

3

ENVELHECIMENTO E NEURODEGENERAÇÃO – UMA VISÃO BIOQUÍMICA

3.1

Bioquímica e Fisiologia do envelhecimento: Vulnerabilidade para Doenças Neurodegenerativas

O envelhecimento é caracterizado por um declínio das funções orgânicas que ocasiona diversas modificações em todo o organismo, levando a uma redução da capacidade funcional do mesmo ^{3.0}.

O sistema nervoso central (SNC) é extremamente afetado pelos processos de envelhecimento, que são caracterizados por alterações morfofuncionais, histológicas e nos sistemas de neurotransmissores que levam a várias mudanças na fisiologia cerebral. Todas as alterações fisiológicas relacionadas ao envelhecimento são consequências de mudanças nos processos bioquímicos associados a estes sistemas.

As alterações bioquímicas do SNC levam a mudanças fisiológicas, tanto a nível macroscópico quanto a nível microscópico ^{3.1-3.3}.

3.1.1.

Alterações fisiológicas macroscópicas do SNC

A figura 1 ilustra algumas subdivisões do cérebro que serão citadas ao longo do texto.

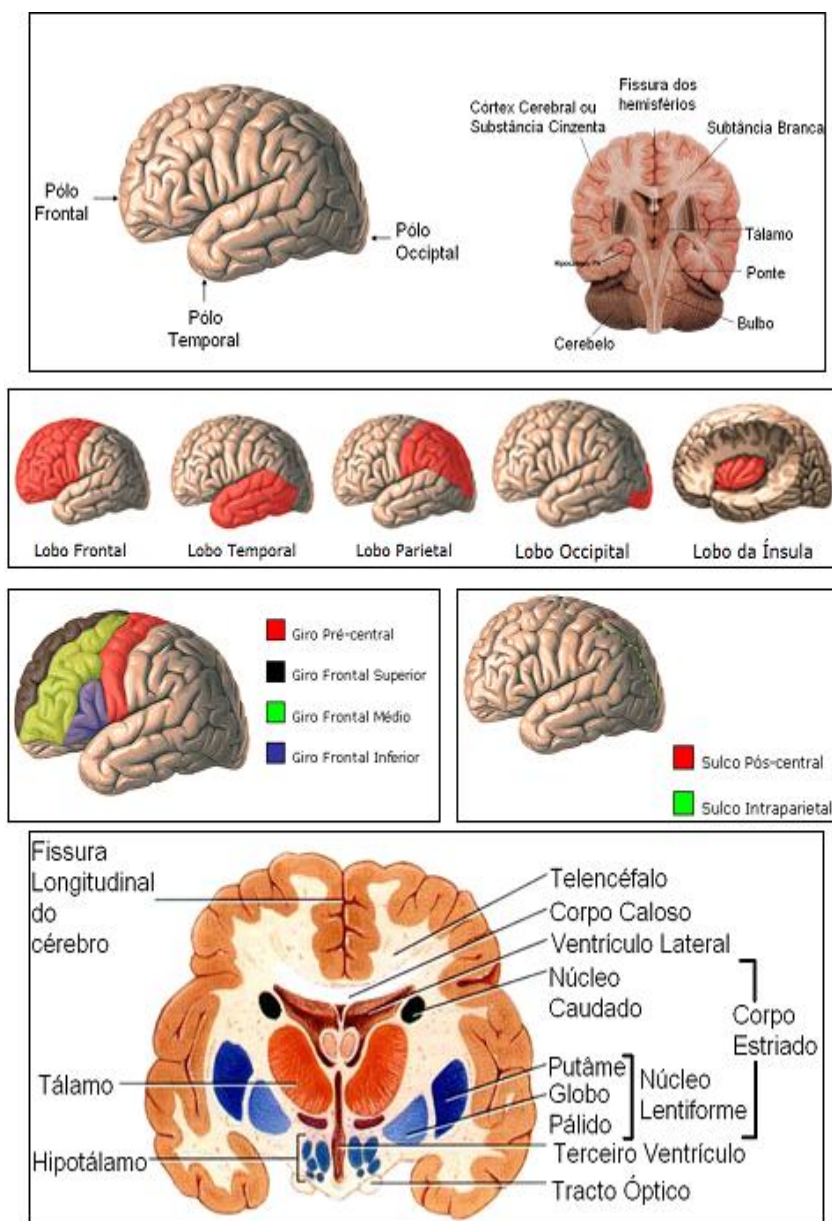


Figura 1 Subdivisões do cérebro

(Extraído de www.auladeanatomia.com/neurologia/telencefalo.htm)

Macroscopicamente, evidências mostram que aproximadamente a partir dos 25 anos de idade ocorre uma redução do encéfalo de 1,4 a 1,7% por década de vida. Aos 90 anos, o volume encefálico se reduz em até 200 cm³ e possui peso aproximadamente 10% menor que aos 30 anos. O córtex para-hipocampal sofre redução de volume em cerca de 10% entre os 40 e 86 anos; o núcleo lentiforme reduz de 21,4 a 36,8% entre os 35 e 60 anos, e o núcleo caudado reduz 24,6%^{3.1,3.2}. Alterações nos sulcos e giros cerebrais também podem ser evidenciadas durante o processo de envelhecimento^{3.1,3.3}.

Os giros sofrem estreitamento, enquanto os sulcos se tornam mais largos e profundos, sendo a hipotrofia mais acentuada nos lobos frontal e temporal, especialmente no complexo amígdala-hipocampal do lobo temporal (papel na memória e aprendizado) e córtex pré-frontal (área motora), e menos intensa no lobo occipital^{3.1,3.2}.

A substância branca cerebral sofre redução nas partes mais anteriores do corpo caloso (fibras inter-hemisféricas frontais e temporais), a partir dos 65 anos. Na tomografia computadorizada são vistas áreas de densidade diminuída na substância branca após os 70 anos, as quais podem estar relacionadas com hipoperfusão^{3.1,3.2}.

Ocorre também alargamento e aumento do volume médio dos ventrículos em 16 mL entre os 18 e 40 anos, e de 56 mL acima dos 61 anos^{3.1,3.2}. Devido à perda de fibras nervosas da substância branca e à perda neuronal cortical e subcortical, a dilatação ventricular evidenciada é bilateral, simétrica e mais pronunciada no corno anterior dos ventrículos laterais. Observa-se ainda um aumento do volume do líquido e alterações nas meninges, especialmente na aracnóide, onde há, após os 60 anos, espessamento fibroso na área parassagital. Devido à redução do volume cerebral, o espaço subdural e subaracnóide aumentam de volume. O cerebelo também sofre perda ponderal e hipotrofia das três camadas corticais. Por fim, há hipotrofia do tronco cerebral^{3.1-3.3}.

3.1.2. Alterações fisiológicas microscópicas do SNC

Microscopicamente, as alterações fisiológicas do SNC decorrem da perda normal e gradual das células nervosas e/ou do acúmulo gradual de alterações químicas, que resultam em distúrbios da função de sistemas químicos específicos^{3.4-3.6}.

Principalmente em função do aumento de radicais livres neurotóxicos, são grandes as mudanças nos processos bioquímicos cerebrais com o avançar da idade e, com isso, várias alterações fisiológicas a nível microscópico também são observadas como a hipotrofia neuronal; degeneração grânulo-vascular, aparecimento de lipofuscinas e alterações nos sistemas neurotransmissores. Essas mudanças, apesar de serem comuns com o envelhecimento, deixam todo o SNC mais vulnerável às neurodegenerações.

Para entender melhor porque estas alterações fisiológicas microscópicas tornam o cérebro mais susceptível às diversas degenerações, detalhes bioquímicos destes processos estão descritos a seguir.

Hipotrofia neuronal

A hipotrofia neuronal e morte celular estão entre as principais causas das alterações do sistema nervoso associadas ao envelhecimento^{3,2} e são caracterizadas pela perda de substância branca no cérebro.

A síntese de mRNA diminui significativamente no cérebro envelhecido, especialmente entre os 50 e 70 anos, provavelmente em decorrência da alteração na estabilidade da molécula de RNA, havendo queda na síntese protéica^{3,2,3,3}. O RNA citoplasmático está reduzido especialmente nos neurônios do córtex frontal, giro hipocampal, células piramidais do hipocampo e células de Purkinje do cerebelo. Tal redução ocorre juntamente com o acúmulo de lipofuscina nas células nervosas e a redução do núcleo e tamanho da substância de NISSL (corpos granulados de proteínas que se impregnam com corantes formando a substância do retículo citoplasmático das células nervosas) e levam à hipotrofia neural simples ou pigmentar^{3,2,3,3}.

A hipotrofia neural é marcada pela retração do corpo celular com a redução da sua capacidade funcional, provavelmente em decorrência de modificações na sua citoestrutura, bem como na sua capacidade de transmissão de sinais^{3,1,3,2}.

Os neurônios piramidais do hipocampo sofrem modificações, apresentando dilatações basais nos dendritos, com redução ou perda de espinhas dendríticas, sintetizadoras de neurotransmissores, e diminuição da superfície de contato para sinapses, comprometendo assim, as funções de aprendizado e memória^{3,2,3,3,3,5}.

O declínio do metabolismo da glicose, após os 10-15 anos de idade, é considerado precursor de alterações morfológicas irreversíveis causadas pela perda de dendritos e sinapses, pois é seguido por uma redução de cerca de 20% do tamanho médio das células nervosas do córtex cerebral^{3,1}.

O conteúdo de mielina cerebral começa a diminuir a partir dos 20 anos de idade e, em conjunto com as alterações supracitadas e as alterações nos neurotransmissores, a degeneração da mielina pode levar a uma diminuição na velocidade de condução neural nas vias aferentes e eferentes, e dificuldade de processamento em regiões do córtex cerebral, onde a velocidade é muito importante. A velocidade de condução nervosa é de 10 a 15% mais lenta nos idosos^{3,0, 3,2, 3,7}.

Degeneração grânulo-vacuolar

A degeneração grânulo-vacuolar é caracterizada pela presença de vacúolos isolados ou múltiplos, provavelmente formados após processo de autofagia (degradação

parcial da proteína Tau nos lisossomos). Estes vacúolos são encontrados no pericário das células piramidais do hipocampo, subiculum e, mais raramente, no córtex parahipocampal, amígdala e substância inominada. Raramente as degenerações grânulo-vacuolares são encontradas antes dos 65 anos e ocorrem em maior quantidade na doença de Alzheimer.

Lipofuscinas

Os corpos residuais ou pigmentares de lipofuscina aparecem como grânulos intracitoplasmáticos e acumulam-se nos neurônios, células gliais e no endotélio capilar^{3.1,3.3,3.5}. Estes pigmentos são formados através da fagocitose de constituintes celulares (autofagocitose) que serão polimerizados e peroxidados em lisossomos secundários. Alguns destes lisossomos irão originar tais pigmentos de lipofuscina e o acúmulo ocorre de maneira diferenciada dependendo da região cerebral e da idade.

Nos núcleos Oliver inferior e dentado, desde os primeiros anos de vida, são encontradas lipofuscinas. Enquanto que nos núcleos motores dos pares cranianos e os grandes neurônios do giro pré-central, no núcleo do tálamo, globo pálido e núcleo vermelho, somente por volta da meia idade estes pigmentos são encontrados^{3.3}.

O efeito deste acúmulo ainda não é conhecido, não estando necessariamente associado à morte celular, mas acreditam que poderia contribuir para a degeneração celular^{3.1,3.3}.

Sistema de neurotransmissores

Durante o envelhecimento há uma diminuição na produção, liberação e metabolismo dos neurotransmissores. Além disso, ocorrem reduções nas concentrações de mensageiros secundários e de enzimas envolvidas nas transduções de sinais.

O cálcio regula funções como síntese e liberação de neurotransmissores, excitabilidade neuronal e fosforilação de proteínas. Entre as enzimas que têm sua concentração reduzida com o envelhecimento estão aquelas responsáveis por sequestrar os radicais livres e regular a homeostase do cálcio. No cérebro envelhecido, há um aumento significativo de cálcio intracelular, que pode levar à morte celular^{3.2}.

Os neurotransmissores dopaminérgicos são os mais afetados com o envelhecimento^{3.1} e distúrbios nas atividades dopaminérgicas são responsáveis por alterações motoras presentes em idades avançadas^{3.1,3.6,3.8}. Outros neurotransmissores, como ácido gama-aminobutírico (GABA), serotonina, catecolaminas, acetilcolina e receptores colinérgicos, também são baixos em idosos.

A função colinérgica central é reduzida no envelhecimento em função das reduções na produção de acetilcolina, na plasticidade de receptores colinérgicos muscarínicos e na função desses receptores^{3.1,3.8}. A síntese da acetilcolina é afetada pela redução do “turnover” da glicose, pois o substrato chave da sua síntese é a acetilcoenzima A, que é sintetizada no cérebro exclusivamente pela glicólise anaeróbica. Estudos mostram que é no sistema colinérgico localizado no hipocampo onde ocorrem as maiores alterações e que a redução da acetilcolinesterase e da colina acetil-transferase é mais presente no córtex e no núcleo caudado em comparação com as células do putâmen^{3.0}.

São observados também aumento na concentração de noradrenalina, metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG, metabólito da noradrenalina) e do ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA, metabólito da serotonina) no líquido cefalorraquidiano dos idosos^{3.1}.

Com relação à noradrenalina existem controvérsias, porque alguns estudos afirmam haver uma redução de 40% nos níveis de noradrenalina no encéfalo aos 70 anos^{3.0} e que a perda de neurônios noradrenérgicos pode ser responsável, em parte, pelos déficits nas funções locomotoras e cognitivas em idosos^{3.8}.

Outro ponto controverso na literatura diz respeito ao sistema serotoninérgico, pois apesar de muitos autores afirmarem que os níveis de serotonina reduzem com o envelhecimento, outros estudos mostram que não há modificação significativa desta substância^{3.0}.

Existem, ainda, dados divergentes a respeito dos níveis de glutamato no córtex cerebral de indivíduos idosos, pois este foi encontrado em níveis elevados, reduzidos ou inalterados^{3.6}.

No que diz respeito a substância GABA, estudos mostram que seus níveis encontra-se diminuídos no núcleo caudado e núcleo olivar inferior no processo do envelhecimento^{3.1}.

3.1.3. Radicais livres e o envelhecimento

Os radicais livres são espécies que apresentam elétrons desemparelhados e, portanto, reagem facilmente com outras moléculas. São considerados os maiores causadores dos processos de envelhecimento generalizado e declínio das funções orgânicas. São responsáveis tanto pelo envelhecimento físico como o mental, sendo que no cérebro eles atuam de forma mais intensa e precoce, levando a problemas desde pequenas perdas de memória até as doenças neurodegenerativas.

Como grande parte dos radicais livres é formada como consequência natural da respiração ou como subproduto do trabalho celular de produção de energia, o organismo naturalmente se encarrega de produzir antioxidantes para combatê-los. Entretanto, quando ocorrem desequilíbrios, a ação desses antioxidantes naturais não é suficiente para manter os sistemas bioquímicos livres das ações oxidativas.

O cérebro é mais afetado pela ação dos radicais livres porque é um órgão rico em ácidos poliinsaturados e, com isso, consome uma quantidade elevada do oxigênio aspirado gerando radicais livres formados por espécies reativas de oxigênio (ROS – reactive oxygen species).

Com relação à produção de energia na célula, os radicais livres são formados porque as mitocôndrias, que são as organelas especializadas em produzir energia, necessitam de oxigênio para este processo, utilizando para isso cerca de 20% do oxigênio consumido. Como subprodutos são gerados radicais livres, particularmente espécies reativas de oxigênio.

As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas não só como consequência do metabolismo celular, mas também por citocinas e oxidases (enzimas específicas da membrana plasmática)^{3,9}.

Os principais alvos de ROS incluem DNA, lipídios, proteínas e açúcares, sendo que a ordem de preferência de ataque depende de muitos fatores, como o local onde a espécie reativa é gerada, a habilidade relativa de uma biomolécula ser oxidada e a disponibilidade de íons metálicos associados a essa biomolécula^{3,10}. Os íons metálicos muitas vezes potencializam a ação dos radicais livres e/ou favorecem a formação de mais radicais livres.

Os radicais livres se ligam preferencialmente a células gordurosas e, como o cérebro e as células nervosas são compostos principalmente de gorduras, a região cerebral é fortemente afetada pela ação dos radicais livres.

A ação dos radicais livres pode inibir a produção de neurotransmissores como, por exemplo, a acetilcolina (envolvida na memória e aprendizado), a dopamina (equilíbrio e no movimento físico) e a serotonina (regula o humor e o apetite), entre outros. Distúrbios nas concentrações de neurotransmissores comprometem todo o funcionamento do cérebro.

O excesso de radicais livres leva ao chamado “stress oxidativo”, que provoca uma resposta defensiva do sistema imunológico e, desta maneira, acaba produzindo mais radicais livres; gerando com isso um processo inflamatório, que é mais um efeito nocivo dos radicais livres.

Nos últimos anos, o processo inflamatório produzido pelos radicais livres, tem sido associado a praticamente todas as doenças crônicas do cérebro, incluindo a Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer, esclerose múltipla e demência.

Os antioxidantes são as substâncias que protegem o organismo contra a formação e ataque dos radicais livres, alguns podem ser obtidos através da alimentação ou medicação, mas vários deles são produzidos pelo próprio organismo. Entre os antioxidantes que o organismo produz destacam-se a glutathione (muito importante para o cérebro e sistema nervoso), as enzimas catalases e peroxidases, a carnitina e a Coenzima Q.

O sistema antioxidante sanguíneo pode ser classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pela superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 ; pela catalase (CAT), que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O e pela glutathione peroxidase (GPx), que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como co-fator. O sistema não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutathione (GSH), principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte de ferro) e ceruloplasmina (transporte do cobre e oxidação do ferro para posterior captação pela transferrina)^{3,11}.

Com o envelhecimento, o cérebro se torna mais vulnerável às degenerações principalmente porque a produção de antioxidantes vai se tornando menor e, por isso,

um fato comum observado em todas as doenças neurodegenerativas é o aumento na produção de radicais livres e o stress oxidativo.

Estudos mostram que a combinação de folato, vitamina E e acetilcarnitina proporciona uma proteção sinérgica contra o stress oxidativo^{3.12}.

3.2.

Desequilíbrio na concentração de íons metálicos e neurodegeneração

Diversos processos biológicos utilizam íons metálicos^{3.13,3.14}. No cérebro, em concentrações normais, os íons metálicos são fundamentais para o funcionamento das sinapses (transmissões de sinais entre os neurônios). No citoplasma das células cerebrais são encontrados normalmente metais de transição como Mn, Fe, Co, Ni, Cu e Zn, cada um com suas funções específicas dentro das concentrações adequadas.

O zinco, por exemplo, faz parte da composição de diversas metaloenzimas, está distribuído de forma não uniforme no cérebro^{3.15} e supõe-se que ele age com o glutamato como neurotransmissor. Mais de 90% do zinco presente no organismo está ligado a metaloproteínas e o maior grupo é o das proteases (MMP) como, por exemplo, as collagenases^{3.16}, que são necessárias para modificações da matriz onde as células residem e se multiplicam.

O ferro está presente em enzimas fundamentais para a síntese de neurotransmissores como serotonina, dopamina e óxido nítrico. Outras enzimas como, por exemplo, a hidroxitirosinase (para a dopamina) e a hidroxitriptofanase (para a serotonina) precisam de um ferro não heme e oxigênio.

O cobre tem um importante papel no cérebro porque é essencial para algumas enzimas fundamentais no metabolismo cerebral, como a CuZn superóxido dismutase, a ceruloplasmina, a citocromo C oxidase, a tirosinase e a dopamina β -hidroxilase^{3.17}. Este íon metálico é também necessário nos processos oxidativos, controlando algumas etapas da síntese do tecido cognitivo, e na produção de certos mensageiros tais como a norepinefrina, a partir da dopamina e peptídeos com grupamentos amida (mais de 50% de todos os peptídeos mensageiros são amidados, incluindo as endorfinas).

Entretanto, íons metálicos têm sido associados à formação de radicais livres e diversas doenças neurodegenerativas vêm sendo associadas ao stress oxidativo, que é consequência da presença excessiva de radicais livres^{3.18}. Estudos mostram que os radicais livres podem levar a precipitação de agregados tóxicos de fragmentos de

proteínas, que contribuem ainda mais para a formação de outros radicais livres e, como consequência, levam a diminuição da capacidade de defesa antioxidante^{3.19} do organismo, o que torna este processo uma reação em cadeia. A formação de placas em doenças neurodegenerativas como o Alzheimer, está sendo associada a metais como ferro, cobre e zinco^{3.18,3.20}.

O envelhecimento e desordens neurodegenerativas, elevam substancialmente as concentrações extracelulares de metais de transição como ferro, cobre, entre outros. O grande problema é que o desequilíbrio na concentração destes íons metálicos provoca toxicidade porque potencializa a formação de radicais livres. A ligação do cobre a algumas proteínas tem sido apontada como grande agente na inicialização da formação de radicais livres e ocasionando dano oxidativo.

O organismo possui agentes biológicos redox, como cisteína, ácido ascórbico, glutathione, metionina, homocisteína, que auxiliam na neuromodulação, proporcionam substratos para a síntese de anti-oxidantes intracelulares e protegem contra o stress oxidativo, principalmente porque capturam os íons metálicos. Em concentrações normais, estes agentes biológicos redox conseguem manter o equilíbrio redox, impedindo a deposição excessiva desses íons metálicos que poderiam potencializar a formação de radicais livres. Entretanto, com o envelhecimento, em função da diminuição ou perda da homeostase celular ocorre uma dramática diminuição dos níveis destes agentes biológicos redox o que, em associação com o desequilíbrio na concentração de íons metálicos como ferro e cobre^{3.21}, que também ocorre com a idade, potencializa a formação de radicais livres neurotóxicos contendo Cu(I) e Fe(II) e várias espécies reativas^{3.22, 3.23}, proporcionando o aumento do stress oxidativo e levando à morte celular.

Agentes que possam complexar íons metálicos e que possuam propriedades redox são estudados como possíveis antioxidantes.

Além disso, estes íons metálicos podem catalisar a oxidação de proteínas, que é um processo exotérmico, contribuindo ainda mais para o aumento do stress oxidativo e a perda das funções neurais. A facilidade de oxidação dos canais das proteínas depende da estrutura do aminoácido, sendo os aminoácidos sulfurados, como a metionina e a cisteína, fácil e reversivelmente oxidáveis, em condições suaves, a dissulfetos^{3.24}.

Para que estes distúrbios não aconteçam, é necessário que haja um balanço entre estes sistemas redox. O balanço redox em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos é determinado pela presença de pares redox responsáveis pelo fluxo de elétrons, e qualquer mudança neste balanço redox pode causar o stress oxidativo^{3,25}. A intensidade e patogenicidade desses desequilíbrios vão depender, naturalmente, das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com moléculas-alvo e da compartimentalização celular destes processos, em que fatores de solubilidade e difusibilidade são determinantes^{3,26}.

Quando a produção de espécies reativas de oxigênio ou outros radicais livres ocorre, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. O stress oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante^{3,25} como consequência, na maioria das vezes, do desequilíbrio na concentração de íons metálicos.

Além da contribuição para a formação de radicais livres, os íons metálicos têm sido associados aos depósitos protéicos característicos de todas as DNs, potencializando a formação das placas amilóides (que contribuem ainda mais para o aumento do stress oxidativo). Na doença de Alzheimer, a geração de espécies reativas de oxigênio tem sido apontada como consequência da coordenação do peptídeo β -amilóide ($A\beta$) a íons cobre^{3,27}. Estudos de RMN revelam que o cobre liga-se de maneira anômala à placa $A\beta$ -amilóide da DA^{3,28}. Metais com atividade redox como cobre, ferro, zinco e manganês são considerados possíveis agentes patogênicos^{3,29, 3,30} envolvidos não só na Doença de Alzheimer, mas em várias outras desordens neurais.

Marcadores de stress oxidativo, como carbonilas protéicas, nitro-tirosina, produtos de peroxidação lipídica e bases de DNA oxidadas, são detectados em concentrações elevadas em tecidos de pacientes e modelos animais de Alzheimer, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica^{3,31, 3,32}.

3.3.

Má formação de proteínas: Origem das degenerações

O cérebro é rico em aminoácidos e íons metálicos, formando cadeias protéicas e enzimáticas que constituem os complexos sistemas neuronais. Desequilíbrio na concentração de íons metálicos e presença de radicais livres que levam ao stress oxidativo, entre outros fatores, podem contribuir para alterações nos genes responsáveis por codificar determinadas proteínas. Problemas na síntese protéica levam à produção de isoformas com conformação estrutural diferente daquela da proteína original^{3.33-3.38}. Estas proteínas modificadas têm sido apontadas como a origem das neurodegenerações, porque são responsáveis pela formação de emaranhados neurofibrilares e placas protéicas insolúveis (principais alterações fisiológicas encontradas no cérebro de pacientes com doenças neurodegenerativas distintas).

3.3.1.

Forma estrutural da proteína – Diferentes sítios de mutação

A figura 2 permite compreender de forma mais clara como as proteínas são estruturalmente formadas.

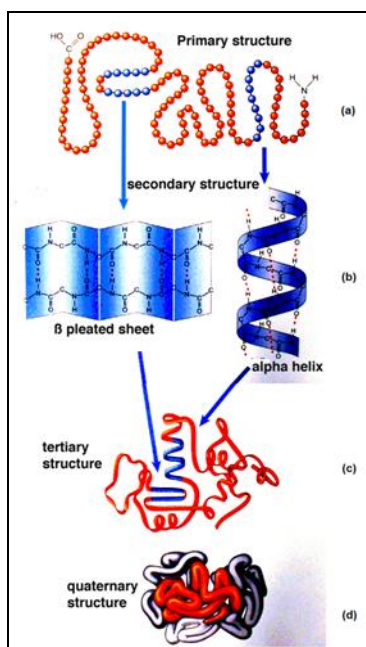


Figura 2 Constituição estrutural das proteínas

(Extraído de WWW.academic.brooklyn.cuny.edu/biology/bio4fv/page/3d_prot.htm)

Para compreender como ocorrem modificações em uma proteína, é preciso saber que a forma estrutural ou “arquitetura” da proteína é dividida em 4 níveis (estrutura primária, secundária, terciária e quaternária). São nestas estruturas que as diferentes modificações ocorrem.

A figura 2 mostra: a) **Estrutura primária**: é a sequência de aminoácidos que constituem a proteína, especificada pela informação genética, onde os aminoácidos estão unidos por ligações peptídicas e pontes dissulfeto; b) **Estrutura secundária**: consiste em um primeiro nível de dobramento da proteína, graças às interações geralmente do tipo ligações de hidrogênio entre seus aminoácidos, formando estruturas conhecidas como **α -hélices** (molécula polipeptídica se apresenta como uma hélice orientada para a direita, como se estivesse em torno de um cilindro, mantida por ligações de hidrogênio arranjadas entre os grupos C=O e H-N) e **folhas- β pregueadas** (ocorre a formação de ligações de hidrogênio entre duas ou mais cadeias polipeptídicas adjacentes. As ligações de hidrogênio ocorrem entre os grupos C=O e N-H de ligações peptídicas pertencentes a cadeias polipeptídicas vizinhas em vez de no interior da cadeia). As combinações entre as estruturas alfa-hélice e beta pregueada são denominadas motivos estruturais ou estruturas supersecundárias; c) **Estrutura terciária**: forma tridimensional que a molécula de proteína adquire ao dobrar-se sobre si mesma graças às interações entre seus aminoácidos. É o pregueamento não periódico das cadeias polipeptídicas. Esta estrutura é determinada pela sequência de aminoácidos e resulta em uma estrutura mais compacta, onde os átomos ocupam posições específicas. A estrutura tridimensional determina a função da proteína; d) **Estrutura quaternária**: consiste de duas ou mais cadeias polipeptídicas (proteínas) unidas por ligações não covalentes. Forma complexos espaciais tridimensionais entre as cadeias polipeptídicas.

As modificações nas proteínas podem ocorrer em qualquer um destes níveis estruturais, desde alterações na sequência de aminoácidos até mudanças diretamente na estrutura tridimensional ou enovelamento da proteína, mantendo inalterada a sequência de aminoácidos. Íons metálicos, como cobre(II) e ferro(II) podem ser responsáveis por modificações protéicas porque podem formar ligações cruzadas internas nas proteínas alterando a conformação estrutural.

3.3.2. Proteínas “misfolded”

Todas as moléculas de proteínas são cadeias de aminoácidos, heterogêneas e não ramificadas. O dobramento ou enovelamento de proteínas é o processo através do qual a proteína assume a sua configuração espacial e funcional^{3.33}. Ao dobrar-se e enrolar-se, a proteína adquire uma forma tridimensional específica que a torna capaz de realizar a sua função biológica^{3.34}. A conformação espacial tridimensional de uma proteína é o que confere a ela sua função específica e é determinada pela sequência de aminoácidos da proteína^{3.35}.

Portanto, a estrutura de uma proteína e suas propriedades funcionais estão intimamente ligadas. O processo contrário chama-se desnaturação, onde uma proteína original é forçada a perder a sua configuração funcional, tornando-se uma cadeia amorfa não-funcional de aminoácidos. A desnaturação ocorre com a deformação tridimensional da proteína e sem a quebra das ligações peptídicas. Em alguns casos, a desnaturação é reversível, e as proteínas podem voltar a dobrar-se. No entanto, a desnaturação é, na maior parte dos casos, um processo irreversível que pode causar inatividade, deficiência ou instabilidade conformacional da proteína^{3.36-3.38}. As proteínas desnaturadas podem ter a sua solubilidade diminuída e precipitar. Assim, a desnaturação de proteínas é uma das causas da formação de placas insolúveis.

Apesar de estruturas desnaturadas contribuírem para a formação de placas insolúveis, as isoformas proteicas associadas às neurodegenerações não são estruturas amorfas, mas sim proteínas que por algum motivo sofreram modificação. Estas alterações comprometem o enovelamento, levando a estruturas incorretamente dobradas e por isso tridimensionalmente diferentes da isoforma normal, mas com uma estrutura bem definida (nada amorfa).

Estas proteínas são chamadas proteínas “misfolded” (mal dobradas, em inglês) e esta expressão é muito usada para descrever as proteínas associadas aos processos neurodegenerativos.

Às vezes, as proteínas “misfolded” são formadas porque alterações na sequência de aminoácidos da proteína levam a mudanças no seu enovelamento. Outras vezes, mesmo a sequência de aminoácidos permanecendo intacta, algumas mudanças podem ocorrer diretamente na estrutura tridimensional da proteína, também comprometendo seu enovelamento.

De uma forma ou de outra, ao assumir qualquer outra estrutura diferente da sua isoforma normal, a proteína torna-se inativa e não consegue mais exercer a sua função específica, podendo formar placas insolúveis que se depositam e tornam-se patogênicas.

Quando estas placas são formadas no cérebro, elas se acumulam na forma de emaranhados neurofibrilares ou placas insolúveis, que constituem as principais alterações fisiológicas microscópicas encontradas no cérebro de pacientes com diferentes doenças neurodegenerativas. Com isso, as patologias associadas às diferentes doenças neurodegenerativas têm origem no acúmulo de proteínas “misfolded”^{3.39-3.41}.

3.3.3.

Neurofibrilas e placas amilóides: Alterações fisiológicas associadas às Doenças Neurodegenerativas (DNs)

Em 3.1.2, foram vistas algumas das alterações fisiológicas microscópicas que ocorrem no SNC como consequência natural do envelhecimento, e que nem sempre estão acompanhadas de doenças neurodegenerativas.

Entretanto, como foi também comentado em 3.1, estas alterações fisiológicas tornam o cérebro mais vulnerável à ação de radicais livres neurotóxicos e outros fatores que podem desencadear a inativação e a morte neural.

O cérebro de pacientes com demências neurodegenerativas apresenta algumas alterações fisiológicas microscópicas bem distintas e especificamente associadas a processos demenciais, que são os emaranhados neurofibrilares e depósitos de placas protéicas (também chamadas placas amilóides).

Estes emaranhados neurofibrilares e as placas amilóides são constituídos por proteínas “misfolded” e têm sido apontados como os principais responsáveis pelos processos patológicos em todas as DNs porque se depositam, impedem as sinapses e contribuem para o aumento do stress oxidativo e morte neural.

Em pequenas quantidades, podem ocorrer de forma difusa em algumas regiões cerebrais (neocórtex, putâmen e núcleo caudado) de idosos saudáveis, como consequência normal do envelhecimento, mas parecem não produzir danos nestas concentrações. As placas amilóides ocorrem mais frequentemente após os 60 anos de idade e a capacidade mental é preservada em 25 a 40% dos indivíduos^{3.4}. Na Doença de Alzheimer (DA), a densidade é maior nas áreas límbicas e neocórtex associativo^{3.8}.

Emaranhados neurofibrilares

Emaranhados neurofibrilares são praticamente ausentes em indivíduos não dementes^{3.2, 3.4, 3.7}. Chamados também de novelos neurofibrilares, são estruturas bem características de neurodegenerações. O principal componente desses emaranhados é uma forma anormal, fosforilada, de uma proteína associada a microtúbulos – proteína Tau^{3.42, 3.43}. Ubiquitina e β -amilóide (também associadas aos microtúbulos) podem ser vistas em menores concentrações nos emaranhados neurofibrilares.

Os novelos neurofibrilares estão fortemente associados à neuropatologia da Doença de Alzheimer, onde as formas fosforiladas da proteína Tau são amplamente encontradas. Este processo de fosforilação da Tau será comentado em 3.4.1.

Placas amilóides

Amilóides são moléculas que têm a capacidade de formar naturalmente grandes agregados insolúveis de proteínas que, por algum motivo, tiveram as suas estruturas modificadas.

As placas amilóides, também denominadas de placas neuríticas, placas dendríticas ou placas senis, formam depósitos extracelulares protéicos chamados de fibras amilóides. Incorporam material neurítico (axônios, dendritos e sinapses degeneradas) e apresentam-se como estruturas esféricas localizadas na parte externa do neurônio^{3.2, 3.3}, mas são heterogêneas quanto à sua formação e composição.

Encontrados em todas as doenças neurodegenerativas, as amilóides têm sido apontadas, mais que as neurofibrilas, como as causadoras da toxicidade celular e da origem dos sintomas patológicos, porque provocam a inativação e morte das células neurais ao se depositarem entre elas.

Diferente dos emaranhados neurofibrilares, que são constituídos quase que exclusivamente pela proteína Tau fosforilada, os depósitos de amilóides são formados por proteínas diferentes. Para cada DN existe uma proteína específica envolvida na constituição da substância amilóide.

Na Doença de Alzheimer, por exemplo, as amilóides são constituídas por uma proteína chamada β -amilóide ($A\beta_{42}$), que deriva da clivagem enzimática de uma proteína maior, denominada proteína precursora da amilóide (PPA). A principal alteração fisiológica encontrada no cérebro de pacientes com DA é a presença destas placas β -amilóides. Já a Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), vulgarmente

chamada de doença da vaca louca, e suas variantes como a doença de Creutzfeldt-Jakob, que é a sua forma humana, estão associadas a depósitos de placas amilóides priônicas formadas pela proteína priônica modificada PrP_{Sc} (proteína priônica scrapie).

Proteínas modificadas são, portanto, as causas das alterações fisiológicas que desencadeiam todos os sintomas patológicos das DN.

3.4.

Proteínas modificadas: Marcadores patológicos das Doenças Neurodegenerativas (DNs)

Como já foi dito anteriormente, todas as doenças neurodegenerativas estão associadas a depósitos na forma de amilóides e neurofibrilas, além do desequilíbrio na concentração de íons metálicos e stress oxidativo gerado pelo excesso de radicais livres.

As proteínas que constituem as placas amilóides específicas nas principais DNs serão descritas a seguir e são marcadores patológicos de cada doença.

3.4.1.

Proteínas β -amilóide e Tau: Doença de Alzheimer (DA)

A doença de Alzheimer (DA) é a forma mais comum de demência, sendo a quarta causa mais frequente de morte em países desenvolvidos^{3.44}. A doença resulta em perda da função neuronal e dano sináptico, com subsequente comprometimento da memória, da coordenação motora e do raciocínio, além de perda da capacidade cognitiva e demência.

Entre as causas mais evidentes da doença estão a ocorrência e deposição extracelular de placas β -amilóides e a formação errática de neurofibrilas intracelulares contendo uma forma anormal, fosforilada, da proteína Tau, associada a microtúbulos^{3.42, 3.43}. Esta fosforilação anormal altera as funções normalmente exercidas pela proteína Tau^{3.45}, como a participação na montagem e estabilização dos microtúbulos^{3.46}.

Os depósitos amilóides na DA são caracterizados pela deposição extracelular de uma proteína na forma fibrilar^{3.47}, composta por uma sequência de 42 aminoácidos^{3.48} (Figura 3), a proteína β -amilóide de 4.500 Daltons^{3.49}, também denominada A β 1-42, β /A $_4$ ^{3.50} ou β AP.

H₂N-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 3 Sequência de aminoácidos da proteína β -amilóide (A β 1-42)

Esta proteína é produto da clivagem enzimática de uma proteína bem maior codificada por um gene localizado no cromossomo 21^{3.51}, denominada APP (proteína precursora da β -amilóide).

A proteína β -amilóide possui duas isoformas mais comuns: a A β 1-40 (predominantemente solúvel e encontrada em todos os fluidos biológicos^{3.52, 3.53}) e a A β 1-42 (insolúvel e predominantemente encontrada nos depósitos de placas senis^{3.54}). A A β 1-42 é considerada como um marcador patológico da Doença de Alzheimer^{3.55, 3.56}. Já a APP possui 695-770 resíduos, sendo a APP 770 uma das formas mais comuns presente no cérebro^{3.57}.

A figura 4 mostra a proteólise da proteína precursora APP 770 dando origem ao fragmento A β 1-42.

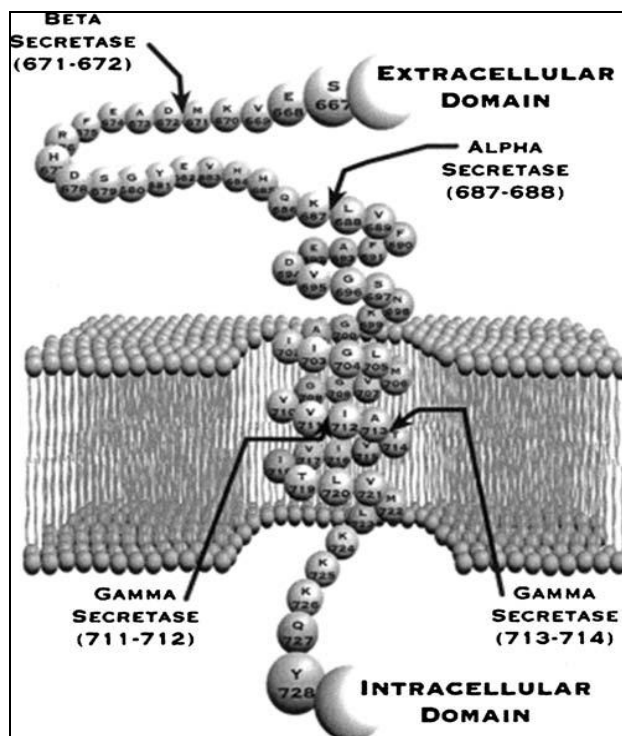


Figura 4 Sítios de clivagem da proteína APP 770. O fragmento A β 1-40, gerado da clivagem pelas β - e γ -secretases, compreende os resíduos 72-711 da APP 770, enquanto o fragmento A β 1-42 compreende os resíduos 672-713. (Extraído da referência 3.57).

A figura 4 mostra como a proteína precursora da β -amilóide (APP) se encontra dividida em 3 regiões, onde a primeira é constituída de uma longa região extracelular (extremidade N-terminal), a segunda é a região que atravessa a membrana celular e a terceira, a região intracelular (extremidade C-terminal). A figura mostra a isoforma APP 770 sendo fragmentada. O fragmento A β 1-40 (solúvel) é gerado da clivagem pelas β - e γ -secretases e compreende os resíduos 672-711 da APP 770, enquanto que o fragmento A β 1-42 (insolúvel), também gerado da clivagem pelas β - e γ -secretases, compreende os resíduos 672-713. Os 28 primeiros resíduos da β -amilóide correspondem à parte da região extracelular da APP, enquanto os 14 últimos (700-713) correspondem à parte do domínio da transmembrana que compreende os aminoácidos 700-723.

É encontrada também, em menor quantidade, a formação de neurofibrilas intracelulares contendo uma forma anormal, fosforilada, de uma proteína associada à microtúbulos – proteína Tau^{3.42, 3.43}.

Os emaranhados neurofibrilares são decorrentes de alterações intracelulares que ocorrem no citoplasma dos neurônios, devido à hiperfosforilação da proteína Tau (estabilizadora dos microtúbulos) e correspondem à perda do citoesqueleto normal dos microtúbulos e neurofilamentos.

A proteína Tau^{3.58} é sintetizada a partir de um único gene no cromossomo 17. São conhecidas seis isoformas humanas desta proteína e todas estão igualmente presentes nos emaranhados neurofibrilares intraneurônios e apresentam um estado de fosforilação anormal^{3.59}. Esta fosforilação anormal altera as funções normalmente exercidas pela proteína^{3.60}, como a participação na montagem e estabilização dos microtúbulos^{3.61}. A desestabilização dos microtúbulos poderia gerar a completa dissolução do citoesqueleto nos neurônios afetados pelos emaranhados neurofibrilares^{3.62}, contribuindo para a perda neuronal observada nos estágios mais avançados da doença^{3.63}.

Além das proteínas patológicas e o desequilíbrio nas concentrações de íons metálicos, é importante mencionar que os portadores de Alzheimer apresentam uma redução geral na concentração de todas as substâncias neurotransmissoras e nas constituintes dos tecidos nervosos e cerebrais. Cabe ressaltar as alterações nos níveis de metalotioneína III (MT-III) e acetilcolina.

A MT-III é uma das metalotioneínas encontradas no cérebro, exerce atividade neuroinibitória e está envolvida na recuperação de lesão neuronal. Estudos realizados demonstram que a concentração da MT-III está diminuída na DA^{3,64}.

A acetilcolina é uma das substâncias responsáveis por transmitir impulsos entre nervos, células nervosas e musculares. Acredita-se que as características clínicas da DA estejam também relacionadas a uma diminuição nos níveis de acetilcolina, pelo fato de os pacientes apresentarem baixos níveis de resposta neuroquímica, com redução da transmissão de estímulos e mensagens. Inibidores da acetilcolinesterase vêm sendo testados no tratamento da Doença de Alzheimer e alguns resultados já estão sendo comprovados, com uma melhora nas funções cognitivas e demência^{3,65-3,70}.

3.4.2.

Proteína Priônica PrP_{Sc}: Encefalopatia Espongiforme Transmissível (EET)

As doenças causadas por príons formam um grupo relacionado de desordens neurodegenerativas fatais, chamadas Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (TSEs), ou doenças priônicas, que afetam humanos e outros mamíferos.

Em bovinos é chamada de Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), vulgarmente conhecida como doença da vaca louca; em ovinos e caprinos é denominada Scrapie e no homem ficou sendo denominada doença Creutzfeldt-Jakob.

Os pacientes com a Doença de Creutzfeldt-Jakob apresentam perda das funções cerebrais, características clínicas e neuropatologia espongiforme, semelhantes à Doença de Alzheimer^{3,71} (Figura 5). Entretanto, o progresso da EET é muito mais rápido, provocando demência total e morte em um período de seis meses.

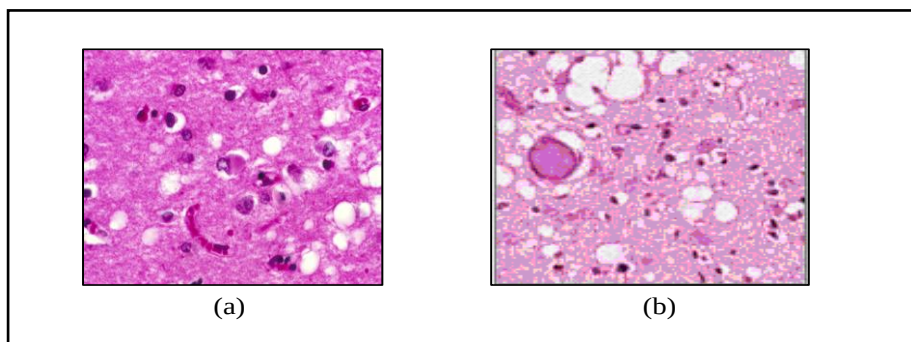


Figura 5 Patologia espongiforme do cérebro nas doenças de Alzheimer (a), e Creutzfeldt-Jakob (b). (Extraído da referência 3.71)

A palavra príon vem do acrônimo Proteinácio e Infeccioso^{3.72}. É uma proteína infecciosa expressa constitutivamente em diversos tipos celulares, especialmente em neurônios, nos quais pode se acumular em membranas pré e pós-sinápticas^{3.73, 3.74}. Os príons são proteínas com capacidade de modificar outras proteínas, tornando-as cópias da proteína que o compõe.

Estas doenças são causadas por uma proteína autoreplicativa, a proteína priônica PrP_{Sc} (príon scrapie), que é a forma patogênica da PrP_C celular normal^{3.73}, que teve a sua estrutura alterada. A PrP_{Sc} é uma proteína “misfolded” priônica. A proteína príon celular PrP_C é produto de um único gene, chamado Prnp, e possui 252 resíduos de aminoácidos (252 em algumas espécies)^{3.74}, estando presente em todas as células do organismo.

Existe outra variante da forma humana, também chamada Doença de Creutzfeldt-Jakob, que é hereditária e progressiva, na qual a proteína priônica apresenta uma alteração na sequência de aminoácidos Met/Val → Met/Met (Figura 6).

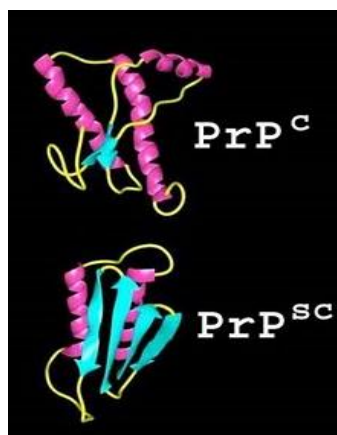


Figura 6 Estrutura da forma normal (PrP_C) e patogênica (PrP_{Sc}) da proteína priônica na Doença de Creutzfeldt-Jakob hereditária. (Extraído de WWW.4.bp.blogspot.com/_dt_tYyrEN_U/SGZzCE0jVMI/AAAAAAAAACM/BFVs2z6dLnE/s1600-h/prion.jpg)

Em todas as variantes, os íons metálicos com atividade redox têm papel ativo, já que ocasionam processos oxidativos anormais^{3.75}.

Processo bioquímico de conversão de PrP_C para PrP_{Sc}

Os príons possuem natureza autoreplicativa, o que explica facilmente como se aglomeram formando placas. A diferença entre a isoforma normal PrP_C e a patogênica

PrP_{Sc} é apenas uma má formação na estrutura secundária tridimensional^{3.76, 3.77}. A sequência primária das duas formas é a mesma, indicando que a conversão da forma celular (que não causa a doença) para a forma infecciosa não é causada por uma modificação covalente na proteína.

Em 3.3.1 foi mostrada como é a constituição estrutural de uma proteína, permitindo entender melhor como são estas modificações protéicas. O que se observa é a conversão de uma estrutura rica em α -hélices na PrP_C a uma outra estrutura que tem maior conteúdo de folhas β , a PrP_{Sc}^{3.76, 3.77}.

As estruturas secundárias das duas isoformas diferem acentuadamente, sendo que a PrP_C é constituída predominantemente por α -hélices (42%) e se apresentando na forma celular globular, enquanto que a PrP_{Sc} é rica em regiões contendo folhas β -pregueadas (43%), principal característica das moléculas infecciosas, se apresentando na forma amilóide^{3.78}.

Com o auxílio de peptídeos sintéticos, foi possível avaliar que as α -hélices poderiam ser convertidas em estruturas β -pregueadas^{3.79} e que estas poderiam induzir mudanças conformacionais em peptídeos com estrutura helicoidal^{3.80}. Paralelamente, foi mostrada a conversão da PrP_C na PrP_{Sc}, *in vitro*^{3.81}, sendo a proteína resultante de tal conversão rica em 7 estruturas β -pregueadas, o que explicaria a deposição tóxica de agregados insolúveis nos tecidos cerebrais^{3.82}.

A conversão da PrP_C em sua isoforma anormal PrP_{Sc} se dá através de um processo no qual uma porção de α -hélice da estrutura é reenovada em folhas β . A conversão de PrP_C em PrP_{Sc} ocorre por um mecanismo auto-catalítico. Existem vários aspectos obscuros sobre a cinética de replicação priônica e o mecanismo de toxicidade associado aos príons, mas já se sabe que a auto-catálise é o mecanismo mais importante na cinética priônica, mesmo que a conversão espontânea de PrP_C em PrP_{Sc} ainda não esteja totalmente explicada. Através de um mecanismo biológico ainda pouco esclarecido, uma vez que a isoforma PrP_{Sc} anormal é formada, ela é capaz de promover a conversão de outras PrP_C normais para a forma PrP_{Sc}. A isoforma defeituosa PrP_{Sc} priônica funciona como uma espécie de molde para a formação de novas proteínas priônicas anormais. Ao entrar em contato com a isoforma normal PrP_C na célula, a isoforma defeituosa faz com que ela adquira a forma patogênica PrP_{Sc}.

Para um melhor entendimento do mecanismo de propagação dos príons, já foram propostos vários modelos matemáticos, e todos constataram ser o termo auto-catalítico (termo de Michaelis-Menten) o mais importante nas equações de cinética priônica.

Apenas a proteína PrP_{Sc} é amilóide, ou seja, tem a capacidade de formar naturalmente grandes agregados protéicos insolúveis. Em oposição, a forma normal PrP_C celular é globular e altamente solúvel. A proteína PrP_C é caracterizada como sendo sensível à digestão pela proteínase K, enquanto a PrP_{Sc} não o é.

3.4.3.

Proteínas alfa-sinucleína e parkina: Doença de Parkinson (DP)

O parkinsonismo caracteriza-se por uma desordem progressiva do movimento devido à disfunção ou morte, principalmente, de neurônios secretores de dopamina, que é uma substância fundamental para o controle e execução dos movimentos. Ataca a região cerebral responsável pelo controle dos movimentos, causa enrijecimento muscular, tremores, lentidão de movimento e instabilidade na postura^{3.83}.

As proteínas alfa-sinucleína e parkina estão diretamente relacionadas à Doença de Parkinson. Defeitos na constituição destas proteínas levam ao acúmulo dos chamados corpos de Lewy (homenagem ao patologista que as observou pela primeira vez), visíveis ao microscópico.

A forma genética da Doença de Parkinson é a mais grave e ocorre por defeito no gene da alfa-sinucleína ou no gene da parkina. São duas formas familiares distintas da doença, podendo também ocorrerem juntas. A forma esporádica da doença (não familiar) também está relacionada a defeitos sutis nas enzimas envolvidas na degradação da alfa-sinucleína e/ou parkina.

O gene da alfa-sinucleína (PARK1) foi o primeiro identificado no mal de Parkinson^{3.84}. Ele codifica uma proteína com apenas 144 aminoácidos, que atua na sinalização entre neurônios. As formas patológicas desta proteína possuem alterações minúsculas na sequência de aminoácidos, várias dessas mutações ainda são desconhecidas, e as duas mais comuns resultam da mudança de um único aminoácido da sequência.

Um segundo gene pode sofrer mutação em outra forma familiar do mal de Parkinson, que codifica a proteína parkina (PARK2)^{3.85}. As mutações da parkina parecem ser mais comuns que as da alfa-sinucleína. A parkina contém várias sequências de aminoácidos (ou domínios) que são comuns a muitas outras proteínas. Associada às proteínas patológicas, a ocorrência da Doença de Parkinson está relacionada também com a presença de íons metálicos e radicais livres, produzidos como resultado normal

das reações metabólicas, e que, em excesso, podem provocar lesões cerebrais através de processos oxidativos e/ou contribuir para as disfunções protéicas.

3.4.4.

Proteína Huntingtina: Doença de Huntington (DH)

O mal de Huntington é hereditário e raro. Afeta pessoas com cerca de 40 anos, causando convulsões e desgaste mental que mata após dez anos. A causa seria a mutação de um gene localizado numa região do cromossomo 4.

Nos portadores da Doença de Huntington, na região do cromossomo 4 onde o gene defeituoso foi observado, há mais de 36 repetições da sequência de nucleotídeos CAG. Em indivíduos normais, neste mesmo local, a sequência de CAG é geralmente menor que 20. Os nucleotídeos são os blocos construtores de DNA, a trinca CAG é responsável pela codificação do aminoácido glutamina.

A proteína codificada por esse gene defeituoso é denominada huntingtina e tem uma sequência com repetição anormalmente alta desse aminoácido. É possível encontrá-la em todas as células do organismo^{3.86}.

3.5.

Bioquímica das agregações protéicas

Uma forma de tentar retardar ou desacelerar as neurodegenerações é o conhecimento bioquímico de todos os processos que levam aos depósitos protéicos que comprometem as sinapses e aumentam o stress oxidativo. Assim, tão importante quanto conhecer os processos bioquímicos que levam à formação de isoformas protéicas “misfolded” é a compreensão de como elas proliferam, gerando os grandes depósitos que as tornam patológicas.

A agregação é facilmente explicada quando se fala de proteínas priônicas, devido à natureza autoreplicativa dos príons, como foi descrito em 3.4.2. Para todas as demais proteínas que não se comportam como príons, um modelo útil para se entender como ocorrem às agregações foi encontrado nos serpins, que são inibidores das serino-proteases.

3.5.1.

Serpins: Modelo útil para entender a agregação de proteínas

Os termos protease, proteinase e peptidase referem-se a um grupo de enzimas que quebram as ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Estas enzimas agem catalisando a hidrólise de tais ligações. O excesso de proteases leva à destruição do tecido.

Os serpins são proteínas que atuam como inibidores de serino-proteases, pertencem à superfamília serpina e podem ser encontrados em diversos organismos, como bactérias termofílicas e mamíferos^{3.87}. Os serpins são descritos como o melhor modelo para se explicar a agregação de proteínas não priônicas.

O elemento básico da estrutura de uma serpina é composto por três lâminas β (A-C) e um laço reativo exposto móvel, que tem uma sequência peptídica que serve como pseudo-substrato para a protease alvo^{3.88-3.94}. Os aminoácidos críticos dentro deste laço atuam como “anzol” da enzima^{3.95}. Isto ocorre porque o centro reativo das serpinas é exposto e reconhecido pela proteinase alvo como um substrato normal a ser clivado. É exatamente nisto que consiste o mecanismo molecular de inibição das serino-proteases pelas serpinas. Uma vez que a enzima é presa, rompe a união peptídica P1-P1' da serpina^{3.96} e a protease se inativa por uma ação de tipo ratoeira, que a faz girar desde o pólo superior ao inferior da proteína em associação com a inserção do laço reativo como uma linha extra na lâmina β A^{3.97-3.101}. Com isso, o centro reativo da protease alvo é deformado, resultando em inibição irreversível^{3.102 – 3.116}.

No entanto, este processo pode se repetir sucessivas vezes^{3.117, 3.118} e, quando isso ocorre, resulta na formação de estruturas poliméricas que são mantidas na célula levando à morte celular e provocando danos ao tecido^{3.119}, o que pode induzir doenças.

A agregação de neuroserpins resulta na chamada encefalopatia familiar com inclusão de corpos de neuroserpins, que são localizados em camadas profundas do córtex cerebral. Há uma relação direta entre a quantidade de neuroserpins acumulados intracelularmente e gravidade da doença^{3.120}.