

2 Revisão da literatura

Neste capítulo foram destacadas algumas informações relevantes sobre o íon alumínio e os ligantes ATP, PCr, Met, Cis, Hcis e Pen. As permissões de reprodução de imagens apresentadas no capítulo estão nos anexos 10.2.

2.1 Alumínio(III)

O alumínio é um cátion pequeno e altamente carregado. Considerado um íon metálico duro, seus complexos hidrolisam facilmente em solução aquosa. A alta relação carga/raio do Al^{3+} confere ao cátion elevado poder polarizador, o que o caracteriza como um ácido de Lewis forte. Em complexos, pode assumir o número de coordenação quatro ou seis e adotar, respectivamente, a geometria tetraédrica ou octaédrica de acordo com os ligantes que estabelece ligações (Perl, 1988, Williams, 1996 e Barros, 2001).

Em solução, o íon alumínio sofre intensa hidrólise, iniciada a partir de um pH baixo, próximo a 3,0 (Perl, 1988). Em valores de pH tão baixos, a principal espécie mononuclear presente é a hexaaquaalumínio(III) $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$. Com a elevação do pH, espécies como $[\text{Al}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$, $[\text{Al}(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_4]^+$ e $\text{Al}(\text{OH})_3$ são formadas, bem como espécies polinucleares, em concentrações maiores do que o íon alumínio (Baes e Mesmer, 1986, Martell e Hancock, 1996 e Cotton *et al.*, 1999).

As espécies formadas com o alumínio facilmente sofrem hidrólise. Por isso, em solução aquosa, ele pode formar complexos de hidróxidos polinucleares e espécies metaestáveis – que podem precipitar e se redissolverem lentamente–. Algumas reações vagarosas mais incomuns podem gerar espécies poliméricas e coloidais menos estáveis (Martell e Motekaitis, 1992).

A identificação das espécies hidrolisadas do íon alumínio é custosa por muitas razões. Entre essas, citam-se: as reações rápidas de difícil parametrização, a presença de ao menos um íon polimérico de difícil caracterização como a espécie $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$ (que possui estrutura fechada e simétrica formada pelo $\text{Al}(\text{OH})_6$ de estrutura octaédrica) e a interferência permanente de espécies hidrolisadas instáveis ou insolúveis. Em resumo, a complicada cinética do

comportamento da hidrólise do íon alumínio envolve reações pouco estáveis, espécies poliméricas e formação de precipitados. (Baes e Mesmer, 1986).

2.1.1 A possibilidade da essencialidade do alumínio(III)

Até a presente data, o alumínio não possui nenhuma função essencial conhecida nos animais. Apesar disso, é ordinariamente encontrado em pequenas quantidades em todos os organismos. No homem, há cerca de $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de massa corpórea. Já no sangue humano, a concentração é, em média, $7 \mu\text{g L}^{-1}$, porque apenas uma pequena parte é reabsorvida pelo rim e atinge a corrente sanguínea (Greger, 1993 e Vallet *et al.*, 2003).

Apesar de não se saber muito sobre a essencialidade do íon, por volta de 1940 sugeriu-se que o alumínio promoveria *in vitro* a reação entre o citocromo C e a succínico desidrogenase. Na segunda metade do século passado, mostrou-se *in vitro* que a ativação do nucleotídeo guanina purificado relacionado à adenil ciclase requeria a presença desse íon (Greger, 1993). Em 2010, uma pesquisa (Lukiw, 2010) propôs um papel na compactação biomolecular baseada na propriedade de sais e hidróxidos de alumínio serem agregadores de moléculas biológicas em solução aquosa. Tal estudo aludiu particularmente à importância que isso teria na condensação de alguns domínios de cromatina com geometria tridimensional e no silêncio da expressão de tipos específicos de informação genética a partir da criação de complexos de interação altamente estáveis dentro da cromatina, que essencialmente inativariam a atividade dos genes (Lukiw, 2010).

Em certas ocasiões, moléculas ectopicamente agregadas pelo alumínio estão associadas a condições patológicas. Há inúmeras evidências de que a associação ectópica do alumínio com alguns genes, proteínas ou lipídios parece colaborar para várias doenças, principalmente, as associadas à agregação biomolecular inesperada (Lukiw, 2010).

A despeito das conjecturas sobre as funções biológicas do alumínio, atualmente sua potencial toxicidade, nos casos de exposição excessiva, continua a ser a maior preocupação da comunidade científica. É essencial ressaltar que sua toxicidade não está correlacionada com a concentração total, mas com a concentração de formas biologicamente ativas, em que o alumínio é absorvido no pH biológico do organismo. A absorção do alumínio ocorre principalmente a partir da formação de complexos (OMS, 1998 e Rubini *et al.*, 2002).

2.1.2 Absorção, distribuição e excreção do alumínio(III)

A absorção do íon alumínio pelo organismo depende de algumas características, como a quantidade ingerida, a solubilidade das espécies de alumínio, o pH do meio, a complexação com ligantes, as concentrações de espécies complexadas formadas e o estado fisiológico e patológico do indivíduo (Schäfer e Jahreis, 2009).

Em relação à possibilidade de complexação com ligantes, cita-se a influência da presença de ácidos orgânicos na absorção do íon, especialmente do ácido cítrico (Greger, 1993). O citrato majora a absorção do alumínio(III) por meio do aumento da solubilidade do metal no intestino, pois é capaz de formar complexos neutros solúveis de pH 2,5 a 5,5, faixa na qual o íon, em geral, se torna insolúvel. Além disso, o citrato compõe com o alumínio(III) um quelato de carga zero, o que permite a penetração do primeiro pelas membranas das células mucosas intestinais (Sedman, 1992) e o citrato pode abrir as junções epiteliais, ao menos em células *in cultura*, o que ocorre possivelmente através da quelação do cálcio (Greger, 1993 e Schäfer e Jahreis, 2009).

A complexação com outros ligantes dietéticos presentes em alimentos e bebidas como o ascorbato, o gluconato, o lactato, o malato, o oxalato, o succinato e o tartarato também foi investigada (Greger, 1993, Berthon, 2002 e Schäfer e Jahreis, 2009). Esses também podem promover um aumento na absorção do alumínio(III), porque possuem a habilidade de elevar o pH de precipitação do íon metálico para mais de 8,0 devido a formação de complexos. O fluoreto, o galato, o clorogenato, o cafeato e o protocatecuato, presentes na dieta, também podem aumentar a absorção gastrointestinal. Aminoácidos também afetam a absorção e a distribuição do alumínio *in vivo* (Berthon, 2002).

O átomo de oxigênio é o principal sítio de ligação do $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ em sistemas biológicos. Carboxilatos, fenolatos, catecolatos e fosfatos são os melhores ligantes para esse cátion. Biomoléculas com tais funções podem estar envolvidas nos processos de absorção e transporte e também nas ações biológicas e fisiológicas do alumínio nos organismos vivos (Cotton *et al.*, 1999 e Rubini *et al.*, 2002).

Embora certos ligantes possam favorecer a absorção do alumínio, outros podem prejudicá-la. Por exemplo, o fosfato tem a capacidade de formar com o

alumínio um precipitado na forma de um sal insolúvel ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), por isso o alumínio é empregado em drogas de tratamento da hiperfosfatemia (Berthon, 2002 e Schäfer e Jahreis, 2006). A sílica presente na alimentação também diminui a absorção do alumínio e desempenha um papel protetor contra a possibilidade de intoxicação pelo íon (Berthon, 2002).

Em geral, no plasma sanguíneo, o alumínio encontra-se ligado a transferrina, a albumina e aos compostos de baixo peso molecular. A participação da transferrina no transporte do íon é considerável (Sedman, 1992), mas a albumina também é apta a ligar até três átomos de alumínio por molécula (Greger, 1993) ainda que fracamente (Sedman, 1992).

Em fluidos corporais, nucleosídeos di e trifosfatos, catecolaminas e aminoácidos também agem como ligantes do alumínio(III) (Schäfer e Jahreis, 2006).

Em mamíferos, a porção de alumínio ingerida pela dieta é comumente bem tolerada. Aproximadamente 99% do teor de alumínio ingerido oralmente é excretado pela via fecal. Da quantidade absorvida pelo trato gastrointestinal, cerca de 95% é excretado pela urina e menos de 2% pela bile (Schäfer e Jahreis, 2006). A maior parte do alumínio excretado na urina encontra-se na forma de um quelato com o aniôn citrato, complexo estável de baixa densidade eletrônica que consegue transportar o alumínio através de membranas apolares (Kruck e McLachlan, 1988, Berthon, 1996 e Dantas *et al.*, 2007).

Apesar de a maioria do Al^{3+} ser excretado pelo organismo em condições normais, quando absorvido no meio ácido do estômago ou no duodeno proximal o íon é distribuído, principalmente, nos ossos (principal depósito corpóreo), no fígado, nos rins e no cérebro (Schäfer e Jahreis, 2006).

2.1.3 Contato dos seres humanos com o alumínio(III)

O alumínio pode entrar em contato com os seres humanos por diversas formas. Ele é usado no tratamento da água à composição de vacinas.

Sais de alumínio (por exemplo, o sulfato de alumínio) são empregados na purificação da água como agentes coagulantes com o intuito de reduzir a matéria orgânica, a turbidez e os níveis de microorganismos. Se sua eliminação não for realizada de maneira eficiente, ele pode contaminá-la (Schäfer e Jahreis, 2006).

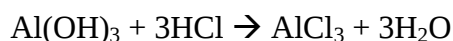
Em geral, o alumínio está presente naturalmente em aquíferos com uma concentração média de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Freitas, Brilhante e Almeida, 2001).

Compostos de alumínio são utilizados em outros fins, no refino de açúcar, na fabricação de cerveja, do papel, do plástico, de polímeros, da borracha e do vidro, na produção de cerâmica, na impermeabilização têxtil, em abrasivos, em forros de forno, em aditivos alimentares e em cosméticos (Schäfer e Jahreis, 2006).

Em cosméticos, exemplifica-se o uso do cloridrato de alumínio em desodorantes do tipo antitranspirantes. Ele produz hidróxido de alumínio insolúvel sobre a pele de modo a formar uma obstrução no ducto da glândula sudorípara. Em pastas de dentes, o emprego do alumínio objetiva a redução da hipersensibilidade dental (Schäfer e Jahreis, 2006).

Os compostos de alumínio são comumente usados em produtos farmacêuticos. Antiácidos têm uma concentração bem elevada de alumínio se comparado a outros medicamentos (Greger, 1993) ou a qualquer alimento que possa ser consumido (Sedman, 1992). Na verdade, consumidores regulares de antiácidos chegam a ingerir quantidades de gramas de alumínio por dia (Nayak, 2002).

O antiácido reduz a concentração de íon hidrogênio oriundo do ácido gástrico e eleva assim o pH intra-estomacal (Richardson, 2004), por meio da reação:



Alguns sais que compõem os antiácidos são o hidróxido de alumínio (como no medicamento brasileiro Pepsamar®), o óxido de alumínio e o carbonato sódico de dihidroxialumínio (Tichy, 2003).

Analgésicos (por exemplo, a aspirina tamponada) também possuem alumínio em sua composição bem como os anti-ulcerativos, os produtos antidiarreicos, os medicamentos hemorroidais (Greger, 1993, Soni *et al.*, 2001, Tichy, 2003 e Schäfer e Jahreis, 2006) e os aglutinantes de fósforo, aproveitados em drogas de tratamento da hiperfosfatemia em pacientes urêmicos com insuficiência renal (Schäfer e Jahreis, 2006 e Schäfer e Seifert, 2006). Os sais de alumínio utilizados nos analgésicos são o hidróxido de alumínio e o glicinato de alumínio, nos anti-ulcerativos o sulfato de alumínio sucrose e nos antidiarreicos o silicato de alumínio e magnésio (Tichy, 2003).

Suplementos de cálcio baseados em conchas de ostras, devido a contaminação, possuem uma porcentagem de alumínio variando de 0,2 a 0,6 (Greger, 1993 e Soni *et al.*, 2001).

O alumínio apresenta efeito anti-inflamatório e ação bactericida (Schäfer e Jahreis, 2006). Um exemplo é a solução de Burow (composta de acetato de alumínio), com efeitos antibacterianos e adstringentes, vastamente aproveitada para o tratamento de infecções crônicas do ouvido (Oishi *et al.*, 2010), inclusive na otite média (Ishibashi *et al.*, 2004) ao inibir o *Staphylococcus aureus*.

Os sais de alumínio são ainda usados como adjuvantes em vacinas e na imunoterapia de alergia com o escopo de majorar as propriedades antigênicas (Schäfer e Jahreis, 2006 e Schäfer e Seifert, 2006), sendo o único adjuvante licenciado para vacinas humanas por décadas (Spreafico, Ricciardi-Castagnoli e Mortellaro, 2010). O adjuvante de vacina aprimora a resposta imune aos antígenos da vacina, ao amplificar qualquer um dos sinais envolvidos no processo de indução da resposta imunológica (Aimanianda *et al.*, 2009). São substâncias com diferentes mecanismos de ação, tais como produtos microbianos, sais minerais, emulsões, micropartículas e lipossomas, utilizadas para aumentar a imunogenicidade de um antígeno coadministrado *in vivo* (Mosca *et al.*, 2008). Acredita-se que os adjuvantes estimulam a resposta à vacina, ao imitar as atividades biológicas normalmente associadas aos patógenos vivos (Gregorio, Tritto e Rappuoli, 2008).

Os compostos de alumínio empregados como adjuvantes são genericamente e comumente chamados de *alum*, perfazem esse grupo o hidróxido de alumínio, o oxihidróxido de alumínio cristalino e o hidroxifosfato de alumínio amorfo, imunopotenciadores de vacinas há mais de 80 anos (Aimanianda *et al.*, 2009) e extensivamente usados na forma de adjuvantes até hoje, apesar do mecanismo de imunoestimulação parcialmente conhecido (Gregorio, Tritto e Rappuoli, 2008 e Kool *et al.*, 2008). Acredita-se que eles aumentem a imunidade humoral por meio da formação de um depósito em que o antígeno é liberado lentamente para aumentar a produção de anticorpos, pela indução da inflamação e pela conversão do antígeno solúvel em partículas, de modo que o antígeno é fagocitado por células imunes como macrófagos (Kool *et al.*, 2008).

Os *alum* são largamente aproveitados em uma variedade de produtos vacinais, tais como proteínas recombinantes, partículas semelhantes a vírus e

polissacarídeos conjugados. As vacinas para difteria, tétano, hepatite e raiva são baseadas em adjuvantes de alumínio. Nos Estados Unidos, a quantidade de alumínio em cada dose de vacina é limitada a um máximo de 0,85 mg (Nayak, 2002).

No Brasil, os bebês em período de amamentação possuem um risco extremamente elevado de absorção de alumínio proveniente das vacinas se comparado ao leite materno (Dorea e Marques, 2010).

O alumínio pode ainda entrar em contato com os seres humanos através da alimentação por meio de alimentos e bebidas (inclusive, a água potável pode possuir 0,014 a 2,7 mg L⁻¹), sendo ingerido diariamente em baixa concentração na dieta. Ele está presente em maiores quantidades em diferentes temperos, por exemplo, no manjerição e no orégano (Greger, 1993). Destaca-se, no entanto, a crescente acidez dos solos que liberam formas fitotóxicas em maior quantidade, o que aumenta a exposição humana (Aranha, 2002 e Rubini *et al.*, 2002).

Esse íon também está presente em aditivos alimentares (por exemplo, conservantes e corantes), o que aumenta significativamente sua concentração na dieta humana. É imprescindível salientar que, nos Estados Unidos, os aditivos alimentares são considerados a principal fonte dietética de alumínio, sendo os mais ingeridos: as formas ácidas e básicas do sódio alumínio fosfato, os sulfatos de alumínio, a bentonita de alumínio, os silicatos de alumínio e os inúmeros corantes à base do elemento (Greger, 1993 e Suay-Llopis e Ballester-Díez, 2002).

Ressalta-se, ainda, o provável prejuízo associado à co-exposição ao alumínio e ao álcool, ambos pró-oxidantes e neurotóxicos. Estudo (Nayak, Sharma e Chowdary, 2011) em ratos sugeriu que o etanol induz, de forma dose-dependente, o aumento dos impactos do alumínio no cérebro.

Há diversos estudos a respeito da quantidade ingerida de alumínio proveniente das dietas. Eles apontam uma ingestão entre 10 a 100 mg por dia (Piccin, Fatibello-Filho e Ramos, 2004 e Dantas *et al.*, 2007). Por exemplo, a ingestão média de alumínio na dieta espanhola corresponde a cerca de 30 mg dia⁻¹ e é oriunda principalmente de leite, produtos lácteos e cereais (Piccin, Fatibello-Filho e Ramos, 2004 e Dantas *et al.*, 2007). Infelizmente, não foi encontrada uma investigação similar sobre a dieta brasileira.

No que tange os utensílios aproveitados para a cocção, ao comparar a concentração de alumínio em alimentos cozidos em panelas de aço e de alumínio

é possível perceber que a cocção realizada em panela de alumínio aumenta a concentração do íon em alguns alimentos, em especial, no molho de tomate, devido ao seu meio ácido que favorece o acúmulo do íon (Greger, 1988). Entretanto, outra pesquisa indica que a migração do metal da panela de alumínio para o alimento não simboliza risco à saúde, pois está abaixo do limite tolerável aceito pela Organização Mundial de Saúde e não influencia significativamente a ingestão total do metal (Dantas *et al.*, 2007).

Embora o alumínio também esteja presente no ar, não há risco de contaminação. Afinal, sua quantidade é muito pequena ($0,005 \text{ mg m}^{-3}$ em áreas rurais até $0,01 \text{ mg.m}^{-3}$ em áreas industrializadas) e ainda de difícil absorção, pois ele se une a partículas grandes em suspensão que não penetram facilmente na árvore brônquica (Suay-Llopis e Ballester-Díez, 2002).

2.1.4 Alguns efeitos nocivos do alumínio(III) no corpo humano

O Al^{3+} interage com diversos elementos na bioquímica do organismo, entre eles: cálcio, fósforo, magnésio, flúor, ferro, cobre, zinco e estrôncio. Isso prejudica a biodisponibilidade de outros íons e compostos importantes para a saúde (Berthon, 1996 e OMS, 1998).

No caso dos íons metálicos Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{3+} , isso se deve às semelhanças químicas com o Al^{3+} . Ele interagiria com proteínas ligantes ou transportadoras do Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Fe^{3+} . Por exemplo, o Al^{3+} interage competitivamente com a transferrina, a albumina, a calbidina e a calmodulina, através da substituição dos íons metálicos ou de uma ligação mais forte no complexo formado com as proteínas (Greger, 1988 e Kiss, 2006).

A interação do alumínio com o cálcio e o fósforo é relacionada à depressão na absorção mediada pelo hormônio paratireoideano (PTH) e pela vitamina D. A exposição ao alumínio pode afetar os níveis de PTH ao inibir sua secreção das células paratireoides ou provocar efeitos diretos nos osteoblastos. Além disso, complexos de alumínio podem inibir a mineralização óssea, o que impede a formação do fosfato de cálcio, principal matéria inorgânica do osso (Greger, 1988). Ainda em relação ao cálcio, o alumínio influencia sua homeostase intracelular ao afetar o tamponamento, a expulsão e os canais de cálcio. Um estudo mostrou que o Al^{3+} liga-se competitivamente a calmodulina, o que provoca um aumento intracelular do Ca^{2+} . O Al^{3+} ainda estimula os canais de cálcio

dependentes da voltagem nas membranas celulares e promove a liberação de cálcio das organelas celulares (Ren *et al.*, 2010).

O Al^{3+} interage com o ferro de várias maneiras, ao diminuir a absorção de ferro não heme por meio da alteração do pH intestinal e a solubilidade do ferro inorgânico. O Al^{3+} também interage com a transferrina, principal proteína transportadora dos dois íons. O alumínio ainda inibe a atividade da ferroxidase da ceruloplasmina, necessária a mobilização de ferro do fígado (Greger, 1988).

A interação do Al^{3+} com o flúor é arrolada ao aumento da perda fecal de fluoreto. Acredita-se que o alumínio esteja conectado a ativação da adenilciclase pelo flúor, uma enzima catalisadora da conversão de ATP a AMPc (Greger, 1988).

O alumínio interage com o cobre pela interferência na atividade da enzima transportadora ceruloplasmina e por sua substituição nos sítios de coordenação da albumina (Greger, 1988).

Esse íon metálico também pode interferir na absorção do zinco e do estrôncio. Porém, tais interações não são conclusivas e não se conhece os mecanismos por quais ocorreriam.

O alumínio pode provocar diversos efeitos nocivos ao organismo como osteomalácia, anemia hipocrômica microcítica, declínio cognitivo ou doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e escleroses, especialmente, a esclerose lateral amiotrófica (Greger, 1993, Ferreira *et al.*, 2008 e Shiek e Ahmed, 2010).

Em 2008, foi publicado um estudo com dados obtidos entre 1988 e 2003 de noventa e uma pessoas que avaliou a condição cognitiva de acordo com a exposição individual e geográfica ao alumínio. Ele mostrou um declínio cognitivo maior nos indivíduos que consumiam água contaminada ou com maior exposição ambiental. Entretanto, o consumo de água contaminada estaria ligado à demência enquanto o ambiente, não. Assim, o alto consumo do íon através da água contaminada representa um fator de risco para o declínio cognitivo (Rondeau *et al.*, 2008).

Isso ocorre, porque o alumínio é um agente neurotóxico que se acumula em diferentes áreas cerebrais de acordo com as doenças neurodegenerativas. Por exemplo, na substância negra em pacientes afetados pela doença de Parkinson. Ele é associado a disfunções neuronais e gliais que afetam vários sistemas de

neurotransmissores, inclusive o dopaminérgico (Shiek e Ahmed, 2010 e Erazi, Ahboucha e Gamrani, 2011).

2.1.5 O alumínio(III) e a diálise

Na insuficiência renal, a filtração realizada pelos rins encontra-se prejudicada, ocorrendo assim maior retenção do alumínio(III). De modo que, quando há exposição a altas concentrações, como ocorria na diálise, pode advir vários efeitos tóxicos como a osteomalácia e a encefalopatia por diálise, sendo a última muito grave (Soni *et al.*, 2001).

A encefalopatia da diálise é uma síndrome crônica notada em pacientes com insuficiência renal em diálise, caracterizada por demência, alterações na fala, mioclonias – contrações repentinas, incontroláveis e involuntárias–, tremores e convulsões (Andrade *et al.*, 2005).

Durante a diálise o carreamento de alumínio incide tão ligeiramente que a capacidade do osso em sequestrar o elemento é extrapolada e, por conseguinte, o acúmulo é desviado para tecidos moles resultando em toxicidade. Em pacientes não-urêmicos submetidos à diálise, as partes do corpo mais frequentemente envolvidas no acúmulo de Al^{3+} são o baço e os ossos (Schäfer e Jahreis, 2006).

Em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), o Al^{3+} causa acúmulo tecidual e depleção dos estoques de ferro. No cérebro dos enfermos, gera encefalopatia letal e progressiva. Durante muito tempo, os doentes em diálise apresentaram problemas devido ao íon proveniente da água do dialisado. Ultimamente, entretanto, diversos países realizam um controle austero da água empregada, que é deionizada e isenta de alumínio (Lima *et al.*, 2001).

Antigamente, a contaminação por Al^{3+} em pacientes com doença renal crônica em tratamento regular de hemodiálise era oriunda principalmente da água usada no preparo do dialisato, devido ao enorme volume de água (cerca de 360 litros por semana) a que os doentes são expostos. Porém, em países desenvolvidos, tal causa foi praticamente extinguida devido ao advento da osmose reversa para purificação e ao intenso controle da qualidade da água (Sedman, 1992 e Bohrer *et al.*, 2009).

Depois de o metal ser eliminado, na medida do possível, das soluções de diálise, a incidência de toxicidade diminuiu muito. Portanto, a neurotoxicidade provocada pelo alumínio nos pacientes em diálise caiu bastante (Nayak, 2002).

Hoje em dia, é imprescindível a atenção aos produtos farmacêuticos contendo alumínio, oferecidos aos pacientes em diálise, sobretudo, os aglutinantes de fosfatos (Tichy, 2003). Esses vêm sendo substituídos por ligantes à base de cálcio ou de Sevelamer (amina polimérica que liga fosfato), de forma que nenhuma outra fonte expressiva do íon metálico para os pacientes em diálise é considerada. Não obstante, enfermos em tratamento regular de hemodiálise apresentam níveis séricos de alumínio anormais (Bohrer *et al.*, 2009).

Um estudo recente com vinte pacientes em diálise no mesmo hospital e expostos a mesma água de dialisato indicou a água potável e os alimentos ingeridos como uma contribuição apreciável, quando a concentração do íon oriunda de drogas não é tão alta. Ainda evidenciou que os pacientes recebendo ferro, insulina e eritropoietina, medicamentos importantes e amplamente administrados, possuem elevado nível de Al^{3+} no plasma em comparação aos pacientes que não os recebem (Bohrer *et al.*, 2009).

2.1.6 O alumínio(III) e a terapia de nutrição parenteral

Além da preocupação com os pacientes em diálise, os doentes em terapia de nutrição parenteral também merecem cuidados especiais.

A terapia de nutrição parenteral, em geral, é usada em pacientes que não podem ou não devem receber a alimentação por via oral. Ela é constituída principalmente por aminoácidos, carboidratos, eletrólitos, vitaminas e elementos traço essenciais. Ela pode conter todas ou algumas dessas substâncias, dependendo da condição de saúde do indivíduo (Harigaya, Kuwahara e Nishi, 2008).

Há enorme preocupação com a concentração de alumínio em dietas parenterais administradas intravenosamente, porque no caso não há barreiras protetoras de órgãos do aparelho digestório (Greger, 1993).

Além disso, em enfermos tratados com nutrição parenteral, mesmo se a função renal é normal, não é possível eliminar todo o alumínio que entra no corpo pela infusão, principalmente, devido à rápida absorção, assim parte do íon se deposita no organismo (Berthon, 2002). A contaminação por alumínio advém das matérias-primas ou/e dos recipientes utilizados para armazenagem (Harigaya, Kuwahara e Nishi, 2008).

No final de 1980, a *Food and Drug Administration* (FDA) recomendou que o alumínio fosse eliminado dos ingredientes aproveitados na composição da nutrição parenteral. A partir de 2004, a FDA determinou que os fabricantes de produtos farmacêuticos inserissem a concentração de alumínio nos rótulos de todos os aditivos usados para compor as soluções da nutrição parenteral, e ainda que não fosse explícito no regulamento, esperava-se que a quantidade máxima de alumínio contido na fórmula parenteral fosse calculada e que se tentasse contornar a possibilidade de sobrecarga de alumínio. Porém, como o cômputo do teor de alumínio na etiqueta do produto pode ser equivocado por não considerar a quantidade real de alumínio contido em cada ingrediente no momento da composição, a maioria dos profissionais prefere monitorar a concentração de alumínio no plasma do paciente (Gura, 2010). Logo, quando a contaminação é detectada, o paciente já está exposto aos seus riscos.

O alumínio absorvido pela contaminação dos fluidos provoca um substancial aumento na quantidade sérica de alumínio, porém, sua excreção encontra-se apenas ligeiramente aumentada (Gitelman, 1995).

Antigamente, eram mais comuns casos de intoxicação por alumínio devido à nutrição parenteral. No entanto, em alguns países, foram realizadas algumas alterações nos produtos com a finalidade de impedir tal problema, por exemplo, substituir os componentes empregados nas fórmulas por outros semelhantes. Todavia, a toxicidade continua sendo relatada esporadicamente.

Uma das modificações, por exemplo, foram relativas à caseína. As soluções de nutrição parenteral até o fim do século passado usavam os hidrolisados de caseína como fonte proteica, porém, por eles serem ricos em alumínio foram trocados por aminoácidos cristalinos que, em geral, têm uma menor carga de alumínio (Gura, 2010).

Outros componentes e aditivos da nutrição parenteral ainda continuam a ser um problema por conter quantidades consideráveis de alumínio, são eles: as multivitaminas, os elementos traço, os sais de cálcio como o gluconato de cálcio, os sais de fosfato como o fosfato de potássio e o fosfato de sódio, a heparina e a albumina (Sedman, 1992, Greger, 1993 e Popinska, *et al.*, 1999).

Pesquisa mostrou que o alumínio presente em pontas de agulha não elevou a incidência de contaminação, provavelmente devido à pequena área superficial e o curto tempo de contato com os fluidos (Gura, 2010).

Além da matéria-prima, outros fatores influenciam a presença e o grau de contaminação de alumínio. São eles: o recipiente de armazenamento e sua qualidade (os materiais plásticos são preferidos), as condições de estocagem do produto, a validade e a etapa de filtração adicional existente no processo de fabricação em algumas marcas (Gura, 2010).

Outra questão que rege a incidência da toxicidade do alumínio na nutrição parenteral presentemente são as regras e as leis existentes em cada país. Afinal, dependendo da região, apenas alguns dos produtos são obrigados a limitar a quantidade do metal na composição da fórmula parenteral ou a incluir o teor de alumínio no rótulo (Gura, 2010).

Quando ocorre a intoxicação, o principal tratamento é a terapia quelante, em especial, com o agente deferroxamina (Gura, 2010). Sideróforo linear hexadentado da classe hidroxamato conhecido pela sigla DFO que tem alta afinidade e especificidade por metais com carga 3+ e que possui administração subcutânea ou intravenosa.

2.1.7 O alumínio(III) e a doença de Alzheimer

A concentração de alumínio no cérebro humano tem relação com as doenças neurodegenerativas (Ferreira *et al.*, 2008 e Shiek e Ahmed, 2010). Um dos principais questionamentos em torno do alumínio em doenças neurodegenerativas é se ele seria uma causa ou uma consequência das doenças. Entretanto, a alta concentração de alumínio não é absoluta em todos os casos de acometimento, afinal nem todos os pacientes que apresentam doenças neurodegenerativas em vida, como o mal de Alzheimer, possuem no cérebro alta concentração de alumínio.

Há casos de pacientes que na autópsia possuíam uma concentração de alumínio no cérebro semelhante à de um paciente da mesma faixa etária, porém, sem sinais de Alzheimer ou outras enfermidades neurológicas.

Dentre as doenças neurodegenerativas relacionadas ao alumínio, o mal de Alzheimer se destaca. Esse é provavelmente resultado de um processo multifatorial com componentes genéticos e fenotípicos. No último, um dos principais malefícios é a exposição ao alumínio. Ele afeta até 70% da população idosa, tendo prevalência de 1,4% entre 65 e 69 anos, 20,8% entre 85 e 89 anos e 38,6% entre 90 e 95 anos. Tais porcentagens consideram os resultados falsos

positivos, quando o paciente é diagnosticado com Alzheimer, mas não possui a doença. Na verdade, o enfermo possuiria outra doença com sintomatologia semelhante, mas o diagnóstico foi equivocado (Ferreira *et al.*, 2008). O Alzheimer é uma enfermidade que tem diagnóstico de exclusão, ou seja, realizado pela exclusão de outras doenças conhecidas com sintomatologia semelhante. O diagnóstico corresponde à doença mais provável segundo o quadro clínico apresentado pelo indivíduo, já que não existem ainda exames capazes de estabelecer com total certeza o diagnóstico. Esse só é verdadeiramente definido quando há a possibilidade de se realizar a necropsia.

O mal de Alzheimer é uma doença cerebral degenerativa de etiologia desconhecida. Ela é caracterizada microscopicamente, na maioria dos casos, pela presença de um grande número de estruturas neurofibrilares e placas amilóides em certas regiões do cérebro (Hamley, 2012). Tem como características clínicas a perda de memória recente e de faculdades intelectuais, com sinais de ansiedade e depressão. Os principais fatores de risco são a idade e o histórico familiar de demência (Ferreira *et al.*, 2008).

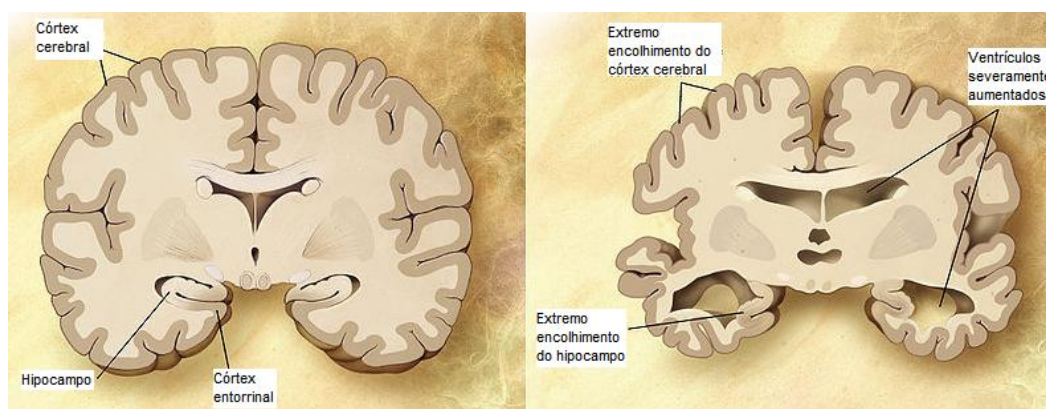


Figura 2.1 - Tecido cerebral sadio (disposto à esquerda) e com Alzheimer (disposto à direita) (Adaptado com permissão de Wikipédia, 2010).

O Alzheimer é associado à redução geral do tecido cerebral sendo marcado pela perda neuronal (hipófise e basal) e proliferação glial (Ferreira *et al.*, 2008). As Figuras 2.1 e 2.2 ilustram o volume reduzido do cérebro com Alzheimer, a profundidade dos sulcos do córtex, a diminuição da quantidade de giros, o aumento dos ventrículos cerebrais e o encolhimento do hipocampo e do córtex cerebral.



Figura 2.2 - Cérebro com Alzheimer (disposto à esquerda) e sadio (disposto à direita)
(Reproduzida com permissão de Dam, 2004).

Durante vinte anos, a conjectura prevalente para patogênese do Alzheimer foi a dos agregados de $A\beta$. Acreditava-se que a doença era caracterizada microscopicamente pela presença em certas regiões do cérebro de um grande número de estruturas neurofibrilares (emaranhados neurofibrilares intraneuronais) e placas amilóides extracelulares. As placas por si só seriam tóxicas e causariam a degeneração dos nervos. A sintomatologia estaria estritamente atrelada a sua deposição e neurotoxicidade (Nicoll, Boche e Holmes, 2008).

As estruturas neurofibrilares formadas por filamentos de configuração fosforilada da proteína Tau, associada aos microtúbulos, teriam um papel menos importante na patogenia. A Tau tornar-se-ia anormalmente fosforilada no Alzheimer e se depositaria intracelularmente na forma de filamentos helicoidais pareados. Ao ocorrer à morte celular, os filamentos agregar-se-iam como emaranhados neurofibrilares extracelulares.

A patogenia do Alzheimer, na hipótese dos agregados de $A\beta$, seria intimamente conectada ao defeito no processamento da clivagem proteolítica do peptídeo $A\beta$ ocorrido devido o seu predecessor, a proteína precursora amilóide (APP). Havendo dois tipos de peptídeos $A\beta$, o $A\beta_{40}$, normalmente produzido em baixas quantidades, e o $A\beta_{42}$ que tem superprodução em mutações genéticas. A formação de placas amilóides dar-se-ia a partir da agregação de ambas $A\beta$, entretanto, a $A\beta_{42}$ seria mais maléfica (Nicoll, Boche e Holmes, 2008).

A Figura 2.3 expõe a sequência de aminoácidos do peptídeo $A\beta_{42}$ (Suh e Checler, 2002), com os aminoácidos citados como possíveis sítios na região N-terminal em rosa e na região C-terminal em azul.

(N-terminal)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(C-terminal)

Figura 2.3 - Sequência de aminoácidos do peptídeo A β 42.

Apesar da hipótese do mal de Alzheimer ser causado pelos agregados de A β , estudos confirmaram que pacientes sem ou com poucos agregados possuem progressivo declínio cognitivo. Isso provocou a associação da maior toxicidade a oligômeros e derivados solúveis intracelulares de A β e não apenas a depósitos insolúveis extracelulares. Nessa nova suposição, os agregados teriam uma toxicidade bem menor (Vieira *et al.*, 2007 e De Felice *et al.*, 2009).

Os oligômeros e derivados solúveis de amiloide, principais espécies tóxicas da maioria das amiloidoses, poderiam ainda induzir a hiperfosforilação da proteína Tau (Vieira *et al.*, 2007).

Outro indício que apoia a hipótese de oligômeros e derivados solúveis como ligantes patogênicos é o anti-histamínico dimebolina, conhecido por melhorar o curso clínico do Alzheimer, aumentar os níveis de deposição de A β (Doody *et al.*, 2008).

De uma maneira geral, cientistas têm qualificado a A β como uma metaloproteína que se liga a íons de elementos de transição através de três histidinas e uma tirosina, localizadas na parte hidrofílica N-terminal do peptídeo, e de uma metionina, na parte hidrofóbica C-terminal. Estudos revelam que alterações na A β como oxidação desses aminoácidos podem modificar a progressão do Alzheimer (Atwood *et al.*, 1998, Huang *et al.*, 1999 e Atwood *et al.*, 2000).

Muitas pesquisas sugerem que a presença de íons metálicos pode ser fundamental tanto para a fibrilização de A β quanto para o começo da produção de espécies reativas de radicais livres de oxigênio conexas ao estresse oxidativo (Gerlach *et al.*, 1994 e Bondy, Guo-Ross e Truong, 1998).

A agregação da A β é fortemente influenciada pela ligação dos peptídeos aos íons metálicos alumínio, cobre, ferro e zinco, encontrados em altas concentrações nas placas amilóides, eles possuem participação na precipitação e citotoxicidade da A β (Domingo, 2006 e Drago *et al.*, 2008a).

O alumínio, o cobre, o ferro e o zinco estão presentes no cérebro de um paciente doente numa concentração de 3 a 5 vezes maior do que no cérebro de

uma pessoa com a mesma idade, porém sem a doença. Eles podem ser tóxicos não apenas por favorecerem a geração de radicais livres de oxigênio, mas também por instigar diretamente a gênese de fibrilas (Basun *et al.*, 1991 e Castellani *et al.*, 1999). Ensaios *in vitro* (Dyrks *et al.*, 1992) apontam que concentrações traço de Al^{3+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} estimulariam a agregação de A β entre 100 e 1000 vezes mais.

A disrupção da sinalização do íon cálcio e a disfunção mitocondrial são alvos da morte e da perda neuronal associada ao mal de Alzheimer. Investigação em camundongos revelou que dos metais alumínio, cobre, ferro e zinco, apenas a conjugação do alumínio a A β perturbava a homeostase neuronal de cálcio e inibia a respiração mitocondrial. Do conteúdo dos quatro metais, apenas a concentração do alumínio majorou no córtex cerebral (Drago *et al.*, 2008a).

Além disso, análises em culturas de neuroblastomas humanos demonstraram a viabilidade celular quando há a formação de complexos A β -metal, em que o metal poderia ser alumínio, zinco, cobre ou ferro. Das células tratadas com esses complexos por 24 horas, somente o complexo A β -alumínio diminuiu a viabilidade celular e aumentou a fluidez, alterando profundamente a morfologia celular. Em comparação aos demais metais, o alumínio promoveu a agregação da A β e produziu efeitos nocivos (Drago *et al.*, 2008b).

Estudos realizados com ratos transgênicos expostos durante seis meses a doses diárias de 1 mg Al.g^{-1} mostraram que após cinco meses do fim do recebimento das doses diárias havia alta quantidade de alumínio no hipocampo, tanto no córtex quanto no cerebelo. Isso não influenciou, entretanto, a quantidade de cobre, zinco, manganês e ferro no fígado, rim, ossos e cérebro, com exceção, apenas, da quantidade de zinco no cérebro que sofreu ligeiro aumento. Esses resultados indicam que o alumínio não influenciaria os níveis de outros metais importantes na etiologia do Alzheimer e participaria diretamente do declínio cognitivo, ao atuar como fator de risco secundário para a patogênese da doença (Mil e Benga, 2006 e Gómez *et al.*, 2008).

A associação entre o íon Al^{3+} e o Alzheimer foi detectada pela primeira vez em 1965, na realização de um estudo de inoculação intracerebral de fosfato de alumínio em coelhos que gerou degeneração neurofibrilar similar à observada no Alzheimer. Em 1973, foi publicado o primeiro artigo sobre o aumento da concentração de alumínio em pacientes com Alzheimer (Ferreira *et al.*, 2008).

Pesquisa (Ribes *et al.*, 2008) realizada com ratos transgênicos expostos a baixas doses de alumínio, comparáveis proporcionalmente a exposição humana corriqueira, encontrou grande quantidade de fragmentos de A β no cérebro, diminuição do aprendizado e da memória e aumento do total de proliferação celular nos giros do hipocampo, o que indica uma resposta reativa do cérebro à quantidade de alumínio.

Investigação realizada com células humanas de neuroblastomas tratadas a níveis não letais com o complexo Al(maltol)₃ mostrou que na presença do Al³⁺ há uma redução significativa do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), indutor da expressão e síntese das proteínas reguladoras de atividades associadas ao citoesqueleto (Arc). Isso indica uma possibilidade de como a exposição ao alumínio provoca danos nos processos de aprendizagem e memória. Afinal, a memória é dependente da plasticidade sináptica e da síntese de novas proteínas, especialmente das Arc, que na presença do Al³⁺ sofrem prejuízo em sua síntese (Chen *et al.*, 2011).

Na doença de Alzheimer, muitos estudos propõem a participação do alumínio associada ao peptídeo A β , porém, há alguns poucos casos em que não se conseguiu observar a toxicidade sinérgica do alumínio e da A β (Nday *et al.*, 2010), provavelmente isto ocorre devido às diferenças nas técnicas empregadas nas pesquisas.

O alumínio aumenta a agregação da A β , a neurotoxicidade de placas amilóides, a hiperfosforilação da Tau, a formação do emaranhado neurofibrilar (microtúbulos hiperfosforilados associados à proteína Tau) e a degeneração de neurônios (Ferreira *et al.*, 2008). Ele induz a morte celular por uma combinação de apoptose e necrose (Zhang *et al.*, 2010a).

Estudo realizado por meio de fluorescência histoquímica sinalizou que a heterocromatina alojava a maioria do alumínio no cérebro. Em placas amilóides, a concentração de alumínio no DNA era de 3700 $\mu\text{g g}^{-1}$ e em condição de normalidade, 2000 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Wills e Savory, 1988 e Good *et al.*, 1992).

Cérebros maduros são mais sensíveis à toxicidade do alumínio. O conteúdo do alumínio nesses pode aumentar devido à exposição maior com a idade ou a habilidade diminuída de remoção (Tripathi *et al.*, 2009).

Autópsias realizadas em tecidos cerebrais de pacientes enfermos mostram manchas que denunciam a presença de alumínio em estruturas celulares e

subcelulares. Todos os neurônios piramidais de espécimes com idade mais elevada exibem, pelo menos em determinado grau, certo conteúdo de alumínio. Muitos o exibem apenas nos nucléolos enquanto outros tanto nos nucléolos como no citoplasma, na forma fibrilar, granular ou de grânulos sólidos (Walton, 2006 e Walton, 2010).

Os neurônios piramidais são qualificados em estágios que apontam um dos dois processos neuropatológicos: o aumento progressivo de alumínio nuclear com degeneração granulo vacuolar ou a formação de emaranhados neurofibrilares nas regiões ricas em alumínio no citoplasma (Walton, 2006).

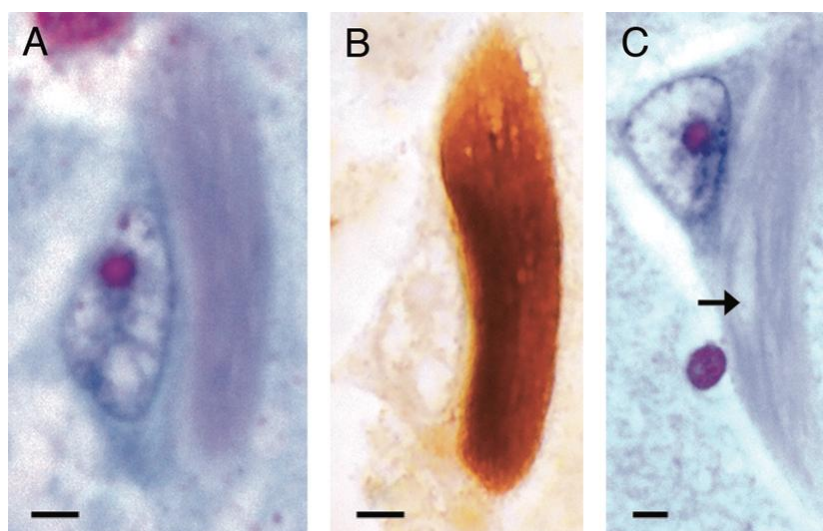


Figura 2.4 - Emaranhados neurofibrilares maduros (Reproduzida com permissão de Walton, 2010).

Nas Figuras 2.4 e 2.5, o método de pigmentação de Walton mostra depósitos de alumínio em cor violeta. A Figura 2.4 (A)-(C) mostra emaranhados neurofibrilares maduros de células piramidais do hipocampo de pacientes diagnosticados com Alzheimer há mais de oito anos. A célula observada na Figura 2.4 (A) e (B) apresenta um emaranhado neurofibrilar grande e o núcleo deslocado para a periferia da célula. Na Figura 2.4 (A) há manchas púrpuras que representam o alumínio. Na Figura 2.4 (B), uma mancha marrom representa a Tau hiperfosforilada. A Figura 2.4 (C) expõe um emaranhado neurofibrilar de uma célula de outro doente na qual parece haver menos e mais finas fibrilas, o que indica agregação de filamentos (Walton, 2010).

As Figuras 2.5 (A)-(C) mostra núcleos de neurônios com o conteúdo de alumínio na forma de fio (A), de fibrilas radiadas (B) e de substância amorfa (C). Na Figura 2.5 (D) há a forma granular do alumínio em vacúolos.

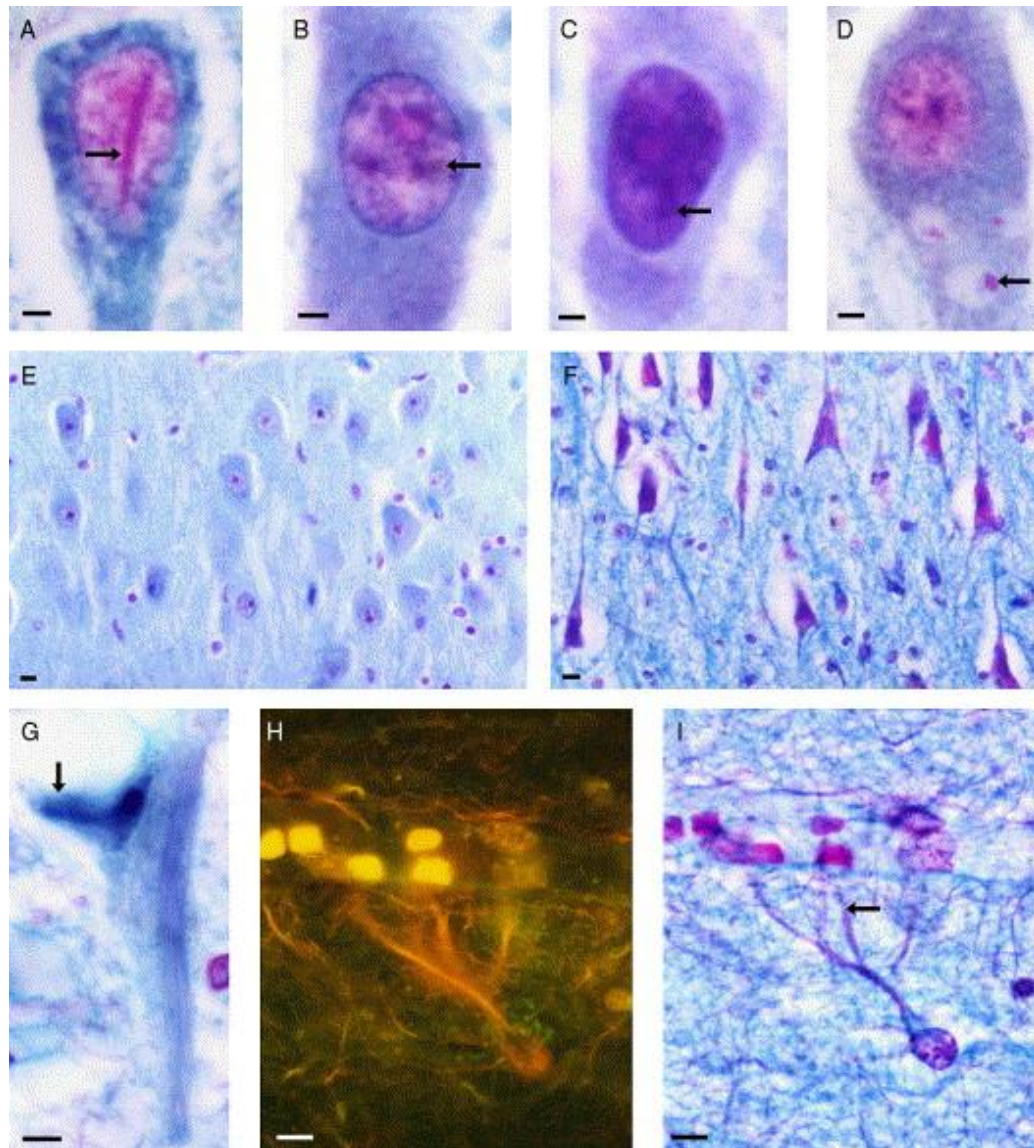


Figura 2.5 - Características do tecido cerebral humano com conteúdos de alumínio (Reproduzida com permissão de Walton, 2006).

Nas Figuras 2.5 (E) e (F) observa-se a quantidade de alumínio em neurônios do hipocampo em idade avançada. Na Figura 2.5 (E) há neurônios de pacientes sem demência com quantidades mínimas de alumínio apenas no nucléolo. Já a Figura 2.5 (F) ilustra neurônios de doentes de Alzheimer com conteúdo máximo de alumínio no núcleo e no citoplasma. Na Figura 2.5 (G), o núcleo foi expulso do emaranhado neurofibrilar. Nas Figuras 2.5 (H) e (I) observa-se a mesma imagem,

porém, na Figura 2.5 (H) ela foi obtida por fluorescência. Nas Figuras 2.5 (H) e (I) há um astrócito com alumínio conectado a um capilar contendo eritrócitos com alumínio (Walton, 2006).

2.2 Ligantes fosfatados

O fósforo, elemento abundante na crosta terrestre, é necessário para todas as formas de vida. Todavia, ressalta-se que no final de 2010 anunciou-se a possibilidade da existência de um micróbio (Wolfe-Simon *et al.*, 2011), o GFAJ-1, que seria capaz de utilizar o arsênio em substituição ao fósforo e variar, dessa forma, a composição elementar de suas biomoléculas básicas. Todavia, tanto a estrutura das moléculas quanto os seus mecanismos de ação não foram descobertos. Houve grande controvérsia (Oehler, 2011 e Foster, 2011) a respeito de tal capacidade, que permanece ainda sem ser comprovada. Inclusive, diversos estudos refutaram a habilidade de essa bactéria sobreviver sem o fósforo e a classificaram como resistente ao arsenato, mas ainda dependente de fosfato (Erb *et al.*, 2012 e Reaves *et al.*, 2012).

O fósforo é um elemento essencial que participa de muitas funções corporais e processos metabólicos, entre eles: exerce efeito tampão que coopera para conservar o pH neutro citoplasmático, serve de base para o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA), gera ligações fosfato de alta energia no ATP, forma redutores biológicos universais como o nicotinamida adenina dinucleotídeo H (NADH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato H (NADPH), e constitui os nucleotídeos cíclicos, como o adenosina monofosfato cíclico (AMPc), que atuam como mensageiros secundários no interior celular e podem ativar as quinases e as fosfatases (Mahan e Escott-Stump, 1998). De um modo geral, as funções dos compostos fosfatados biológicos englobam a formação de estruturas, a transferência de energia e a iniciação e regulação de processos celulares (Vallet *et al.*, 2003).

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

Os compostos fosfatados podem ter as energias liberadas em reações de hidrólise das ligações P-O com valores pequenos, o que se observa na Tabela 2.1 nas reações de hidrólise da glicose-6-fosfato, do monofosfato de adenosina (AMP) e do glicerol- α -fosfato. Entretanto, as reações de hidrólise nas ligações

P-O ou P-N do ATP, do difosfato de adenosina (ADP), do acetil-fosfato, da PCr e do fosfoenolpiruvato possuem altas energias livres de hidrólise. Devido à grande instabilidade termodinâmica, esses compostos recebem a classificação de compostos ricos em energia e as suas ligações P-O ou P-N são chamadas de ligações fosfatadas de alta energia.

Compostos fosfatados	ΔG (kJ mol ⁻¹) em pH 7,0
Fosfo-enolpiruvato	-61,9
Fosfocreatina	-43,1
Acetil-fosfato	-42,3
ATP (para ADP)	-30,5
AMP (para adenosina)	-9,2
Glicose-6-fosfato	-13,8
Glicerol- α -fosfato	-9,2

Tabela 2.1 - Energias livres para as hidrólises de alguns compostos fosfatados (pH 7,0)
(Adaptada de Machado e Nome, 1999).

Os compostos ricos em energia podem se ligar a dois nucleotídeos e ainda sofrer ionização em pH próximo à neutralidade (pH fisiológico). A sua ionização, ao considerar a estabilidade cinética, é importante no meio biológico, porque a carga negativa sobre o grupo fosfato repele eventuais nucleófilos e dificulta a hidrólise. A evolução ainda favoreceu esses metabólitos que podem se conservar dentro da membrana celular, apesar de ionizados, já que os fosfatos estão na forma ionizada em valores de pH fisiológico (Machado e Nome, 1999).

Em relação a características químicas dos nucleotídeos, lembra-se que esses possuem como principais sítios de interações a base púrica (átomos doadores N-1 e N-7), a base pirimidínica (N-3) e os átomos de oxigênio dos grupos fosfatos (Lomozik e Jastrzab, 2003).

Os compostos fosfatados são extremamente significantes para o organismo e participam de processos metabólicos primordiais – como o de geração energética, mencionado acima. Estes são afetados em doenças degenerativas, como o Alzheimer.

Alguns estudos mostram que os índices de ATP, de creatina e de PCr estão diminuídos na doença de Alzheimer, no entanto, outras pesquisas mais antigas indicavam que esses compostos não eram eliminados (Bottomley *et al.*, 1992, Gonzalez *et al.*, 1996, Hattori *et al.*, 2002 e Mihara *et al.*, 2006). Atualmente, a maioria dos trabalhos aponta concordância para a diminuição dos depósitos energéticos cerebrais.

Estudo realizado por ressonância magnética *in vivo* no cérebro de pacientes com Alzheimer mostrou alterações no estado biofísico das membranas fosfolipídicas - devido a diferenças nos níveis de fosfodiésteres - e no metabolismo dos fosfatos de alta energia. Em pacientes que apresentavam demência foram evidenciadas diminuições dos níveis de PCr e adenosina difosfato, aumento dos níveis de fosfomonoésteres e aumento da taxa metabólica oxidativa, o que sugere estresse energético no cérebro com Alzheimer. Com a piora do quadro neurológico, as mudanças se acentuariam ainda mais (Pettegrew *et al.*, 1997).

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

No entanto, pesquisa indica que a captação vesicular de glutamato possa ser ainda regulada por fosfomonoésteres endógenos e PCr. Assim, como esses são afetados na doença de Alzheimer, a captação de L-glutamato também deve ser prejudicada (Xu *et al.*, 1997).

A estabilidade de compostos fosforilados e suas interações com metais vem sendo estudada há algum tempo (Sigel *et al.*, 1987); todavia, são indispensáveis mais pesquisas sobre o assunto.

2.2.1 Adenosina 5'-trifosfato (ATP)

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

A energia produzida pela formação de subprodutos oriundos da quebra desta molécula inicia a contração muscular e assiste a vários processos citológicos, como transporte ativo, síntese e secreção de substâncias, divisão celular, entre outros (Mahan e Escott-Stump, 1998 e Shils *et al.*, 2003).

Alterações nos níveis de ATP e nos seus transportadores são observadas em inúmeras doenças, entre as quais se cita a doença arterial coronariana (Rejeb *et al.*, 2010), a atrofia ótica dominante (Lodi *et al.*, 2011), a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Lommatzsch *et al.*, 2010) e alguns tipos de cânceres (Stagg e Smyth, 2010). Entretanto, em outras enfermidades que parecem ter ligação com o ATP, como no caso da asma (Lazar *et al.*, 2010), este composto parece não modificar suas concentrações.

O ATP tem ação importante no sistema nervoso. A gliotransmissão é um processo no qual os astrócitos funcionam como elementos ativos, influenciando a transmissão sináptica e a sinaptogênese. Os gliotransmissores, compostos liberados de células gliais, mais conhecidos são o glutamato e o ATP, logo o ATP participa diretamente da transmissão sináptica e da sinaptogênese. Somado a isso, o ATP pode ainda estimular a síntese de D-serina, ao majorar a taxa de atividade da enzima cerebral serina racemase, ao atuar como um regulador positivo da enzima (Scolari e Acosta, 2007).

O ATP, além de desempenhar seu papel de gliotransmissor, pode influenciar canais celulares. O canal de potássio sensível ao ATP possui efeito neuroprotetor contra danos neuronais isquêmicos, como o acidente vascular cerebral, embora não se saiba como isso ocorre (Bantel, Maze e Trapp, 2010 e Zhang *et al.*, 2010b).

2.2.1.1 Adenosina 5'-trifosfato e a doença de Alzheimer

Um dos primeiros artigos que sugeriram a relação entre o Alzheimer e o ATP ressaltava a acumulação de receptores-A1-adenosina em estruturas neurodegenerativas no Alzheimer, o que mediaría tanto o processamento da APP quanto à fosforilação da proteína Tau (Rizopoulos *et al.*, 1989).

A quantidade de receptores de adenosina-A1 aumenta tanto na fase inicial quanto na fase avançada da doença, entretanto, não há diferenças com a progressão patológica. Além disso, também estão majorados os receptores de adenosina-A2A (Albasanz *et al.*, 2008).

Nos pacientes com Alzheimer, há significativa diminuição na densidade dos agonistas e dos antagonistas dos receptores de adenosina nos sítios de ligação da camada molecular do giro denteado (Ulas *et al.*, 1993).

Estudo de imunomarcção em necropsias de pacientes com Alzheimer e controles mostrou que os receptores de adenosina no hipocampo e no córtex cerebral apresentam mudança no padrão de expressão e redistribuição nessas áreas do cérebro, existindo imunoreatividade ao receptor de adenosina-A1 nos neurônios em degeneração com emaranhados neurofibrilares e neurites distróficas de placas amilóides (Angulo *et al.*, 2003).

Os receptores de adenosina podem ser alvos potenciais de medicamentos no Alzheimer.

A adenosina e os receptores de adenosina também vêm sendo ligados à modulação da neuroinflamação e a injúria cerebral em doenças como a esclerose múltipla e encefalomielite. O papel do receptor A1 é mais bem conhecido, contudo, pouco se sabe sobre a participação do receptor A2A. Embora, ele pareça se associar a mecanismos neuroprotetores (Yao *et al.*, 2012).

Além disso, mediante estudos de neurônios em cultura, a relação entre estresse oxidativo e alterações no transporte de glicose foi comprovada. A A β altera a captura de glicose e acarreta, por sua vez, uma diminuição nos níveis de ATP. Um caminho apontado para isso é a conjugação do 4-hidroxinonanal (aldeído derivado da lipoperoxidação dos ácidos graxos poliinsaturados n-6) à proteína transportadora de glicose GLUT3, o que interfere no transporte de glicose para o ciclo de Krebs (Keller *et al.*, 1997 e Butterfield, 2002).

A alteração no metabolismo de glicose restringe também a síntese de acetilcolina, glutamato, aspartato, ácido aminobutírico e glicina (Blum-Degen *et al.*, 1995).

A A β gera radicais livres no Alzheimer e tais espécies reativas provocam peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e perda da integridade da membrana, o que acarreta inibição de ATPases, perda da homeostase de cálcio, inibição do sistema de captação de glutamato dependente de sódio em células gliais, adulteração de vias metabólicas, ativação de fatores de transcrição e, por fim, apoptose (Butterfield, 2002).

A difusão no organismo de ATP livre e de ATP ligado a um íon metálico é semelhante, visto que o tamanho molecular do complexo não é muito maior que o

do ATP livre (Huang, Liu e Mao, 1998), logo, complexos com esse ligante podem atingir diversas regiões no corpo humano.

Na etiologia do Alzheimer e em outras amiloidoses, a formação das fibrilas amilóides possui um papel importante. Estudos mostram que o complexo AlATP promove a formação de fibrilas reativas de beta-amilóide e de peptídeos amiloidogênicos independentes. À indução de formação de fibrilas, é seguida a complexação do AlATP por um ou mais monômeros dos peptídeos. Entretanto, o complexo formado não pode ser identificado diretamente, o que sugere a atuação do AlATP como uma chaperona na formação de fibrilas amilóides, ao auxiliar o desdobramento das fibrilas. O efeito do AlATP não é mimetizado nem pelo AlADP, nem pelo AlAMP (Exley e Korchazhkina, 2001).

Além disso, a homeostase cerebral do alumínio tem impacto na função cerebral. As mudanças nas funções cerebrais envolvem a potencialização das atividades de neurotransmissores através da ação do AlATP em receptores de ATP no cérebro (Exley, 1999).

O fato de o íon alumínio incitar fortemente a agregação de A β (Dyrks *et al.*, 1992), conseqüentemente, pode majorar os distúrbios na captura de glicose, visto que há uma maior concentração de A β (Keller *et al.*, 1997 e Butterfield, 2002), e então ocasionar uma redução mais significativa das concentrações de ATP.

2.2.2 Fosfocreatina (PCr)

A PCr é uma molécula de creatina fosforilada sintetizada no fígado e transportada até as células para armazenamento. Ela é um depósito temporário de energia usado por alguns tecidos em ocasiões de estresse, como os músculos, o coração e o cérebro.

Antigamente, acreditava-se que as reservas corporais de PCr não eram alteradas nem por treinamento físico, nem pela dieta do indivíduo. Porém, pesquisas (Mendes e Tirapegui, 2002) mostraram que a creatina obtida da dieta é absorvida pelo organismo e pode ser transformada em PCr, para subsequente armazenagem.

A PCr tem natureza anfipática, de modo que suas características iônicas permitem-na ligar-se às cabeças fosfolipídicas polares das membranas. Com a ligação, a PCr diminui a fluidez membranar e limita a passagem de material celular. Essa estabilização impede a isquemia e a hipóxia (Cecconi *et al.*, 2002).

No pH fisiológico, a PCr encontra-se sob a forma do ânion PCr^{2-} que pode coordenar-se aos cátions metálicos. De forma que, há a competição entre os ânions contendo o grupo fosfato, como o ADP e o ATP com a PCr^{2-} pelas espécies catiônicas presentes no meio. Dados sobre a estabilidade de complexos envolvendo a PCr e outros ligantes fosfatados são necessários para a determinação da concentração das espécies presentes no meio citosólico (Cecconi *et al.*, 2002). Isso também motivou o estudo mais aprofundado de compostos de coordenação formados nos sistemas entre o alumínio e os ligantes fosfatados (ATP e PCr) na tese.

O metabolismo da PCr liga-se a creatina e a creatina quinase, assim, se qualquer alteração ocorre em um desses compostos, a PCr também pode sofrer prejuízos. Isso porque ela faz parte do sistema Creatina/PCr/Creatina quinase. Os papéis celulares primordiais desse sistema são o provimento de energia de ligações fosfato e a regeneração do ATP. A creatina exerce função essencial no metabolismo energético, participa da síntese proteica e da estabilização de membranas.

A terapia de suplementação com creatina em crianças e/ou em adultos é utilizada com efeitos benéficos de curto e longo prazo em diversas doenças, como atrofia giratória – resultado de um erro inato do metabolismo referente à atividade da ornitina-delta-aminotransferase–; vários tipos de desordens musculares, entre elas as miopatias inflamatórias, a distrofia facioscapulohumeral, a distrofia de Becker e a distrofia de Duchenne; doença de Huntington; distúrbios metabólicos e ósseos, como a osteoporose e a diabetes tipo II; leucemia linfoblástica aguda; DPOC; insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e doenças associadas à mitocôndria. A hipóxia e condições vinculadas à energia cerebral, como o traumatismo cerebral, a isquemia cerebral e a prematuridade, também podem se favorecer com a suplementação (Brosnan e Brosnan, 2007, Evangeliou *et al.*, 2009, Gualano *et al.*, 2010 e Kerr, 2013). A creatina, devido suas propriedades neuroprotetoras, é usada ainda como adjuvante efetivo e seguro para o tratamento de desordens cerebrais ligadas a disfunção do metabolismo energético, entre elas esclerose lateral amiotrófica, doença de Parkinson, Huntington e Alzheimer (Gualano *et al.*, 2010, Braissant, 2010 e Allen, 2012).

A creatina apresenta benefícios ao organismo ainda na forma de derivados, caso de um complexo de acetato com a PCr e o magnésio, que mantém os efeitos

neuroprotetores da creatina *in vitro* e *in vivo*. As análises *in vitro* revelaram que, além do efeito neuroprotetor contra danos, o complexo aumenta a quantidade de creatina neuronal independentemente do transportador de creatina, o que pode representar uma “cura” da síndrome hereditária da deficiência do transportador de creatina, já que poderia impedir o aparecimento dos sintomas da desordem. Exames *in vivo* com camundongos mostraram que se o acetato é dado antes da isquemia, há a neuroproteção, logo o derivado pode ser usado como medicamento no tratamento de condições com risco de derrame iminente ou de dano cerebral isquêmico, por exemplo, ataques isquêmicos transitórios de alto risco, cirurgia da artéria carótida e cirurgia de coração aberto, bem como, na deficiência hereditária do transportador de creatina (Perasso *et al.*, 2009). Então, diversas condições debilitantes podem ser amenizadas ao se interferir no metabolismo da PCr.

As mudanças nos níveis de creatina e PCr no cérebro estão envolvidas na patogênese de doenças neurológicas, tais como o transtorno obsessivo-compulsivo e a depressão (Kato *et al.*, 1994 e Mirza *et al.*, 2006). Além de participarem em processos cerebrais de aprendizado e memória (Oliveira *et al.*, 2008 e Braissant, 2010).

No cérebro, a PCr merece especial atenção devido ao metabolismo energético. O ATP é a fonte de energia mais comum em reações cerebrais, todavia, a PCr é uma reserva energética importante no sistema nervoso central (SNC). Inclusive, o nível de PCr é muito superior ao de ATP no SNC e pode ser usado para repor o ATP utilizado em reações celulares (Graham *et al.*, 1996). Uma grande quantidade de ATP é constantemente necessária para manter a atividade sináptica do sistema nervoso central e periférico (Williams, 2003 e Andres *et al.*, 2008). No hipocampo e no cerebelo, regiões com elevada atividade sináptica, as concentrações de PCr são maiores (Erecinska e Silver, 1989).

A redução ou o esgotamento dos níveis de ATP pode contribuir para a morte de células neurais (Andres *et al.*, 2008), e as doenças neurodegenerativas são causadas por uma perda progressiva de células de uma ou várias regiões do sistema nervoso, por isso, as quantidades de ATP e de PCr estão intrinsecamente ligadas as doenças degenerativas.

Inclusive em doenças neurodegenerativas, depósitos de creatina podem indicar processos oxidativos disfuncionais. Autópsias em tecido do sistema nervoso central em seis pacientes afetados com a esclerose lateral amiotrófica

mostraram, em todos os casos, pequenos depósitos cristalinos de creatina (Kastyak *et al.*, 2010). Depósitos ou pigmentação similares não foram descobertos em indivíduos saudáveis. A Figura 2.6 (A-B) exhibe depósitos de creatina na medula espinhal de um paciente que sofria de esclerose lateral amiotrófica (Kastyak *et al.*, 2010).

Tais depósitos, encontrados também em todos os pacientes com a doença de Alzheimer avançada, sugerem grande perturbação no estado energético (Gallant *et al.*, 2006).

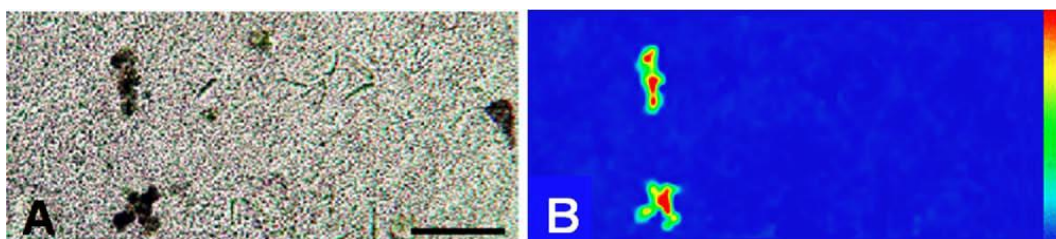


Figura 2.6 - Tecido *post mortem* da medula espinhal de paciente com esclerose lateral amiotrófica mostrando dois depósitos de creatina com imagem de microscópio de luz (A) e de infravermelho com transformada de Fourier (B) (Reproduzida com permissão de Kastyak *et al.*, 2010).

2.2.2.1 Fosfocreatina e a doença de Alzheimer

No Alzheimer, a captura de glicose pelas células sofre obliteração (Keller *et al.*, 1997 e Butterfield, 2002). Isto ocasiona diminuição nos níveis de ATP e interfere no ciclo de Krebs. Dessa forma, há prejuízo também na concentração de PCr.

O sistema creatina-PCr é regulado pela creatina quinase. No cérebro com Alzheimer e em células expostas ao peptídeo A β , entretanto, tal enzima é afetada e sua expressão cerebral parece diminuir (Gualano *et al.*, 2010).

Outra vinculação da PCr ao Alzheimer é observada pela creatina, seu produto de hidrólise.

Há ainda poucas pesquisas sobre o efeito da creatina na função cognitiva, mas já se reconhece sua capacidade neuroprotetora contra doenças neurodegenerativas. Além disso, ela é vista como uma forma de tratamento para algumas desordens neurológicas. Evidências recentes sugerem sua participação em processos cerebrais, como o aprendizado e a memória. Estudos corroboraram que a suplementação oral de creatina aumenta a pontuação em testes de

inteligência, reduz a fadiga mental e protege contra a diminuição da oxigenação no cérebro (Oliveira *et al.*, 2008). Acredita-se que a melhora de funções neuronais pela presença de creatina está relacionada ao aumento do estoque energético.

A suplementação de creatina em neurônios cultivados em meio neurotóxico induzido pelo peptídeo A β exerce efeito neuroprotetor, todavia, mais investigações precisam ser feitas para se averiguar as consequências da suplementação como estratégia para amenizar os sintomas da doença de Alzheimer (Gualano *et al.*, 2010).

Na doença de Alzheimer, caracterizada pela presença de concentrações anormais do peptídeo A β , há interferência na bioenergética humana (Butterfield, 2002 e Keller *et al.*, 1997) e na respiração mitocondrial, o que influencia os níveis de compostos que podem auxiliar na geração de energia como a PCr, especialmente por ela repor o ATP utilizado em reações celulares no SNC (Graham *et al.*, 1996). Tal condição pode se acentuar pelo aumento na concentração de alumínio, que promove maior agregação de A β (Dyrks *et al.*, 1992 e Drago *et al.*, 2008b).

O fato do Al³⁺ majorar a agregação da A β também interfere na creatina quinase, pois, sua expressão cerebral é inibida (Gualano *et al.*, 2010), o que, consequentemente, influencia o sistema PCr-creatina.

2.3 Aminoácidos

Os aminoácidos sulfurados presentes comumente no organismo humano, como a Cis, a Met e a Hcis, contribuem para o metabolismo celular e homeostase do enxofre. Desequilíbrios no metabolismo deste elemento estão conectados ao estresse oxidativo e consequentemente às doenças neurodegenerativas (Townsend, Tew e Tapiero, 2004).

Somado a isso, estudos indicaram que tratamentos de doenças inflamatórias e da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) com compostos que possuam o grupamento sulfidril podem ser benéficos. Pesquisas *in vitro* demonstraram que efeitos estimulatórios em fator de necrose tumoral (TNF), induzido por radicais livres na replicação de vírus da imunodeficiência humana (HIV) e de monócitos, poderiam ser inibidos por compostos que tenham esse grupamento, de modo a retardar o processo inflamatório (Grimble, 1994 e Grimble e Grimble, 1998).

Outro fator que merece atenção é a possibilidade da formação de complexos para uma melhor absorção de íons metálicos.

Um estudo em camundongos mostrou que quando o alumínio(III) é administrado oralmente por um longo período juntamente com o aminoácido glicina, isso facilita sua acumulação *in vivo*. Há um aumento significativo de Al^{3+} em todos os órgãos, principalmente, no cérebro e nos ossos. Já quando o metal é administrado isoladamente, há pouca absorção (Aikoh, Yamato e Shibahara, 2007).

Uma pesquisa sobre os efeitos de absorção e de apoptose de complexos de aminoácidos com alumínio (Aremu e Meshitsuka, 2005) em cultura primária de astrócitos indicou que tais complexos possuem um papel mais importante no mecanismo de neurotoxicidade do alumínio se comparado a sais inorgânicos ou complexos com citrato.

A investigação (Aremu e Meshitsuka, 2005) mostrou que a taxa de internalização do metal pelos astrócitos depende do aminoácido usado como ligante. Ao comparar a glicina, a serina e o glutamato, a primeira possuía uma absorção maior. Um aspecto curioso foi a internalização pelos astrócitos de complexos com aminoácidos, mas não com o citrato. Interessantemente, os transportadores de aminoácidos parecem não participar na captação dos complexos. Outras vias que não precisem de energia proporcionada pela sódio-potássio ATPase participariam da internalização do alumínio. Uma delas é a difusão passiva, contudo, parece haver outras (Aremu e Meshitsuka, 2005).

A Figura 2.7 (A-F) ilustra mudanças na morfologia nuclear em culturas primárias de astrócitos tratadas com o Al^{3+} . A Figura 2.7 (A) exhibe células controle e a Figura 2.7 (B-F) mostra células tratadas com o alumínio e a glicina. Destaca-se que células com manchas homogêneas no núcleo são consideradas viáveis enquanto células com a presença de condensação ou fragmentação de cromatina sugerem a apoptose (Aremu e Meshitsuka, 2005).

A pesquisa (Aremu e Meshitsuka, 2005) sugere que estudos sobre a neurotoxicidade do Al^{3+} devem reputar os aminoácidos como bons candidatos para a promoção da absorção celular do metal sob a forma de complexos. Ademais, ao se considerar o prejuízo no metabolismo dos astrócitos e seu comprometimento devido a apoptose pelo aumento do acúmulo de alumínio é preciso ponderar a perda da regulação dos astrócitos e de sua atuação no SNC

como uma forma de causar a neurodegeneração do Alzheimer (Aremu e Meshitsuka, 2005). É válido ressaltar a importância dos astrócitos na biossíntese de fosfolipídios no cérebro (De Koning, 2003).

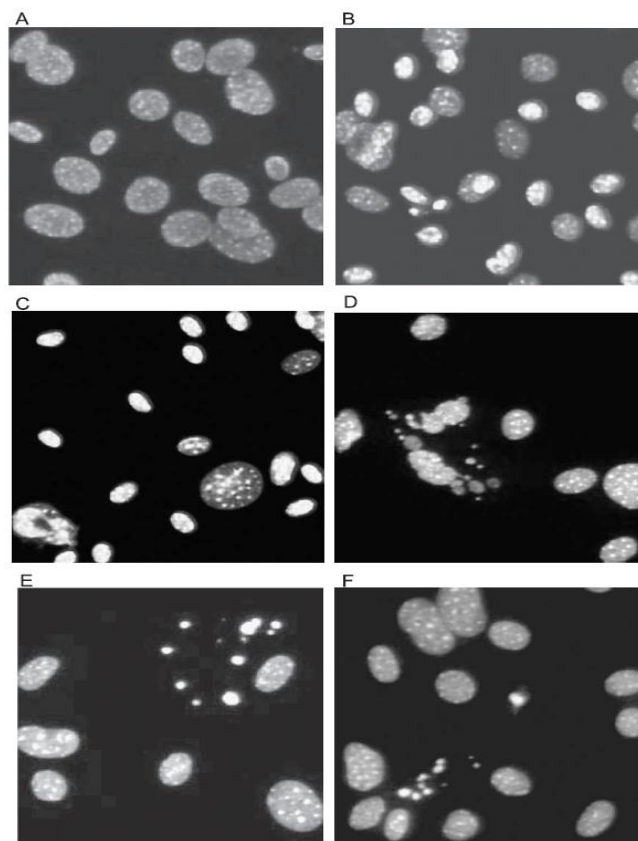


Figura 2.7 - Mudanças na morfologia nuclear em culturas primárias de astrócitos tratadas com Al^{3+} (Reproduzida com permissão de Aremu e Meshitsuka, 2005).

2.3.1 Metionina (Met)

A Met é um aminoácido sulfurado essencial que possui como prováveis sítios de ligação os grupamentos amina, carboxilato e tioéter (Lehninger, 2002).

A Hcis e a Cis são produzidas a partir da Met. Quando o nível de Met é satisfatório para o desempenho das reações metabólicas, a Hcis fabricada entra na via de transulfuração e é convertida em cistationina. No entanto, quando a conservação de Met é necessária, a Hcis é remetilada e a produção de Hcis e Cis é interrompida (Lehninger, 2002).

Esse aminoácido atua na biossíntese proteica (por ser um aminoácido das cadeias polipeptídicas); na síntese proteica (por produzir Hcis e Cis); na formação de S-adenosilmetionina (que provê grupos metil para a síntese de epinefrina, fosfatidilcolina, creatina, nucleotídeos metilados e melatonina); na síntese da glutathione (GSH) (um substrato para desintoxicação da GSH-S-transferase e

antioxidante da GSH peroxidase); e no mecanismo antioxidante de proteínas (Urdaneta *et al.*, 2006). A Met é um dos aminoácidos oxidados com mais facilidade, seu estado oxidativo é regulado *in vivo* pela Met sulfóxido redutase (Barreiros, David e David, 2006 e Binger *et al.*, 2010).

Células de bactérias em que a Met é substituída por norleucina exibem um estresse oxidativo maior e morrem mais ligeiramente quando expostas ao hipoclorito, ao peróxido de hidrogênio ou a radiações ionizantes. Espécies reativas de oxigênio, em geral, reagem naturalmente com resíduos de Met em proteínas para formar sulfóxido de Met, por conseguinte, há a supressão de espécies reativas. Como a maioria das células tem a enzima Met sulfóxido redutase, catalisadora da redução da Met sulfóxido para Met, os resíduos de Met atuam como antioxidantes catalíticos endógenos em células (Luo e Levine, 2009).

A Met tem relações com lesões hepáticas (Soon Jr. *et al.*, 2010), patogênese de amiloidoses (Binger *et al.*, 2010 e Wong *et al.*, 2010), doença de Creutzfeldt-Jakob (enfermidade neurodegenerativa rara em humanos, que faz parte do grupo de encefalopatias espongiformes transmissíveis ou doenças de prion) (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2010), doenças autoimunes (Giuseppe *et al.*, 2010), depressão histadélica (altos níveis de histamina) (Franco, 2005), esquizofrenia (Franco, 2005 e Tuetting *et al.*, 2010), esclerose lateral amiotrófica (Ghoddoussi *et al.*, 2010), doença de Parkinson e Alzheimer (Franco, 2005).

2.3.1.1 Metionina e a doença de Alzheimer

A Met está entre os aminoácidos presentes no peptídeo A β e ocupa a posição 35 na sua sequência da estrutura primária. Ela é importante para a neurotoxicidade, com propensão para reduzir metais de transição e formar espécies reativas de oxigênio.

Pesquisas têm qualificado a A β como uma metaloproteína que se liga a íons de elementos de transição. Trabalhos citam a Met 35, localizada na região carbofílica C-terminal, como sítio de ligação. Quando a A β perde a Met sobrevém uma baixa capacidade de reduzir Cu²⁺ a Cu¹⁺, o que dificulta a ligação do metal ao peptídeo e evita assim seu acúmulo nas placas amilóides (Atwood *et al.*, 1998, Atwood *et al.*, 2000 e Huang *et al.*, 1999).

Estudos teóricos (Schoneich *et al.*, 2003) têm sugerido como intermediários cátions do peptídeo A β . Esses radicais seriam estabilizados através da formação

de ligação com átomos de oxigênio ou de nitrogênio de ligações peptídicas adjacentes. Embora, a formação de ligações enxofre-oxigênio seja cineticamente preferida, em escalas de tempo mais longas, as ligações enxofre-oxigênio convertem-se em ligações enxofre-nitrogênio, sendo esse um processo pH-dependente (Schoneich *et al.*, 2003).

Um grupo de pesquisa desenvolveu um modelo de estresse oxidativo para elucidar a neurotoxicidade do peptídeo A β baseado no resíduo de Met. A análise sugeriu associação do resíduo com a formação de fibrilas e a geração de estresse oxidativo. Isto ficou evidenciado *in vitro* depois da substituição do aminoácido pela norleucina, que não possui enxofre em sua composição (Butterfield *et al.*, 1999).

Quando o resíduo Met-35 é substituído por uma Cis, o estresse oxidativo do Alzheimer também é suavizado (Butterfield e Boyd-Kimball, 2005). Logo, a substituição da Met por outro aminoácido mitiga a ação pró-oxidante da A β , o que diminui a oxidação de proteínas e, portanto, a sua neurotoxicidade.

Entretanto, outro estudo *in vitro* que realizou a substituição da Met 35 por norleucina ou valina mostrou que a substituição influencia moderadamente a A β , porém, não causa alterações na neurotoxicidade do peptídeo, o que indica que a Met não seria tão importante para a toxicidade dele (Maiti *et al.*, 2010).

Outra pesquisa indicou o papel fundamental da Met 35 no desenvolvimento da doença de Alzheimer, visto que a reatividade de peptídeos sem a Met é muito menor e seu átomo de enxofre é capaz de ativar os sítios alquis próximos a ele, mas também os distantes (Francisco-Marquez e Galano, 2009).

Além disso, um estudo *in vivo* (Butterfield *et al.*, 2010) mostrou a necessidade da existência de um resíduo de Met individual na posição 35 do peptídeo amilóide para ocorrência de dano oxidativo. Isso evidenciou pela primeira vez o destaque da Met 35 para o estresse oxidativo no cérebro de um modelo de mamíferos. Contudo, há divergências entre as investigações. Testes (Walter *et al.*, 1997 e Varadarajan *et al.*, 2000) com ratos revelaram não haver ligação de íons metálicos pelo resíduo de Met da A β .

De um modo geral, a Met 35 do peptídeo A β é considerada, até o momento, importante para as reações redoxes que promovem o estresse oxidativo e deve contribuir para a toxicidade induzida pela A β , todavia, ainda há controvérsias.

Além da presença da Met na A β , o seu estado redox parece desempenhar um papel crucial em ações neurotóxicas do peptídeo, que induz a uma redução dependente do tempo da viabilidade celular. A A β com o resíduo Met-35 oxidado é significativamente menos danosa ao organismo, pois não eleva a expressão de genes pró-apoptóticos (Clement *et al.*, 2006). A superexpressão de tais genes induz a liberação do citocromo c da membrana interna mitocondrial e de outros fatores citossólicos que propiciam o processo apoptótico.

Quando ocorre a oxidação da Met-35 para Met sulfóxido há uma dificuldade significativa na formação das fibrilas em pH fisiológico. Ademais, a Met sulfóxido altera a morfologia característica da A β e previne a formação da protofibrila, intermediário chave na amiloidose-beta e associada à neurotoxicidade (Hou *et al.*, 2002).

Investigações (Dado e Gellman, 1993 e Naslund *et al.*, 1994) em placas amilóides mostraram existência de alta proporção de Met sulfóxido e de produtos de reações de estresse oxidativo envolvendo a Met. Exames de modelagem estrutural sugeriram que a oxidação da Met deforma significativamente a estrutura secundária da A β (Dado e Gellman, 1993 e Naslund *et al.*, 1994).

As ações neurotóxicas do peptídeo A β podem ser modificadas intensamente pelo estado redox do resíduo de Met 35 e a oxidação reversível da Met em proteínas tem função antioxidante, de modo que um decréscimo na concentração ou na atividade da Met sulfóxido redutase pode promover a doença de Alzheimer (Misiti, Clementi e Giardina, 2010).

Uma pesquisa feita com células de neuroblastoma mostrou que o estado redox da Met 35 modula a expressão e a atividade da Met sulfóxido redutase, e parece proteger as células de dano proteico oxidativo e morte celular. Em células com a Met oxidada, a atividade da Met sulfóxido redutase e os níveis de RNA mensageiro aumentam, diferentemente do que ocorre quando a Met encontra-se reduzida. Tal fato sugere variação da toxicidade dos peptídeos A β com Met-35 com a habilidade da forma oxidada de diminuir o estresse oxidativo, ao aumentar a expressão gênica e a função da Met sulfóxido redutase, o que alude uma possibilidade terapêutica da Met sulfóxido redutase na doença de Alzheimer (Misiti, Clementi e Giardina, 2010).

O metabolismo da Met ainda pode estar diretamente correlacionado a doença de Alzheimer. Camundongos com a APP mutante com elevados níveis de

ingestão de Met apresentam variadas mudanças neuroquímicas, entre elas aumento das concentrações no cérebro de Hcis, S-adenosilmetionina, A β , proteína Tau, proteína Tau-fosfatada e colesterol. Ressalta-se que tais modificações são vistas em animais alimentados com muita Met, mas não naqueles com uma dieta deficiente em vitaminas do complexo B e ácido fólico. Isto indica que a hiperhomocisteinemia deve-se principalmente a alta concentração de Met. Além disso, parece haver uma ligação entre a APP e o metabolismo da Met, o que sugere um papel para o metabolismo de Met na patogênese da doença de Alzheimer (McC Campbell *et al.*, 2011).

Como já mencionado, o peptídeo A β , comum nos cérebros acometidos por Alzheimer, possui uma Met na posição 35, na parte hidrofóbica C-terminal, que pode atuar como um dos sítios de interação para metais (Atwood *et al.*, 1998, Atwood *et al.*, 2000 e Huang *et al.*, 1999). Sabe-se que a agregação da A β é fortemente influenciada pela ligação dos peptídeos aos íons metálicos, como o alumínio, encontrados em altas concentrações nas placas amilóides (Domingo, 2006 e Drago *et al.*, 2008b), de modo que talvez haja alguma interação entre o alumínio e a Met na A β .

Somado a isso, o alumínio age como um agente pró-oxidante no córtex e no cerebelo, causando neurolipofuscinogênese e alteração do comportamento da atividade neural (Manzano-León e Mas-oliva, 2006), porém, a melatonina, antioxidante presente no organismo humano oriundo da Met, mesmo na presença de Al³⁺ consegue atuar como antioxidante (Garcia *et al.*, 2010).

2.3.2 Cisteína (Cis)

A Cis é um aminoácido sulfurado parcialmente essencial. Em situações normais condicionadas à espécie, à maturação, à dieta, ao estado nutricional e à condição patofisiológica, é sintetizado pelo próprio organismo (Waitzberg, 2004).

Ela possui diferentes vias metabólicas e importantes funções no organismo. Cita-se a síntese proteica, que auxilia no crescimento e no balanço de nitrogênio corpóreo, a síntese de proteínas ferro-enxofre, formadas a partir do enxofre reduzido e da conjugação de ácidos biliares (Lehninger, 2002) e a atuação nas funções linfocitárias como o aumento na atividade citotóxica dos linfócitos T (Waitzberg, 2004).

Tal aminoácido, assim como os demais que contêm enxofre, contribui para a manutenção e a integridade dos sistemas celulares, ao influenciar reações orgânicas redox e a capacidade celular de se descontaminar de compostos tóxicos, radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Lehninger, 2002).

Variações nos níveis de Cis e ou defeitos nas enzimas que participam na regulação do metabolismo de enxofre produzem desequilíbrio da reserva do elemento e uma diversidade de enfermidades humanas, que incluem homocisteinúria, cisteinúria, a síndrome da apneia obstrutiva do sono (Cintra *et al.*, 2011), a doença fibrótica do pulmão (Janssen-Heininger *et al.*, 2010), doenças cardiovasculares (Jones *et al.*, 2011 e Go *et al.*, 2010), defeitos no tubo neural, doença de Alzheimer, câncer (Townsend, Tew e Tapiero, 2004 e Yang *et al.*, 2013) e doença de Parkinson (Muller e Kuhn, 2009 e Mueller e Muhlack, 2012).

Inclusive, um estudo (Lin *et al.*, 2010) com mulheres acima de 45 anos, que não tinham histórico de câncer ou de doença cardiovascular, investigou a relação entre o câncer de mama e os níveis plasmáticos de Hcis e de Cis. Encontrou-se que o risco de câncer de mama não é relacionado aos níveis de Hcis, mas é aos de Cis, sobretudo quando os níveis de folato são baixos (Lin *et al.*, 2010). Isso significa que o conhecimento da concentração sanguínea de Cis pode auxiliar na previsão do risco de câncer de mama.

2.3.2.1 Cisteína e a doença de Alzheimer

Uma droga segura para a doença de Alzheimer a partir da adição de um resíduo de Cis ao peptídeo A β exibiu resultados positivos como o reforço da imunogenicidade e a redução da quantidade de depósitos de A β em animais (Matsuda, Kaminaka e Nozaki, 2009).

Além disso, os compostos antioxidantes que possuem Cis, como o S-alil-L-cisteína (SAC), componente solúvel em água presente no alho, e a N-acetil-cisteína têm efeitos protetores contra o Alzheimer.

O primeiro inibe a fibrilação da A β e desestabiliza as fibrilas A β pré-formadas, o que impede o declínio cognitivo e protege os neurônios da apoptose neuronal induzida (Gupta e Rao, 2007). Já o segundo exerce efeito protetor a partir da diminuição do estresse oxidativo e de marcadores da apoptose (Moreira *et al.*, 2007).

A N-acetil-L-cisteína é um precursor da glutathione com ações antioxidantes e, provavelmente, o seu uso prévio em pacientes com comprometimento cognitivo leve ou com doença de Alzheimer é vantajoso, pois, protege contra o estresse oxidativo endógeno mediado por doenças neurodegenerativas em comparação com um tratamento em uma idade mais avançada. A administração de N-acetil-L-cisteína *in vivo* suprime a oxidação proteica e a nitração, aumenta os níveis e a atividade da glutathione peroxidase no cérebro, eleva a atividade da glutathione redutase e protege contra a peroxidação lipídica; provavelmente, devido a propriedades, como a atividade antiinflamatória ou a ativação de vias de sinalização de proteção (Huang *et al.*, 2010).

O S-propargil-cisteína (SPRC), análogo estrutural do SAC, é um aminoácido sulfurado que tem ações cardioprotetoras. Em ratos é capaz de inibir os efeitos da deterioração cognitiva e dos danos estruturais neuronais induzidos pela A β , ao inibir a expressão do fator de necrose tumoral e de algumas proteínas no hipocampo, o que indica uma possibilidade de terapia para o Alzheimer (Gong *et al.*, 2011).

O peptídeo A β , encontrado em altas concentrações nos cérebros acometidos por Alzheimer, induz a citotoxicidade no fator de crescimento neural, diminui a viabilidade celular e o potencial da membrana mitocondrial, aumenta a atividade da lactato desidrogenase e a fragmentação do DNA, reduz a atividade da Na,K-ATPase, eleva as atividades da caspase-3 e caspase-8 – envolvidas com a apoptose celular –, majora a produção de proteínas e a expressão de RNA mensageiro para interleucinas (IL-1 β e IL-6) e para o fator de necrose tumoral (TNF). O S-etil-cisteína e o S-propil-cisteína, compostos sulfurados hidrofílicos formados naturalmente em plantas *Allium* como alho e cebola, também agem como agentes antioxidantes e anti-inflamatórios, e são capazes de impedir ou atenuar a citotoxicidade e o estresse oxidativo que ocorre em doenças neurodegenerativas como o Parkinson e o Alzheimer (Tsai *et al.*, 2010).

No Alzheimer, tais compostos aliviam o estresse anti-inflamatório e a apoptose provocada pela A β , o que resulta em um aumento na sobrevivência celular. O pré-tratamento em culturas de células neuronais com o S-etil-cisteína ou o S-propil-cisteína revelou que eles aumentam a viabilidade celular e o potencial da membrana mitocondrial, reduzem a atividade da lactato desidrogenase e a fragmentação do DNA, atenuam os efeitos da A β nas atividades

da Na,K-ATPase, da caspase-3 e da caspase-8, suprimem a expressão de RNA mensageiro e diminuem a produção de citocinas, logo são agentes neuroprotetores vigorosos contra a doença de Alzheimer (Tsai *et al.*, 2010).

Ademais, uma pesquisa mostrou que um heptapeptídeo cíclico com Cis se liga com alta afinidade a A β , sendo homólogo ao domínio extracelular rico em Cis de muitas proteínas da família Frizzled, que atuam como receptores transmembrana e são relacionadas ao desenvolvimento embrionário, à polaridade celular, à formação de sinapses neurais, entre outros processos. A ligação que ocorre entre as Frizzled no domínio rico em Cis e a A β poderia instigar a neurotoxicidade. Assim, o homólogo heptapeptídeo cíclico com Cis faria o bloqueio da interação, pois substituiria as proteínas Frizzled na ligação, o que poderia ter fim terapêutico, afinal não ocorreria mais a inibição da sinalização dos receptores envolvidos em processos fisiológicos (Magdesian *et al.*, 2008).

No mal de Alzheimer, o Al³⁺ aumenta a atividade da acetilcolinesterase, porém, em estudo com ratos tratados com alumínio e pela administração crônica de N-acetilcisteína incide a melhora da retenção de memória e a atenuação do dano oxidativo e da atividade da acetilcolinesterase, o que mostra o efeito neuroprotetor da N-acetilcisteína em doenças degenerativas (Prakash e Kumar, 2009), apesar da presença do Al³⁺. Logo, outros derivados da Cis, como o S-propargil-cisteína, o S-etil-cisteína e o S-propil-cisteína, também devem manter suas atividades neuroprotetoras, mesmo com altas concentrações cerebrais de Al³⁺, o que é comum no Alzheimer.

2.3.3 Homocisteína (Hcis)

A Hcis é um derivado da Met necessário para manter a homeostase dos compostos sulfurados no organismo. Ela tem efeito pró-inflamatório e promove o estresse oxidativo (Mishra *et al.*, 2010). Níveis de Hcis elevados no plasma ou no soro são frequentemente originados por deficiências de enzimas cofadoras vitamina B₁₂ e doador de metil folato (Kivipelto *et al.*, 2009).

Níveis altos desse aminoácido liga-se a fatores genéticos, ao estilo de vida, a menopausa e ao envelhecimento (Lehninger, 2002 e Kivipelto *et al.*, 2009). A Hcis celular, se em excesso, pode escapar para a circulação, e representar um fator de risco para doença aterosclerótica, doença coronária, acidente vascular cerebral, doença vascular periférica, trombose venosa, embolia pulmonar, insuficiência

renal, além de prever a mortalidade em seres humanos (Sachdev, 2005, Babiloni *et al.*, 2007, Kim, Cho e Kwon, 2008 e Nilsson, Gustafson e Hultberg, 2009). O total de Hcis plasmática também é um fator de risco para lesões na substância branca, doenças cerebrovasculares, demência vascular e atrofia cerebral (Risselada *et al.*, 2009, Firbank *et al.*, 2010 e Smith *et al.*, 2010). Somado a isso, o aumento da quantidade plasmática de Hcis agrava a cardiomiopatia diabética (Mishra *et al.*, 2010), colabora para a patogênese da síndrome dos ovários policísticos (Temel *et al.*, 2010) e a neuropatologia da psicose (Kale *et al.*, 2010), além de ser relacionado a esquizofrenia (Garcia-Miss *et al.*, 2010).

Estudos clínicos evidenciaram também a possibilidade de altos níveis plasmáticos de Hcis aumentarem, além do risco dessas enfermidades, o de doenças neurodegenerativas, todavia, o efeito da Hcis em neurônios e o mecanismo celular de indução da neurodegeneração ainda são ignotos (Sachdev, 2005, Babiloni *et al.*, 2007, Kim, Cho e Kwon, 2008 e Nilsson, Gustafson e Hultberg, 2009).

Inclusive, pacientes com demência podem possuir distúrbios comportamentais ligados à depressão, especialmente os com demência moderada a grave. A depressão maior e os distúrbios comportamentais em pacientes com Alzheimer estão associados à progressão da doença e a altos níveis de Hcis no plasma. Conforme os níveis de Hcis se elevam, aumenta-se a sintomatologia dos distúrbios comportamentais (Chen *et al.*, 2010).

Uma pesquisa feita com pacientes acometidos por esclerose lateral amiotrófica, paralisia supranuclear progressiva ou doença de Parkinson mostrou que os níveis de Hcis e de metilmalonato não diferem significativamente entre tais doenças neurodegenerativas. Isso sugere que a Hcis e o metilmalonato podem ser liberados em consequência da neurodegeneração, independentemente da causa subjacente, ou que eles podem estar associados às patogêneses das doenças, já que níveis elevados de Hcis e de metilmalonato são neurotóxicos. De qualquer forma, tanto a Hcis quanto o metilmalonato servem como marcadores do processo degenerativo (Levin *et al.*, 2010). A neurotoxicidade da Hcis envolve eventos glutamatérgicos e oxidativos (Loureiro *et al.*, 2010).

A administração aguda de Hcis promove a elevação dos parâmetros inflamatórios, pois ocasiona a ativação imune pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), de quimiocina (MCP-1) e dos níveis de

nitrito no hipocampo, no córtex cerebral e no soro, além de aumentar o número relativo de neutrófilos e monócitos no sangue. Isso indica que a inflamação liga-se as disfunções neuronais e cardiovasculares de pacientes com concentrações altas de Hcis (Cunha, Ferreira e Wyse, 2010).

2.3.3.1 Homocisteína e a doença de Alzheimer

Níveis elevados de Hcis majoram o risco da doença de Alzheimer, pois, ela compromete os neurônios pela indução de apoptose, fragmentação do DNA e hiperfosforilação da Tau (Ho *et al.*, 2010 e Suszynska *et al.*, 2010). Enfermos com grandes quantidades de Hcis parecem apresentar duas vezes mais risco de desenvolver Alzheimer do que pessoas com níveis baixos, ao se considerar a exclusão dos fatores de risco (Kivipelto *et al.*, 2009 e Annerbo, Kivipelto e Lokk, 2009).

O distúrbio no metabolismo de Hcis é um fator de risco para a doença de Alzheimer e pode contribuir para a sua fisiopatologia, por meio da acumulação de A β e ou de Tau fosforilada. Uma pesquisa mostrou que os níveis de A β -42 não são relacionados às concentrações no líquido cefalorraquidiano de Hcis, de S-adenosilmetionina, de S-adenosil-homocisteína ou de 5-metiltetraidrofolato nem no Alzheimer, nem em indivíduos saudáveis, o que indica conexão entre a alteração do metabolismo de Hcis e a acumulação de Tau fosforilada (Popp *et al.*, 2009).

Um estudo demonstrou que a concentração de Hcis aumenta de 15,93 nmol.L⁻¹ em pacientes sem desvios cognitivos para 18,78 nmol.L⁻¹ em pacientes acometidos pelo Alzheimer. O nível plasmático de Hcis aumentaria com a severidade da demência enquanto o de vitamina B₁₂ diminuiria (Siuda, Targosz e Opala, 2009).

Numa pesquisa observou-se que quando ocorre conversão de pessoas saudáveis em acometidas com Alzheimer há um elevado aumento de Hcis se comparado à conversão de pessoas saudáveis em acometidas com transtorno cognitivo leve. Logo, um maior acúmulo de metabólitos tóxicos tais como a Hcis, pode favorecer o desenvolvimento da doença de Alzheimer (Blasko *et al.*, 2008).

Há indícios que apontam a ligação da Hcis ao aumento do estresse oxidativo, a danos ao DNA, ao desencadeamento de apoptose e a excitotoxicidade – mecanismos essenciais da neurodegeneração–. Estudiosos têm investigado se a

redução das concentrações de Hcis poderia reduzir a incidência de Alzheimer e os resultados revelaram-se positivos (Morris, 2003, Dwyer *et al.*, 2004 e Sachdev, 2005).

Embora os altos níveis totais de Hcis nos pacientes com Alzheimer estejam ligados à sua incidência, esses não mostraram relação significativa com a severidade da doença (Talebi *et al.*, 2008). De modo que alguns trabalhos apontam que ela participa apenas no desenvolvimento do Alzheimer e não em sua progressão clínica.

Entretanto, indivíduos com a doença de Alzheimer ou com a demência vascular possuem níveis plasmáticos de Hcis basal e pós-carga de Met altos se comparados a indivíduos saudáveis, o que confirma a contribuição de uma quantidade cronicamente elevada de Hcis para a degeneração neuronal em pacientes com demência (Kivipelto *et al.*, 2009 e Villa *et al.*, 2009). A alta concentração de Hcis na doença de Alzheimer pode relacionar-se a injúria da função endotelial, apesar da ausência de lesões cerebrovasculares (Piazza *et al.*, 2012).

Comumente, em pacientes com Alzheimer, ocorre uma elevação no nível de Hcis desde o início da doença, possivelmente relacionada à sua patogênese por meio dos mecanismos de ativação do receptor NMDA, de influxo de cálcio, de produção de espécies reativas de oxigênio, de danos ao DNA e de apoptose. Ademais, as mudanças nos níveis de Hcis estão ligadas ao estresse oxidativo e a depleção de glutathiona (Morillas-Ruiz *et al.*, 2010 e Sinha *et al.*, 2010).

Concentrações altas de Hcis, mas dentro da faixa normal entre os idosos relacionam-se intensamente a taxa de declínio cognitivo global em pacientes com doença de Alzheimer. Inclusive a quantidade de Hcis plasmática total no início da doença ajuda a prever a taxa de declínio cognitivo. De modo que quanto maior a concentração de Hcis, mais rápido é o declínio. A concentração de Hcis pode com facilidade ser diminuída pelo tratamento com vitamina B, entretanto, não há comprovações que tal terapêutica atenuar a taxa de declínio cognitivo em pacientes com Alzheimer (Oulhaj *et al.*, 2010).

O íon alumínio promove a fosforilação da proteína Tau, o que induz a formação e o crescimento do emaranhado neurofibrilar (Ferreira *et al.*, 2008 e Walton, 2010), característico da doença de Alzheimer. Inclusive, nas células piramidais do hipocampo dos pacientes acometidos com a doença, há reservas

citoplasmáticas de agregados de complexos formados entre o alumínio e a Tau hiperfosforilada (Walton, 2010).

No Alzheimer, altos níveis de Hcis afetam os neurônios pela indução de apoptose, fragmentação de DNA e hiperfosforilação da Tau (Ho *et al.*, 2010 e Suszynska *et al.*, 2010) e a alteração do metabolismo de Hcis na doença deve estar atrelada a uma acumulação de Tau fosforilada (Popp *et al.*, 2009).

Sendo assim, o alumínio(III) pode originar a fosforilação anormal da proteína Tau, ligada a altos níveis de Hcis, um fator de risco para a doença de Alzheimer.

2.3.4 Penicilamina (Pen)

A Pen é um aminoácido sintético produzido através de hidrólise pela degradação da penicilina. Não é considerado um antibiótico, mas sim um fármaco da classe das penicilinas (Aronson, 2006).

A forma utilizada para os tratamentos medicamentosos é a dextrógira purificada. Evita-se até a mistura racêmica, pois a forma levógira é considerada tóxica e antagonista da piridoxina, importante coenzima para o metabolismo humano (Aronson, 2006).

A absorção da D-Pen pode ser dificultada por antiácidos ou pela alimentação, por isso, geralmente, é ingerida, no mínimo, 2 horas após uma refeição. O aminoácido possui algumas características como solubilidade, estrutura química e tamanho que o tornam uma droga útil. Quando combinado a metais forma complexos menos tóxicos ao organismo, e a formação de pontes dissulfeto permite configurá-los com uma boa solubilidade (Aronson, 2006).

A Pen é metabolizada no fígado e boa parte é eliminada na urina ou nas fezes sob a forma de dissulfetos de baixo peso molecular e de S-metil-penicilamina. Contudo, uma porção forma sulfóxidos ou complexos estáveis de alta meia-vida com a albumina. Há assim a bioacumulação vagarosa à medida que a Pen é utilizada (Aronson, 2006).

A forma enantiomérica D-Pen é largamente usada no tratamento de artrite reumatóide, doença de Wilson, cisteinúria e intoxicação por metais como chumbo, cádmio, mercúrio ou ouro (Aronson, 2006). O uso medicamentoso na doença de Wilson é o mais conhecido.

A doença de Wilson é uma degeneração hepatolenticular, promovida por um gene autossômico recessivo, em que há o distúrbio no metabolismo de cobre caracterizado pelo prejuízo na síntese ou na função da ceruloplasmina, a qual se liga ao metal e o transporta pelo organismo. Desta forma, os níveis séricos e a excreção urinária de cobre encontram-se aumentados. As principais características da enfermidade são as manifestações neurológicas, os anéis de Kayser-Fleischer nos olhos e a hepatite crônica. O tratamento baseia-se na redução da ingestão dietética do cobre e no uso de agentes quelantes, como a D-Pen, que mobilizam o cobre ao formar complexos excretados pela urina (Brewer e Yuzbasiyangurkan, 1992, Shils *et al.*, 2003, Fujiwara *et al.*, 2006 e Medici, Rossaro e Sturniolo, 2007).

Na ressonância magnética nuclear por imagem (RMI) do cérebro dos pacientes acometidos pela enfermidade, pode-se observar no mesencéfalo a formação de uma imagem semelhante à face de um urso, como nota-se na Figura 2.8, por isso, muitas vezes a chamam de doença da “face de panda gigante”.

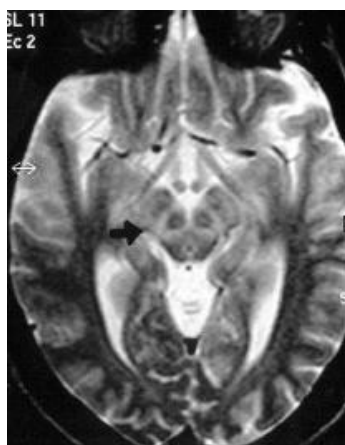


Figura 2.8 - RMI do cérebro de um paciente com Doença de Wilson (Reproduzida com permissão de Brito *et al.*, 2005).

A D-Pen também é uma droga citotóxica para as células cancerosas. Ela gera doses dependentes de espécies reativas de oxigênio através da oxidação catalisada pelo cobre, o que aumenta os níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio. A Pen e a N-acetil-cisteína podem promover a apoptose em diversos tipos de células cancerígenas humanas, no entanto, o mecanismo molecular ainda é desconhecido, embora a apoptose induzida pareça ser mediada pelo estresse do retículo endoplasmático, organela celular associada à desintoxicação (Guan *et al.*, 2010 e Wadhwa e Mumper, 2010).

Um dos fatores de risco de destaque para os cânceres bucal, do trato aerodigestivo e do pulmão é a fumaça do cigarro. Análises *in vitro* com câncer de pulmão e bucal mostraram que a D-Pen é um forte agente protetor contra a fumaça do cigarro, tanto na ausência quanto na presença de saliva. Logo em uma condição altamente pró-oxidante, ela apresenta capacidade anti-inflamatória. A D-Pen também protege contra um aumento de carbonilas, que representa a oxidação de proteínas (Nagler *et al.*, 2010).

Além disso, este aminotiol é antiangiogênico, diminui a permeabilidade vascular e ainda inibe a proliferação de células endoteliais humanas e o fator de crescimento endotelial celular (Wadhwa e Mumper, 2010).

Entre os pacientes que utilizam a D-Pen, aproximadamente 30% têm reações de hipersensibilidade no primeiro mês de tratamento, como febre, erupção cutânea e linfadenopatia. Porém, há ainda a possibilidade de efeitos secundários que envolvem a pele, as articulações (artropatia), o sistema imunológico e a depressão da medula óssea (Sternlieb, 2000 e Fujiwara *et al.*, 2006).

Estudo com ratos revelou que a Pen pode ligar-se covalentemente com grupos aldeídos para formar irreversivelmente o anel tiazolidina, como se observa na Figura 2.9. Isso propiciaria à ativação de macrófagos rapidamente, o que acontece antes da reação imune.

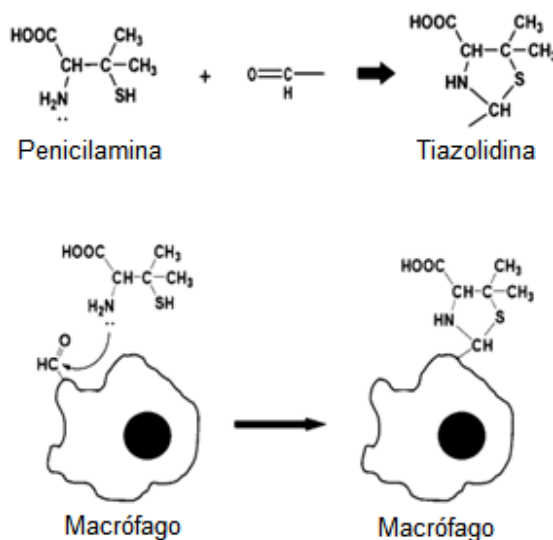


Figura 2.9 - Formação da tiazolidina na superfície de macrófagos por meio da ligação da Pen a um aldeído (Reproduzida com permissão de Li, Mannargudi e Uetrecht, 2009).

A ativação pode ocasionar a autoimunidade, já que os macrófagos participam da iniciação da resposta imune. Independentemente da concentração da

Pen, essa reage tanto com macrófagos quanto com outras células do baço, mas preferem às primeiras. Destaca-se que a reação irreversível entre o aldeído de moléculas sinalizadoras macrófagos e a Pen pode ser um dos fatores da fase inicial da patogênese da reação adversa mediada pela imunidade provocada pela Pen (Li, Mannargudi e Uetrecht, 2009 e Li e Uetrecht, 2009). Percebe-se também ela eleva a produção de citocinas, como o TNF e as IL, associadas à ativação dos macrófagos (Li e Uetrecht, 2009).



Figura 2.10 - Pescoço de um homem de 26 anos com doença de Wilson tratado com Pen, que apresentou uma das reações adversas do medicamento, as pápulas de Brown (Reproduzida com permissão de Khatu *et al.*, 2011).

A D-Pen também pode causar, após longo tempo de uso, dermatoses degenerativas como equimoses, linfangiectasia e elastose perfurante serpiginosa. A última nem sempre se manifesta clinicamente. Quando ela é induzida pela Pen, exibe alterações histopatológicas distintas das fibras elásticas da derme, observada na Figura 2.10 (Khatu *et al.*, 2011).

Como já citado, a mistura racêmica e a forma levógira inibem as enzimas dependentes de piridoxina, pois causam sua deficiência, e são, portanto, neurotóxicas (Aronson, 2006). A forma dextrógira é fracamente neurotóxica. Em alguns casos, pode provocar polineuropatia ou reações alérgicas. Muito raramente, ocasiona neuropatia óptica e polirradiculoneurite aguda ou síndrome de Guillain-Barré. Pacientes que já possuam algum problema neurológico nos quais se inicie o tratamento com a D-Pen podem sofrer piora na sintomatologia e até a morte (Aronson, 2006).

Não se sabe se o acometimento no sistema nervoso é causado pela capacidade da Pen de sequestrar metais, o que poderia acarretar uma mudança nos níveis de elementos necessários ao cérebro ou se é devido a outras propriedades, como a doação de grupos sulfridril (Aronson, 2006).

2.3.4.1 Penicilamina e a doença de Alzheimer

Com o envelhecimento e em diversas doenças neurodegenerativas, há o acúmulo de íons metálicos no cérebro. No Alzheimer, esses se acumulam e depositam-se com o peptídeo A β .

O efeito de quelação da D-Pen sobre o cobre na doença de Wilson pode ser aproveitado nos pacientes com doença de Alzheimer, porque a partir da formação de complexos, ela seria capaz de reduzir o estresse oxidativo.

Uma pesquisa realizou o tratamento com a droga e notou que antes de usá-la, o total de peróxidos e o conteúdo de cobre nos pacientes com Alzheimer eram altos enquanto os níveis de antioxidantes eram baixos. Após seu uso, houve redução do estresse oxidativo, contudo, não foi observada diferença no declínio cognitivo (Squitti *et al.*, 2002).

Logo, acredita-se que há a formação de quelatos com o íon cobre, o que deixa uma menor quantidade de cobre livre, hábil a participar de reações com as espécies reativas de oxigênio.

Assim, a interação da Pen com os íons metálicos tem sido estudada, a fim de se desenvolver uma droga segura para alterar a progressão da doença. A estratégia de redução de íons metálicos no cérebro através da administração de quelantes é promissora (Cherny *et al.*, 2000 e Rossi *et al.*, 2002).

Estudo mostrou que sistemas de nanopartículas com quelantes conjugados podem atravessar a barreira hematoencefálica. Por isso, investigações acerca da precipitação de íons metálicos com os sistemas de nanopartículas no lugar de peptídeos A β vêm sendo realizadas (Cui *et al.*, 2005).

O alumínio tem uma alta concentração no tecido cerebral de pessoas que sofrem de certas doenças degenerativas, como o Alzheimer (Perl, 1988). O conteúdo aumentado em cérebros maduros pode ser devido à exposição maior com a idade ou a habilidade diminuída de remoção (Tripathi *et al.*, 2009).

Como a Pen pode interagir com íons metálicos, ao capturá-los e eliminá-los em formas menos tóxicas ao organismo, cabe-se destacar a possibilidade da droga atuar na diminuição da concentração do alumínio no Alzheimer por meio da formação de quelatos (Cherny *et al.*, 2000 e Rossi *et al.*, 2002) ou de sistemas de nanopartículas com quelantes conjugados (Cui *et al.*, 2005).