



**CONFORME SOLICITAÇÃO DO AUTOR, ESTA
PRODUÇÃO INTELECTUAL POSSUI RESTRIÇÃO
DE ACESSO**

**CAXIAS DO SUL
2025**



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**POTENCIAL NEUROTÓXICO DE UM POSSÍVEL PRODUTO
DE TRANSFORMAÇÃO DO L-BMAA: O ÁCIDO 1-METIL-2-
OXOIMIDAZOLINA-4-CARBOXÍLICO COMO INDUTOR DE
NEURODEGENERAÇÃO**

Gabriel André Turcatel

CAXIAS DO SUL
2025

Gabriel André Turcatel

**POTENCIAL NEUROTÓXICO DE UM POSSÍVEL PRODUTO
DE TRANSFORMAÇÃO DO L-BMAA: O ÁCIDO 1-METIL-2-
OXOIMIDAZOLINA-4-CARBOXÍLICO COMO INDUTOR DE
NEURODEGENERAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Coorientadora: Prof. Dra. Mariana Roesch Ely

CAXIAS DO SUL

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

T932p Turcatel, Gabriel André

Potencial neurotóxico de um possível produto de transformação do L-BMAA [recurso eletrônico] : o ácido 1-metil-2-oxoimidazolina-4-carboxílico como indutor de neurodegeneração / Gabriel André Turcatel. – 2025.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2025.

Orientação: Sidnei Moura e Silva.

Coorientação: Mariana Roesch Ely.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Biotecnologia. 2. Cianotoxinas. 3. Aminoácidos. 4. Microglia. 5. Aminoácidos Excitatórios. I. Silva, Sidnei Moura e, orient. II. Ely, Mariana Roesch, coorient. III. Título.

CDU 2. ed.: 604.2:577.1

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Márcia Servi Gonçalves - CRB 10/1500

Potencial neurotóxico de um possível produto de transformação do L-BMAA: O ácido 1-metil-2-oxoimidazolina-4-carboxílico como indutor de neurodegeneração

Gabriel André Turcatel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul como parte dos requisitos para a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 04 de dezembro de 2025

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva
Universidade de Caxias do Sul – UCS

Prof. Dra. Ana Paula Duarte Souza
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUC-RS

Prof. Dr. Cháriston André Dal Belo
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge
Universidade de Caxias do Sul – UCS

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas oportunidades recebidas e experiências que me trouxeram até aqui.

Ao meu orientador, Professor Dr. Sidnei Moura e Silva, pela oportunidade e confiança depositada em mim para a condução deste trabalho, pelas orientações e liberdade de escolha.

A Professora Dra. Mariana Roesch Ely, pelo incentivo, conselhos e ensinamentos compartilhados durante este período.

A minha família e amigos pelo apoio, incentivo e compreensão nos momentos marcados por minha ausência.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia, Produtos Naturais e Sintéticos pela amizade construída.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Clínica, por todo o incentivo a cada etapa de meu trabalho.

Aos meus professores da graduação, que seguem presentes na minha vida acadêmica e profissional me apoiando a cada passo de minha jornada.

À Professora Tânia Marcourakis, Juliana Ligia Freires Ribeiro e Matheus Lujan Pereira do Laboratório de Neurotoxicologia da Universidade de São Paulo, por todo o conhecimento compartilhado e contribuições para a realização deste e futuros trabalhos.

À Universidade de Caxias do Sul e a CAPES, pela estrutura e financiamento da pesquisa.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 β -N-METILAMINO-L-ALANINA	13
2.2 INTERAÇÃO ENTRE L-BMAA E ÍONS CARBONATO	18
2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i> PARA ESTUDOS DE NEUROTOXICIDADE.....	19
2.3.1 Linhagem microglial BV-2	20
2.3.2 Linhagem celular SH-SY5Y	21
3. OBJETIVOS	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 CAPÍTULO 1	26
4.2 CAPÍTULO 2	63
5. DISCUSSÃO GERAL	89
6. CONCLUSÃO	91
7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AEG	N-(2-aminoetil)-glicina
BAMA	β -amino-N-metilalanina
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
Ca ²⁺	Cálcio
ChAT	Colina Acetil Transferase
DAB	Ácido 2,4-diaminobutanoico
db-cAMP	Dibutiril Monofosfato Cíclico de Adenosina
DL	Dose Letal
ECM	matriz extracelular
ELA/PDC	Esclerose Lateral Amiotrófica associada ao Complexo Parkinson-Demência
GLS	Glutaminase
GLUL	Glutamato Amônia Ligase
HRSM	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
iGluRs	Receptores Ionotrópicos de L-Glutamato
K ⁺	Potássio
IL	Interleucina
L-BMAA	β -N-metilamino-L-alanina
L-Glu	L-Glutamato
MAC	Marcadores de Células Microgliais
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
Na ⁺	Sódio
NGF	Fator de Crescimento Neural
NMDA	N-metil-D-aspartato
PKA	Proteína Quinase A
RA	Ácido retinoico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TPA	12-O-tetradecanoil-forbol-13

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Palmeira da espécie <i>C. circinalis</i> no ecossistema de Guam.	11
Figura 2. Estrutura do L-BMAA, e alguns dos seus isômeros conhecidos.	14
Figura 3. Mecanismos de neurotoxicidade induzidos pelo L-BMAA.	16
Figura 4. Comparação da estrutura química entre compostos excitatórios do SNC como L-Glutamato e ácido caínico e L-BMAA.	18
Figura 5. Estrutura química da L-BMAA em solução considerando o pH fisiológico.	19
Figura 6. Equilíbrio químico proposto entre L-BMAA e <i>addutos</i> de carbonato.	19
Figura 7. Linhagem celular murina BV-2. Aumento de 20 ×	20
Figura 8. A) Células da linhagem SH-SY5Y indiferenciadas. B) Células SH-SY5Y diferenciadas a células semelhantes a neurônios a partir de RA e BDNF. Aumento de 20×. .	22

RESUMO

O L-BMAA é um aminoácido não proteínogênico produzido como metabólito secundário por algumas plantas e por espécies de cianobactérias, ganhando destaque por ser associado ao elevado índice de doenças neurodegenerativas na ilha de Guam na década de 80. Sua relação com processos neurodegenerativos foi associada a hiperestimulação de receptores ionotrópicos de L-Glu, interferindo na homeostase do cálcio e induzindo morte celular. Mais tarde estudos comprovaram através de modelos *in vitro* que a toxicidade deste é dependente do íon carbonato, capaz de formar *addutos* com L-BMAA em condições fisiológicas. Em trabalhos anteriores, foi identificado um possível marcador com *m/z* 145, o qual foi relacionado a formação de um ciclo guanidínico (ácido 1-metil-2-oxoimidazolina-4-carboxílico) – BMAA cíclico. Da mesma forma, outros compostos endógenos e exógenos são relacionados à hiperestimulação de iGluRs e, conseqüentemente, processos neurodegenerativos. Inicialmente foi realizada uma ampla revisão abordando o potencial neurotóxico e relação estrutura-atividade de cinco agonistas de iGluRs, incluindo L-BMAA, β-ODAP, ácido domoico, ácido quínolínico e ácido L-homocisteico. Ainda, foi proposta uma rota de síntese para o BMAA cíclico e sua toxicidade avaliada em modelos *in vitro* frente a linhagem microglial BV-2 através dos ensaios de MTT, avaliação de ROS, potencial de membrana mitocondrial e mecanismo de morte celular por fluorescência. Como resultado, o composto foi sintetizado com pureza de 86% e teve sua estrutura química confirmada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR). Foram definidas as concentrações de 0.21 ± 0.12 e 0.8 ± 0.09 mM como DL₂₅ e DL₅₀ para células BV-2, respectivamente. Tanto o ensaio MTT quanto a análise morfológica das células após 24 de tratamento demonstraram efeito dose-dependente. Ensaios de fluorescência ainda revelaram os efeitos agudos do BMAA-cíclico como indução de apoptose e aumento de ROS. Em resumo, este trabalho demonstra a possibilidade deste composto ter um efeito inédito de toxicidade, o qual pode ser a peça-chave para responder pelos efeitos demonstrados a mais de 40 anos, relacionados ao maior índice de neurodegeneração conhecido no mundo.

Palavras-chave: Cianotoxinas; L-BMAA; Célula Microglial; Ácido 2-amino-3(metilamino)propiônico; Aminoácidos Excitatórios; Glutamato.

ABSTRACT

L-BMAA is a non-proteinogenic amino acid produced as a secondary metabolite by some plants and cyanobacteria species, gaining prominence for its association with a high incidence of neurodegenerative diseases on the island of Guam in the 1980s. Its relationship with neurodegenerative processes was linked to the hyperstimulation of ionotropic L-Glu receptors, interfering with calcium homeostasis and inducing cell death. Later studies, using in vitro models, confirmed that its toxicity is dependent on the carbonate ion, capable of forming adducts with L-BMAA under physiological conditions. In previous work, a possible marker with m/z 145 was identified, which was related to the formation of a guanidine ring (1-methyl-2-oxoimidazoline-4-carboxylic acid) – cyclic BMAA. Similarly, other endogenous and exogenous compounds are related to the hyperstimulation of iGluRs and, consequently, neurodegenerative processes. Initially, a comprehensive review was conducted addressing the neurotoxic potential and structure-activity relationship of five iGluR agonists, including L-BMAA, β -ODAP, domoic acid, quinolinic acid, and L-homocysteic acid. Furthermore, a synthesis route for cyclic BMAA was proposed, and its toxicity was evaluated in vitro against the BV-2 microglial cell line using MTT assays, ROS assessment, mitochondrial membrane potential, and fluorescence-based cell death mechanism analysis. As a result, the compound was synthesized with 86% purity, and its chemical structure was confirmed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and High-Resolution Mass Spectrometry (HRMS). Concentrations of 0.21 ± 0.12 and 0.8 ± 0.09 mM were defined as the LD₂₅ and LD₅₀ for BV-2 cells, respectively. Both the MTT assay and morphological analysis of cells after 24 hours of treatment demonstrated a dose-dependent effect. Fluorescence assays further revealed the acute effects of cyclic BMAA, such as induction of apoptosis and increased ROS. In summary, this work demonstrates the possibility of this compound having a novel toxicity effect, which may be the key to explaining the effects demonstrated for over 40 years, related to the highest known rate of neurodegeneration in the world.

Keywords: Cyanotoxins; L-BMAA; Microglial Cell; 2-amino-3(methylamino)propionic acid; Excitatory Amino Acids; Glutamate.