



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

CLÁUDIO HENRIQUE DAHNE DE SOUZA FILHO

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA LECTINA DE *Canavalia*
brasiliensis (ConBr) COM O SISTEMA xc-**

Florianópolis
2022

CLÁUDIO HENRIQUE DAHNE DE SOUZA FILHO

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA LECTINA DE *Canavalia
brasilensis* (ConBr) COM O SISTEMA xc-**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Rodrigo Bainy Leal, Dr.

Coorientador: Vanir Reis Pinto Júnior, Dr.

Florianópolis

2022

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

Dahne Souza Filho, Cláudio Henrique
AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA LECTINA DE
Canavalia brasiliensis (ConBr) COM O SISTEMA xc- / Cláudio
Henrique Dahne Souza Filho ; orientador, Rodrigo Bainy
Leal, coorientador, Vanir Reis Pinto Júnior, 2022.
75 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Lectinas. 3. Sistema xc-. 4.
Ferroptose. 5. Bioinformática. I. Bainy Leal, Rodrigo. II.
Reis Pinto Júnior, Vanir. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV.
Título.

CLÁUDIO HENRIQUE DAHNE DE SOUZA FILHO

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO DA LECTINA DE *Canavalia
brasilensis* (ConBr) COM O SISTEMA xc-**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Rodrigo Bainy Leal, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Guilherme Razzera Maciel, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Vinícius José da Silva Osterne, Dr.

Ghent University

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Bioquímica

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Prof. Rodrigo Bainy Leal, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2022

AGRADECIMENTOS

Meus principais agradecimentos em relação à condução deste trabalho são direcionados ao Vanir. Não tenho palavras para te agradecer por toda a orientação desde a graduação até agora. Muito obrigado por tudo! Não só pelos ensinamentos, mas também pela amizade e companheirismo.

Meus imensos agradecimentos à minha família, especialmente minha mãe, minha irmã e minhas tias. Muito obrigado por todo o amor durante esses dois anos de pandemia, e por sempre acreditarem em mim e contribuírem com palavras de apoio. Meus agradecimentos especiais, em relação à família, para meus dois anjos da guarda: meu gatinho Chelsie, pelo amor e pela companhia em vários momentos não só de trabalho, como da vida, e minha avó Tânia, que sempre se mostrou mais entusiasmada do que eu mesmo em relação à profissão que eu escolhi e sempre demonstrou orgulho de mim. Sempre irei amar e lembrar de vocês dois.

À minha namorada, Julianna, muito obrigado por todo o carinho, amor, companhia e compreensão durante todo o tempo. Eu tenho muita sorte e sou muito grato em te ter do meu lado sempre. Muito obrigado pelo apoio incondicional.

Aos meus queridos ex-companheiros de laboratório e amigos do BioMol-Lab, em especial Messias e Cláudia. Muito obrigado, acima de tudo, pela amizade de vocês!

Aos meus dois queridos amigos e colegas do *clube da Tainha*. Muito obrigado, Rodrigo e Laís, por terem me acolhido tão bem em Florianópolis e por terem feito esse semestre ter sido tão show. Sempre irei lembrar de vocês com extremo carinho e espero que possamos nos reencontrar logo.

Aos meus queridos amigos e colegas do PPG-BQA, em especial a Karol, a Melânia e o Pedro: muito obrigado pela companhia!

Meus agradecimentos à banca, composta pelo Vinícius e pelo prof. Guilherme Razzera, por terem aceitado o convite de forma tão rápida!

Ainda sobre acolhimento e estadia em Florianópolis, eu não podia deixar de falar da Rosângela e dos meus 3 amiguinhos felinos: Tom, Luna e, especialmente a Mel. Muito obrigado por terem me feito companhia em todos esses meses e terem deixado minha estadia extremamente mais agradável!

Meus vários agradecimentos ao prof. Rodrigo, por ter aceitado me orientar, ter-me dado conselhos valiosos ao longo de todo esse percurso e por seu entusiasmo contagiante.

Agradeço aos profs. Benildo e Kyria pela permissão e uso das instalações do BioMol-Lab para condução de boa parte deste trabalho.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado, que permitiu que esse trabalho tenha sido realizado, e à Universidade Federal de Santa Catarina.

E, claro, obrigado a absolutamente todas e todos que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

RESUMO

O sistema x_c^- é um trocador de cistina/glutamato, responsável pela oferta intracelular de cisteína para síntese de glutathione, um tripeptídeo fundamental para a atividade de diversos sistemas antioxidantes. Esse sistema é formado por duas subunidades: uma cadeia leve conhecida como proteína transportadora xCT (SLC7A11) e uma cadeia pesada altamente glicosilada, a proteína CD98 (SLC3A2 ou 4F2hc). O sistema x_c^- é hiperexpresso em linhagens de glioma, contribuindo para a sua sobrevivência. Por apresentar uma das subunidades glicosilada, esse sistema pode ser um potencial alvo de lectinas vegetais. A inibição desse transportador pode acarretar morte celular por ferroptose, um tipo de morte celular não-apoptótica associada à lipoperoxidação, que pode ser explorada para contornar a resistência de células tumorais à apoptose. Assim, o principal objetivo deste trabalho consistiu em avaliar, por meio de ferramentas *in silico*, a interação entre a lectina das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) com esse sistema, a fim de observar se ocorrem modificações estruturais que possam impactar sua função. Foram realizadas simulações de dinâmica molecular, docking molecular e modelagem molecular por homologia a fim de tentar alcançar os objetivos. Observou-se que, no sistema em interação com ConBr, os resíduos que compõem o sítio de interação com o glutamato apresentaram valores de flutuação quadrática média (RMSF) cerca de duas vezes maiores que no sistema controle. O sistema em interação com ConBr também apresentou um valor de comprimento da cavidade cerca de cinco vezes menor que o do sistema nativo. Com base nos parâmetros de avaliação estrutural da trajetória de dinâmica molecular, no cálculo do comprimento da cavidade do transportador e na modificação de orientação causada nos resíduos que compõem a cavidade, nós concluímos que a ConBr tem potencial de causar inibição do transportador. Ensaios experimentais, utilizando linhagens celulares que expressam o sistema x_c^- , serão necessários a fim de confirmar nossos achados.

Palavras-chave: Lectinas. Sistema x_c^- . Ferroptose.

ABSTRACT

The x_c^- system is a cystine/glutamate exchanger, responsible for maintaining intracellular levels of cysteine for the synthesis of glutathione, a tripeptide essential for cellular antioxidant processes. This system is formed by two subunits: a light chain known as the transporter protein xCT (SLC7A11) and a heavy chain, the protein CD98 (SLC3A2 or 4F2hc) that is highly glycosylated. The x_c^- system is overexpressed in glioma cell lines, contributing to their survival. Noteworthy, as it presents one subunit glycosylated, this system may be a potential target for plant lectins. Inhibition of this transporter can lead to cell death by ferroptosis, a type of non-apoptotic cell death associated with lipid peroxidation, which can be exploited to circumvent the resistance of tumor cells to apoptosis. Thus, the main objective of this work was to evaluate, using *in silico* tools, the interaction between the lectin of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) seeds with this system in order to observe if there are structural changes that may impact its function. It has been observed that in the system interacting with ConBr the residues that make up the site of interaction with glutamate showed root mean square fluctuation (RMSF) values about twice as high as in the control system. The system interacting with ConBr also presented a cavity length value about five times smaller than the native system. Based on the evaluation of structural parameters of the molecular dynamics trajectory, the measurement of the carrier cavity length and the modification of orientation caused in the residues that compose the cavity, we conclude that ConBr has the potential to cause inhibition of this transporter. Experimental assay, using cell lines expressing the x_c^- system, will be necessary to confirm our findings.

Keywords: Lectins. X_c^- system. Ferroptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional do sistema xc- elucidada por crioeletromicroscopia (PDB: 7P9V).....	21
Figura 2 - Representação esquemática das hélices transmembrana, indicadas por números, que constituem a cadeia leve do sistema xc-.....	22
Figura 3 - Figura 3. Representação esquemática de um dos resíduos glicosilados da proteína CD98 (PDB: 7P9V).....	23
Figura 4 - Representação esquemática do funcionamento do sistema xc-.....	24
Figura 5 - Os três processos fundamentais para desencadear ferroptose.....	26
Figura 6 - Representação esquemática dos glicanos testados.	32
Figura 7 - Modelo de ConBr escolhido como representativo neste trabalho	36
Figura 8 - Alinhamento do modelo ConBr (verde) x ConA (azul)	37
Figura 9 - Modelo escolhido como representativo da modelagem do sistema xc-.....	39
Figura 10 - Sistema xc- modelado em verde e sistema xc- nativo por crioeletromicroscopia em azul (PDB: 7P9V).....	40
Figura 11 - Modelo mutado (PDB 7CCS) em alinhamento com a estrutura nativa obtida por crioeletromicroscopia (PDB: 7P9V)	41
Figura 12 - Alinhamento de diferentes membros da família LAT.....	42
Figura 13 - Representação esquemática do N-glicano MAN7 escolhido por docking molecular.	45
Figura 14 - Representação de ConBr em interação com o N-glicanos escolhido, ligado ao resíduo Asn381.....	46
Figura 15 - Representação da montagem do sistema xc- inserido na membrana	49
Figura 16 - Representação de ConBr em interação com um dos glicanos após o sistema ter sido montado em membrana	50

Figura 17 - RMSD de xCT para os dois sistemas	51
Figura 18 - RMSD de CD98 para os dois sistemas	52
Figura 19 - Frequência de contatos por ligações de hidrogênio formados entre ConBr e o glicano alvo presente na proteína CD98	53
Figura 20 - Gráfico de RMSF de xCT para os dois sistemas	54
Figura 21 - Gráfico de RMSF de CD98 para os dois sistemas.....	55
Figura 22 - Gráfico de RMSF para os resíduos que compõem a cavidade de interação com o glutamato nos dois sistemas.....	56
Figura 23 - Gráfico de raio de giro (RoG) de xCT para os dois sistemas.....	57
Figura 24. Gráfico de raio de giro (RoG) de CD98 para os dois sistemas	57
Figura 25 - Gráfico de energia total em função do raio de giro para os dois sistemas	58
Figura 26 - Delimitação da cavidade de interação com o glutamato pelo CaverWeb.	59
Figura 27 - Comparação do comprimento da cavidade de interação com o glutamato nos diferentes sistemas.....	60
Figura 28 - Representação em superfície da proteína xCT, evidenciando a cavidade de interação com o glutamato.....	60
Figura 29 - Representação do sítio de interação da erastina	61
Figura 30 - Representação dos resíduos que compõem o sítio de interação com o glutamato, representado em roxo.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de avaliação de qualidade estrutural do modelo de ConBr gerado	37
Tabela 2 - Parâmetros de avaliação para o docking molecular em unidades numéricas arbitrárias.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BSO - butionina sulfoximina
- CEM - crio-eletromicroscopia
- ConBr - lectina das sementes de *Canavalia brasiliensis*
- CRD – domínio de reconhecimento a carboidratos
- GM - glioblastoma multiforme
- GSH - glutationa reduzida
- IDH1/2 - isocitrato desidrogenase 1 ou 2
- MBS – sítio de ligação a metais
- RMSD – desvio quadrático médio
- RMSF – flutuação quadrática média
- ROG - raio de giro
- TAE/EAT - epilepsia associada ao tumor
- TERT - transcriptase reversa da telomerase

LISTA DE SÍMBOLOS

-  N-acetil-glicosamina
-  Galactose
-  Manose
-  Fucose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1. Gliomas.....	18
2.2. Gliomas, convulsões e excitotoxicidade	19
2.3. Sistema xc-	21
2.4. A indução de ferroptose como estratégia antitumoral.....	25
2.5. Lectinas	27
2.6. ConBr e envolvimento com o sistema xc-.....	29
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVO GERAL	29
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1. Modelagem molecular de ConBr em interação com glicanos complexos	30
4.2. Modelagem molecular de xc ⁻	31
4.3. Docking molecular de ConBr com glicanos.....	31
4.4. Dinâmica molecular de ConBr com sistema xc-.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Avaliação da qualidade dos modelos gerados por MMH	35
5.2. Avaliação da interação de ConBr com carboidratos por meio de docking molecular.....	43
5.3. Montagem do sistema e dinâmica molecular do sistema xc-	48
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	63
7. REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

Os cânceres constituem uma das principais causas de morte a nível global sendo, atualmente, o principal problema de saúde pública no mundo, e a sua incidência e mortalidade vêm crescendo devido a uma série de fatores, como o envelhecimento populacional maior, além de mudanças na prevalência e distribuição dos fatores de risco. Estimou-se, para o triênio 2020-2022, que haveria cerca de 625 mil novos casos de câncer no Brasil, em que os mais frequentes seriam os de próstata para homens, de mama para mulheres, e cólon e reto para ambos os sexos (INCA, 2020). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os cânceres contabilizam anualmente aproximadamente 9 milhões de mortes no mundo (MATTIUZZI; LIPPI, 2019).

Dentre os cânceres de pior prognóstico, destacam-se os tumores encefálicos, mais especificamente os glioblastomas, tumores altamente agressivos e que acarretam um péssimo prognóstico aos pacientes, de forma que apenas 4,7% desses sobrevivem mais do que 5 anos após o diagnóstico. Apesar de existir tratamento farmacológico, o benefício clínico é limitado, visto que esses tumores apresentam elevado grau de resistência aos quimioterápicos tradicionalmente utilizados, como os agentes alquilantes (LANG *et al.*, 2021). Dessa forma, prospectar moléculas que consigam contornar essa resistência seria de grande interesse clínico, especialmente moléculas que desencadeiem outros tipos de morte celular além da apoptose – processo de morte o qual as células de câncer tradicionalmente apresentam resistência (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Neste trabalho, foi avaliado a capacidade de uma lectina vegetal modular o sistema de captura de cistina em troca de glutamato, sistema xc⁻, que é essencial para a manutenção dos níveis intracelulares de glutathione. Assim, de maneira indireta, o estudo visa determinar o possível papel que uma lectina vegetal poderia ter na indução de um tipo de morte celular não-apoptótica: a ferroptose, que é desencadeada pelo acúmulo intracelular de lipoperóxidos quando o sistema antioxidante da célula está prejudicado (DIXON *et al.*, 2012). As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que reconhecem carboidratos livres ou glicoconjugados na superfície de células e, ao fazê-lo, podem disparar respostas celulares, como a indução de morte celular em células tumorais, como já foi documentado para diversas lectinas (BHUTIA *et al.*, 2019).

Os gliomas podem hiperexpressar um transportador, chamado xCT, que importa cistina em troca de glutamato, estando envolvido na resistência dessas células ao estresse oxidativo e à terapia farmacológica (DIGOMANN; LINGE; DUBROVSKA, 2019). Esse transportador se associa com uma glicoproteína de membrana, chamada CD98, que é necessária para o funcionamento da xCT. Por apresentar glicosilações, CD98 pode representar um potencial alvo para lectinas. A associação entre essas duas proteínas de membrana é chamada de sistema xc⁻. A inibição farmacológica desse sistema acarreta queda dos níveis de glutatona intracelular, levando a prejuízo dos sistemas antioxidantes celulares, sendo um dos mecanismos indutores de ferroptose (LIU; XIA; HUANG, 2020).

Dessa forma, investigamos neste trabalho, por meio de ferramentas *in silico*, a interação da lectina das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) com glicoconjugados da proteína CD98. Com isso, pretendemos avaliar se essa lectina possui potencial para modificar a atividade de um transportador envolvido com a proteção das células contra o estresse oxidativo e cuja inibição acarreta um processo de morte celular conhecido como ferroptose.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Gliomas

Dentre os diversos tipos de cânceres, os tumores encefálicos malignos destacam-se entre os de pior prognóstico, pois afetam de maneira direta a qualidade de vida do paciente e sua função cognitiva. Desses, os gliomas malignos são o tipo mais comum, representando 30% de todos os tumores cerebrais primários e 80% dos tumores cerebrais malignos (WELLER *et al.*, 2015). Em 2016, a OMS revisou o sistema de classificação dos gliomas, levando em consideração tanto características histológicas quanto moleculares. De maneira geral, histologicamente, esses tumores podem ser classificados como astrocitomas, oligoastrocitomas, oligodendrogliomas e glioblastomas (LOUIS *et al.*, 2016).

O glioblastoma é caracterizado, histologicamente, por ter um elevado número de células e atividade mitótica, alta proliferação vascular e necrose. Devido ao fato de, nesses tumores, ser muito comum a variação em tamanho e formato das células, esses cânceres são também denominados de glioblastoma multiforme (GM). O GM é um tumor altamente invasivo, sendo comum sua infiltração nos arredores do parênquima encefálico, apesar de se manterem no sistema nervoso central e não entrarem em processo de metástase (DOLECEK *et al.*, 2012).

De acordo com a classificação mais recente da OMS, diversos marcadores moleculares são levados em consideração para distinguir os diferentes tipos de glioma. Três biomarcadores de destaque são a enzima isocitrato desidrogenase 1 ou 2 (IDH1/2), mutações no promotor TERT (transcriptase reversa da telomerase) e uma codeleção 1p/19q. De acordo com a forma a qual esses marcadores se combinam, junto com a classificação histológica, os gliomas podem ser classificados em cinco principais grupos com características próprias de idade de início, comportamento clínico, alterações genéticas e mecanismos gerais de patogênese (DELGADO-LÓPEZ; CORRALES-GARCÍA, 2016; REIFENBERGER *et al.*, 2017).

Em relação à forma como o GM se caracteriza clinicamente, é comum a presença de dores de cabeça com padrões inespecíficos de dor, devido à pressão intracraniana aumentada. Dificuldades cognitivas e mudanças de

personalidade podem se desenvolver conjuntamente com doenças psiquiátricas ou demência, especialmente em indivíduos idosos. Em tumores maiores, relata-se incontinência e problemas motores, como o desequilíbrio de marcha, comum em doenças que afligem o sistema nervoso. Há sintomas também parecidos com aqueles presentes no acidente vascular encefálico, como a hemiparesia, perda sensorial ou problemas relacionados ao campo visual e dificuldade de comunicação associada à linguagem (DOLECEK *et al.*, 2012. DAVIS, 2016). Entretanto, entre as manifestações clínicas do GM, a que se apresenta de maneira mais frequente é a convulsão, afetando cerca de 25% a 50% dos pacientes (DAVIS, 2016).

2.2. Gliomas, convulsões e excitotoxicidade

Dentre as complicações mais comuns em pacientes com glioma, destacam-se os episódios convulsivos, estando presente em cerca de 88% dos pacientes com gliomas de baixo grau (grau II de acordo com a classificação histológica da OMS de 2007) e até 50% dos gliomas como um todo (LIUBINAS *et al.*, 2014). De acordo com a classificação histológica, as convulsões estão presentes em 60–100% dos astrocitomas, 70–100% dos oligoastrocitomas e em 61% dos oligodendrogliomas. Ainda, existe uma frequência geral de convulsões observadas em até 39–100% nos astrocitomas anaplásicos, 33% dos oligoastrocitomas anaplásicos e em 43–57% dos oligodendrogliomas anaplásicos (BEAUMONT; WHITTLE, 2000; SALMAGGI *et al.*, 2005) .

Assim, a epilepsia associada ao tumor (EAT) pode ser definida como convulsões que decorrem da presença de um glioma supratentorial. O controle desses episódios é de fundamental importância, especialmente naqueles pacientes que apresentam gliomas de baixo grau, pois são pacientes geralmente jovens, com possível alta expectativa de vida e sem outras condições neuropatológicas associadas, sendo o descontrole dessas convulsões o principal fator que causa prejuízo à sua qualidade de vida (LIUBINAS *et al.*, 2014).

Diversas explicações têm sido propostas a fim de explicar o desenvolvimento da EAT e, embora seja possivelmente algo multifatorial, diversas evidências apontam que uma das principais causas seja uma desregulação na homeostase glutamatérgica, uma vez que esse é o principal

neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central de mamíferos (SONTHEIMER, 2008)

As convulsões podem ser classificadas em diferentes tipos, sendo as chamadas tônico-clônicas e parciais complexas as mais proeminentes na EAT, onde esta acomete entre 16-36% dos pacientes, em média, enquanto aquela acomete 18-33% (LIUBINAS *et al.*, 2014). A principal estratégia de manejo clínico com relação às convulsões baseia-se na excisão cirúrgica do tumor, acompanhado de tratamento com antiepilépticos (RICARD *et al.*, 2012; VAN BREEMEN; WILMS; VECHT, 2007). Entretanto, essa abordagem farmacoterápica não apenas pode trazer efeitos adversos preocupantes, como esses efeitos são ainda maiores em pacientes que possuem tumores em comparação com aqueles que não possuem. Dentre esses efeitos, pode-se citar a erupção cutânea, náuseas, encefalopatia, disfunções hepáticas, mielossupressão, ataxia e dores na gengiva (GLANTZ *et al.*, 2000; LIUBINAS *et al.*, 2014). Nesse sentido, há a chamada “hipótese glutamatérgica” para o desenvolvimento da EAT.

Uma vez que, como já apontado, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central, a sua secreção em excesso pode desencadear um quadro chamado de excitotoxicidade, processo em que quantidades anormais desse neurotransmissor estão em excesso por conta de uma liberação acentuada ou de uma recaptação inadequada por astrócitos e neurônios (BELOV KIRDAJOVA *et al.*, 2020; GREEN; DOS SANTOS; FONTANA, 2021). Dessa forma, ocorre ativação prolongada de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, levando a um influxo de cálcio que sobrecarrega os níveis intracelulares desse íon, ocasionando morte celular. A excitotoxicidade, dessa forma, está por trás de uma série de doenças, como a doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica (ELA), acidente vascular encefálico, entre outros (LIUBINAS *et al.*, 2014; SONTHEIMER, 2008). Já foi demonstrado em modelos experimentais murinos que o nocaute da proteína xCT, envolvida na exportação de glutamato, tornava os animais menos suscetíveis ao desenvolvimento de convulsões (SATO *et al.*, 2005). Essa proteína se associa com uma glicoproteína (CD98), formando o sistema xc⁻, um

importante alvo não apenas para compostos anticonvulsivantes, mas também antitumorais.

2.3. Sistema x_c^-

O sistema x_c^- pertence à família SLC7 (*solute carrier 7*), que é composta por proteínas heterodiméricas que realizam transporte ativo secundário de aminoácidos (PARKER *et al.*, 2021). Essa família é subdividida em dois subgrupos: os transportadores de aminoácidos catiônicos (CATs) e os transportadores de L-aminoácidos (LATs) (FOTIADIS; KANAI; PALACÍN, 2013), grupo do qual o sistema x_c^- é integrante. Esse sistema é composto por duas proteínas que se associam por ligações dissulfeto: uma cadeia leve, que é também chamada de xCT ou de SLC7A11, e uma cadeia pesada, chamada de CD98hc, 4F2hc ou SLC3A2 (Fig. 1).

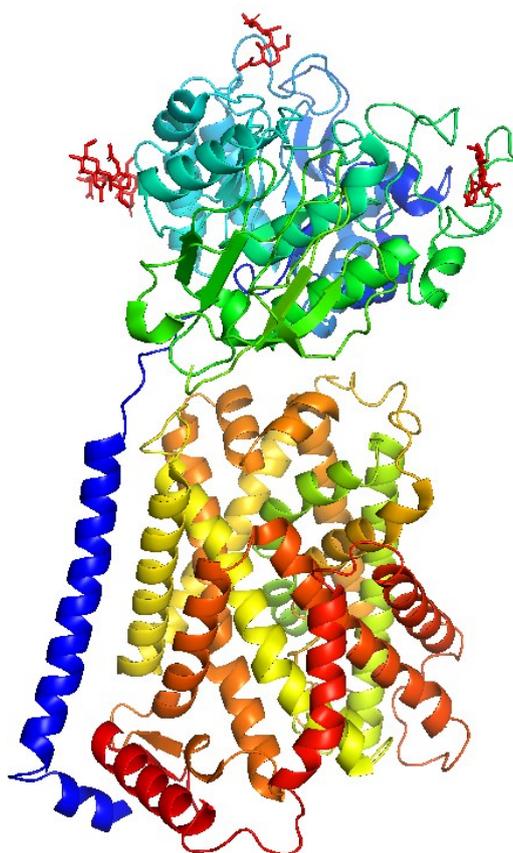


Figura 1. **Estrutura tridimensional do sistema x_c^- elucidada por crioeletromicroscopia (PDB: 7P9V).** O sistema x_c^- é constituído por duas proteínas: CD98/4F2hc/SLC3A2 (cadeia pesada) e xCT/SLC7A11 (cadeia leve), que se associam por ligações dissulfeto e por interações hidrofóbicas. A xCT é uma proteína integral de membrana e a CD98 é glicosilada e está voltada para o meio extracelular. As glicosilações da CD98 são representadas pelos carboidratos em cor vermelha na porção superior da imagem.

O sistema x_c^- consiste em um antiporte de cistina e glutamato de uma forma independente de sódio. Esse sistema capta cistina extracelular, trocando-a por glutamato intracelular em uma proporção de 1:1 (KOPPULA *et al.*, 2017). Em seres humanos, a cadeia leve é uma proteína transmembrana que atravessa a bicamada lipídica 12 vezes (Fig. 2), contendo tanto as extremidades amino quanto carboxiterminal localizadas na face citoplasmática. Por outro lado, a cadeia pesada é uma proteína com uma única passagem transmembrana com a sua extremidade N-terminal voltada para a face intracelular, enquanto o seu domínio C-terminal é extracelular e altamente glicosilado (KOPPULA; ZHUANG; GAN, 2021). São documentados quatro sítios de *N*-glicosilação para a CD98, localizados nos resíduos Asn365, Asn381, Asn424 e Asn506. Ainda que não se tenha informação sobre a constituição completa desses glicoconjugados, já se sabe que as cadeias se iniciam com dois resíduos de *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc). Uma representação de um desses resíduos pode ser visualizada na figura 3.

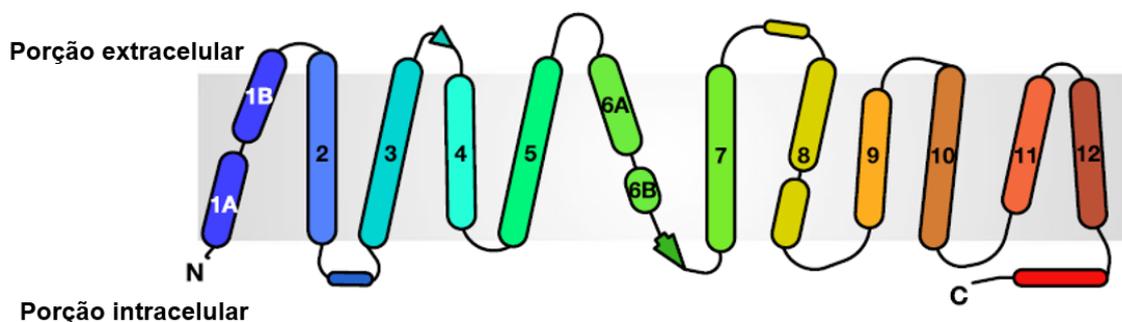


Figura 2. **Representação esquemática das hélices transmembrana, indicadas por números, que constituem a cadeia leve (xCT) do sistema x_c^- .** Adaptado de Parker *et al.* (2021).

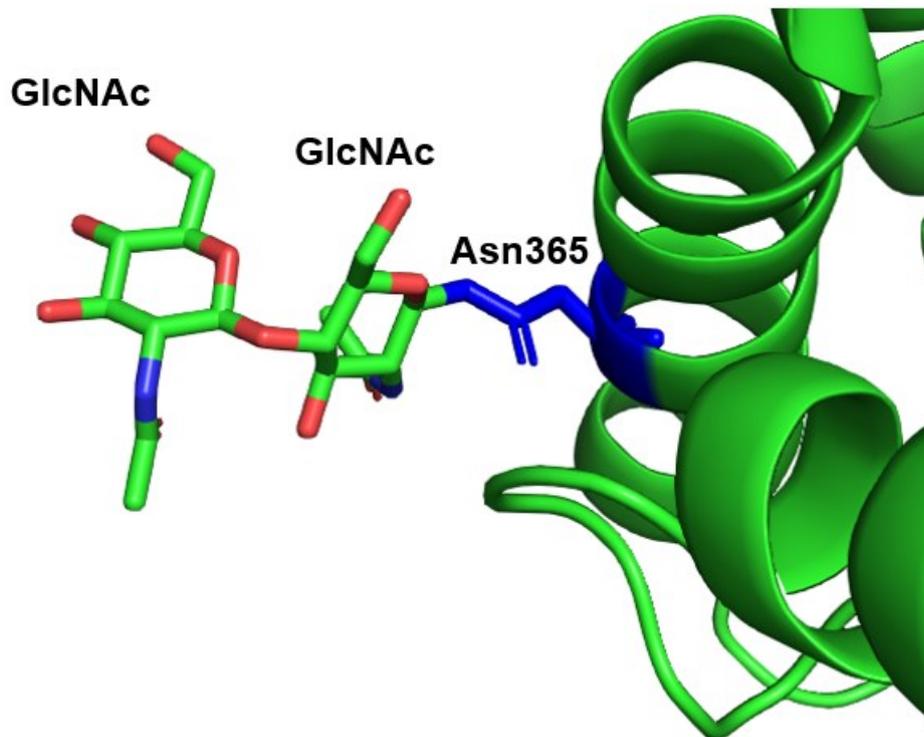


Figura 3. **Representação esquemática de um dos resíduos glicosilados da proteína CD98 (PDB: 7P9V).** Os quatro resíduos glicosilados da CD98 são de asparagina (Asn), representando *N*-glicosilações. O núcleo básico desses glicanos, que é conhecido experimentalmente, é formado por duas unidades de *N*-acetil-glicosamina (GlcNAc) ligadas.

A atividade adequada desse sistema requer as duas cadeias. A xCT é responsável pela função primária de transporte, sendo bastante específica tanto para cistina quanto para glutamato. As funções associadas à glicoproteína CD98 ainda são pouco compreendidas, mas já é conhecido que ela é necessária para a manutenção da atividade do transportador xCT na membrana, funcionando como uma proteína chaperona (FOTIADIS; KANAI; PALACÍN, 2013; MATSUO *et al.*, 2002; NAKAMURA *et al.*, 1999), além de estar envolvida na sinalização de integrinas (FERAL *et al.*, 2005), bem como na proliferação celular (CANTOR *et al.*, 2009).

Em relação ao seu papel biológico, esse sistema desempenha função fundamental em relação à homeostase redox, uma vez que está envolvido de maneira indireta na síntese de glutathiona (Fig. 4), por conta do transporte de cistina. Esse dipeptídeo é captado do meio extracelular, sendo rapidamente convertido a cisteína no ambiente celular altamente redutor. A cisteína, por sua vez, é utilizada como precursor limitante para a síntese do tripeptídeo glutathiona

(Cys-Glu-Gly), um potente antioxidante. Quando sintetizado na forma reduzida (GSH), em uma reação catalisada pela enzima glutationa sintetase, pode atuar como cofator de enzimas que catalisam reações de neutralização de espécies reativas de oxigênio, impedindo, portanto, o dano oxidativo (LEWERENZ, Jan *et al.*, 2013).

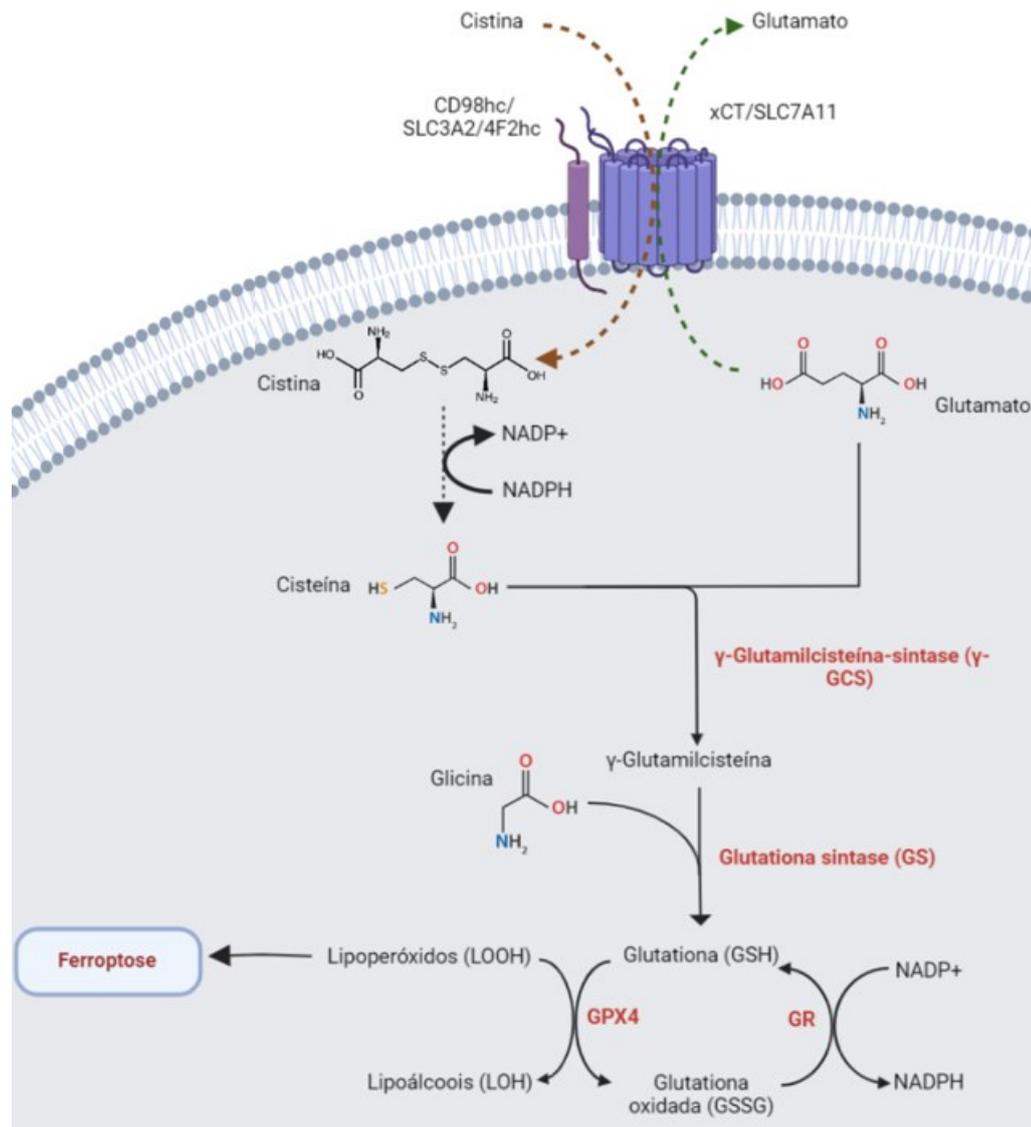


Figura 4. **Representação esquemática do funcionamento do sistema xc⁻.** O sistema xc⁻ consiste na união de duas proteínas: SLC7A11 e SLC3A2. O sistema funciona mediante a captação de cistina do meio extracelular com exportação de glutamato a partir do meio intracelular. A cistina é reduzida a cisteína, que junto com o glutamato e a glicina são utilizados como precursores para a síntese de glutationa, utilizada como coenzima para a glutationa peroxidase 4 (GPX4). GR – glutationa redutase. LOOH representam lipoperoxídeos que, quando acumulados, desencadeiam ferroptose, algo que será abordado mais adiante neste texto. Adaptado de Koppula *et al.* (2021) e criado no BioRender.

Devido a esse papel protetor frente ao estresse oxidativo, esse sistema torna-se fundamental para a sobrevivência de algumas linhagens de células de câncer e diversos trabalhos já relataram o seu papel protetor frente a vários tipos de estressores celulares. Diferentes trabalhos já documentaram que a hiperexpressão do transportador xCT tanto em linhagens celulares de neurônios como em linhagens tumorais permite que essas células apresentem resistência potencializada ao estresse oxidativo (BANJAC *et al.*, 2008; LEWERENZ, J. *et al.*, 2012; SHIH *et al.*, 2006), assim como já foi relatado que essa expressão aumentada permite que células tumorais apresentem elevada resistência frente ao tratamento com temozolamida ou cisplatina (OKUNO *et al.*, 2003; POLEWSKI *et al.*, 2016).

Portanto, o papel pró-sobrevivência que esse transportador desempenha é de tamanha importância que a sua inativação, seja por meio de ferramentas genéticas (YE *et al.*, 2014) ou farmacológicas (DIXON *et al.*, 2012), pode desencadear morte celular.

2.4. A indução de ferroptose como estratégia antitumoral

Por meio de uma série de estudos foi caracterizado que o bloqueio farmacológico do SLC7A11 causava um tipo de morte celular regulada e não-apoptótica que até então não havia sido descrita, chamada de ferroptose (DIXON *et al.*, 2012), que ocorre devido um acúmulo de lipídeos peroxidados (lipoperóxidos). Define-se que as três características marcantes que definem uma célula tumoral como sensível à ferroptose é a presença de fosfolipídeos oxidáveis contendo ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), a presença de ferro ativado (Fe^{2+}) e um defeito ou inibição das vias de reparo de lipoperóxidos (DIXON; STOCKWELL, 2019) (Fig. 5). A ferroptose pode ser inibida mediante a incubação de células com agentes antioxidantes lipofílicos, como a ferrostatina, liproxstatina ou trolox, que neutralizam os lipoperóxidos e previnem a propagação do dano oxidativo à membrana (ZILKA *et al.*, 2017).

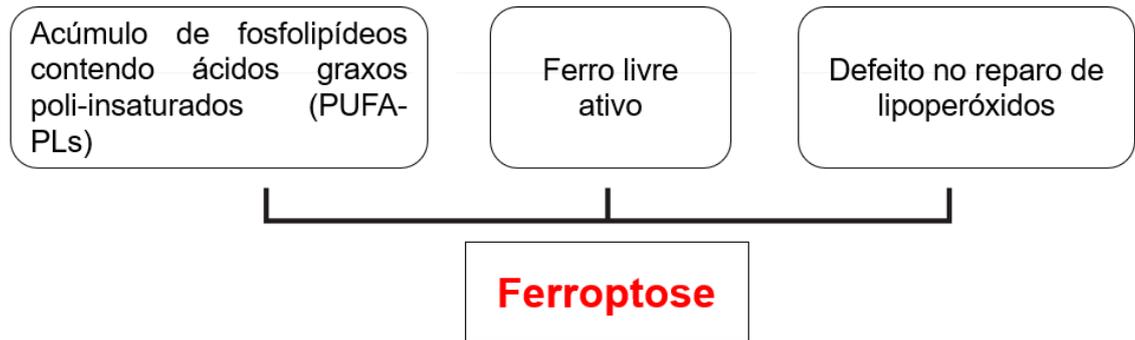


Figura 5. **Os três processos fundamentais para desencadear ferroptose.** Adaptado de Dixon & Stockwell (2019).

A participação do ferro nesse tipo de morte celular é fundamental pois o ferro livre ou enzimas lipoxigenases que utilizam ferro como cofator são responsáveis por catalisar as reações de oxidação dos PUFAs de membrana, levando à formação de lipoperóxidos. Inclusive, a ferroptose pode ser bloqueada por agentes quelantes de ferro, como ciclopirox ou deferoxamina (STOCKWELL *et al.*, 2017).

Em situações normais, a formação dos lipoperóxidos é controlada mediante um sistema de reparo enzimático, em que a peroxidase de fosfolípidos glutathione peroxidase 4 (GPX4), uma selenoenzima antioxidante que desempenha papel importante, pois converte hidroperóxidos lipídicos tóxicos (lipoperóxidos) em lipoálcoois não-tóxicos, utilizando a glutathione na forma reduzida para neutralizar essas espécies reativas (Fig. 4). Assim, já foi observado que tanto a deleção genética dessa enzima como a sua inibição farmacológica podem desencadear ferroptose, pois isso permite que haja o acúmulo de lipoperóxidos (STOCKWELL *et al.*, 2017).

Tendo em vista que a GPX4 depende de glutathione reduzida para o seu funcionamento, a sua concentração intracelular deve ser mantida em uma faixa adequada para regular a resposta antioxidante. Dessa forma, compostos como butionina sulfoximina (BSO) - inibidor da síntese de glutathione - e (1S,3R)-RSL3 – inibidor da GPX4 – podem ser utilizados para induzir ferroptose (DIXON; STOCKWELL, 2019). Por ser um tipo de morte celular regulada que pode ser induzida farmacologicamente, logo se cogitou a ideia de estimulá-la como ferramenta de supressão tumoral. A forma como isso pode ser alcançado se

baseia nas características marcantes – *hallmarks* – da ferroptose citados anteriormente.

A indução de ferroptose é uma estratégia particularmente promissora em tumores que apresentam resistência à apoptose, como é o caso dos gliomas, que adquirem esse fenótipo mediante respostas adaptativas ao estresse (FULDA, 2018; TREJO-SOL *et al.*, 2018), o que acarreta um prognóstico ruim ao tratamento quimioterápico, visto que a droga de primeira escolha é a temozolamida (TMZ), agente alquilante que causa rompimento de fita simples e dupla ao DNA durante a replicação, levando as células à apoptose (IAPAER *et al.*, 2018). Assim, já foi documentado que a indução de ferroptose pode reverter a resistência à quimioterapia (WU *et al.*, 2020). Sendo assim, a prospecção de moléculas que consigam induzir a ferroptose em linhagens tumorais é essencial e, dentro desse contexto, talvez as lectinas possam merecer destaque.

2.5. Lectinas

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que são capazes de reconhecer carboidratos de forma reversível e sem alterar sua estrutura, conseguindo realizar distinção entre diferentes cadeias de oligossacarídeos (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Apesar de essas moléculas serem ubíquas na natureza, estando presente em todos domínios da vida, serão consideradas neste trabalho apenas as lectinas vegetais e, dentro desse grupo, as lectinas de leguminosas (PEUMANS *et al.*, 2001).

Ao longo dos anos, as lectinas de leguminosas tornaram-se ferramentas indispensáveis no âmbito da pesquisa básica e aplicada, sendo investigadas tanto em relação à função que desempenham nas plantas quanto em relação ao seu potencial biotecnológico (TSANEVA; VAN DAMME, 2020). Já foram documentadas atividades antitumoral, inflamatória e nociceptiva, vasoativa, antibacteriana e antifúngica, mitogênica, imunomodulatória, inseticida, dentre outras para lectinas de leguminosas (CAVADA *et al.*, 2019a).

Essa família de lectinas é composta por protômeros de massa molecular aproximada de 30 kDa e com uma estrutura primária de 250 a 300 resíduos de aminoácidos por cadeia polipeptídica. Além disso, a maior parte dos representantes dessa família são glicoproteínas *N*-glicosiladas. A fim de que

essas lectinas consigam desempenhar o reconhecimento de carboidratos, seus monômeros possuem duas regiões de fundamental importância: o domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD, do inglês *carbohydrate recognition domain*) e um domínio de ligação a metais divalentes (MBS, do inglês *metal binding site*) (CAVADA *et al.*, 2019b).

Estruturalmente, os monômeros das lectinas de leguminosas possuem estrutura tridimensional bastante conservada, sendo caracterizados pelo motivo *jellyroll* ou β -sanduíche. Esse é formado por uma folha β plana, constituída por seis fitas na região posterior, que é interconectada por *loops* a uma outra folha β anterior, formada por sete fitas. Nessa estrutura, o CRD é formado por quatro *loops* presentes na porção superior (CAVADA *et al.*, 2019b).

A lectina de leguminosa que é objeto de estudo desse trabalho, ConBr, foi purificada pela primeira vez em 1979 e teve sua estrutura tridimensional elucidada por cristalografia de raios X em 1997 (PDB: 1AZD) (CAVADA *et al.*, 2019b). ConBr é altamente específica para manosídeos simples, glicose, α -metilmanosídeos e seus derivados. A interação dessa lectina com os carboidratos se dá por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre os resíduos que compõem o CRD - Asp14, Leu99, Tyr100, Gly98, Ala207, Aps208 e Arg228 - e os carboidratos. Além do CRD, um outro sítio importante para a atividade dessa lectina é o MBS; no qual o íon Mn^{2+} é coordenado pelos resíduos Glu8, Asp10, Asp19, His24 e duas moléculas de água, e o íon Ca^{2+} é coordenado pelos resíduos Asp10, Tyr12, Asn14, Asp19 e duas outras moléculas de água (CAVADA *et al.*, 2019b).

Desde a sua purificação, foram descobertos diversos efeitos biológicos que a ConBr pode desencadear, como efeito antidepressivo (BARAUNA *et al.*, 2006; RIEGER *et al.*, 2014), imunomodulador (BATISTA *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA SILVA *et al.*, 2011), anticonvulsivante (RUSSI *et al.*, 2012) e antiproliferativo em diferentes linhagens celulares tumorais (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014).

Para os propósitos deste trabalho, é importante salientar duas outras atividades biológicas que foram documentadas para essa lectina nos últimos dez anos. A primeira é a de neuroproteção frente à toxicidade induzida por glutamato em fatias hipocâmpais de camundongos (JACQUES *et al.*, 2013). Nesse artigo, documentou-se que a incubação de ConBr preveniu a redução da viabilidade

celular induzida por glutamato em excesso e diminuiu, também, a fosforilação da proteína Akt.

A segunda, tendo sido descrita recentemente, se refere à capacidade antitumoral seletiva frente a linhagens de glioma (WOLIN *et al.*, 2021). Nesse trabalho, foi identificado que a ConBr em baixas concentrações inibiu a migração celular de células de glioma C6 e desencadeou morte celular por autofagia, de uma forma dependente de seu CRD. Em relação às vias de sinalização investigadas, os autores observaram que ocorreu aumento nos níveis de fosforilação da proteína p38^{MAPK} e JNK, e que houve diminuição na fosforilação de ERK1/2 e Akt, além de inibição da fosforilação de mTORC1.

2.6. ConBr e envolvimento com o sistema xc⁻

Tendo em vista que ConBr pode desempenhar atividade antitumoral e neuroprotetora frente à excitotoxicidade glutamatérgica e que o sistema xc⁻ possui na sua constituição a glicoproteína CD98/4F2hc, altamente glicosilada, a pergunta central do presente trabalho foi se essa lectina pode interagir com esse sistema, modulando sua atividade.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar, a partir de simulações *in silico*, se a lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) pode levar a alterações estruturais que modulem a atividade do sistema xc⁻.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Realizar a modelagem molecular por homologia do sistema xc⁻ a partir das estruturas individuais das proteínas xCT e CD98 e avaliar a qualidade dos modelos gerados;

b) Realizar a modelagem molecular por homologia de ConBr utilizando modelos complexados com glicanos complexos e avaliar a qualidade dos modelos gerados;

c) Determinar os glicanos que serão utilizados no sistema, desenhá-los e inseri-los no modelo criado do sistema xc⁻;

d) Realizar *docking molecular* rígido de ConBr em interação com os glicoconjugados ligados à CD98;

e) Realizar simulações de dinâmica molecular do sistema xc⁻ livre e em associação com ConBr e avaliar a trajetória por meio de diversos parâmetros estruturais;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Modelagem molecular de ConBr em interação com glicanos complexos

Tendo em vista que não existe estrutura cristalográfica resolvida de ConBr em interação com glicanos complexos, utilizou-se a ferramenta de modelagem molecular por homologia, com base na lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) em interação com o glicano β -D-GlcNAc(1,2) α -D-Man-(1,6)[β -D-GlcNAc(1,2) α -D-Man(1,6)] α -D-Man (PDB: 1TEI). ConBr e ConA são proteínas homólogas com 99% de similaridade de sequência, em que só há a diferença de dois resíduos nas suas estruturas (CAVADA *et al.*, 2019b). O software utilizado foi o Modeller 10.1 (WEBB; SALI, 2016) e foram gerados 200 modelos a partir do modelo de ConA. Em seguida, foi realizada uma seleção onde os modelos com os melhores valores dos parâmetros molpdf e DOPE score foram escolhidos. Desses, foram escolhidos 10 modelos com os menores valores de forma proporcional e foram comparados frente a outros parâmetros de qualidade de estrutura proteica.

Os parâmetros avaliados foram o Verify3D, que determina a compatibilidade entre a estrutura tridimensional de uma proteína com a sua estrutura primária, atribuindo um valor com base em sua localização e ambiente, comparando o resultado com outras estruturas (LÜTHY; BOWIE; EISENBERG, 1992); PROCHECK, que analisa a qualidade estereoquímica de uma estrutura proteica, analisando as geometrias moleculares tanto da estrutura como um todo quanto de resíduo em resíduo (LASKOWSKI *et al.*, 1993); Z-score (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2010) e Q-MEAN (BENKERT; TOSATTO; SCHOMBURG, 2008), que fornecem uma estimativa do "grau de natividade" das características estruturais observadas em um modelo e descreve a probabilidade de que um

determinado modelo seja de qualidade comparável às estruturas experimentais. O modelo escolhido apresentou os melhores valores e foi utilizado para realizar o docking com os glicanos desenhados.

4.2. Modelagem molecular de xc⁻

O modelo escolhido foi o publicado por Oda *et al.* (2020), que trouxe a primeira estrutura tridimensional do complexo xCT/CD98, só que em uma versão mutada (PDB: 7CCS). Entretanto, por haver uma inconsistência em relação aos dados disponíveis no PDB, pois representavam a proteína na versão mutada, realizou-se o alinhamento das estruturas primárias das duas proteínas utilizando o *blastp* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) e escolhendo o banco de dados do UNIPROT (<https://www.uniprot.org/>) para obter as sequências nativas, não mutadas, das proteínas. As sequências de ambas as proteínas foram editadas, unindo as cadeias A (CD98) e B (xCT) em uma única estrutura de 923 resíduos de aminoácidos, mas cujo modelo tridimensional é representado pela versão mutada do complexo xc⁻ (PDB: 7CCS).

O próximo passo consistiu em realizar a modelagem molecular propriamente dita, seguindo o mesmo protocolo utilizado para a ConBr, realizando a seleção das estruturas geradas com base nos melhores valores dos parâmetros estruturais. Entretanto, devido à complexidade da estrutura gerada, esses valores foram insatisfatórios e, dessa forma, utilizou-se o servidor de minimização de energia do YASARA (KRIEGER *et al.*, 2009) para atingir valores ideais. Provavelmente, isso ocorreu por se tratar de uma proteína de membrana que não se encontrava em suas condições nativas quando modelada, nem mesmo o modelo de referência que continha mutações em sua estrutura. Em todas as sobreposições de modelos em que é mostrado valor de desvio quadrático médio (RMSD), este é baseado na estrutura proteica total.

4.3. Docking molecular de ConBr com glicanos

Os glicanos foram escolhidos com base no trabalho de Powlesland *et al.* (2009), que descreve *N*-glicanos presentes na proteína CD98 por meio de

espectrometria de massas. Os carboidratos escolhidos foram os de estrutura predita mais acurada, mais especificamente de acordo com seus valores de m/z : 1987, 2191, 2243, 2395, 2417, 2591, 2692, 2866, 3040, 3141, 3214, 3315, 3489 e 3664 (Fig. 6). Esses foram desenhados utilizando o *software* GLYCAM-Web (<https://glycam.org/>) e, posteriormente, realizou-se *docking* molecular entre ConBr e cada um desses carboidratos a fim de observar com qual deles ocorreria interação mais estável.

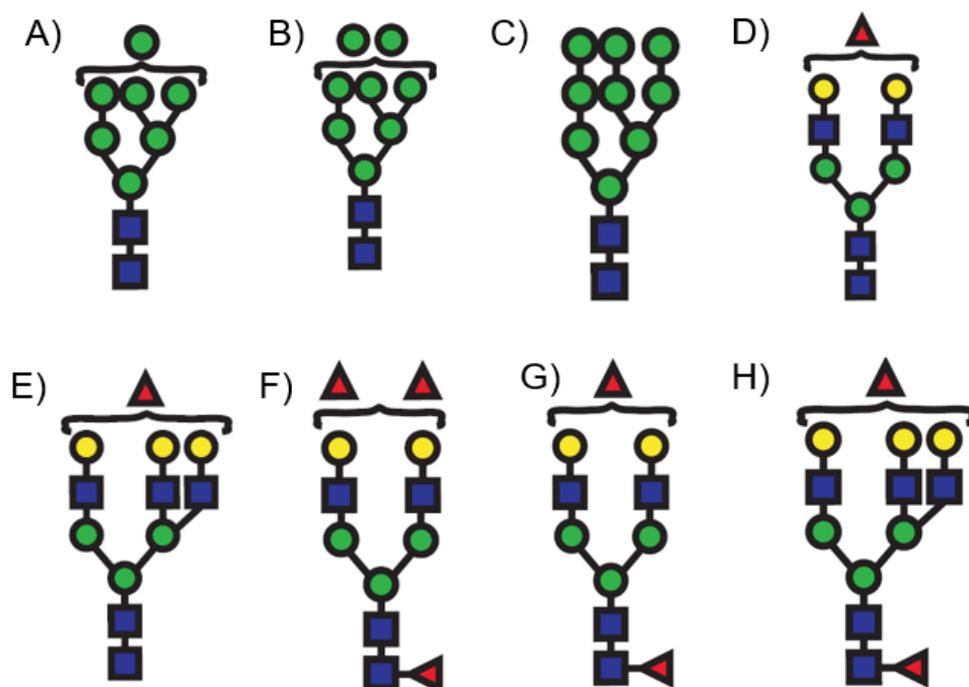


Figura 6. **Representação esquemática dos glicanos testados.** Esses carboidratos foram baseados no trabalho de Powlesland *et al.* (2009). A – m/z 1987; B – m/z 2191; C – m/z 2395; D – m/z 2243; E – m/z 2692; F – m/z 2591; G – m/z 2417; H – m/z 2866.

Após a escolha e desenho dos carboidratos, eles foram mimizados utilizando o campo de força GLYCAM_06 (KIRSCHNER *et al.*, 2008) e seguiu-se com o *docking* molecular entre a ConBr e estes. Para tal, utilizou-se o *software* GOLD v. 5.6.1. (CCDC, Cambridge, England) e as configurações foram ajustadas conforme as descritas no trabalho de Cavada *et al.* (2021). O domínio de reconhecimento a carboidratos de ConBr foi escolhido como o ponto para aplicação do algoritmo do programa em um raio de 12 Å. A função PLANTSPLP foi utilizada para o cálculo de escore do *docking* (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009). O melhor modelo foi escolhido levando em consideração a combinação

entre os valores de escore, de ligações de hidrogênio, de penalidades geométricas e de interações apolares (XAVIER et al., 2016; DE ÁVILA et al., 2017; HEBERLE; F. DE AZEVEDO, 2011; HECK et al., 2017). Após a realização do docking entre a ConBr e os glicoconjugados individualmente, escolheu-se o que teve uma melhor interação com essa proteína. *Docking* com o glicano presente no modelo de ConA, usado como referência, demonstrou que ConBr interagiu de forma semelhante.

O próximo passo consistiu em inserir o glicano escolhido na proteína CD98, em seus quatro sítios de glicosilação já descritos (365, 381, 424 e 506). Esse glicano foi escolhido para ser inserido no receptor pois apresentou uma boa interação com ConBr no *docking* e, além disso, apresentou boa abundância relativa dentre os outros glicanos potenciais para CD98 (POWLESLAND et al., 2009). Logo após, realizou-se o docking da ConBr com o sistema xc⁻. Por se tratar de um sistema envolvendo três proteínas diferentes, escolheu-se o software PATCHDOCK (DUHOVNY; NUSSINOV; WOLFSON, 2002; SCHNEIDMAN-DUHOVNY et al., 2005) para realizar docking rígido e o glicano ligado ao resíduo Asn381 da CD98 foi escolhido como alvo de interação com a ConBr, pois é o resíduo mais exposto e isso facilitaria a interação. Esse passo foi utilizado apenas para criar o sistema ConBr com xc⁻ e o resultante foi submetido ao preparo para a dinâmica molecular.

4.4. Dinâmica molecular de ConBr com sistema xc⁻

O modelo de xc⁻ obtido após minimização foi submetido à ferramenta *membrane builder* (JO et al., 2008) presente no CHARMM-GUI (LEE et al., 2020) para prepará-lo para dinâmica. Dois sistemas foram preparados: um correspondendo apenas ao sistema xc⁻ inserido na membrana e outro correspondendo a esse sistema em interação com ConBr,

A dinâmica foi realizada utilizando o *software* AMBER20 suite (CASE et al., 2020), com os parâmetros do campo de força ff19SB para proteínas (TIAN et al., 2020), GLYCAM_06j para os carboidratos (KIRSCHNER et al., 2008) e Lipid17 para os lipídeos (KLAUDA et al., 2010). As simulações foram realizadas durante o intervalo de tempo de 200 ns (20.000 *frames*). Durante o

preparo, o sistema xc⁻ foi inserido em um modelo de membrana plasmática, construída dentro da interface do próprio CHARMM-GUI. Os lipídeos escolhidos para compor a membrana foram colesterol (CHL) e os glicerofosfolipídeos fosfatidilserina (POPS), fosfatidiletanolamina (POPE) e fosfatidilcolina (POPC), por serem os lipídeos mais comuns em membranas de células eucariontes (VAN MEER; VOELKER; FEIGENSON, 2008). Para cada lipídeo desse, foram inseridas 40 moléculas na hemiface externa da membrana e 37 na hemiface interna. O sistema foi solvatado com o modelo de água TIP3P, com 10.000 moléculas de água, e foi neutralizado por adição de íons Na⁺ e Cl⁻

A minimização de energia para ambos os sistemas foi conduzida utilizando 8000 passos do método *steepest-descent* e 7000 passos de *conjugate gradient*, totalizando 15000 ciclos de minimização. Após a minimização, seguiu-se com 6 etapas de equilibrção, sendo uma metodologia seguida para modelos em membrana. As duas primeiras etapas foram realizadas em 250.000 passos NVT, a terceira também em 250.000 passos NVT, e da quarta à sexta foram feitas em 500.000 passos NVT. A temperatura de 300 K foi mantida utilizando o termostato de Langevin com um coeficiente de fricção de 1 ps⁻¹. O controle de pressão foi feito utilizando um barostato Berendsen semi-isotrópico para 1 bar com uma tensão superficial constante (BERENDSEN *et al.*, 1984). O algoritmo SHAKE foi utilizado para constrição das ligações covalentes envolvendo os átomos de hidrogênio (RYCKAERT; CICCOTTI; BERENDSEN, 1977). As interações eletrostáticas de longa distância foram calculadas pelo método *Particle Mesh Ewald* (PME) com um limiar de 10 Å (ESSMANN *et al.*, 1995).

Após a realização da dinâmica molecular dos dois sistemas, a análise da trajetória consistiu em avaliar os seguintes parâmetros: desvio quadrático médio (RMSD), flutuação quadrática média (RMSF), raio de giro (RoG), energia total do sistema, ligações de hidrogênio intermoleculares (HB) e frequência de contato (CF). Para essas análises foram utilizados Cpptraj (ROE; CHEATHAM, 2013), Xmgrace e VMD (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da qualidade dos modelos gerados por modelagem molecular

A tabela 1 mostra os valores dos parâmetros avaliados em relação à qualidade do modelo. Como explicado previamente, apesar de já haver estrutura tridimensional obtida a partir de cristalografia de raios-X de ConBr tanto sozinha quanto em interação com carboidratos, não há disponível estrutura da ConBr em interação com glicanos complexos, como os que se pretendia avaliar neste trabalho. O modelo representativo para a estrutura tridimensional de ConBr está representado na figura 7. Os valores estão condizentes com o que se espera para a modelagem de lectinas de leguminosas, como previamente documentado para as lectinas de *Centrolobium microchaete* (CML) (NECO *et al.*, 2018), de *Vatairea guianensis* (VGL) (CAVADA *et al.*, 2020), *Dioclea lasiophylla* (DlyL) (PINTO-JUNIOR *et al.*, 2017), *Arachis duranensis* e *Arachis ipaensis* (NASCIMENTO *et al.*, 2018). A sobreposição do modelo gerado com a estrutura de partida (ConA em interação com glicano complexo) apresentou elevado percentual de identidade e um baixo valor de RMSD (Fig. 8), sendo um outro representativo da qualidade do modelo gerado.

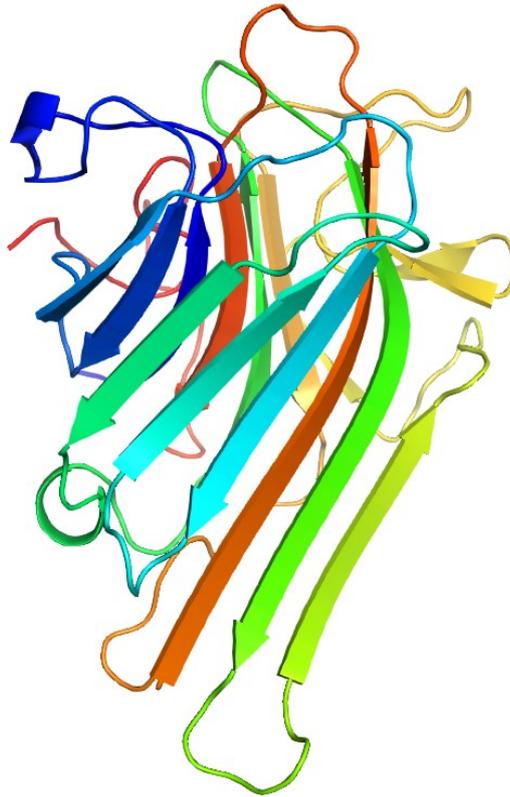


Figura 7. **Modelo de ConBr escolhido como representativo neste trabalho.**

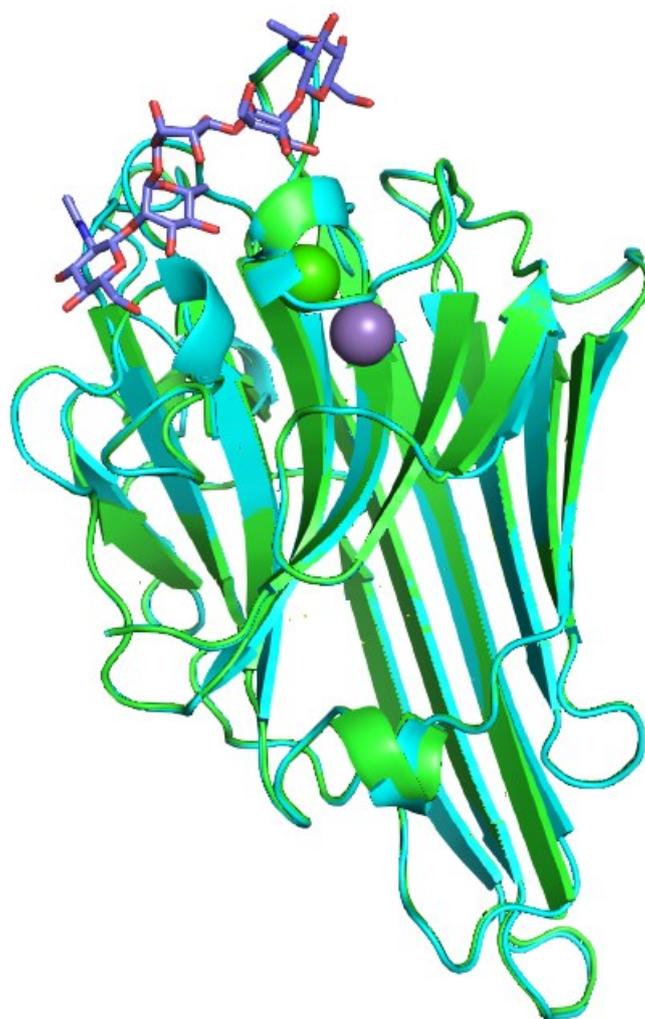


Figura 8. Alinhamento do modelo ConBr (verde) x ConA (azul) em interação com β -D-GlcNAc(1,2) α -D-Man-(1,6)[β -D-GlcNAc(1,2) α -D-Man(1,6)] α -D-Man. O glicano está representado em coloração azul e vermelha. Valor de RMSD total = 0,105. As esferas de cor verde e púrpura representam os metais Ca^{2+} e Mn^{2+} .

Tabela 1. Parâmetros de avaliação de qualidade estrutural do modelo de ConBr gerado.

Parâmetro	Valor
Molpdf	1062,05
DOPE score	- 26732,29
Verify 3D	100%
Qmean	0,88 \pm 0,05
Z-score	0,340

Gráfico de Ramachandran	93,9% dos resíduos em regiões favorecidas; 6,1% em regiões permitidas
Presença de cis-peptídeos	1

Em relação à modelagem do sistema xc⁻, o modelo gerado, quando inserido no YASARA, possuía uma energia inicial de -131.782,2 kJ/mol, com um valor de escore de -2,77. Ao final da minimização, em que ocorreu a solvatação do sistema, a energia final alcançou -453.671,2 kJ/mol, com um valor de escore de - 1,04. O modelo gerado está representado na figura 9. Para atestar sua qualidade, realizou-se a sua sobreposição com a estrutura tridimensional do sistema xc⁻ nativo, elucidada por crio-eletromicroscopia (PARKER *et al.*, 2021), em que se obteve um valor de RMSD = 2,864 (Fig. 10). Para fins comparativos, realizou-se também a sobreposição do modelo de partida (PDB: 7CCS), modelo construído com mutações cuja estrutura também foi elucidada pela mesma técnica, com a estrutura nativa (PDB: 7P9V), obtendo-se um valor de RMSD = 2,651 (Fig. 11). Ainda que o valor de RMSD tenha sido considerado alto, especialmente se comparado ao modelo gerado de ConBr, alguns fatores devem ser levados em consideração. Primeiramente, trata-se de um sistema complexo, que envolve duas proteínas juntas que não estão na sua forma nativa (ou seja, em membrana), estando presentes no vácuo. Além disso, o modelo que utilizamos como padrão de modelagem apresentava além desse primeiro fator, uma estrutura mutada, contribuindo ainda mais para o desvio. Tendo em vista que, ao alinhar as estruturas, os elementos estruturais permaneceram conservados, a modelagem foi considerada satisfatória.

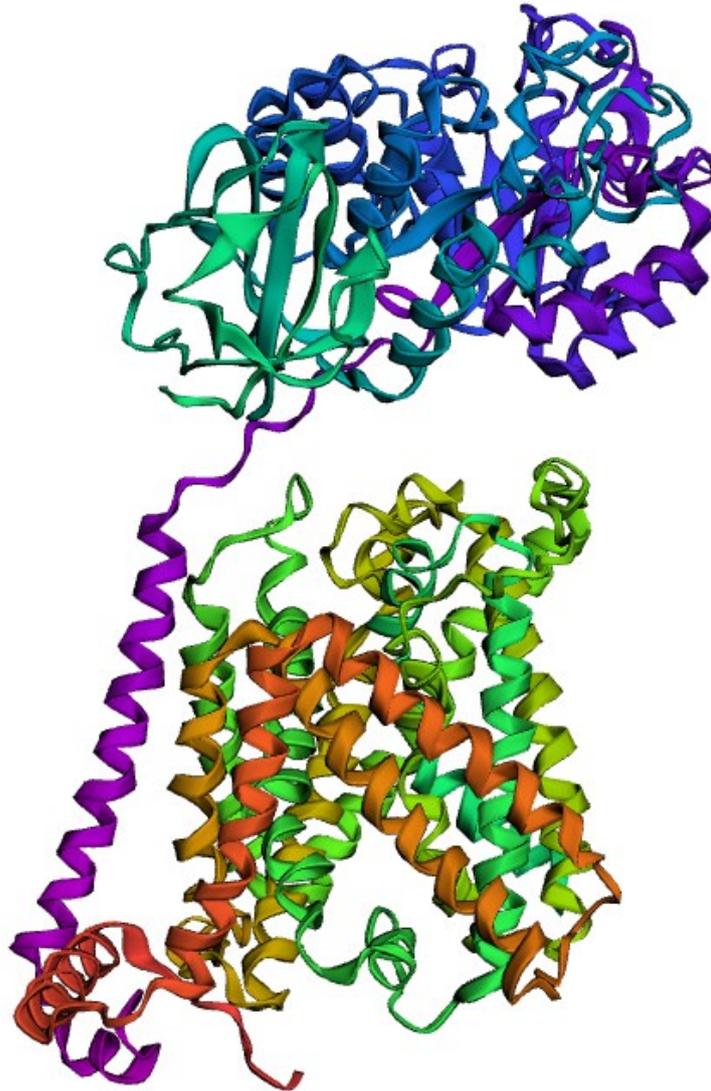


Figura 9. **Modelo escolhido como representativo da modelagem do sistema xc:** Esse modelo foi produzido a partir de um molde com mutações (PDB: 7CCS) e apresentou todas as características estruturais esperadas em relação ao sistema xc: a cadeia leve transmembrana, composta por 12 hélices, que se associam à cadeia pesada, localizada na parte superior da figura.

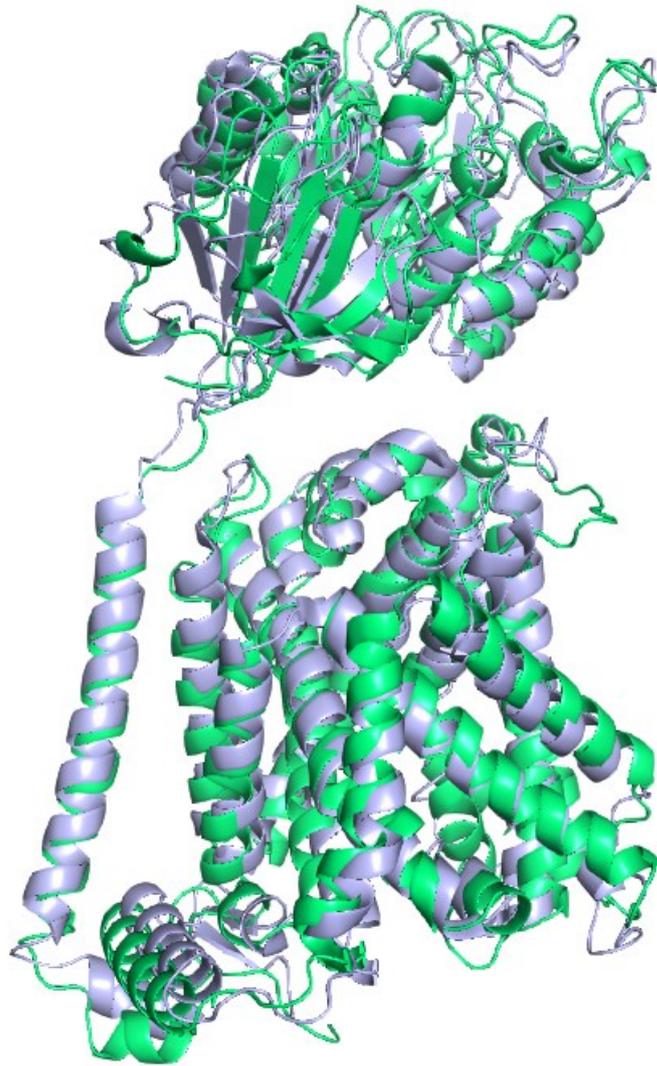


Figura 10. **Sistema x_c^- modelado em verde e sistema x_c^- nativo por crioeletromicroscopia em azul (PDB: 7P9V).** A sobreposição de estruturas mostra que o sistema modelado apresentou evidente qualidade. O valor de RMSD para o alinhamento total dos dois modelos apresentou valor de 2,442.

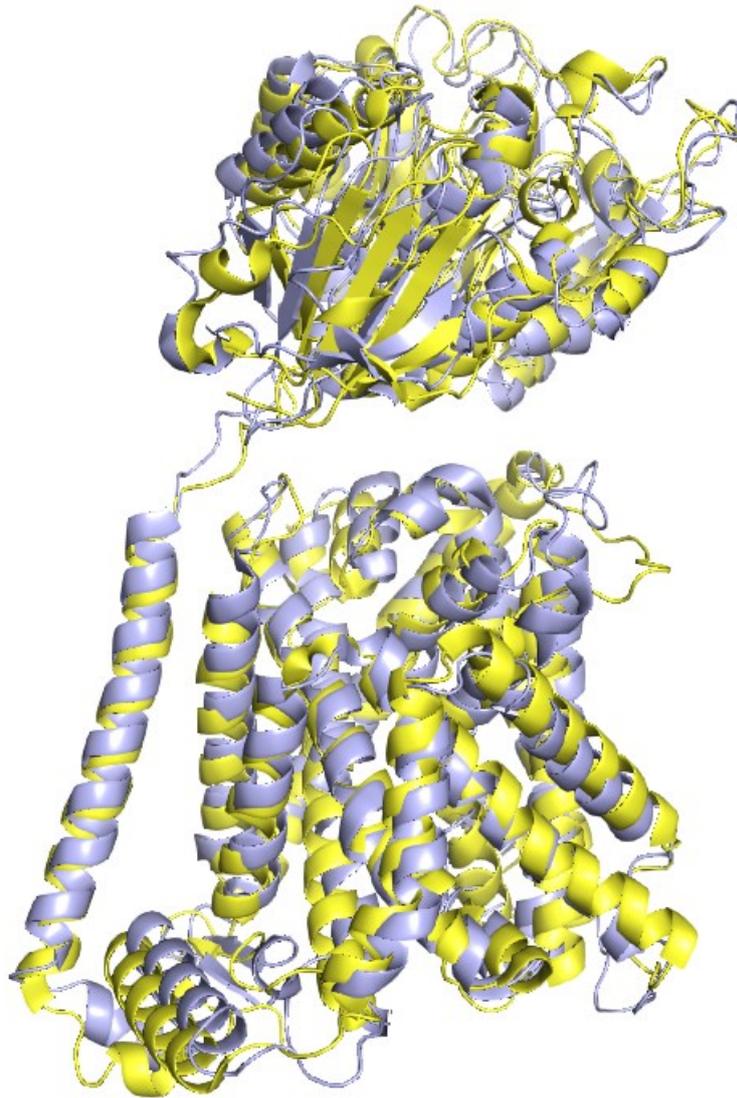


Figura 11. **Modelo mutado (PDB 7CCS) (em amarelo) em alinhamento com a estrutura nativa obtida por crioeletromicroscopia (PDB: 7P9V) (em azul).** O modelo mutado foi aquele utilizado como padrão para produção do sistema modelado. O valor de RMSD para o alinhamento total dos dois modelos apresentou valor de 2,651.

O modelo gerado está de acordo com as estruturas que vieram a ser determinadas após o início desse trabalho (PARKER *et al.*, 2021; YAN *et al.*, 2022). Pode-se observar a presença das 12 hélices transmembrana que formam o transportador xCT, que se associam com uma outra hélice constituinte da CD98hc, algo característico para os complexos proteicos pertencentes à família LAT. Nessa família, a hélice única da CD98hc interage por meio de interações hidrofóbicas com a hélice 4. Inclusive, ao realizar o alinhamento do nosso modelo com os complexos LAT1-CD98hc (YAN *et al.*, 2019) e LAT2-CD98hc

(RODRIGUEZ *et al.*, 2021), também envolvidos no transporte de aminoácidos, pode ser observada a significativa conservação da estrutura tridimensional (Fig. 12). Estruturalmente, as proteínas que pertencem às LATs possuem uma estrutura conservada que exibe o enovelamento caracterizado como "topologia invertida 5 + 5" (SHI, 2013), em que as primeiras cinco hélices transmembrana se relacionam com outras cinco hélices por meio de um pseudo eixo de simetria dupla que corre paralelo ao plano da membrana plasmática.

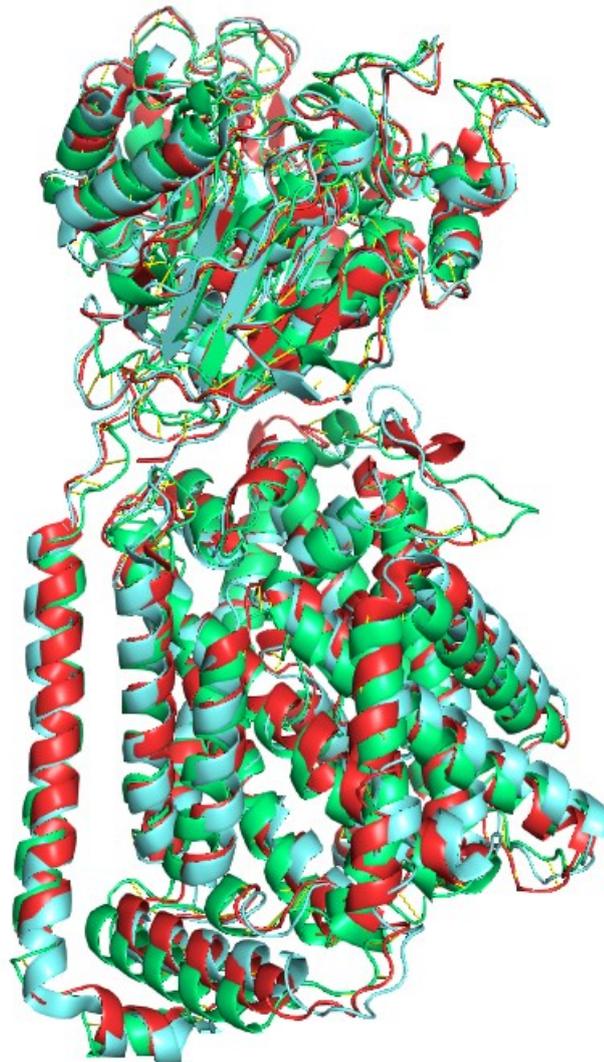
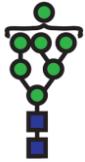


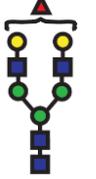
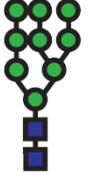
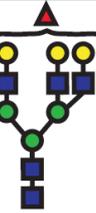
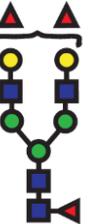
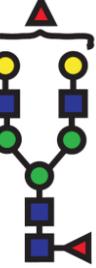
Figura 12. **Alinhamento de diferentes membros da família LAT.** Os constituintes da família LAT de transportadores apresentam as mesmas características estruturais que podem ser observadas no sistema xc⁻. Em verde claro está representado nosso modelo; em vermelho – LAT1 (PDB: 7DSK); azul – LAT2 (PDB: 7B00).

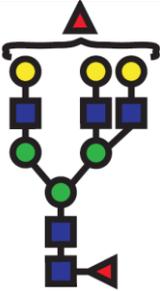
5.2. Avaliação da interação de ConBr com carboidratos por meio de *docking molecular*

Os valores de escore obtidos (em unidades arbitrárias) pelo docking molecular estão representados na tabela 2. Vários *N*-glicanos foram testados, sendo que ConBr apresentou melhores valores de escore para os ricos em manose, e cruzando esses dados com as posições espaciais adotadas durante a realização do *docking*, o que se mostrou mais adequado para prosseguimento com as análises posteriores foi o primeiro representado na tabela. Esses dados estão de acordo com o que já foi documentado para a especificidade de ConBr a carboidratos, uma lectina específica a glicose/manose que já se observou apresentar afinidade de *N*-glicanos com trimanosídeos (CAVADA *et al.*, 2019a). Esse *N*-glicano (Fig. 13) foi, posteriormente, inserido nos quatro sítios de glicosilação da CD98hc e a ConBr foi fixada em interação com um desses sítios por meio do *software* PatchDock (DUHOVNY; NUSSINOV; WOLFSON, 2002; SCHNEIDMAN-DUHOVNY *et al.*, 2005) (Fig. 14).

Tabela 2. Parâmetros de avaliação para o *docking molecular* em unidades numéricas arbitrárias.

Carboidrato/valor dos parâmetros	PLP.fitness	Escore (PLP.PLP)	PLP. <i>ligand clash</i>	Contribuições da torção do ligante	Contribuições das ligações de hidrogênio	Contribuições das interações apolares
	64,3910	-54,7055	4,55	7,22	-12,9979	-39,15
	41,0574	-43,5077	11,0481	7,8123	- 6,3	- 27,96

	31,93	- 46,99	27,92	7,17	- 10,99	- 43,69
	39,54	- 45,10	34,71	6,82	- 10,48	- 54,04
	64,60	- 62,25	48,23	6,25	- 11,71	- 48,09
	-*	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-

	-	-	-	-	-	-
---	---	---	---	---	---	---

* Apesar de testado, os valores dos parâmetros ficaram fora de uma faixa esperada de normalidade, sendo, portanto, descartados para as avaliações posteriores.

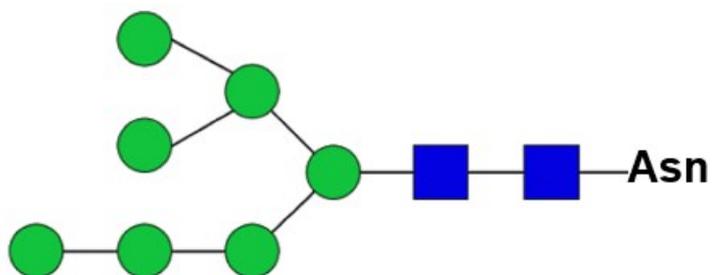


Figura 13. **Representação esquemática do N-glicano MAN7 escolhido por *docking* molecular.** As esferas verdes representam unidades de manose, enquanto os quadrados azuis representam unidades de N-acetil-glicosamina.

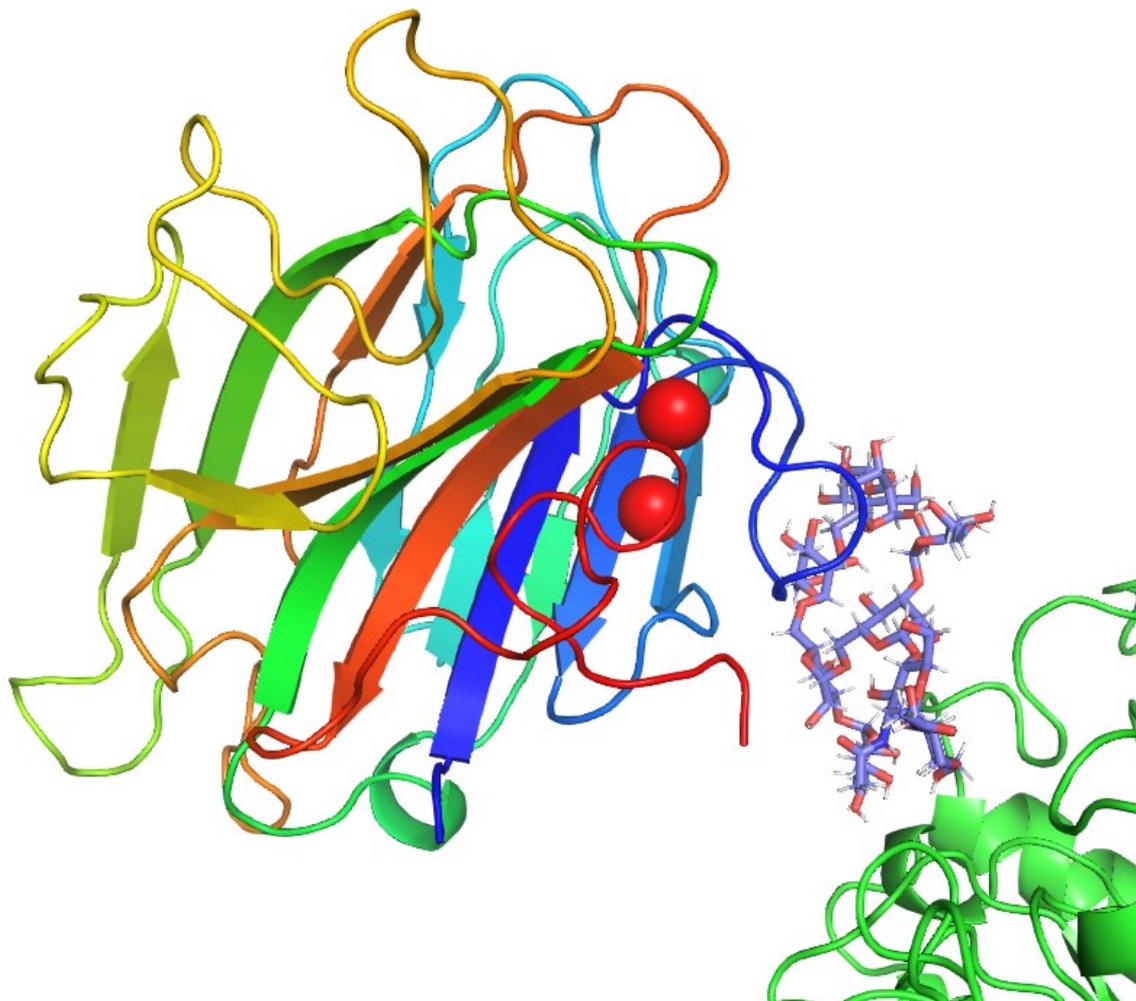


Figura 14. Representação de ConBr em interação com o N-glicano escolhido, ligado ao resíduo Asn381.

A avaliação do potencial de interação de ConBr com esses possíveis glicanos presentes na proteína CD98, de acordo com o trabalho de Powlesland *et al.* (2009) abre uma série de novas oportunidades de aplicações biomédicas para não apenas a ConBr, mas como para uma série de lectinas específicas a glicose/manose. Essa glicoproteína foi descrita, pela primeira vez, como um antígeno de superfície celular envolvido na ativação de linfócitos T (HAYNES, 1981). Ela se associa de maneira covalente com outras proteínas, chamadas de subunidades leves – como é o caso da própria xCT e das outras LATs. Esses complexos estão relacionados com bastantes funções, como adesão celular, metabolismo energético e transporte de hormônios (SANTIAGO-GÓMEZ *et al.*, 2013).

Diversos trabalhos já relataram a importância dessa proteína em vários processos relacionados ao estabelecimento de tipos diferentes de câncer. CD98 é hiperexpressa em linhagens tumorais de diferentes origens, o que favorece a sobrevivência e proliferação celular (BULUS *et al.*, 2012; NGUYEN *et al.*, 2012), além de possivelmente mediar a transformação maligna por conta da sua interação com β 1-integrinas (HARA *et al.*, 1999). Já foi observado que a CD98 está por trás do estabelecimento e da propagação da leucemia mieloide aguda por auxiliar a manter as células-tronco tumorais. Dessa forma, a deleção de CD98 prejudicou a propagação e iniciação desse tipo de tumor em camundongos, além de as células apresentarem menores interações com o endotélio (BAJAJ *et al.*, 2016). Sua importância já foi documentada, também, para o câncer de cólon, em que está hiperexpressa. Foi visto que o seu silenciamento por nanopartículas foi capaz de potencializar a quimioterapia nesse tipo de tumor (XIAO *et al.*, 2018).

Dessa forma, caso essa interação da ConBr venha a se traduzir em um prejuízo à função da CD98, torna-se evidente mais um alvo no contexto da aplicação antitumoral dessa lectina. Entretanto, a simples interação entre ConBr e CD98 pode permitir a sua utilização como biossensor para identificar estágios de diferentes tipos de cânceres. Isso se deve pois já foi relatado que CD98 pode ser um biomarcador promissor em relação ao prognóstico de cânceres do trato biliar, tendo sido encontrado que cerca de 37% de pacientes com esse tipo de tumor apresentavam expressão elevada dessa glicoproteína (KAIRA *et al.*, 2014). Outro trabalho observou que CD98 também pode ser utilizada como biomarcador para cânceres de cabeça e pescoço, além de regular a resistência à radioterapia desses tumores (DIGOMANN *et al.*, 2019).

Para os propósitos deste trabalho, é válido destacar os possíveis papéis que essa interação pode ter no contexto dos gliomas. Observou-se que o transportador xCT, o qual se associa com a proteína CD98 para formar o sistema xc⁻, é altamente expresso em linhagens celulares de glioma U251, de forma que a inibição do transportador por sulfasalazina ocasionava morte celular por acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e que a sua deleção ocasionava maior sensibilidade frente ao tratamento com temozolamida (POLEWSKI *et al.*, 2016). No mesmo trabalho foi documentado que a

hiperexpressão do xCT levou a uma potencialização na expressão de genes envolvidos no metabolismo energético, biogênese mitocondrial, produção de ATP e manutenção de baixos níveis de EROs. De forma similar ao que ocorreu em outros cânceres, a hipoexpressão de CD98 reduziu a agressividade e malignidade em gliomas (AN *et al.*, 2016).

Portanto, caso a interação entre ConBr e CD98 venha a se confirmar em modelos experimentais, essa lectina pode vir a ser explorada como ferramenta antitumoral com enfoque no impacto ao metabolismo de aminoácidos, por afetar os transportadores envolvidos na sua captação, e como mais um biossensor para auxiliar no estadiamento de diferentes tipos de cânceres, como os supracitados.

5.3. Montagem do sistema e dinâmica molecular do sistema xc⁻

Após o encaixe da ConBr no glicano-alvo ter sido realizado utilizando o PatchDock, o sistema foi preparado utilizando o gerador de construção de membrana do CHARMM-GUI. O sistema xc⁻ inserido na membrana pode ser observado na fig. 15 e em interação com a ConBr na fig. 16. Esses dois sistemas foram submetidos a simulações de dinâmica molecular em 200 ns, com cerca de 20.000 frames, à pressão constante de 1 bar e temperatura de 300K. As trajetórias de ambos os sistemas se mostraram satisfatórias ao terem sido posteriormente analisadas pelo *software* VMD. No caso do sistema em interação com ConBr, a lectina manteve a interação com os glicanos de CD98 durante todo o momento.

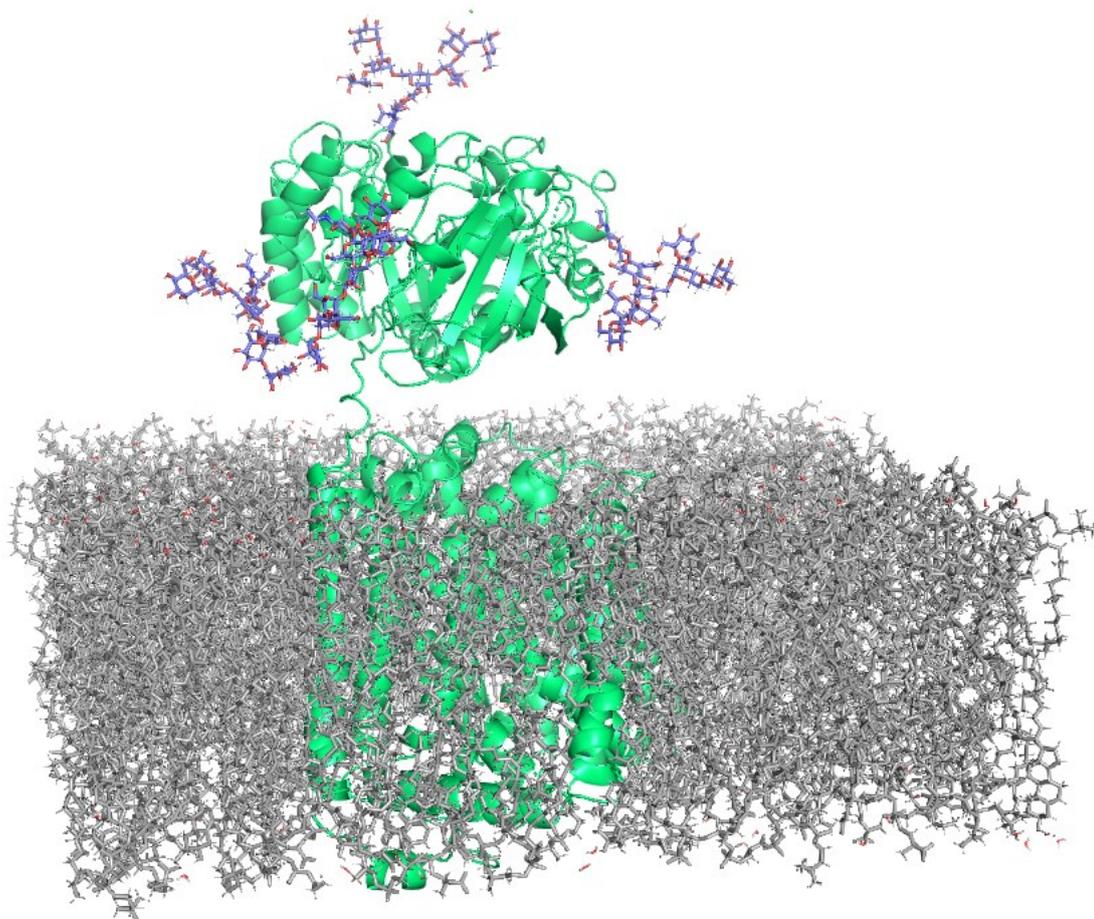


Figura 15. **Representação da montagem do sistema xc⁻ inserido na membrana.** A cadeia leve é inserida na membrana, enquanto a cadeia pesada está representada no que seria o meio extracelular, com os glicoconjugados identificados em cor amarela.

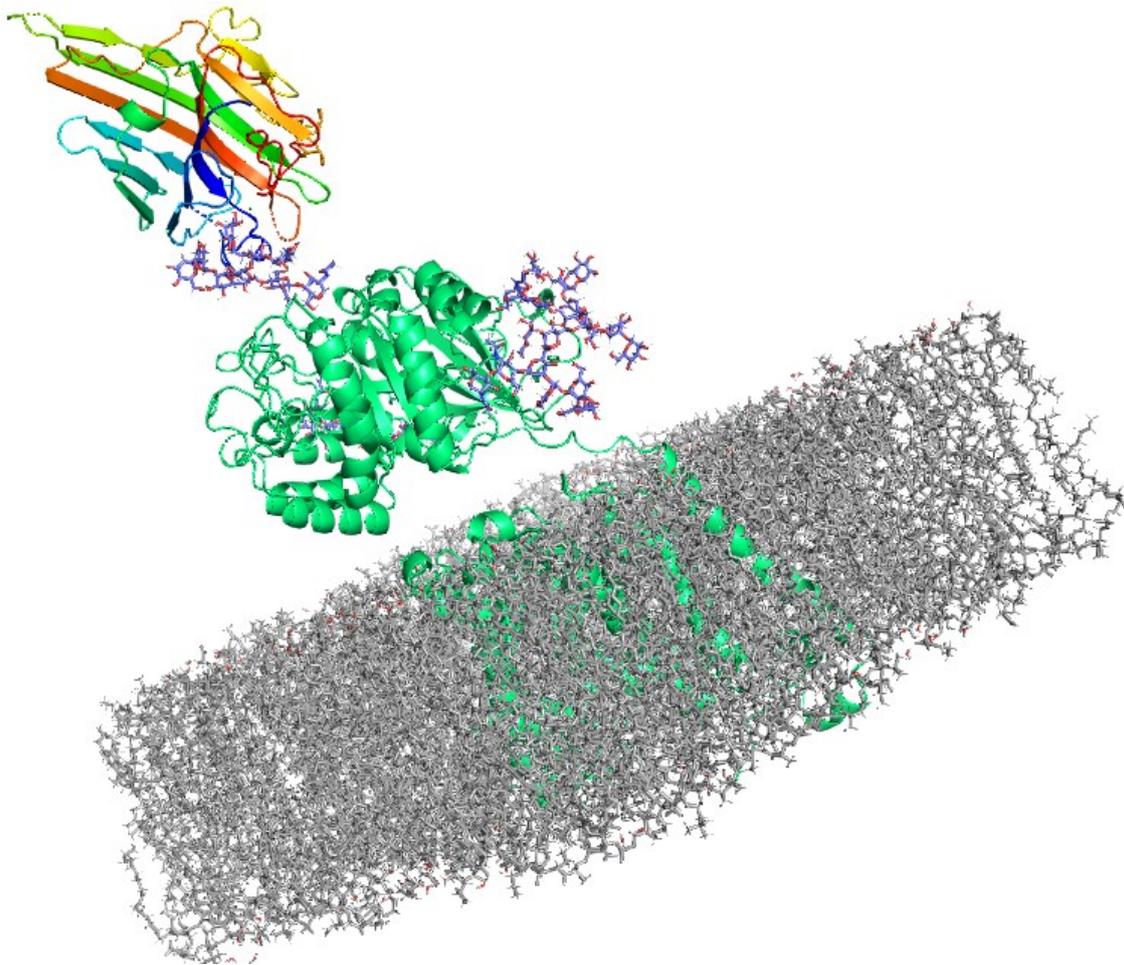


Figura. 16. Representação de ConBr em interação com um dos glicanos após o sistema ter sido montado em membrana.

Para avaliar a estabilidade estrutural dos dois sistemas ao longo da trajetória foram medidos os parâmetros de desvio quadrático médio (RMSD), flutuação quadrática média (RMSF), raio de giro (RoG) e energia total do sistema. Para todas essas medidas, será evidenciado neste trabalho o comportamento das proteínas xCT e CD98.

O RMSD é uma medida de grande valia na avaliação de trajetórias, pois é um indicativo do quanto a estrutura de uma proteína se modifica, em uma simulação, em comparação com uma estrutura de partida. Observando o gráfico de RMSD para xCT (Fig. 17), pode ser visto que o sistema em interação com ConBr entrou em equilíbrio entre 75 a 100 ns, havendo uma variação aproximada de 3,75 a 4,0 Å. Por outro lado, essa estabilidade não foi mantida no sistema nativo, havendo flutuações entre 100 a 125 ns. Aparentemente, a interação da

ConBr com os glicanos de CD98 parece exercer impacto quanto à estabilidade estrutural da proteína xCT, auxiliando na estabilidade do sistema. Quando observado o RMSD para CD98 (Fig. 18), tanto o modelo em interação com a ConBr quanto o modelo sozinho parecem alcançar um estado de equilíbrio no mesmo momento, em cerca de 75 ns.

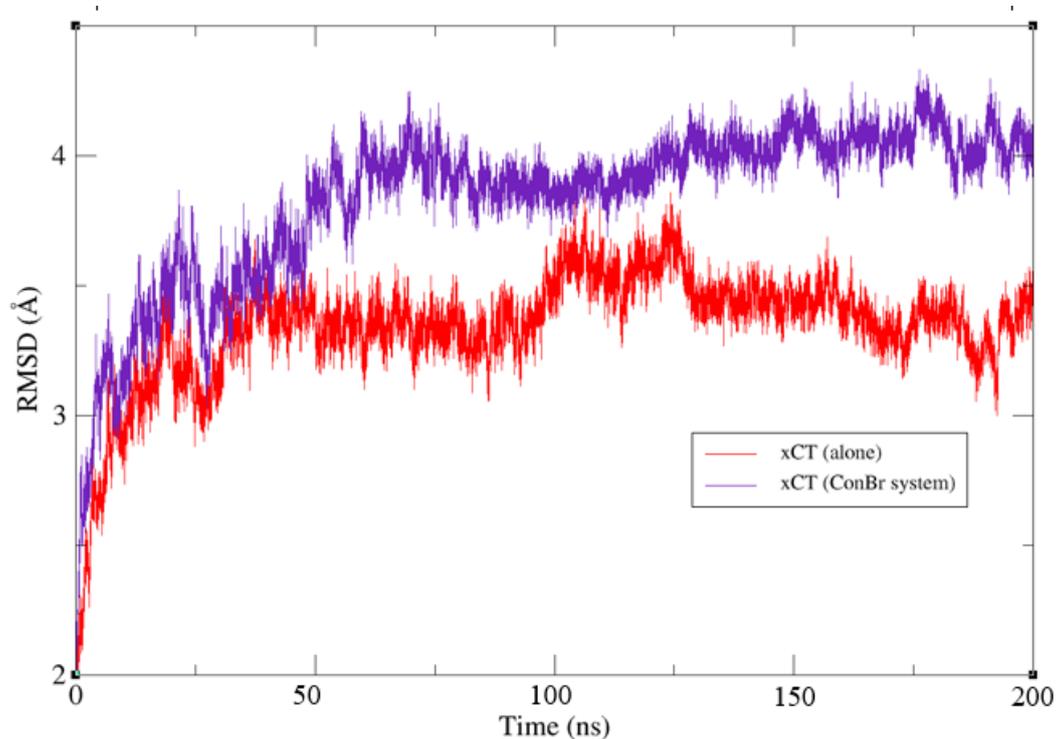


Figura 17. **RMSD de xCT para os dois sistemas.** O sistema nativo está representado em vermelho, enquanto o sistema em interação com ConBr está representado em roxo.

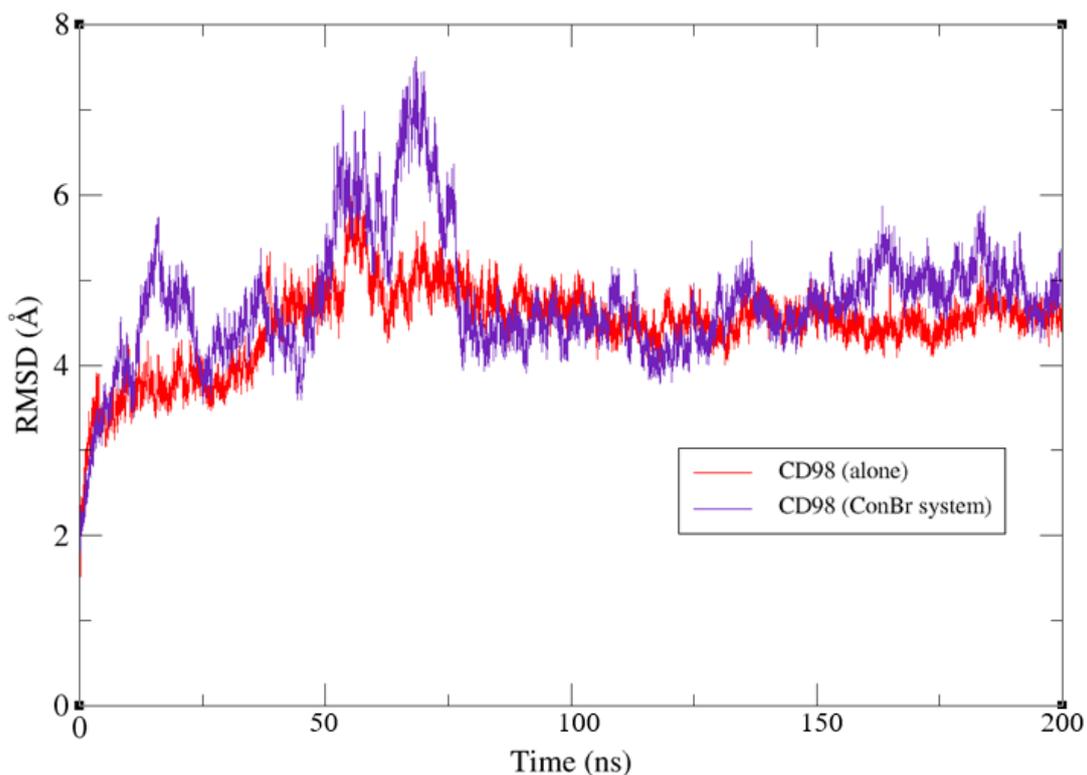


Figura 18. **RMSD de CD98 para os dois sistemas.** O sistema nativo está representado em vermelho, enquanto o sistema em interação com ConBr está representado em roxo.

Outro importante fator de análise diz respeito aos tipos de interações que ocorrem entre a ConBr e o glicoconjugado que ela interage. Pode ser visualizado na fig. 19 que as ligações de hidrogênio representam um tipo de interação importante para estabilizar essa interação. Entretanto, ainda que durante uma certa faixa de tempo o número de ligações de hidrogênio chegue a 0, convém salientar que o sistema em interação com ConBr entrou em equilíbrio, conforme observado nas figs. 17 e 18. Dessa forma, outras interações, como as hidrofóbicas e de van der Waals, devem auxiliar na interação da ConBr com o glicano a fim de mantê-los estáveis durante a trajetória.

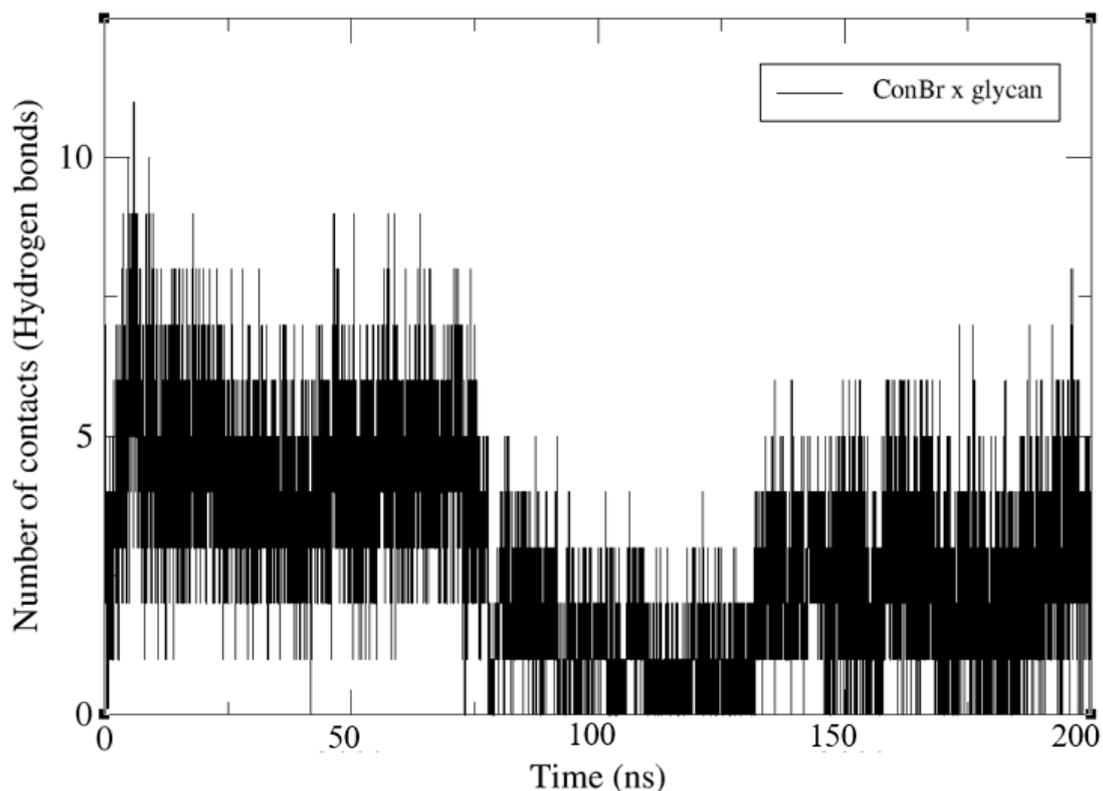


Figura 19. **Frequência de contatos por ligações de hidrogênio formados entre ConBr e o glicano alvo presente na proteína CD98.** As ligações de hidrogênio parecem ser interações importantes na interação entre ConBr com os glicanos, apesar de haver uma fração de tempo em que não há formação dessas ligações, entre 75 a 125 ns. Nesse momento, outras interações podem estar contribuindo para a estabilização.

O RMSF é um parâmetro adequado para avaliar a variação na posição dos átomos ao longo da trajetória, sendo uma boa medida de flexibilidade do sistema. De maneira geral, pode-se perceber que a ConBr torna a xCT, no geral, mais flexível (Fig. 20). Uma das porções onde essa flexibilidade é mais acentuada encontra-se entre, aproximadamente, os resíduos 340 e 380, que representam as hélices TM8 e TM9. ConBr deixa xCT mais inflexível no resíduo 108, que faz parte da TM2, pois pode ser observado que na estrutura nativa é um resíduo bem mais flexível, sendo representado por um longo pico no início do gráfico. Ao avaliar o RMSF para os resíduos que compõem a CD98 (Fig. 21), observa-se que é seguido um padrão relativamente parecido de flutuação nos dois sistemas e quando comparados ao RMSF de xCT. A ConBr, aparentemente, está levando a uma maior flexibilidade da proteína CD98 como um todo, resultando no aumento da flexibilidade observado para os resíduos da xCT.

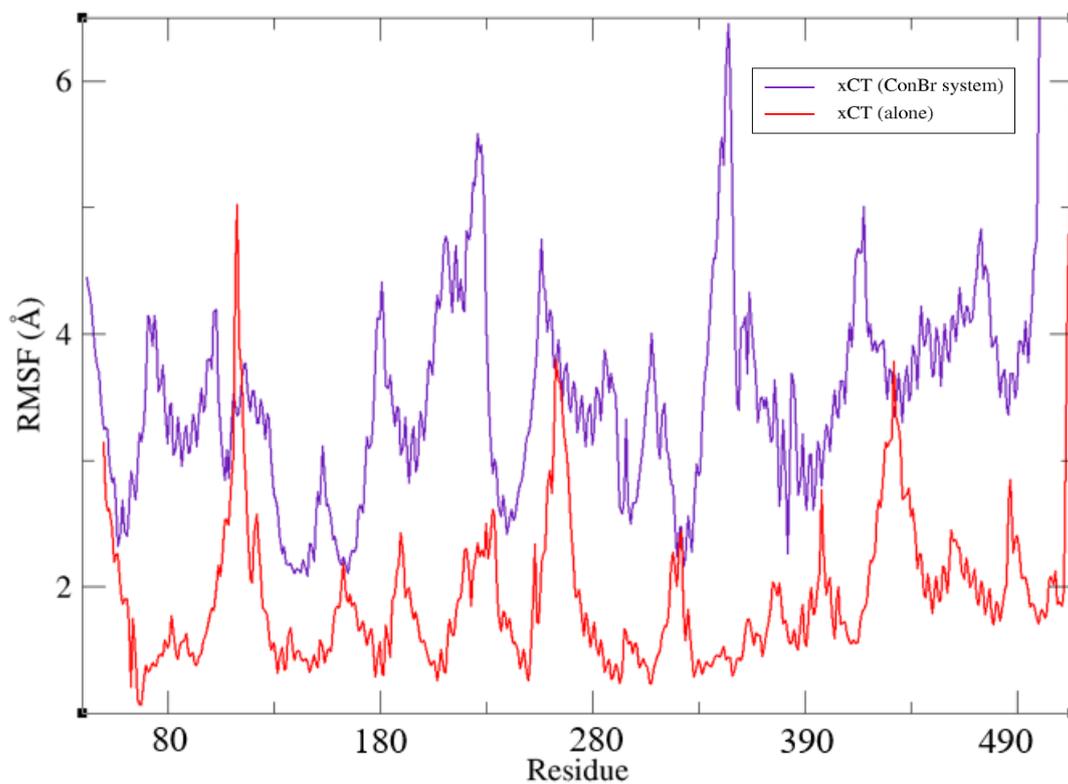


Figura 20. **Gráfico de RMSF de xCT para os dois sistemas.** O sistema nativo está representado em vermelho, enquanto o sistema em interação com ConBr está representado em roxo.

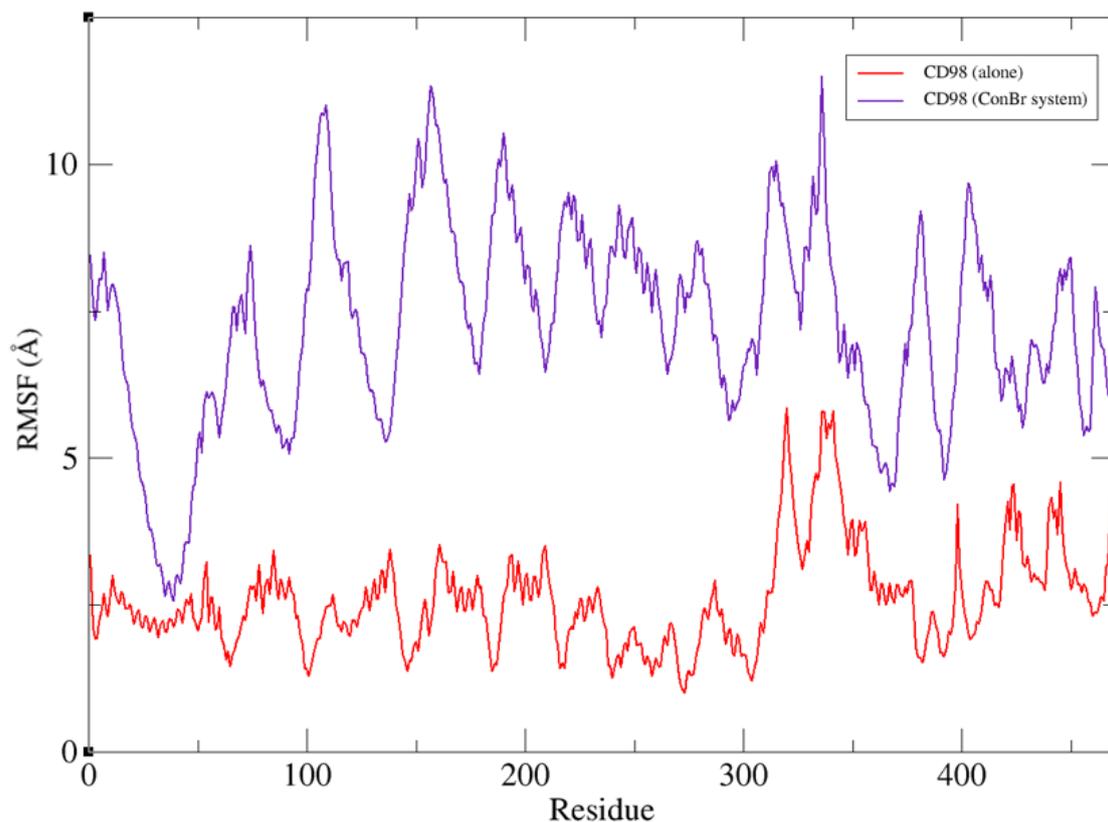


Figura 21. **Gráfico de RMSF de CD98 para os dois sistemas.** O sistema nativo está representado em vermelho, enquanto o sistema em interação com ConBr está representado em roxo.

Nós analisamos o RMSF, também, em relação apenas aos resíduos que formam a cavidade de interação com o glutamato, segundo descrito por Parker *et al.* (2021) (Fig. 22). Para todos esses, é evidente que há um maior valor de RMSF no sistema com a ConBr, representando uma maior flexibilidade desses resíduos, o que pode deixar a cavidade mais instável e, dessa forma, dificultar a interação com o glutamato.

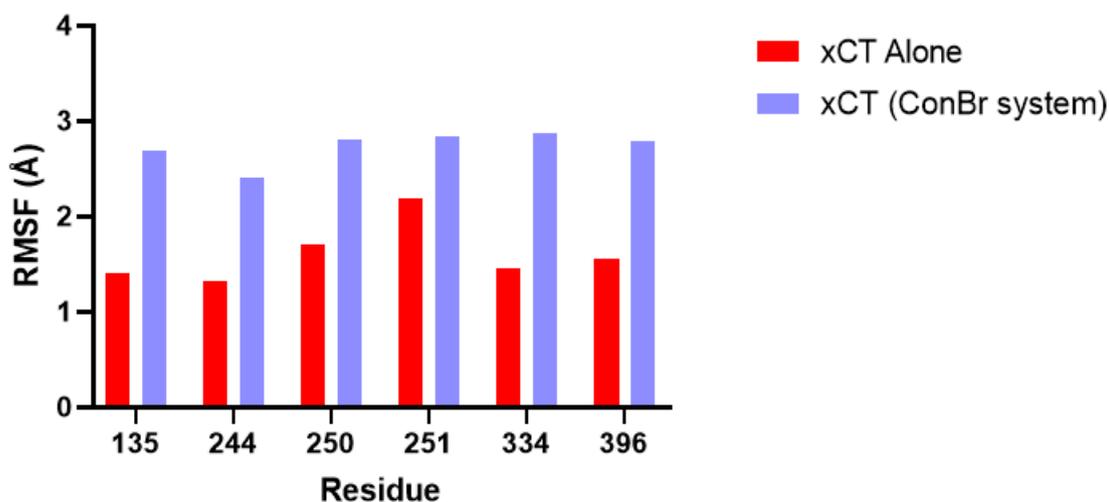


Figura 22. Gráfico de RMSF para os resíduos que compõem a cavidade de interação com o glutamato nos dois sistemas. O sistema nativo está representado em vermelho, enquanto o sistema em interação com ConBr está representado em roxo.

O raio de giro é uma medida útil para avaliar o grau de enovelamento ou empacotamento de uma proteína durante uma trajetória de dinâmica molecular. Ao observar a diferença desse parâmetro entre o sistema nativo e o sistema em interação com ConBr, em relação à proteína xCT, não são evidenciadas mudanças muito grandes nos valores de raio de giro (Fig. 23) e, em ambos, ocorre uma discreta diminuição na compactação de suas estruturas ao longo da trajetória. Entretanto, ao analisar o ROG apenas para a CD98 (Fig. 24), a interação com ConBr leva essa proteína a assumir uma compactação discretamente menor do que se comparado ao sistema sozinho. Além disso, ambos os sistemas adotam estados energéticos similares, havendo uma variação média entre -6000 a -4500 kcal/mol em função do raio de giro (Fig. 25).

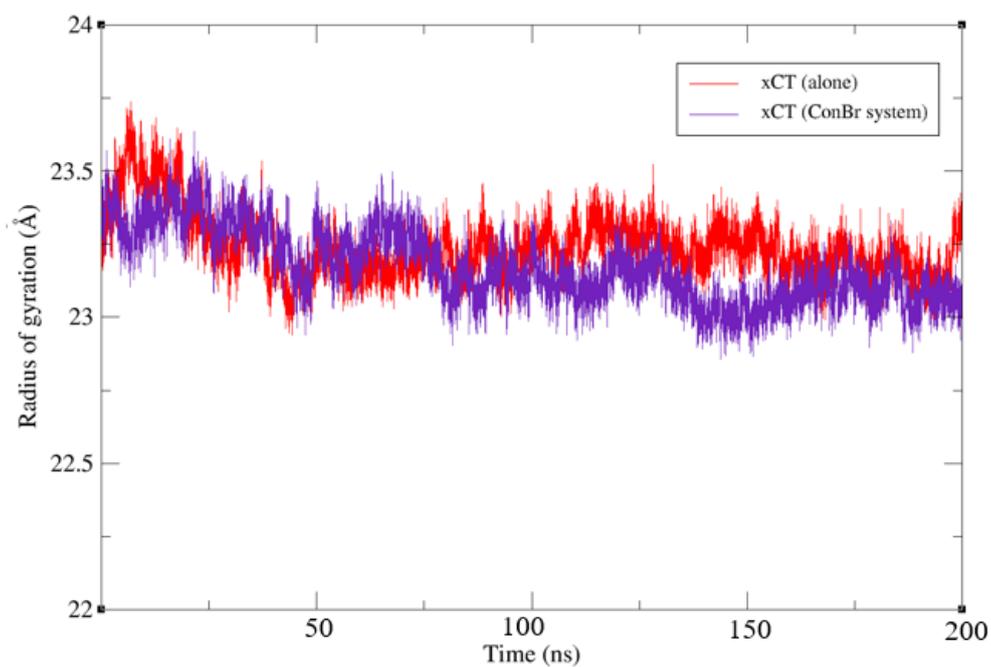


Figura 23. **Gráfico de raio de giro (RoG) de xCT para os dois sistemas.** O sistema nativo está representado em vermelho, enquanto o sistema em interação com ConBr está representado em roxo.

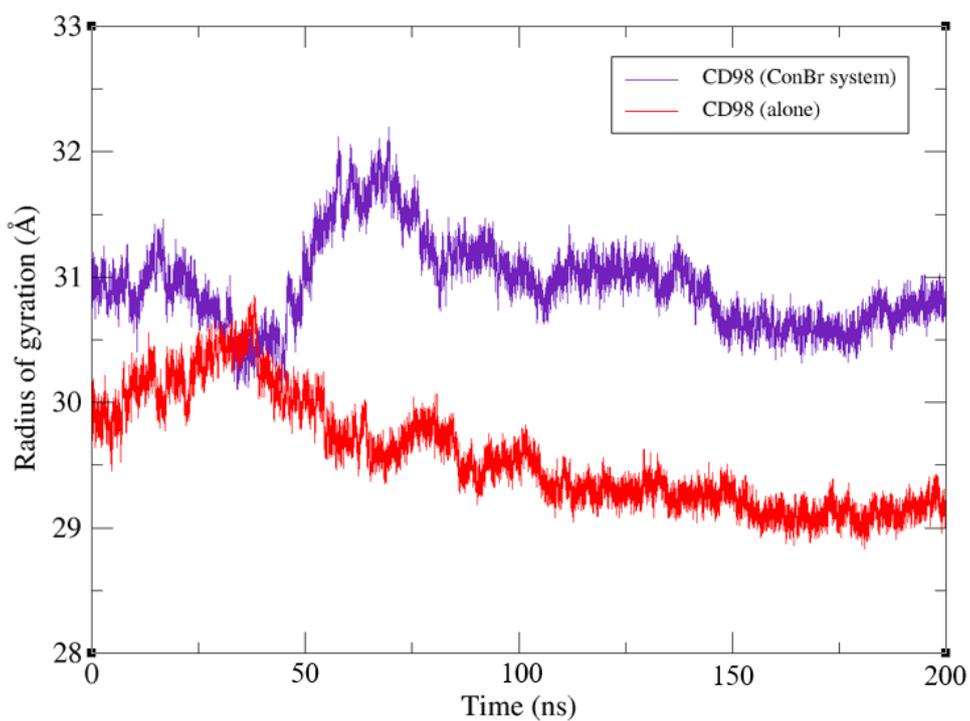


Figura 24. **Gráfico de raio de giro (RoG) de CD98 para os dois sistemas.** O sistema nativo está representado em vermelho, enquanto o sistema em interação com ConBr está representado em roxo.

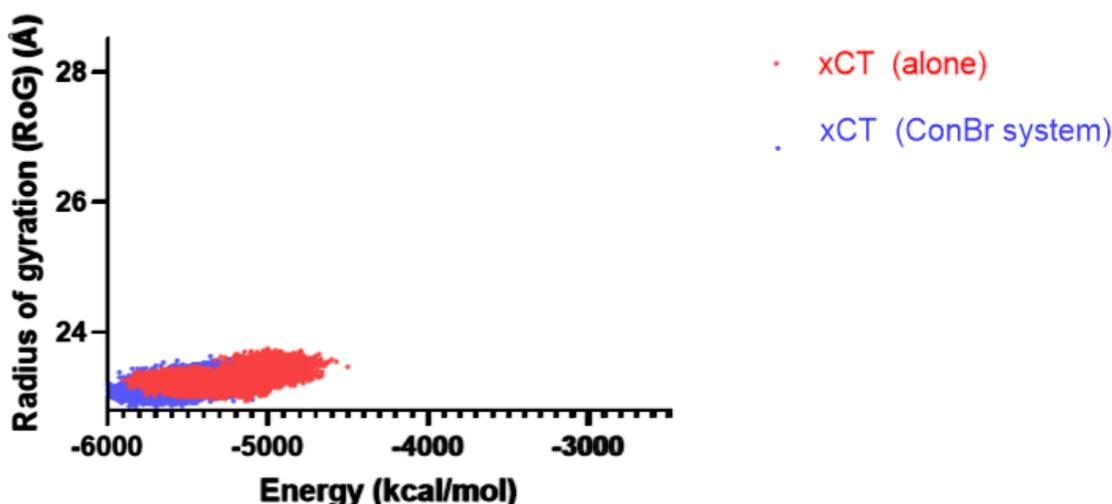


Figura 25. Gráfico de energia total em função do raio de giro para os dois sistemas. O sistema nativo está representado em vermelho, enquanto o sistema em interação com ConBr está representado em roxo.

Apesar de o raio de giro não indicar diferença significativa na compactação da proteína como um todo em ambos os sistemas, nós avaliamos os comportamentos dos resíduos que formam a cavidade em relação ao seu comprimento, medido em Å. Utilizando o servidor Caver Web v1.1 (STOURAC *et al.*, 2019), que analisa possíveis túneis e canais em estruturas proteicas de forma bastante acurada, os resíduos que interagem com o substrato glutamato foram escolhidos para delimitar a cavidade-alvo e o servidor realizou um cálculo de comprimento desta, encaixando estruturas esféricas para preenchê-la, que podem ser visualizadas na fig. 26.

Na fig. 26A, está representada a estrutura nativa resolvida por CEM, na fig. 26B a estrutura modelada, em 26C o sistema em interação com a ConBr e em 26D o sistema em interação com o inibidor farmacológico erastina. Foram selecionados os mesmos resíduos para realizar o cálculo da cavidade em todos os modelos. O resultado comparativo dos comprimentos dos túneis está representado na fig. 27.

Ao comparar o modelo nativo com o modelado, o comprimento da cavidade deste é maior do que daquele e talvez isso se deva às diferenças do próprio processo de modelagem e da estrutura de partida para o nosso modelo escolhido. Entretanto, quando comparamos ambos esses sistemas com aquele que interage com ConBr, pode ser vista uma redução drástica no comprimento

da cavidade. Parece haver um maior fechamento do túnel entre a hélice 1 e a hélice 6, de forma que o espaço ocupado pelas esferas no sistema em interação com ConBr não preenche mais essa região (Fig. 26C).

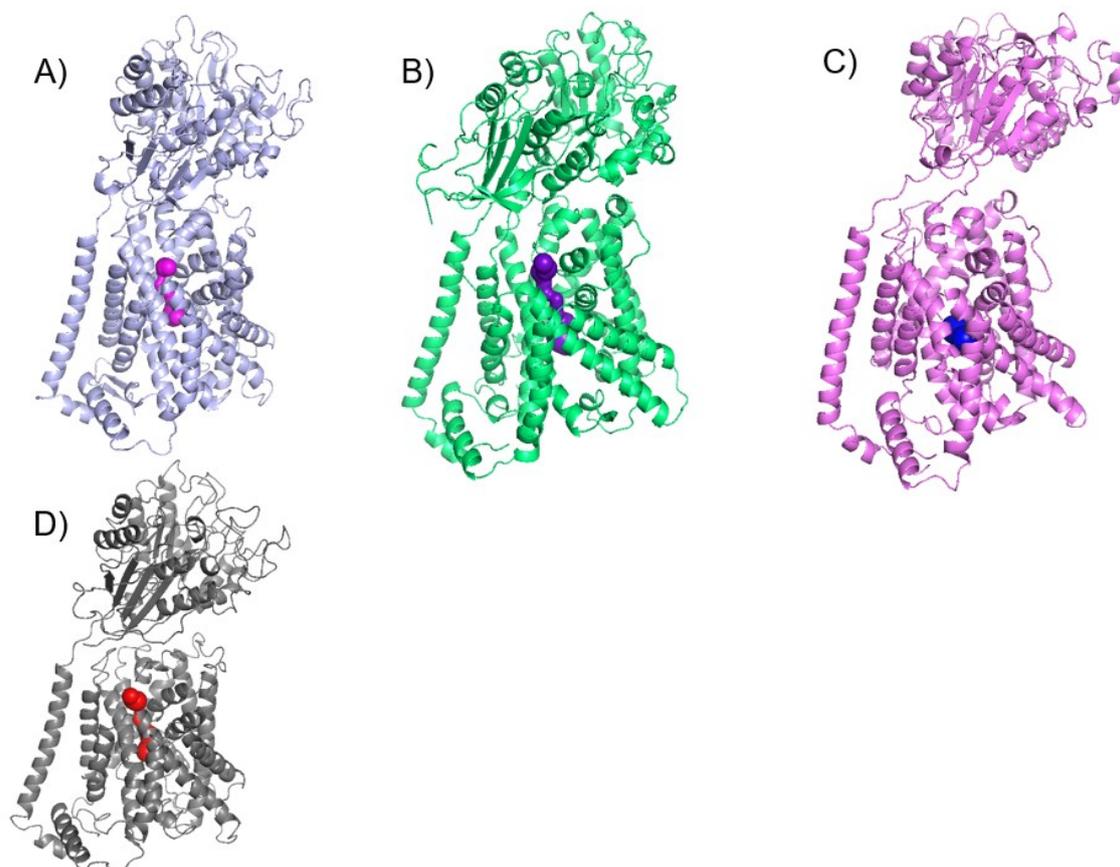


Figura 26. **Delimitação da cavidade de interação com o glutamato pelo CaverWeb.** A – Sistema nativo (PDB: 7P9V); B – sistema modelado; C – Sistema em interação com ConBr e D – Sistema em interação com erastina (PDB: 7EPZ). O sistema modelado analisado na figura B representa, nessa situação, um *frame* da dinâmica molecular após o sistema ter atingido o equilíbrio, a fim de observar de maneira mais verossímil o comportamento do túnel.

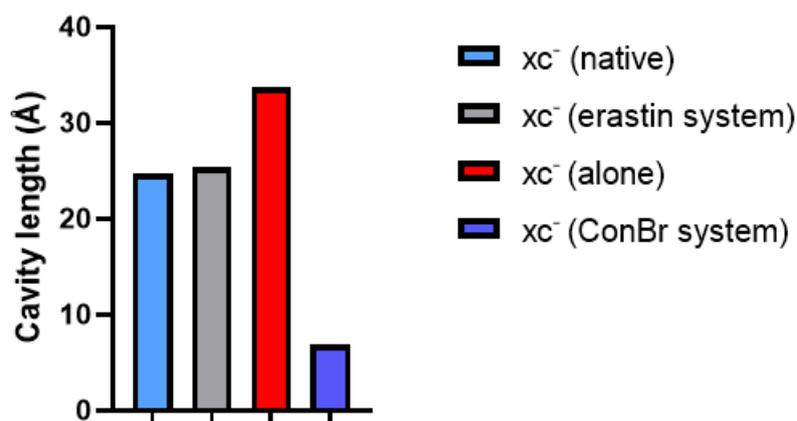


Figura 27. **Comparação do comprimento da cavidade de interação com o glutamato nos diferentes sistemas.** O cálculo realizado pela plataforma CaverWeb leva em consideração uma medida de cavidade estática. Para o sistema modelado e o sistema com ConBr, realizou-se o cálculo utilizando um frame após ambos os sistemas entrarem em equilíbrio.

Com o intuito de avaliar de forma mais visual e direta o possível impacto que a ConBr pode exercer na cavidade, a proteína xCT em interação com o glutamato foi representada como superfície (Fig. 28A) e realizou-se a sobreposição com o sistema em interação com ConBr (representado pela superfície em coloração azul) (Fig. 28B). Pode ser evidenciado que há uma aparente diminuição no comprimento da cavidade, confirmando o que se mostra na fig. 27.

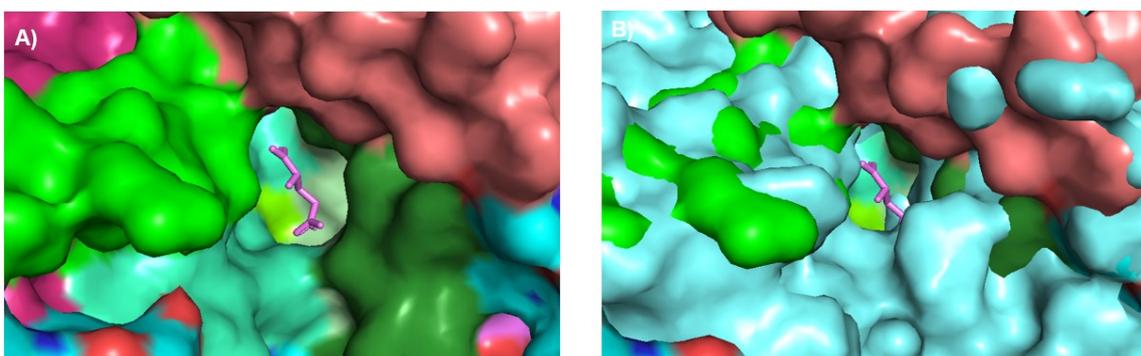


Figura 28. **Representação em superfície da proteína xCT, evidenciando a cavidade de interação com o glutamato.** A – Sistema xc⁻ nativo em interação com o glutamato (PDB: 7P9U); B – Sobreposição do sistema nativo com o sistema em interação com ConBr, na mesma posição representada em A.

Nós também comparamos com xc⁻ em interação com erastina, uma molécula classicamente utilizada para inibição do sistema e indução de ferroptose (DIXON; STOCKWELL, 2019). Apesar de ser um inibidor específico e

potente, a erastina não causa mudanças no comprimento da cavidade se comparado com a estrutura nativa. Isso se deve ao fato da erastina se ligar em outro sítio na xCT que não a cavidade de ligação ao glutamato, como pode ser visto na fig. 29. Assim, essa molécula impede o funcionamento do sistema por bloquear estericamente a entrada de glutamato na cavidade sem necessariamente alterar a estrutura do túnel.

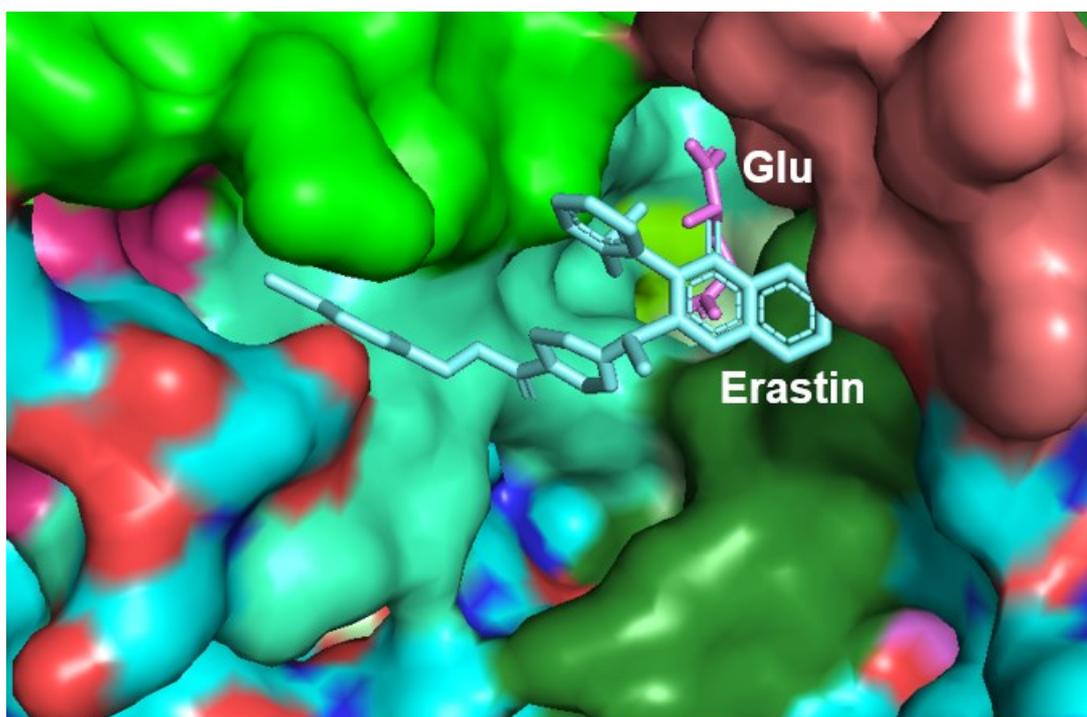


Figura 29. **Representação do sítio de interação da erastina.** Realizou-se a sobreposição do sistema nativo em interação com o glutamato (PDB: 7P9U) com o sistema em interação com erastina (PDB: 7EPZ), a fim de observar como a erastina interfere na ligação do glutamato.

Por fim, fizemos uma avaliação dos resíduos que formam a cavidade nos dois sistemas, a fim de avaliar se ocorrem mudanças visíveis em relação ao seu posicionamento (Fig. 30). Para isso, o sistema nativo e aquele em interação com ConBr foram sobrepostos utilizando o PyMOL e representou-se apenas os resíduos que constituem a cavidade de interação. Pode ser evidenciado que no sistema em interação com ConBr (Fig. 30B) ocorrem mudanças estruturais evidentes, especialmente em relação aos resíduos aromáticos F250 e Y251, que se distanciam em relação ao sistema nativo (Fig. 30A). Além disso, ocorre uma

mudança de direcionamento em R396. Essas mudanças tornam-se mais evidentes ao sobrepor os sítios dos dois sistemas (Fig. 30C).

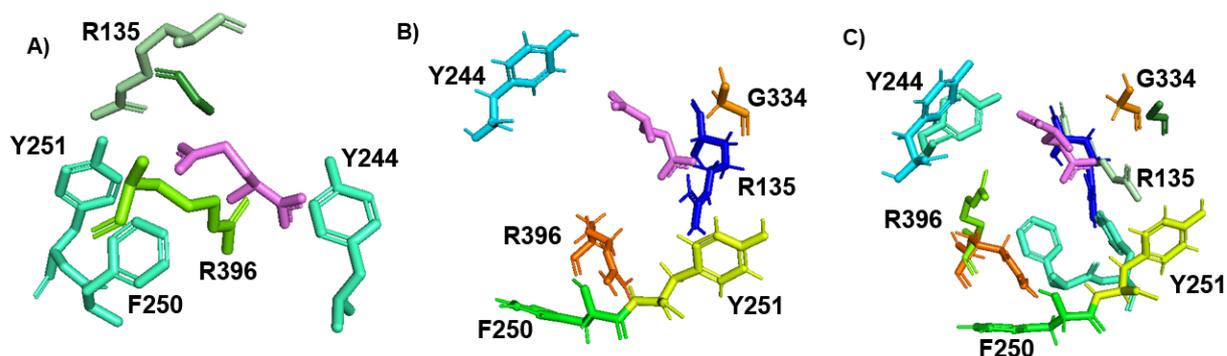


Figura 30. **Representação dos resíduos que compõem o sítio de interação com o glutamato, representado em roxo.** A – Sistema nativo (PDB: 7P9V); B – sistema em interação com ConBr; C – sobreposição do A com B.

Uma característica importante, que diferencia o xCT de outros transportadores da família SLC7, é a presença do resíduo R396, localizado na TM10. Essa cadeia lateral ocasiona um aumento significativo no caráter positivamente carregado no sítio de ligação ao glutamato, enquanto que nas proteínas LAT1 e LAT2, esse resíduo é formado por asparagina (PARKER *et al.*, 2021). Essas mudanças no direcionamento dos resíduos podem ter um impacto importante em relação à função de transporte. Parker *et al.* (2021) realizaram experimentos de mutagênese, realizando três trocas: R396A, R396K e R396N. Nos três casos, a troca do resíduo acarretou impacto profundo em relação ao transporte de cistina, prejudicando-o significativamente.

Conforme experimentos de *docking* e dinâmica molecular que foram feitos para o sistema x_c^- com a cistina (PARKER *et al.*, 2021), o resíduo R396 apresenta fundamental importância para a especificidade que a xCT possui em relação a esse dipeptídeo, pois coordena a segunda carboxila e empurra esse ligante na posição de interação tradicional com a TM1 e TM6. Logo, tendo em vista que esse resíduo sofre bastante influência tanto em relação à sua posição (Fig. 30) quanto em relação à sua flexibilidade (Fig. 22), a ConBr pode impactar também o transporte de cistina, e não apenas de glutamato.

Tendo em vista o potencial que ConBr apresenta para uma possível inibição do sistema xc⁻, torna-se razoável testá-la *in vitro* em relação ao seu potencial indutor de ferroptose. Recentemente, nosso grupo publicou um trabalho em que se descrevia o papel antitumoral de ConBr frente a linhagens de glioma, especialmente por exercer autofagia e inibir vias de sinalização de proliferação celular (WOLIN *et al.*, 2021). Com base neste trabalho, essa lectina possivelmente pode estar influenciando a morte celular em células de glioma por impactar a função do sistema xc⁻.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base no modelo de simulação que escolhemos, nosso trabalho sugere que a ConBr impacta a estrutura da proteína xCT por levar a uma diminuição na cavidade de interação com o glutamato e modificar a orientação dos resíduos que interagem com esse substrato. Isso, por sua vez, pode resultar em um prejuízo ao funcionamento do sistema, ocasionando estresse oxidativo e ferroptose.

Como perspectivas deste trabalho, algumas análises *in silico* ainda precisam ser realizadas a fim de torná-lo mais robusto, como uma análise dinâmica de cavidade, para ver como esta se comporta ao longo da trajetória, bem como novas simulações de dinâmica molecular tanto com o sistema nativo (7P9V) quanto com o sistema em interação com o glutamato (PDB: 7P9U), a fim de observar se ocorrem alterações significativas se comparados com o nosso modelo. Este é o primeiro trabalho a sugerir que lectinas vegetais podem estar envolvidas na indução de ferroptose.

Por fim, para identificar se ConBr realmente pode exercer um papel modulador na ferroptose, testes *in vitro* precisam ser realizados identificando como se comportam os marcadores de ferroptose em células tumorais incubadas com ConBr, como quantificação intracelular de glutathione, de lipoperóxidos, de ferro e mensuração de alguns marcadores farmacodinâmicos da ferroptose, realizando a comparação com o sistema controle.

REFERÊNCIAS

AN, Sai *et al.* Amino Acid Metabolism Abnormity and Microenvironment Variation Mediated Targeting and Controlled Glioma Chemotherapy. [s. l.], p. 1–13, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/sml.201601249>

BAJAJ, Jeevisha *et al.* CD98-Mediated Adhesive Signaling Enables the Establishment and Propagation of Acute Myelogenous Leukemia. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 30, n. 5, p. 792–805, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.003>

BANJAC, A. *et al.* The cystine/cysteine cycle: A redox cycle regulating susceptibility versus resistance to cell death. **Oncogene**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 1618–1628, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210796>

BARAUNA, Sara C. *et al.* Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 160–169, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.07.030>

BATISTA, J. E.C. *et al.* Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 25, p. 52–60, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.12.005>

BEAUMONT, A.; WHITTLE, I. R. The pathogenesis of tumour associated epilepsy. **Acta Neurochirurgica**, [s. l.], v. 142, n. 1, p. 1–15, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s007010050001>

BELOV KIRDAJOVA, Denisa *et al.* Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 14, n. March, p. 1–27, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00051>

BERENDSEN, H. J.C. *et al.* Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.448118>

BHUTIA, Sujit K *et al.* Plant lectins in cancer therapeutics : Targeting apoptosis and autophagy- dependent cell death. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 144, n. January, p. 8–18, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.04.001>

BULUS, Nada *et al.* CD98 increases renal epithelial cell proliferation by activating MAPKs. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 1–12, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040026>

CANTOR, Joseph *et al.* CD98hc facilitates B cell proliferation and adaptive humoral immunity. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 412–419, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.1712>

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, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1389203720666190104123210>

CAVADA, Benildo Sousa *et al.* Molecular dynamics and binding energy analysis of *Vatairea guianensis* lectin: a new tool for cancer studies. **Journal of Molecular Modeling**, [s. l.], v. 26, n. 2, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00894-019-4281-3>

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, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.100>

DAVIS, Mary. Glioblastoma: overview of disease and treatment. **Clinical Journal Of Oncology Nursing**, [S.L.], v. 20, n. 5, p. 1-14, 1 out. 2016. Oncology Nursing Society (ONS). <http://dx.doi.org/10.1188/16.cjon.s1.2-8>.

DE OLIVEIRA SILVA, Flávio *et al.* Immunostimulatory activity of ConBr: A focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 346, n. 2, p. 237–244, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1239-x>

DELGADO-LÓPEZ, P. D.; CORRALES-GARCÍA, E. M. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. **Clinical and Translational**

Oncology, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 1062–1071, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12094-016-1497-x>

DIGOMANN, David *et al.* The CD98 heavy chain is a marker and regulator of head and neck squamous cell carcinoma radiosensitivity. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 3152–3163, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2951>

DIGOMANN, David; LINGE, Annett; DUBROVSKA, Anna. SLC3A2/CD98hc, autophagy and tumor radioresistance: a link confirmed. **Autophagy**, [s. l.], v. 15, n. 10, p. 1850–1851, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1639302>

DIXON, Scott J. *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, [s. l.], v. 149, n. 5, p. 1060–1072, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>

DIXON, Scott J.; STOCKWELL, Brent R. The hallmarks of ferroptosis. **Annual Review of Cancer Biology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 35–54, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030518-055844>

DUHOVNY, Dina; NUSSINOV, Ruth; WOLFSON, Haim J. Efficient unbound docking of rigid molecules. **Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)**, [s. l.], v. 2452, p. 185–200, 2002. Disponível em: https://doi.org/10.1007/3-540-45784-4_14

ESSMANN, Ulrich *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. **The Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 103, n. 19, p. 8577–8593, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/1.470117>

FAHEINA-MARTINS, Glaucia V. *et al.* Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1161–1169, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.06.017>

FERAL, Chloe C. *et al.* CD98hc (SLC3A2) mediates integrin signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 355–360, 2005. Disponível em:

<https://doi.org/10.1073/pnas.0404852102>

FOTIADIS, Dimitrios; KANAI, Yoshikatsu; PALACÍN, Manuel. The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 34, n. 2–3, p. 139–158, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.10.007>

FULDA, Simone. Cell death-based treatment of glioblastoma. **Cell Death and Disease**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0021-8>

GLANTZ, M. J. *et al.* Practice parameter: Anticonvulsant prophylaxis in patients with newly diagnosed brain tumors: Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, [s. l.], v. 54, n. 10, p. 1886–1893, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.54.10.1886>

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, n. September, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114786>

HANAHAH, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HARA, Kaori *et al.* Malignant transformation of NIH3T3 cells by overexpression of early lymphocyte activation antigen CD98. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 262, n. 3, p. 720–725, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1051>

HAYNES, Barton F. Human T Lymphocyte Antigens as Defined by Monoclonal Antibodies. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 127–161, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1981.tb00445.x>

IAPAER, Shabierjiang J *et al.* Resistance for Glioblastoma. [s. l.], p. 405–421, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2018-0141>

JACQUES, Amanda V. *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>

JO, Sunhwan *et al.* Software News and Updates CHARMM-GUI : A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. [s. l.], 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc>

KAIRA, Kyoichi *et al.* CD98 is a promising prognostic biomarker in biliary tract cancer. **Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 654–657, 2014. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(14\)60278-2](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(14)60278-2)

KIRSCHNER, Karl N.; YONGYE, Austin B.; TSCHAMPEL, Sarah M.; GONZÁLEZ-OUTEIRIÑO, Jorge; DANIELS, Charlisa R.; FOLEY, B. Lachele; WOODS, Robert J.. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. carbohydrates. **Journal Of Computational Chemistry**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 622–655, 11 set. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20820>.

KLAUDA, Jeffery B. *et al.* Update of the CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. **Journal of Physical Chemistry B**, [s. l.], v. 114, n. 23, p. 7830–7843, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jp101759q>

KOPPULA, Pranavi *et al.* The glutamate/cystine antiporter SLC7A11/xCT enhances cancer cell dependency on glucose by exporting glutamate. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 292, n. 34, p. 14240–14249, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.798405>

KOPPULA, Pranavi; ZHUANG, Li; GAN, Boyi. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy. **Protein and Cell**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. 599–620, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00789-5>

KRIEGER, Elmar *et al.* Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, [s. l.], v. 77, n.

SUPPL. 9, p. 114–122, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/prot.22570>

LANG, Fengchao *et al.* Genotoxic therapy and resistance mechanism in gliomas. **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 228, p. 107922, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107922>

LEE, Jumin *et al.* CHARMM-GUI supports the Amber force fields. **Journal of Chemical Physics**, [s. l.], v. 153, n. 3, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1063/5.0012280>

LEWERENZ, J. *et al.* Mutation of ATF4 mediates resistance of neuronal cell lines against oxidative stress by inducing xCT expression. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 847–858, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.165>

LEWERENZ, Jan *et al.* The cystine/glutamate antiporter system xc- in health and disease: From molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. **Antioxidants and Redox Signaling**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 522–555, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4391>

LIU, Jinyun; XIA, Xiaojun; HUANG, Peng. xCT: A Critical Molecule That Links Cancer Metabolism to Redox Signaling. **Molecular Therapy**, [s. l.], v. 28, n. 11, p. 2358–2366, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.08.021>

LIUBINAS, Simon V. *et al.* Tumour associated epilepsy and glutamate excitotoxicity in patients with gliomas. **Journal of Clinical Neuroscience**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 899–908, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2014.02.012>

LOUIS, David N. *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, [s. l.], v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>

MATSUO, Hirotaka *et al.* Identification of a novel Na⁺-independent acidic amino acid transporter with structural similarity to the member of a heterodimeric amino acid transporter family associated with unknown heavy chains. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 23, p. 21017–21026, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M200019200>

MATTIUZZI, Camilla; LIPPI, Giuseppe. Current cancer epidemiology. **Journal of Epidemiology and Global Health**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 217–222, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2991/jegh.k.191008.001>

NAKAMURA, Eijiro *et al.* 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 274, n. 5, p. 3009–3016, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.5.3009>

NASCIMENTO, Kyria Santiago *et al.* Homology modeling, molecular docking, and dynamics of two α -methyl-d-mannoside-specific lectins from Arachis genus. **Journal of Molecular Modeling**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00894-018-3800-y>

NECO, Antonio Hadson Bastos *et al.* Structural analysis, molecular docking and molecular dynamics of an edematogenic lectin from Centrolobium microchaete seeds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 117, p. 124–133, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.166>

NGUYEN, Hang Thi Thu *et al.* Intestinal epithelial cell-specific CD98 expression regulates tumorigenesis in Apc Min/mice. **Laboratory Investigation**, [s. l.], v. 92, n. 8, p. 1203–1212, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.83>

OKUNO, S. *et al.* Role of cystine transport in intracellular glutathione level and cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 88, n. 6, p. 951–956, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600786>

PARKER, Joanne L. *et al.* Molecular basis for redox control by the human cystine/glutamate antiporter system xc⁻. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 1–11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27414-1>

PEUMANS, W. J. *et al.* Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [s. l.], v. 491, p. 27–54, 2001. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1267-7_3

PINTO-JUNIOR, Vanir Reis *et al.* Molecular modeling, docking and dynamics

simulations of the Dioclea lasiophylla Mart. Ex Benth seed lectin: An edematogenic and hypernociceptive protein. **Biochimie**, [s. l.], v. 135, p. 126–136, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.02.002>

POLEWSKI, Monika D. *et al.* Increased expression of system xc- in glioblastoma confers an altered metabolic state and temozolomide resistance. **Molecular Cancer Research**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1229–1242, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0028>

POWLESLAND, Alex S. *et al.* Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. **Glycobiology**, [s. l.], v. 19, n. 8, p. 899–909, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwp065>

REIFENBERGER, Guido *et al.* Advances in the molecular genetics of gliomas-implications for classification and therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 434–452, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.204>

RICARD, Damien *et al.* Primary brain tumours in adults. **The Lancet**, [s. l.], v. 379, n. 9830, p. 1984–1996, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61346-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61346-9)

RIEGER, Débora K. *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>

RODRIGUEZ, Carlos F. *et al.* Structural basis for substrate specificity of heteromeric transporters of neutral amino acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 118, n. 49, p. 1–10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.2113573118>

ROE, Daniel R.; CHEATHAM, Thomas E. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 3084–3095, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ct400341p>

RUSSI, Michael A. *et al.* ConBr, a lectin from canavalia brasiliensis seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. **Neurochemical**

Research, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 288–297, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-011-0608-x>

RYCKAERT, Jean Paul; CICCOTTI, Giovanni; BERENDSEN, Herman J.C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. **Journal of Computational Physics**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 327–341, 1977. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(77\)90098-5](https://doi.org/10.1016/0021-9991(77)90098-5)

SALMAGGI, A. *et al.* A multicentre prospective collection of newly diagnosed glioblastoma patients in Lombardia, Italy. **Neurological Sciences**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 227–234, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10072-005-0465-y>

SANTIAGO-GÓMEZ, Angélica *et al.* 4F2hc-silencing impairs tumorigenicity of HeLa cells via modulation of galectin-3 and β -catenin signaling, and MMP-2 expression. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [s. l.], v. 1833, n. 9, p. 2045–2056, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.04.017>

SATO, Hideyo *et al.* Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 274, n. 17, p. 11455–11458, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11455>

SATO, Hideyo *et al.* Redox imbalance in cystine/glutamate transporter-deficient mice. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 280, n. 45, p. 37423–37429, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M506439200>

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, Dina *et al.* PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 33, n. SUPPL. 2, p. 363–367, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gki481>

SHI, Yigong. Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. **Annual Review of Biophysics**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 51–72, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-083012-130429>

SHIH, Andy Y. *et al.* Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation. **Journal of**

Neuroscience, [s. l.], v. 26, n. 41, p. 10514–10523, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3178-06.2006>

SILVA, Flávio de Oliveira *et al.* Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 276–282, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.01.005>

SONTHEIMER, Harald. A role for glutamate in growth and invasion of primary brain tumors. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 105, n. 2, p. 287–295, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05301.x>

STOCKWELL, Brent R. *et al.* Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. **Cell**, [s. l.], v. 171, n. 2, p. 273–285, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>

STOURAC, Jan *et al.* Caver Web 1.0: Identification of tunnels and channels in proteins and analysis of ligand transport. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 47, n. W1, p. W414–W422, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz378>

TIAN, Chuan *et al.* Ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution. **Journal of Chemical Theory and Computation**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 528–552, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00591>

TREJO-SOL, Cristina *et al.* Autophagic and Apoptotic Pathways as Targets for Chemotherapy in Glioblastoma. [s. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms19123773>

TSANEVA, Mariya; VAN DAMME, Els J.M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate Journal**, [s. l.], v. 37, n. 5, p. 533–551, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10719-020-09942-y>

VAN BREEMEN, Melanie SM; WILMS, Erik B.; VECHE, Charles J. Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management. **Lancet Neurology**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 421–430, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70103-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70103-5)

VAN MEER, Gerrit; VOELKER, Dennis R.; FEIGENSON, Gerald W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. **Nature Reviews Molecular Cell**

Biology, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 112–124, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm2330>

WELLER, Michael *et al.* Glioma. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 1, n. July, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.17>

WOLIN, Ingrid A.V. *et al.* ConBr lectin modulates MAPKs and Akt pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon caspase-8 activation. **Biochimie**, [s. l.], v. 180, p. 186–204, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.003>

WU, Yinan *et al.* Ferroptosis in Cancer Treatment : Another Way to Rome. [s. l.], v. 10, n. September, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.571127>

XIAO, Bo *et al.* Silencing of Intestinal Glycoprotein CD98 by Orally Targeted Nanoparticles Enhances Chemosensitization of Colon Cancer. **ACS Nano**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 5253–5265, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b08499>

YAN, Renhong *et al.* Structure of the human LAT1–4F2hc heteromeric amino acid transporter complex. **Nature**, [s. l.], v. 568, n. 7750, p. 127–130, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1011-z>

YAN, Renhong *et al.* The structure of erastin-bound xCT–4F2hc complex reveals molecular mechanisms underlying erastin-induced ferroptosis. **Cell Research**, [s. l.], n. July 2021, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41422-022-00642-w>

YE, Peng *et al.* Nrf2- and ATF4-Dependent Upregulation of xCT Modulates the Sensitivity of T24 Bladder Carcinoma Cells to Proteasome Inhibition. **Molecular and Cellular Biology**, [s. l.], v. 34, n. 18, p. 3421–3434, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mcb.00221-14>

ZILKA, Omkar *et al.* On the Mechanism of Cytoprotection by Ferrostatin - 1 and Liproxstatin - 1 and the Role of Lipid Peroxidation in Ferroptotic Cell Death. [s. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00028>

XAVIER, Mariana Morrone; HECK, Gabriela Sehnem; AVILA, Mauricio Boff de; LEVIN, Nayara Maria Bernhardt; PINTRO, Val Oliveira; CARVALHO, Nathalia Lemes; AZEVEDO, Walter Filgueira de. SAnDReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, [S.L.], v. 19, n. 10, p. 801-812, 20 dez. 2016. Bentham Science Publishers Ltd. <http://dx.doi.org/10.2174/1386207319666160927111347>.