

Yara Bou-Hamdan Azziz

## O papel do cobre, ferro e zinco na doença de Parkinson

Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde  
Porto, 2011



O papel do cobre, ferro e zinco na doença de Parkinson

Yara Bou-Hamdan Azziz

O papel do cobre, ferro e zinco na doença de Parkinson

Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde  
Porto, 2011

O papel do cobre, ferro e zinco na doença de Parkinson

Yara Bou – Hamdan Azziz

O papel do cobre, ferro e zinco na doença de Parkinson

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos  
para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

## Sumário

A doença de Parkinson é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, descrita primeiramente em 1817 pelo médico inglês James Parkinson. É um distúrbio crónico e progressivo do sistema nervoso central. Os principais sintomas da doença de Parkinson são tremor em repouso, bradicinésia, rigidez muscular e instabilidade postural. É uma doença multifactorial que é provocada pela destruição dos neurónios dopaminérgicos e pela presença de corpos de Lewy na substância negra. Esta patologia não tem cura e afecta com maior frequência homens do que as mulheres.

A etiologia da doença de Parkinson encontra-se, em parte, por desvendar. Estudos sugerem que o seu aparecimento pode ser devido à ocorrência de múltiplos factores que parecem estar associados a causas ambientais (exposição a substâncias tóxicas) e genéticas, produção aumentada de radicais livres, anormalidades mitocondriais, predisposição genética e envelhecimento cerebral.

O cobre, o ferro e o zinco são oligoelementos essenciais, responsáveis pela função de muitas enzimas e proteínas celulares; contudo esses mesmos elementos tornam-se tóxicos quando ocorre um desequilíbrio na sua homeostase, proporcionando desordens neurodegenerativas como a doença de Parkinson.

O tratamento medicamentoso na doença de Parkinson visa o controlo dos sintomas. A necessidade de eliminação desses metais (tóxicos ou essenciais) em excesso no organismo pode ser feita através de uma terapia de quelatação em doenças neurodegenerativas, usando agentes quelantes específicos para cada metal.

## **Abstract**

Parkinson's disease is considered the second most common disease neurodegenerative in the world, it was described in 1817 by James Parkinson. It is a chronic and progressive disorder of the central nervous system. The main symptoms of Parkinson's disease are rest tremor, bradykinesia, muscular rigidity and postural instability. It is a multifactorial disease that is caused by destruction of dopaminergic neurons and the presence of Lewy bodies in the substantia nigra. This disease has no cure and affects men more frequently than women

The etiology of Parkinson's disease is, in part, Unknown. Studies suggest that their appearance may be due to the occurrence of multiple factors that appear to be linked to environmental causes (exposure to toxic substances) and genetic, increased production of free radicals, mitochondrial abnormalities, genetic predisposition and aging brain.

Copper, iron and zinc are essential trace elements, responsible for the function of many enzymes and cellular proteins, yet these same elements become toxic when is an imbalance in homeostasis, providing neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease.

Drug treatment in Parkinson's diseases aims to control symptoms. The need to eliminate these metals (toxic or essential) in excess in the body can be made through a chelation therapy in neurodegenerative disease, using agents specific for each metal.

## Agradecimentos

Depois destes cinco anos de trabalho árduo estou a um triz de apresentar a minha tese de final de curso, se Deus quiser, e começar uma nova fase na minha vida.

Agradeço às pessoas mais importantes na minha vida que sem eles nada seria possível e concretizável.

**Mãe:** Teus braços sempre se abrem quando preciso um abraço. Teu coração sabe compreender quando preciso uma amiga. Teus olhos sensíveis se endurecem quando preciso uma lição. Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas que precisava para voar. És a melhor mãe do mundo

**Pai:** Quando nasci meu pai era simplesmente alguém a quem o dizia a palavra PAI mas Agora que sou adulta, é a pessoa quem sem ele não poderia jamais viver. Debaixo deste teu olhar azul duro está a pessoa mais tornurento no mundo.

**Linda:** Um amor bem verdadeiro que se estime como irmã, que se venere como mãe, que se proteja como filha. Linda, minha querida irmã, as saudades vão ser muitas e a distância também. Gostaria poder aproximar a tua realidade da minha.

**Sara:** Se nada existisse.....Se tudo fosse, de qualquer modo, absolutamente coisa nenhuma? Nada seria o mesmo.....Gosto muito de ti

**Mouhamed:** és um silêncio impenetrável.... mas és um PORTO onde passo as minhas tempestades porque sei que quando preciso de ti tu estás sempre a meu lado.

**A ti.....**If you add up all the stars of heaven, every grain of sand on the seashore, all roses in the world and all the smiles that have already been given in history, will begin to get an idea of how much i love u .....(Se somar todas as estrelas do céu, todos os grãos de areia da praia, todas as rosas do mundo e todos os sorrisos que já foram dados na história, começarás a ter uma idéia do quanto que te quero)

E por fim mas não por último agradeço muito à minha orientadora, a professora Fernanda Leal que sem a sua disponibilidade e o seu apoio não conseguiria apresentar este meu trabalho final...obrigada pela paciência e compreensão que teve comigo.

Obrigada também a minha co-orientadora, a professora Rita Catarino pela atenção que me deu.

A todos os meus amigos que de uma maneira ou outra marcaram esta fase da minha vida e que continuarão a marcar uns mais que outros.

**OBRIGADA!**

# Índice

<b>I.</b>	<b>Introdução</b>	<b>16</b>
<b>II.</b>	<b>A doença de Parkinson</b>	<b>20</b>
	2.1. A doença de Parkinson e o seu diagnóstico	20
	2.1.1. Histopatologia	21
	2.2. Mecanismos neurodegenerativos	22
	2.2.1. Disfunção mitocondrial	22
	2.2.2. Stress oxidativo - geração de radicais livres	24
	2.3. Susceptibilidade genética	30
	2.4. Inibição do sistema proteossomal da ubiquitina	33
<b>III.</b>	<b>Cobre na doença de Parkinson</b>	<b>37</b>
	3.1. Funções biológicas do cobre	37
	3.1.1. Ceruloplasmina	38
	3.1.2. Superóxido dismutase (SOD)	39
	3.1.3. Metalotioneínas (MTs)	40
	3.2. Homeostase do cobre	41
	3.3. Mecanismo neurodegenerativo do cobre	43
<b>IV.</b>	<b>Ferro na doença de Parkinson</b>	<b>46</b>
	4.1. Homeostase do ferro	46
	4.2. Mecanismo neurodegenerativo do ferro	50
<b>V.</b>	<b>Zinco na doença de Parkinson</b>	<b>53</b>
	5.1. Homeostase do zinco	53
	5.2. Mecanismo neurodegenerativo do zinco	55

<b>VI.</b>	<b>Abordagem terapêutica da doença de Parkinson</b>	<b>57</b>
	6.1. Dopaminomiméticos: Levedopa (L-dopa)	57
	6.2. Agonistas dopaminérgicos	58
	6.3. Anticolinérgicos	59
	6.4. Inibidores selectivos da MAO	59
	6.5. Inibidores da COMT	60
	6.6. Amantadina	60
	6.7. Quelantes de metais	60
<b>VII.</b>	<b>Conclusão</b>	<b>64</b>
<b>VIII.</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>66</b>

## Índice de Figuras

- Figura 1.** Corte cerebral da principal região de controlo dos movimentos voluntários: substância negra, em cérebro normal e de pacientes com DP\_\_\_\_\_ 21
- Figura 2.** Um corpo de Lewy (CL) no citoplasma de um neurónio dopaminérgico pigmentado na substância negra\_\_\_\_\_ 22
- Figura 3.** Reacção de Fenton: decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dependente do ferro, com a produção de radicais hidroxilo reactivos\_\_\_\_\_ 24
- Figura 4.** Perpetuação da formação de radicais hidroxilo pela reacção de Fenton na presença de excesso de superóxido\_\_\_\_\_ 25
- Figura 5.** Mecanismo de morte neuronal na DP\_\_\_\_\_ 31
- Figura 6.** Formação dos corpos de Lewy (CL). Na presença de vesículas intracitoplasmáticas de lipídios, a  $\alpha$ -sinucleína assume a estrutura helicoidal alfa, e em grandes concentrações vesiculares, a forma beta de fibrilas amilóides\_\_\_\_\_ 32
- Figura 7.** Passos enzimáticos principais da via proteolítica dependente de ubiquitina/proteoassoma. E1 – enzima activador de ubiquitina, E2 – enzima conjugador de ubiquitina, E3 – ligase de ubiquitina–proteína, Ub – ubiquitina ou grupo ubiquitil\_34
- Figura 8.** Sítios para ligação com metais presentes na metalotioneína (MT). Os círculos denotam íons metálicos divalentes (ex. Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>)  
\_\_\_\_\_ 40
- Figura 9.** Esquema das vias de transporte do cobre(I) em mamíferos  
\_\_\_\_\_ 42
- Figura 10.** Representação dos domínios da PPA\_\_\_\_\_ 44

**Figura 11.** O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: ferroredutase; DMT-1: transportador de metal divalente- 1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor da transferrina\_\_\_\_\_48

**Figura 12.** Internalização do ferro na mitocôndria e a regulação exercida pela frataxina na síntese do heme e dos “clusters” Fe-S. A conversão do ferro férrico em ferroso é importante para que a ferroquelatase reconheça o ferro e o incorpore no anel pirrólico para formar o heme\_\_\_\_\_49

**Figura 13.** Transporte sináptico do zinco\_\_\_\_\_55

**Figura 14.** Síntese de dopamina a partir da L-dopa\_\_\_\_\_43

**Figura 15.** Estrutura da desferrioxamina\_\_\_\_\_61

**Figura 16.** Estrutura do M30\_\_\_\_\_62

**Figura 17.** Estrutura do VK-28\_\_\_\_\_62

**Figura 18.** Estrutura do clioquinol\_\_\_\_\_63

## Índice de tabelas

**Tabela 1.** Exemplo de enzimas e outras proteínas cobre-dependentes \_\_\_\_\_ 37

## Lista de abreviaturas

6-OHDA	6- Hidroxidopamina
3-OMD	3-O-metildopa
AMPA	Ácido 2-amino-3- (5-metil-3-oxo-1,2- oxazol-4-yl) propiónico
ATP	Adenosina trifosfato
BH	Barreira hemato-liquórica
BHE	Barreira hemato-encefálica
CAT	Catalase
CL	Corpos de Lewy
Clioquinol	5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina
COMT	Catecol-O-aminoTransferase
CoQ	Coenzima
CTR1	Transportador de cobre
DCytb	Citocromo-b duodenal
DMT-1	Proteína transportadora de metais divalentes
DAT	Transportador de dopamina (do inglês <i>dopamine transporter</i> )
DP	Doença de Parkinson
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies Reactivas de Oxigénio
FADH <sub>2</sub>	Flavina adenina dinucleótido
FPN	Ferroportina
FTL	Cadeias leves da ferritina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPX	Glutaciona peroxidase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
HCP-1	Proteína transportadora do heme-1
Heph	Hefaestina
HFE	Proteína da hemocromatose
HNE	4-Hidroxinonenal
HVA	Ácido homovelínico

IRE	Elementos reguladores de ferro
IRP	Proteínas reguladoras de ferro
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade (do inglês <i>Low-density lipoprotein</i> )
M30	5-(N-metil-N-propargylaminometil)-8-hidroxiquinolina
MAO	Monoamina oxidase
MDA	Malondialdeído
MPTP	Metil-fenil-tetrahidropiridina
MTs	Metalotioneínas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NMDA	N-metil- D-aspartato
OH	Hidroxilo
PARP	Poli-ADP-ribose polimerase
PPA	Precursor da proteína amilóide
PET	Tomografia por emissão de positrão (do inglês <i>Positron emission tomography</i> )
SH	Grupos tiol
SOD	Superóxido dismutase
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (do inglês <i>Single photon emission computerised tomography</i> )
STEAP3	Sexto antígeno epitelial transmembranar da próstata 3 (do inglês <i>Six transmembrane epithelial antigen of prostate 3</i> )
Tf	Transferrina
TfR1	Receptor transferrina 1
Hidrolase L1	Ubiquitina Carboxiterminal (UCH-L1),
VK28	5-[4-(2-hidroxietil) piperazina-1-metil]-quinolina-8-ol
Vitamina A	Beta caroteno
Vitamina C	Ácido ascórbico
Vitamina E	Alfa tocoferol

## **I. Introdução**

A doença de Parkinson (DP) é descrita pela primeira vez no início do século XIX, em 1817, pelo médico britânico James Parkinson como “paralisia agitante” em “An Essay on the Shaking Palsy” (Parkinson, 1817). É um distúrbio neurológico do movimento, lentamente progressivo e de evolução longa e prolongada, que mais adiante leva à incapacidade (Teive, 2005).

Segundo Nakabayashi et al. (2008), a DP é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo. Afecta com maior frequência homens do que mulheres, numa proporção de 3 para 2, e quase 1 % da população acima de 60 anos de idade. Em geral os sintomas começam a aparecer na quinta década de vida. No entanto, já foram diagnosticados casos aos trinta anos de idade (Chwiej, 2010).

É uma doença multifactorial (Elbaz e Tranchant, 2007), cujo aparecimento se encontra associado a diferentes causas, nomeadamente, alterações bioquímicas, factores ambientais e factores genéticos, incluindo aterosclerose, infecções virais, traumatismo craniano e uso crónico de medicamentos antipsicóticos (Lana et al., 2010).

As complicações associadas normalmente à DP são traumatismos provocados por quedas, broncoaspiração de alimento devida a disfunção dos movimentos involuntários, infecções do tracto urinário e lesões da pele provocados pela progressiva redução da mobilidade (Schapira, 2009).

O diagnóstico baseia-se principalmente nos aspectos semiológicos com destaque para a apresentação da síndrome extrapiramidal (característica da doença), marcada por tremor de repouso, rigidez, perda do reflexo postural e bradicinésia (Wientraub, Comella e Horn, 2008). A marcha característica consta de pequenos passos com velocidade crescente e também denuncia a presença do distúrbio. Acredita-se que em média deva existir acima de 60 % de perda neuronal para que surjam esses sinais da doença (Teive, 2005). Alterações da mímica facial, do humor, da caligrafia e da voz são também marcos significativos da doença (Moreira, 2007).

A DP caracteriza-se pela presença de disfunção monoaminoérgica múltipla, incluindo o deficit de sistemas dopaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos (Teive, 2005). É uma desordem cerebral que é caracterizada pela neurodegeneração específica da substância negra acompanhada pela diminuição significativa de dopamina em todos os componentes dos gânglios basais, e pela presença de corpos de Lewy (CL), inclusões citoplasmáticas compostas por uma variedade de proteínas como  $\alpha$ -sinucleína, parkina e ubiquitina (Togo et al., 2001).

Na actualidade a presença de deficiência dopaminérgica a nível estriatal nos pacientes com DP, observa-se através da utilização de exames de neuroimagem, como a tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *positron emission tomography*) e tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT, do inglês *Single Photon Emission Computerised Tomography*) (Teive, 2005).

Na DP 90% dos casos são esporádicos e sem etiologia conhecida (Wientraub, Comella e Horn, 2008). No entanto, existem alguns processos que levam à atrofia e morte dos neurónios dopaminérgicos do sistema nervoso. Os mais citados são o stress oxidativo, a excitotoxicidade, a disfunção mitocondrial e a agregação proteica. Em todos estes processos os metais desempenham um papel importante (Chwiej, 2010).

O stress oxidativo é considerado um dos muitos mecanismos que contribuem para o envelhecimento cerebral. O dano oxidativo de macromoléculas aumenta com a idade, levando a um declínio progressivo da função das células e tecidos. Além disso, os radicais livres podem promover a lipoperoxidação, ou seja, a oxidação de lipoprotéínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoprotein*), reagir com proteínas levando à sua inactivação e consequente alteração da sua função, entre outros efeitos (Ferrer et al., 2010).

Na DP verifica-se uma diminuição de actividade do complexo mitocondrial I, actividade subnormal do complexo proteossomal e agregação proteica anormal (Schapira, 2009). A mitocondria é um dos grandes sistemas alvo no processo de envelhecimento pelo stress oxidativo. A deposição de agregados proteicos provoca danos cerebrais e contribui substancialmente para diversas patologias (Brown e Borutaite, 2004).

Mais de um terço de proteínas precisam de iões metálicos para o seu funcionamento. O cobre, o ferro e o zinco são oligoelementos essenciais responsáveis pela função de muitas enzimas e proteínas celulares; contudo esses mesmos elementos tornam-se tóxicos quando ocorre uma acumulação excessiva a nível intracelular (Kozlowski et al., 2009). Na verdade, o cobre e o ferro podem contribuir para a produção de radicais livres e portanto, são susceptíveis de desempenhar um papel importante na regulação e indução de apoptose. Ao contrário desses metais, o zinco pode de forma directa ou induzido pelas metalotioneínas, ter um papel protector contra danos oxidativos. (Fernandes e Mafra, 2005).

Assim, a interacção entre os metais e as proteínas no sistema nervoso parece ser um factor crucial para o desenvolvimento ou ausência de neurodegeneração. Elevadas concentrações destes metais no cérebro têm vindo consistentemente a ser observadas na DP. Agentes quelantes de metais podem então ser usados como terapêutica em doenças neurodegenerativas associadas a metais.

Actualmente a DP não tem cura e o tratamento visa o controlo dos sintomas (Moreira, 2007). O tratamento terapêutico visa restabelecer os níveis de dopamina no cérebro. As cirurgias para certos doentes também poderão tornar-se benéficas (Monteiro, 2008).

O trabalho proposto tem como objectivo a realização de uma revisão actualizada, cuidada e crítica da literatura científica publicada sobre o papel do cobre, ferro e zinco, os seus mecanismos patogénicos e possíveis terapêuticas na DP.

Para tal foi feita a revisão de artigos científicos, efectuada através da biblioteca on-line da Universidade Fernando Pessoa, utilizando os motores de busca: MEDLINE/Pubmed e do Science Direct; bem como uma pesquisa através do Google de artigos científicos e sites de instituições credíveis e actualizados sobre “o papel do cobre, ferro e zinco na doença de Parkinson” preferencialmente, desde 2007 até 2011. Foi ainda feita uma pesquisa na biblioteca da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Devido ao aumento da prevalência da DP em Portugal, uma vez que actualmente afecta mais de vinte mil portugueses com quadros clínicos cada vez mais graves, e sendo uma doença para a qual ainda não existe cura, houve a motivação de elaborar esta

Dissertação para uma actualização da informação sobre os mecanismos básicos etiopatogénicos da DP, para que possa ser mais eficazmente diagnosticada e fornecer num futuro próximo agentes terapêuticos para que possa ser tratada.

## II. A doença de Parkinson

### 2.1. A doença de Parkinson e o seu diagnóstico

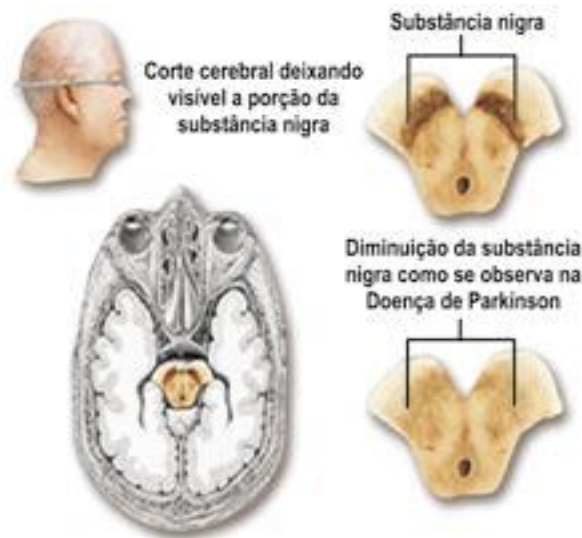
A DP está entre os problemas neurológicos mais preponderantes hoje em dia. A DP é actualmente umas das doenças neurodegenerativas com prevalência mais elevada na população mundial. É um distúrbio crónico e progressivo do sistema nervoso central, caracterizada preferencialmente, mas não exclusivamente, pela degeneração dos neurónios dopaminérgicos na substância negra e a presença de agregados proteicos no citoplasma neuronal, os CL. Hipóteses sobre a causa da perda de células dopaminérgicas estão relacionadas com o stress oxidativo, a disfunção mitocondrial e o metabolismo de xenobióticos (Kruger, 2004). Estes mecanismos neurodegenerativos serão referidos mais à frente.

O diagnóstico baseia-se em critérios clínicos, numa história cuidadosa e exame físico (Jankovic, 2008). Os sintomas cardinais da DP são:

1. Tremor em repouso: está presente nas extremidades, desaparecendo ao movimento; é comum também nos lábios, queixo e língua. O tremor em repouso das mãos aumenta com o andar e pode ser um sinal precoce, podendo ser agravado pelo stress.
2. Rigidez: traduz-se na dificuldade de relaxamento muscular devido ao desequilíbrio entre os níveis de acetilcolina (que promove a contracção muscular) e dopamina (que inibe a contracção muscular) (Monteiro, 2008).
3. Instabilidade postural: ocorrem na grande maioria das vezes tardiamente no curso da doença e não são específicas da DP. Inclinação da cabeça, cifose (um aumento anormal da concavidade posterior da coluna vertebral), braços mantidos à frente do corpo e cotovelos, joelhos flectidos, inversão dos pés e inclinação lateral do corpo (Moreira et al., 2007). Isto pode levar à queda e incapacidade de se pôr de pé sem auxílio.
4. Bradicinesia: lentidão dos movimentos, perda dos movimentos automáticos e hipocinesia (diminuição da amplitude dos movimentos, especialmente os movimentos repetitivos) (Nutt e Wooten, 2005).

### 2.1.1. Histopatologia

Os sinais e sintomas de parkinsonismo provêm de uma perturbação da função em duas regiões dos núcleos da base - a substância negra e o corpo estriado (núcleo caudado e putâmen). Essas massas nucleares centrais de substância cinzenta contêm praticamente toda a dopamina do cérebro humano (Figura 1).



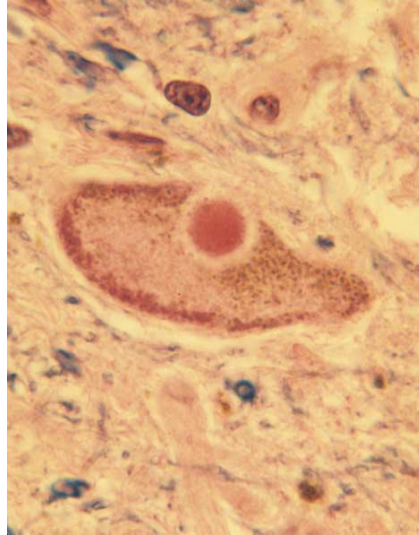
**Figura 1.** Corte cerebral da principal região de controle dos movimentos voluntários: substância negra, num cérebro normal e de pacientes com DP (adaptado de Doença de Parkinson: terapêutica actual e avançada, 2006).

Braak e colaboradores (2003) dividiram o processo patológico da DP em seis estágios: Estágio 1: acometimento do núcleo motor dos nervos glossofaríngeo e vago, degeneração do bulbo olfatório e do núcleo olfatório.

Estágio 2: comprometimento dos núcleos de rafe, núcleo reticular gigantocelular, e do complexo lócus ceruleus.

Estágio 3 e 4: comprometimento da parte compacta da substância negra do mesencéfalo. (Chaudhuri et al., 2006).

Estágio 5 e 6: presença dos CL nas estruturas límbicas e neocórtex (Figura 2), presença de sintomatologia neuropsiquiátrica, como depressão, declínio cognitivo e alucinações visuais.



**Figura 2.** Um corpo de Lewy (CL) no citoplasma de um neurónio dopaminérgico pigmentado na substância negra (adaptado de Lang e Luzano, 1998)

## 2.2. Mecanismos neurodegenerativos

### 2.2.1. Disfunção mitocondrial

As mitocôndrias são organelos intracitoplasmáticos constituídos por duas membranas. São responsáveis por muitos processos essenciais no desenvolvimento e na função normal do organismo, incluindo a produção de ATP, apoptose, e geração de espécies reactivas de oxigénio (ERO).

A mitocôndria produz cerca de 90 % da energia celular (Piecznik e Neustadt, 2007). Essa produção energética é o resultado de dois processos metabólicos coordenados: o ciclo de Krebs e a cadeia de transporte de electrões e fosforilação oxidativa. O fluxo dos electrões provenientes da nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) e flavina adenina dinucleótido (FADH<sub>2</sub>) para o O<sub>2</sub> dá-se através de complexos enzimáticos ancorados na membrana mitocondrial interna, que constituem a cadeia de transporte de electrões. Estes complexos são: Complexo I (NADH-coenzima Q oxiredutase), Complexo II (Succinato-ubiquinona oxiredutase), Complexo III (ubiquinona-citocromo-c oxiredutase), Complexo IV (citocromo-c oxidase-COX), dois transportadores de electrões móveis, coenzima Q10 (ubiquinona) e o citocromo-c. O quinto complexo que continua a fosforilação oxidativa é o Complexo V (ATP sintase) (Nasseh et al, 2001).

As doenças mitocondriais resultam de uma disfunção na cascata bioquímica, sendo as doenças mais estudadas e mais comuns as que afectam a cadeia respiratória (Oliveira, 2009).

O cérebro é altamente dependente da energia produzida pela mitocôndria para o seu funcionamento. A mitocôndria utiliza grande quantidade de  $O_2$  numa massa de tecido relativamente pequena, o que torna esse tecido altamente susceptível à acção de espécies reactivas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

As especulações de que anormalidades mitocondriais estariam relacionadas com a etiopatogenia da doença de Parkinson surgiram após a definição da existência de redução na actividade do complexo I mitocondrial, NADH CoQ1 redutase. Outra anormalidade também detectada foi a do complexo alfa-cetoglutarato desidrogenase (Teive, 2005).

A disfunção mitocondrial ocorre por diminuição da actividade dos complexos da cadeia respiratória com um consequente prejuízo no transporte de electrões, o que leva a uma dispersão de electrões na forma de radicais livres potencialmente perigosos para a célula (Halliwell e Gutteridge, 2007).

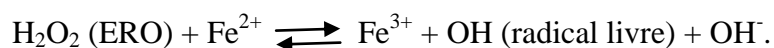
O papel da disfunção mitocondrial na DP foi reforçado pelos estudos de parkinsonismo por metil-fenil-tetrahidropiridina (MPTP), com evidência da presença de inibição selectiva do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial na parte compacta da substância negra do mesencéfalo (Teive, 2005). O MPTP é uma substância tóxica, descoberta em 1971, que provoca um síndrome parkinsoniano em tudo semelhante à doença de Parkinson. Esta substância destrói selectivamente os neurónios dopaminérgicos da substância negra compacta. O MPTP torna-se neurotóxico quando é oxidado a  $MPP^+$  pela enzima MAO-B (monoamina oxidase B). Os terminais dopaminérgicos captam o  $MPP^+$ , inibindo assim a enzima NADH CoQ1 redutase. A inibição desta enzima leva à produção excessiva de radicais livres provocando citotoxicidade, por inibição da respiração mitocondrial, o que contribui para a lesão neuronal e consequentemente morte neuronal progressiva na DP (apoptose). Desta forma a disfunção mitocondrial decorrente de factores tóxicos externos ou internos, bem

como factores genéticos, provocaria uma cascata de reacções que culminariam com a apoptose ou morte celular programada (Henchcliffe e Beal, 2008).

### 2.2.2. Stress oxidativo - geração de radicais livres

O stress oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre factores que promovem a formação de radicais livres e os mecanismos de defesa anti-oxidativos. As reacções de oxidação e redução são catalisadas por metais de transição como o cobre, o ferro, e o manganês. Tem sido discutido que o stress oxidativo pode contribuir para o processo patogénico da morte das células nigrais na DP. Vários factores estão implicados com a excessiva formação de peróxidos, como deficiência de glutathiona (principal arma anti-oxidante e protectora) e um aumento da reactividade ao ferro, levando à formação de oxi-*radicais* tóxicos. Todos estes factores actuam de forma isolada ou em conjunto, provocando o aparecimento da degeneração na parte compacta da substância negra do mesencéfalo (Teive, 2005).

Um desequilíbrio entre a taxa de geração e a capacidade de remoção celular de radicais livres provoca stress oxidativo. Metais de transição, como o cobre e o ferro, podem doar ou aceitar electrões livres durante reacções intracelulares, catalisando a formação de radicais livres, como na reacção de Fenton (Figura 3):

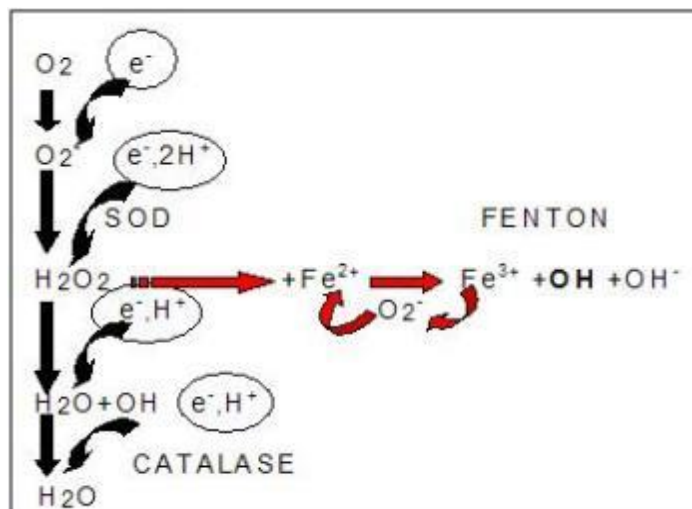


**Figura 3.** Reacção de Fenton: decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  dependente do ferro, com a produção de radicais hidroxilo reactivos (adaptado de Mancía et al., 2010)

Visto que a maior parte do ferro intracelular está na forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ), este precisa de ser reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  para poder participar na reacção de Fenton.

No estado metabólico normal, o superóxido favorece a oxidação de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . No entanto, se a concentração intracelular de superóxido é elevada, o equilíbrio da reacção favorece a redução de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , perturbando a reacção de Fenton e formando mais radicais livres hidroxilo. Os níveis das ERO são minimizados pela ligação das proteínas

de armazenamento e de transporte, que agem como quelantes, diminuindo a formação de OH (Figura 4) (Fernandez et al., 2007).



**Figura 4.** Perpetuação da formação de radicais hidroxilo pela reacção de Fenton na presença de excesso de superóxido (adaptado de Fernandez et al., 2007)

Os radicais livres podem ser gerados por todas as células vivas aeróbias, sendo os principais: o anião superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), o radical hidropéroxilo ( $HO_2$ ) e o radical hidroxilo ( $HO^{\bullet}$ ). Estas moléculas são derivadas do metabolismo do  $O_2$ , sendo conhecidas como as ERO. Dentre as ERO pode-se referir o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). Este processo favorece a ocorrência de ataques dessas espécies reactivas a componentes celulares, especialmente lípidos. Assim, a peroxidação lipídica provoca dano tecidual, o que está relacionado com a patogénese de várias doenças entre elas a DP.

As ERO são produzidas naturalmente no nosso organismo através de processos metabólicos oxidativos que podem ser de extrema utilidade, como na activação do sistema imunológico e da resposta inflamatória ou na destoxificação de fármacos (Schneider e Oliveira, 2004).

As ERO geradas no organismo podem provir de diferentes locais, sendo a principal fonte a mitocôndria, devido ao  $O_2$  que escapou da cadeia de transporte de electrões. A geração dessas espécies é associada ao metabolismo do  $O_2$  mitocondrial cuja fosforilação oxidativa resulta na formação de adenosina trifosfato (ATP). Os substratos oxidativos originam-se na glicólise, no ciclo de Krebs e na cadeia de transporte de

electrões, sendo o  $O_2$  o receptor final de electrões (Finland., Lac e Filaire, 2006). Na parte terminal da cadeia de transporte de electrões, a enzima citocromo oxidase remove um electrão de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo c, adicionando-os ao oxigénio para formar água, sendo esta reacção catalizada pela coenzima Q(CoQ). A formação de ERO pela mitocôndria é proporcional à actividade da cadeia de transporte de electrões, mas esta não é proporcional ao consumo de  $O_2$ . Um desequilíbrio entre a produção e a remoção dessas espécies, pode levar a eventos nocivos, como apoptose de células saudáveis, o envelhecimento precoce, a alteração da função celular e o aparecimento de doenças degenerativas como a DP.

A morte celular ocorre tanto por necrose quanto por apoptose. Na morte celular por necrose, a célula incha e rompe-se, libertando o seu conteúdo para o meio extracelular. Pode haver a libertação de antioxidantes, como a catalase e a glutathione, e também de pró-oxidantes, como os iões de cobre, ferro e proteínas do grupo heme. Agentes esses que podem afectar as células adjacentes, podendo até provocar nelas stress oxidativo. Na apoptose, o mecanismo intrínseco de suicídio celular é activado, e não há libertação do conteúdo celular. A morte celular por apoptose pode ser acelerada em doenças neurodegenerativas, havendo envolvimento do stress oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Além disso, o stress oxidativo pode levar a um aumento de peroxidação lipídica, cujos produtos malondialdeído (MDA) e 4-hidroxinonenal (HNE), entre outros, são neurotóxicos, inibindo a actividade de diversas enzimas e alterando a função celular.

A dopamina é uma catecolamina derivada da tirosina e é metabolizada no cérebro por acção da enzima MAO e catecol-o-aminotransferase (COMT) em ácido homovelínico (HVA) e ácido 3,4-dihidrofénilacético. O metabolismo normal da dopamina produz radicais e  $H_2O_2$ , os quais na presença de depósitos de ferro no cérebro, abundante nos gânglios da base, pode gerar radicais livres de hidroxilo que interferem na cadeia respiratória celular, levando à neurotoxicidade (Monteiro, 2008).

Os iões metálicos, dentre eles o cobre e o ferro, podem gerar ERO. Entre os iões metálicos, o ferro é o metal mais abundante no organismo e o que está biologicamente

mais capacitado para gerar as ERO e catalisar as reacções de oxidação das biomoléculas (Mancía et al., 2010).

Os metais contêm electrões não emparelhados, o que os qualifica como radicais (com excepção do zinco). Os factores de maior significado, em relação ao seu estado reactivo, são as suas valências variáveis, o que permite modificações do potencial de oxidação, envolvendo um electrão.

O ferro apresenta dois estados de oxidação mais comuns. Em solução, na presença de ar, o ferro (III) é o mais estável, enquanto os sais de ferro (II) são redutores fracos. Se uma solução de sais de ferro (II) é deixada exposta ao ar, ela é vagarosamente oxidada ao estado de ferro (III). Esta é uma oxidação, e o  $O_2$  dissolvido na solução é reduzido a radical superóxido (Sequeira, Almeida e Arruda, 2006).

O alto conteúdo de ferro favorece a lipoperoxidação e a autooxidação de neurotransmissores através de radical hidroxilo formado na reacção de Fenton (Mancía et al., 2010). Nesta reacção, uma mistura de  $H_2O_2$  e um sal de ferro (II) reage com muitas moléculas orgânicas. Isto é devido à formação do radical hidroxilo. O ferro (III) pode reagir com  $H_2O_2$ . Assim a mistura de um sal de ferro e  $H_2O_2$  podem promover uma série de reacções com radicais (Grotto, 2008).

O cobre apresenta também dois estados de oxidação mais comuns, cobre (I) e cobre (II). A diferença de um electrão permite ao cobre participar em reacções de radicais. Sob condições adequadas, os sais de cobre poderão aceitar electrões, ou ceder electrões ao radical superóxido.

O zinco tem somente um estado de oxidação e não promove reacções com radicais. Tem sido sugerido que o zinco pode inibir algumas reacções de radicais *in vivo*, deslocando outros metais de transição, como o ferro, do local da ligação onde estejam a promover as reacções (Kozlowski et al., 2009).

### *Lipoperoxidação*

A lipoperoxidação é um processo fisiológico contínuo que ocorre normalmente nas membranas celulares. Além de ser um factor de renovação da membrana, é um processo essencial na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, bem como na fagocitose e pinocitose. Por serem formadas em grande parte por lípidos insaturados e proteínas, as membranas são particularmente susceptíveis ao ataque oxidativo. Quando a produção de espécies reactivas aumentar além da capacidade de desintoxicação, esse processo será exacerbado, e com isso a lipoperoxidação provoca alterações profundas na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, o que provoca perda da selectividade na troca iónica com libertação do conteúdo de organelos e formação de produtos citotóxicos como o MDA e HNE (Ferreira e Matsubara, 1997).

O MDA, a pH fisiológico, ataca proteínas e bases de DNA, provocando lesões mutagénicas. O HNE parece ser citotóxico para células neuronais (Manzano-León e Mas-Oliva, 2006). Nesse contexto a formação de HNE precede a morte neuronal. Concentrações aumentadas desse produto lipídico são encontradas em tecido cerebral de pacientes afectados por doenças neurodegenerativas. Por lesar proteínas de membranas o HNE pode também inibir enzimas das membranas como  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase, glicerol-3-fosfato aciltransferase, glicose-6-fosfatase e  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase, e também canais de potássio.

As etapas da lipoperoxidação são: iniciação, propagação e terminação. A iniciação é provocada pelo ataque de qualquer espécie reactiva com capacidade de retirar um átomo de hidrogénio de um grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-) a um lípido da membrana. Nesse contexto, radicais hidroxilo podem iniciar a lipoperoxidação. Uma vez que o átomo de hidrogénio tem apenas um electrão, ao captar um átomo de hidrogénio de um grupo metileno fica um electrão desemparelhado no carbono (-CH-). Esse radical é estabilizado por um rearranjo molecular, que reage com o O<sub>2</sub> e forma radical peroxilo (ROO). Na fase de propagação o radical peroxilo capta um protão de uma molécula lipídica. O radical de carbono formado reage com o O<sub>2</sub> para formar outro radical peroxilo, e assim sucessivamente. Quando dois radicais produzidos nas etapas anteriores reagirem entre si, formam um produto estável (Halliwell e Gutteridge, 2007).

### *Defesas antioxidantes*

Os organismos desenvolvem sistemas antioxidantes de defesa para protecção, como também sistemas de reparação, que previnem a acumulação de moléculas alteradas por oxidação. O principal mecanismo de defesa do organismo contra a produção de ERO é feito pelos antioxidantes que são responsáveis pela inibição, redução e remoção das lesões celulares provocadas pelas mesmas (Singh, Sharad e Kapur, 2004).

Os antioxidantes são substâncias exógenas ou endógenas que reduzem a formação de radicais livres ou reagem com os mesmos, neutralizando-os. A célula é capaz de se proteger contra o dano oxidativo através de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que actuam sempre em sinergismo e estão localizados dentro das células ou na circulação sanguínea.

Os antioxidantes enzimáticos compreendem a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX) (Patil, Kodliwadmth e Kodliwadmth, 2007). A SOD é a primeira linha de defesa contra as ERO por neutralizar a formação de  $O_2^-$  na mitocôndria e por neutralizar o  $O_2^-$  e o  $H_2O_2$  do citosol, ou seja, catalisa a dismutação do radical superóxido. A SOD é uma metaloenzima que em sistemas eucarióticos possui zinco, cobre e manganês (Fernandes e Mafra, 2005). A CAT está presente em todas as células que usam  $O_2$  para converter  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . O  $O_2$  produzido pelas CATs é estável (Gaetani et al., 2011). Os níveis de CAT são particularmente baixos em muitas regiões cerebrais, aumentando assim a susceptibilidade do cérebro ao dano provocado por radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1996). A GPX está presente na mitocôndria e no citosol, catalisando a reacção da glutathione reduzida (GSH) com  $H_2O_2$  para formar glutathione oxidada (GSSG) e  $H_2O$  (Finland, Lac e Filaire, 2006).

Dos antioxidantes não-enzimáticos destaca-se a vitamina E (alfa tocoferol), a vitamina C (ácido ascórbico), a vitamina A (beta caroteno), o selénio, a glutathione e o ácido úrico (Finland, Lac e Filaire, 2006).

### 2.3 Susceptibilidade genética

Vários estudos indicam um maior risco para desenvolver a doença associada a factores ambientais como exposição a pesticidas, traumatismo craniano e poluentes. Apesar dos casos herdados de forma mendeliana, a maioria dos casos de DP é esporádica.

A importância de factores genéticos na etiopatogenia da DP cresceu nos últimos anos após os estudos de Polymeropoulos e colaboradores (1997), culminando a definição de algumas formas de doença com herança autossômica dominante recessiva, com a definição de genes, locus genéticos e também pela pesquisa de factores genéticos de susceptibilidade às neurotoxinas ambientais exógenas e endógenas. Vários genes candidatos a susceptibilidade têm sido estudados, entre eles o CYP2D6, uma isoenzima do complexo citocromo P450 (Teive, 2005). A susceptibilidade genética a toxinas ambientais e o defeito capaz de gerar toxinas endógenas e /ou dificultar a sua remoção são mecanismos pelos quais os factores genéticos podem contribuir para a degeneração celular.

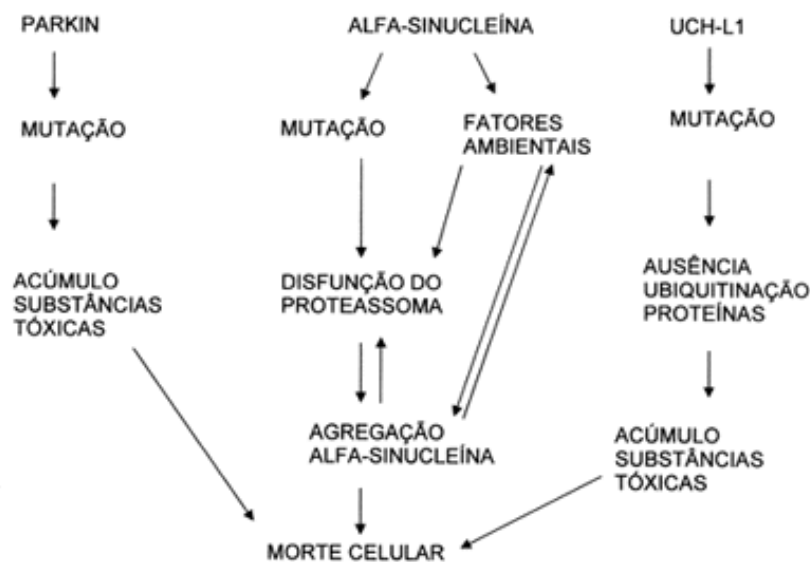
Vários estudos têm associado a maior frequência de aparecimento da DP em pacientes que vivem em zonas rurais, que fazem uso de água de poço e que estão mais expostos a pesticidas e herbicidas (Teive, 2005).

As duas formas mais conhecidas de DP com herança autossômica dominante e recessiva são as relacionadas com os genes Park 1 e Park 2 (Parkin), respectivamente. A forma Park 2 é a mais frequente encontrada em todo o mundo, nos pacientes com parkinsonismo de início precoce (Ganz, 2007).

Polymeropoulos e colaboradores (1997) descobriram a presença de mutação no gene Park 1 que codifica a  $\alpha$ -sinucleína, que é uma proteína existente nas terminações nervosas pré-sinápticas, envolvida na plasticidade neuronal. Observaram que no gene desta proteína, ao nível do nucleotídeo 209, havia uma alteração na posição 53, com uma troca de alanina pela treonina (Ala53Thr). Estas alterações foram identificadas em 13 famílias gregas. Na Alemanha foi encontrada outra mutação do gene  $\alpha$ -sinucleína, com uma troca de alanina por prolina (Ala30Pro) (Gasser, 2004).

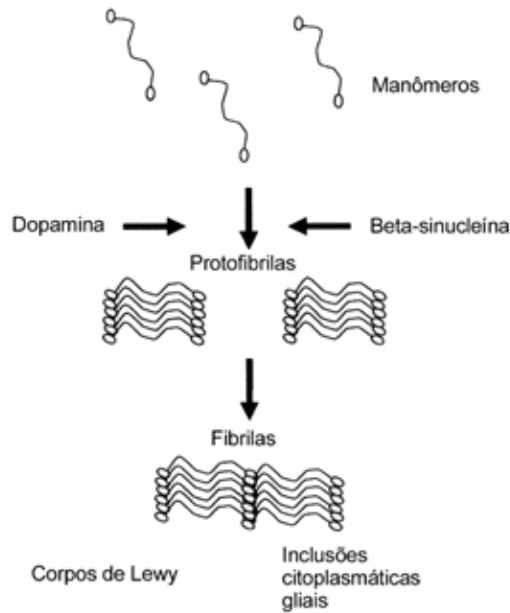
A mutação em Park 1 faz com que haja uma agregação proteica intracelular, que é neurotóxica, impedindo a função de células dopaminérgicas. Os agregados proteicos citoplasmáticos são identificados como CL que incluem  $\alpha$ -sinucleína, Parkin, Hidrolase L1 Ubiquitina Carboxiterminal (UCH-L1), ubiquitina, subunidade proteômica 26S e outras moléculas.

A proteína Parkin exerce um papel importante na manutenção ou sobrevivência dos neurónios nigrais. Em caso de mutações do gene Parkin (Figura 5), pode haver agregação proteica, como a  $\alpha$ -sinucleína e a sinfilina, através do processo de ubiquitinação (a ubiquitina é o maior componente dos CL), formando assim inclusões citosólicas de ubiquitina positiva, que são dificilmente degradadas pelo complexo proteossomal, o que leva a morte neuronal.



**Figura 5.** - Mecanismo de morte neuronal na DP (adaptado de Ribeiro et al., 2004)

A  $\beta$ -sinucleína pode ser usada como uma nova estratégia de tratamento da DP porque inibe a agregação da  $\alpha$ -sinucleína (Figura 6).



**Figura 6.** - Formação dos corpos de Lewy (CL). Na presença de vesículas intracitoplasmáticas de lípidos, a  $\alpha$ -sinucleína assume a estrutura helicoidal alfa, e em grandes concentrações vesiculares, a forma beta de fibrilas amilóides (adaptado de Ribeiro et al, 2004).

No Japão, Matsumine e colaboradores (1997) descreveram uma mutação de ponto ou deleção na região de Park 2, localizada no cromossoma 6: 6q25, uma forma de parkinsonismo juvenil autossômica recessiva. Observou-se nos estudos necrópsia, a presença de degeneração selectiva de neurónios na zona compacta da substância negra, contudo sem a presença dos CL (Teive, 2005). O produto génico é a ubiquinona. Esta caracteriza-se por ter início precoce (antes dos 40 anos), tendo uma boa resposta ao tratamento com levodopa. As mutações em Parkin, consideradas uma das principais causas de DP familiar, provocam a perda da actividade enzimática e acumulação de proteínas não ubiquitinadas, que não formam CL e levam à morte selectiva de células neuronais.

Park 3 é outro gene ainda não identificado, localizado no cromossoma 2p13 depois de análise de ligação de seis famílias europeias com herança autossômica dominante e típica patologia de CL. Mutações neste gene podem ter sido subdiagnosticadas e os pacientes confundidos com DP esporádica. Essas famílias apresentam sinais de demência e neuropatologia, além da perda neuronal na substância negra e típicos CL no tronco (Ribeiro et al., 2004).

No gene UCH-L1 (Park 5), em duas famílias alemãs, foi encontrada uma mutação em que a isoleucina é substituída por metionina na posição 93 (I93M), produzindo a redução da actividade enzimática de UCH-L1, impedindo a depuração proteica, no qual está envolvido a desconjugação de ubiquitina. A disfunção da enzima leva à falta de reciclagem dos monómeros de ubiquitina com alteração no mecanismo proteossomal-proteolítico. A acumulação anormal de proteínas e seus substratos é responsável pela patogênese da DP (Ribeiro et al., 2004).

No locus Park7, as mutações no gene DJ-1 provocam provavelmente perda de função. Nesses casos a doença é de início precoce e a herança envolvida é autossômica recessiva (Healy et al., 2008).

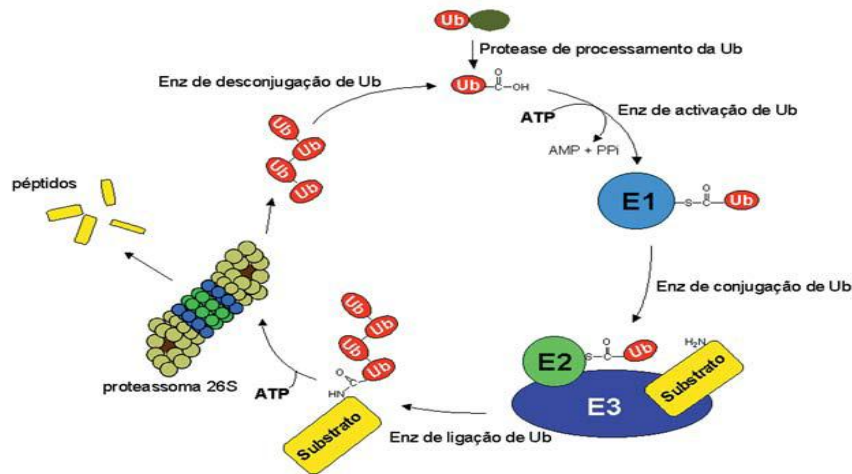
Estudos de ligação em outras famílias com DP não têm identificado mutações dos genes conhecidos e sugeriram a presença de outros genes envolvidos na etiologia da DP, como o gene "tau" no cromossoma 17 (início tardio de sintomas).

O número de genes candidatos para a DP tem aumentado rapidamente. Muitos genes candidatos têm sido descritos em famílias específicas. A ênfase actual das bases genéticas da DP tem como objectivo desvendar a etiologia da doença, contribuindo para a terapia.

#### **2.4. Inibição do sistema proteossomal da ubiquitina**

O sistema proteossomal da ubiquitina representa o mecanismo primário responsável pela eliminação de proteínas intra-celulares mutantes danificadas, e também está relacionado com a regulação dos níveis de proteínas de vida curta que medeiam actividades celulares como a transcrição de genes e a neurotransmissão (Teive, 2005). Este sistema é formado por proteossomas conhecidos como 26S e 20S, que são proteases com acção multicatalítica encontradas no citoplasma, retículo endoplasmático, na região peri-nuclear e no núcleo das células eucarióticas. Neste sistema proteossomal-ubiquitina as proteínas anormais são inicialmente conjugadas com cadeias de moléculas de ubiquitina, ou seja, ubiquitilação que consiste na formação de uma ligação isopeptídica entre a ubiquitina e a proteína-substrato, funcionando assim como um sinal para o reconhecimento e degradação pelo sistema proteossomal. Isto envolve a acção de

três classes de enzimas: E1 (enzima activadora da ubiquitina), E2 (enzima conjugadora da ubiquitina) e E3 (ligase de proteína ubiquitina) (Figura 7).



**Figura 7.** Passos enzimáticos principais da via proteolítica dependente de ubiquitina/proteossoma. E1 – enzima activador de ubiquitina, E2 – enzima conjugador de ubiquitina, E3 – ligase de ubiquitina–proteína, Ub – ubiquitina ou grupo ubiquitil (adaptado de Ramos, 2005)

Em primeiro lugar, ocorre a activação do grupo carboxílico da glicina existente no terminal C da ubiquitina, catalisada por E1, formando um adenilato de ubiquitina intermediário, com a concomitante hidrólise de ATP, ocorrendo também a transferência da ubiquitina activada para o centro tiol da enzima E1 (com a libertação de AMP). Depois, a ubiquitina activada é transferida, por transacilação, para um grupo tiol de uma segunda enzima, pertencente à família das proteínas E2. Estes ésteres de tiol formados entre E2 e ubiquitina são dadores de ubiquitina para a formação da ligação isopeptídica entre o resíduo de glicina do terminal C da ubiquitina e grupos amina de resíduos de lisina das proteínas-substrato. A E3 é responsável pela selecção da proteína-substrato através do reconhecimento de um sinal de degradação existente nessa proteína. As reacções repetidas em sequência levam à formação de uma cadeia de poli-ubiquitina conjugada a proteínas, que associada a proteínas não ubiquitinadas serão degradadas pelo sistema proteossomal 26S e 20S. (Ramos, 2005) Este sistema complexo contém subunidades alfa e beta, e é composto de diferentes activadores que são proteínas conhecidas como PA700 que fazem parte do grupo de proteínas chamadas proteínas de choque térmico, as quais actuam como “chaperonas moleculares”, participando na remoção de proteínas anormais ao nível celular neuronal (Nussbaum e Ellis, 2003)

Tem-se evidenciado uma perda das subunidades alfa do sistema proteossomal 20S, dentro dos neurónios dopaminérgicos nigrais. A perda da subunidade alfa leva a uma instabilidade do sistema proteossomal, com perda de função e subsequente desencadeamento do processo neurodegenerativo.

A presença da mutação da  $\alpha$ -sinucleína, nos casos de DP idiopática com herança autossómica recessiva, pode interferir com a acção do sistema proteossomal-ubiquitina, através de uma acção inibitória, ou mesmo levando a uma saturação deste sistema, provocando desta forma acumulação de proteínas intra-celulares pobremente degradadas, levando à morte neuronal (Teive, 2005).

A proteína Parkin envolvida com uma forma de parkinsonismo de início precoce, decorrente de uma mutação génica, é na verdade uma ligase da ubiquitina E3, que tem um papel importante no processo de degradação de substratos alvos, mediada pelos proteossomas (Teive, 2005). A presença de mutação nesta proteína provoca uma disfunção do sistema proteossomal-ubiquitina ao promover a depuração de proteínas anormais que seriam acumuladas e desencadeariam a morte neuronal (Teive, 2005). Um dos substratos da proteína Parkin é uma forma glicosilada da  $\alpha$ -sinucleína, estabelecendo um elo de ligação entre a proteína Parkin e a  $\alpha$ -sinucleína e a DP idiopática, decorrente de um defeito do sistema proteossoma-ubiquitina. (Rawl et al., 2002).

A mutação no gene 4p14, que codifica a hidrolase-L1 terminal C da ubiquitina, pode provocar perda da sua actividade enzimática, interferindo com o processo de ubiquitinização e por consequência afectar o processo de depuração proteica com acumulação de proteínas e morte neuronal (Teive, 2005).

A propensão da DP ocorrer em pacientes de idade avançada sugere que o sistema proteossomal neuronal torna-se insuficiente na sua função de depuração das proteínas anormais, que podem acumular com o passar da idade (Teive, 2005).

Assim um desequilíbrio entre uma carga elevada de proteínas anormais, associadas a uma baixa actividade do sistema proteossomal, e a presença de baixos níveis de

activadores proteossomais (PA700 e Pa28), na parte compacta da substância negra do mesencéfalo, levam a processos neurodegenerativos.

### III. Cobre na doença de Parkinson

#### 3.1. Funções biológicas do cobre

O cobre é um elemento essencial para inúmeras funções fisiológicas e bioquímicas, através da sua participação no metabolismo energético, na homeostase de ferro, em mecanismos de protecção antioxidante e como componente de muitas metaloproteínas e metaloenzimas (Speich et al., 2001). Diversos trabalhos demonstram que o cobre é cofactor de enzimas como a SOD, lisil oxidase (Bairele et al., 2010), citocromo c oxidase e ceruloplasmina. Algumas das principais enzimas e proteínas cobre-dependentes são apresentadas na Tabela 1.

<b>Proteína</b>	<b>Funções biológicas</b>
Citocromo c oxidase	Transporte de electrões na mitocôndria
Ceruloplasmina (ferroxidase I)	Transporte de cobre no plasma, ferroxidase, quelante de iões superóxido gerados na circulação
Lisil oxidase	Formação de ligações cruzadas no colágeno e elastina
Dopamina $\beta$ hidroxilase	Cataliza a conversão da dopamina em noradrenalina
Cobre-zinco SOD	Desintoxificação do ião superóxido
Tirosinase	Síntese de melanina
Metalotioneínas	Importante na manutenção de concentrações adequadas de cobre intracelular, evitando a toxicidade
Hefastina	Promove o efluxo de ferro dos enterócitos

**Tabela 1.** Exemplo de enzimas e outras proteínas cobre-dependentes (adaptado de Koury e Donangelo, 2007)

O cobre é co-factor de várias enzimas como a SOD e ceruloplasmina que possuem actividade antioxidante, protegendo diferentes estruturas celulares da acção de ERO. A enzima mitocondrial citocromo c oxidase é importante para a produção celular de energia, uma vez que está envolvida na cadeia de transporte de electrões, onde ocorre a redução do  $O_2$  a  $H_2O$  com formação de ATP. As ferroxidases, como a ceruloplasmina (ferroxidase I) e a ferroxidase II, são enzimas cobre-dependentes que mantêm a homeostase do ferro no organismo. A ceruloplasmina tem função de limpador de radicais livres. Cerca de 85 a 95 % do cobre está ligado covalentemente à ceruloplasmina sérica (Bairele et al., 2010). A lisil oxidase participa na formação, manutenção e estabilização do tecido conjuntivo. A dopamina  $\beta$  - monooxigenase converte dopamina em noraepinefrina. A enzima cobre-zinco SOD encontra-se no citoplasma das células e no meio extracelular, e está envolvida na dismutação do radical livre anião superóxido a  $H_2O_2$  e  $H_2O$ .

No entanto, o ião cobre livre pode apresentar efeitos tóxicos, tanto em estado oxidado ( $Cu^{2+}$ ), como em estado reduzido ( $Cu^+$ ), podendo catalizar a formação de ERO e actuar como pró-oxidante.

Para que as cobre-proteínas desempenhem as suas funções essenciais de forma satisfatória, tais como antioxidantes, o ião cobre precisa de estar presente em concentrações intra e extracelulares adequadas. Embora o cobre seja um elemento essencial para o organismo, quando em excesso pode provocar efeitos tóxicos.

### **3.1.1. Ceruloplasmina**

A ceruloplasmina é uma glicoproteína presente no plasma, onde são incorporados seis átomos de cobre durante a sua biossíntese hepática. Possui uma acção de ferroxidase, pois é capaz de oxidar o ião ferroso em ião férrico.

A função antioxidante da ceruloplasmina consiste não só na capacidade de manter os iões de cobre e ferro ligados às suas proteínas específicas, evitando que os mesmos participem na reacção de Fenton, mas também no seu efeito limpador sobre os aniões superóxido e outras ERO. A ceruloplasmina inibe a oxidação de lípidos, protegendo estruturas proteicas e DNA de lesões.

A concentração do cobre extracelular exerce efeito directo sobre a qualidade de síntese e secreção de ceruloplasmina. Quando há redução na incorporação do cobre durante a síntese, como no caso de deficiência de cobre, ocorre uma libertação de um produto instável (apoceruloplasmina) desprovido de actividade ferroxidase (Koury e Donangelo, 2007).

### **3.1.2. Superóxido dismutase (SOD)**

O anião superóxido é um radical livre potencialmente lesivo às células, processo favorecido nas mitocôndrias. Apesar da citocromo c oxidase proteger esta redução, a libertação de uma pequena quantidade deste anião é inevitável.

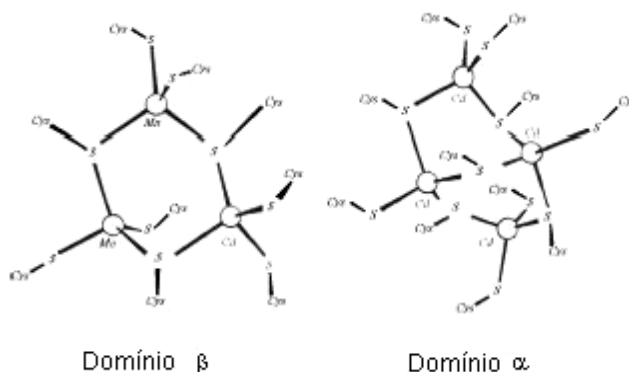
A função da SOD é reduzir a acção lesiva do anião superóxido, que é formado pela redução de  $O_2$  por um electrão, catalisando sua conversão a espécies menos reactivas (Koury e Donangelo, 2007).

A SOD possui três isoformas, sendo duas intracelulares (mangânês- dependente, na mitocôndria e cobre- zinco-dependente no citosol) e cobre-zinco extracelular. A cobre-zinco SOD é uma enzima muito estável, tendo o cobre como cofactor essencial para a sua actividade catalítica, enquanto o zinco desempenha uma função estrutural (Koury e Donangelo, 2007).

O centro activo da cobre-zinco SOD é carregado positivamente e circundado por um anel de radicais com carga negativa. O anião superóxido é atraído electrostaticamente para o centro activo e liga-se ao  $Cu^{2+}$ , provocando a transferência de um electrão formando o  $Cu^+$  e o  $O_2$ , que é libertado. O segundo anião superóxido penetra no centro activo e liga-se ao  $Cu^+$ , à arginina e ao  $H^+$ , adquirindo um electrão. Assim o  $Cu^{2+}$  é recuperado e é formado o  $H_2O_2$ . A enzima catalase, ferro-dependente, impede que o mesmo sofra acção de iões livres como o ferro e o cobre, actuando sobre ele (Koury e Donangelo, 2007).

### 3.1.3. Metalotioneínas (MTs)

As metalotioneínas (MTs) são proteínas monoméricas compostas de dois domínios globulares com capacidade de se ligarem a sete átomos de qualquer metal divalente. São ricas em resíduos de cisteína, com afinidade para iões de metais pesados, como o cobre e zinco, possibilitando a formação de clusters tiol-metal. Em mamíferos são encontradas em diferentes isoformas. A MT-I e a MT-IV são pequenas proteínas de 61 a 68 aminoácidos, com estrutura terciária composta por distintos domínios, alfa e beta (Figura 8). As MT do tipo I e II são as mais abundantes no cérebro, encontradas primeiramente nos astrócitos. A MT-III tem sido observada principalmente no cérebro e em baixos níveis nos tecidos periféricos. Estudos apontam para uma deficiência desta isoforma no cérebro de indivíduos com doença de Alzheimer (Kozlowski et al., 2009). A MT-IV é mais abundante em tecidos estratificados e não se encontra a nível cerebral. As diferenças entre os diferentes tipos de MTs não são meramente estruturais, e hoje sabe-se que a MT-I e a MT-II podem ser induzidas por várias condições de stress e compostos, tais como citoquinas e ERO.



**Figura 8.** Sítios para ligação com metais presentes na metalotioneína (MT). Os círculos denotam iões metálicos divalentes (ex.  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) (adaptado de Niterói, 2006).

Ainda há muito para esclarecer sobre as funções das MTs, mas devido à propriedade de quelatar zinco, a proteína tem sido apontada como um importante controlo na homeostase desse metal essencial. Cada molécula de MT tem a capacidade de se ligar até 12 átomos de cobre e zinco. As MTs desempenham um papel fundamental na manutenção de níveis adequados destes metais dentro das células. Este papel torna-se importante quando o processo de efluxo celular do cobre está comprometido, seja por

alterações na ATP7A ou ATP7B, ou quando há uma exposição aguda a elevadas concentrações de cobre. Entre outras funções, as MTs são também capazes de proteger contra o stress oxidativo. As MTs reduzem a toxicidade do cobre, limitando a sua participação em reacções que favorecem a liberação de ERO (Koury e Donangelo, 2007).

A MT nos mamíferos adopta uma conformação com diferentes grupos de tiol-metal, localizados em dois domínios com estequiometria de M3 (Scys)<sup>9</sup> (no domínio N-terminal) e M4 (Scys)<sup>11</sup> (no domínio C-terminal) para iões metálicos divalentes (Kozlowski et al., 2009). O enrolamento da cadeia de proteína ao redor dos clusters, é inteiramente conduzido pela coordenação dos iões metálicos. O mecanismo exacto de quelatação dos iões metálicos não está bem esclarecido até agora. Mas esta é a chave para perceber o papel das MTs na célula.

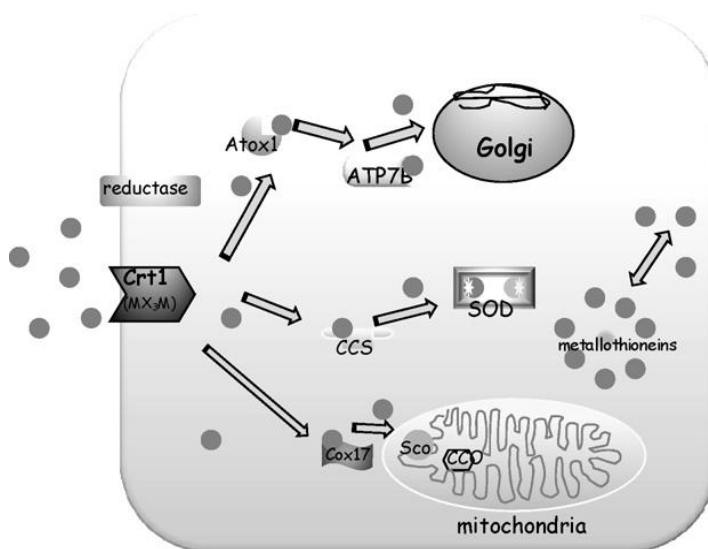
O número máximo de ligação dos iões metálicos aos domínios alfa e beta das MTs, é determinado pelas propriedades do ião metálico. Quatro Cd(II), Zn(II) ligam-se ao domínio alfa e três no beta, enquanto no caso de Cu(I), Ag(I) e Hg(II) ligam-se tanto ao domínio alfa ou beta, ligando quatro, seis ou nove iões metálicos (Kozlowski et al., 2009).

A cobre-MT actua como depósito de cobre, transferindo-o para cobre apo-proteínas e/ou cobre apo-chaperonas e, além disso, tem um papel na desintoxificação do cobre (Kozlowski et al., 2009). A cobre-MT possui 53 aminoácidos, dos quais 12 são cisteína e 6-8 iões de Cu(I). O último modelo estrutural da ligação da MT ao Cu(I) mostrou 10 resíduos de cisteína envolvidos por 8 átomos de cobre. A homeostase do cobre e do zinco é fortemente regulada e é essencial para a fisiologia do cérebro. Alterações neste metabolismo estão envolvidas nas doenças neurodegenerativas.

### **3.2. Homeostase do cobre**

A manutenção da homeostase do cobre no organismo exige mecanismos bastante complexos de absorção, transporte, captação, distribuição e desintoxificação celular, alguns deles dependentes de nutrientes (Koury e Donangelo, 2007).

O cobre é transportado para dentro das células ligado a uma ou mais proteínas transmembranares, como o transportador do cobre (CTR1, do inglês *copper transporter 1*) (Figura 9). Este possui dois centros de atracção para o metal, um domínio extracelular rico em metionina (terminal N extracelular), apresentando um forte impacto no transporte de Cu(I), e outro intracelular rico em cisteína e histidina (terminal C intracelular) com função ainda desconhecida, mas que pode estar envolvida na mobilização do cobre dos vacúolos (Kozlowski et al., 2009). O CTR1 localiza-se no plasma membranar e no interior das vesículas, transportando o metal para as cobre-chaperonas do citosol. No citosol o cobre liga-se a um grupo de proteínas receptoras (metalo-chaperonas) que direccionam e transferem o cobre para as estruturas celulares contendo as diversas apo-cuproproteínas, substâncias sem a incorporação do cobre (Koury e Donangelo, 2007). As chaperonas também auxiliam na protecção intracelular contra o poder óxido-redutor do cobre (Gaetke e Chow, 2003).



**Figura 9.** Esquema das vias de transporte do cobre(I) em mamíferos (adaptado de Kozlowski et al., 2009)

As cobre-chaperonas dividem-se em três classes funcionais: CCS (direcciona o cobre para o citoplasma para a síntese de cobre-zinco superóxido dismutase), Atox1 (direcciona o cobre para as ATPases 7A e 7B, que servem como mediadores no transporte de cobre dependente de energia, para o lúmen do complexo de Golgi, para futura síntese de ceruloplasmina e lisil oxidase) e COX17 (direcciona o cobre para as mitocôndrias para a síntese de citocromo c oxidase).

Quando o cobre se encontra em concentrações elevadas, as ATPases que o translocam são redistribuídas para dentro de vesículas citoplasmáticas. Através de mecanismos de exocitose, este mar de cobre intracelular vai ser destinado ao efluxo, evitando assim a acumulação do cobre em níveis tóxicos dentro das células. As MTs são outro mecanismo de controlo de toxicidade do cobre intracelular. A expressão das isoformas I e II encontra-se elevada em doenças neurodegenerativas.

### 3.3. Mecanismo neurodegenerativo do cobre

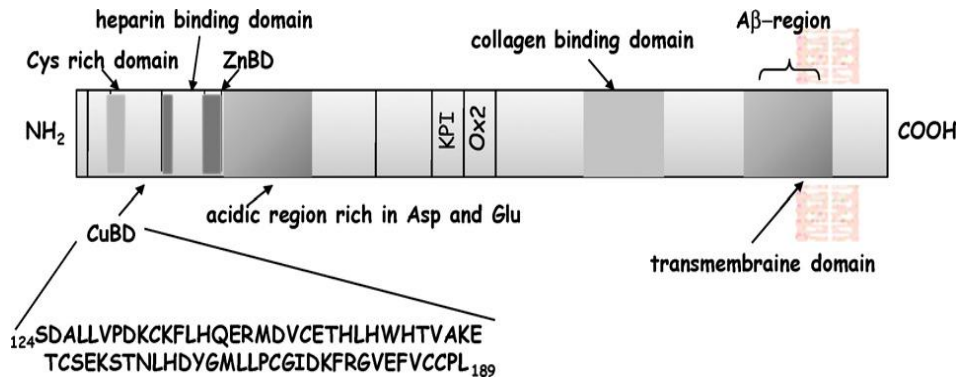
Qualquer desequilíbrio entre o influxo e o efluxo de iões de cobre pode levar a citotoxicidade e contribuir para o desenvolvimento de diversas patologias como o cancro, doenças neurodegenerativas e envelhecimento (Kozlowski et al., 2009).

O ião de cobre livre participa na formação de radicais livres tanto na forma cúprica ( $\text{Cu}^{2+}$ ) como na forma cuprosa ( $\text{Cu}^+$ ). Na presença de iões superóxido ou de agentes redutores, como o ácido ascórbico e glutathione, o ião cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) pode ser reduzido a cuproso ( $\text{Cu}^+$ ), sendo capaz de catalisar a formação de radicais hidroxilo, a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , via reacção de Fenton, (Kozlowski et al., 2009), promovendo a imediata oxidação dos resíduos de aminoácidos vizinhos.

O radical hidroxilo é o radical livre mais lesivo às células, podendo causar danos em praticamente todas as moléculas biológicas através da peroxidação de lípidos das membranas celulares e da oxidação do DNA e estruturas proteicas (Koury e Donangelo, 2007). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é capaz de fragmentar a estrutura da ceruloplasmina (Halliwell e Gutteridge, 1989), libertando assim o ião do cobre que estará livre para participar nas reacções químicas que libertam o hidroxilo. A redução da actividade de ferroxidase da ceruloplasmina, associada à perda do cobre ligado, favorece a participação do ião ferroso livre na reacção de Fenton, aumentando ainda mais a formação do radical hidroxilo.

A proteína precursora do péptido  $\beta$  amilóide (PPA) é uma proteína transmembranar glicosilada, abundante a nível cerebral e constitui uma família de várias isoformas com diferentes números de resíduos de aminoácidos (Figura 10). Há vários domínios

distintos dentro da estrutura da PPA, incluindo os domínios de ligação do cobre e do zinco e a região tóxica PPA.



**Figura 10.** Representação dos domínios da PPA (adaptado de Kozlowski et al., 2009)

O domínio de ligação do cobre na PPA localiza-se na extremidade N, um domínio rico em cisteína. A expressão da PPA é a chave da modelação neuronal da homeostase do cobre. Este domínio influencia a neurotoxicidade mediada por Cu(I). O aumento da concentração do cobre influencia o metabolismo da PPA, reduzindo a produção de βA e aumentando as ligações membranares que secretam PPA.

De acordo com estudos feitos em animais, a PPA desempenha uma função importante na homeostase do cobre e do ferro. Uma das funções da PPA é o transporte do cobre do meio extracelular para o meio intracelular. O fragmento tóxico do péptido amilóide (βA), que está directamente envolvido na formação de placas de Alzheimer, é um péptido gerado durante o processamento proteolítico da PPA por duas proteases e secretases.

A PPA induz a oxidação proteica, peroxidação lipídica, produção de ERO e outros factores de stress oxidativo. Há também observações sobre o funcionamento deficiente do complexo I mitocondrial, com a consequente agregação e acumulação de α-sinucleína.

Além da produção de ERO, o cobre, bem como outros metais como o ferro e o zinco, têm um papel importante na neurodegeneração, através da ligação em locais específicos

nas proteínas envolvidas. Apenas a SOD é uma cupro-enzima, mas a PPA e os seus fragmentos ( $\beta$ A), a proteína prião e a  $\alpha$ -sinucleína possuem sítios específicos de ligação do cobre(II) (Kozlowski et al., 2009). Além disso, a caracterização da interacção do cobre(II) com a  $\alpha$ -sinucleína demonstra a capacidade deste metal na aceleração da agregação de proteínas em concentrações fisiologicamente relevantes, sem alterar as estruturas fibrilares resultantes.

O  $\beta$ A inibe a actividade da citocromo oxidase e da alfa-cetoglutarato desidrogenase na mitocôndria. Uma superexpressão da  $\alpha$ -sinucleína prejudica a função mitocondrial e aumenta o stress oxidativo.

## IV. Ferro na doença de Parkinson

### 4.1. Homeostase do Ferro

O ferro é um elemento essencial para várias funções metabólicas, participando no transporte de  $O_2$ , síntese de DNA, reacções redox na cadeia de transporte de electrões, além de fazer parte da estrutura molecular de diversas proteínas e enzimas (Siqueira, Almeida e Arruda, 2006). Nos mamíferos é utilizado principalmente na síntese da hemoglobina (Hb) nos eritroblastos, da mioglobina nos músculos e dos citocromos no fígado. Um indivíduo adulto tem no seu organismo 4 a 5 g de ferro, sendo que cerca de 2,5 g na forma de Hb (Grotto, 2008). A deficiência de ferro é um dos problemas nutricionais mais comuns, que acomete populações em todo o mundo, sendo a anemia a manifestação mais relevante. A deficiência de ferro compromete o desenvolvimento cognitivo, aumenta a morbimortalidade materna e infantil, reduz a capacidade de trabalho e a resistência imunológica (Siqueira, Almeida e Arruda, 2006). O ferro pode ser potencialmente prejudicial quando em excesso devido à produção de ERO pela reacção de Fenton (Viatte e Vaulont, 2009). Assim, a homeostase deste elemento exige do organismo uma regulação extremamente eficaz, entre a concentração de ferro absorvido, reciclado e excretado.

A capacidade de excreção do ferro, em mamíferos, é limitada uma vez que não existe uma via reguladora activa para tal. Dessa forma, a homeostase sistémica do ferro é controlada, principalmente, pela regulação entre a quantidade absorvida no intestino e reciclada pelo sistema reticuloendotelial (Constante et al., 2006).

Para que ocorra a absorção de ferro inorgânico ( $Fe^{3+}$ ), forma encontrada nos alimentos de origem vegetal e nos cereais, é necessária a sua redução à forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ ) (Siqueira, Almeida e Arruda, 2006). Esta tarefa é realizada na superfície apical dos enterócitos pela enzima citocromo-b duodenal (DCytb) (Santos et al., 2009) A absorção do ferro é realizada pelos enterócitos no intestino delgado proximal, perto da junção gastro-duodenal.

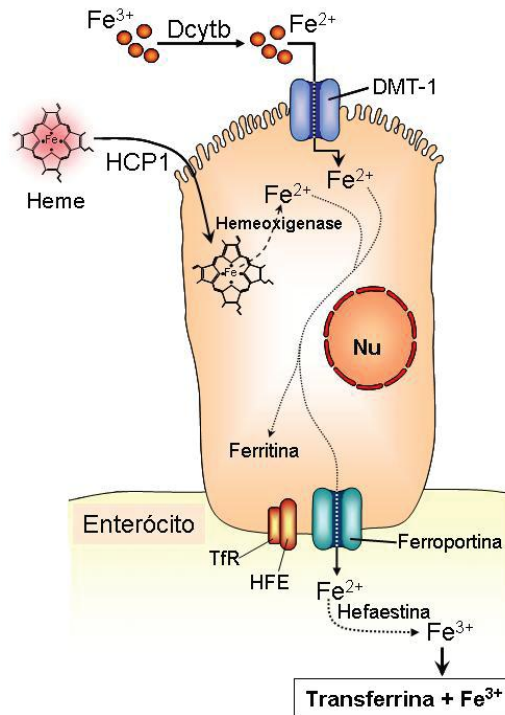
A proteína transportadora de metais divalentes (DMT-1), presente na superfície apical da célula, além do  $Fe^{2+}$ , transporta  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Zn^{2+}$ . Para exercer a sua função, a

DMT-1 necessita que o ferro tenha sido convertido de  $\text{Fe}^{3+}$  para  $\text{Fe}^{2+}$ . O ferro resultante é transportado para o enterócito (Ganz, 2007). O ferro absorvido pelos enterócitos pode ser armazenado como ferritina ou ser transferido para o plasma. (Atanasiu et al., 2006). O ferro ferroso é transferido para a circulação portal através da ferroportina (FPN), presente na membrana basolateral do enterócito. A FPN é a única proteína responsável pelo efluxo de ferro das células. Após deixar o enterócito, o ferro ferroso, para se ligar à transferrina (Tf), deve ser oxidado a ferro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Esta oxidação é potencializada pela hefaestina (Heph) (Santos et al., 2009). Mutações que inativam a FPN ou a Heph levam ao prejuízo na absorção e acumulação de ferro no enterócito e nos macrófagos. A Tf é uma glicoproteína plasmática, que se liga firmemente e de forma reversível ao ferro, tendo afinidade pelo ferro na forma férrica. É responsável pelo transporte do ferro para os tecidos que possuem receptor de transferrina 1 (TfR1) (Siqueira, Almeida e Arruda, 2006). 30% da Tf está saturada com ferro.

Quando complexado à Tf, a internalização do ferro é iniciada pela ligação a um receptor específico (TfR) presente na membrana plasmática das células. Esse receptor é um homodímero transmembranar constituído de duas subunidades idênticas ligadas por pontes dissulfeto. A afinidade do TfR à Tf diférrica parece ser determinada pela proteína da hemocromatose (HFE) produzida pelo gene da hemocromatose, também presente na membrana plasmática dos eritroblastos. Dentro do citosol a HFE forma um complexo com a Tf (Grotto, 2008). O complexo Tf-TfR-HFE é endocitado pelas células endoteliais. Este compartimento endossomal é acidificado por bombas de prótons, levando à redução do pH, induzindo a libertação do ferro férrico da Tf, por reduzir a afinidade desta proteína com o ferro férrico. A DMT1 presente na membrana do endossoma transporta para o citoplasma apenas o ferro ferroso (Dunn et al., 2007). A redução do ferro neste compartimento é realizada possivelmente pela proteína redutora sexto antígeno epitelial transmembranar da próstata 3 (STEAP, do inglês *six transmembrane epithelial antigen of prostate 3*) permitindo assim o transporte do ferro para fora do endossoma através da DMT1 (Atanasiu et al., 2006). Tanto a Tf sem ferro (apotransferrina) como o TfR1 retornam à superfície da célula para um ciclo posterior.

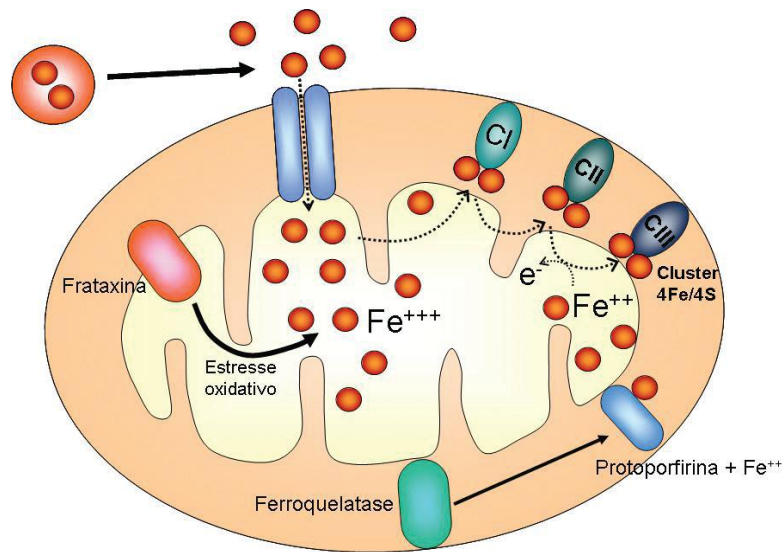
O ferro na forma heme, contido nas carnes vermelhas, é melhor absorvido do que a forma inorgânica (Kozlowski et al., 2009) A internalização do ferro heme da dieta é feita pela proteína transportadora do heme-1 (HCP-1), presente na membrana apical das

células do duodeno. O heme liga-se à membrana em escova dos enterócitos duodenais e à proteína transportadora, atravessando intactamente a membrana plasmática, importando o heme extracelular que irá ligar-se à membrana das vesículas no citoplasma (Figura 11).



**Figura 11.** O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: ferredutase; DMT-1: transportador de metal divalente- 1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor da transferrina (adaptado de Grotto, 2008)

A frataxina, proteína localizada na membrana interna e na matriz mitocondrial, regula a utilização do ferro mitocondrial, destinando o ferro à síntese do heme ou à gênese dos clusters Fe-S (Figura 12). Ainda não está totalmente esclarecido o mecanismo de entrada do ferro na mitocôndria. Em eritroblastos de murino foi descrito um transportador conhecido como mitoferrina (Grotto, 2008). A frataxina tem um papel importante na prevenção de formação de radicais livres na mitocôndria, ao formar um complexo com o ferro. Assim, a falta de frataxina promove a acumulação de ferro mitocondrial, em detrimento do ferro citosólico.



**Figura 12.** Internalização do ferro na mitocôndria e a regulação exercida pela frataxina na síntese do heme e dos “clusters” Fe-S. A conversão do ferro férrico em ferroso é importante para que a ferroquelatase reconheça o ferro e o incorpore no anel pirrólico para formar o heme (adaptado de Grotto, 2008)

As proteínas reguladoras de ferro (IRP) participam na manutenção da homeostase de ferro intracelular. As IRP1 e IRP2 ligam-se a elementos reguladores de ferro (IRE) presentes no mRNA que codifica proteínas envolvidas com o metabolismo de ferro, controlando as suas traduções. Os IRE são sequências de mRNA constituídos por 30 nucleótidos, localizados nas regiões não codificadoras 3' ou 5'. Quando os IRE estão na extremidade 3', a ligação com a IRP protege o mRNA da degradação e prossegue a síntese proteica. A ligação da IRP com o IRE localizado na extremidade 5' inibe a tradução do mRNA em proteína, diminuindo a sua síntese. Quando há excesso de ferro intracelular, as IRP são inativadas por dois mecanismos distintos: a IRP1 é uma proteína citosólica bifuncional que contém um cluster Fe-S. Na presença de ferro, a IRP1 age como uma aconitase e na sua ausência, a IRP liga-se aos IREs de vários transcritos da homeostase do ferro. Por outro lado, a IRP2 é inativada por um mecanismo dependente de ferro. Os elementos IRE próximos da região não codificadora 3', quando não estão ligados ao IRP existe uma clivagem do mRNA e conseqüentemente a síntese protéica será interrompida. A não ligação do IRP aos IRE localizados próximos à região 5' induz a síntese proteica porque o complexo de inicialização da tradução está activado (Grotto, 2008).

O TfR e a ferritina são dois alvos importantes das IRP e são responsáveis, respectivamente, pela captação e armazenamento do ferro celular. Daí o ferro poder activar o sistema IRP/IRE; ser sequestrado por chaperonas ou proteínas de armazenamento (ferritina, neuromelanina, hemossiderina, MTs); ser oxidado a  $Fe^{3+}$  e ser libertado da célula via ceruloplasmina ou ferroportina; ou gerar ERO, participando em reacções catalisadas por ele (Fernandez et al., 2007).

A hepcidina é um peptido circulante recentemente descrito, desempenhando um papel fundamental na homeostase do ferro. A FPN é o receptor da hepcidina e a interacção hepcidina-FPN controla os níveis de ferro nos eritrócitos, hepatócitos e macrófagos. O complexo hepcidina-FPN é internalizado nos domínios da membrana basolateral dos macrófagos e a FPN é degradada, bloqueando a libertação do ferro dessas células.

#### **4.2. Mecanismo neurodegenerativo de ferro**

O cérebro é o segundo órgão a seguir ao fígado que contém concentrações mais elevadas de ferro. A alta concentração de ferro no cérebro está relacionada com o aumento da taxa do metabolismo oxidativo para manter o gradiente iónico da membrana, o transporte axonal e a transmissão sináptica (Kozłowski et al., 2009).

As concentrações intracelulares de ferro nos eritrócitos permanecem baixas, o que determina a absorção contínua de ferro. No cérebro as concentrações não são fixas, mas aumentam com a idade e em várias doenças, e diminuem em caso de deficiência do ferro na dieta. As concentrações elevadas de ferro no encéfalo humano adulto encontram-se nos núcleos da base, especialmente no globo pálido e na substância negra (Fernandez et al., 2007). A barreira hemato-encefálica (BHE) e a barreira hemato-liquórica (BHL) controlam a captação do ferro para dentro do cérebro pela regulação da expressão de receptores de proteínas de transporte.

Uma grande quantidade de ferro está armazenada no sistema nervoso pela neuromelanina. O ferro pode migrar progressivamente para o citosol durante a patogênese da DP, aumentando as ERO, fazendo com que os neurónios dopaminérgicos nigrais sejam susceptíveis ao stress oxidativo.

Um terço a três quartos de todo o ferro cerebral está armazenado dentro das células gliais, ligado à ferritina ( $\text{Fe}^{3+}$ ) na sua forma solúvel, protegendo as células do dano oxidativo causado pelo ferro livre ( $\text{Fe}^{2+}$ ). A hemossiderina armazena ferro na sua forma insolúvel (Fernandez et al., 2007). Os oligodentrócitos são as células cerebrais que mais contêm ferro. A neuromelanina não é detectável durante o primeiro ano de vida, aumentando a partir da segunda década até aos 80 anos. A ferritina na substância negra é muito baixa no primeiro ano de vida, aumenta até aos 20 anos e permanece constante até aos 90 anos de idade (Fernandez et al., 2007). Nos indivíduos normais, os níveis de ferro aumentam até à quarta década de vida, permanecendo estáveis até aos 90 anos na substância negra. Quando há alteração na BHE, o ferro é capturado continuamente pelo cérebro, levando a uma acumulação excessiva deste metal.

Estudos mostraram a associação entre a DP e os vários genes envolvidos no metabolismo e homeostase do ferro:

Fellestchin et al. (2003) e Fogilieni et al. (2007) identificaram mutações nos genes que codificam as cadeias leves da ferritina (FTL) em neuroferritinopatias e ceruloplasmina em aceruloplasminemia (FTH1) (Song et al., 2010).

Borie et al. (2002) investigaram a presença de mutações no exão 7, de G para A, da transferrina, e correlacionaram-na com a DP.

Hochtrasser et al. (2004) sequenciaram o exão do gene da ceruloplasmina e investigaram a associação da mudança de A a T no exão 9 que resulta da mudança na posição 544 com a DP e com hiperecogenicidade.

Na hemocromatose hereditária existe uma absorção exacerbada do ferro, em função da mutação na proteína HFE. Esta é uma proteína que influencia a absorção do ferro celular, o que constitui um factor de risco para o desenvolvimento da DP (Fernandez et al., 2007). As variantes C282Y e H63D estão associadas com a doença da hemocromatose (González- Baptista et al., 2007).

Mutações na DMT-1, envolvida no transporte do ferro e que protege contra os danos de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (neurotoxina que induz efeitos semelhantes à DP

quando injectada em roedores) (Salazar et al., 2008) e MPTP, podem levar à acumulação de ferro e conseqüentemente à DP (Mancía, 2010).

## V. Zinco na doença de Parkinson

### 5.1. Homeostase do zinco

Depois do ferro, o zinco é o elemento mais abundante no corpo. Uma concentração mais alta do zinco é encontrada a nível cerebral e nas células  $\beta$  pancreáticas. A quelatação do zinco, por agentes quelantes, a nível cerebral ocorre maioritariamente a nível do hipocampo, amígdala e córtex. Na sua forma iónica o zinco exerce um papel importante na modulação, na neurotransmissão e função sináptica (Fernandes e Mafra, 2005).

O zinco é componente estrutural da SOD. A SOD extracelular encontra-se em níveis reduzidos em situações de deficiência de zinco.

Além da actividade antioxidante, o zinco é indispensável para actividades de enzimas envolvidas directamente com a síntese de DNA e RNA, como por exemplo, da DNA e RNA polimerase e, parece ter efeito modulador e protector para o crescimento de células cancerosas (Fernandes e Mafra, 2005). O zinco influencia também a divisão celular, pela actividade da dioxitimidina quinase e adenosina (5') tetrafosfato (5')-adenosina. Defeitos na síntese da função do mRNA parecem ser induzidos pela perda de zinco, pois o mesmo desempenha papel em diversos factores de transcrição, proteínas que reconhecem sequências específicas de DNA e regulam a transcrição de genes (Fernandes e Mafra, 2005).

As MTs exercem um papel importante na homeostase do Zn(II). A MT-3 apresenta um papel relevante na homeostase neuronal do Zn(II) em regiões como o hipocampo. Como já foi dito anteriormente, as MTs são pequenas proteínas de 61-68 aminoácidos com resíduos de cisteína e com dois domínios para a ligação de Zn(II). O stress oxidativo interfere com a ligação do Zn às MTs.

O zinco participa na estrutura da MT, que tem propriedades antioxidantes em condições como exposição a radiações, drogas e metais pesados, inibindo a propagação de radicais livres através de ligações selectivas de iões de metais pró-oxidantes como o ferro e o cobre. Especula-se que em situações de stress oxidativo, a MT liberta o zinco ligado à sua molécula (Kozlowski et al., 2009).

A deficiência do zinco é acompanhada por consequências dramáticas como a erosão do tracto gastrointestinal, lesões de pele, insuficiência cardíaca, ou malformações do cérebro e do sistema reprodutor masculino. O zinco livre é um factor chave na morte neuronal associada com isquémia bem como outras doenças neuropatológicas. A distribuição do metal em concentrações adequadas na membrana plasmática e nos compartimentos intracelulares, e um fornecimento adequado de zinco, previne a acumulação e os efeitos tóxicos deste metal (Kozlowski et al., 2009).

A complexidade da homeostase do zinco deve-se às inúmeras proteínas envolvidas no seu transporte. Existem pelo menos 10 membros da família dos transportadores de Zn (II) (ZnT) e 3 distintas isoformas de MTs (Kozlowski et al., 2009). Os ZnT já caracterizados são ZnT-1, ZnT-2, ZnT-3 e ZnT-4. Os ZnT-1 localizam-se na membrana basolateral de enterócitos e células tubulares renais e são reguladas pela quantidade de zinco ingerido. Os ZnT-2 estão envolvidos na captação do zinco no intestino, rins e nos testículos. Já o ZnT-3 está presente nas vesículas neuronais e nos testículos. Por último, o ZnT-4 localiza-se a nível neuronal e nas glândulas mamárias (Fernandes e Mafra, 2005). Os ZnT-1 e ZnT-3 são altamente expressos no cérebro (Kozlowski et al., 2009). A expressão de ZnT-1 está relacionada com o aparecimento do zinco sináptico e está envolvida na redução da toxicidade de Zn(II).

O zinco é encontrado principalmente no compartimento intracelular, contudo, uma fracção pequena deste metal encontra-se na circulação, estando ligada a proteínas plasmáticas como a albumina, alfa-2-macroglobulina e Tf. Os níveis plasmáticos de zinco são homeostaticamente regulados.

A mitocôndria possui uma capacidade elevada de captação de zinco. Um bloqueio neste processo leva à acumulação de Zn(II) a nível do citosol. A mitocôndria por si só pode fornecer uma reserva intracelular de zinco e sob determinadas condições pode sequestrar o zinco relibertando-o para o citoplasma.

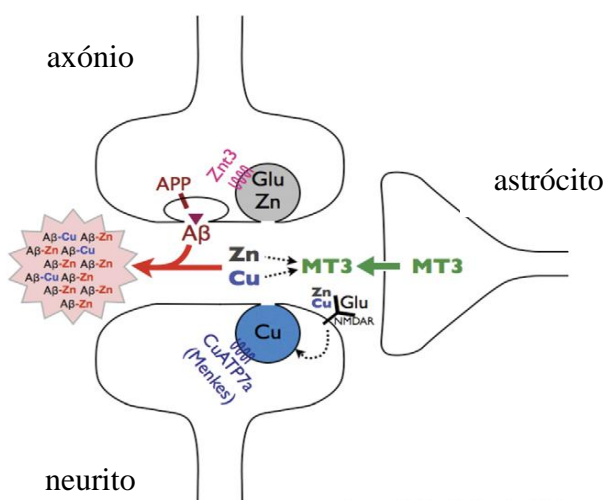
O zinco é um neuromodulador nas sinapses excitatórias e possui um papel considerável na resposta ao stress oxidativo e faz parte de enzimas que contribuem para a manutenção e integridade funcional do cérebro. Na DP ocorre uma diminuição das

concentrações de zinco no fluido cerebrospinal e um significativo aumento na substância negra.

## 5.2. Mecanismo neurodegenerativo do zinco

Um desequilíbrio na homeostase do zinco está relacionado com a disfunção mitocondrial e o stress oxidativo, envolvendo-o no envelhecimento cerebral e /ou neurodegeneração. O zinco está envolvido em processos de apoptose e necrose celular, podendo assim activar diferentes mecanismos de morte dentro dos neurónios (Kozlowski et al., 2009).

O Zn(II) é libertado juntamente com o glutamato em muitas sinapses excitatórias (Figura 13). Este pode entrar nos neurónios através dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) e ácido propiónico 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) (AMPA), através dos canais de cálcio, ou ainda dos ZnTs. Assim, os dendritos a nível dos neurónios pré-sinápticos são carregados por Zn-T3, que vão transportar o zinco ao longo do axónio. Nos terminais pré-sinápticos, as vesículas contêm glutamato e zinco livre. Sob determinadas condições, ocorre a exocitose do zinco e do glutamato, ocorrendo despolarização e abertura dos canais permeáveis do zinco, ligando aos seus receptores na célula pós-sináptica. Todos os canais de cálcio têm alguma permeabilidade ao zinco.



**Figura 13.** Transporte sináptico do zinco (Adaptado de Barnham e Bush, 2008)

Como já foi dito, as MTs são pequenas proteínas que contêm resíduos de cisteínas e ligam-se a metais, incluindo o zinco (Konoha; Sadakane; Kawahara, 2006). Quando

ocorre oxidação ou nitrosilação, estas libertam zinco para o fluido extracelular. O óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) ou o peroxinitrito interagem, preferencialmente com a MT-3, e promovem a libertação de Zn(II) das MTs. Pode haver inibição da citocromo oxidase, levando ao aumento da libertação de electrões e formação de superóxido. NO<sup>•</sup> pode reagir com O<sub>2</sub><sup>-</sup> formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). A geração de peroxinitrito *in vivo* pode levar à oxidação e nitração de lipídios, DNA e proteínas.

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que uma exposição a concentrações elevadas de Zn(II) levam à morte neuronal e elevação neuronal dos níveis de Zn complexado. Supõe-se que estes danos sejam atribuídos aos movimentos trans-sinápticos do catião desde a sua libertação dos terminais nervosos até aos neurónios pós-sinápticos. Este processo designa-se por translocação do Zn(II).

Por si só o zinco não é um agente oxidante. O Zn(II) pode levar a produção de ERO através da via mitocondrial ou extramitocondrial. Estudos realizados a nível das mitocôndrias mostraram que o zinco inibe a respiração celular interferindo com o canal de transporte do electrão; inibe o complexo III da mitocôndria no Citocromo bc1 (Ubiquinona-citocromo c oxidoredutase) e inibe o complexo I mitocondrial por inibição de alfa cetoglutarato desidrogenase (Kozlowski et al., 2009).

A nível extra mitocondrial, o zinco aumenta a actividade da NADPH oxidase (enzima que cataliza a produção de superóxido a partir do O<sub>2</sub> e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH)) e induz a enzima óxido nítrico sintase. O Zn(II) sensibiliza a libertação de ERO.

O zinco promove também a activação de Poli-ADP-ribose polimerase (PARP), promovendo a necrose celular. O stress oxidativo activa a PARP, que transfere fracções de ADP-ribose da NAD<sup>+</sup> para as proteínas alvo. A continuação desta activação resulta na depleção de NAD<sup>+</sup> e ATP e consequente morte celular (Christopher., Koh., Bush 2005).

Estudos recentes mostraram que a interacção entre  $\alpha$ -sinucleína e os metais como o cobre, o ferro e o zinco leva à agregação proteica mas ainda surgem dúvidas se estas observações *in vitro* são fisiologicamente relevantes (Barnham e Bush, 2008).

## **VI. Abordagem Terapêutica da doença de Parkinson**

A DP não tem cura. O tratamento visa o controlo dos sintomas, aumentando consideravelmente a expectativa de vida dos pacientes tratados. Sem tratamento, a DP progride entre 5 a 10 anos até um estágio rígido, acinético, onde o paciente não consegue cuidar de si mesmo (Melo, Barbosa e Caramelli, 2006). Nenhum fármaco ou abordagem cirúrgica impedem a progressão da doença porque as células cerebrais não sofrem renovação como outras células no organismo. O tratamento passa pela terapia protectora, sintomática e cirúrgica (Rodrigues e Campos, 2006).

Pode-se dividir as estratégias de tratamento da DP em medidas farmacológicas, medidas não farmacológicas e tratamento cirúrgico.

O tratamento medicamentoso tem por objectivo aumentar os níveis de dopamina, que se encontram reduzidos, a nível da substância negra, mantendo a amplitude dos movimentos, prevenindo a rigidez e contracções musculares, diminuindo os tremores e estimulando a expressão facial e as actividades motoras que impliquem precisão.

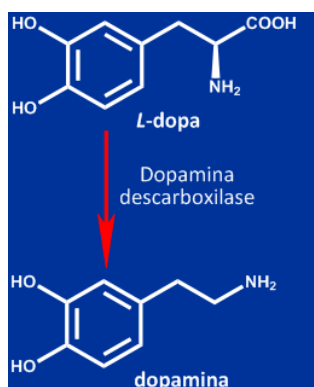
As alternativas farmacológicas disponíveis, na actualidade, para a DP limitam-se às seguintes opções:

- Dopaminomiméticos: levodopa (L-dopa)
- Agonistas dopaminérgicos
- Anticolinérgicos
- Inibidores selectivos da MAO
- Inibidores da COMT
- Amantadina
- Quelantes de metais

### **6.1. Dopaminomiméticos: Levodopa (L-dopa)**

Uma vez que a dopamina é uma amina, não consegue ultrapassar a BHE. Por isso, administra-se levodopa (L-dopa) que é precursor da dopamina. A L-dopa no cérebro é

transformada em dopamina, através de descarboxilação, pela acção da enzima dopa-descarboxilase (Figura 14) restabelecendo assim os níveis em deficiência daquele neurotransmissor.



**Figura 14.** Síntese de dopamina a partir de L-dopa (adaptado de Nova esperança de tratamento para o mal de Parkinson, 2011)

Grande parte da L-dopa administrada é descarboxilada pela MAO, sendo que apenas 1-3 % aproximadamente da dose administrada chega inalterada ao cérebro. Para diminuir a concentração de L-dopa degradada na via sistémica, esta é associada a um de dois inibidores da descarboxilase periférica actualmente disponíveis: carbidopa ou benserazida (Rodrigues e Campos, 2006). O Sinemet<sup>®</sup> é a associação de cardidopa e L-dopa. O Madopar<sup>®</sup> é a associação de benserazide e L-dopa.

## 6.2. Agonistas dopaminérgicos

### *Bromocriptina*

A bromocriptina age fortemente sobre os receptores D2 da dopamina e é um agonista parcial dos receptores D1. Este fármaco é mais eficaz do que a L-dopa no tratamento da fase final da DP porque não necessita de conversão enzimática para realizar a sua actividade e não depende da capacidade funcional dos neurónios nigroestriatais. Os agonistas dopaminérgicos apresentam uma acção mais duradoura do que a L-dopa (Pahwa et al., 2006).

### *Pergolida*

A Pergolida é um agonista dopaminérgico que estimula directamente os receptores D1 e D2. É eficaz em pacientes que ainda não começaram tratamento com L-dopa (Rodrigues e Campos, 2006).

### *Pramipexole*

O pramipexole é um agonista selectivo para os receptores D2 e pode ser utilizado em monoterapia ou em associação com a terapia de L-dopa. Tem como função atenuar os efeitos motores em pacientes que já experimentam estes efeitos induzidos pela diminuição da resposta a L-dopa (Rodrigues e Campos, 2006).

## **6.3. Anticolinérgicos**

A dopamina apresenta um efeito inibitório na liberação da acetilcolina. Na DP os níveis de dopamina diminuem e conseqüentemente aumentam os níveis de acetilcolina. Os anticolinérgicos bloqueiam a acção da acetilcolina endógena ou de agonistas exógenos. Apresentam um largo espectro de acção e são eficazes na diminuição dos tremores e da rigidez (Pahwa et al., 2006).

Exemplos de acetilcolinérgicos são o tri-hexifenidilo (Artane®), a benztropina (Cogentin®) e o biperideno (Akineton®).

## **6.4. Inibidores selectivos da monoaminoxidase (MAO)**

### *Selegilina*

Existem dois tipos de isoenzimas que são a MAO-A e a MAO-B. A MAO-A metaboliza principalmente noradrenalina e serotonina, enquanto a MAO-B metaboliza a dopamina.

A selegilina (Eldepryl®) inibe a enzima MAO-B, aumentando assim a concentração sináptica da dopamina, prolongando o seu período durante o qual permanece na fenda sináptica (Pahwa et al., 2006). Pode ser utilizada como adjuvante no tratamento DP com

L-dopa, uma vez que ela intensifica e prolonga os efeitos desta. A selegilina pode aumentar os efeitos adversos provocados pela L-dopa, pelo que é controverso o seu uso crónico na DP (Rodrigues e Campos, 2006).

### **6.5. Inibidores da catecol-o-aminotransferase (COMT)**

A COMT é uma enzima envolvida no metabolismo das catecolaminas. Esta enzima actua na L-dopa produzindo 3-O-metildopa (3OMD). Os inibidores da COMT inibem a COMT, prolongando o tempo de permanência da dopamina na fenda sináptica (Pahwa et al., 2006).

Um exemplo de inibidor da COMT é a entacapona (COMTAN®).

### **6.6. Amantadina**

É um fármaco antiviral utilizado na terapêutica inicial da DP moderada. Actualmente sugere-se que o seu mecanismo de acção na DP passa pelo aumento da libertação de dopamina.

### **6.7. Quelantes de metais**

Os iões metálicos são importantes cofactores para muitos transportadores, factores de transcrição e enzimas. Qualquer distúrbio na homeostase dos metais leva à formação de ERO, provocando danos a nível das células, desenvolvendo diferentes doenças neurodegenerativas.

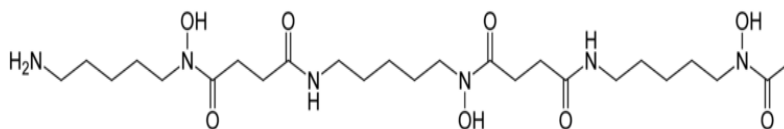
As novas estratégias para o tratamento de doenças neurodegenerativas continuam a crescer. O uso de agentes quelantes que captam iões metálicos livres presentes em excesso a nível cerebral, pode apresentar uma promissora opção terapêutica. Este tratamento ajuda a remover iões como o cobre, ferro e o zinco responsáveis pela indução de efeitos neurotóxicos (Bolognin et al., 2009).

O objectivo desta terapia pode ser alcançado através da complexação do metal em excesso, interagindo com as proteínas e restaurando o equilíbrio correcto entre os principais biometais.

É importante que os quelantes possuam a capacidade de atravessar a BHE para se ligarem selectivamente aos iões metálicos sem alterarem a homeostase destes no organismo e apresentem uma afinidade adequada para removerem o excesso de iões envolvidos na DP (Bolognin et al., 2009).

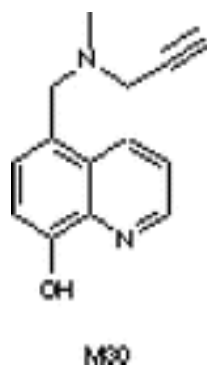
Estudos recentes mostraram que os quelantes de ferro oferecem uma neuroprotecção significativa *in vitro* e *in vivo*. A incorporação de um quelante de ferro seguro e eficaz no regime terapêutico actualmente usado para DP, permite a redução da dose efectiva do medicamento e complementa as suas acções. O quelante de ferro tem o potencial de prevenir a indução de ERO por parte do ferro, o stress oxidativo e a agregação de  $\alpha$ -sinucléina.

A desferrioxamina (Figura 15) é um quelante hidrofílico que possui afinidade para se ligar ao cobre, ferro e zinco (Zheng et al., 2005; Bolognin et al., 2009). Possui características importantes na redução do stress oxidativo e inibição dos radicais livres (Angel et al., 2002). Tem uma biodisponibilidade oral mas não consegue ultrapassar a BHE ( Duce e Bush, 2010).



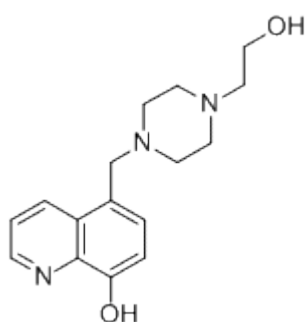
**Figura 15.** Estrutura da desferrioxamina (Wikipedia, the free encyclopedia, 2011)

O 5-(N-metil-N-propargylaminometil)-8-hidroxiquinolina (M30) (Figura 16) é também um quelante de ferro com uma potencialidade equivalente à desferrioxamina. Mostrou ser eficaz na inibição da peroxidação lipídica induzida pelo ferro (Zheng et al., 2005). Estas propriedades juntamente com a inibição selectiva de MAO-B, fazem com que o M30 seja um bom candidato para o tratamento da DP.



**Figura 16.** Estrutura do M30 (adaptado de Bolognin et al., 2009)

O 5-[4-(2-hidroxi-etil) piperazina-1-metil]-quinolina-8-ol (VK28) (Figura 17) representa uma nova classe de fármacos que complexam o ferro, com uma potencialidade igual à desferroxamina na inibição da peroxidação lipídica provocada pelo excesso de ferro a nível cerebral. Estudos em ratos, mostraram a eficácia deste quelante na protecção contra 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) na indução de lesão nos neurónios dopaminérgicos, sem afectar o metabolismo de noradrenalina ou serotonina (Bolognin et al., 2009).



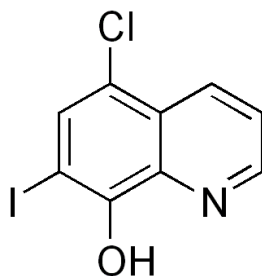
**Figura 17.** Estrutura do VK-28 (adaptado de Bolognin et al., 2009)

Estudos em ratos mostraram que após uma isquémia transitória do prosencéfalo, quelantes de zinco acumularam, especificamente, nos neurónios em degeneração. Isto foi impedido pela injeção intraventricular de um agente quelante de zinco, Cálcio-ácido etilendiamino tetra-acético (Ca-EDTA) (Angel et al., 2002).

O DP-b99 é um quelante hexadentado derivado do ácido 1,2-bis (2-aminofeniloxi) etano-N,N,N',N'-tetra acético) (BAPTA), tendo a capacidade de se ligar a metais bivalentes, quelatando os metais cobre e zinco, diminuindo a acumulação destes a nível

dos neurónios. Foi mostrada a sua eficácia em diminuir os efeitos de excitotoxicidade *in vivo* e *in vitro*. (Bolegnin, 2009).

O 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (clioquinol) (Figura 18) é um quelante lipofílico que atravessa livremente a BHE, ligando-se selectivamente ao  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  (Schäfer et al., 2007), prevenindo a neurotoxocidade *in vivo* induzida pelo MPTP (Bolognin et al., 2009).



**Figura 18.** Estrutura do clioquinol (Wikipedia, the free encyclopedia, 2011)

Diversas abordagens estão actualmente em desenvolvimento para doenças neurodegenerativas agudas e crónicas que visam modificar as funções dos iões metálicos através da terapia de quelatação. Será necessário fazer mais estudos *in vivo* neste âmbito para poder progredir com sucesso nesta via terapêutica.

## VII. Conclusão

O envelhecimento da população é hoje um fenómeno mundial característico dos países desenvolvidos, pelo que é espectável que a incidência e a prevalência da DP venham a aumentar no futuro. A DP consiste numa patologia crónica e progressiva esporádica e idiopática, que se deve primeiramente à morte dos neurónios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra mesencefálica e conseqüente diminuição de dopamina. Devido à atrofia e à degeneração dos núcleos da base, o paciente com DP apresenta distúrbios motores frequentes, como tremor, rigidez e bradicinésia.

As causas e os mecanismos responsáveis pela DP não são bem conhecidos. São vários os factores envolvidos nessa doença, mas nenhum foi confirmado como factor de risco.

O tratamento farmacológico é essencial para a minimização de alguns sintomas da doença, permitindo aos pacientes manterem a sua independência para realização das actividades do dia-a-dia e melhorando a sua qualidade de vida. A terapia farmacológica, a nutrição e a fisioterapia, juntos têm um papel primordial no tratamento desta patologia, reabilitando o paciente no aspecto funcional e introduzindo-o novamente na sociedade. É importante a educação dos pacientes e dos seus familiares.

A DP caracteriza-se pela presença de inclusões intraneurais citoplasmáticas, conhecidas por CL. Estes encontram-se localizados a nível das células nervosas na substância negra.

O stress oxidativo, a disfunção mitocondrial e a predisposição à degeneração celular pela susceptibilidade genética às toxinas ambientais e defeitos genéticos geram toxinas endógenas e /ou dificultam a sua remoção. Tendo como mecanismo básico a disfunção do sistema proteossomal e da ubiquitina que leva à acumulação de proteínas, do tipo  $\alpha$ -sinucleína, Parkin, entre outras. Desta forma ocorre a degeneração dos neurónios dopaminérgicos.

Os iões metálicos são essenciais para o metabolismo celular, actividades enzimáticas, funções mitocondriais, neurotransmissão e desenvolvimento. O desequilíbrio da homeostase dos biometais como o cobre, o ferro e o zinco leva à acumulação destes a

nível cerebral. Estes induzem directa ou indirectamente o stress oxidativo levando à formação de radicais livres que provocam citotoxicidade das células neuronais, relevando a sua importância na patogénese da DP.

A terapia quelante é muito importante para a complexação de metais acumulados a nível cerebral. Daí a especificidade e selectividade do agente quelante serem cruciais para um tratamento eficaz. É importante conseguir perceber a etiologia da doença para permitir um melhor diagnóstico e tratamento.

Assim o conhecimento dos mecanismos patofisiológicos da DP facilita a procura de um único alvo patogénico a ser tratado, evitando a progressão da doença, podendo num futuro próximo, quem sabe, chegar à cura.

### VIII. Bibliografia

Angel, I., et al. (2002). Metal ion chelation in neurodegenerative disorders. *Drug Development Research*, 56, pp. 300-309.

Atanasiu, V., Manolescu, B. e Stoian, I. (2006). Heparin – Central Regulator Of Iron Metabolism. *European Journal of Haematology*, 78, pp.1-10.

Bairele, M., et al. (2010). Possible effects of blood copper on hematological parameters in elderly, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 46 (6), pp. 463-470.

Barnham, K.J. e Bush, A.I. (2008). Metals in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, pp. 222-228.

Bolognin, S., et al. (2009). Chelation Therapy for Neurodegenerative Diseases. *Medicinal Research Reviews*, 29 (Nº4), pp. 547-570.

Braak, H., et al. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 24, pp. 197-211.

Bravo, P.A.F. e Nassif, M.C. (2006). Doença de Parkinson: terapêutica actual e avançada. *Infarma*, 18 (9/10), pp. 25-29.

Brown, G.C. e Borutaite, V. (2004). Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochimica, Biophysica Acta*, 1658, pp. 44-49.

Christopher, J.F., Koh, J.Y. e Bush, A.I. (2005). The neurobiology of zinc in health and disease. *Nature reviews neuroscience*, 10, pp. 1-14.

Chaudhuri, K.R., et al. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*, 5, p. 235.

Chwiej, J. (2010). The use of cluster and discriminate analysis in the investigations of the role of trace metals in the pathogenesis of parkinson's disease. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 24, pp. 78-88.

Henchcliffe, C. e Beal, M. F. (2008). Mitochondrial biology and oxidative stress In Parkinson disease pathogenesis. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4 (11) pp.600-609.

Constante, M. et al. (2006). Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidin levels in iron overload and inflammation. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 291, pp. 229-237.

Duce, J.A. e Bush, A.I. (2010). Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Progress in Neurobiology*, 92, pp. 1-18.

Elbaz, A. e Tranchant, C. (2007). Epidemiologic studies of environmental exposures in 271 Parkinson's disease. *Journal Neurological Science*, 262, pp. 37-44.

Fernandes, A.G. e Mafra, D. (2005). Zinc and cancer: a review. *Revista Saúde*, 1 (2), pp. 144-156.

Fernandez, L.L., et al. (2007). Iron and neurodegeneration. *Scientia Medica*, 17 (4), pp. 218-224.

Ferreira, A.L.A. e Maturba, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estress oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43, (1), pp. 61-68.

Ferrer, I., et al. (2011). Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease, *Journal of Neural Transmission*, 118 (5), pp. 821-839.

Finland, J., Lac, G. e Filaire, E. (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, 36, pp. 327-358.

Gaetani, GF., et al. (2011). Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide. *Blood*, 87,(4), pp. 1595-1599.

Gaetke, L.M. e Chow, C.K. (2003). Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189, pp. 147-163.

Ganz, T. (2007). Molecular Control of Iron Transport. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18, pp.394–400.

Gasser, T. (2004). Parkinson disease, genetics types. [em linha]. Disponível em [http://www.orpha.net/data/patho/GB/UK-parkinson .pdf](http://www.orpha.net/data/patho/GB/UK-parkinson.pdf). [Consultado em 01 de Outubro de 2011].

González - Baptista, H.A. et al. (2007). Association of HFE mutations (C282Y and H63D) with iron overload in blood donors from Mexico city. *Annals of Hepathology*, 6(1), pp. 55-60.

Grotto, H.Z.W. (2008). Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 30 (5), pp. 390-397.

Halliwell, B. e Gutteridge, JMC. (1989). *Free radical in biology and medicine*. New York, Oxford University Press.

Healy, D.G., et al. ( 2008). Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *Lancet Neurology*, 7, pp. 583-590.

Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, 79, pp. 368-376.

Konoha, K., Sadakane,Y. e Kawahara, M. (2006). Zinc neurotoxicity and it's role in neurodegenerative disease. *Journal of health science*, 52 (1), pp. 1-8.

Koury, J.C., Donangelo, C.M. (2007). Homeostase de cobre e actividade física. *Revista de educação física*, 136, pp. 47-65.

Kozlowski, H., et al. (2009). Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). *Coordination Chemistry Reviews*, 253, pp. 2665-2685.

Kruger, R. (2004). Parkinson disease, genetics types. [Em linha]. Disponível em [http://www.orpha.net/data/patho/GB/UK-parkinson .pdf](http://www.orpha.net/data/patho/GB/UK-parkinson.pdf). [Consultado em 01 de Outubro de 2011].

Lana, R. C., et al. (2010). Percepção da qualidade de vida de indivíduos com doença de Parkinson através do PDQ-39. *Revista Brasileira de Fisioterapia*, 11, pp. 397- 402.

Lang, A.E. e Lozano, A.M. 1998. Parkinson's disease. First of two parts. *The New England journal of medicine*, 339 (15), pp.1044-1053

Lee, V.M.Y. e Trojanowski, J.Q. (2006). Mechanisms of Parkinson's Disease Linked to Pathological  $\alpha$ -Synuclein: New Targets for Drug Discovery. *Neuron*, 52, pp. 33-38.

Mancía, R. S., et al. (2010). The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico Biological interactions*, 186, pp. 184-199.

Manzano-León, N. e Mas-Oliva, J. ( 2006). Estress oxidativo, péptido  $\beta$ -amiloide y enfermedad de Alzheimer. *Gaceta médica de México*, 142 (3), pp. 222-238.

Matsumine, H., et al. (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *American Journal of Human Genetics*, 60, pp. 588-596.

Melo, L.M., Barbosa, E.R. e Caramelli, P. (2006). Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease: clinical characteristics and treatment, *Revista de Psiquiatria*, 34 (4), pp. 176-183.

Monteiro, I.J.S. (2008). Doença de Parkinson: as suas bases bioquímicas. Porto, pp. 3-22.

Moreira, S.C., et al. (2007). Parkinson's disease: how to diagnose and to treat. *Revista científica da faculdade de medicina de Campos*, 2 (2), pp.19-29.

Nakabayashi, T.I.K., et al. (2008). Prevalence of depression in Parkinson's disease. *Revista de Psiquiatria clínica*, 35 (Nº6), pp. 219-227.

Nasseh, I.E., et al. (2001). Doenças mitocondriais. *Revista Neurociências*, 9 (2), pp. 60-69.

Nova esperança de tratamento para o mal de Parkinson, [em linha]. Disponível em <http://www.uff.br/sbqrio/novidades/Novidades2009/Parkinson.html> [consultado em 06 de Outubro de 2011].

Nussbaum, R.L. e Ellis, C.E. (2003). Alzheimer's disease and parkinson's disease. *New England Journal of Medicine*, 348, pp. 1356-1364.

Nutt, J.G. e Wooten, G.F. (2005). Diagnosis and initial management of Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, 353 (10), pp. 1021 – 1027.

Oliveira, L.D. (2009). Alterações comportamentais e disfunção mitocondrial em ratos submetidos a modelo animal de esquizofrenia induzido por cetamina. *Cariciúmia*, p. 8

Pahwa, R., et al. (2006). Practice Parameter: Treatment of Parkinson disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology, *American academy of neurology*, 66, pp. 983-995.

Parkinson, J. (1817). *Anessay on the shaking palsy*. London, Whittingham & Rowland.

- Patil, S. B., Kodliwadmath, M.V., Kodliwadmath, S.M. ( 2007). Study of oxidative stree and enzymatic antioxidant in normal pregnancy. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 22 (1), pp. 135-137.
- Piecznik, S.R., Neustadt, J. (2007). Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Experimental and Molecular Pathology*, 83, pp. 84-92.
- Polymeropoulos., et al. (1997). Mutation in the  $\alpha$ -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276, pp. 2045- 2047.
- Ramos, P.C. (2005). A via proteolítica dependente de ubiquitina/proteassoma. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 96, pp.58-63.
- Rawal, N., et al. (2002). New parkin mutations an typical phenotypes in families with autossomal recessive parkinsonism. *Neurology*, 60, pp. 1378-1381.
- Ribeiro, E. M., et al. (2004). Bases genéticas da doença de Parkinson. *Revista brasileira de medicina*, 61, pp.388-398
- Rodrigues, M. e Campos, L.C. (2006). Estratégia para o tratamento com levodopa na doença de Parkinson. *Revista Analytica*, 23, pp. 44-51.
- Salazar, J., et al. (2008). Divalent metal transporter 1 (DMT1) contributes to neurodegeneration in animal models of parkinson's disease. *PNAS*, 105, pp. 18578-18583
- Santos et al. (2009). Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood*, 113(15), pp.3593-3599.
- Schäfer, S., et al. (2007). Copper and clioquinol treatment in young APP transgenic and wild-type mice: effects on life expectancy, body weight, and metal-ion levels. *Journal of Molecular Medicine*, 85, pp. 405-413.

Schapira, A.H. (2009) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurologic Clinics*, 27, pp. 583-603.

Sneider, C.D. e Oliveira, A.R. (2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismo de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 10 (4), pp. 308-313.

Singh, R. P., Sharad, S. e Kapur, S. (2004). Free Radicals and Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Relevance of Dietary Antioxidants. *Journal Indian of Academy Medicine* 5(3), pp: 218-25.

Siqueira, E..M. A., Almeida, S.G.e Arruda, S. (2006). The adverse role of iron in the organism. *Comum Ciência Saúde*, 17 (Nº3), pp. 229-236.

Song, N., et al. (2010). Ferroportine 1 but not hephastin contributes to iron accumulation in a cell model of Parkinson disease. *Free Radical Biology & -medicine*, 48, pp. 332-341.

Speich,M., Pineau, A. e Ballereau, F. (2001). Minerals trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. *Clinica Chimica Acta*, 12, pp. 1-11.

Teive, A.G. H. (2005). Etiopathogenesis of Parkinson Disease. *Revista Neurociências*, 13 (º4), pp. 201-214.

Togo, T., et al. 2001. Glial involvement in the degeneration process of Lewy body-bearing neurons and the degradation process of Lewy bodies in brains of dementia with Lewy bodies. *Journa of the Neurological Sciences*, 184, pp. 71-75.

Wientraub, D., Comella, C.L. e Horn, S. (2008). Parkinson's disease – Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *American Journal Managed Care*, 14, pp.40-48

Wikipedia, the free encyclopedia. [Em linha]. Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Deferoxamine-2D-skeletal.png>. [consultado em 05 de Outubro de 2011].

Wikipedia, the free encyclopedia. [Em linha]. Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Clioquinol.png> [consultado em 05 de Outubro de 2011].

Yeager, M.P., Coleman, R.A. (2010). In silico evidence for glutathione- and iron-related pathogenesis in parkinson disease. *Journal of Neuroscience Methods*, 188, pp. 151-164.

Zheng, H., et al. (2005) Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, pp. 773–783.

