

## 6 LIGANTES

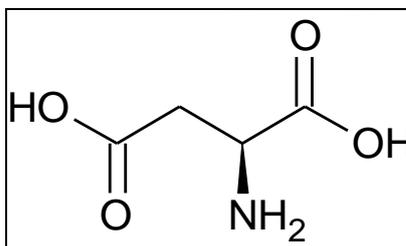
### 6.1. Aminoácidos presentes na placa $\beta$ -amilóide

Como descrito em 3.4.1, a placa  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ 1-42), composta pela sequência de 42 aminoácidos (Figura 7), é o principal componente das placas senis encontradas no cérebro de pacientes com Alzheimer e é apontada como responsável pelos sintomas patológicos associados a esta doença neurodegenerativa. No cérebro de pacientes com Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas são encontrados diversos fragmentos peptídicos e elevada concentração de íons metálicos, entre eles o Cu(II). Estudos mostram que anomalias na interação entre o íon metálico e a proteína  $\beta$ -amilóide levam a precipitação de agregados A $\beta$ -amilóide<sup>6.0</sup>. Para complementar estudos em solução que estão sendo desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa<sup>6.1, 6.2</sup>, foram escolhidos seis aminoácidos da placa amilóide.

**H<sub>2</sub>N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gly-Lys-  
Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-  
Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-Ile-Ala-COOH**

**Figura 7 Sequência de aminoácidos da proteína  $\beta$ -amilóide (A $\beta$ 1-42)**

### 6.1.1. Ácido Aspártico



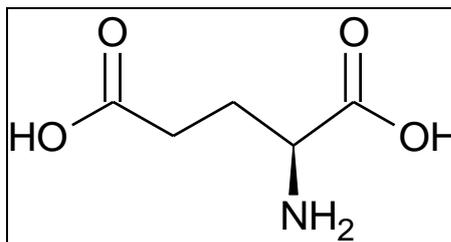
**Figura 8 Estrutura do ácido aspártico**

A figura 8 mostra a fórmula estrutural do ácido aspártico, ou aspartato (Asp), também denominado ácido aminosuccínico, ácido aminobutanodióico e 1-amino-1,2-carboxietano, que possui fórmula geral  $C_4H_7NO_4$  e massa molar 133,10 g/mol. Sua solubilidade em água é de 0,775g por 100 mL a 25 °C. O ácido aspártico se comporta como um ácido triprótico. Em solução aquosa, existem três constantes de dissociação<sup>6.3, 6.4</sup>:  $pK_1 = 1,88$  (1º grupo carboxilato);  $pK_2 = 3,65$  (2º grupo carboxilato);  $pK_3 = 9,60$  (grupo amino).

Ácido aspártico é um dos principais neurotransmissores excitatórios do córtex cerebral, está amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC) e tem papel em processos como aprendizado, memória e desenvolvimento das conexões sinápticas normais do cérebro<sup>6.5</sup>. Os receptores pré-sinápticos são abundantes nas terminações nervosas do hipocampo, permitindo o influxo de cálcio de forma lenta, o que promove a liberação do aspartato. Este processo está relacionado à maturação neuronal, aprendizado e memória<sup>6.6</sup>. Os receptores de aspartato elevam as concentrações intracelulares de cálcio e por isso parecem estar envolvidos nos mecanismos de morte celular<sup>6.7</sup>.

A atuação dos neurotransmissores excitatórios no SNC é tão potente que diversas pesquisas indicam que existe uma relação entre degenerações neurológicas como Parkinson e Alzheimer e uma hiperatividade dos mesmos<sup>6.8</sup>.

### 6.1.2. Ácido Glutâmico



**Figura 9** Estrutura do ácido glutâmico

Na figura 9 pode ser observada a fórmula estrutural do ácido 2-aminopentanodióico, conhecido como ácido glutâmico ou glutamato (Glu), que possui fórmula mínima  $C_5H_9NO_4$  e massa molar 147,11 g/mol. Sua temperatura de fusão é de 160 °C e solubilidade igual a 7,2g/L de água a 20 °C. Em solução aquosa, existem três constantes de dissociação<sup>6,9</sup>:  $pK_1 = 2,23$  (1º grupo carboxilato);  $pK_2 = 4,42$  (2º grupo carboxilato);  $pK_3 = 7,30$  (grupo amino).

O glutamato é um aminoácido não essencial que possui estrutura semelhante ao aspartato e, assim como ele, é um dos principais neurotransmissores excitatórios e está envolvido em funções cognitivas, como a aprendizagem e a memória, sendo o mais comum nos mamíferos. Em neurônios produtores de GABA, ele atua também como precursor na síntese deste importante neurotransmissor.

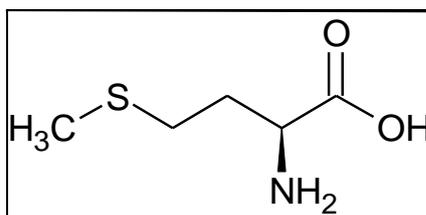
É armazenado em vesículas nas sinapses e o impulso nervoso provoca sua liberação no neurônio pré-sináptico; enquanto que na célula pós-sináptica, receptores como o NMDA se ligam ao glutamato, ativando-se. As membranas de neurônios e da glia possuem transportadores de glutamato, que retiram rapidamente este aminoácido do meio extracelular.

O acúmulo de glutamato, assim como o de aspartato, pode ocorrer no meio extracelular quando os transportadores destes aminoácidos funcionam de forma reversa, o que pode ocorrer em situações de patologia cerebral (danos ou doenças). Esta reversão provoca a entrada de íons  $Ca^{2+}$  nas células, através de receptores NMDA, levando a danos neuronais e, eventualmente, à morte celular (apoptose). Este processo é conhecido como excitotoxicidade. A apoptose, que é uma espécie de morte celular programada, é causada por fatores como danos mitocondriais devido ao excesso de  $Ca^{2+}$

<sup>6.10</sup> e promoção de fatores de transcrição de genes pró-apoptóticos (ou repressão de fatores de transcrição de genes antiapoptóticos) mediada pelo glutamato e pelo  $\text{Ca}^{2+}$ .

A excitotoxicidade devido ao acúmulo de glutamato ocorre em episódios de isquemia cerebral e apoplexia e está associada a doenças como Esclerose Lateral Amiotrófica, latirismo e Doença de Alzheimer.

### 6.1.3. Metionina



**Figura 10 Estrutura da metionina**

Na forma estrutural da metionina (Met) (figura 10), pode-se observar que este ligante é um aminoácido sulfurado. Também denominado ácido 2-amino-4-metil tiobutírico, ou  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -ácido metilmercaptobutírico, possui fórmula geral  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$  e massa molar 149,21 g/mol. A sua solubilidade em água é de 30g/L a 20 °C e decompõe-se a 140 °C. Em solução aquosa, existem duas constantes de dissociação<sup>6.11</sup>:  $\text{pK}_1 = 2,25$  (grupo carboxilato);  $\text{pK}_2 = 9,22$  (grupo amino).

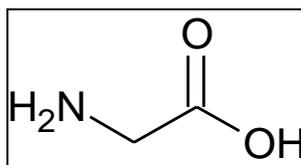
A metionina é um aminoácido essencial e, portanto, não é sintetizado pelo organismo, sendo obtido pela dieta alimentar. Trigo carne e peixes são exemplo de alimentos ricos em metionina. As necessidades deste aminoácido são avaliadas entre 800 e 3000 mg por dia<sup>6.12</sup>. Aproximadamente 80 % da metionina ingerida através da dieta são transformados em cisteína que, além de formar parte das proteínas, origina diversas moléculas de interesse biológico<sup>6.8</sup>.

A metionina é fundamental para a síntese de moléculas biológicas como betaína, carnitina, epinefrina, ergosterol, melatoína, metanefrina, sarcosina, normetanefrina e ácidos nucleicos<sup>6.13</sup>. Além disso, nos organismos, tem função de defesa antioxidante, permitindo a oxidação de resíduos de metionina nos canais protéicos e, desta forma, protegendo outros aminoácidos. Isto justifica a presença da metionina nos sítios ativos de algumas enzimas, como o peptídeo metionina-sulfoxido-reductase (pMRS), enzima específica do cérebro, e na proteína  $\beta$ -amilóide ( $\text{A}\beta_{1-42}$ ), onde ocupa a posição 35<sup>6.14</sup>.

<sup>6.17</sup>, (figura 7). Pacientes com Alzheimer apresentam uma atividade reduzida da enzima pMRS, o que sugere que os resíduos de metionina não exercem sua função antioxidante, ou seja, a metionina é oxidada a sulfóxido, o qual possivelmente é atacado por radicais hidroxila formando outros radicais que produzem sulfonas de maneira irreversível<sup>6.16, 6.17</sup>.

Estudos teóricos computacionais da proteína A $\beta$ -amilóide sugerem uma possível interação do radical sulfuramyl da Met35 com outra molécula de A $\beta$ 1-42, extraindo um átomo de hidrogênio do carbono  $\alpha$  da Gly33 do peptídeo adjacente<sup>6.18</sup>. Com base em trabalhos experimentais, tem-se sugerido que a oxidação da metionina pode exercer um mecanismo de proteção que atua como um tampão, protegendo assim a célula dos graves danos causados pelos processos oxidativos<sup>6.14-6.16</sup>.

#### 6.1.4. Glicina



**Figura 11 Estrutura da glicina**

A figura 11 representa a fórmula estrutural da glicina (Gli), que é o aminoácido mais simples, também denominado ácido aminoacético ou ácido aminoetanóico. Possui fórmula molecular  $C_2H_5NO_2$  e massa molar de 75,07 g/mol, bem como apenas um grupamento carboxílico e um amino. No estado sólido a decomposição se inicia a 200 °C. Sua solubilidade em água é igual a 25 g/100 g de água a 25 °C. Em solução aquosa, possui duas constantes de dissociação<sup>6.2</sup>:  $pK_1 = 2,34$  (grupo carboxilato);  $pK_2 = 9,60$  (grupo amino).

A glicina é um aminoácido inibidor do SNC, apresentando efeito específico de inibição nos neurônios pós-sinápticos e agindo de forma semelhante à do ácido gama aminobutírico (GABA), apesar de apresentarem estruturas e rotas metabólicas bem diferentes. A liberação destes dois neurotransmissores é dependente da concentração de cálcio. Ambos inibem a ativação neuronal e abrem os canais de cloreto, no entanto possuem características farmacológicas distintas<sup>6.4, 6.19</sup>. Alterações nos níveis e funções de glicina e GABA estão relacionadas a diversos estados patológicos originados no

SNC. Cálculos teóricos realizados em A $\beta$ -amilóide (1-42) sugerem que a glicina 33 é um sítio importante de propagação de radicais livres, devido ao fato de que pode ser facilmente atacada pelos radicais livres que contêm o átomo enxofre, provenientes do resíduo de metionina 35 do peptídeo adjacente, extraindo o átomo de hidrogênio central da glicina, o qual se liga rapidamente a um átomo de oxigênio formando um radical peroxila, contribuindo para a neurotoxicidade do peptídeo<sup>6,18</sup>.

#### 6.1.5. Serina

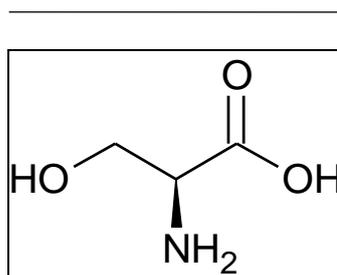
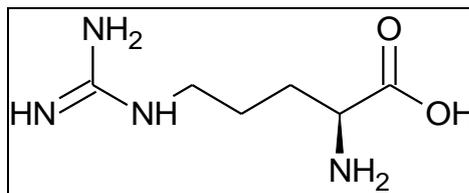


Figura 12 Estrutura da serina

A figura 12 representa a fórmula estrutural do ácido 2-amino-3-hidroxiopropanóico, ou ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hidroxipropiônico, mais conhecido como serina (Ser), que possui fórmula geral  $C_3H_7NO_3$  e massa molar igual a 105,09 g/mol. No estado sólido, ocorre apreciável decomposição acima de 45 °C. É um aminoácido hidroxilado do grupo de aminoácidos não essenciais e, apesar de possuir um grupamento OH a mais, a sua solubilidade é de apenas 5g/100g de água a 25 °C e é praticamente insolúvel em solventes neutros como o etanol. Em solução aquosa, a serina também se comporta como um ácido diprótico e possui as seguintes constantes de dissociação<sup>6,2</sup>:  $pK_1 = 2,21$ ;  $pK_2 = 9,15$ .

No cérebro, a D-serina atua na formação das esfingomielinas e modula os receptores de glutamato do tipo NMDA. Estes receptores estão relacionados a diversas funções cerebrais, incluindo os processos de aprendizado e memória.

### 6.1.6. Arginina

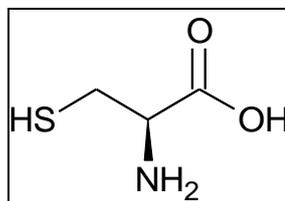


**Figura 13 Estrutura da arginina**

A figura 13 representa a fórmula estrutural do ácido 2-amino-5-guanido-pentanóico, conhecido como L-arginina (Arg), ou simplesmente arginina, que possui fórmula geral  $C_6N_4H_{14}O_2$  e massa molar igual a 174,21 g/mol, decompõe-se a uma temperatura de 238 °C e sua solubilidade em água é de 15g/100g, a 21 °C. Este aminoácido é classificado como um  $\alpha,\omega$ -diaminocarboxilato e possui três valores para pKa: pK1 = 2,17 (grupo carboxilato); pK2 = 9,04 (grupo  $\alpha$ -amino); pK3 = 12,48 (pertencente à parte guanidina da L-arginina, caracterizada como um ácido fraco).

## 6.2. Outros aminoácidos presentes no cérebro

### 6.2.1. Cisteína



**Figura 14 Estrutura da cisteína**

A Figura 14 mostra a fórmula estrutural da cisteína (Cis), um aminoácido não essencial, também denominado ácido (R)-2-amino-3-mercaptopropanóico, ou ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -propanotiol. É um aminoácido sulfurado, possui fórmula geral  $C_3H_7NO_2S$  e massa molar 121,16 g/mol. Tem ponto de fusão em 178 °C e solubilidade em água de 160g/L a 20 °C. Em solução aquosa, a cisteína apresenta as seguintes constantes de dissociação<sup>6,20</sup>  $pK_1= 1,71$ (grupo carboxilato);  $pK_2=8,36$ (grupo tiol);  $pK_3=10,77$ (grupo amino).

Apesar de não fazer parte da constituição da  $\beta$ -amilóide, a cisteína foi escolhida como ligante porque sua atividade antioxidante tem sido amplamente estudada<sup>6,21, 6,22</sup>. É encontrada no cérebro<sup>6,23, 6,24</sup> e pertence à rota metabólica de neurotransmissores como a taurina, em que atua como seu precursor direto<sup>6,12, 6,25</sup>.

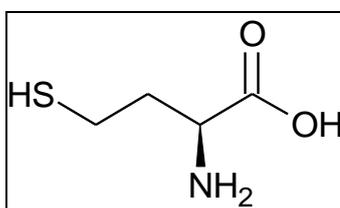
É sintetizada a partir da metionina através de uma transmetilação, em que a metionina se transforma em homocisteína, com subsequente transulfuração, na qual a homocisteína passa a cisteína<sup>6,12</sup>.

A rota metabólica da cisteína, como a de outros aminoácidos sulfurados (metionina e cistina), permite visualizar sua interconexão metabólica com o neurotransmissor excitatório aspartato e o neurotransmissor inibitório taurina, assim como com o ácido oxaloacético e o piruvato<sup>6,12</sup>. A presença do grupo tiol (-SH) confere à cisteína características específicas, favorecendo reações de oxi-redução que dão lugar à formação de ligações dissulfeto, unindo covalentemente dois peptídeos ou duas regiões do mesmo polipeptídeo<sup>6,26</sup>.

Nos sistemas biológicos, a cisteína é o único aminoácido que combina a capacidade nucleofílica, uma extensa atividade redox e a capacidade de ligação a íons

metálicos tais como  $\text{Fe}^{2+/3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{+/2+}$ . Estas propriedades excepcionais podem ser explicadas pelas características químicas do grupo tiol e fazem da cisteína uma parte essencial na formação de muitas proteínas e representando um componente chave na atividade catalítica de diversas enzimas<sup>6.26, 6.27</sup>.

### 6.2.2. Homocisteína



**Figura 15 Estrutura da homocisteína**

A Figura 15 mostra a fórmula estrutural do ácido 2-amino-4-mercaptopbútrico, conhecido como homocisteína (hCis), que apresenta possui mínima  $\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$  e massa molar 135,18 g/mol. Em solução aquosa, a homocisteína possui as seguintes constantes de dissociação:  $\text{pK}_1 = 2,40$  (grupo carboxilato);  $\text{pK}_2 = 8,92$  (grupo tiol);  $\text{pK}_3 = 10,47$  (grupo amino).

Este aminoácido foi escolhido como um dos ligantes porque tem sido encontrado em alta concentração no plasma de pacientes com Alzheimer<sup>6.28, 6.29</sup>. É um aminoácido endógeno contendo um grupo tiol, que é produzido metabolicamente pela desmetilação da metionina e está envolvido em vários processos bioquímicos.

A determinação de hCis em fluidos biológicos (plasma, especialmente) é muito importante porque a hiper-homocisteinemia tem sido associada a várias doenças, como problemas coronários, cerebrovasculares, defeitos do tubo neural, distúrbios mentais<sup>6.30</sup> e desenvolvimento da Doença de Alzheimer<sup>6.3</sup>. Níveis elevados de homocisteína no plasma têm sido relacionados não só a distúrbios nas enzimas envolvidas na síntese, *in vivo*, mas também a deficiências nutricionais das vitaminas B6 e B12<sup>6.30</sup>.

Estudos relacionam, simultaneamente, a hiper-homocisteinemia a problemas coronários e Alzheimer, em virtude do elevado nível de hCis no plasma, além disso, tem

sido apontado como maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares<sup>6.31, 6.32</sup> e que as pessoas com fatores de risco cardiovascular têm maiores propensões de sofrer de Alzheimer,<sup>6.31, 6.33-6.35</sup> o que tem sido reforçado pela concentração elevada de hCis presente no plasma de pacientes com Alzheimer<sup>6.28, 6.29</sup>.

As vitaminas do complexo B têm sido apontadas como a melhor proteção contra o aumento da concentração de homocisteína<sup>6.36</sup>.

### **6.3. Compostos usados como suplemento alimentar - auxiliar no tratamento da Doença de Alzheimer**

#### **6.3.1. L-carnitina**

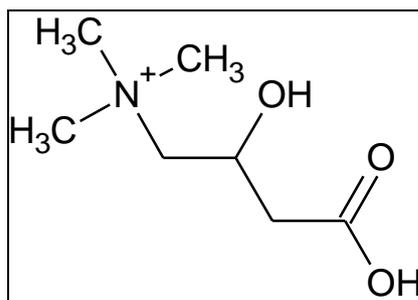
A carnitina é um aminoácido importante na composição das proteínas. Está presente naturalmente nos organismos e é encontrado nos alimentos.

A acetilcarnitina é a forma química ativa que é dada como suplemento. A carnitina está presente no leite materno e é essencial para o desenvolvimento físico e mental normal. Novamente, os níveis diminuem com a idade. A importância da carnitina é que esta é prontamente transformada em acetilcolina, um neurotransmissor que é crítico para os processos de aprendizado e concentração. A acetilcolina é encontrada em praticamente todas as regiões do córtex cerebral. Ao que parece muitas células, em diferentes zonas, podem sintetizar esta molécula, mesmo nas sinapses. Os doentes com Alzheimer apresentam baixo teor de acetilcolina e os primeiros medicamentos para diminuição dos sintomas da doença, são inibidores da acetilcolinesterase, enzima que degrada a acetilcolina.

A carnitina também é essencial para a produção de energia pela mitocôndria. Ela transporta os ácidos graxos através da membrana mitocondrial, onde eles são transformados em energia, além de ajudar na remoção de toxinas que são formadas no mitocôndria como subproduto de reações, permitindo que estas sejam eliminadas do organismo.

A presença da N-acetilcarnitina diminui os problemas causados por metais tóxicos, uma vez que se coordena preferencialmente a metais como mercúrio e chumbo.

A Figura 16 mostra a fórmula estrutural da L-carnitina, que possui fórmula geral  $C_7H_{16}NO_3$  e massa molar de 162,21 g/mol. É um composto de amônio quaternário, que facilita o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro do mitocôndria. No mitocôndria, os ácidos graxos entram no ciclo da beta-oxidação e são convertidos em acetil coenzima A, para posterior entrada no ciclo de Krebs e na cadeia respiratória, com produção de energia<sup>6.37</sup>.

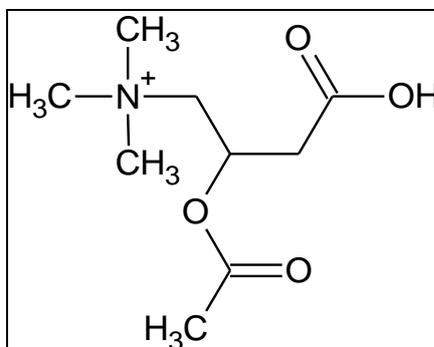


**Figura 16 Estrutura da L-carnitina**

Estudos destacam a ação antioxidante da L-carnitina ao relatarem que ela exerce uma proteção contra doenças relacionadas ao stress oxidativo, como a peroxidação de lipídios<sup>6.38</sup>, síndrome de Down<sup>6.39, 6.40</sup>, falência cardíaca e HIV<sup>6.41</sup>.

Pesquisas recentes reportam que o stress oxidativo gerado pelo acúmulo de cobre leva a um aumento na quantidade de ácidos graxos livres, induzindo disfunção mitocondrial, e que o tratamento com L-carnitina consegue inibir essa disfunção<sup>6.42</sup>. A L-carnitina conjuga-se aos ácidos graxos removendo-os do mitocôndria e, posteriormente, eles são eliminados pela urina.

### 6.3.2. Acetil-L-Carnitina



**Figura 17 Estrutura da acetil-L-carnitina**

A Figura 17 mostra a fórmula estrutural da acetil-L-carnitina, que possui fórmula geral  $C_9H_{18}NO_4$  e massa molar de 204,24 g/mol.

A acetil-L-carnitina é uma forma especial de L-carnitina que entra com mais facilidade no cérebro e tem a capacidade de melhorar a função cerebral, agindo como antioxidante e, com isso, diminuindo o stress oxidativo. Sua ação antioxidante ajuda a prevenir a deterioração do cérebro durante estados de stress e previne os danos que podem ocorrer nas células nervosas cerebrais, quando o aporte de oxigênio ao cérebro está diminuído.

Um estudo científico recente mostrou que a associação de acetil-L-carnitina com o ácido alfa-lipóico melhora o desempenho da memória, pela diminuição dos danos oxidativos nas células cerebrais. A combinação de folato, vitamina E e acetilcarnitina proporciona uma proteção sinérgica contra o stress oxidativo<sup>6.43</sup>.