on Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 2575, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21072575>. Acesso em: 03 nov. 2024.

WANG, Ke *et al.* Neuroprotective Effect of Puerarin on Glutamate-Induced Cytotoxicity in Differentiated Y-79 Cells via Inhibition of ROS Generation and Ca⁽²⁺⁾ Influx. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 1109, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms17071109>. Acesso em: 29 jul. 2024.

WIATRAK, Benita *et al.* PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 958, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells9040958>. Acesso em: 13 nov. 2024.

WILLARD, Stacey; KOOCHKPOUR, Shahriar. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. **International Journal of Biological Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 948–959, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijbs.6426>. Acesso em: 15 set. 2024.

WORKU, Beniam; TOLOSSA, Nafyad. A Review on the Neuroprotective Effect of *Moringa oleifera*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2024, p. 7694516, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2024/7694516>. Acesso em: 10 jan. 2025.

XIE, Danni *et al.* The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 15, p. 1016559, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1016559>. Acesso em: 23 nov. 2024.

ZHANG, Dongyang; HUA, Zhongyan; LI, Zhijie. The role of glutamate and glutamine metabolism and related transporters in nerve cells. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. e14617, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/cns.14617>. Acesso em: 05 jan. 2025.

ZHANG, Yan; CHU, John-Man-Tak; WONG, Gordon-Tin-Chun. Cerebral Glutamate Regulation and Receptor Changes in Perioperative Neuroinflammation and Cognitive Dysfunction. **Biomolecules**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 597, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biom12040597>. Acesso em: 18 out. 2024.

ZHAO, Xiangli *et al.* New Insight into the Concanavalin A-Induced Apoptosis in Hepatocyte of an Animal Model: Possible Involvement of Caspase-Independent Pathway. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 1312, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28031312>. Acesso em: 16 nov. 2024.

APÊNDICE A - DADOS SUPLEMENTARES

Figura Suplementar 1 - Purificação da lectina ConA. (A) = Cromatograma obtido por cromatografia de afinidade em Sephadex G-75. PI representa as proteínas não retidas, enquanto PII representa as proteínas retidas. Glicina 0,1 M pH 2,6 foi utilizada como tampão de eluição. (B) = Análise de SDS-PAGE da ConA. L1: Marcadores de peso molecular (kDa): albumina sérica bovina (66), ovalbumina (45), tripsinogênio (24), inibidor de tripsina (20), α -lactalbumina (14). L2: Cadeias da lectina ConA: α 25 kDa, β 16 kDa e γ 12 kDa.

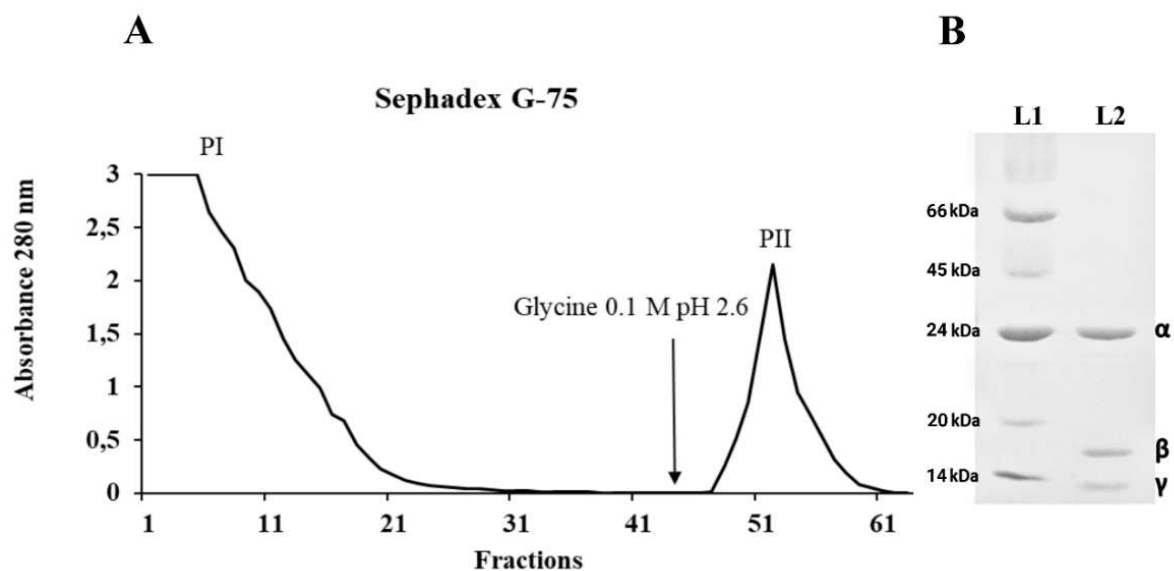


Figura Suplementar 2 - Sítio de ligação a metais (MBS). Representação esquemática do sítio de ligação a metais, ilustrando a coordenação de um íon magnésio (vermelho) e um íon cálcio (verde) por resíduos específicos de aminoácidos. O magnésio é coordenado com duas moléculas de água e os resíduos Glu8, Asp10, Asp19 e His24. O cálcio interage diretamente com Asp10, Tyr12, Asp19 e Arg228, e indiretamente com Asn14 e Asp208 por meio de ligações de hidrogênio mediadas por água.

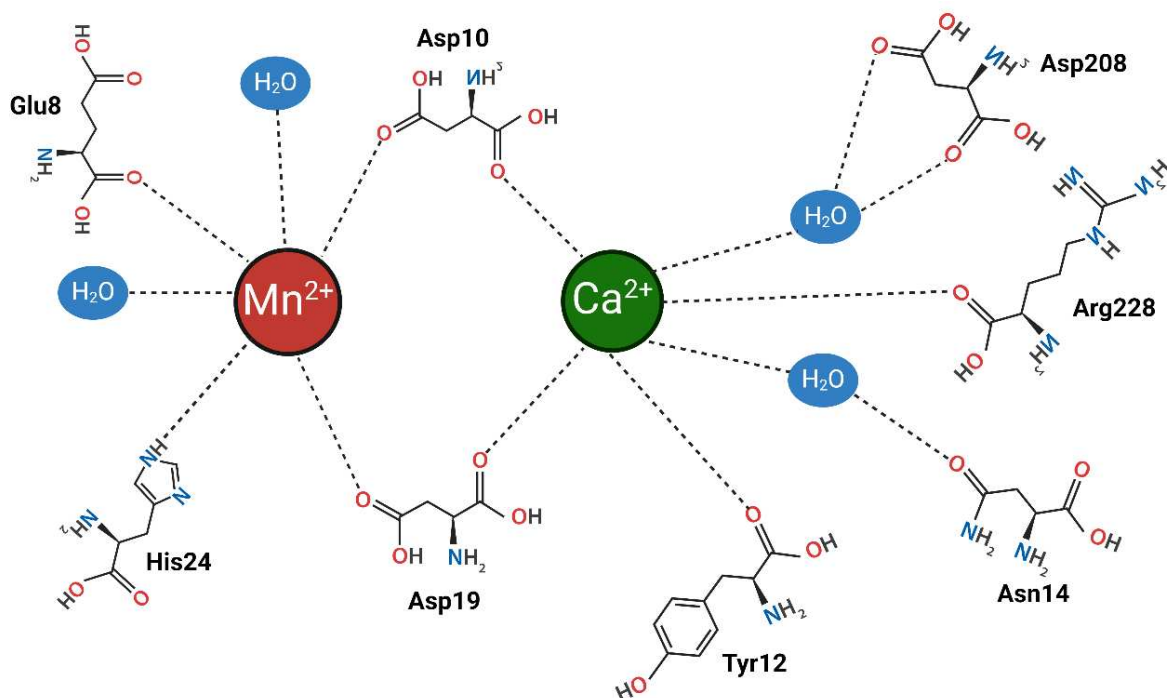


Figura Suplementar 3 - A sequência de eventos que valida nossas hipóteses, detalhando o efeito neuroprotetor *in vitro* da ConA e sua interação com o glutamato via o sítio de ligação de aminoácidos.

