

## 2 Ligantes

### 2.1 Aminoácidos Sulfurados

As proteínas têm um papel decisivo na produção de espécies reativas oxidantes já que o radical HO<sup>•</sup> reage na cadeia lateral destas, modificando-as pela adição do radical ou pela abstração de hidrogênio [2.1]. Por esta razão, a DA está bastante associada ao estresse oxidativo. Os principais aminoácidos afetados são Cis, Met, histidina, triptofano e fenilalanina, e, em menores proporções, arginina e asparagina [2.2].

Nos aminoácidos sulfurados, além do risco de ataque pelo radical HO<sup>•</sup>, há também o risco de ataque pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que somente oxida proteínas que ofereçam resíduos de Met ou grupos tióis que são muito reativos. Embora este radical seja pouco reativo perante moléculas orgânicas na ausência de metais de transição, exerce um papel importante no estresse oxidativo, pois é capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila [2.2].

Entre as espécies reativas participantes do mecanismo de estresse, destaca-se ainda o ânion radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) que é inesperadamente inativo mas que, no entanto, em solução possui como reação fundamental a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio [2.3].

Como ressaltado anteriormente, a partir da molécula de peróxido de hidrogênio pode haver reações de oxidação com alguns aminoácidos sulfurados.

O O<sub>2</sub><sup>•-</sup> participa também da produção de radical HO<sup>•</sup> através da redução de quelatos de Fe(III), da reação de Fenton, da reação de Haber-Weiss e da sinalização molecular - por meio de sua capacidade de oxidar grupos -SH em ligações dissulfeto [2.2], sendo hábil em ativar e desativar enzimas que contenham cisteína.



Lembra-se que a reação de Fenton é aquela em que o radical hidroxil é formado quando o peróxido de hidrogênio reage com Fe(II) ou Cu(I), a partir das reações:



E a reação de Haber-Weiss é aquela em que o radical hidroxil é formado quando o peróxido de hidrogênio reage com o superóxido sendo a reação catalisada por íons de metais de transição, como o ferro ou cobre.



Os ataques aos aminoácidos pelas espécies reativas podem gerar danos tais como clivagens de ligações, gerando ou não fragmentos, e ligações cruzadas, sendo capaz de gerar sequelas como perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares e morte celular [2.2].

No presente trabalho serão estudados alguns aminoácidos sulfurados relacionados à DA e, desta forma, ao estresse oxidativo. São eles:

- ✓ Met
- ✓ Cis
- ✓ Hcis
- ✓ Pen

As estruturas químicas destes aminoácidos podem ser observadas na Figura 2.1.

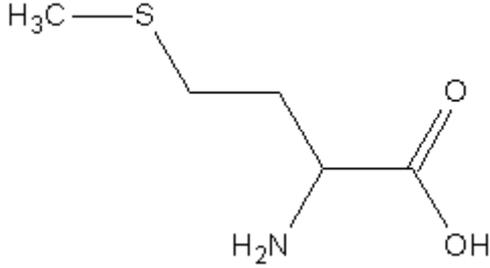
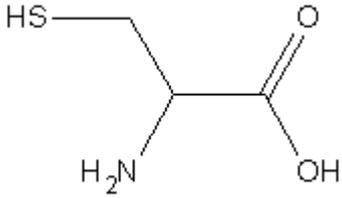
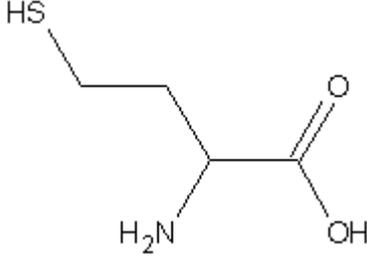
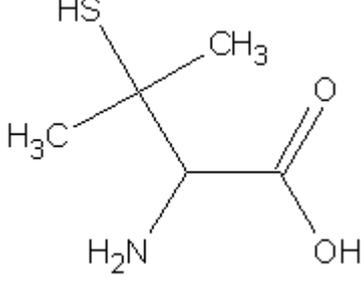
	
<p>Ácido (S)-2-amino-4-(metil sulfonil)- butanóico</p> <p>Metionina</p>	<p>Ácido 2-bis-(2-amino- propiónico)-3-dissulfeto ou Ácido 3-tiol-2-amino-propanóico</p> <p>Cisteína</p>
	
<p>Ácido 2-amino-4-mercaptobutanóico</p> <p>Homocisteína</p>	<p>Dimetilcisteína ou Ácido 2- amino-3-mercapto-3-metilbutírico</p> <p>Penicilamina</p>

Figura 2.1 - Aminoácidos sulfurados em estudo.

Estes ligantes possuem em comum os grupamentos amina, carboxilato e a presença do elemento enxofre em sua estrutura, sendo como sulfidril livre na Cis, Hcis e Pen, e como tioéter na Met. Estes diferem ainda em relação ao tamanho da cadeia e ramificações.

Na Figura 2.2 são exibidos os principais produtos das reações de estresse oxidativo envolvendo os aminoácidos sulfurados. Estes podem participar da patogênese da DA ou serem afetados por esta.

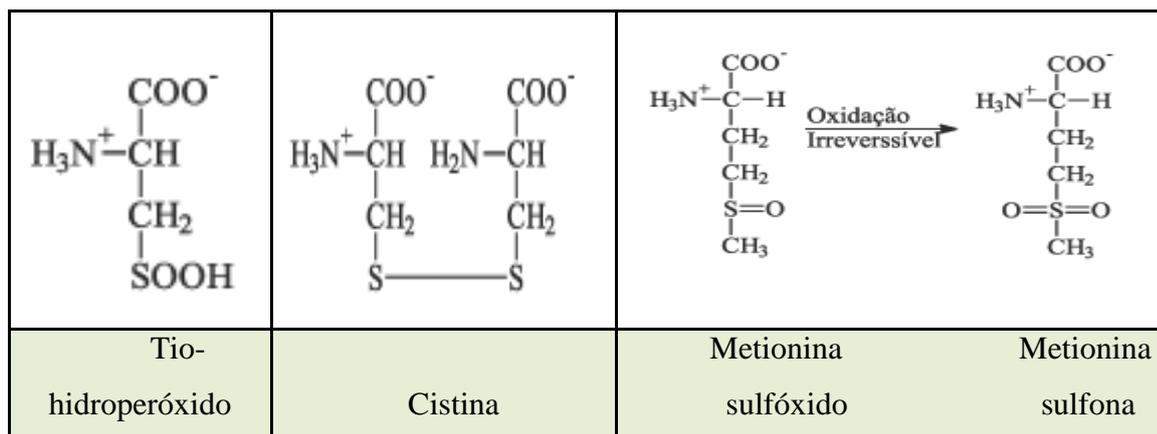


Figura 2.2 - Produtos das reações de estresse oxidativo sobre os aminoácidos sulfurados em estudo [2.2]

Os aminoácidos em estudo estão conectados a outras patologias humanas, além do Alzheimer.

Por exemplo, estudos indicaram que tratamentos de doenças inflamatórias e Aids com compostos que possuam o grupamento sulfidril podem ser benéficos e pesquisas *in vitro* demonstraram que efeitos estimulatórios em fator de necrose tumoral (TNF), induzido por radicais livres na replicação de HIV e monócitos, podem ser inibidos por compostos que tenham este grupamento, o que retardaria o processo inflamatório [2.4, 2.5].

Somando-se a isso, os aminoácidos sulfurados presentes comumente no organismo humano, como a Cis, a Met e a Hcis, contribuem para o metabolismo celular e homeostase do enxofre, havendo indícios recentes de que desequilíbrios no metabolismo de enxofre estariam conectados ao estresse oxidativo e consequentemente às doenças neurodegenerativas [2.6].

Dentre os aminoácidos sulfurados supracitados, a Pen é o único aminoácido sulfurado sintético em estudo. Ela é usada como quelante de íons metálicos em casos de intoxicação e no tratamento da doença de Wilson, tendo sido pesquisada atualmente como possibilidade de terapêutica para pacientes com DA [2.7, 2.8, 2.9].

### 2.1.1 Metionina

A Met é um aminoácido sulfurado essencial que contribui para a síntese de colina, participa na formação de componentes não-protéicos celulares, exerce ação lipotrópica através da betaína - formada pela oxidação da colina e tem relações

com a depressão histadélica, a esquizofrenia, a doença de Parkinson e o Alzheimer [2.10].

A Hcis e a Cis são produzidas a partir da Met, como se pode notar no ciclo bioquímico da Figura 2.3. A produção destas depende da quantidade de Met disponível no organismo. Quando o nível de Met é satisfatório para o desempenho das reações metabólicas, a Hcis fabricada entra na via de transulfuração e é convertida em cistationina. No entanto, quando a conservação de Met é necessária, a Hcis é remetilada e a produção de Hcis e Cis é interrompida [2.1].

A vitamina B<sub>12</sub>, sob forma de metilcobalamina, participa da doação do grupo metil à Hcis, atuando como cofator, portanto, no seu processo de remetilação, transformando-a em Met [2.11].

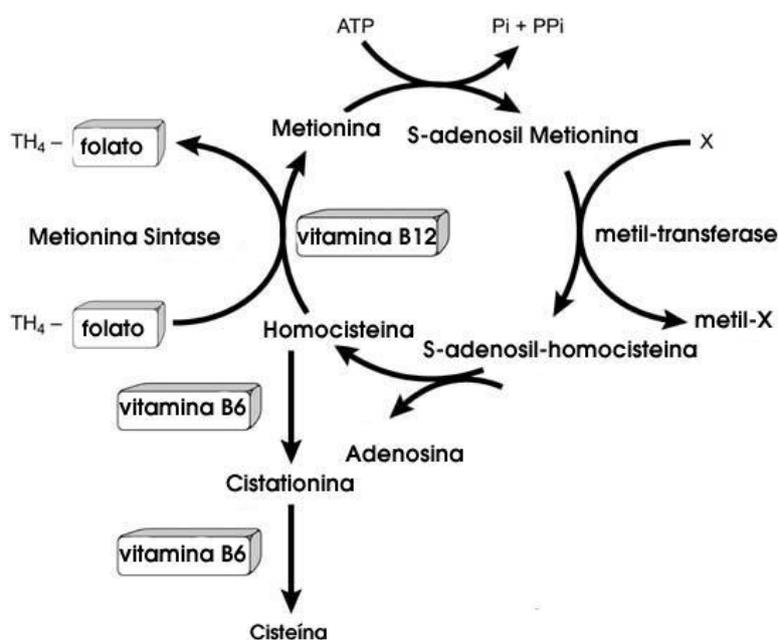


Figura 2.3 – Metabolismo da Metionina [2.12]

Quando há deficiência de folato, ocorre um déficit de 5-metiltetrahidrofolato, principal forma da vitamina encontrada no organismo, que funciona como doadora de grupo metil na via de remetilação, impedindo a conversão de Hcis a Met, colaborando, então, para o desenvolvimento da hiperhomocisteinemia [2.11].

Além disso, quando ocorre a privação de folato, há o esgotamento de doação do grupo metil pela S-adenosilmetionina, o que conseqüentemente inibe a

glutathione (GSH) S-transferase, uma vez que esta enzima requer metilação de espécies oxidativas.

A Met atua: na biossíntese protéica, por ser um aminoácido das cadeias polipeptídicas; na síntese protéica, por produzir Hcis e Cis; na formação de S-adenosilmetionina, que provê grupos metil para a síntese de epinefrina, fosfatidilcolina, creatina, nucleotídeos metilados e melatonina; na síntese de GSH, que entre outras funções, serve como um substrato para desintoxicação da GSH-S-transferase e como antioxidante da GSH peroxidase; e no mecanismo antioxidante de proteínas, visto que a melatonina serve como antioxidante endógeno do grupo tiol [2.13].

A deficiência de S-adenosilmetionina, produzida pela Met, promove alta expressão da presenilina-1, o que aumenta a expressão da enzima gama-secretase, que atua cortando o pedaço de APP restante após a clivagem feita pela beta-secretase e, desta forma, auxilia na geração de A $\beta$  [2.14].

Estudo *post mortem* feito com o cérebro humano com Alzheimer apontou baixíssimas concentrações de S-adenosilmetionina [2.15].

O aumento desta a partir da suplementação dietética alivia uma variedade de fatores de risco e características associadas com a DA [2.14, 2.16].

A Met está entre os aminoácidos presentes no peptídeo A $\beta$ -42, ocupando a posição 35, sendo importante para a neurotoxicidade e propensão para reduzir os metais de transição e formar espécies reativas de oxigênio.

Um grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de estresse oxidativo para elucidar a neurotoxicidade da proteína A $\beta$  baseada no resíduo Met. A análise sugeriu associação deste com a formação de fibrilas e a geração de estresse oxidativo. Isto ficou evidenciado *in vitro* depois da substituição do aminoácido pela norleucina, que não possui enxofre em sua composição [2.17].

Se o resíduo Met-35 for substituído por uma Cis, o estresse oxidativo da DA também é suavizado [2.18].

Além da presença de Met na A $\beta$ , o seu estado redox parece desempenhar um papel crucial em ações neurotóxicas do peptídeo, que induz a uma redução dependente do tempo da viabilidade celular. A A $\beta$  com o resíduo Met-35 oxidado é significativamente menos danosa ao organismo, visto que esta não eleva a expressão do gene pró-apoptótico bax como a A $\beta$  sem alterações no resíduo Met [2.19]. A superexpressão deste gene acelera a apoptose celular, porque induz a

liberação do citocromo c da membrana interna mitocondrial e de outros fatores citossólicos que propiciam o processo apoptótico.

Quando ocorre a oxidação da Met-35 para Met sulfóxido há uma dificuldade significativa na formação das fibrilas em pH fisiológico. Além disso, a Met sulfóxido altera a morfologia característica da A $\beta$  e previne a formação da protofibrila, intermediário chave na amiloidose-beta e associada à neurotoxicidade [2.20].

Investigações em placas senis mostraram que existe uma alta proporção de Met sulfóxido e de produtos de reações de estresse oxidativo envolvendo Met nestas. Exames de modelagem estrutural apontaram que a oxidação da Met deformou significativamente a estrutura secundária da A $\beta$  [2.21, 2.22].

Isto ocorre porque a Met é um dos aminoácidos mais suscetíveis a oxidação *in vivo*, especialmente, sob condições de estresse oxidativo [2.23].

Estudos teóricos têm sugerido como intermediários cátions do peptídeo  $\beta$  amilóide (A $\beta$ ) pelo radical Met. Estes radicais Met seriam estabilizados através da formação de ligação com átomos de oxigênio ou de nitrogênio de ligações peptídicas adjacentes. Embora, a formação de ligações enxofre-oxigênio seja cineticamente preferida, em escalas de tempo mais longo, as ligações enxofre-oxigênio convertem-se em ligações enxofre-nitrogênio, sendo este um processo pH-dependente [2.24].

Como dito anteriormente, pesquisas têm qualificado a A $\beta$  como uma metaloproteína que se liga a íons de elementos de transição. Trabalhos citam a Met 35, localizada na região carboxilica C-terminal, como sítio de ligação [2.25, 2.26, 2.27].

Quando a A $\beta$  perde a Met sobrevém uma baixa capacidade de reduzir Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup>, dificultando a ligação do metal à proteína, evitando assim seu acúmulo nas placas senis.

A substituição da Met por outro aminoácido elimina a ação pró-oxidante da A $\beta$  diminuindo a oxidação de proteínas e, portanto, sua neurotoxicidade.

Contudo, a presença de Met não é suficiente para esclarecer a capacidade redox da A $\beta$  bem como sua neurotoxicidade.

Testes em laboratório revelaram que em ratos que possuíam A $\beta$  com Met, esta proteína não tinha a aptidão para se ligar a íons metálicos por este sítio [2.28, 2.29].

### 2.1.2 Cisteína

A Cis é um aminoácido sulfurado parcialmente essencial, ou seja, em condições normais, condicionadas à espécie, à maturação, à dieta, ao estado nutricional e à condição patofisiológica, é sintetizada pelo próprio organismo a partir da Met, na presença do cofator vitamina B<sub>6</sub> [2.12].

Entretanto, em caso de insuficiência do cofator ou da Met, a Cis passa à posição de indispensável.

Aminoácido prenunciador da síntese de GSH, pode ser obtido pré-formado da alimentação ou por via específica de transulfuração hepática a partir da serina e da Met.

O catabolismo da Hcis, derivada da Met e a transferência do enxofre da Met à serina para sintetizar Cis ocorrem através da transulfuração, com a participação das enzimas piridoxal 5'-fosfato (PLP)-dependentes, cistationina β-sintetase e cistationina γ-liase [2.1, 2.30].

Neonatos, pré-termos e até lactentes, às vezes, necessitam de suplementação de Cis, devido à imaturidade do sistema enzimático de converter Met em Cis, posto que a atividade da cistationase é baixa [2.30].

As dietas ocidentais oferecem de 2,25 g a 3,00 g de aminoácidos sulfurados por dia, sendo estes abundantes em proteínas de animais e cereais, sendo a absorção dos produtos protéicos pelo epitélio intestinal eficiente [2.30].

Este aminoácido possui diferentes vias metabólicas e importantes funções no organismo, através de si ou de seus metabólitos, entre estas, cita-se: a síntese protéica, auxiliando no crescimento e no balanço de nitrogênio corpóreo e a síntese de proteínas ferro-enxofre, formadas a partir do enxofre reduzido e da conjugação de ácidos biliares [2.1].

Uma vez que a Cis e a Hcis plasmáticas totais estão associadas à composição corporal, por sua vez também estão associadas à densidade mineral óssea [2.31].

A Cis, assim como os demais aminoácidos contendo enxofre, contribui para a manutenção e integridade dos sistemas celulares, influenciando reações orgânicas redox e a capacidade celular de se descontaminar de compostos tóxicos, radicais livres e espécies reativas de oxigênio.

Aminoácidos sulfurados contribuem para o metabolismo celular de enxofre e para a homeostase deste elemento. Ademais, desempenham papel significativo na regulação do metabolismo de carbono.

Defeitos nas enzimas que participam na regulação do metabolismo de enxofre produzem desequilíbrio da reserva deste elemento e uma diversidade de patologias humanas, incluindo homocisteinúria, cisteinúria, defeitos no tubo neural, doenças vasculares, DA e câncer [2.6].

Em pacientes urêmicos, o metabolismo celular do enxofre fica desregulado, devido à deficiência de piridoxina, o que gera a redução da produção dos níveis de Cis bem como de taurina, elevando-se a concentração de Hcis. Já em doentes hepáticos, há diminuição da competência de transulfuração.

A Cis é capaz de melhorar as funções linfocitárias, entre estas a atividade citotóxica dos linfócitos T e a inibição da expressão do fator de transcrição nuclear em células T ativadas. Isto é interessante para o tratamento de doenças que afetam o sistema imunológico, como a Aids.

Quando há um estímulo inflamatório, devido a endotoxinas e ao fator de necrose tumoral, os macrófagos agem como carreadores de Cis. Mas a captação deste aminoácido é competitivamente inibida pelo glutamato, encontrado em concentrações maiores em caso de imunossupressão ou Aids [2.12].

A Cis em meio neutro ou pouco alcalino oxida-se rapidamente, transformando-se no dímero cistina, que por ser pouco solúvel, precipita-se em solução; já em meio ácido, pode ocorrer a redução do grupo tiol e formação de sulfeto de hidrogênio.

Em estudo recente, descobriu-se que o sulfeto de hidrogênio produzido endogenamente no cérebro a partir da redução do grupo tiol da Cis, funciona como neuromodulador e, ainda, como relaxante da musculatura lisa. Porém, são necessários mais esclarecimentos sobre esta modulação [2.32].

Somando-se as investigações sobre a proteção exercida pelo sulfeto de hidrogênio, recentemente, grupos científicos estão realizando pesquisas em camundongos com o intuito de desenvolver uma droga segura para a DA a partir da adição de um resíduo Cis à proteína A $\beta$ . Este medicamento vem demonstrando resultados positivos, com reforço da imunogenicidade e com redução da quantidade de depósitos de A $\beta$  nestes animais, e, desta forma, da sua toxicidade [2.33].

Além disso, compostos antioxidantes que possuem Cis, como o S-alil-L-cisteína (SAC), componente solúvel em água presente no alho, e N-acetilcisteína têm efeitos protetores na DA.

O primeiro inibe a fibrilação da A $\beta$  e desestabiliza as fibrilas A $\beta$  pré-formadas – impedindo o declínio cognitivo e protegendo os neurônios de apoptose neuronal induzida [2.34].

Já o segundo exerce efeito protetor a partir da diminuição do estresse oxidativo e de marcadores de apoptose, tendo um efeito mais pronunciado quando presente simultaneamente com o ácido lipóico [2.35].

Sabe-se também que o Al(III) aumenta a atividade da acetilcolinesterase, porém, em estudo com ratos tratados com alumínio e pela administração crônica de N-acetilcisteína incide a melhora da retenção de memória, a atenuação do dano oxidativo e da atividade da acetilcolinesterase, mostrando-se o efeito neuroprotetor da N-acetilcisteína [2.36].

### 2.1.3 Homocisteína

Igualmente à Cis, a Hcis é um aminoácido sulfurado parcialmente essencial, sendo produzido através das vias de transmetilação e transulfuração.

Na transmetilação, a Met ao reagir com o ATP forma S-adenosilmetionina, que atua como doador de metila, metabolizando diferentes componentes celulares, como carnitina, epinefrina, proteínas, entre outros. Após reações de transferência da metila, catalisadas por metil transferases, gera-se o subproduto S-adenosil-homocisteína, que é hidrolisado, gerando a adenosina e a Hcis [2.1, 2.12, 2.30].

Na transulfuração, a Cis com a participação da cistationina sintetase usando como cofator a forma ativada da piridoxina, o fosfato de piridoxal, gera Hcis [2.1].

A Hcis celular, se em excesso, pode escapar para a circulação, representando fator de risco para doença coronária, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica, trombose venosa e embolia pulmonar.

Fatores como gênero, idade, consumo de álcool e concentrações séricas de vitamina B<sub>12</sub>, folato e piridoxina são importantes para a determinação dos níveis de Hcis e, deste modo, de risco de doença cardiovascular prematura [2.30, 2.37].

A deficiência de folato é associada ao aumento dos níveis de Hcis, pois a eliminação desta é regulada por duas vias metabólicas moduladas por ele, a transmetilação e a transulfuração [2.38].

Na doença aterosclerótica, estudos atuais indicam que a Hcis atua como um fator de risco independente para o seu desenvolvimento e que níveis plasmáticos de aproximadamente  $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$  já seriam relevantes para o desenvolvimento de patologias cardiovasculares [2.39, 2.40].

A figura 2.4 traz um esquema do metabolismo da Hcis e do possível mecanismo da doença aterotrombótica.

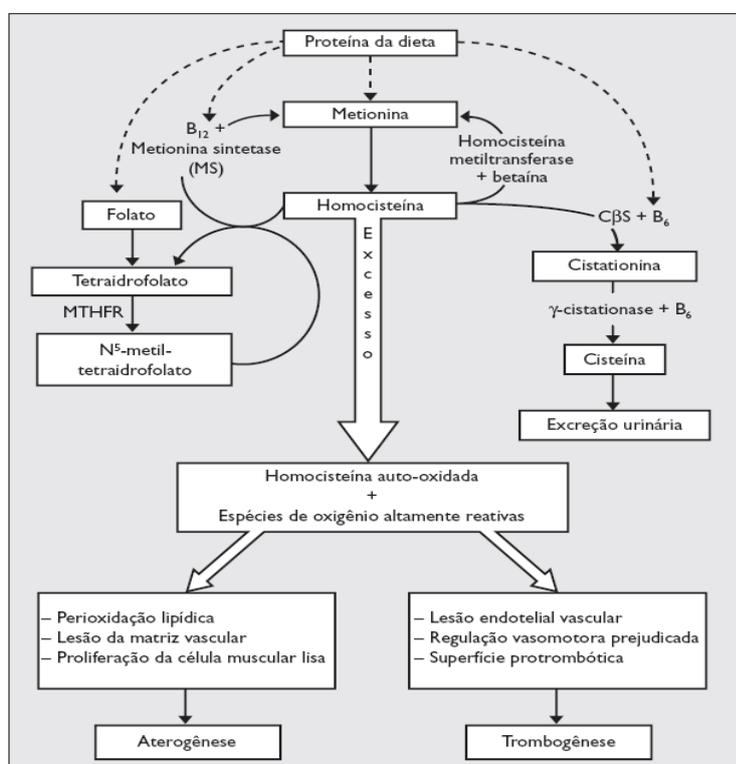


Figura 2.4 - Metabolismo da homocisteína e possível mecanismo da doença aterotrombótica [2.40]

Estudos clínicos têm levantado a possibilidade de que níveis plasmáticos altos de Hcis aumentem, além do risco de aterosclerose e acidente vascular cerebral, também o de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer, todavia, o efeito da Hcis em neurônios e o mecanismo celular pelo qual esta poderia induzir a neurodegeneração ainda são ignotos [2.41, 2.42, 2.43].

Numa pesquisa observou-se que quando ocorre conversão de pessoas saudáveis em acometidas com Alzheimer há um elevado aumento de Hcis se comparado à conversão de pessoas saudáveis em acometidas com transtorno

cognitivo leve, concluindo-se que um maior acúmulo de metabólitos tóxicos, tais como a Hcis, pode favorecer o desenvolvimento da DA [2.44].

Relaciona-se que o aumento de Hcis plasmática total majora em mais que o dobro o risco de desenvolvimento da DA [2.45].

Um estudo demonstrou que a concentração de Hcis aumenta de 15,93 nmol.L<sup>-1</sup> em pacientes sem desvios cognitivos para 18,78 nmol.L<sup>-1</sup> em pacientes acometidos pelo Alzheimer e que o nível plasmático de Hcis aumentaria com a severidade da demência enquanto que o de B<sub>12</sub> diminui [2.46].

Há indícios que apontam a ligação da Hcis ao aumento do estresse oxidativo, danos ao DNA, desencadeamento de apoptose e excitotoxicidade - mecanismos essenciais da neurodegeneração. Estudos recentes, no Canadá e Estados Unidos, têm investigado se a redução de Hcis poderia reduzir a incidência de Alzheimer, os resultados estão revelando-se positivos [2.43, 2.47, 2.48].

Embora os altos níveis totais de Hcis nos pacientes com DA estejam ligados à incidência desta, estes não mostraram relação significativa com a severidade da doença [2.49]. De modo que se acredita que esta participa apenas no desenvolvimento da DA e não em sua progressão clínica.

O excesso de Hcis inibe ainda a hidrólise de S-adenosil-homocisteína, ocasionando a diminuição da concentração intracelular de adenosina [2.50].

Isto pode estar correlacionado ao papel da Hcis e ainda à diminuição dos níveis plasmáticos de ATP na DA.

#### **2.1.4 Penicilamina**

A Pen é um aminoácido sintético produzido através de hidrólise pela degradação da penicilina, não sendo considerado um antibiótico, mas sim um fármaco da classe das penicilinas. É largamente usado, na forma enantiomérica D-Pen, no tratamento de artrite reumatóide, doença de Wilson, cisteinúria e intoxicação por metais, como chumbo, cádmio, mercúrio ou ouro [2.51].

O uso medicamentoso na doença de Wilson é o mais conhecido, por isso, optou-se por esclarecer um pouco sobre esta patologia.

A doença de Wilson é uma degeneração hepatolenticular promovida por um gene autossômico recessivo em que há um distúrbio no metabolismo de cobre caracterizado pelo prejuízo na síntese ou na função da ceruloplasmina, a qual se liga ao metal e o transporta pelo organismo. Desta forma, os níveis séricos e a

excreção urinária de cobre encontram-se aumentados. As principais características desta enfermidade são as manifestações neurológicas, os anéis de Kayser-Fleischer nos olhos e a hepatite crônica. O tratamento baseia-se na redução da ingestão dietética do cobre e no uso de agentes quelantes, como a D-Pen, que mobilizam o cobre formando complexos, excretados pela urina [2.30, 2.51, 2.52, 2.53, 2.54].

Na ressonância magnética nuclear por imagem (RMI) do cérebro dos pacientes acometidos por esta enfermidade, pode-se observar no mesencéfalo a formação de uma imagem semelhante à face de um urso, como nota-se na figura 2.5, por isso, muitas vezes a chamam de doença da “face do panda gigante”.

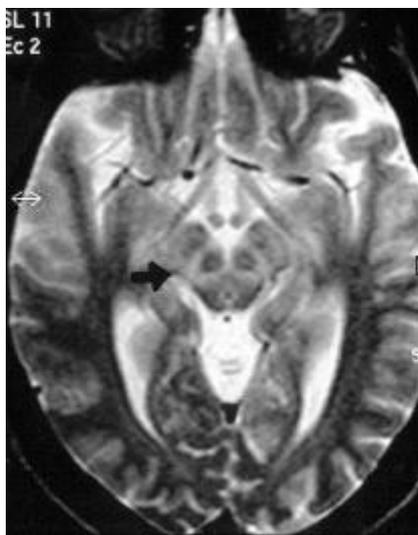


Figura 2.5 – RMI do cérebro de paciente com Doença de Wilson [2.55].

Entre os pacientes que utilizam a D-Pen, aproximadamente 30% têm reações de hipersensibilidade no primeiro mês de tratamento, como febre, erupção cutânea e linfadenopatia. Porém, há ainda a possibilidade de efeitos secundários envolvendo a pele, as articulações (artropatia), os efeitos imunológicos e a depressão da medula óssea [2.52, 2.56].

Este aminoácido possui algumas características como solubilidade, estrutura química e tamanho que o tornam uma droga útil. Isto porque, quando combinado a metais, forma complexos que são menos tóxicos para o organismo e a formação de pontes dissulfeto nestes, permite configurá-los com uma boa solubilidade.

Com o envelhecimento e em diversas doenças neurodegenerativas, há acúmulo de íons metálicos no cérebro. No Alzheimer, estes se acumulam, depositando-se com a proteína A $\beta$ -amilóide.

Além do efeito de quelação da D-Pen com cobre na doença de Wilson, este mesmo efeito também é pesquisado nos pacientes com Alzheimer, pois a partir da formação de complexos, esta seria capaz de reduzir o estresse oxidativo.

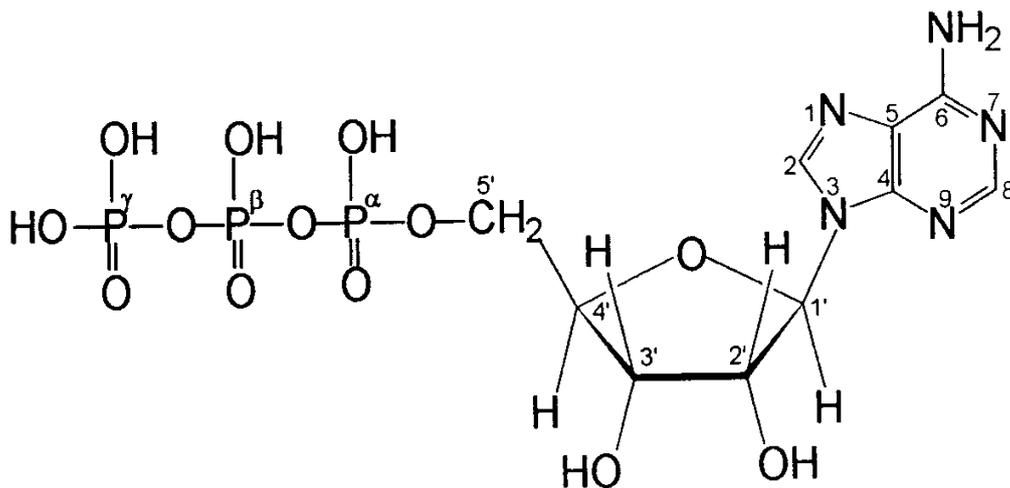
Uma pesquisa realizou o tratamento com esta droga e notou que antes de usá-la, o total de peróxidos e o conteúdo de cobre nos pacientes com Alzheimer eram altos enquanto que os níveis de antioxidantes eram baixos. Após seu uso, houve redução do estresse oxidativo, contudo, não foi observada diferença no declínio cognitivo [2.57]. Logo, acredita-se que há formação de quelatos com o íon cobre deixando, desta forma, uma menor quantidade de cobre livre, hábil a participar de reações com as espécies reativas de oxigênio.

Assim, a interação da Pen com íons metálicos tem sido estudada, a fim de se desenvolver uma droga segura que altere a progressão da patologia, de modo que, a estratégia de redução de íons metálicos no cérebro através da administração de quelantes é promissora [2.7, 2.9].

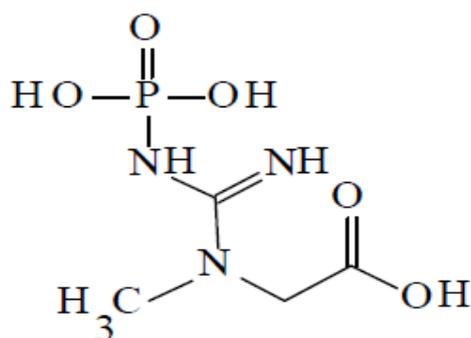
Estudo recente mostrou que sistemas de nanopartículas com quelantes conjugados podem atravessar a barreira hematoencefálica. Devido a isso, este grupo de cientistas, agora, investiga acerca da precipitação de íons metálicos com estes sistemas de nanopartículas em vez de com as proteínas A $\beta$ -amilóide [2.8].

## **2.2 Ligantes Fosfatados**

As estruturas químicas dos ligantes fosfatados em estudo podem ser vistas na figura 2.6.



Ácido Adenosino-5'-trifosfórico ou Ácido 5-(6-aminopurin-9-il)-3,4-dihidroxioxolan-2-il metoxi-hidroxi-fosforil-oxi-hidroxi-fosforil-oxifosfônico  
Adenosina 5'-trifosfato



N-(Imino(fosfonoamino)metil)-N-metilglicina ou Ácido 2-[metil-(N'fosfonocarbamimidoil)amino] acético  
Fosfocreatina

Figura 2.6 – Ligantes fosfatados em estudo

O fósforo, presente em grande quantidade nos tecidos, é um elemento essencial que participa de muitas funções corporais, entre elas: serve de base para o DNA e o RNA, gera ligações fosfato de alta energia no ATP e forma o AMPc, que atua como mensageiro secundário no interior celular.

A absorção dos fosfatos dá-se, principalmente, no estado inorgânico. O fosfato organicamente ligado é hidrolisado no lúmen intestinal pelas fosfatases pancreáticas e intestinais, sendo liberado como fosfato inorgânico e posteriormente absorvido.

A homeostase e a excreção do fosfato são realizadas pelos rins. A excreção aumenta quando há maior ingestão ou absorção do elemento, hiperparatireoidismo, acidose respiratória metabólica, expansão de volume celular ou ingestão de diuréticos [2.39].

Na tabela 2.1, observam-se as energias livres para as hidrólises de alguns compostos fosfatados no pH 7,0.

Os compostos fosfatados podem ter as energias liberadas em reações de hidrólise das ligações P-O pequenas, o que se observa na tabela 2.1 nas reações de hidrólise da glicose-6-fosfato, do monofosfato de adenosina (AMP) e do glicerol- $\alpha$ -fosfato. Porém, as reações de hidrólise nas ligações P-O ou P-N do ATP, do difosfato de adenosina (ADP), do acetil-fosfato, da PCr e do fosfoenolpiruvato possuem altas energias livres de hidrólise. Devido à grande instabilidade termodinâmica, estes compostos recebem a classificação de compostos ricos em energia e as suas ligações P-O ou P-N são chamadas de ligações fosfatadas de alta energia [2.58].

composto fosfatado	$\Delta G$ (kJ mol <sup>-1</sup> )
Fosfo-enolpiruvato	-61,9
Fosfocreatina	-43,1
Acetil-fosfato	-42,3
ATP (para ADP)	-30,5
AMP (para adenosina)	-9,2
Glicose-6-fosfato	-13,8
Glicerol- $\alpha$ -fosfato	-9,2

Tabela 2.1 - Energias livres para as hidrólises de alguns compostos fosfatados (pH 7,0) [2.58]

Os compostos ricos em energia podem se ligar a dois nucleotídeos e ainda sofrer ionização em pH próximo à neutralidade (pH fisiológico). A sua ionização, tratando-se de estabilidade cinética, é importante no meio biológico, porque a carga negativa sobre o grupo fosfato repele eventuais nucleófilos e dificulta a hidrólise. A evolução ainda favoreceu estes metabólitos que podem se conservar dentro da membrana celular, apesar de ionizados, já que os fosfatos estão na forma ionizada em valores de pH fisiológico. As cargas negativas protegem os anidridos fosfóricos ricos em energia de ataque nucleofílico pela água e por outras espécies, dando-lhes uma enorme estabilidade cinética em solução aquosa, não

obstante o fato de eles serem termodinamicamente instáveis. Esta contraposição garante que, após a síntese, o composto não sofrerá hidrólise, viabilizando sua utilização nos processos bioenergéticos [2.58].

Em relação a características químicas dos nucleotídeos, deve-se saber que estes possuem como principais sítios de interações: a base púrica (átomos doadores N-1 e N-7), a base pirimidínica (N-3) e os átomos de oxigênio dos grupos fosfatos [2.59].

Os compostos fosfatados são extremamente significantes para o organismo, participando de processos metabólicos primordiais - como o de geração energética, o que pode ser percebido pela breve revisão acima realizada. Estes são afetados em doenças degenerativas, como o Alzheimer.

Alguns estudos atuais mostram que os índices de ATP, da creatina e da PCr estão diminuídos na DA, no entanto, outras pesquisas mais antigas indicavam que estes compostos não eram eliminados [2.60, 2.61, 2.62, 2.63].

Atualmente, a maioria dos trabalhos aponta concordância para a diminuição dos depósitos energéticos cerebrais.

Estudo realizado por ressonância magnética *in vivo* no cérebro de pacientes com Alzheimer mostrou alterações no estado biofísico das membranas fosfolipídicas - devido a diferenças nos níveis de fosfodiésteres - e no metabolismo dos fosfatos de alta energia. Em pacientes que apresentavam demência foram evidenciadas diminuições dos níveis de PCr e adenosina difosfato, aumento dos níveis de fosfomonoésteres e aumento da taxa metabólica oxidativa, sugerindo que o cérebro está sob estresse energético no Alzheimer. Com a piora do quadro neurológico, as mudanças se acentuaram ainda mais [2.64].

O L-glutamato, principal aminoácido excitatório que cumpre papel na aprendizagem e na memória humana, sofre a captação em vesículas sinápticas por um processo dependente de ATP.

No entanto, pesquisa sugere que a captação vesicular de glutamato possa ser ainda regulada por fosfomonoésteres endógenos e PCr. Assim, como estes são afetados na DA, a captação de L-glutamato também deve estar prejudicada [2.65].

A estabilidade de compostos fosforilados e suas interações com metais vem sendo estudada há algum tempo; todavia, são necessárias mais pesquisas sobre o assunto [2.66].

### 2.2.1 Adenosina 5'-trifosfato

O ATP é um nucleotídeo com ligações fosfato de alta energia presente em todas as células e constitui a principal forma celular de armazenagem de energia. É formado por uma base nitrogenada – adenina, um carboidrato - ribose, associado a três radicais fosfato conectados em cadeia, sendo os átomos passíveis de ligação nesta molécula os nitrogênios doadores N-1 e N-7 e os oxigênios dos grupos fosfatos.

A energia produzida pela formação de subprodutos oriundos da quebra desta molécula inicia a contração muscular e assiste a vários processos citológicos, como transporte ativo, síntese e secreção de substâncias, divisão, entre outros [2.30, 2.39].

A síntese deste composto fosfatado ocorre principalmente por meio do ADP em um dos dois caminhos: fosforilação do substrato, em que ocorre a formação de ATP por fosforilação direta do ADP sem dependência de oxigênio e fosforilação oxidativa, que forma a maior parte do ATP presente no organismo. No último processo, elétrons são transferidos de NADH e FADH<sub>2</sub> para moléculas de oxigênio através de uma série de transportadores de elétrons, que se encontram na superfície interna da membrana da mitocôndria. Estes complexos formam uma cadeia e os elétrons de alta energia atravessam pelos mesmos, perdendo energia, até serem transferidos para uma molécula de oxigênio. A energia que foi dissipada é usada para o transporte de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, gerando um gradiente eletroquímico pela membrana da mitocôndria, onde localiza-se a enzima ATP sintase, que transporta os prótons de volta para a matriz mitocondrial. O movimento dos prótons ativa esta enzima, catalisando a síntese de ATP [2.1, 2.12].

Na figura 2.7 exibe-se o ciclo do ácido tricarboxílico, responsável pela geração de grandes quantidades de ATP no organismo.

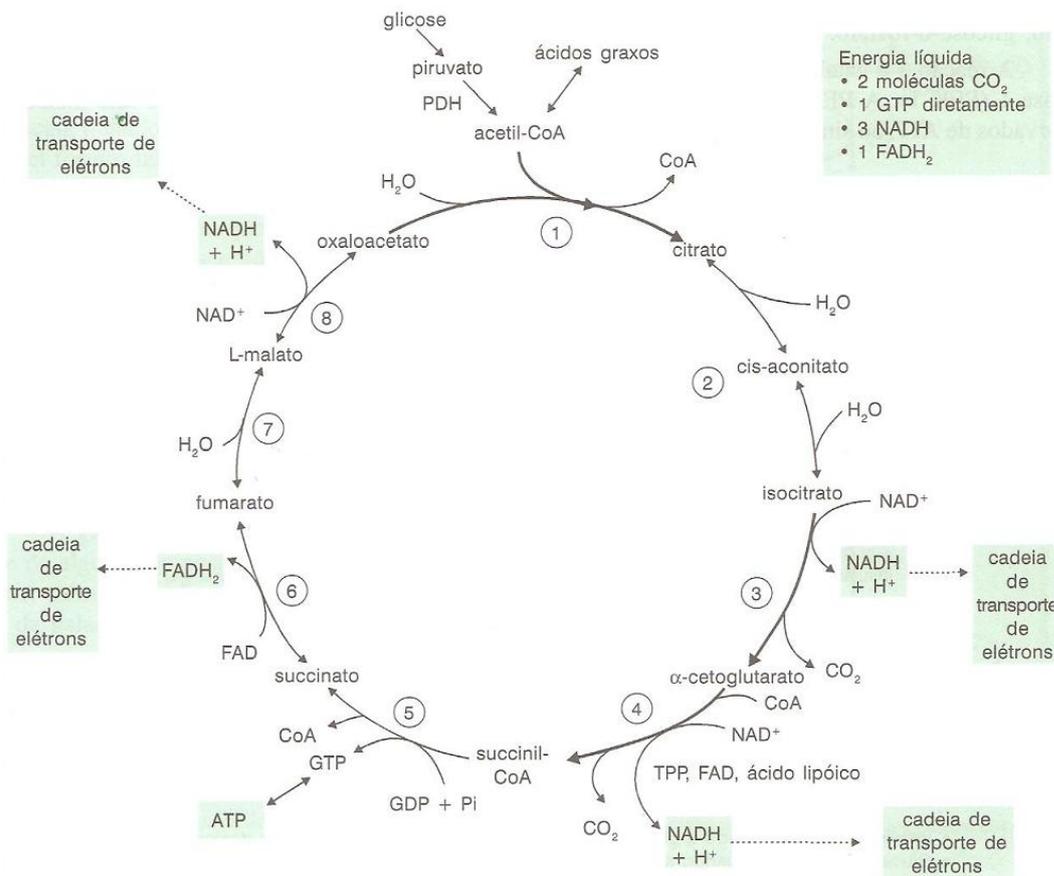


Figura 2.7 – Ciclo do ácido tricarboxílico. As etapas 1, 3 e 4 são irreversíveis e limitantes [2.12]

Na figura 2.8 mostra-se a geração líquida de ATP derivada da oxidação de uma molécula de glicose sob condições aeróbias e anaeróbias.

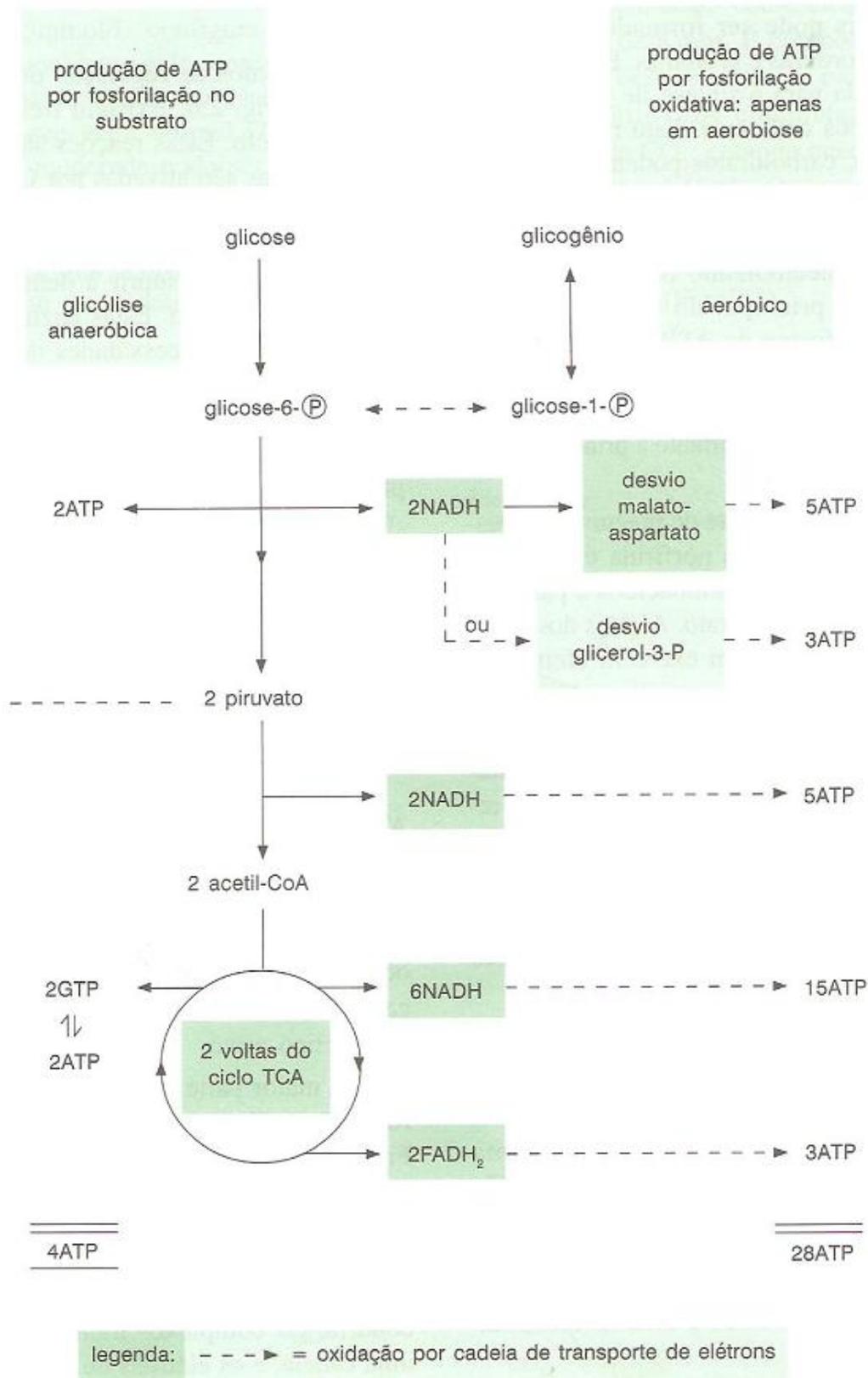


Figura 2.8 – Geração líquida de adenosina 5'-trifosfato [2.12]

Um dos primeiros artigos sugerindo a relação entre o Alzheimer e a ATP ressaltava a acumulação de receptores-A1-adenosina em estruturas

neurodegenerativas na DA, o que mediará tanto o processamento da proteína precursora amilóide quanto a fosforilação da taurina [2.67].

A quantidade de receptores de adenosina-A1 encontra-se aumentada tanto na fase inicial quanto na fase avançada da doença, entretanto, não há diferenças com a progressão patológica. Além disso, também estão majorados os receptores de adenosina-A2A. Embora haja o acúmulo de receptores de adenosina, o aumento da ligação e dos níveis de expressão protéica dos receptores não estão associados com o aumento dos níveis do RNAm que codifica estes receptores, mostrando que provavelmente há sensibilização das vias de transdução correspondente [2.68].

Nos pacientes com Alzheimer, há ainda significativa diminuição na densidade dos agonistas e dos antagonistas dos receptores de adenosina nos sítios de ligação da camada molecular do giro denteado [2.69].

Estudo utilizando a imunomarcagem em necropsias de pacientes com DA e controles mostraram que receptores de adenosina no hipocampo e no córtex cerebral apresentam uma mudança no padrão de expressão e há uma redistribuição dos receptores nestas áreas do cérebro. Existindo imunoreatividade ao receptor de adenosina-A1 nos neurônios em degeneração com emaranhados neurofibrilares e neurites distróficas de placas senis [2.70].

Percebe-se cada vez mais que os receptores de adenosina são alvos potenciais na DA.

Além disso, mediante estudos de neurônios em cultura, obteve-se a comprovação da relação entre estresse oxidativo e alterações no transporte de glicose. Constatando-se que a A $\beta$  altera a captura de glicose, acarretando, por sua vez, uma diminuição nos níveis de ATP. Indicando-se que isto ocorra através da conjugação do 4-hidroxinonanal, aldeído derivado da lipoperoxidação dos ácidos graxos poliinsaturados n-6, à proteína transportadora de glicose GLUT3, interferindo no transporte de glicose para o ciclo de Krebs (também chamado de ciclo do ácido tricarboxílico ou do ácido cítrico) [2.71, 2.72].

A alteração no metabolismo de glicose restringe também a síntese de acetilcolina, glutamato, aspartato, ácido aminobutírico e glicina [2.73].

Sabe-se ainda que a A $\beta$  gera radicais livres no Alzheimer e tem-se definido que estas espécies reativas provocam peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e perda da integridade da membrana, implicando na inibição de ATPases, perda

da homeostase de cálcio, inibição do sistema de captação de glutamato dependente de sódio em células gliais, adulteração de vias metabólicas, ativação de fatores de transcrição e, por fim, apoptose [2.71].

A difusão no organismo de ATP livre e de ATP ligado ao metal seria semelhante, visto que o tamanho molecular do complexo não é muito maior que o do ATP livre [2.74].

Na etiologia da DA e em outras amiloidoses, a formação das fibrilas amilóides possui um papel importante. Estudos mostram que o complexo AlATP promove a formação de fibrilas reativas de beta-amilóide e de peptídeos amiloidogênicos independentes. À indução de formação de fibrilas, é seguida a complexação do AlATP por um ou mais monômeros dos peptídeos. Entretanto, o complexo formado não pode ser identificado diretamente, o que sugere a atuação do AlATP como uma chaperona na formação de fibrilas amilóides, ou seja, o AlATP auxiliaria o desdobraimento das fibrilas. O efeito do AlATP não é mimetizado nem pelo AlADP, nem pelo AlAMP [2.75].

No capítulo de íon metálico irá se comentar que a homeostase cerebral do alumínio tem impacto na função cerebral. As mudanças nas funções cerebrais envolvem a potencialização das atividades de neurotransmissores através da ação do AlATP em receptores de ATP no cérebro [2.76].

### 2.2.2 Fosfocreatina

A PCr é uma molécula de creatina fosforilada sintetizada no fígado e transportada para as células musculares para armazenamento, servindo como depósito temporário de energia.

Integrante da classe de compostos ricos em energia, sendo usada por tecidos que precisam de muita energia em ocasiões de estresse, como os músculos, o coração e o cérebro.

A seguir é exposta sua reação de hidrólise, demonstrando a alta energia do composto:



A energia livre padrão de hidrólise da PCr é alta,  $43,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$ , devido à formação de subprodutos oriundos da quebra da ligação fosfato. A reação produz a creatina, estabilizada pela formação de um híbrido de ressonância.

Quando o corpo é exposto a situações em que necessita de produções altíssimas de energia em pouco tempo, como contração muscular, o suprimento de energia é oriundo da PCr, que auxilia ainda na ressíntese do ATP.

Devido a esta ação energética reparadora, a PCr é usada, correntemente, no tratamento de pacientes com enfermidades cardíacas, com o nome farmacêutico de Neoton [2.77].

A ressíntese de ATP anaerobicamente pode ocorrer por duas formas: uma quando o ATP perde um fosfato, liberando energia e formando o ADP, que é enzimaticamente combinado pela creatina quinase com outro fosfato de alta energia oriundo da PCr, refosforilando diretamente o ADP numa reação reversível e a outra é a partir do glicogênio em que há formação de lactato [2.1].

A figura 2.9 mostra a ressíntese de ATP através da enzima creatina quinase. A reação no sentido inverso, em que se formaria a PCr, é catalisada pela ATP-creatina-transfosforilase.

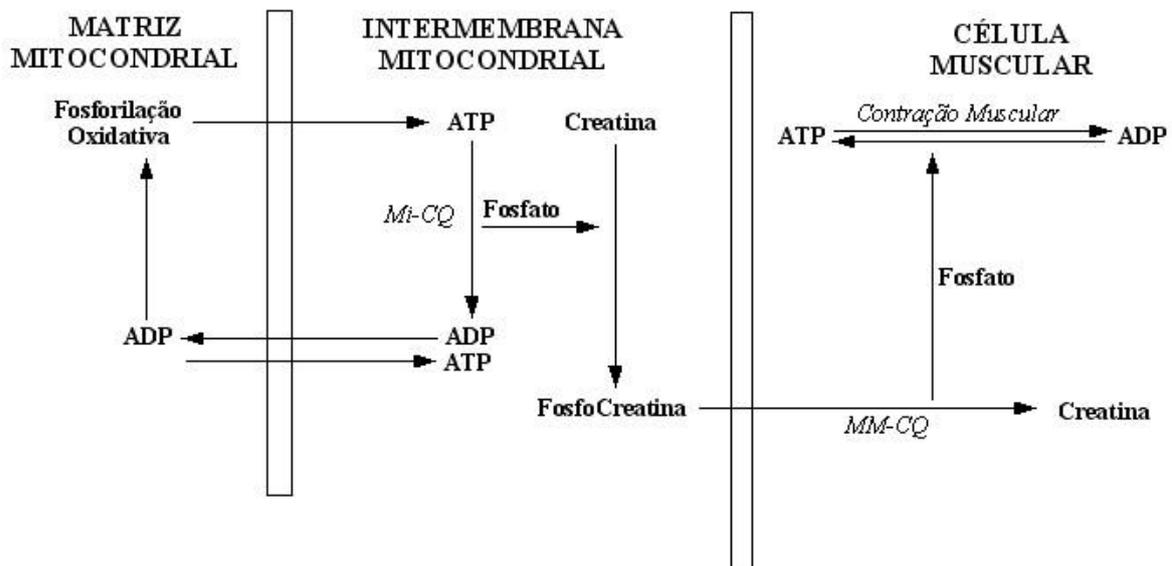
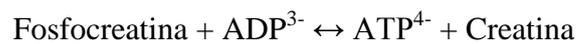


Figura 2.9 - Reações envolvendo o ATP e a fosfocreatina na contração muscular, em que Mi-CQ é a creatina quinase mitocondrial e MM-CQ é a creatina quinase muscular [2.78].

Antigamente, acreditava-se que reservas corporais de PCr não eram alteradas nem por treinamento físico, nem pela dieta do indivíduo, porém, pesquisas atuais mostraram que a creatina obtida da dieta é absorvida pelo

organismo, podendo ser transformada em fosfocreatina e assim armazenada. Entretanto, somente a creatina muscular pode ser aumentada desta maneira [2.79].

Em relação a características químicas, cabe destacar que, no pH fisiológico, a PCr encontra-se sob a forma do ânion  $\text{PCr}^{2-}$  e este pode coordenar-se aos cátions metálicos. Sendo assim, há a competição entre os ânions contendo o grupo fosfato, como o ADP e o ATP com o  $\text{PCr}^{2-}$  pelas espécies catiônicas presentes no meio. Logo, dados sobre a estabilidade de complexos envolvendo a PCr são necessários para a determinação da concentração das espécies presentes no meio citossólico [2.80].

A PCr tem natureza anfipática, de modo que suas características iônicas permitem ligar-se às cabeças fosfolipídicas polares das membranas. Com a ligação, a PCr diminui a fluidez das membranas e, conseqüentemente, limita a passagem de material celular. Esta estabilização da membrana impede a isquemia e a hipóxia. Logo, a PCr ajuda a evitar danos celulares por perda de material citoplasmático [2.80].

No Alzheimer, como já mencionado, a captura de glicose pelas células sofre obliteração. Isto ocasiona diminuição nos níveis de ATP e restringe a síntese de acetilcolina — afetando a contração muscular — e a produção de glutamato, aspartato, ácido-aminobutírico e glicina — interferindo no ciclo de Krebs. Desta forma, há prejuízo também na geração de PCr.

Outra vinculação da PCr com o Alzheimer dá-se através da creatina, seu produto de hidrólise.

O sistema creatina-fosfocreatina é regulado pela creatina quinase, porém, no cérebro com DA e em células expostas ao peptídeo beta-amilóide esta é afetada.

Depósitos microcristalinos de creatina, que são encontrados em todos os pacientes com a patologia avançada, sugerem que há grande perturbação no estado energético e que esta molécula poderia funcionar como um marcador do processo patológico [2.81].

Embora pesquisas sobre o efeito da creatina na função cognitiva sejam escassas, já se reconhece que esta possui capacidade neuroprotetora contra doenças neurodegenerativas. Além disso, ela é vista como uma forma de tratamento para distúrbios neurológicos. Evidências recentes sugerem sua participação em processos cerebrais, como o aprendizado e a memória. Estudos corroboraram que a suplementação oral de creatina aumenta a pontuação em testes

de inteligência, reduz a fadiga mental e protege contra a diminuição da oxigenação no cérebro [2.82].

Acredita-se que a melhora de funções neuronais pela presença de creatina está relacionada ao aumento do estoque energético.

Pesquisadores revelaram ainda que a creatina liberada numa forma dependente do potencial de ação é capaz de modular o processo de transmissão de informações, tendo então, papel neuromodulador [2.83].