1
Introdução

1.1.
Uma visão geral sobre a doença de Alzheimer

Com o aumento da expectativa de vida registrado nos últimos tempos, em especial em países desenvolvidos, tem-se observado o prevalecimento de certas doenças neurodegenerativas.

A doença de Alzheimer (DA), que fora inicialmente caracterizada em 1906 pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer, é uma das doenças neurodegenerativas em destaque atualmente, sendo a mais comum delas. [1,2] É uma doença primariamente relacionada à idade e a causa mais comum de demência em pessoas idosas. A demência é caracterizada pela progressiva perda de memória e das funções cognitivas, além de outros critérios de diagnóstico, como aqueles presentes no *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* e os critérios da *National Institute of Neurological and Communicative Disorders Association*, que são os mais usados e contêm dados sobre as doenças mentais que ocorrem em adultos e crianças, abrangendo desde as causas conhecidas delas até o prognóstico e pesquisas relacionadas ao tratamento mais adequado.[2]

A afecção tem duas classificações gerais: de acometimento tardio, que ocorre com maior incidência a partir dos 60 anos de idade, e a de acometimento precoce, ocorrendo ao redor dos 40 anos. Nos EUA e Grã-Bretanha, a DA representa cerca de 50% dos casos de demência, sendo estimado que corresponda a quarta causa de morte de idosos nestes países.[1]

Considerando o ponto de vista neuropatológico, são observados nos indivíduos com DA atrofia cortical difusa, a presença de placas senis e novelos neurofibrilares, degeneração neurovascular, bem como perda neuronal.[1,2,3] Apesar de tais alterações poderem ser encontradas no cérebro de idosos sadios, não são notados neste último grupo a mesma intensidade de tais sintomas e nem a presença conjunta deles.[1]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

Um dos fatos mais importantes observados recentemente, tendo em vista o aspecto neuropatológico da DA, é o acúmulo do peptídeo *β*-amilóide (A*β*), constituinte das placas senis e formado por, aproximadamente, 40 resíduos de aminoácidos.[2,4] Além desse fato, tem sido verificada grande concentração de íons metálicos, tais como Cu(II) e Zn(II), nessas placas.[5]

O íon Cu(II) é normalmente encontrado nas enzimas e proteínas citocromo c oxidase, ceruloplasmina e superóxido dismutase (SOD) durante a circulação fisiológica normal. Ele é liberado nas sinapses, tendo uma concentração de 15 μmol L^{-1} na cavidade sináptica. Além disso, é encontrado em concentrações de aproximadamente 400 μmol L^{-1} nas placas amilóides, enquanto a concentração extracelular cerebral normal está entre 0,2 e 1,7 μmol L^{-1}.[3]

Por outro lado, a fonte cerebral primária de íons Zn(II) ocorre no processo de transmissão de impulsos nervosos, quando o íon é liberado nas sinapses, sendo a sua concentração entre 200 e 300 μmol L^{-1}. O íon Zn(II) pode promover a agregação e formação das placas A*β*, nas quais se encontra em concentrações de aproximadamente 1 mmol L^{-1}. Apesar disso, a presença deste íon poderia representar uma neuroproteção, visto que ele teria a capacidade de atenuar a toxicidade do peptídeo *β*-amilóide em culturas corticais.[6]

As drogas aprovadas para o tratamento da DA visam combater os déficits associados à redução da função cerebral e se incluem em duas classes: os inibidores da acetilcolinesterase e inibidores dos receptores do tipo NMDA (*N*-Metil-D-Aspartato). Tais drogas podem estar envolvidas no aumento da permanência da função cognitiva. Apesar disso, não parecem causar significativa diminuição da progressão da doença.[3]

Assim, o desenvolvimento de novos medicamentos que impossibilitem o progresso da DA é, neste contexto, de fundamental importância. Uma das possíveis formas de combate à doença estaria justamente vinculada à possibilidade de se evitar o acúmulo de íons metálicos, que induzem a precipitação das placas amilóides e, no caso do cobre, contribuem para o estresse oxidativo.[7,8] Isto pode ser feito através do uso de agentes quelantes tradicionais ou, mais recentemente, de moderadores da interação proteína-metal (MPACs, do inglês: 'Metal-Protein Attenuating Compounds').[6]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

Exemplo desses MPACs é o clioquinol (CQ, 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina), Figura 1. Foi verificado que o uso oral dessa substância em camundongos resultou em uma redução da deposição cortical de placa amilóide em 49%, bem como em uma melhora no quadro geral de saúde das cobaias quando comparado ao dos animais não tratados com a medicação.[5]

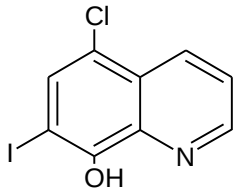

Figura 1: Estrutura do clioquinol.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

O sucesso no tratamento dos camundongos com essa droga parece ser devido à combinação da inibição da precipitação do peptídeo A*β*, bem como à dissolução dos agregados metal/*β*-amilóide, que, por sua vez, devem ser removidos no sangue ou degradados no meio intracelular. Sugeriu-se que a natureza hidrofóbica do clioquinol facilitaria o seu acesso ao sítio de ligação do metal no polipeptídeo.[7]

1.2. Breve histórico sobre a doença de Alzheimer

Apesar de várias formas de demência serem conhecidas ao longo dos tempos, a descrição sistêmica sobre os aspectos clínicos e patológicos de algumas delas só puderam ser mais bem elucidadas no fim do século XIX, por intermédio do avanço nos campos da neuroanatomia, histologia e outras áreas da biologia.[9]

Neste contexto, destaca-se o trabalho de Alois Alzheimer, psiquiatra alemão que teve papel indispensável no esclarecimento da doença que hoje leva o seu nome. No ano de 1901, ele se deparou com um caso particular de sintomas de transtorno de personalidade. A portadora destes era uma mulher de 51 anos, chamada Auguste D., mostrada na Figura 2, que, desde cinco anos atrás, apresentava progressiva perda de memória, alucinações, distúrbios de

comportamento e problemas no convívio social. Durante a anamnese efetuada pelo médico, foi percebida significativa confusão mental no que tangia às informações pessoais da paciente, tais como seu nome, sobrenome e os nomes de seus familiares. Em todas as perguntas relacionadas a isso, a resposta dada era a mesma: Auguste.[9,10]

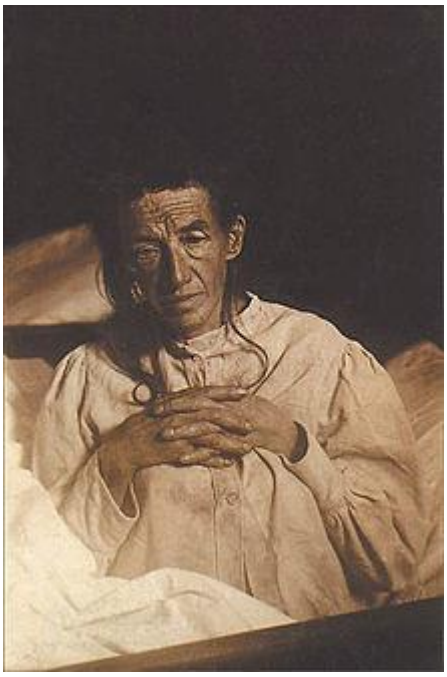

Figura 2: Auguste D., paciente de Alois Alzheimer.[10]

Em 1906, com o falecimento de Auguste D., foi feito um estudo microscópico do tecido cerebral da paciente por A. Alzheimer e seus colaboradores, que mostrou severa atrofia do córtex, significativa presença de emaranhados neurofibrilares no interior dos neurônios, característica desconhecida até aquele momento, e milhares de depósitos extracelulares, atribuídos às placas senis que são encontradas nos idosos não portadores da doença, sendo todas essas observações feitas no córtex cerebral. Estudos realizados com outros pacientes com sintomas semelhantes aos de Auguste apontaram para as mesmas observações, como mostrado nas Figuras 3 e 4.[10]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

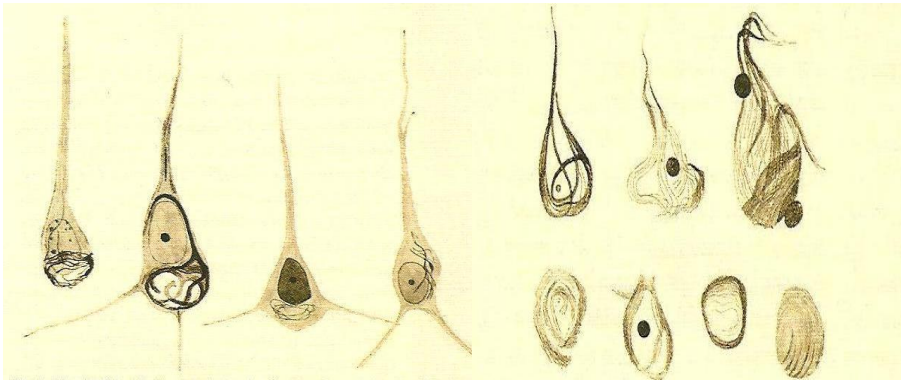

Figura 3: Emaranhados neurofibrilares encontrados no cérebro da paciente Auguste D.[10]

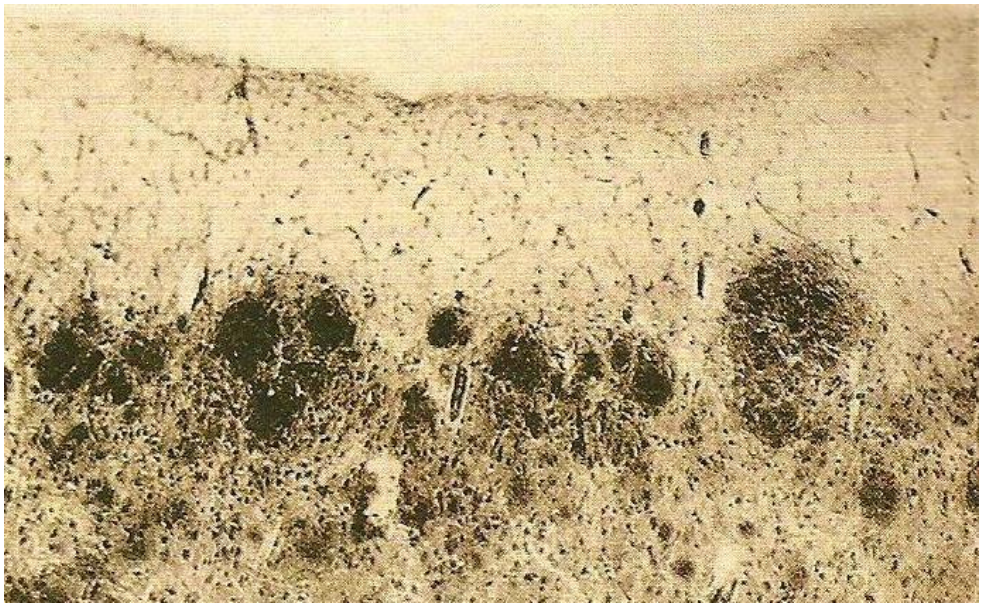

Figura 4: Corte retirado do cérebro de Johann F., outro paciente de Alzheimer. Os pontos escuros correspondem às placas amilóides.[10]

Através dessas observações, o médico estabeleceu critérios de diferenciação entre a nova patologia e a demência senil comum, caracterizada por uma perda mais benigna das funções mentais, e que é associada à idade muito avançada.[10,11]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

1.3.
Visão clínica e bases moleculares da doença de Alzheimer

1.3.1.
Visão clínica

De um ponto de vista geral, é observado na DA o comprometimento das capacidades cognitivas dos pacientes, que, como já descrito, tende a se tornar mais significativo com o passar dos anos. Geralmente, a memória recente é a primeira a ser afetada, porém outras habilidades são comprometidas com o progresso da doença, como a capacidade de fazer cálculos e o uso de objetos e ferramentas comuns, o que é denominado apraxia ideomotora. Cerca de 6 a 12 anos após o diagnóstico, em geral, ocorre a morte dos pacientes, relacionada a complicações que a própria imobilidade deles traz, ocorrendo, por exemplo, devido à pneumonia ou à embolia pulmonar.[11]

Em termos anatômicos, é verificada significativa atrofia do córtex cerebral, bem como a perda de neurônios corticais e subcorticais. Além disso, o fato mais marcante da doença está ligado à presença excessiva de placas extracelulares formadas por um peptídeo denominado *β*-amilóide (A*β*), além de depósitos intracelulares de outro peptídeo conhecido como proteína tau, os quais se referem àqueles emaranhados neurofibrilares observados por Alzheimer, que são encontrados predominantemente no hipocampo e regiões associadas do córtex (Figura 5). Nesses tecidos, ocorre um aumento do grau de estresse oxidativo, inflamação cerebral e neurodegeneração.[6,11]

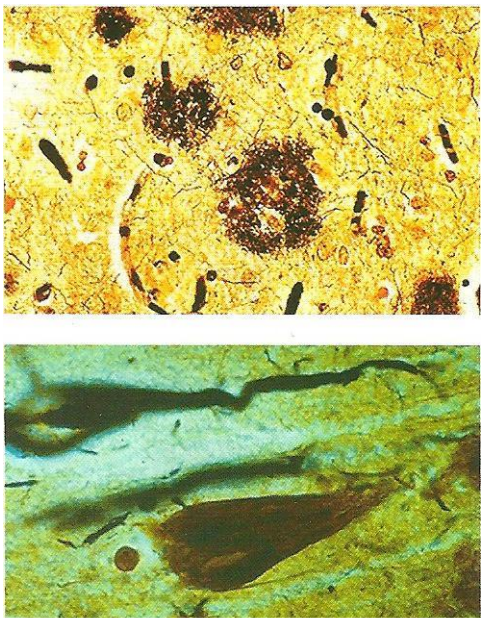

Figura 5: Placas senis mostrando agregados do peptídeo *β*-amilóide, de aspecto escuro e irregular (parte superior) e emaranhados neurofibrilares, presentes no interior das células nervosas, relacionados a depósitos da proteína tau (parte inferior da figura).[10]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

Em contrapartida, regiões como o córtex visual e motor são relativamente preservadas. Conseqüentemente, funções cognitivas (memória e raciocínio abstrato) são as mais comprometidas.[6,11]

Sob um aspecto neuroquímico, ocorre um déficit em inúmeras substâncias neurotransmissoras, que é relacionado à perda neuronal. A deficiência de acetilcolina é significativa e desproporcional, além da redução nos níveis de serotonina, glutamato e neuropeptídeos.[11]

1.3.2. Proteína Precursora Amilóide (APP) e *β*-amilóide

A formação das placas extracelulares é proveniente de uma proteína normal, conhecida como proteína precursora amilóide ou APP (do inglês: 'Amyloid Precursor Protein'). Esta é uma glicoproteína grande, de 695 a 770 resíduos de aminoácidos, incluindo três domínios: a região extracelular *N*-terminal, a região transmembrana hidrofóbica e o domínio citoplasmático *C*-terminal. Ela é amplamente expressa por neurônios de todo o cérebro de indivíduos normais e daqueles com DA e está inserida na membrana externa dessas células.[6,10,11]

Apesar de ainda ter sua função desconhecida, algumas evidências sugerem que ela pode estar relacionada à manutenção da homeostase do íon cobre, regulação de cálcio intracelular, crescimento e adesão celular, plasticidade sináptica, bem como efetuando o papel de receptor de superfície celular de um ligante ainda desconhecido, fato relacionado aos seus aspectos estruturais.[6,12]

A APP é proteoliticamente processada por duas enzimas: α ou β-secretase. Quando ela é processada pela primeira, ocorre a liberação do fragmento α-APP_s e na membrana plasmática fica um fragmento residual C83. Caso a clivagem ocorra pela segunda, produz-se a β-APP_s e um fragmento residual C99 permanece na membrana. Estes fragmentos residuais são hidrolisados no domínio transmembrana por uma outra enzima, a γ-secretase, gerando o peptídeo *β*-amilóide, que está relacionado à doença de Alzheimer. A Figura 6 ilustra esse processo.[12]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

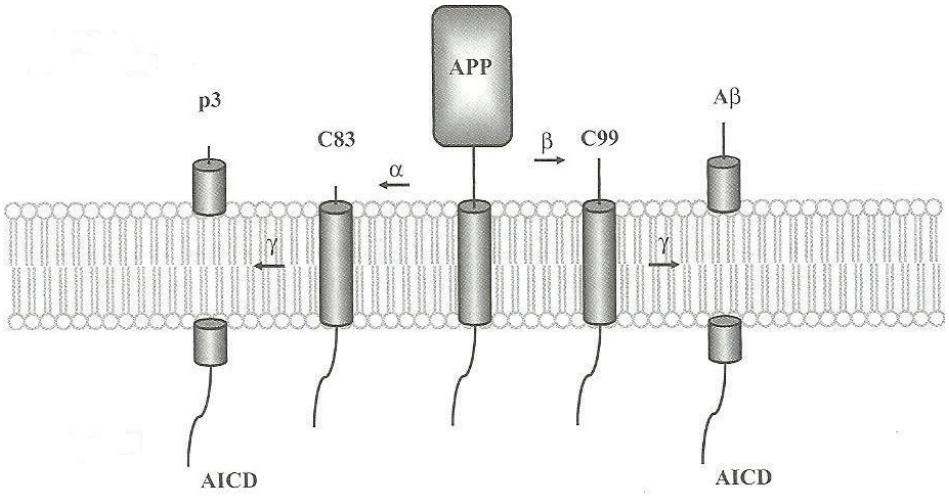

Figura 6: Processamento da proteína precursora amilóide (APP) pelas enzimas α-secretase ou β-secretase, e γ-secretase.[12]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

O processo de clivagem da porção residual C99 resulta em um peptídeo A*β*(1-40). Mas outras formas também são produzidas, particularmente uma forma com 42 resíduos de aminoácidos [A*β*(1-42)], mostrada na Figura 7, que tende a dobrar-se sobre si mesma, adotando a conformação *β*-pregueada e adquirindo alta tendência a formar agregados insolúveis.[13] A defeituosa A*β*(1-42) se deposita, primeiramente, nas sinapses glutamatérgicas no córtex e no hipocampo, que constituem parte importante no processo de estabelecimento da memória, além de ocasionar a morte e eliminação das células nervosas afetadas.[6,10]

$^{+}H_3N$-Asp^{1}-Ala-Glu-Phe-Arg-His^{6}-Asp-Ser^{8}-Gly-Tyr^{10}-Glu-Val-His^{13}-His^{14}-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly^{25}-Ser-Asn-Lys^{28}-**Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met^{35}-Val-Gly-Gly^{38}-Val-Val^{40}-Ile^{41}-Ala^{42}-COO^{-}**

Figura 7: Sequência de aminoácidos para o peptídeo A*β*(1-42).[13]

A forma *β*A-(1-40) é predominantemente solúvel, estando presente nos fluidos biológicos (~ 90%), como o plasma e o líquido cefalorraquidiano, que é um líquido claro e límpido localizado entre o crânio e o córtex cerebral. Já a forma *β*A-(1-42) é a espécie predominante nas placas, sendo, portanto, mais neurotóxica.[13]

1.3.3.
Proteína tau e emaranhados neurofibrilares

Os emaranhados neurofibrilares intracelulares observados por Alois Alzheimer estão relacionados às proteínas tau. Essas proteínas, que possuem entre 352 e 441 resíduos de aminoácidos, se encontram ao longo dos axônios das células nervosas, associadas aos microtúbulos, exercendo a função de estabilizá-los. Estes atuam nos processos de transporte intracelular de substâncias, movimento de organelas, além de serem componentes do citoesqueleto, que garante o suporte interno das células. [10]

Quando as proteínas tau são sujeitas a hiperfosforilação anormal nos sítios contendo os resíduos de serina e treonina, fato presente na doença de Alzheimer (de causa desconhecida e ocasionado pelas quinases, que são enzimas que transferem grupos fostato para moléculas-alvo), ocorre uma sobrecarga de tais proteínas, que se desprendem dos microtúbulos, acumulando-se no interior das células nervosas. Por sua vez, ocorre a instabilização dos microtúbulos, afetando desta forma a sustentação da estrutura celular.[10,13] A desintegração microtubular ocasiona a interrupção da função do axônio, que é a de condução do impulso nervoso. Além disso, a agregação das proteínas tau, bem como das outras estruturas celulares, conduz, progressivamente, à morte neuronal, tão comum na doença de Alzheimer.[10] A Figura 8 ilustra o processo de colapso microtubular associado à doença.

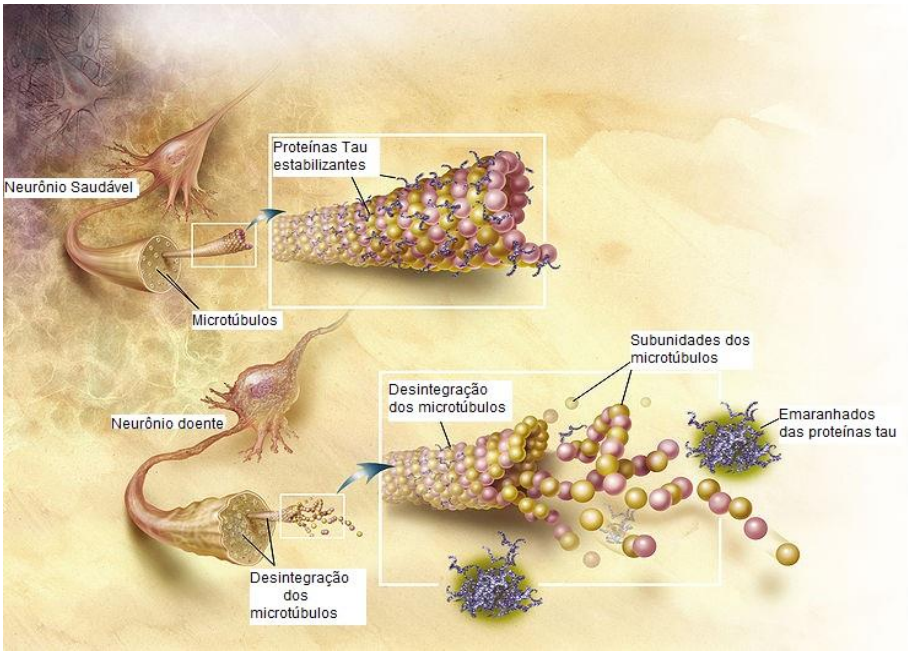

Figura 8.: Processo de desintegração microtubular associada à doença de Alzheimer.[14]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

1.3.4.
Contribuições genéticas para a doença de Alzheimer

Tanto fatores genéticos quanto ambientais colaboram, conjuntamente, para o estabelecimento da doença e para os diversos graus de severidade dela. Uma das contribuições importantes a esse respeito é a da herança genética de cada indivíduo.[15]

Atualmente, são conhecidos quatro genes associados com os casos precoces da DA. São eles: genes codificadores da APP, presenilina-1 (PSEN-1), presenilina-2 (PSEN-2) e das apoproteínas E (APO-E). A alteração nos três primeiros relaciona-se a casos precoces da doença e verificou-se que mutações herdadas nesses genes que tenham caráter autossômico dominante causam a DA. No entanto, essas mutações estão presentes em um pequeno percentual da população e, assim, são responsáveis por apenas 5% dos casos de DA. Os outros 95% relacionam-se a ocorrências mais tardias, tipicamente observadas para esta doença.[2,15]

O gene relacionado à síntese de APP se encontra no cromossomo 21 e mutações nele provocam o aumento nos níveis de Aβ ou de Aβ(1-42) que, como já discutido, é a forma mais tóxica que o peptídeo pode apresentar. Outra observação importante está ligada ao fato de portadores da síndrome de Down (trissomia do 21) apresentarem comumente a forma mais precoce da doença, já que, neste caso, a presença excedente de um cromossomo 21, resultaria em uma maior produção de APP e maiores chances de sua fragmentação em pedaços neurotóxicos. De fato, o cérebro dos portadores da doença apresenta significativa acumulação de Aβ(1-42).[2]

Alterações nos genes relacionados à síntese de PSEN-1 e PSEN-2, que são proteínas transmembrana que permitem o acesso ao sítio γ da proteína precursora do amilóide, são responsáveis por 18 a 50% dos casos que envolvem a DA precoce.[15]

As apoproteínas E se referem a uma classe de proteínas com 317 resíduos de aminoácidos, constituindo as lipoproteínas responsáveis pelo transporte de colesterol entre órgãos no processo de circulação sanguínea. O cérebro é o segundo órgão de maior produção da proteína, no qual ela atua no reparo de danos neuronais, de modo que possibilita o re-estabelecimento das conexões sináptico-dentríticas. No que tange à ocorrência tardia da doença, foi

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

sugerido que a herança do alelo APO-E4 constitui um fator de risco para o aparecimento da mesma.[15] O alelo está presente em excesso nos indivíduos com DA, quando em comparação com indivíduos normais, e a herança dele, bem como a dos outros mencionados acima, aumenta até cinco vezes a probabilidade de ter Alzheimer. Porém, as modificações nestes genes relacionados a tais proteínas não são suficientes ou indispensáveis para explicar todos os casos de DA, o que ratifica a complexidade dessa patologia.[15]

1.4.
O envolvimento dos íons metálicos na doença de Alzheimer

1.4.1.
Aspectos gerais

O cérebro é um órgão especializado, que exerce inúmeras atividades enzimáticas, neurotransmissoras, memória e aprendizagem, necessitando de íons metálicos na regulação neuronal nas sinapses. Os íons Cu(II) e Zn(II) são particularmente associados a esta função, atuando de forma significativa na atividade sináptica. Em especial, o íon zinco(II) se destaca nesse contexto.[11,13]

Apesar do papel dos íons metálicos ser indispensável ao equilíbrio das funções neurológicas, fato evidenciado pelo sofisticado mecanismo homeostático desenvolvido pelas células para o controle da atuação deles, o desequilíbrio no mecanismo de absorção ou redistribuição de tais espécies no corpo humano pode implicar uma séria alteração do balanço iônico, o que resulta na manifestação de doenças neurológicas, incluindo as desordens neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer.[13]

Desse modo, muitos estudos têm apontado que os íons metálicos supracitados estão envolvidos na DA. A participação deles pode estar relacionada ao favorecimento da agregação do peptídeo Aβ ou à promoção de danos oxidativos, derivados da produção de espécies reativas de oxigênio.[13]

1.4.2.
A participação do íon Cu(II) na doença de Alzheimer

O envolvimento do cobre na doença de Alzheimer tem sido bastante estudado, sendo observada a presença de um excesso desse elemento no

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

espaço intracelular cerebral. Foi demonstrado que a concentração desse íon nas placas amilóides era, aproximadamente, de 400 μmol L^{-1}, enquanto que a sua concentração extracelular normal é em torno de 0,2 a 1,7 μmol L^{-1}. [6]

Com relação ao seu modo de coordenação no peptídeo *β*-amilóide, há um consenso atualmente que descreve que os dezesseis primeiros resíduos de aminoácidos estão fortemente envolvidos na coordenação. Neles, Asp representa a asparagina, Ala a alanina, Glu a glutamina, His a histidina e Tir a tirosina. Os fragmentos contêm os sítios Asp1 (NH_2), Asp1 (CO), Asp1 (COO^-), Ala2 (CO), Glu3 (COO^-), His6 (Imidazol), Asp7 (COO^-), Tir10 (O^-), Glu11 (COO^-), His13 (Imidazol), His14 (Imidazol), sendo encontrada uma estrutura quadrático plana distorcida, com no mínimo a participação de três átomos de nitrogênio no plano equatorial. Certamente, grupos amino terminais e imidazol da cadeia lateral das histidinas 6, 13 e 14 estão envolvidos na complexação. Há também a possibilidade de envolvimento do nitrogênio da ligação peptídica entre Asp1-Ala2, o que levaria a outro arranjo geométrico. No que se refere ao oxigênio envolvido na coordenação, ainda há controvérsias, sendo possivelmente o do carboxilato da Asp1 e Asp7 e, para o caso em que há alteração da geometria, o oxigênio da Ala2 deve estar envolvido. [17]

No que se refere à influência deste íon na agregação do peptídeo *β*-amilóide, foi verificado, em experimentos *in vitro*, que o íon cobre afeta a precipitação de A*β*, apesar da auto-agregação deste peptídeo ser espontânea.[13] Além de ter sido detectada a possível influência deste metal em agregados neurológicos, sua participação em processo de oxirredução (ou redox) é significativa. Foi observado que o peptídeo A*β* pode produzir diretamente peróxido de hidrogênio através da redução de Cu^{2+}. Desse modo, pode-se dizer que ele é redox-ativo.[6,13,16]

Essa observação é particularmente importante, pois vários estudos apontam que reações de oxidação ocorrem na DA, pelo fato de serem observados inúmeros produtos derivados destas, como produtos de peroxidação lipídica, nitração protéica e mitocondrial e mudanças no estado de oxidação de ácidos nucléicos. Assim, pode haver uma relação entre danos oxidativos e a morte neuronal associada à doença.[13] Essa condição é conhecida por estresse oxidativo, que é proveniente do desequilíbrio entre a taxa com que radicais livres são gerados e removidos do meio celular.[6] Estas espécies são naturalmente geradas através de processos, tanto enzimáticos quanto não enzimáticos, que

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

ocorrem nas células, a partir, inicialmente, da redução do oxigênio molecular, de modo que elas poderiam estar envolvidas no mecanismo de defesa humano, abrangendo a destruição de microorganismos invasores e de células tumorais, por exemplo.[17]

Apesar do possível papel benéfico, a toxicicidade delas é significativa, pois são altamente reativas, podendo danificar os lipídeos, as proteínas, o DNA e o RNA. As próprias células, entretanto, são capazes de atenuar tal efeito agressivo, mantendo a homeostase redox celular através do uso de antioxidantes enzimáticos, a exemplo da superóxido dismutase, glutationa redutase e glutationa peroxidase e catalase.[17] No entanto, no contexto da DA, estudos *post-mortem* têm apontado níveis reduzidos de antioxidantes naturais no tecido cerebral e no plasma dos pacientes.[18]

O tecido nervoso tem maior tendência de sofrer os danos oxidativos, já que o cérebro tem algumas características que contribuem para isso, como, por exemplo, o fato de ser o órgão com maior atividade aeróbica do organismo, ter menores níveis de antioxidantes (tais como a glutationa), membranas ricas em ácidos poliinsaturados, e tendência natural ao acúmulo de íons metálicos, que é acentuada com a idade.[6]

Como mencionado, a condição oxidativa promove a formação de espécies reativas, como H_2O_2. Esse fato é particularmente importante, pois o peróxido pode reagir com os íons metálicos reduzidos através de reações radicalares, conhecidas como reações de Fenton, de modo a produzir o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), que é bastante reativo, podendo abstrair átomos de hidrogênio de moléculas orgânicas e causando, assim, danos oxidativos, como aqueles já mencionados, nas estruturas que contêm tais moléculas e que se encontrem nas vizinhanças de onde os radicais estão sendo produzidos, assim provocando, possivelmente, a morte neuronal. O mecanismo de atuação desses radicais se encontra descrito a seguir:[6]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

a) $A\beta + M^{(n+1)+} \rightarrow A\beta^{+\cdot} + M^{n+}$

b) $M^{n+} + O_2 \rightarrow M^{(n+1)+} + O_2^{-}$

c) $O_2^{-} + O_2^{-} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$

d) $M^{n+} + H_2O_2 \rightarrow M^{(n+1)+} + HO^{\cdot} + HO^{-}$

e) $O_2^{-} + H_2O_2 \rightarrow HO^{\cdot} + O_2 + HO^{-}$

Esquema 1: Equações químicas envolvendo o comportamento redox dos íons metálicos e o polipeptídeo A*β*. Em (a), tem-se a redução dos íons metálicos por A*β*; (b) reação redox envolvendo o íon metálico reduzido (Cu^{+}) e oxigênio molecular; (c) produção de peróxido de hidrogênio a partir do radical superóxido; (d) reação de Fenton e (e) reação de Haber-Weiss para produzir o radical hidroxila.[6]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

1.4.3.
A participação do íon Zn(II) na doença de Alzheimer

A atuação do íon Zn(II) na DA tem sido significativamente estudada, visto que foi demonstrado que este íon, em concentrações acima de 300 nmol L^{-1}, ocasiona a precipitação de A*β*, induzindo a agregação do peptídeo nas placas senis.[19] Além disso, o seu envolvimento na patogenia do Alzheimer foi relacionado ao fato de terem sido verificadas elevadas concentrações de Zn(II) tanto nas placas amilóides (1 mmol L^{-1}) quanto no fluido cérebro-espinhal de pacientes com DA, comparado aos controles usados na análise.[13]

Na coordenação do íon zinco(II) ao polipeptídeo, os resíduos de aminoácidos de 6 a 14 parecem estar relacionados à coordenação, tendo a participação de todos os resíduos imidazólicos. Além disso, resíduos de Asp1 e Glu11(COO-) da porção amino-terminal, ou moléculas de água podem também estar envolvidos na coordenação.[17]

A Figura 9 apresenta a proposta estrutural do complexo misto de Cu(II) e Zn(II) com o peptídeo A*β*. Nela, apenas os resíduos de aminoácidos envolvidos na complexação de ambos os íons são mostrados.

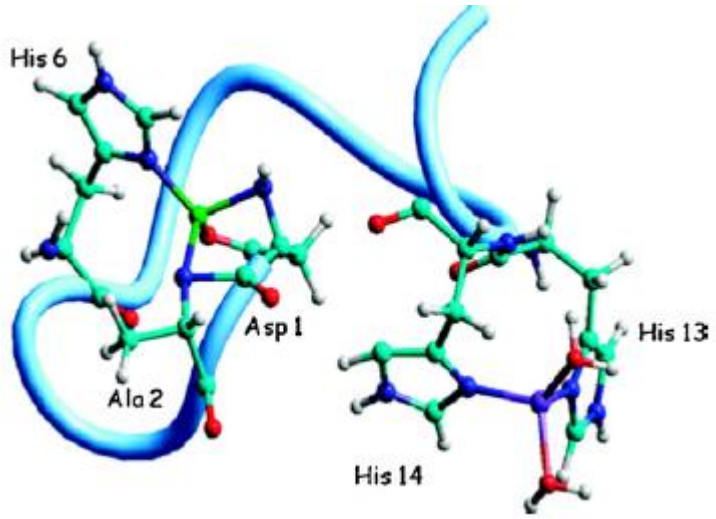

Figura 9: Proposta estrutural do complexo misto de Cu^{2+} e Zn^{2+} com o peptídeo βA.[17]

Quanto ao processo de agregação, ele pode ocorrer no momento em que acontece a transmissão sináptica. Nessa ocasião, a concentração extracelular do íon aumenta entre 200 a 300 μmol L^{-1}. Possivelmente, com o avanço etário, o mecanismo de controle dessa atividade deve ficar reduzido, ocorrendo uma maior tendência à agregação.[19]

A Figura 10 ilustra a atividade sináptica do íon zinco(II). O íon está presente na porção terminal do neurônio, onde se encontra ligado a seu transportador (ZnT3). Na neurotransmissão, o íon é liberado na fenda sináptica, junto a glutamato, modulando a neurotransmissão glutamato-ativada através da inibição de receptores como o NMDA (*N*-Metil-D-Aspartato). Na DA, o íon zinco(II) liberado na fenda se liga ao peptídeo Aβ, promovendo a oligomerização e agregação peptídica na região. [20,21]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

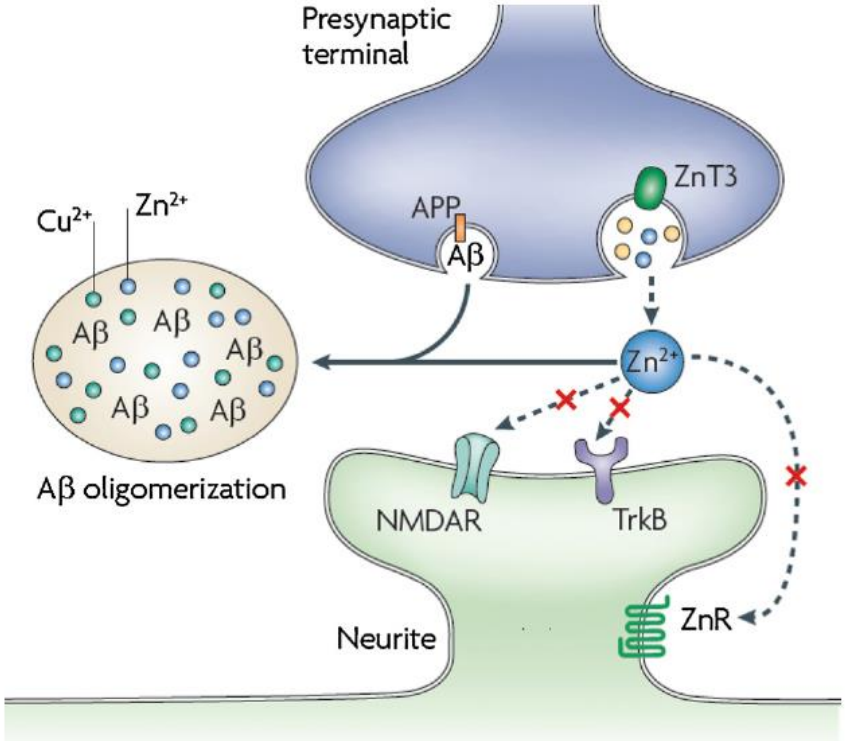

Figura 10.: Representação da atividade sináptica corrompida devido à doença de Alzheimer, implicando a formação de agregados de A*β* com os íons Cu(II) e Zn(II). [20]

No entanto, existem divergências na literatura sobre as possíveis influências que esta espécie poderia ter no contexto da DA. Estudos mostram que a atividade exercida pelo zinco pode não ser neurotóxica, mas neuroprotetora, pois ele poderia reduzir a toxicidade do peptídeo A*β* em culturas corticais. Apesar de ser desconhecido o mecanismo de proteção do íon, é sugerido que deve haver competição entre ele e o íon Cu(II), por exemplo. Basicamente, a ligação do Zn(II) às placas de A*β* mudaria a conformação do peptídeo de tal maneira que impedisse que os outros íons pudessem alcançar seus sítios de ligação. Esse tipo de efeito, por sua vez, contribuiria para a redução da formação de peróxido de hidrogênio e radicais livres, uma vez que zinco é um metal inerte quanto a processos redox, o que colaboraria para a diminuição dos níveis de estresse oxidativo e, portanto, da degradação dos tecidos vizinhos.[13,19]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

1.5.
Medidas terapêuticas: terapias atuais e importância de novas abordagens

A acetilcolina é um neurotransmissor que tem importantes funções no processo de aprendizagem e memória e a enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela degradação desse neurotransmissor. Terapias mais recentes envolvem o uso de agentes inibidores desta enzima, com o intuito de aumentar a eficiência sináptica. Quatro deles se encontram aprovados para o tratamento da DA: tacrina, rivastigmina, donepezil e galantamina (Figuras 11 a 14, respectivamente). A primeira tem uma potente função inibidora, exercendo efeito moderado sobre alguns parâmetros de memória. No entanto, devido aos fortes efeitos colaterais, que envolvem diarréia, cólicas abdominais, anorexia e náuseas, seu uso clínico é limitado. As outras, apesar de exercerem pouco efeito de inibição sobre a AChE nos tecidos periféricos, são melhor toleradas e, portanto, mais utilizadas.[11]

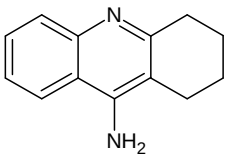

Figura 11: Estrutura da tacrina.

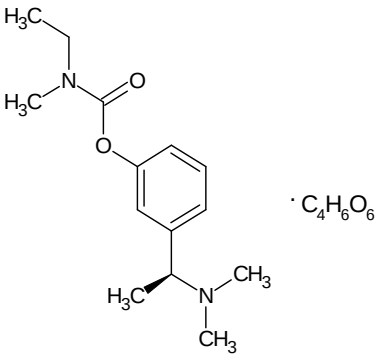

Figura 12: Estrutura da rivastigmina.

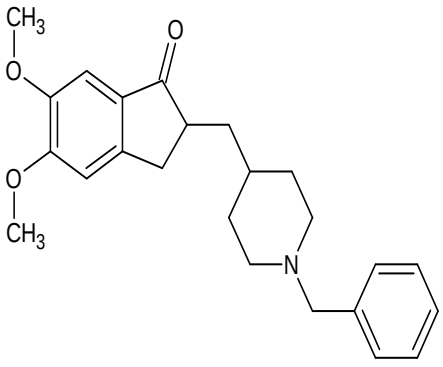

Figura 13: Estrutura do donepezil.

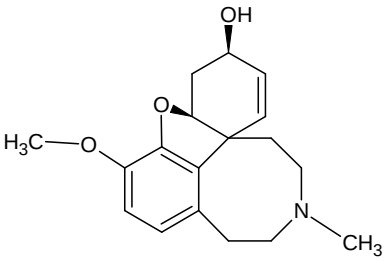

Figura 14: Estrutura da galantamina

.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

Outra classe de fármacos, que são usados em casos da DA que vão de moderados a avançados, são os inibidores dos receptores do *N*-metil-D-aspartato. Esses receptores, pertencentes à classe dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, têm sido apontados como importantes no processo de aprendizagem e memória. Porém, a superativação deles pode estar relacionada a muitas desordens neurológicas, como a DA. Desse modo, fármacos inibidores têm sido desenvolvidos, sendo a memantina, mostrada na Figura 15, a única aprovada até o momento como bloqueador do NMDA. [22]

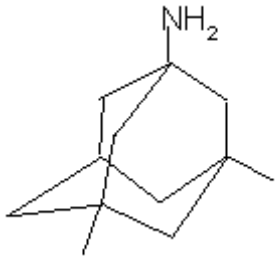

Figura 15: Estrutura da memantina.

Apesar disso, não há um tratamento que promova a estabilização do quadro da doença ou a sua regressão. Nesse contexto, percebe-se a necessidade de novas abordagens para o combate à doença de Alzheimer.

Uma vez que é conhecido que a concentração de íons metálicos no cérebro aumenta com o avanço da idade, que alguns deles mediam o processo de estresse oxidativo, bem como poderiam colaborar para a agregação do peptídeo A*β*, já que podem interagir com esta macromolécula, novas abordagens terapêuticas têm sido desenvolvidas no intuito de modular as interações metal-proteína anômalas.[13] Disso, vem o conceito de Compostos Atenuadores da Interação Metal-Proteína (do inglês MPACs), que se trata do uso de agentes quelantes capazes de romper interações anormais metal-proteína, com o objetivo de promover a repartição e normalização da distribuição dos íons. Essa abordagem é diferente da terapia de quelação tradicionalmente conhecida e usada em casos de intoxicação por íons metálicos, a qual visa à remoção sistêmica de certos metais em excesso; para isto, é necessária a existência de

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

grande afinidade química entre estes íons metálicos e os agentes quelantes em questão.[6]

No caso dos MPACs, existe um alvo específico para o ligante e a constante de dissociação do complexo formado não pode ser muito baixa e nem muito alta, possibilitando assim a redistribuição e normalização dos níveis dos íons metálicos fisiológicos.[6] Exemplos de substâncias que mostram a capacidade de atuarem como MPACs são a desferroxiamina (DFO) e a deferiprona, mostradas nas Figuras 16 e 17. Apesar de essas substâncias serem utilizadas no caso de o organismo sofrer sobrecarga de ferro, elas podem também ser empregadas como possíveis MPACs. Testes clínicos têm mostrado que a DFO impede a progressão da DA, além do fato de se ligar moderadamente a íons Cu(II) e Zn(II), o que contribuiria para a atenuação dos efeitos da doença. De modo similar, a deferiprona apresenta moderados efeitos quelantes e devido à sua significativa lipofilicidade, a travessia da barreira hemato-encefálica é eficiente.[23] Além disso, ela mostra ligações também efetivas com os íons metálicos Cu(II) e Zn(II), em pH fisiológico. [6]

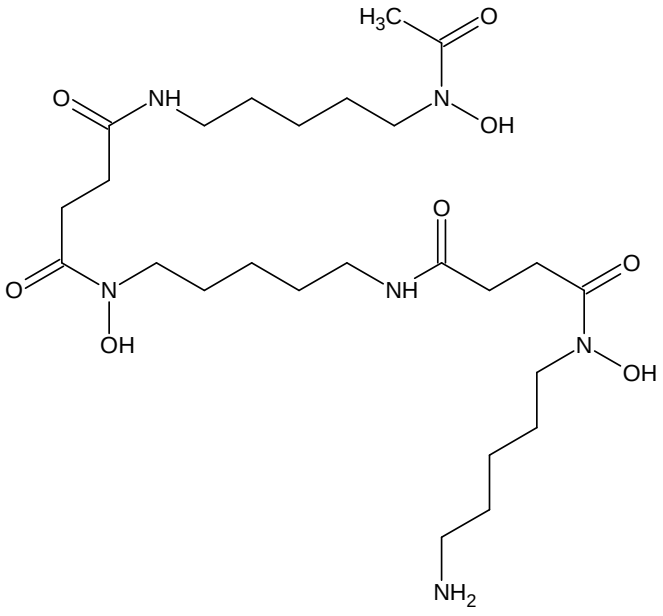

Figura 16: Estrutura da DFO.

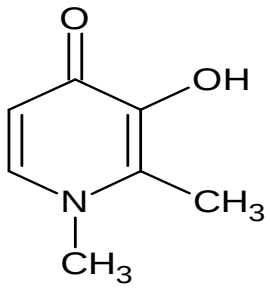

Figura 17: Estrutura da deferiprona.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

Com o conhecimento dessa definição, é possível direcionar ideias a respeito da elaboração de compostos que possibilitem a função desejada. Uma vez que, no caso da doença de Alzheimer, uma medida adequada seria o desenvolvimento de agentes atenuadores que atuem diretamente no cérebro, a permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE) deve ser considerada. Essa barreira é formada pelo endotélio de vasos sanguíneos cerebrais, pela membrana basal e células neurogliais, e separa o fluido intersticial cerebral do sangue circulante, de modo a proteger o cérebro de alterações nos níveis sanguíneos de íons metálicos e metabólitos de moléculas pequenas.[24]

Esse fato torna essa barreira altamente seletiva, de modo que uma droga que seja passível de atravessá-la deve possuir significativa hidrofobicidade, ser compacta, pouco carregada, bem como ter massa molar relativamente baixa (menor que 500 g mol^{-1}).[6] Uma vez no cérebro, a droga deve ser capaz de complexar os íons metálicos presentes nos agregados protéicos, de modo a permitir a re-dissolução e eliminação desses. Além disso, o agente deve ter baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais.[13]

Dentro dessa perspectiva, estudos voltados a alguns ligantes que pudessem alcançar os sítios de ligação dos metais no peptídeo Aβ e que apresentassem efeitos desejáveis começaram a ser realizados. Bush e colaboradores tomaram a hipótese de que o ligante deveria não somente reduzir a sobrecarga do peptídeo, mas também ser capaz de contribuir para a redução dos níveis de estresse oxidativo no cérebro. Em 1999, eles mostraram que quelantes de metais poderiam solubilizar placas amilóides em cérebros *post-mortem* de pacientes com DA. Eles chegaram à conclusão de que ligantes da classe das quinolinas poderiam ser capazes de remover Cu(II) e Zn(II) de Aβ. O candidato incialmente escolhido foi o clioquinol (CQ), oficialmente conhecido como 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (Figura 1), que é uma droga hidrofóbica, livremente permeável através da BHE e que possuía potenciais propriedades quelantes para os respectivos íons.[25]

No entanto, o desenvolvimento dessa droga pelo laboratório Ciba-Geigy não tinha a finalidade original de combate à doença de Alzheimer. O seu uso era voltado para o tratamento da disenteria amebiana. Porém, no final da década de 1960, houve uma elevada taxa de neurotoxicidade (especificamente, mielo-opticoneuropatia subaguda) no Japão, o que ocasionou a suspensão do uso do clioquinol no início de 1970.[26]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

Os testes com CQ realizados *post-mortem* com tecidos humanos de pacientes com DA apontaram que a concentração de A*β* liberado na forma solúvel aumentou mais de 200% na presença de uma concentração pouco maior que 0,4 μmol L^{-1} de CQ em uma extração única. Extrações posteriores indicaram a solubilização quase que completa de todo o peptídeo, fato que estimulou o grupo a testar a eficácia de CQ na inibição da deposição de amilóide.[26]

Através do uso do rato transgênico APP2576, um modelo *in vivo* de DA, foi verificado que o tratamento com clioquinol reduziu em 49% os depósitos de amilóide, havendo ausência de neurotoxicidade significativa.[5]

O clioquinol alcançou a fase II do teste de eficácia clínica para o tratamento da DA, mostrando melhoras no nível de cognição e menores níveis de peptídeo A*β*(1-42) em alguns pacientes. Porém, a Prana Biotechnology, companhia responsável pelo desenvolvimento da droga após a Ciba-Geigy, verificou que ela continha impurezas mutagênicas, de modo que não poderiam ser reduzidas para níveis aceitáveis, o que ocasionou a suspensão do desenvolvimento do fármaco para o uso na DA.[26]

Outro composto derivado do clioquinol (PBT2), também produzido pela mesma empresa, mas sem o átomo de iodo, fora sintetizado e testado em pacientes com DA, tendo completado a fase IIa de testes com pacientes, mostrando significativa redução nos níveis de A*β*(1-42) do fluido cérebro-espinhal, sem que houvesse alteração dos níveis séricos de cobre e zinco.[6]

Mesmo com o êxito do clioquinol e, principalmente, de seu análogo PBT2 na eficiência do combate à DA, o seu mecanismo de ação ainda é pouco esclarecido.[26] Acredita-se que, primeiramente, ocorra uma inibição da interação metal-A*β*, com a decorrente prevenção da agregação do peptídeo e redução dos níveis de estresse oxidativo, aprisionamento de íons metálicos redox ativos, tais como Cu(II), e elevação nos níveis de atividade de metaloproteinases para a degradação de A*β*.[6]

Outra possível abordagem terapêutica é a utilização de moléculas com ação antioxidante. Como a doença de Alzheimer é significativamente relacionada à geração de espécies reativas de oxigênio, como já mencionado, a aplicação de antioxidantes com baixo peso molecular poderia ter um efeito positivo na atenuação do estresse oxidativo. [27]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

Nesse contexto, destaca-se a melatonina (MLT, *N*-acetil-5-metoxitriptamina), apresentada na Figura 18. Essa substância é derivada do aminoácido triptofano, sendo ela o principal produto secretado pela glândula pineal, além de ser encontrada em todos os fluidos corporais. Ela apresenta lipofilicidade e hidrofobicidade moderadas, tendo, portanto, um caráter anfifílico, fato que permite que ela penetre com relativa facilidade em todas as membranas biológicas, inclusive a barreira hemato-encefálica. [27]

Quanto à suas funções, destacam-se a regulação do ritmo circadiano e a redução da peroxidação lipídica, fato relacionado à sua ação antioxidante. O ritmo circadiano significa “um ciclo diário”, e está relacionado ao fato de os seres vivos conseguirem adequar seu metabolismo de acordo com a luminosidade externa (período de vigília e de sono). [27, 28] Levando-se em conta a estrutura da MLT, sabe-se que sua ação antioxidante está relacionada à presença do anel indólico, que apresenta alta estabilidade por ressonância e baixa energia de ativação no que tange reações com radicais livres, ou seja, a estabilização desses radicais é favorecida frente ao anel indólico.[29]

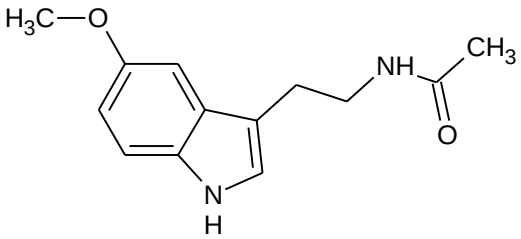

Figura 18: Estrutura da melatonina.

Além dessas funções, estudos indicam que indivíduos com sintomas de doença mental severa, alergias severas, doenças auto-imunes e câncer no sistema imunológico (como leucemias) poderiam não estar produzindo a melatonina adequadamente, fato que ratifica a grande importância desse hormônio. [29]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

1.6.
Proposta de trabalho

Uma vez que os atuais medicamentos usados para o combate à doença não são capazes de impedir a sua progressão,[3] é muito importante a busca por agentes terapêuticos que detenham o avanço do seu quadro, bem como que permitam a sua regressão. Neste contexto, a terapia baseada no conceito de MPACs surge como uma estratégia promissora para o combate à DA, já havendo sido alcançados alguns progressos, como no caso do uso do clioquinol e PBT2.[8]

Tendo isso em vista, pode-se sugerir que a aplicação de ligantes derivados de bases de Schiff, que são consideradas os mais fundamentais sistemas quelantes em química de coordenação, além de possuírem diversas aplicações farmacológicas, tais como atividades antibiótica [30,31], antifúngica [32] e anti-HIV,[33] dentre outras, constitua importante recurso na busca de terapias adequadas ao tratamento da DA. Esses compostos são capazes de se coordenar a centros metálicos através do nitrogênio do grupo imina e de outros grupamentos presentes com potenciais átomos doadores, podendo, assim, atuar como ligantes bi, tri ou tetradentados.[34,35]

Com base nisso, neste projeto, visou-se à síntese e caracterização de dois ligantes derivados de bases de Schiff, um deles constituídos pelo anel 8-hidroxiquinolínico, guardando, portanto, uma estrutura similar à do clioquinol (Figura 1) e outro contendo o anel 5-bromo-indólico, mantendo parte da estrutura semelhante à melatonina (Figura 18) e contendo um halogênio (bromo) no anel, parecidamente ao clioquinol, que contém o cloro e o iodo. As bases de Schiff foram obtidas com a condensação do agente anti-tuberculose isoniazida, havendo a formação de hidrazonas. Desse modo, esses ligantes, mostrados nas Figuras 19 e 20 passam a ter a capacidade de se coordenarem através dos átomos doadores nitrogênio e oxigênio.

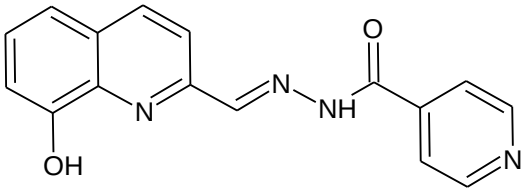

Figura 19: Estrutura do ligante baseado no clioquinol (**H_2*L1***).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA

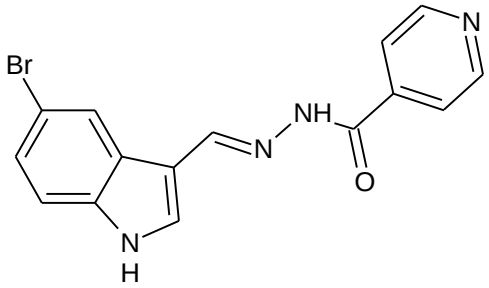

Figura 20: Estrutura do ligante baseado na melatonina (**H*L2***).

Embora os ligantes não sejam completamente inéditos, é a primeira vez que eles são propostos e testados como compostos úteis no tratamento da DA e outras desordens neurodegenerativas. Além disso, a pesquisa valorizou o fato de que duas moléculas que individualmente possuam atividade potencialmente biológica possam ser condensadas e formar uma única espécie potencialmente ativa [36], além do fato de se buscar novas utilidades para substâncias já conhecidas, tal como aconteceu com o clioquinol.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 10122269/CA