

1 Introdução

A existência no fluido biológico de íons metálicos e moléculas orgânicas biologicamente ativas como poliaminas, nucleotídeos, entre outras, contendo átomos com pares de elétrons doadores, sendo considerados como ligantes em potencial, indicam a necessidade do conhecimento da composição, estrutura e estabilidade dos complexos formados entre eles para entender suas atividades biológicas no organismo.

Nas condições biológicas, existe um grande número de ligantes competindo simultaneamente pelos íons metálicos. Assim, os equilíbrios químicos envolvem também, não somente a formação de um complexo entre um ligante e um íon metálico (complexo binário), como também a formação de complexos com um íon metálico e dois ligantes (complexo ternário) [1,2,3] existindo, neste último caso, a possibilidade de ocorrer interações entre os ligantes.

De fato, os complexos ternários e as interações ligante-ligante, desempenham papéis e funções importantes em vários processos bioquímicos como no transporte de íons metálicos, reações enzimáticas, além de outras funções biológicas, variando de reconhecimento molecular e catálise de metaloenzimas até transferência de informações por neurotransmissores e hormônios [4].

Neste caso, estudar a formação destes tipos de complexos, sua estabilidade e estrutura, e a possibilidade de interação entre os ligantes, é de extrema importância.

Neste trabalho foi estudado o comportamento dos sistemas contendo poliaminas na presença de ligantes fosfatados, PCr ou ATP, e a coordenação à íons metálicos de interesse biológico, Cu(II) e Zn(II).

1.1 As Poliaminas

As poliaminas (PA) são aminas biogênicas existentes em praticamente todos os tipos de células. Em pH fisiológico, as poliaminas encontram-se sob a

forma catiônica protonada. Devido o seu grupo protonado – grupo NH_3^+ , esses compostos podem interagir com bioligantes carregados negativamente, tais como ácidos nucleicos, proteínas e fosfolipídios, sendo ainda bons ligantes para metais de transição [5].

Entre as poliaminas biogênicas, pode-se citar a putrescina (Put) (1,4-butanodiamina), sendo esta, a poliamina precursora de outras duas poliaminas biogênicas: a espermidina (Spd) e a espermina (Spm) [6]. Outras poliaminas naturais são a 1,3 diaminopropano (tn), a cadaverina, a norespermidina, entre outras, porém são encontradas em menor quantidade no organismo humano [7]. Outra poliamina é a etilenodiamina (en), mas essa não é encontrada no organismo [5].

A en, figura 1-a, possui uma cadeia metilênica de dois átomos de carbono e a cada um dos carbonos uma amina primária está ligada. Seus dois átomos nitrogênicos doadores ligam-se com o íon central para a formação de um anel de cinco membros. É um típico ligante formador de quelato, entretanto, ela também pode coordenar-se de forma monodentada ou em ponte [5].

A tn, figura 1-b, possui uma cadeia metilênica de três átomos de carbono e a cada um dos carbonos uma amina primária está ligada. A tn forma complexos com anel de seis membros, dando preferência à coordenação tipo cadeira. Entretanto uma conformação mista também é possível, particularmente no caso de derivados alquil [5].

A Put, figura 1-c, possui uma cadeia metilênica de quatro átomos de carbono e a cada um dos carbonos na extremidade uma amina primária está ligada. É encontrada no pulmão, fígado, pâncreas, sêmen dos mamíferos. Também é encontrada em tecidos em decomposição, juntamente com a cadaverina. Ambas poliaminas são produzidas pela quebra de aminoácidos, L-ornitina e lisina, respectivamente em organismos vivos e mortos [8,9]. Os dois compostos são os maiores responsáveis pelo odor ruim de carne putrificada e também contribuem para o odor do mau hálito [10].

A Spd, figura 1-d, possui uma cadeia metilênica de quatro átomos de carbono e uma cadeia metilênica de três átomos de carbonos que se ligam por uma amina secundária, e a cada um dos carbonos na extremidade, uma amina primária está ligada. São encontradas em todos os organismos vivos.

A Spm, figura 1-e, possui uma cadeia metilênica de quatro átomos de carbonos ligada através de duas aminas secundárias a duas cadeias metilênicas de três átomos de carbono e a cada um dos carbonos na extremidade, uma

amina primária está ligada. São encontradas apenas em organismos superiores [11].

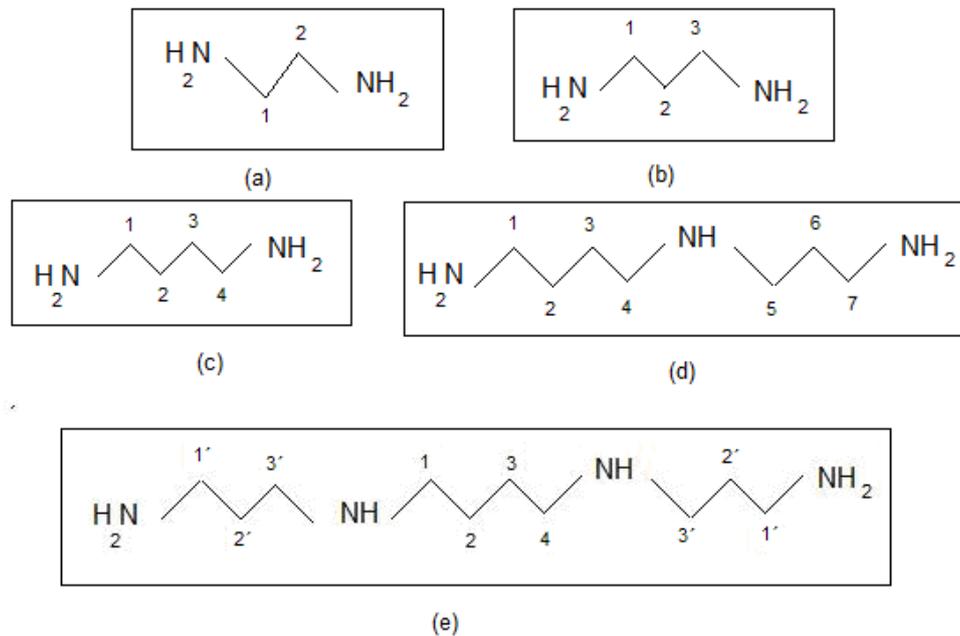


Figura 1 – Estrutura das poliaminas: (a) en, (b) tn, (c) Put, (d) Spd e (e) Spm

1.1.a Funções biológicas das poliaminas no sistema nervoso central

As poliaminas estão presentes em praticamente todos os tipos de células [12,13] e suas concentrações são particularmente grandes em células jovens e cancerígenas [12,14]. Entre as funções biológicas das poliaminas podemos citar a influência no estágio de transcrição na síntese das proteínas, estabilização das membranas e agem como mensageiros intracelulares. Estão envolvidas em várias reações: reagem como substrato para a síntese de hormônios ou agem como fragmentos de coenzimas [15-18].

A putrescina, espermina e a espermidina são poliaminas que também exibem um número de efeitos neurofisiológicos e metabólicos no cérebro [17-19]. Os papéis dessas poliaminas em cérebros normais e patológicos ainda estão sob pesquisa. Os primeiros estudos das poliaminas no cérebro foram relatados na década de 1970, porém se tornaram um importante foco de investigação da neurociência anos mais tarde [17].

Estudos relacionados ao nosso sistema nervoso central (SNC), indicam que as poliaminas podem potencializar ou inibir a ação de um receptor glutamatérgico localizado no hipocampo, o receptor N-Metil-D-aspartato (NMDAr) [16-28]. Esse receptor faz parte do sistema glutamatérgico que envolve uma série de receptores que são ativados pelo aminoácido glutamato. O sistema é considerado o maior neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central [29-34]. Os receptores deste sistema permitem a transmissão do impulso elétrico e o receptor NMDA está envolvido na plasticidade sináptica e na formação de sinapses envolvidas nos processos de aprendizagem e memória [16,18,26-33,35-38].

A figura 2 representa o receptor NMDA e seus sítios de ligação.

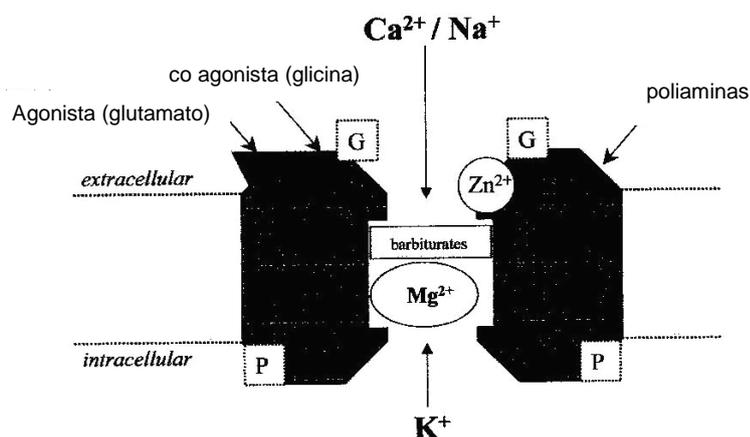


Figura 2- Receptor NMDA e seus sítios de ligação [33].

O receptor NMDA é um canal iônico que regula o fluxo de cálcio, sódio e potássio em células neuronais. O fluxo desses íons metálicos é responsável pela transmissão sináptica. No entanto, a ativação excessiva do receptor NMDA, elevando os níveis de aminoácidos excitatórios, é responsável por excitotoxicidade isquêmica do cérebro resultando em danos neurológicos e morte neural [23,29,31-33,35-37,39].

O NMDAr é ativado, inibido ou modulado através de ligações em sítios específicos. Existem sítios específicos para o glutamato, para a glicina, um coativador desse receptor, sítios das poliaminas, sítios para o Zn(II), entre outros. Quando o receptor NMDA está em repouso, o canal iônico está bloqueado pelo íon Mg(II). O canal é desbloqueado quando os agonistas do receptor, o glutamato e a glicina se ligam ao NMDAr e há uma despolarização pós sináptica [18,23,29,31-33,37]. As poliaminas Put, Spd e Spm, são agonistas

do NMDAr e ao interagir com esse receptor, através de sítios extracelulares no canal, estimulam ou inibem o receptor provocando mudanças neurais [16-23,25-28,34-37]. Baixas concentrações de poliaminas melhoram as correntes do NMDAr, aumentando a frequência de abertura do canal, enquanto as concentrações mais elevadas de poliaminas produzem menos aumento ou inibem as correntes do receptor NMDAr provocando deficiência na memória e danos no aprendizado [19,25,27]. A afinidade do canal pela poliamina é dependente de sua carga. Assim, a Spm é mais potente que a Spd, que por sua vez é mais potente que a Put [19,22,37].

Alguns dos efeitos das poliaminas no NMDAr são: potencializam a ação dos aminoácidos glicina e glutamato, aumentando a condutância e a frequência de abertura do canal; bloqueiam a entrada do poro como faz o Mg(II) devido seu caráter catiônico [19,21,22,24,27,28,33,36,37,40]

Alguns compostos são antagonistas do receptor NMDA, ou seja, inibem suas atividades e funções. Os antagonistas não competitivos são compostos que atuam sobre o NMDAr, porém só agem quando o receptor já está ativado [29]. Apesar de serem estruturalmente diversos, todos tem carga positiva e agem de maneira a serem dependentes da voltagem. Alguns antagonistas são usados na farmacologia como analgésicos ou drogas clínicas dada a sua capacidade de amenizar as ações dos neurônios [33,37,41].

As poliaminas podem também estar implicadas na doença neurodegenerativa Alzheimer (DA). Em pacientes com DA é observada uma diminuição da ligação do glutamato ao receptor NMDA [33]. As concentrações de espermidina e espermina em pacientes com DA são significativamente aumentadas no cérebro. As concentrações normais de Spd e Spm no hipocampo são 5,94 nmol/mg e 1,10 nmol/mg, respectivamente. No cérebro com DA, essas concentrações são 7,14 e 1,43 nmol/mg respectivamente [42]. O aumento nas concentrações podem estar implicadas numa inibição do NMDAr, causando a deficiência na memória.

1.2

A fosfocreatina e o ATP

Os compostos fosfatados desempenham importantes funções em vários processos biológicos. Os organismos vivos necessitam de energia para que possam desempenhar uma série de funções ligadas à vida, tais como o crescimento, movimento e reprodução. Adenosina 5´trifosfato (ATP) é o

composto fosfatado mais importante, sendo a fonte de energia mais comum para diversos processos biológicos [43]. Sua cadeia de fosfatos atua como núcleo de armazenamento e transferência de energia, que é liberada através de sua clivagem [1]. A hidrólise do ATP é catalisada por ATPases e vários cátions divalentes estão envolvidos no mecanismo [44]. O sistema nervoso central (SNC), assim como outros tecidos excitáveis, possui outro reservatório de alta energia, a fosfocreatina (PCr). No SNC o nível de PCr é mais alto que de ATP e pode ser usada para reconstituir o ATP utilizado nas reações celulares [35,45].

A fosfocreatina (PCr), figura 3, é um composto orgânico fosforilado encontrado no tecido muscular, capaz de armazenar e fornecer energia para, dentre outras atividades do organismo, também para a transmissão do impulso elétrico, por meio da conversão da PCr e ADP em adenosina 5´trifosfato (ATP), figura 4, e creatina (Cr) [46-48], em uma reação catalisada pela enzima denominada creatina quinase [49], conforme mostra a figura 5.

A molécula de PCr apresenta três átomos doadores possíveis em solução: um átomo de oxigênio do grupamento fosfato, um átomo de oxigênio do grupamento carboxilato e o átomo de nitrogênio do grupamento guanidino. Assim, a molécula de PCr pode atuar como ligante tridentado ou, em casos de sistemas com mais um ligante além da PCr, pode interagir com um íon metálico e com um segundo ligante.

O ATP é um nucleotídeo contendo adenina, ribose e três grupos fosfato. O centro de estocagem e transferência de energia é a cadeia polifosfato [44]. A molécula de ATP possui vários sítios possíveis de coordenação. Os principais sítios são os átomos de oxigênio dos grupos fosfato. Entretanto dependendo da natureza do íon metálico, os átomos de nitrogênio da adenina também são possíveis sítios de coordenação [50].

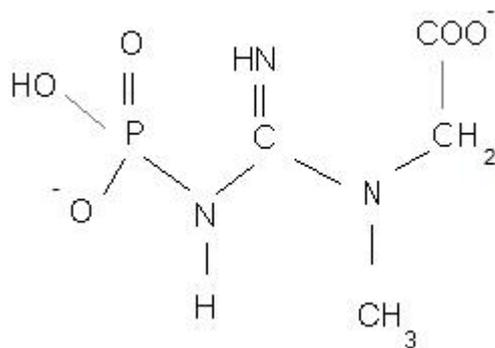


Figura 3 – Estrutura da PCr

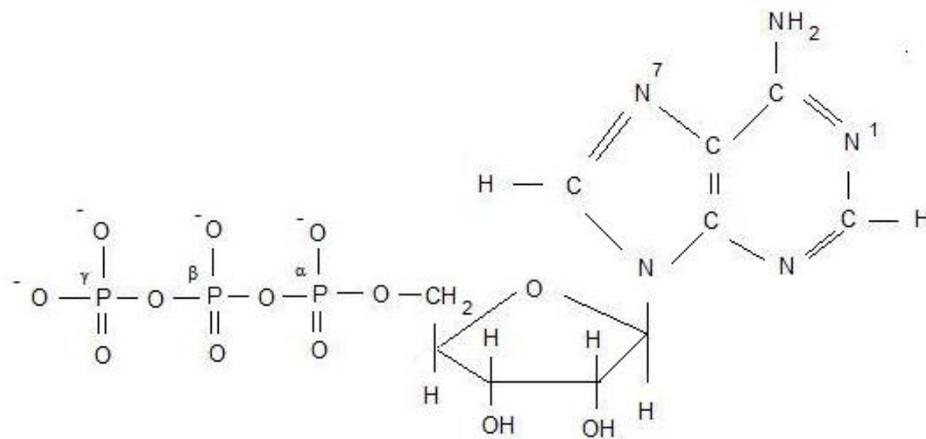


Figura 4 – Estrutura do ATP

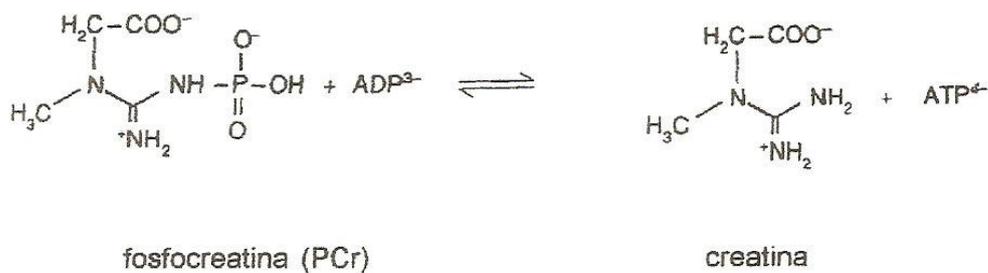


Figura 5 – Transferência do grupo fosfato da PCr para o ADP. Produção de ATP [49]

1.2.1

Funções biológicas da PCr e ATP no sistema nervoso central

O ATP é a fonte de energia mais comum para as reações no cérebro. No entanto, o sistema nervoso central, assim como outros tecidos excitáveis, possui outro reservatório de alta energia, a PCr. No SNC o nível de PCr é mais alto que de ATP e pode ser usada para reconstituir o ATP utilizado nas reações celulares [35, 45]. As maiores concentrações de PCr no cérebro são relatadas na camada molecular do hipocampo e cerebelo, regiões que contêm um grande número de contatos sinápticos [45].

O cérebro representa apenas cerca de 2% da massa corporal e pode gastar até 20% do consumo de energia do corpo. Um volume muito alto de ATP

é necessário para manter os potenciais elétricos da membrana, bem como as atividades sinápticas do sistema nervoso central e periférico [46,51].

Estudos realizados recentemente, indicam que alterações nos níveis de PCr no cérebro podem refletir em mudanças na energia do cérebro. Essas alterações de concentração de PCr podem estar implicadas na patogênese de distúrbios cerebrais como desordem obsessivo-compulsivo e desordem depressiva [52]. Estudos anteriores também indicaram níveis inferiores de PCr no cérebro de pacientes com desordem bipolar comparados com pacientes saudáveis [53]. A putrescina também pode ter um papel na depressão e poderia ser um antidepressivo endógeno. Este efeito seria, pelo menos em parte, pela ligação da putrescina ao NMDAr, causando a inibição desse receptor [18].

O ATP age como um neurotransmissor excitatório rápido em diversas regiões do SNC, incluindo o hipocampo. As transmissões mediadas pelo ATP são consideradas relativamente menores em significado funcional, em comparação com a transmissão mediada pelo glutamato [54,55].

As doenças neurodegenerativas compõem um grupo de doenças ocasionadas por uma perda progressiva de células de uma ou múltiplas regiões do sistema nervoso. Se ocorrer uma diminuição ou esgotamento de ATP, isso pode contribuir para a morte das células neurais. Isquemia cerebral, uma situação em que o cérebro não recebe o fluxo sanguíneo suficiente para manter a função neurológica normal, é conhecida por levar rapidamente à morte celular neuronal devido ao comprometimento do metabolismo energético [46].

Estudos recentes sugerem a creatina (Cr) como importante neuromodulador do cérebro [56]. Além de seu potencial para o tratamento de distúrbios neurológicos, a suplementação de creatina mostrou propriedades protetoras contra as doenças neurodegenerativas, tais como a esclerose amiotrófica lateral, Alzheimer, Parkinson e Huntington [40,46] e evidências recentes sugerem o envolvimento de creatina em importantes processos fisiológicos cerebrais, como os processos de aprendizagem e memória [40]. A administração intrahipocampo de creatina leva a melhoria da aprendizagem espacial possivelmente por modular o sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA, sugerindo um papel putativo deste composto na função cognitiva [40].

1.3 Interações intermoleculares

As interações intermoleculares entre as poliaminas naturais e os bioligantes ocorrem em uma faixa de pH na qual as poliaminas estão protonadas (carga positiva) e os bioligantes estão desprotonados (carga negativa). Estas interações podem ser explicadas como interações eletrostáticas considerando a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio entre os grupos carregados negativamente dos bioligantes e os grupamentos amino protonados – NH_3^+ - das poliaminas [5,57].

A tendência de formação de adutos moleculares vai depender tanto do número de grupos amino protonados das poliaminas quanto do comprimento da cadeia de átomos de carbono entre esses grupos [57].

O Ácido desoxirribonucléico (DNA) é um polímero longo de unidades simples chamadas nucleotídeos, com uma espinha dorsal de açúcares e grupos fosfato ligados por ligações de éster. Ligado a cada açúcar encontra-se um dos quatro tipos de moléculas chamadas bases, como mostra a figura 6. É a sequência destas quatro bases ao longo da espinha dorsal que codifica as informações genéticas. Esta informação é lida utilizando o código genético, que especifica a sequência de aminoácidos dentro de proteínas.

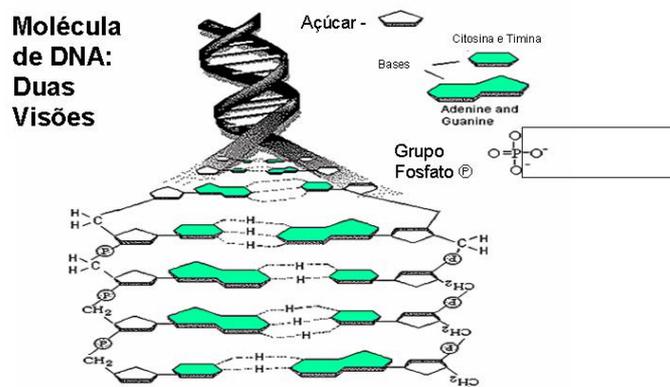


Figura 6 – Estrutura do DNA (The national health museum) [58]

O DNA, em pH fisiológico, possui grupos fosfatos carregados negativamente [59], como podemos ver pela figura 6. Essa carga negativa é neutralizada pela carga positiva das poliaminas. No entanto esta interação depende da estrutura da poliamina e de sua carga [60,61].

As interações com as poliaminas espermidina e espermina provocam mudanças significativas na estrutura do DNA. Apesar de ainda não serem

compreendidas, acredita-se que estas alterações estruturais sejam importantes no processo de divisão e diferenciação celular [5].

A figura 7 mostra exemplos de possibilidades da ligação, da espermidina e da espermina, à seqüência do DNA.

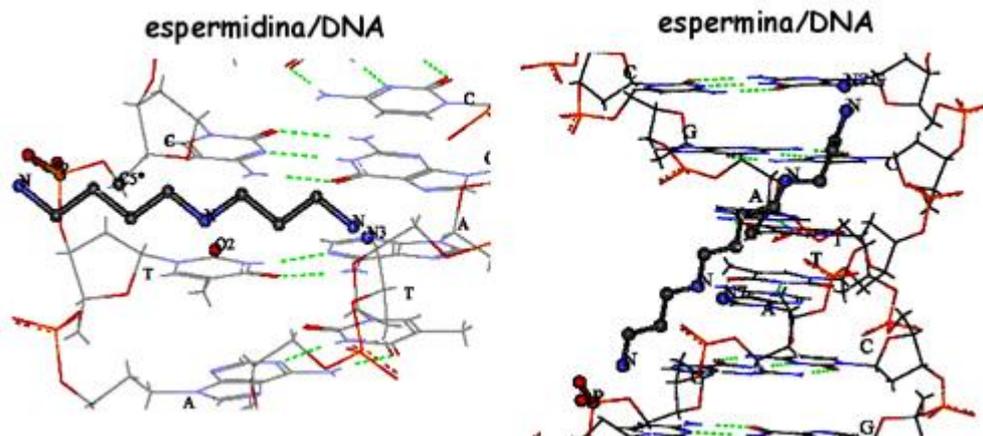


Figura 7 – Exemplos de possibilidades da união preferencial, da espermidina e da espermina, à seqüência do DNA [62]

Os centros de interações entre as poliaminas e outros bioligantes são as mesmas envolvidas na coordenação com íons metálicos [57]. Portanto, a presença de íons metálicos é considerada como um fator que afeta as interações entre as duas moléculas. As interações dos íons metálicos com os bioligantes induzem alterações na conformação da molécula. O caráter e a natureza das mudanças dependem do modo de coordenação e estabilidade dos complexos formados [5].

1.4

Os íons metálicos estudados: Cu(II) e Zn(II)

Alguns metais, entre outras inúmeras funções, são essenciais para o desenvolvimento e manutenção das transmissões neurais, assim como nos processos de aprendizagem e memória. O equilíbrio de íons metálicos é essencial para o funcionamento de diversas funções fisiológicas, especialmente no sistema nervoso central. Devido à sua importância, as células desenvolveram máquinas complexas para controlar a homeostase dos íons metálicos. O rompimento desses mecanismos, ou a absorção de metais prejudiciais com nenhuma função biológica conhecida, altera o equilíbrio iônico e podem resultar em doenças, incluindo doenças neurais e neurodegenerativas, como as doenças

de Menkes e Alzheimer. Compreender as complexas interações estruturais e funcionais de íons metálicos com os vários componentes intra e extracelulares do sistema nervoso central, em condições normais e durante a neurodegeneração, é essencial para o conhecimento das causas das doenças e o possível desenvolvimento de terapias eficazes [63].

O cobre, terceiro metal de transição mais abundante no organismo humano (250 mg no total) [64], assim como o zinco, segundo metal de transição mais abundante no organismo (2-3 g de zinco no total) [64], são íons metálicos essenciais à vida. Os íons cobre e zinco são de fundamental importância fisiológica nos tecidos dos mamíferos. Eles são componentes essenciais de muitas proteínas estruturais e atuam como cofatores para a atividade de muitas enzimas que são essenciais para o funcionamento do cérebro. Entre as enzimas podemos destacar as enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes (superóxido dismutase; SOD), na respiração celular (citocromo c oxidase) e na síntese de catecolaminas (dopamina-hidroxilase h) e uma infinidade de outras enzimas envolvidas em vários processos biológicos necessários para o crescimento, desenvolvimento e manutenção do sistema nervoso [65]. Estudos mostraram que as cobre amino-oxidases estão envolvidas no processo de oxidação das ligações das poliaminas com o DNA, levando à degradação do DNA. Também podem estar envolvidas no processo de conversão das poliaminas espermidina e espermina à putrescina [66]. Os íons de Zn(II) estão diretamente associados na regulação das expressões dos genes, também estão presentes na maioria das DNA e RNA polimerases e participam de diversos processos biológicos tais como: regulador de enzimas [64], na transmissão de sinal neural, como neuromodulador [38,64,67-74] e também associado a doenças como: Alzheimer, epilepsia, isquemia, etc [64,75].

O cérebro tem o maior teor de zinco em relação a outros órgãos. O zinco não é uniformemente distribuído no cérebro. As maiores concentrações estão localizadas em regiões como o hipocampo, a amígdala e o neocórtex. Mesmo no cérebro, 90% do total de zinco do cérebro encontram-se ligados a metaloproteínas. Os 10% restantes são encontrados em vesículas pré sinápticas, ligados ou livres. Entretanto, o íon zinco livre é bastante tóxico aos neurônios [65].

Assim como o zinco, o cobre se acumula no cérebro. A concentração média de cobre no fluido cérebro espinal é estimada em cerca de 70 μM . Embora, como o zinco, a maioria encontra-se ligado a proteínas, íon cobre livre é estimado em cerca de 0,1 μM a 0,8 μM . No entanto, esses valores são

frequentemente ultrapassados na fenda sináptica e durante doenças neurodegenerativas em que as concentrações de cobre podem chegar a 400 μM [65].

No hipocampo, a concentração de cobre e zinco presente é igual a 6,6 $\mu\text{g/g}$ (peso seco) e superior a 65 $\mu\text{g/g}$ (peso seco), respectivamente [51].

O zinco liga-se diretamente à proteínas para alterar a sua função. São particularmente alvos a histidina, cisteína, aspartato e ácido glutâmico. Já o cobre possui várias maneiras nas quais ele pode modificar a atividade de uma proteína. Como o zinco, pode ligar-se diretamente a um dos aminoácidos citados. No entanto, por ser um metal redox, pode ligar-se a resíduos de cisteína e oxidá-los. Isso pode catalisar a formação de pontes de dissulfeto entre resíduos de cisteína adjacentes, alterando a função da proteína. Uma terceira maneira mais indireta é através da geração de radicais livres, que podem alterar profundamente a proteína e a função das células [65].

Em relação ao NMDAr, é bem estabelecido que ambos os íons, zinco e cobre, são potenciais inibidores do receptor cerebral. Enquanto o sítio de ligação do cobre ainda não está esclarecido, os sítios e modo de inibição do zinco estão bem estabelecidos [65]. Estudos recentes demonstraram que o cobre é um elemento essencial ao nosso cérebro. Nos mamíferos, o cobre pode atuar como cofator de transferência de elétron nas cupro-enzimas, que são requeridas nos processos críticos das funções do SNC. Segundo Schlieff *et al* [76], aplicações de cobre demonstram afetar a excitabilidade dos neurônios cultivados, incluindo diretamente o receptor NMDA, sugerindo que o cobre pode modular a transmissão neuronal. Com a estimulação dos receptores NMDA, o íon cobre também é liberado na forma de íon livre. É o único ambiente conhecido onde a forma de cobre livre é encontrada. Acredita-se que esse íon cobre livre modula a ativação de cascatas de cálcio-dependentes que contribuem para modificações sinápticas. Portanto, o cobre pode funcionar como modulador atividade-dependente das transmissões sinápticas do hipocampo [63,76].

Recentemente, a função neurológica do zinco tem atraído muita atenção. Como podemos observar na figura 2 (página 25) há também um sítio de ligação do zinco ao NMDAr. O zinco pode atuar ligado a esse receptor, exercendo atividade moduladora sobre o funcionamento das sinapses [38,67-70]. A atividade do Zn(II) extracelular sobre o NMDAr é inibitória e pode ser dependente ou independente da voltagem [71-74]. A inibição dependente da voltagem é semelhante ao bloqueio do NMDAr pelo Mg(II) . A inibição independente da voltagem é resultante de uma redução na ativação do NMDA

pelo Zn(II), resultante de uma mudança nos mecanismos de abertura do canal do receptor [73,74].

As poliaminas são amplamente utilizadas como ionóforos para o Zn(II), devido a grande afinidade dos átomos doadores de nitrogênio das poliaminas pelo Zn(II) [64].

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa que afeta atualmente cerca de 35 milhões de pessoas no mundo [77]. É caracterizada patologicamente pela presença de emaranhados neurofibrilares, placas senis, deposição de peptídeo beta-amilóide, e por uma perda seletiva de neurônios e diminuição da densidade sináptica. Uma interação anormal da placa A β com os íons metálicos induzem a agregação peptídica e a oxidação na doença de Alzheimer [78-80]. Acredita-se que os íons zinco e cobre que se encontram ligados às placas A β são íons que foram liberados nas sinapses glutamatérgicas [80].

Aspectos químicos do Cu(II)

O elemento Cobre tem número atômico igual a 29. O íon metálico Cu(II) tem configuração eletrônica d^9 . Os números de coordenação mais encontrados para os complexos de Cu(II) são quatro e seis e menos freqüente, cinco. Em geral, a maioria dos complexos de Cu(II) são verdes ou azuis tetragonalmente distorcidos com quatro ligações Cu(II)-Ligante mais curtas no plano xy e duas ligações Cu(II)-Ligante mais longas no eixo z

Aspectos químicos do Zn(II)

O elemento Zinco tem número atômico igual a 30. O íon metálico Zn(II) tem configuração eletrônica d^{10} . O zinco é um forte ácido de Lewis que não modifica o seu número de oxidação em pH fisiológico [81]. Em sistemas biológicos aparece sempre como cátion divalente Zn(II).

Os números de coordenação para os compostos de Zn(II) são quatro e seis. A estrutura tetraédrica é a estrutura geralmente encontrada em complexos de zinco na cavidades das proteínas. Isso pode explicar porque a coordenação quatro é a estrutura encontrada nos “*zinc-fingers*” e nas enzimas de zinco [82].