

Juliana Isabel de Sousa da Mota Miranda

**O papel dos metais na doença de Huntington e na esclerose lateral  
amiotrófica**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2016



Juliana Isabel de Sousa da Mota Miranda

**O papel dos metais na doença de Huntington e na esclerose lateral  
amiotrófica**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2016

Juliana Isabel de Sousa da Mota Miranda

**O papel dos metais na doença de Huntington e na esclerose lateral  
amiotrófica**

Atesto a originalidade deste trabalho

---

*Juliana Isabel de Sousa da Mota Miranda*

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

## Sumário

As doenças neurodegenerativas caracterizam-se por apresentar condições bastante debilitantes, ainda sem cura, que afetam pessoas de todas as idades e resultam numa degeneração progressiva e/ou morte dos neurónios, sendo estas as células responsáveis pelas funções do sistema nervoso.

Nos últimos anos, tem-se vindo a descobrir uma relação entre os metais e a neurodegeneração, porém, os mecanismos pelos quais os iões metálicos (ferro, cobre e manganês) interferem com a doença de Huntington e com a esclerose lateral amiotrófica ainda são pouco claros, necessitando de novos estudos e investigações.

Contudo, para a manutenção das funções vitais e homeostase de órgãos individuais são necessários níveis adequados de elementos metálicos vestigiais. Estes níveis vestigiais, apesar de essenciais para a vida, com o excesso de acumulação podem tornar-se altamente tóxicos e possivelmente fatais.

Existem já alguns mecanismos que se pensam estar na base do início da progressão das doenças abordadas, tais como o stress oxidativo através da libertação de espécies reativas de oxigénio e a agregação proteica.

A doença de Huntington é uma patologia neurodegenerativa, autossómica dominante, que afeta o movimento e conduz a um défice cognitivo e perturbações psiquiátricas. É causada pela expansão instável de uma repetição do trinucleótido CAG na região codificante do gene HD, no braço curto do cromossoma 4. Este gene codifica a proteína Huntingtina, onde irá ocorrer uma mutação originando a Huntingtina mutante, levando deste modo à degeneração do estriado e das camadas mais profundas do córtex, sendo estas seletivamente afetadas durante a progressão da doença.

A esclerose lateral amiotrófica é uma doença neurodegenerativa rara, caracterizada pela perda progressiva da função motora e da capacidade respiratória, cuja mortalidade se deve fundamentalmente à repercussão respiratória, em estádios mais tardios da doença. A primeira evidência da doença é o surgimento da fraqueza simétrica num dos

membros, associada à atrofia progressiva dos músculos. Uma mutação no gene que codifica a superóxido dismutase 1, expressa ubiquamente na eliminação de radicais livres, parece estar na base desta patologia, encontrada em 1 a 9% dos pacientes com esclerose lateral amiotrófica.

Sendo estas duas doenças neurodegenerativas raras e pouco estudadas e tendo repercussões negativas na saúde do indivíduo, é de extrema importância a realização de um diagnóstico precoce. Para tal, é necessário que o clínico realize uma boa anamnese, exame físico e ainda a execução de exames complementares de diagnóstico.

Até ao momento, a maioria das doenças neurodegenerativas, não possuem ainda uma cura, não sendo a doença de Huntington e a esclerose lateral amiotrófica uma exceção. O tratamento existente, passa por mecanismos que apenas aliviam a sintomatologia. Atualmente, os quelantes de metais estão a ser testados como mecanismos terapêuticos no combate à acumulação do excesso de metais no organismo, diminuindo desta forma a sua toxicidade. São ainda necessários mais estudos, porém constituem um avanço na medicina.

**Palavras-chave:** Doenças neurodegenerativas; Doença de Huntington, Esclerose lateral amiotrófica; Cobre; Ferro; Manganês; Metais tóxicos; Metais biológicos.

## **Abstract**

Neurodegenerative diseases are characterized by presenting harmful conditions, still without cure, affecting all ages and resulting in a progressive degeneration and/or neurologic death, being these cells the responsible for the neurologic system functions.

In the last years, it has come to discover a link between metals and neurodegeneration, however, the mechanisms by which metallic ions (iron, copper and manganese) cause Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis are still unclear, needing new studies and investigation.

In spite of that, in order to maintain individual organs vital functions and homeostasis, adequate levels of vestigial metallic elements are necessary. These vestigial levels, however essential to life, with excessive accumulation may become highly toxic and potentially fatal.

There are a few mechanisms that are probably in the origin of the addressed diseases progression, as such oxidative stress through reactive oxygen species liberation and proteic aggregation.

Huntington's disease is a neurodegenerative pathology, autosomal dominant, which affects movements and leads to a cognitive deficit and psychiatric perturbations. It is caused by the unstable expansion of a CAG trinucleotide repetition in the HD gene codifying region, in the chromosome 4 short arm. This gene codifies Huntingtin protein, where a mutation leading to a mutant Huntingtin will occur, resulting in the striatum and most deep layers of cortex degeneration, that are selectively affected during the disease progression.

Amyotrophic lateral sclerosis is a rare neurodegenerative disease, characterized by the progressive loss of motor function and respiratory capacity, which mortality is fundamentally due to respiratory repercussion, in the late stages of the disease. The first symptom is symmetric weakness in one of the limbs, associated with a progressive muscle atrophy. A mutation on the superoxide dismutase 1 codifying gene, expressed on the

free radicals elimination, is likely to be on the origin of this pathology, found in 1% to 9% of amyotrophic lateral sclerosis patients.

Both of these diseases are rare and poorly studied and both have negative repercussions in the patient life, so it is of extreme importance the realization of an early diagnosis. Therefore, a good clinical story is necessary, as also as physical exam and complementary diagnosis exams.

Up to this moment, most neurodegenerative diseases don't have a cure yet, and Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis are not an exception. There is treatment available, consisting in mechanisms that only realive the symptoms. Nowadays, metal chelators are being tested as therapeutic mechanisms to fight the excessive metal accumulation on the organism, decreasing, therefore, its toxicity. There are also needed more studies, as they promote a step foward in medicine.

**Keywords:** Neurodegenerative diseases; Huntington's disease; Amyotrophic lateral sclerosis; Copper; Iron; Manganese; Toxic metals; Biological metals.

## **Agradecimentos**

Após 5 anos de esforço e dedicação, é tempo de agradecer a um conjunto de pessoas que contribuíram, de diversas formas, para a concretização do meu percurso acadêmico.

Deixo o agradecimento público aos meus pais, aos meus irmãos, cunhadas e aos meus pequenos sobrinhos, por me darem os pilares essenciais para a minha formação. Obrigada por todo o apoio e carinho.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Exma. Professora Doutora Fernanda Leal, por me ter orientado neste trabalho de final de curso, por toda a prontidão e dedicação disponibilizada ao longo de todo o trabalho.

Aos meus amigos e, em especial ao Rodrigo, por todas as horas de estudo e por todo o apoio que me deram ao longo deste curso, foram, sem dúvida, essenciais para a minha formação acadêmica.

Agradeço, ainda, a todos os professores que me transmitiram os seus conhecimentos nas mais diversas áreas para que se pudesse concretizar este sonho de ser farmacêutica.

# Índice

Sumário.....	V
Abstract.....	VII
Agradecimentos.....	IX
Índice de Figuras.....	XII
Índice de Tabelas.....	XV
Siglas e Abreviaturas.....	XVI
<b>I. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Conceitos gerais sobre a doença de Huntington e a esclerose lateral amiotrófica.....	1
1.2. Importância dos metais no organismo e fatores que influenciam a indução de toxicidade.....	2
1.2.1. Homeostase do ferro.....	4
1.2.2. Homeostase do manganês.....	10
1.2.3. Homeostase do cobre.....	11
1.3. Metodologia.....	15
<b>II. Doença de Huntington.....</b>	<b>17</b>
2.1. Caracterização da doença de Huntington.....	17
2.1.1. Fisiopatologia.....	19
2.1.2. Neuropatologia.....	21
2.1.3. Mecanismos de neurodegeneração.....	23
2.1.4. Mecanismos de eliminação de corpos de inclusão.....	24
2.2. Efeito dos metais na doença de Huntington.....	28
2.2.1. Mecanismo neurodegenerativo do ferro.....	29
2.2.1.1. O papel da mitocôndria no metabolismo do ferro.....	29
2.2.1.2. Disfunção mitocondrial e acumulação de ferro.....	31
2.2.2. Mecanismo neurodegenerativo do manganês.....	34
2.2.3. Mecanismo neurodegenerativo do cobre.....	37
2.3. Diagnóstico da doença de Huntington.....	39
2.4. Terapêutica da doença de Huntington.....	41

2.4.1. Tratamentos farmacológicos.....	41
2.4.2. Agentes quelantes.....	44
2.4.3. Tratamento antioxidante.....	47
<b>III. Esclerose lateral amiotrófica.....</b>	<b>48</b>
3.1. Caracterização da esclerose lateral amiotrófica.....	48
3.2. Superóxido dismutase 1 na esclerose lateral amiotrófica.....	49
3.3. Mecanismos de neurodegeneração.....	52
3.3.1. Excitotoxicidade pelo glutamato.....	53
3.3.2. Stress oxidativo.....	54
3.3.3. Stress do retículo endoplasmático.....	55
3.3.4. Disfunção mitocondrial.....	56
3.3.5. Distúrbio do transporte axonal.....	57
3.3.6. Agregados de superóxido dismutase 1.....	57
3.4. Efeito dos metais na esclerose lateral amiotrófica.....	58
3.4.1. Mecanismo neurodegenerativo do ferro.....	59
3.4.2. Mecanismo neurodegenerativo do cobre.....	61
3.5. Diagnóstico da esclerose lateral amiotrófica.....	62
3.6. Terapêutica da esclerose lateral amiotrófica.....	64
3.6.1. Tratamentos farmacológicos.....	65
3.6.2. Agentes quelantes.....	66
<b>IV. Conclusão.....</b>	<b>69</b>
<b>V. Bibliografia.....</b>	<b>71</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Potenciais mecanismos de sobrecarga de metais no cérebro no desenvolvimento de desordens afetivas e doenças neurodegenerativas.....	4
<b>Figura 2.</b> Estrutura do heme.....	5
<b>Figura 3.</b> O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro.....	7
<b>Figura 3A.</b> Catabolismo da dopamina através das enzimas MAO A e B.....	8
<b>Figura 3B.</b> Síntese da serotonina através da enzima triptofano hidroxilase.....	9
<b>Figura 3C.</b> Síntese da dopamina através da enzima tirosina hidroxilase.....	9
<b>Figura 3D.</b> Síntese do GABA através da enzima glutamato descarboxilase.....	9
<b>Figura 4.</b> Absorção e efluxo do cobre através das barreiras do cérebro.....	12
<b>Figura 5.</b> Metabolismo do cobre intracelular em células cerebrais. As setas representam as rotas do tráfico de cobre intracelular, sendo que as rotas alternativas (transferência direta do CTR1 para as chaperonas de cobre) são indicadas por setas a tracejado.....	13
<b>Figura 6.</b> Representação do gene huntingtina e o impacto da extensão da repetição poliQ no início da DH. O gene huntingtina é transcrito e traduzido numa proteína de 350 kDa.....	17
<b>Figura 7.</b> Estruturas estriatais e não estriatais afetadas na DH.....	22
<b>Figura 8.</b> Exemplificação de mecanismos que levam à neurodegeneração na DH.....	27
<b>Figura 9.</b> Representação do mecanismo de ativação da caspase.....	28
<b>Figura 10.</b> Cadeia transportadora de elétrons.....	29
<b>Figura 11.</b> Internalização do ferro na mitocôndria e a regulação executada pela frataxina na síntese do heme e dos aglomerados de Fe-S.....	31

<b>Figura 12.</b> Potenciais interações do ferro e mHtt na indução do stress oxidativo.....	33
<b>Figura 13.</b> Atividade reduzida da GS na DH.....	36
<b>Figura 14.</b> Efeito do cobre na doença de Huntington.....	37
<b>Figura 15.</b> O ferro e o cobre na DH.....	38
<b>Figura 16.</b> Estrutura da tetrabenezina.....	42
<b>Figura 17.</b> Estrutura da tiaprida.....	42
<b>Figura 18.</b> Estrutura da ciamemazina.....	42
<b>Figura 19.</b> Estrutura da coenzima Q10.....	43
<b>Figura 20.</b> Estrutura da minociclina.....	43
<b>Figura 21.</b> Estrutura da 8-hidroxiquinolina.....	44
<b>Figura 22.</b> Estrutura da deferiprona.....	45
<b>Figura 23.</b> Estrutura da desferrioxamina.....	45
<b>Figura 24.</b> Estrutura da 2,2-bipiridina.....	45
<b>Figura 25.</b> Estrutura do clioquinol.....	46
<b>Figura 26.</b> Estrutura do resveratrol (A) e do polifenol (B).....	47
<b>Figura 27.</b> Esquema representativo dos neurónios motores afetados pela ELA e respectivos músculos associados. Entre os músculos afetados encontram-se os músculos dos membros inferiores, superiores, língua e músculos peitorais envolvidos na respiração.....	48
<b>Figura 28.</b> A) Estrutura da SOD1 humana. O $\beta$ -barril, o <i>loop</i> de zinco e o <i>loop</i> eletrostático são mostrados na cor azul, verde e vermelho, respetivamente. Os iões de cobre e zinco são exemplificados como esferas laranja e azul, respetivamente. B) Mutações na SOD1 relacionadas com a ELA. As mutações SOD1 são representadas como pequenas esferas dentro do monómero da proteína SOD1.....	51

<b>Figura 29.</b> Mecanismos neurotóxicos que originam a ELA mediada pela SOD1.....	53
<b>Figura 30.</b> Esquema representativo da hipótese de agregação da SOD1, com a forma monomérica como precursor da agregação.....	58
<b>Figura 31.</b> Acumulação de ferro no córtex motor de um paciente com ELA. <b>(A)</b> As setas identificam a comparação com um controlo saudável. <b>(B)</b> Acumulação <i>post-mortem</i> de ferro no meio e nas camadas mais profundas da matéria cinzenta cortical.....	59
<b>Figura 32.</b> Estrutura do riluzole.....	65
<b>Figura 33.</b> Estrutura da D-penicilamina.....	67
<b>Figura 34.</b> Estrutura do dietilditiocarbamato.....	67
<b>Figura 35.</b> Estrutura do tetratiomolibdato de amónio.....	67

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Classificação do risco de transmissão da DH com base no número de repetições CAG.....	19
--	----

## **Siglas e Abreviaturas**

3-NP- Ácido 3-nitropiônico

ADN- Ácido desoxirribonucleico

ADP- Adenosina difosfato

AMPA- Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AMPAR- Recetores AMPA

ARN- Ácido ribonucleico

Atox1- Chaperona de cobre antioxidante 1

ATP- Adenosina trifosfato

ATP7A e B- ATPases

BCB- Barreira sangue-fluído cerebrospinal (do inglês *blood-cerebrospinal fluid barrier*)

BHE- Barreira hematoencefálica

CAG- citosina-adenina-guanina

CCO- Citocromo c oxidase

CCS- Chaperona de cobre para superóxido dismutase 1 (do inglês *copper chaperone for superoxide dismutase 1*)

COMT- Catecol O-Metiltransferase

COX- Cicloxigenase

CSF- Flúido cerebrospinal (do inglês *cerebrospinal fluid*)

CTR1- Transportador de cobre 1 (do inglês *copper transporter 1*)

Cu- Cobre

DBH- Dopamina  $\beta$ -hidroxilase

Dcytb- Citocromo b duodenal redutase (do inglês *duodenal cytochrome b reductase*)

DFO- Desferrioxamina

DH- Doença de Huntington

DRPLA- Dentatorubro palidolusiana

ELA- Esclerose lateral amiotrófica

ERA- Espécies reativas de azoto

ERO- Espécies reativas de oxigénio

FAT- Transporte axonal rápido (do inglês *fast axonal transport*)

Fe- Ferro

Fe<sup>2+</sup>- Ferro ferroso

Fe<sup>3+</sup>- Ferro férrico

FPN- Ferroportina

GABA- Ácido  $\gamma$ -aminobutírico (do inglês  $\gamma$ -aminobutyric acid)

Gln- Glutamina

GLT1- Transportador de glutamato (do inglês glutamate transporter 1)

Glu- Glutamato

GluR2- Subunidade do recetor glutamato 2

GS- Glutamina sintetase

GSH- Glutathiona

GTP- Guanosina trifosfato

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Peróxido de Hidrogénio

Hb- Hemoglobina

HCP1- Proteína transportadora do heme-1

HDAC6- Histona desacetilase 6

HFE- Proteína de hemocromatose

His- Histidina

HO- Heme oxigenase

HSP- Proteínas de choque térmico (do inglês *heat shock protein*)

Htt- Proteína huntingtina

IBs- Corpos de inclusão (do inglês *inclusion body*)

IMNs- Inclusões nucleares intraneuronais (do inglês *intraneuronal nuclear inclusions*)

ISCs- Aglomerados ferro-enxofre (do inglês *iron-sulfur clusters*)

IT15- gene *Interesting transcript 15'*

KDa- Kappa Daltons

LDH- Lactato desidrogenase

LMNs- Neurónios motores inferiores (do inglês *lower motor neuron*)

MAO- Monoamina oxidase

MAP-2- Proteína associada ao microtúbulo-2

MBDs- Domínios de ligação de metais N-terminal (do inglês *metal binding domains*)

mHtt- Huntingtina mutante

Mn- Manganês

MTs- Metalotioneínas

NADH- Dinucleótido adenina nicotinamida (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*)

NMDAR- Recetor N-metil-D- aspartato

nNOS- Óxido nítrico sintetase neuronal

NO- Óxido nítrico

Nox2- NADPH-oxidase 2

NU- Núcleo

O<sub>2</sub>- Oxigénio

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>- Superóxido

p62- Proteína de ligação à poliubiquitina

PCR- Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

PET- Tomografia por emissão de positrões (do inglês *positron emission tomography*)

PoliQ- Poliglutamina

RE- Retículo endoplasmático

SDH- Succinato desidrogenase

SLC25A37- Mitoferrina

SNC- Sistema nervoso central

SOD1- Superóxido dismutase 1

SUP- Sistema ubiquitina-proteossoma

Tf- Transferrina

TfR- Receptores específicos da transferrina

Tf-TfR- Complexo transferrina / Recetores específicos da transferrina

TMD-1- Transportador de metais divalentes 1

TTM- Tetratiomolibdato de amónio

Ub- Ubiquitina

UMNs- Neurónios motores superiores (do inglês *upper motor neurons*)

UPR- Resposta de proteínas desdobradas (do inglês *unfolded protein response*)

VDAC1- Proteína dependente da tensão do canal de aniões 1 (do inglês *voltage-dependent anion channel 1*)

## I. Introdução

### 1.1. Conceitos gerais sobre a doença de Huntington e a esclerose lateral amiotrófica

Em 1872, George Huntington publicou uma das primeiras descrições da doença de Huntington (DH), que viria a ter o seu nome. Em toda a sua carreira, fez apenas esta publicação que foi baseada em famílias acompanhadas pelo seu pai, que também era médico (Finkbeiner, 2011).

Contudo, foi apenas em 1993 que a mutação genética causadora da doença foi descoberta pelo consórcio organizado pela *Hereditary Disease Foundation*. Este grupo identificou uma expansão instável do trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) na região codificante (exão 1) do gene HD que codifica a proteína Huntingtina mutante (mHtt), que estaria na base da origem da doença (Gil-Mohapel, 2011). Quando excede as 40 repetições, a doença apresenta penetrância completa que se associam com a disfunção e morte neuronal, predominantemente no corpo estriado, resultando numa tríade de movimento, comportamento e disfunção cognitiva (Jones, 2016).

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma das doenças neuromusculares mais comuns em todo o mundo (Hayashi et al., 2015). As primeiras descrições médicas de casos de ELA remontam a década de 1820, em que o relatório da doença publicado pelo neurobiologista e físico Jean-Martin Charcot de 1874 foi considerado como a primeira caracterização detalhada da doença e foi elogiado pela sua perfeição e completividade. Charcot catalogou cuidadosamente as alterações fisiológicas em larga escala de pacientes com ELA, incluindo a fraqueza, progredindo esta para uma paralisia total dos músculos voluntários, espasticidade ou rigidez, espasmos nos membros, dificuldades mecânicas na pronúncia e ao engolir e eventual dificuldade respiratória, levando deste modo à morte (Mulligan e Chakrabartty, 2013).

Assim, a ELA caracteriza-se por ser uma doença neurodegenerativa fatal caracterizada pela morte seletiva de neurónios motores superiores e inferiores, levando a uma atrofia muscular progressiva, paralisia e morte. Cerca de 80 a 90% dos casos de ELA não

possuem uma componente genética ou causa conhecida e são denominadas esporádicas. Os cerca de 10% restantes dos casos de ELA constituem as formas familiares da doença e são causados por mutações numa série de proteínas, entre as quais se destaca a cobre-zinco superóxido dismutase 1 (SOD1), que representa o exemplo mais bem estudado até ao momento (Chattopadhyay e Valentine, 2009).

Em ambas as patologias neurodegenerativas, o diagnóstico precoce é importante mas também muito complexo devido à similaridade com outras doenças neurológicas (Kaur et al., 2015).

Deste modo, é indispensável a realização de uma cuidada história clínica e posterior realização de exames imagiológicos. Pode ainda ser necessário a realização de exames complementares de diagnóstico como por exemplo a realização de um teste genético com recurso à reação em cadeia da polimerase (PCR) no caso da DH e estudos sorológicos no caso da ELA (Gasser et al., 2003; Martelli, 2014; Silani et al., 2011).

Até ao momento, ainda não existe cura para estas desordens neurodegenerativas, adoptando-se algumas estratégias de tratamentos para aliviar a sintomatologia e retardar a progressão das doenças. Acredita-se que a complexidade dos mecanismos que levam à neurodegeneração contribuem para o insucesso da busca de um tratamento eficaz, sendo que a maioria das estratégias testadas possuem um mecanismo de ação restrito (Gil-Mohapel e Rego, 2011; Martelli, 2014).

## **1.2. Importância dos metais no organismo e fatores que influenciam a indução de toxicidade**

Os iões metálicos possuem um papel fundamental nos processos biológicos, quer de uma forma estrutural, estabilizando várias proteínas ou configurações de ácidos nucleicos, quer funcional. Os metais tornam-se mensageiros secundários ou ativam metaloenzimas (Barnham e Bush, 2014).

Contudo, para a manutenção das funções vitais e homeostase de órgãos individuais são necessários níveis adequados de elementos metálicos vestigiais. Estes níveis vestigiais,

apesar de essenciais para a vida, com o excesso de acumulação podem tornar-se altamente tóxicos e possivelmente fatais (Mitra, 2014).

Para que ocorra a absorção e metabolismo dos vários metais, como por exemplo o ferro e manganês, é necessário um importante transportador de metais divalentes (TMD-1). A expressão alterada deste transportador pode resultar numa modificação da absorção de metais tóxicos e por conseguinte a indução de toxicidade do metal (Menon et al., 2015). Há uma crescente evidência de que os metais desempenham um papel crucial na patogénese de doenças neurodegenerativas. Estas incluem diferentes condições patológicas que partilham processos metabólicos semelhantes, como agregação proteica e stress oxidativo, ambos associados ao envolvimento de metais.

O aumento da acumulação de metais no cérebro está associado a um aumento do stress oxidativo promovido pela capacidade dos metais catalisarem reacções redox, desencadeando deste modo um mecanismo neurodegenerativo (Menon et al., 2015).

O stress oxidativo é definido como uma situação na qual a formação de espécies reativas excede significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos de biomoléculas tais como o ácido desoxirribonucleico (ADN), lípidos e proteínas. Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o normal funcionamento da célula, levando-a à morte por apoptose ou necrose, desencadeando desta forma um mecanismo neurodegenerativo (Barbosa et al., 2006).

Existem vários fatores que alteram componentes do metabolismo do metal, influenciando assim o papel do metal no corpo e no cérebro. O excesso de metal no cérebro causa neurodegeneração e disfunção nos neurotransmissores através da indução do stress oxidativo. Espécies reativas de oxigénio (ERO) prejudicam vários componentes de neurotransmissores, acabando por se manifestar como distúrbios psiquiátricos/afetivos (Figura 1).

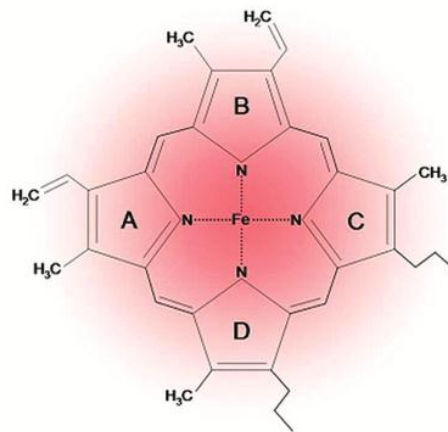


**Figura 1.** Potenciais mecanismos de sobrecarga de metais no cérebro no desenvolvimento de desordens afetivas e doenças neurodegenerativas (Adaptado de Menon et al., 2015).

### 1.2.1. Homeostase do ferro

O ferro (Fe) é um elemento essencial necessário para o desenvolvimento normal das funções cerebrais (Urrutia et al., 2014). É o metal de transição mais abundante no corpo humano, e constitui um componente essencial na formação do heme fundamental em várias funções do organismo, incluindo a produção de energia celular (adenosina trifosfato, ATP), a síntese de ADN e transporte de oxigénio (Grotto, 2010; Menon et al., 2015).

O heme é sintetizado em todas as células nucleadas, sendo que a maior quantidade é produzida pelo tecido eritróide, ficando assim dependente da síntese de hemoglobina (Hb) nos eritroblastos. Parte da sua síntese ocorre na mitocôndria e no citosol, estando dependente de diversas enzimas para a sua formação. O heme é constituído por um anel tetrapirrólico com um ião central de ferro (Figura 2). A cadeia respiratória mitocondrial é importante na conversão do ferro férrico ( $Fe^{3+}$ ) em ferroso ( $Fe^{2+}$ ), pois o  $Fe^{3+}$  é a única forma química reconhecida pela ferratoquelase para que seja incorporado no anel pirrólico na finalização do heme (Grotto, 2010).



**Figura 2.** Estrutura do heme (Grotto, 2010).

A deficiência de ferro é um dos problemas nutricionais mais comuns, que afeta populações em todo o mundo, mesmo em países mais desenvolvidos. A manifestação mais comum causada por esta deficiência denomina-se por anemia, em que esta compromete o desenvolvimento físico e cognitivo das crianças, aumenta a morbidade maternal e infantil e reduz a capacidade de trabalho e a resistência imunológica (Siqueira et al., 2006).

A maior parte do ferro existente no organismo é adquirido e absorvido através da dieta (Zhang et al., 2016). Para que ocorra a absorção do ferro inorgânico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), forma encontrada nos alimentos de origem vegetal, é necessário a sua redução à forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) pela citocromo b duodenal redutase (Dcytb) (Figura 3) (Siqueira et al., 2006).

A absorção de metais a partir de fontes dietéticas, apenas é possível devido à existência de um importante transportador de ferro, TMD-1, presente na superfície apical da célula, proporcionando quantidades suficientes de nutrientes e metais individuais no organismo (Menon et al., 2015). A absorção ocorre a nível intestinal, estando o TMD-1 localizado na superfície luminal das membranas dos enterócitos duodenais (Siqueira et al., 2006).

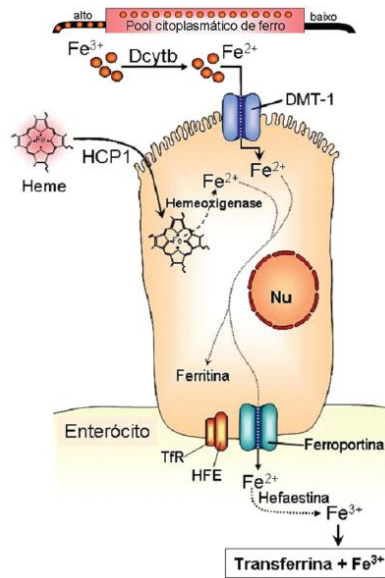
No cérebro, a expressão do TMD-1 é mais elevada nos neurónios do estriado e cerebelo. O transporte de metais através da barreira hematoencefálica (BHE) é o primeiro passo

na regulação da absorção dos metais no sistema nervoso central (SNC), bem como na manutenção dos níveis adequados das suas concentrações (Menon et al., 2015).

O transporte do ferro ocorre entre os locais de absorção, armazenamento e utilização, através de uma glicoproteína plasmática denominada transferrina (Tf), que se liga firmemente e de forma reversível ao ferro. A Tf é reconhecida por recetores de membranas celulares específicos (TfR), importantes para a captação de ferro pelas células. Após a libertação intracelular do complexo Tf-TfR, o ferro penetra em compartimentos funcionais ou fica armazenado na ferritina (Siqueira et al., 2006).

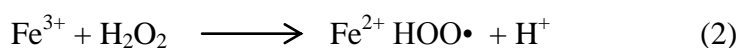
O principal exportador do ferro da célula para o plasma é a ferroportina (FPN), sendo este o único mecanismo de efluxo do ferro. Como a Tf tem grande afinidade para o ferro na forma férrica, o  $\text{Fe}^{2+}$  exportado pela FPN deve ser oxidado para  $\text{Fe}^{3+}$ . A oxidase hefaestina é responsável por essa conversão (Figura 3) (Grotto, 2010).

A absorção do ferro heme é feita pela proteína transportadora do heme-1 (HCP1), localizada na membrana apical das células do duodeno. O heme liga-se à membrana dos enterócitos duodenais e a proteína transportadora atravessa intacta a membrana plasmática, importando o heme extracelular que se irá ligar à membrana das vesículas no citoplasma da célula. No interior da célula, o ferro é libertado pela protoporfirina pela heme oxigenase (HO) e após ser libertado, fará parte do mesmo compartimento do ferro não heme (Figura 3) (Grotto, 2010).



**Figura 3.** O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro (Grotto, 2010).

O corpo humano possui a capacidade de regular o conteúdo de ferro através da proteína globular ferritina, que armazena o ferro não utilizado para assim proteger a célula de efeitos tóxicos, através da formação de ERO, evitando a reação aleatória com moléculas de O<sub>2</sub> (Zhang et al., 2016). O ferro pode ser potencialmente prejudicial, quando em excesso, devido à consequente produção de ERO pela reação de Fenton:



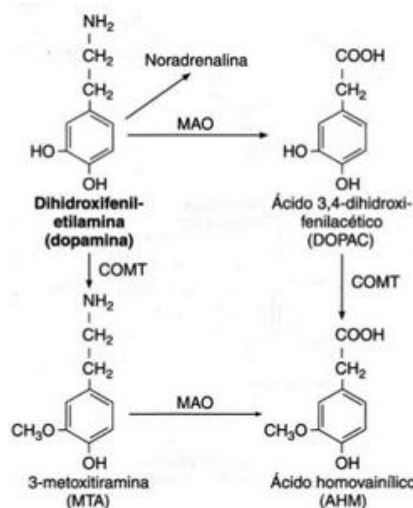
Existem enzimas como a catalase e a glutatona que mantêm os níveis de produtos tóxicos reduzidos, convertendo-os em produtos menos tóxicos e numa grande quantidade de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) endógeno. Contudo, o Fe<sup>2+</sup> pode ser oxidado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno, resultando na produção de dois radicais de oxigénio diferentes (Muller e Leavitt, 2014).

O radical hidroxilo originado através do stress oxidativo, é considerado uma das espécies mais reativas geradas nos sistemas biológicos. Esta molécula induz danos irreversíveis no ADN, ácido ribonucleico (ARN), proteínas e lípidos (Urrutia et al., 2014).

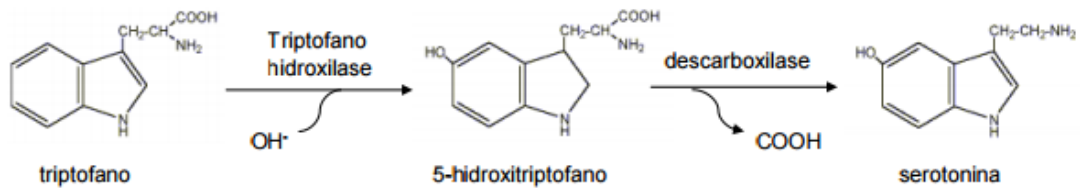
Embora a ferritina seja uma proteína de armazenamento de ferro, o seu aumento sugere uma maior disponibilidade para causar danos, através duma combinação de um aumento do transporte de ferro para o cérebro, efluxo reduzido a partir de células, ou a redistribuição de outros compartimentos (isto é, alteração da homeostasia no cérebro) (Rosas et al., 2012).

No cérebro, o ferro é o segundo metal mais abundante, a seguir ao zinco, e é essencial para a mielinização. Para além da ferritina, o ferro está presente no cérebro ligado a vários transportadores, é um cofator para muitas metaloproteínas e serve como cofator para enzimas indispensáveis envolvidas no metabolismo e síntese de neurotransmissores (Menon et al., 2015).

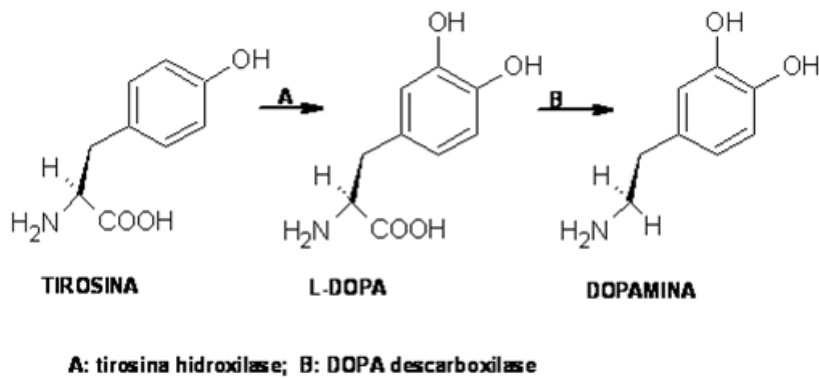
As enzimas envolvidas na síntese de neurotransmissores, que possuem ferro como um grupo prostético, são alvos reconhecidos da deficiência de ferro. Estas enzimas são a monoamina oxidase (MAO) A e B envolvidas no catabolismo da dopamina (Figura 3A), a triptofano hidroxilase necessária para a síntese da serotonina (Figura 3B), a tirosina hidroxilase necessária para a síntese de dopamina (Figura 3C) e a glutamato descarboxilase envolvida na síntese do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) (Figura 3D) (Urrutia et al., 2014).



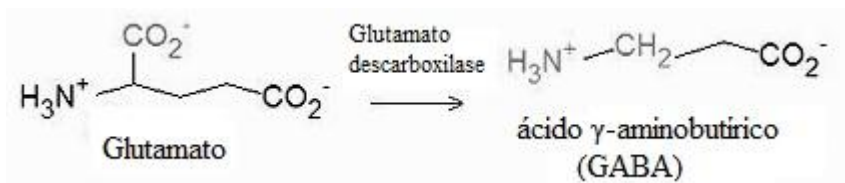
**Figura 3A.** Catabolismo da dopamina através das enzimas MAO A e B.



**Figura 3B.** Síntese da serotonina através da enzima triptofano hidroxilase.



**Figura 3C.** Síntese da dopamina através da enzima tirosina hidroxilase.



**Figura 3D.** Síntese do GABA através da enzima glutamato descarboxilase.

Qualquer aumento da exposição de ferro a biomoléculas celulares poderia facilmente potencializar a neurodegeneração, e de facto há uma extensa evidência do aparecimento de danos oxidativos precoces de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos no cérebro de doentes com a DH. Mesmo pequenas elevações de metais podem levar a um aumento do stress oxidativo celular através de reações redox, levando a várias consequências negativas para o metabolismo energético, podendo mesmo afetar a transdução de sinal e

a transcrição do gene e resultar em danos no ADN e, eventualmente, na morte celular (Rosas et al., 2012). Em suma, acumulações anormais de ferro no cérebro, possivelmente devido à inexistência de uma homeostasia, poderão conduzir à neurodegeneração (Zhang et al., 2016).

### **1.2.2. Homeostase do manganês**

O manganês (Mn) é um dos elementos mais abundantes que existe naturalmente na crosta terrestre, não surgindo desde logo no seu estado puro. Óxidos, carbonatos e silicatos definem os minerais mais importantes que contêm manganês. Este metal existe em várias formas químicas, estados de oxidação ( $Mn^{2+}$ ,  $Mn^{3+}$ ,  $Mn^{4+}$ ,  $Mn^{6+}$  e  $Mn^{7+}$ ), sais (sulfato, cloreto e gluconato) e quelatos (aspartato, fumarato, succinato) (Farina et al., 2012).

A fonte primária de manganês para a população humana é, em geral, através da dieta. A ingestão média é estimada entre 0,9-10 mg de manganês por dia, porém só cerca de 3-5% de manganês ingerido é absorvido, sendo o resto excretado nas fezes. Os alimentos com níveis de manganês superiores a 30 mg /kg são os grãos, arroz e nozes (Farina et al., 2012).

O manganês é necessário para uma função imunitária adequada, regulação do açúcar no sangue e energia celular, reprodução, digestão, formação do tecido conjuntivo e ósseo, defesa contra as ERO e para a manutenção da função normal do cérebro (Madison et al., 2012; Horning et al., 2015). O manganês constitui um micronutriente essencial no cérebro, especialmente nos gânglios basais (Menon et al., 2015).

Os efeitos benéficos de manganês ocorrem devido à incorporação do metal em metaloproteínas. As metaloproteínas que contêm manganês incluem as oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. O manganês está incorporado em metaloenzimas tais como a arginase, glutamina sintetase, piruvato carboxilase, e enzimas SOD, estando estas dependes do manganês para o seu funcionamento (Madison et al., 2012; Horning et al., 2015). Deste modo, este metal funciona como um cofator de várias enzimas necessárias para a função neuronal e glial das células, assim como

enzimas envolvidas na síntese e metabolismo de neurotransmissores (Kwakye et al., 2011).

Para assegurar a função biológica e evitar a toxicidade é necessária uma regulação homeostática apropriada dos níveis de manganês (Tidball et al., 2014).

O transporte de manganês e ferro está intimamente relacionado (Menon et al., 2015). Ambos são metais de transição de primeira linha com massas atômicas semelhantes e com raios e estrutura de electrões idênticos, permitindo assim mecanismos de transporte compartilhados (Horning et al., 2015).

Alguns transportadores de ferro medeiam a captação de manganês, incluindo o TMD-1, TfR1 e FPN. A importância do TMD-1 no transporte de manganês foi observado na deficiência de manganês em ratos do Belgrado e demonstrou que a absorção de manganês em astrócitos ocorreu via TMD-1 e era dependente da quantidade de ferro. Embora a afinidade do TMD-1 intestinal para o manganês seja relativamente alta, o transporte de manganês através do TMD-1 para o cérebro tem sido posta em causa (Menon et al., 2015). Por conseguinte, as concentrações de ferro alteradas têm mostrado um papel influenciador na quantidade de manganês absorvido (Horning et al., 2015).

### **1.2.3. Homeostase do cobre**

O cobre (Cu) é um dos diversos íons metálicos necessários para as funções essenciais do organismo. Está presente em todo o cérebro e encontra-se mais proeminente nos gânglios basais, hipocampus, cerebelo, numerosas membranas sinápticas e em corpos celulares dos neurónios piramidais corticais e cerebelares granulares (Desai e Kaler, 2008).

Este metal é crucial em reações de transferência de electrões, numa série de enzimas envolvidas em atividades como a defesa antioxidante e biossíntese de neurotransmissores, constituindo assim um importante co-fator para numerosas enzimas, desempenhando um papel importante no desenvolvimento do SNC (Desai e Kaler, 2008; Hands et al., 2010). As enzimas que dependem do cobre para executarem as suas funções incluem a tirosinase, importante na síntese de melanina; cobre-zinco

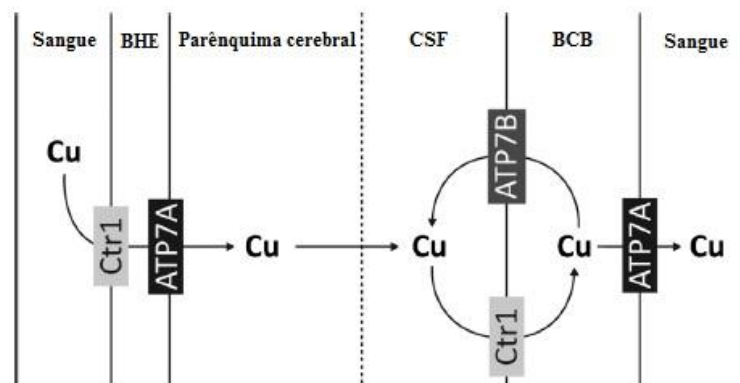
SOD, na desintoxicação do ião superóxido; ceruloplasmina, no transporte do cobre no plasma; hephaestina, que promove o efluxo de ferro nos enterócitos; dopamina  $\beta$ -hidroxilase (DBH), que cataliza a conversão da dopamina em noradrenalina e a citocromo c oxidase (CCO) essencial no transporte de electrões na mitocôndria (Scheiber et al., 2014).

Apesar das funções essenciais do cobre, um excesso deste metal pesado poder-se-á tornar tóxico, principalmente devido à sua capacidade reativa com o oxigénio molecular que conduz à formação de ERO (Hands et al., 2010).

A produção de radicais livres ocorre por meio da reacção de Haber-Weiss,  $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \longrightarrow O_2 + HO^{\cdot} + HO^-$ , que resulta em danos mitocondriais, quebra do ADN e lesão neuronal (Desai e Kaler, 2008).

Portanto, o transporte e compartimentalização do cobre são altamente regulados, envolvendo transportadores e chaperonas de cobre (Hands et al., 2010).

O cobre existente no cérebro é derivado do cobre periférico, em que este é transportado através da BHE e /ou da barreira sangue-fluído cerebrospinal (BCB), que separam o espaço intersticial cerebral do sangue e do fluído cerebrospinal (CSF), respetivamente. Em ambas as barreiras de cobre, este é transportado essencialmente na forma de ião livre (Figura 4).



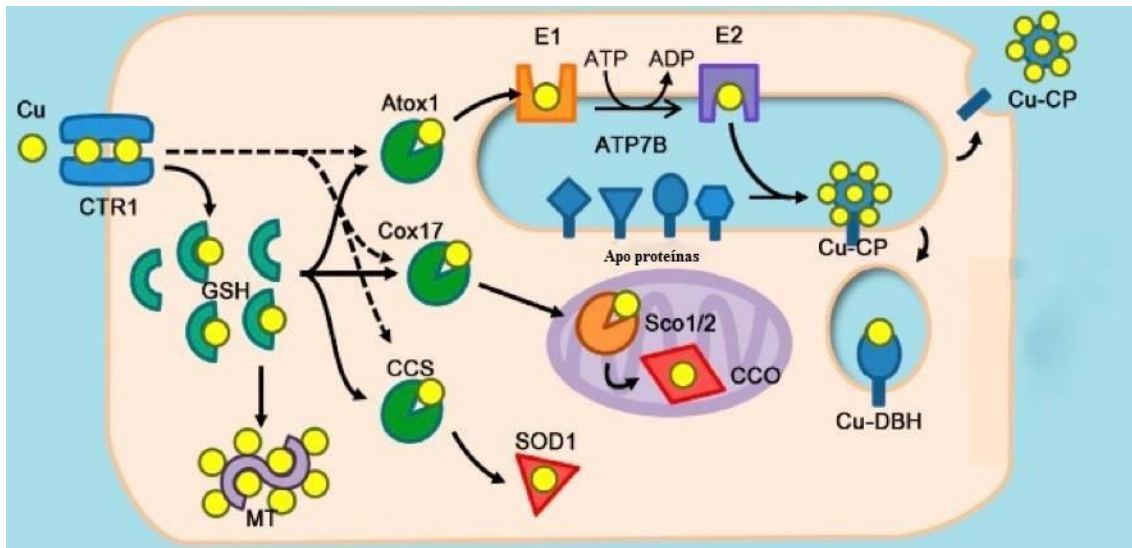
**Figura 4.** Absorção e efluxo do cobre através das barreiras do cérebro (Adaptado de Scheiber et al., 2014).

A BHE representa a principal via de transporte do cobre a partir da circulação sanguínea para o parênquima cerebral, onde é utilizado e subsequentemente libertado para o CSF através do líquido intersticial cerebral (Scheiber et al., 2014).

O cobre é transportado do sangue para as células cerebrais por meio de um transportador de cobre (CTR1), localizado no lado apical e libertado para o parênquima cerebral através de uma ATPase, a ATP7A (Scheiber et al., 2014).

O excesso de cobre é libertado a partir de células do cérebro para o CSF, onde é absorvido pelas células epiteliais polarizadas do plexo coróide que formam a BCB. Por sua vez, o cobre pode ser absorvido por essas células ou fica armazenado para o transporte potencial em CSF por uma ATPase (ATP7B) ou é libertado para o sangue pela ATPase (ATP7A) (Scheiber et al., 2014).

O cobre entra na célula através do transportador CTR1, localizado na membrana plasmática, e liga-se a metabolitos tiol, incluindo a glutationa (GSH) (Figura 5) (Hatori e Lutsenko, 2016).



**Figura 5.** Metabolismo do cobre intracelular em células cerebrais. As setas representam as rotas do tráfico de cobre intracelular, sendo que as rotas alternativas (transferência direta do CTR1 para as chaperonas de cobre) são indicadas por setas a tracejado (Adaptado de Hatori e Lutsenko, 2016).

Em condições fisiológicas, as células contêm menos de um ião livre de cobre celular. Esta concentração extremamente baixa é mantida através da ligação do cobre em metalotioneínas (MTs) e GSH (Scheiber et al., 2014). O tripeptido GSH está presente em concentrações milimolares nas células e é importante na desintoxicação de peróxidos e ERO, assim como na regulação e sinalização redox intracelular. A GSH possui a capacidade de formar complexos estáveis com  $\text{Cu}^+$ , mesmo na presença de oxigénio (Scheiber et al., 2014). O complexo Cu-GSH é considerado como o principal contribuinte no armazenamento permutável de cobre citosólico. De acordo com esta função, estudos *in vitro* demonstraram que o Cu-GSH é capaz de transferir o cobre para as MTs, armazenando-o (Scheiber et al., 2014).

As MTs são proteínas de baixo peso molecular ricas em cisteína que possuem um papel importante na homeostase do cobre, entre as quais se incluem a desintoxicação de iões metálicos não essenciais, neuroprotecção, manutenção do potencial redox tiol intracelular e ajuda na regulação da proliferação celular. Estas possuem ainda a capacidade de armazenar o cobre citosólico, permitindo estabelecer um metabolismo normal de cobre, e servem como reservatório em caso de défice de cobre (Scheiber et al., 2014).

Porém, a expressão de MTs é induzida por um excesso de cobre, em que são capazes de estabelecer uma ligação celular com o cobre em excesso, armazenando-o num complexo Cu-MT. Um aumento do conteúdo de MT celular confere uma resistência contra a toxicidade induzida pelo cobre (Scheiber et al., 2014).

No cérebro, as chaperonas de cobre são conhecidas por distribuir o cobre no citosol, para a via de secreção e para as mitocôndrias (Hatori e Lutsenko, 2016). Existem diferentes chaperonas de cobre citosólicas, entre as quais se destacam a chaperona de cobre antioxidante (Atox1), chaperona de cobre para a SOD1 (CCS) e as chaperonas de cobre para a CCO, Cox17, SCO1 e SCO2, em que todas competem com o complexo Cu-GSH e medeiam o cobre para os seus compartimentos-alvo específicos (Hatori e Lutsenko, 2016).

Atox1 foi a primeira chaperona de cobre a ser descoberta, que fornece o cobre à via secretora (Hatori e Lutsenko, 2016). Esta liga-se e transfere o  $\text{Cu}^+$  para os domínios de

ligação de metais N-terminal (MBDs) dos transportadores do tipo ATPases, o ATP7B que serve como mediador no transporte de cobre dependente de energia, para o lúmen do complexo de Golgi, para futura síntese de neurotransmissores (Scheiber et al., 2014). O cobre dissocia-se do lúmen e é incorporado em várias enzimas dependentes de cobre, incluindo a ceruloplasmina (CP), a DBH, entre outras oxirredutases (Hatori e Lutsenko, 2016).

As mitocôndrias requerem o cobre para a maturação da CCO, que catalisa a reação terminal da cadeia respiratória e está inserida na membrana mitocondrial interna. A transferência do cobre para a CCO é facilitada por comportamentos combinados de chaperonas de cobre Cox17 e SCO1/2. A Cox17 é uma metalochaperona solúvel, localizada tanto no citosol como no espaço intermembranar das mitocôndrias, enquanto a SCO1 e a SCO2 são proteínas homólogas membranares (Hatori e Lutsenko, 2016). Dados recentes sugerem que SCO1 recebe o cobre a partir da Cox17 na reação acoplada ao transporte de elétrons e, em seguida, liberta o cobre para a CCO através de interações específicas proteína-proteína. A SCO2 também recebe o cobre a partir da Cox17 mas atua como uma oxidorredutase. Curiosamente, a ligação do cobre a SCO2 facilita em grande parte a reação redox (Hatori e Lutsenko, 2016).

Um fenómeno um pouco semelhante é observado para a CCS. A SOD1 recebe o seu cofator de cobre predominantemente da CCS, embora em células humanas a GSH pode substituir a CCS (Hatori e Lutsenko, 2016).

### **1.3. Metodologia**

A revisão bibliográfica foi realizada entre Outubro de 2015 e Julho de 2016, com base na pesquisa de informação nos motores de busca PubMed, b-On, Scielo e Science Direct, compreendidas entre o ano de 1999 e 2016. Foram utilizados 67 artigos. Foi ainda realizada uma pesquisa no livro “Bradley’s Neurology in Clinical Practice”. De referir, ainda, a utilização da base de dados do Infarmed.

As palavras-chave usadas na pesquisa bibliográfica foram “*Huntington’s disease*”, “Doença de Huntington”, “*Neurodegenerative disorders*”, “*The role of iron in neurodegenerative disorders*”, “*The role of cooper in neurodegenerative disorders*”,

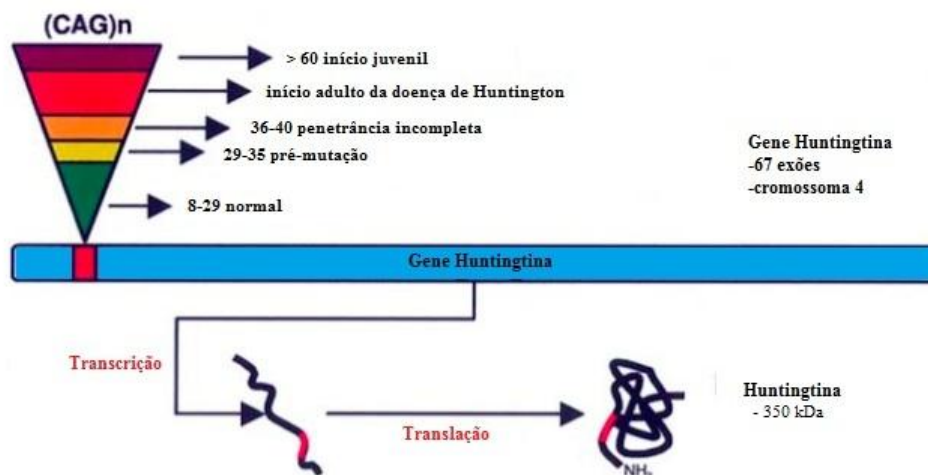
*“Treatment of neurodegenerative disorders”, “Metal toxicity in neurodegenerative disorders”, “Biological metals in neurodegenerative disorders”, “Amyotrophic Lateral Sclerosis”, “ALS”, “esclerose lateral amiotrófica”, “SOD1”, “Riluzole”, “cooper”, “iron”, “manganese”, “mitochondrial dysfunctions”.*

## II. Doença de Huntington

### 2.1. Caracterização da doença de Huntington

A DH define-se como um distúrbio neurodegenerativo de origem hereditária, causado pela expansão instável de uma repetição do trinucleótido CAG (> 35 CAGs) na região codificante do gene HD, também designado IT15 no braço curto do cromossoma 4. Este gene codifica a Htt, que é uma proteína que se caracteriza por possuir um tamanho elevado (aproximadamente 350 kDa) e que é marcadamente conservada e expressa no organismo (Raymond et al., 2011). O gene IT15 quando traduzido em proteína provocará a formação de uma sequência de longa extensão de poliglutamina (poliQ) que particularmente levará à sua agregação (Barnham e Bush, 2014).

Quando é atingido um determinado comprimento da extensão da secção de repetições do trinucleótido CAG, produz-se a mHtt, que difere da forma não mutada por desempenhar funções celulares diferentes, estando na base da etiologia da patologia abordada (Figura 6) (Walker, 2007).



**Figura 6.** Representação do gene huntingtina e o impacto da extensão da repetição poliQ no início da DH. O gene huntingtina é transcrito e traduzido numa proteína de 350 kDa (Adaptado de Rego e Almeida, 2005).

A Htt é amplamente expressa, sendo que as suas concentrações mais elevadas são encontradas nos testículos e cérebro. A nível cerebral, a Htt expressa-se maioritariamente no neocórtex, córtex cerebral, hipocampus e corpo estriado. Dada a sua localização subcelular, esta proteína apresenta várias funções celulares a nível do citoplasma e do núcleo, o que deduz a sua interação com numerosas proteínas envolvidas na expressão do gene, transporte intracelular, metabolismo e sinalização intracelular (Borrel- Pagès et al., 2006). A Htt é deste modo uma proteína indispensável por possuir propriedades anti-apoptóticas, prevenindo a morte celular programada. Estudos em ratinhos demonstraram que a Htt é necessária para o desenvolvimento embrionário normal e neurogénese, uma vez que a sua ausência está relacionada com a morte embrionária (Borrel- Pagès et al., 2006).

A proteína mutante é expressa de forma ubíqua em todo o organismo, porém, a morte celular surge em áreas específicas do cérebro, particularmente no estriado e no córtex (Gil-Mohapel et al., 2011). Assim, quando mutada, conduz à formação de corpos de inclusão intracelulares, alterações no transporte celular, alterações na transcrição e apoptose que acarreta lesões em vários tecidos, em particular no cérebro, onde provoca a atrofia dos gânglios da base (Martelli, 2014).

A mutação referida causa a elongação da glutamina, junto da amina terminal e a sua prevalência é de aproximadamente 4 a 10 casos por 100.000 na população europeia ocidental. Contudo, há um risco elevado de existirem muitos mais indivíduos que possam ter herdado o gene mutante (Raymond et al., 2011).

A expansão repetida do trinucleótido CAG no gene que codifica a Htt mostra uma forte correlação negativa com a idade de início dos sinais motores (Lee et al., 2012). Populações não afetadas pela doença apresentam 11 a 34 repetições de trinucleótidos, enquanto os indivíduos afetados codificam tipicamente 42 a 66, em que estes apresentam um maior número de cópias repetidas, correlacionado mais cedo o início da doença (Tabela 1) (Smith et al., 2016).

**Tabela 1.** Classificação do risco de transmissão da DH com base no número de repetições CAG (Gil-Mohapel et al., 2011).

Número de Repetições CAG	Risco de Transmissão para a Descendência	Manifestação da Doença
< 28	Não há transmissão	Não há manifestação da doença
28-35	Intermediário (no caso da ocorrência de mutações que levam a um aumento do número de CAGs na descendência)	Não há manifestação da doença
35-40	Penetrância incompleta	Possibilidade de vir a manifestar a doença ou início mais tardio
40-50	Penetrância completa	A doença é manifestada na idade adulta
> 50	Penetrância completa	A doença é manifestada precocemente (durante o período juvenil)

A DH é uma doença de manifestação lenta, apesar de poderem ocorrer manifestações em jovens, quando a repetição do codão CAG excede as 60 repetições, sendo que se podem verificar episódios epiléticos em crianças pequenas (Raymond et al., 2011). Nos pacientes juvenis a sintomatologia é consideravelmente diferente, sendo caracterizada por bradicinésia, tremores, rigidez e distonia, e a coreia pode mesmo estar ausente (Gil-Mohapel et al., 2011). Esta patologia neurodegenerativa progressiva surge, normalmente, em indivíduos com idades compreendidas entre os 35 e 42 anos. A doença progride ao longo do tempo e torna-se fatal 15 a 20 anos após o aparecimento dos primeiros sintomas (Gil-Mohapel et al., 2011). Esta doença afeta ambos os sexos com a mesma frequência de forma autossómica dominante (Borrel-Pagès et al., 2006; Smith et al., 2016). Atualmente ainda não se descobriu a cura, porém para tentar diminuir a progressão da doença têm-se utilizado fármacos paliativos (Raymond et al., 2011).

### 2.1.1. Fisiopatologia

A DH apresenta diversos sintomas como perturbações motoras, défice cognitivo e alterações psiquiátricas. Dentro destes, a sintomatologia mais conhecida manifestada por esta patologia caracteriza-se por um excesso de movimentos motores descoordenados, chamados de coreia, e distúrbios de marcha (Walker, 2007).

Os primeiros sinais da patologia são subtis, como movimentos inquietos dos dedos das mãos e dos pés durante um período de stress ou durante a marcha, dificuldades na resolução de problemas, irritabilidade e depressão (Martelli, 2014). Em alguns casos o défice das funções cognitivas pode ser detectado décadas antes do aparecimento dos sintomas motores (Gil-Mohapel et al., 2011).

As alterações motoras, associadas à perda de coordenação dos movimentos voluntários, progridem de forma lenta. Os movimentos involuntários dos músculos tornam-se mais graves e os pacientes perdem gradualmente a capacidade para se moverem e, eventualmente, de comunicarem. Os estádios mais avançados da doença são também caracterizados por bradicinésia (isto é, lentidão anormal dos movimentos voluntários) e rigidez severa (Gil-Mohapel et al., 2011).

As alterações cognitivas são encontradas em praticamente todos os pacientes e aparecem precocemente no sentido da doença. O comprometimento principal é o da função executiva, incluindo o planeamento e julgamento precários, comportamento impulsivo, desorganização, défice psicomotor, apatia, falta de cuidados pessoais e perda de iniciativa (Martelli, 2014). Ao longo da progressão da doença, as dificuldades no discurso progridem mais rapidamente que a dificuldade na compreensão (Walker, 2007). Estas alterações cognitivas tendem a piorar ao longo do tempo com a progressão da doença, podendo os doentes com DH, numa fase tardia, apresentar demência severa (Martelli, 2014).

Ao contrário da cognição, os sintomas psiquiátricos e comportamentais surgem com alguma frequência, mas não mostram uma progressão gradual com a gravidade da doença. As manifestações neuropsiquiátricas mais comuns são depressão, ansiedade, irritabilidade e apatia (Finkbeiner, 2011). Pensamentos suicidas e tentativas de suicídio são mais comuns que na população em geral. Estima-se que seja aproximadamente 5-10% o suicídio e mais de 25% a forma tentada, representando a terceira causa de morte. Sintomas maníacos e psicóticos também se podem desenvolver (Walker, 2007).

A principal causa de morte dos pacientes ocorre, geralmente, devido a complicações respiratórias infecciosas ou cardiovasculares (Gil-Mohapel et al., 2011). Estudos *in vitro* com modelos de pré-sintomáticos nos estádios iniciais (grau 1), os pacientes não

mostraram alteração/redução no estriado ou nos complexos corticais I-IV, indicando que a afeção respiratória resulta de um avanço tardio no desenvolvimento da doença (Rosas et al., 2012).

### **2.1.2. Neuropatologia**

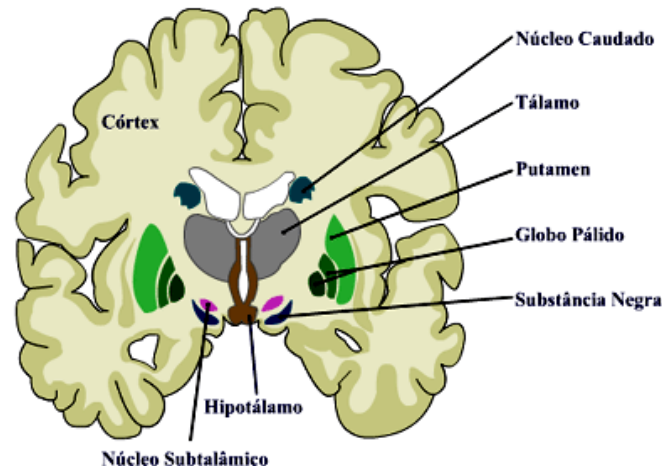
Nas fases sintomáticas iniciais da DH, o cérebro pode ser livre de neurodegeneração. No entanto, a evidência de disfunção neuronal é abundante, mesmo em indivíduos assintomáticos (Walker, 2007).

Os neurónios corticais apresentam diminuição da coloração de fibras nervosas, neurofilamentos, tubulina e da proteína associada ao microtúbulo-2 (MAP-2) e diminuição da concentração da complexina 2. Estes elementos estão associados com a função sináptica, a integridade do citoesqueleto e o transporte axonal, sugerindo um papel importante para a disfunção cortical na patogénese da doença (Walker, 2007).

Neuropatologicamente, a DH é caracterizada, primeiramente, pela perda neuronal gradual do corpo estriado (núcleo caudado e putamen) e do córtex. No entanto, muitos outros núcleos são também afetados, incluindo o globo pálido, tálamo, hipotálamo, núcleo subtalâmico, substância negra e cerebelo (Raymond et al., 2011).

Foi desenvolvida uma escala de avaliação dos diferentes estádios patológicos utilizada para determinar a severidade da degeneração na DH. Esta escala permite classificar a doença em 5 graus (0 a 4), associados a diferentes graus de gravidade neuropatológica, baseada nos padrões de degeneração estriatal observados em tecido *post-mortem* (Gil-Mohapel et al., 2011; Martelli, 2014).

O grau de atrofia estriatal também se correlaciona com a degeneração de estruturas cerebrais não-estriatais, sendo que nos graus 1 e 2, estas estruturas encontram-se geralmente preservadas ou apresentam apenas uma atrofia ligeira. Nos graus 3 e 4, o córtex cerebral (particularmente as camadas III, V e VI), o *globus pallidus*, tálamo, núcleo subtalâmico, substância negra, substância branca e cerebelo poderão também estar afetados (Figura 7) (Gil-Mohapel et al., 2011; Martelli, 2014).



**Figura 7.** Estruturas estriadas e não estriadas afetadas na DH (Martelli, 2014).

A especificidade da morte do corpo estriado na DH ainda não está muito bem compreendida (Borrel- Pagès et al., 2006). Os neurónios espinhosos médios constituem 90 a 95% de todos os neurónios do estriado, em que estes pertencem aos gânglios da base, e utilizam o GABA como neurotransmissor inibitório principal, bem como neuropéptidos específicos. Estes neurónios GABAérgicos são os mais afetados e a sua degeneração ocorre progressivamente (Raymond et al., 2011). A perda do efeito inibitório causada pela morte desses neurónios tem sido diretamente associada aos movimentos involuntários característicos da doença (Martelli, 2014). O corpo estriado também contém um número de componentes moduladores incluindo as projecções de dopamina e colinérgicos ou entradas GABAérgicas de interneurónios do estriado, em que estes elementos constituem a base do microcircuito do estriado, um microcircuito que é fortemente perturbado na DH (Raymond et al., 2011).

A perda significativa de neurónios é também relatada no córtex cerebral de pacientes, incluindo as regiões frontal, parietal e temporal, apesar dessas alterações serem menos marcantes do que as observadas no estriado (Martelli, 2014). No córtex, as camadas III, V e VI são as últimas a degenerar. A morte neuronal do corpo estriado, numa fase tardia da doença, pode levar a défices que surgem anos depois do momento de aparecimento da doença. Estes estão associados à disfunção sináptica e celular que ocorre no córtex (Raymond et al., 2011). Avanços nas técnicas imagiológicas cerebrais mostraram

alterações no desenvolvimento cognitivo, défice de atenção, memória e execução de funções (Raymond et al., 2011).

### **2.1.3. Mecanismos de neurodegeneração**

A repetição da expansão de cadeias poliQ está na base da DH, porém os mecanismos de toxicidade, ou seja, a relação entre os agregados de mHtt e a patologia, não são completamente compreendidos (Muller e Leavitt, 2014). Estudos revelaram que expansões de poliQ conferem à proteína propensão a agregar-se, em que a sua taxa de agregação aumenta drasticamente com o aumento da expansão. Acredita-se que a expansão da poliQ confere uma função tóxica à Htt (Finkbeiner, 2011). O efeito tóxico da mHtt pode então revelar-se e originar a doença. A clivagem proteolítica de mHtt gera péptidos curtos com elevado potencial de agregação e quando localizada no núcleo, estes agregados ricos em poliQ tornam-se citotóxicos (Smith et al., 2016).

Duas importantes características neuropatológicas caracterizam-se pela acumulação nuclear de Htt mutante designada por inclusões nucleares intraneuronais (INNs) e a formação de agregados proteicos em neurites distróficas nos neurónios estriatais e corticais (Gil-Mohapel et al., 2011).

O aparecimento de INNs correlacionam com o aparecimento de défices comportamentais e a carga global de INNs correlacionam com a severidade dos sintomas (Finkbeiner, 2011).

Os agregados, ou simplesmente, corpos de inclusão (IBs) localizam-se no corpo estriado, córtex cerebral, cerebelo e na medula espinal (Arrasate et al., 2012). Os IBs de mHtt foram também descritos no citoplasma, em especial na área perinuclear e em dendrites, sendo que os IBs dendríticos são os mais comuns (Finkbeiner, 2011). Foram também localizados noutros compartimentos celulares, no núcleo e no retículo endoplasmático (Ciechanover et al., 2014). IBs contendo Htt mutante, particularmente em regiões do cérebro afetadas, providenciou uma prova primária de que a DH está fundamentalmente associada ao mau enrolamento e eliminação inadequada das proteínas (Finkbeiner, 2011).

Contudo, o papel dos IBs na DH é bastante controverso. Alguns autores consideram que os IBs poderiam ser uma causa direta da doença, enquanto outros acreditam que não estabelecem uma relação com o seu próprio mecanismo ou até mesmo poderiam ser um mecanismo de desintoxicação da célula (Rego e Almeida, 2005).

Um sistema de microscópio automatizado permitiu rever o papel dos IBs na DH. Admiravelmente, os neurónios do corpo estriado que formaram IBs possuíram um menor risco de morte, tendo sobrevivido melhor que neurónios sem IBs. Após 24 a 48 horas da formação de IBs, os níveis de difusão de Htt mutante reduziram para níveis quase de linha de base, juntamente com o risco de morte. Portanto, os IBs foram propostos para atenuar os efeitos de Htt mutante difusa, sequestrando-a, diminuindo desta forma a sua atividade química e/ou, eventualmente, redobrando-a numa forma mais inerte (Finkbeiner, 2011).

Assim, a formação de IBs pode ser uma resposta benéfica, útil na melhoria da toxicidade. Na verdade, para os neurónios que formam IBs, o risco de morte, que está altamente correlacionado com os níveis de mHtt difusa antes da formação de IBs, torna-se substancialmente independente dos níveis. A descoberta sugere que a formação de IBs marca um novo estado adaptado para o neurónio (Arrasate et al., 2012).

#### **2.1.4. Mecanismos de eliminação de corpos de inclusão**

A eliminação de IBs pode ocorrer através de diferentes processos celulares, que, dependendo do ambiente, pode agravar ou atenuar o progresso da doença (Maiti et al., 2014). Os mecanismos envolvidos incluem chaperonas moleculares, o sistema ubiquitina-proteossoma (SUP) e vias de autofagia (Figura 8) (Maiti et al., 2014).

A primeira linha de defesa é o SUP, um sistema proteolítico seletivo em que os substratos são marcados com ubiquitina (Ub), desdobrando-se em cadeias polipeptídicas nascentes, promovendo a clivagem em péptidos curtos durante a passagem através da câmara estreita do proteossoma (Ciechanover et al., 2014).

As chaperonas moleculares, tais como as proteínas de choque térmico (HSP), fazem parte de um sistema de defesa celular altamente conservado que regula várias funções

celulares. Elas fornecem proteção contra o stress celular por interação prejudicial com diferentes co-chaperonas e outras proteínas idênticas ou por indução da expressão de quinases, recetores hormonais, fatores de transcrição ou proteínas antioncogénicas (Maiti et al., 2014). As principais funções destas moléculas são para, aquando da formação dos polipéptidos, estes adotarem uma conformação apropriada, redobrar proteínas desnaturadas/danificadas, evitar a agregação de proteínas, degradar proteínas severamente danificadas e a apoptose. As chaperonas ajudam no processo de degradação de proteínas, fornecendo-as ao sistema ubiquitina-proteossoma (Maiti et al., 2014).

Entre as HSPs mais importantes, destacam-se as HSP70 e suas co-chaperonas HSP40 e TRiC, sendo estas de relevância, pois ajudam a concluir as funções das chaperonas (Arrasate et al., 2012). Embora a maior parte das proteínas celulares se dobrem de forma independente, as HSPs são essenciais para facilitar a eficiência do processo de enrolamento de proteínas (Maiti et al., 2014).

Em células não-neuronais, os IBs podem estar associados com o centro organizador de microtúbulos. A formação destes corpos estaria assim dependente de microtúbulos, sugerindo que as proteínas com mau enrolamento estariam acumuladas no COMT, através do transporte baseado em microtúbulos. Neste processo, a histona desacetilase 6 (HDAC6), uma desacetilase citoplasmática que interage com a ubiquitina, pode funcionar, possivelmente, em alguma capacidade adaptativa ou como parte de um processo complexo envolvendo uma proteína de ligação à poliubiquitina (a p62), o SUP e mecanismos autofágicos de depuração de proteínas (Finkbeiner, 2011). A p62 é um recetor autofágico prototípico que reconhece proteínas ubiquitinadas e sequestra-as para a autofagia, permitindo assim que a degradação seja seletiva (Lim et al., 2015).

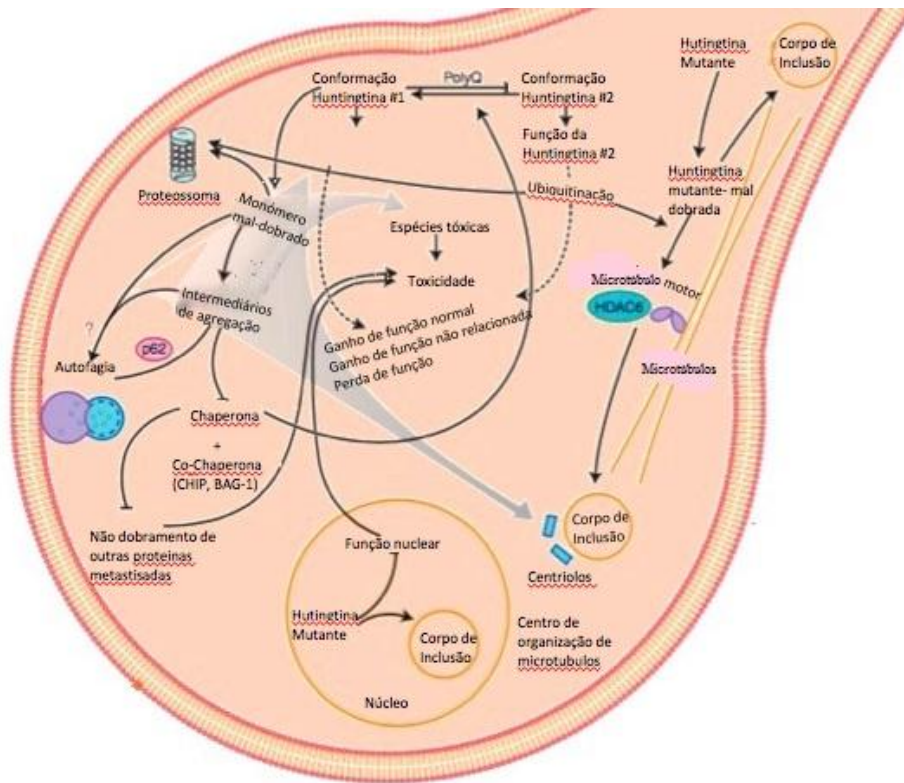
A p62 caracteriza-se por ser um bom candidato para detetar mHtt ubiquitinada e controlar a formação de agregados. A expressão da p62 é aumentada em células que expressam mHtt. Esta proteína está envolvida na ligação entre agregados proteicos poliubiquitinados ao processo de autofagia. Assim, pode recrutar componentes autofagossomais aos agregados poliubiquitinados, facilitando a eliminação destes agregados e até mesmo formas não-agregadas de mHtt. Em conjunto com o reconhecimento de Htt ubiquitinada, a p62 interage com a mHtt acetilada, o que pode

contribuir ainda mais para a sua degradação, levando a mHtt para o sistema autofágico (Arrasate et al., 2012).

A HDAC6 liga-se com uma elevada afinidade à ubiquitina, que medeia a sua capacidade de controlar negativamente o volume de poliubiquitina celular e favorece a agregação de proteínas poliubiquitinadas (Arrasate et al., 2012).

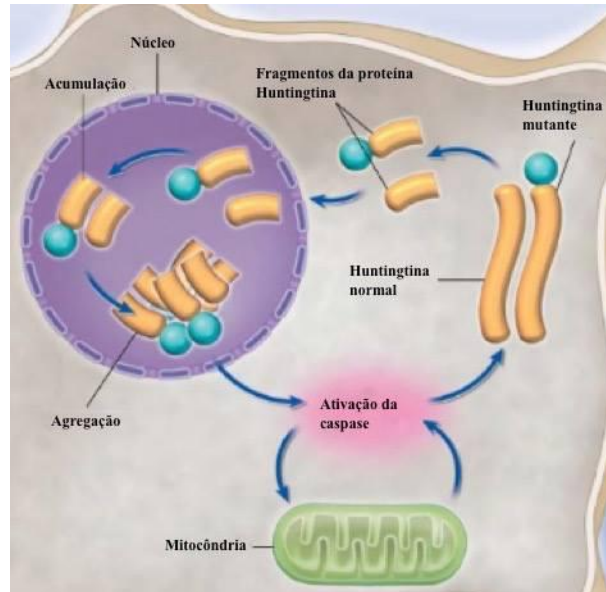
Assim, HDAC6 e p62 podem ser proteínas celulares chave que regulam o destino de proteínas poliQ ubiquitinadas e acetiladas, como é o caso da mHtt, através da ativação de uma ampla resposta de confrontamento que inclui a formação de IBs, ativação de autofagia, e outros mecanismos. A eficácia desta resposta para melhorar a sobrevivência neuronal, depende da extensão da eliminação da mHtt tóxica com mau enrolamento. A formação de IBs e autofagia diminuiriam formas difusas tóxicas de mHtt (Arrasate et al., 2012).

Desta forma, a autofagia desempenha um papel crucial na homeostase neuronal. A função e sobrevivência dos neurónios dependem em grande parte, da eficiência da remoção de proteínas modificadas e de organelos danificados por degradação autofágica (Zhang et al., 2016). Esta caracteriza-se por ser uma via catabólica celular que, através de autofagossomas sequestra e fornece cargas citosólicas para os lisossomas para a degradação de proteínas mal dobradas e agregados proteicos que causariam a neurodegeneração. A sua atividade pode ser aumentada para compensar a deficiência do SUP e aliviar o stress consequente da proteotoxicidade (Lim et al., 2015).



**Figura 8.** Exemplificação de mecanismos que levam à neurodegeneração na DH (Adaptado de Finkbeiner, 2011).

O envolvimento da apoptose tem sido também proposta na neurodegeneração na DH. Foram detetados ruturas dos filamentos de ADN em regiões afetadas nos cérebros de pacientes. Além disso, vários estudos relataram que a expansão poliQ em Htt medeia a apoptose através da ativação de caspases (Figura 9), em particular, as caspases 1, 3, 8 e 9. A ativação da caspase-3, dentro de certos níveis, foi anteriormente sugerida para desempenhar um processo normal que cliva substratos sem causar apoptose. No entanto, as caspases têm sido amplamente implicadas na clivagem da Htt, que podem ser responsáveis pela produção de fragmentos tóxicos de Htt em N-terminais. As caspases ativadas foram indicadas para clivar ambas as formas de Htt, normal e mutante, perto de N-terminais, apoiando para o papel da Htt como um substrato da caspase. A inibição da caspase diminuiu a toxicidade induzida pela Htt e expansão poliQ em células e retardou a progressão da patologia e a mortalidade de ratinhos transgênicos (Rego e Almeida, 2005).



**Figura 9.** Representação do mecanismo de ativação da caspase (Adaptado de Webscolar, 2016).

Em suma, a expansão poliQ confere à proteína Htt uma ou mais funções tóxicas e a propensão para se agregar e acumular intracelularmente. As células contêm redes moleculares complexas interligadas que impedem a mutação das proteínas e corrigem ou degradam as que se tornam mutantes. Estas redes podem detetar a mHtt como uma ameaça e iniciar respostas de defesa benéficas, permitindo apenas o retardamento da doença. O mecanismo pelo qual a expansão poliQ induz mutação em Htt continua ainda desconhecido (Finkbeiner, 2011).

## 2.2. Efeitos dos metais na doença de Huntington

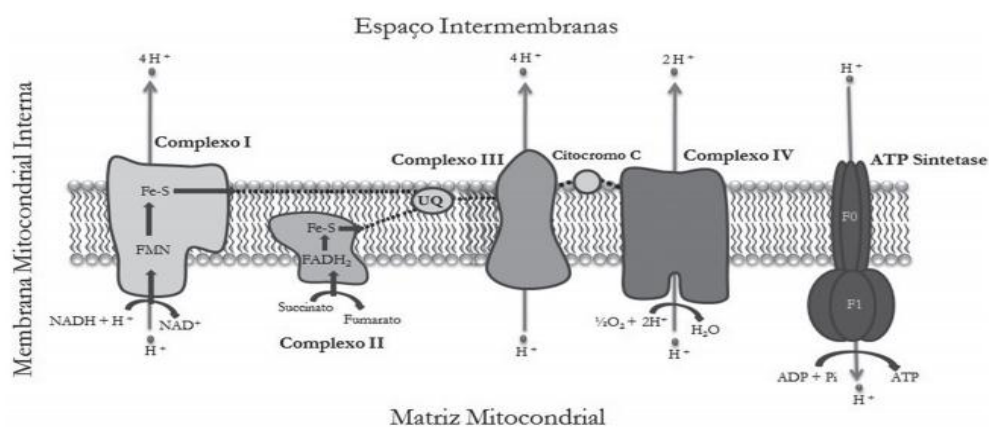
Acredita-se que a neurodegeneração é a manifestação mais comum causada pela toxicidade do metal (Mitra, 2014). Na DH, as alterações dos tecidos dos gânglios basais estão relacionadas com um aumento do ferro no núcleo caudado e cobre no putamen (Barnham e Bush, 2014). Os níveis de cobre têm sido associados à aprendizagem e memória, e o aparecimento da DH está interligado com um aumento das interações cobre-proteína no cérebro (Kawada et al., 2015).

## 2.2.1. Mecanismo neurodegenerativo do ferro

### 2.2.1.1. O papel da mitocôndria no metabolismo do ferro

As mitocôndrias são organelos citoplasmáticos presentes nas células humanas, e também em outras células eucarióticas, formadas por estruturas complexas, com duas membranas altamente especializadas, uma externa e outra interna. Possuem o espaço intermembranar e o espaço interno da matriz onde está presente o ADN mitocondrial, os ribossomas mitocondriais, os ARNs e várias enzimas. Este organelo apresenta diversas funções essenciais para as células humanas e sua manutenção normal, tais como a produção de energia (ATP), atuação na morte celular por indução da apoptose e geração de ERO. A produção de energia celular resulta da interação de dois processos metabólicos correlacionados, o ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa (Nasseh et al., 2001).

Existem quatro complexos enzimáticos, localizados na membrana mitocondrial interna, que, conjuntamente, constituem a cadeia respiratória (Figura 10). O Complexo I (NADH-coenzima Q oxiredutase), o Complexo II (succinato ubiquinona oxiredutase), o Complexo III (ubiquinona-citocromo c oxiredutase), o Complexo IV (citocromo c oxidase), dois transportadores de elétrons móveis, a coenzima Q10 (ubiquinona) e o citocromo c. Um quinto complexo enzimático completa, então, a fosforilação oxidativa: o Complexo V (ATP sintetase) (Nasseh et al., 2001).



**Figura 10.** Cadeia transportadora de elétrons (Pereira et al., 2012).

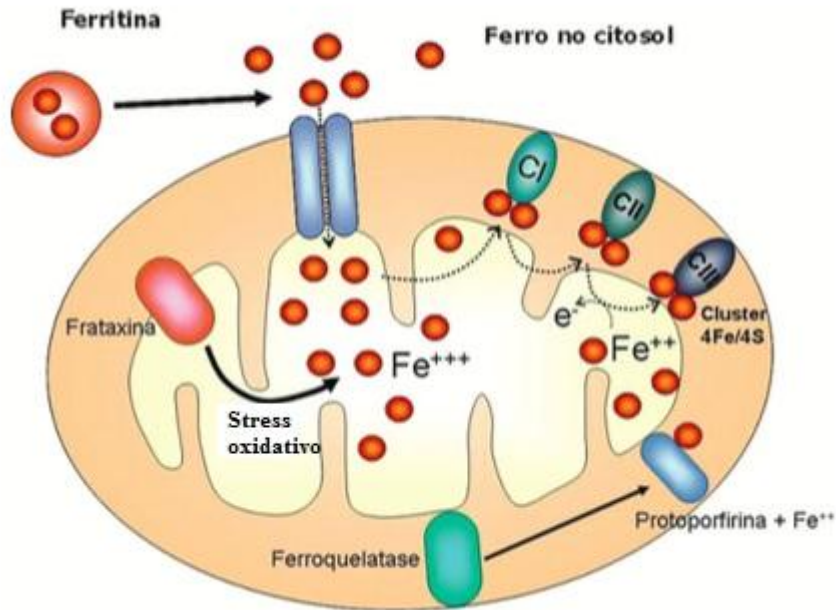
O cérebro é dos órgãos que mais oxigênio consome, estando inteiramente dependente da eficiência da mitocôndria para produção de energia para o seu funcionamento. A elevada necessidade de O<sub>2</sub> deve-se ao alto consumo de ATP pelos neurônios, para manter o potencial de membrana e o fluxo de neurotransmissores (Barbosa et al., 2006).

Particularmente relevante para os processos neurodegenerativos é a relação entre a mitocôndria e o ferro. A mitocôndria desempenha um papel chave no metabolismo do ferro porque constitui a localização celular onde assegura a síntese de aglomerados de ferro-enxofre (ISCs) e de grupos prostéticos de heme, que são vitais para a função celular. Uma fração do ferro que entra no organismo deve passar por este organelo antes de chegar ao seu destino final. As ISCs mais comuns são 2Fe-2S e 4Fe-4S, que são formadas por átomos de ferro tetraedricamente coordenados com pontes de sulfuretos (Urrutia et al., 2014).

Na cadeia transportadora de elétrons, 12 ISCs transportam os elétrons do complexo I ao complexo III e 5 proteínas contendo heme transportam elétrons do complexo III para o IV. Exemplo de uma proteína com ISC é a ferroquelatase, que está envolvida na adição de ferro à protoporfirina IX para a síntese de heme. O processo de síntese do ISC é complexo e a compreensão dos seus mecanismos de regulação está ainda em desenvolvimento (Mena et al., 2015).

A cadeia respiratória constitui uma fonte de ERO provenientes de perdas. A coexistência de ferro e ERO no espaço isolado da mitocôndria torna este organelo particularmente propenso a danos causados e mediados por radicais de hidroxilo (Urrutia et al., 2014). A mitocôndria lesionada apresenta um maior risco de perdas de elétrons na cadeia respiratória, produzindo consequentemente mais ERO, gerando um ciclo vicioso (Barbosa et al., 2006).

Ainda não está totalmente esclarecido como ocorre a entrada do ferro na mitocôndria. Estudos sugerem a presença de um transportador, a mitoferrina (SLC25A37), que possui grande afinidade para o ferro. Após o ferro ser transportado através da membrana mitocondrial, a frataxina, uma proteína localizada na membrana interna e na matriz mitocondrial, permite uma regulação da sua utilização destinando o ferro à síntese do heme ou dos Fe-S (Figura 11) (Grotto, 2010).



**Figura 11.** Internalização do ferro na mitocôndria e a regulação executada pela frataxina na síntese do heme e dos aglomerados de Fe-S (Adaptado de Grotto, 2010).

A frataxina desempenha um papel essencial pois ao formar um complexo com o ferro, previne a formação de radicais livres na mitocôndria. Portanto, a carência de frataxina promove a acumulação de ferro mitocondrial, em detrimento do ferro citosólico (Grotto, 2010).

#### 2.2.1.2. Disfunção mitocondrial e acumulação de ferro

A disfunção mitocondrial e o consequente dano oxidativo têm sido propostos para desempenhar um papel crítico nas doenças neurodegenerativas, incluindo a DH (Solans et al., 2006).

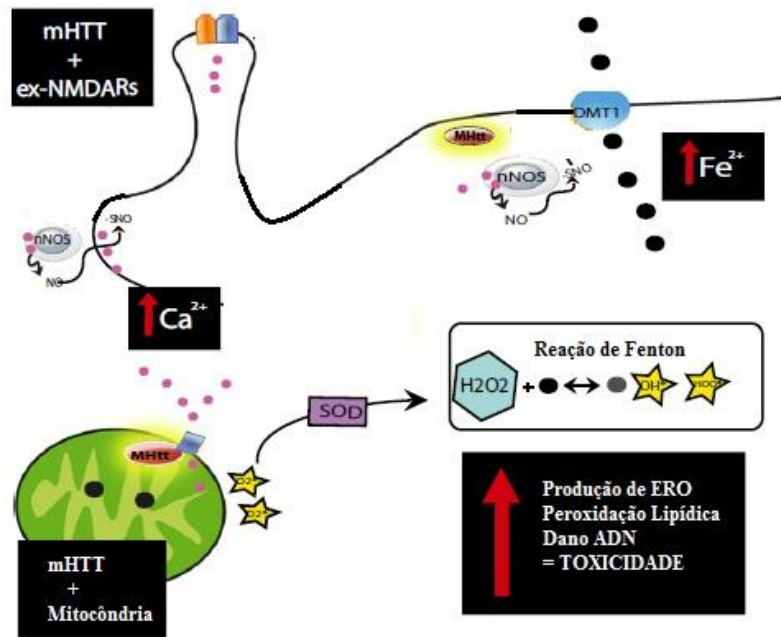
As mitocôndrias desempenham um papel fulcral na produção de ERO, um processo intimamente associado com a produção de ATP. Assim, torna-se importante a preservação da homeostase do ferro mitocondrial, essencial para manter a produção de radicais hidroxilo numa concentração mínima enquanto sustenta concomitantemente uma síntese ideal de heme e ISC (Mena et al., 2015). O ADN mitocondrial é vulnerável ao stress oxidativo devido à carência de histonas (tornando-o desprotegido), à elevada

densidade de informações, aos mecanismos limitados de reparação e aos abundantes radicais livres criados na membrana interna mitocondrial (Muller e Leavitt, 2014).

A disfunção mitocondrial apresenta uma elevada relevância para a degeneração específica do corpo estriado em que esta pode ser modelada por toxinas ambientais seletivas ou por manipulação genética da mitocôndria. Estudos em modelos de roedores com DH vieram a comprovar que a disfunção mitocondrial provém de neurotoxinas mitocondriais. Esta disfunção resulta numa diminuição da síntese de ATP bem como de ISCs e de grupos heme (Muller e Leavitt, 2014). Estudos *postmortem* em pacientes com DH, mostraram que o núcleo caudado e o putamen apresentavam deficiências graves nos complexos II e III mitocondriais da cadeia respiratória (Solans et al., 2006).

Vários estudos têm sugerido que a forma mutante de Htt está também implicada nesta disfunção por causar danos nos neurónios por interferência direta com a função mitocondrial. A diminuição da energia metabólica tem sido proposta como um mecanismo pelo qual a mHtt medeia a morte neuronal. Pacientes com a DH e que apresentem perda de peso durante a progressão da doença, poderá estar relacionado com a síntese comprometida de ATP. A mHtt foi encontrada na membrana externa mitocondrial em células do corpo estriado obtido a partir de pacientes com DH (Mena et al., 2015). A presença de mHtt solúvel leva a um aumento da produção de ERO e a relação entre a mHtt e a DH não é bem compreendida, mas o processo de formação de IBs pode ser uma ampla resposta à presença de mHtt. No entanto, eles também têm sido referidos como sendo centros de stress oxidativo dependentes de ferro (Muller e Leavitt, 2014).

A acumulação de ferro não parece estar na origem da DH, mas pode ser relatado como um evento precoce na cascata patológica. A perturbação da função normal da Htt na absorção do ferro, causado pela expansão da poliQ, pode contribuir para a acumulação de ferro que é observada na patologia abordada, constituindo um evento mais tardio na neurodegeneração (Figura 12) (Mena et al., 2015).



**Figura 12.** Potenciais interações do ferro e mHtt na indução do stress oxidativo (Adaptado de Muller e Leavitt, 2014).

Foram também detetados defeitos na homeostase do cálcio mitocondrial como um efeito direto das poliQ (Solans et al., 2006). Na presença de mHtt, ocorre um aumento da sensibilidade da ativação do recetor de N-metil-D-aspartato (NMDAR), que leva a um aumento dos níveis de cálcio intracelulares. Com a perda de potencial de membrana e de proteínas funcionais, o poro de transição de permeabilidade liberta, eventualmente, o cálcio intracelular a partir da mitocôndria (Muller e Leavitt, 2014).

O aumento dos níveis de cálcio intracelular conduz à ativação de enzimas dependentes de cálcio, incluindo a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). Este pode-se ligar através do NMDAR levando à produção de óxido nítrico (NO), contribuindo para uma sinalização alterada. A abundância de NO produzido na célula pode também formar radicais de peroxinitrito na presença de superóxidos produzidos a partir da sinalização respiratória alterada nas mitocôndrias. Os peroxonitratos podem reagir com água produzindo mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno. Tem sido demonstrado que a nNOS ativada pelo cálcio se liga ao TMD-1, conduzindo assim ao influxo intracelular de ferro na membrana plasmática e a nível endossomal. Este aumento de ferro fica então disponível para reagir com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno já produzido. A presença de Fe e dos consequentes

radicais hidroxilo, superóxido e espécies reativas de azoto (ERA) levam assim a aumento da peroxidação lipídica, danos no ADN, stress celular, e, eventualmente, morte celular neuronal, levando à neurodegeneração descrita na DH (Muller e Leavitt, 2014).

### **2.2.2. Mecanismo neurodegenerativo do manganês**

A exposição a níveis elevados de manganês provoca neurotoxicidade, especialmente em regiões do cérebro onde se acumula, preferencialmente no globo pálido, estriado, substância negra e no núcleo subtalâmico (Madison et al, 2012). No entanto, pesquisas recentes sobre a DH identificaram uma deficiência na movimentação de manganês neuronal, associado à diminuição dos níveis de manganês neuronais. De notar, que os níveis de manganês intracelulares encontram-se reduzidos no corpo estriado em doentes com DH (Horning et al., 2015). A deficiência de manganês não é comum nos humanos, pois uma grande parte deste metal é adquirida a partir da dieta. No entanto, a deficiência de manganês é encontrada em diversos problemas neurológicos, incluindo a DH (Menon et al., 2015). Na patologia em questão, os níveis de manganês encontram-se significativamente reduzidos no córtex cerebral, sendo este fortemente afetado na DH (Menon et al., 2015). O mecanismo pelo qual a mHtt danifica o transporte de manganês ainda se encontra desconhecido (Horning et al., 2015).

A deficiência de manganês resulta num conjunto de várias alterações fisiológicas, incluindo anormalidades esqueléticas e alterações no metabolismo lipídico (Menon et al., 2015). O manganês é um co-fator da SOD mitocondrial, uma enzima antioxidante essencial que contribui para uma correta metabolização dos radicais livres na mitocôndria. A deficiência de manganês resulta numa diminuição da atividade da MnSOD, aumentando assim a peroxidação lipídica mitocondrial devido a um aumento de radicais livres, resultando numa desordem neurodegenerativa (Menon et al., 2015).

A deficiência parcial/perda de atividade da MnSOD revelou um aumento da sensibilidade neuronal para a toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (3-NP), originando um fenótipo da DH neurodegenerativa semelhante com a degeneração dos neurónios médios espinhosos do estriado (núcleo caudado/putamen) (Horning et al., 2015).

A hipótese de que a disfunção mitocondrial contribui para a patogénese na DH foi primeiro testada farmacologicamente com a utilização do 3-NP, um inibidor irreversível da succinato desidrogenase, uma subunidade do complexo II da cadeia transportadora de eletrões e componente do ciclo de Krebs (La Fontaine et al., 2000). O modelo com DH induzido com o 3-NP provocou uma replicação das características clínicas e fisiopatológicas da doença, tais como coreiforme espontânea, distonia e défices cognitivos, abrangendo défices de memória de trabalho, incluindo deste modo a degeneração progressiva do tecido estriatal (Mehrotra et al., 2015).

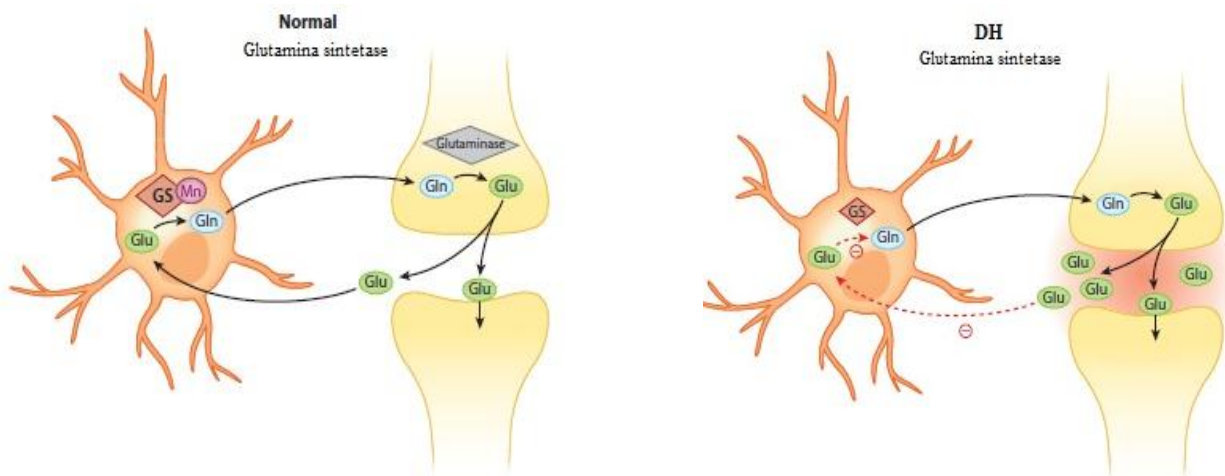
Um dos mecanismos, após a administração de 3-NP, foi o desenvolvimento da disfunção mitocondrial que leva a uma insuficiência bioenergética. Esta falha bioenergética envolve três processos que interagem entre si: diminuição de energia (ATP), stress oxidativo e excitotoxicidade (Mehrotra et al., 2015). A administração de 3-NP resultou num compromisso de funções mitocondriais, em termos de:

- (1) Atividade diminuída das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial, níveis alterados do citocromo, coloração histoquímica reduzida do complexo II e IV e redução da expressão de mRNA de complexos da cadeia respiratória;
- (2) Aumento do stress oxidativo mitocondrial causado pelo aumento de ERO e níveis de nitrito, juntamente com a diminuição da MnSOD e da atividade da enzima catalase;
- (3) Mudanças estruturais mitocondriais avaliadas pelo inchaço mitocondrial, reduzido potencial de membrana mitocondrial e mudanças ultra-estruturais;
- (4) Elevação dos níveis de citocromo c citosólicas, atividade da caspase 3 e 9 juntamente com expressão alterada de proteínas apoptóticas e;
- (5) Funções cognitivas prejudicadas (Mehrotra et al., 2015).

Esta lesão mitocondrial resultante da deficiência de MnSOD contribui para a neurodegeneração (Horning et al., 2015).

A diminuição da actividade da glutamina sintetase (GS) tem sido observada na DH. Esta redução da expressão da GS em astrócitos foi observada em cérebros com DH, especialmente em fases tardias da doença (Horning et al., 2015). A GS é também uma enzima dependente do manganês sendo principalmente localizada em astrócitos que catalisam a conversão do neurotransmissor glutamato (Glu) em glutamina (Gln), podendo este ser libertado e posteriormente retomado por neurónios para a nova síntese de Glu (Horning et al., 2015). A absorção eficiente de Glu depende da actividade da GS, indicando um papel importante para a GS na função sináptica normal bem como um efeito neuroprotetor desta enzima contra a excitotoxicidade induzida pelo Glu e consequente neurodegeneração (Horning et al., 2015).

Na DH, onde os níveis de manganês se encontram reduzidos, a actividade da GS é prejudicada e inibe a captação de Glu, aumentando desta forma a concentração de Glu extracelular (Figura 13) (Horning et al., 2015). Consequentemente, os níveis elevados de Glu extracelular aumentam a expressão da GS e inibem os transportadores de Glu gliais (Horning et al., 2015). Os níveis elevados de Glu extracelular tornam-se neurotóxicos com consequente inibição da absorção de Glu pelos astrócitos, originando a neurotoxicidade por Glu (Horning et al., 2015).



**Figura 13.** Atividade reduzida da GS na DH (Adaptado de Horning et al., 2015).

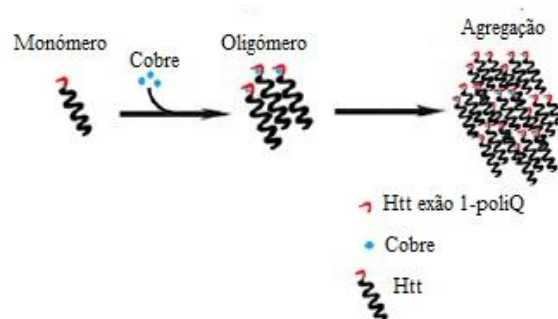
### 2.2.3. Mecanismo neurodegenerativo do cobre

O cobre, em concentrações elevadas, tem sido apontado como um fator causador da neurodegeneração, mais uma vez associado ao excesso de produção de ERO (Rotilio et al., 2000). Concentrações aumentadas de cobre têm sido relatadas em cérebros humanos com DH. No entanto, a causa deste acréscimo dos níveis de cobre na DH e os caminhos específicos através dos quais eles podem potencializar a neurodegeneração são ainda desconhecidos (Fox et al., 2007). Supõe-se que o aumento da quantidade de cobre ligado a locais de ligação com baixa afinidade na DH, poderia promover o stress oxidativo e a neurodegeneração (Desai e Kaler, 2008).

O papel do cobre na DH apresenta elevada relevância em duas proteínas, onde foram relatadas duas maneiras possíveis nas quais o cobre poderia contribuir para a patogênese na DH:

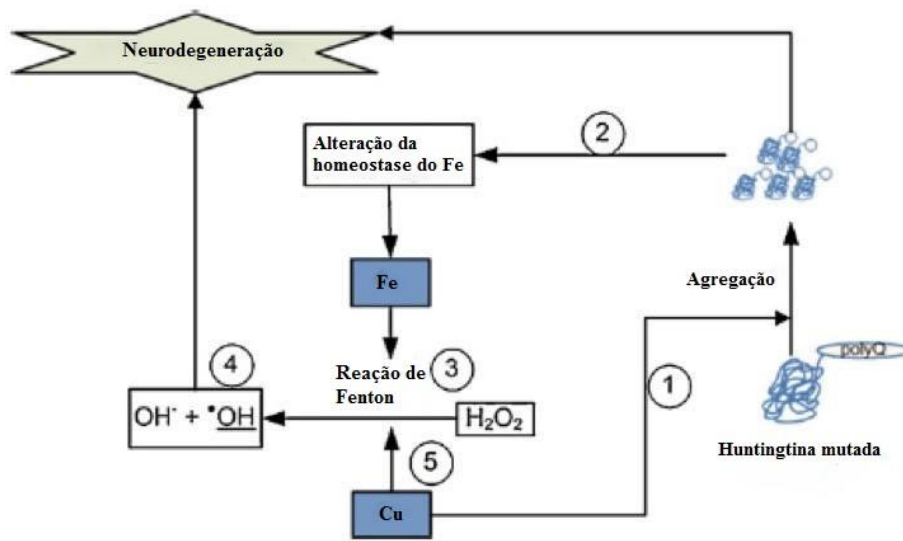
- 1) Na Htt, devido à sua centralidade na doença, por modulação da sua estrutura; e
- 2) Na lactato desidrogenase (LDH), devido à sua sensibilidade documentada ao cobre, à sua necessidade para o metabolismo energético cerebral normóxico e devido a algumas evidências na alteração do metabolismo do lactato em cérebros com DH (Fox et al., 2007).

Estudos *in vitro* relataram que o cobre pode acelerar significativamente a fibrilação e a agregação do exão 1 da Htt com trato poliQ. A ligação do cobre ao exão 1 da Htt poliQ induz a oligomerização da proteína, traduzindo-se em mais depósitos de fibrilas e conseqüentemente à sua agregação (Figura 14) (Xiao et al, 2013).



**Figura 14.** Efeito do cobre na DH (Adaptado de Xiao et al., 2013).

O cobre poderá então promover a conformação alterada da mHtt, a agregação e/ou a atividade redox (Fox et al., 2007). Estudos vieram a comprovar que o cobre promove a agregação de Htt e interage com resíduos de histidina (His) no terminal-N da proteína. A alteração da homeostase do cobre poderá perturbar a estrutura e função da Htt (Figura 15). Modificações da proteína huntingtina (1) conduzirão a uma alteração da homeostase do ferro (2), conduzindo à acumulação de ferro. O aumento dos níveis de ferro conduzirá a uma cascata de eventos através da reação de Fenton (3), à geração de radicais livres (4) e, finalmente, à neurodegeneração. O cobre também poderá participar na reação de Fenton (5) (Rivera-Mancía et al., 2010).



**Figura 15.** O ferro e o cobre na DH (Adaptado de Rivera-Mancía et al., 2010).

Estudos propuseram uma atividade reduzida da LDH na DH, devido pelo menos em parte, à inibição enzimática mediada pelo cobre, levando possivelmente à neurodegeneração. Várias enzimas glicolíticas e desidrogenases mitocondriais, incluindo a LDH e a succinato desidrogenase (SDH) são sensíveis à inativação mediada pelo cobre. A LDH constitui um componente importante no transporte de lactato em neurónios-astrocitos através do qual o lactato é libertado pelos astrocitos e usado como um substrato energético pelos neurónios. Estudos comprovam que os níveis de lactato estão aumentados no estriado humano com DH (Fox et al., 2007). Porém, são necessários mais estudos sobre o papel do cobre na DH (Rivera-Mancía et al., 2010).

### **2.3. Diagnóstico da doença de Huntington**

A DH, uma patologia hereditária autossômica dominante, caracterizada por movimentos motores excessivos e défices neurofisiológicos, necessita de uma busca incessante para o seu diagnóstico precoce (Finkbeiner, 2011).

Para tal, deverá ser realizado um exame físico conjugado com uma avaliação psicológica, para assim se conseguir determinar se as manifestações clínicas da doença já se iniciaram. Os movimentos involuntários excessivos, de qualquer região do corpo, são uma razão frequente para a procura de ajuda médica (Martelli, 2014). A realização de uma cuidada história familiar é um dos critérios usados para o diagnóstico, visto que se trata de uma doença de carácter hereditário com sintomas específicos (Gil- Mohapel et al., 2011).

Para o diagnóstico pode ser realizado um teste genético que tem por base uma técnica de PCR de uma amostra sanguínea do indivíduo em causa, para posterior realização de uma contagem das repetições CAG presentes nos alelos de Htt (Gasser et al., 2003). Estes testes podem ser realizados em apenas três circunstâncias (Meyers, 2004):

1. Na confirmação do diagnóstico, através da presença de uma cópia expandida da repetição trinucleotídica do Htt;
2. Na realização de um teste preditivo para populações com predisposição genética para a patologia que consiste na examinação neurológica e do ADN, bem como, aconselhamento;
3. Nos testes pré-natais, em que estes não são muito utilizados, uma vez que os indivíduos com risco de possuírem a doença realizam os testes antes da gravidez. Os indivíduos com teste positivo para a doença geralmente optam por não ter filhos.

Apesar de muitos procurarem a cura para a patologia, menos de 5% estão dispostos a realizar este tipo de teste, devendo-se esta situação à ausência de um tratamento específico. No caso da sua realização e da resposta ser positiva, a ocorrência de suicídio está descrita na bibliografia (Walker, 2007). A realização destes testes deve-se aos

possíveis portadores da doença necessitem de tomar decisões a nível profissional e pessoal como é o caso de ter filhos (Meyers, 2004). Antes da sua execução, os pacientes devem ser informados dos riscos relativos, e posteriormente apoiados medicamente e de forma confidencial (Walker, 2007).

A imagiologia desempenha também um papel predominante no diagnóstico da DH. Podem ser realizados exames como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética em casos de patologia moderada a severa. Estas demonstram, em caso de patologia avançada, uma diminuição bilateral do volume do corpo estriado-núcleo caudado e um aumento dos cornos frontais dos ventrículos laterais. Outras regiões do corpo estriado como o putamen e o globo pálido também são afetados particularmente com o progresso da doença, com evidência adicional de alterações talâmicas (Montoya et al., 2005; Walker, 2007).

A ressonância magnética funcional e a tomografia por emissão de positrões (PET) demonstram a ocorrência de alterações cerebrais antes do início dos sintomas da doença. Técnicas específicas da ressonância podem determinar de forma específica o tamanho do córtex e do corpo estriado (Montoya et al., 2005; Walker, 2007).

Atualmente, estudos neurodegenerativos revelaram alterações na massa cinzenta cortical e nas regiões de massa branca cerebrais. Redução do volume do osso frontal e temporal foram observados em doentes com DH. Outros estudos demonstraram ainda diminuição do hipocampo, do cerebelo e consequentemente do volume cerebral (Montoya et al., 2005; Walker, 2007).

Uma limitação do diagnóstico é a impossibilidade de diagnosticar fenotipicamente de forma diferencial a atrofia dentatorubro palidolusiana (DRPLA), a DH2 (característica do Sul de África e das populações negras Americanas) e de algumas doenças hereditárias (Walker, 2007).

## **2.4. Terapêutica da doença de Huntington**

Nos dias de hoje, podem ser encontradas mais de 3000 publicações científicas sobre a eficácia de inúmeras terapêuticas no tratamento da DH. Apesar disto, ainda não existe um tratamento eficaz para esta patologia neurodegenerativa (Gil-Mohapel et al., 2011). Como em muitas outras doenças crônicas, é necessário reconhecer muitas das limitações dos tratamentos médicos que, no entanto, nos últimos 20 anos apresentaram um ligeiro progresso (O Walker, 2007). O sucesso do tratamento de uma doença neurodegenerativa depende de dois fatores independentes, a seleção adequada dos candidatos ao tratamento e a capacidade de deteção dos efeitos terapêuticos na população clínica.

Esta contribuição é necessária, porém insuficiente por si só, para ganhos terapêuticos e benefícios clínicos (Ray, Shoulson, 2011).

### **2.4.1. Tratamentos farmacológicos**

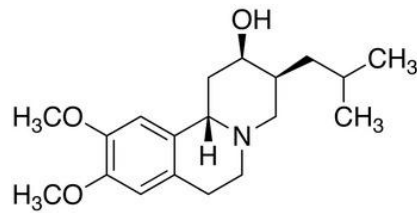
As intervenções farmacológicas podem melhorar, temporariamente, o controlo motor e os distúrbios psiquiátricos presentes em pacientes com DH. No entanto, estas melhorias não modificam positivamente os mecanismos de neurodegeneração (Kumar et al., 2015). Drogas anti-coreicas, como a tetrabenezina ou os neurolépticos, possuem a capacidade de proporcionar aos doentes, com coreia severa, uma diminuição dos movimentos involuntários constantes (O Walker, 2007).

A tetrabenezina (Revocon®) (Figura 16) é um inibidor do transporte vesicular da monoamina 2, levando a uma depleção das monoaminas, particularmente da dopamina no cérebro. É utilizada para o tratamento de movimentos involuntários em variadas patologias (Kegelmeyer et al., 2014).

Esta é composta por uma catecolamina de depleção, proporcionando um melhor controlo motor nos pacientes com a patologia em questão (Smith et al., 2016).

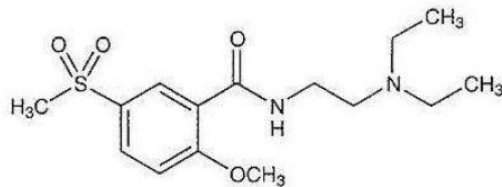
Fármacos que apresentam na sua constituição dopamina de depleção levam a manifestações tardias (Smith et al., 2016). Estas drogas podem ainda causar bradiquenésia, rigidez, depressão e ainda sedação (O Walker, 2007). Ao contrário dos bloqueadores dos recetores de dopamina, esta droga, nos seus estudos documentados,

nunca causou disquênese tardia, tendo sido descrito o primeiro caso clínico de utilização deste fármaco em 1960 (Diana, 2007).

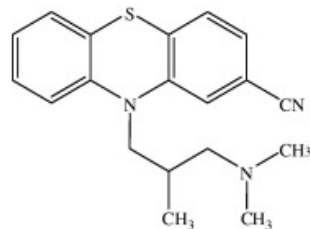


**Figura 16.** Estrutura da tetrabenezina (Wikipedia, the free encyclopedia, 2016).

Os neurolépticos, tais como tiaprida (Tiapridal®) (Figura 17) e ciamemazina (Tercian®) (Figura 18), realizam o bloqueio dos recetores pós-sinápticos da dopamina no sistema mesolímbico resultando num efeito desejado de ação antipsicótica. Do bloqueio dos recetores de dopamina no sistema nigro-estriado podem resultar reações motoras extrapiramidais. Os neurolépticos bloqueiam ainda recetores adrenérgicos, recetores centrais da histamina e recetores colinérgicos, de que resultam outros efeitos laterais (Infarmed, 2012).



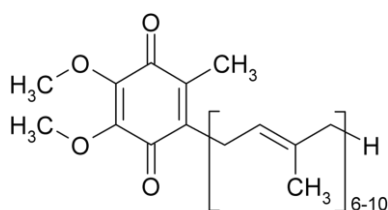
**Figura 17.** Estrutura da tiaprida (Ortuño et al., 2007).



**Figura 18.** Estrutura da ciamemazina (Singh et al., 2012).

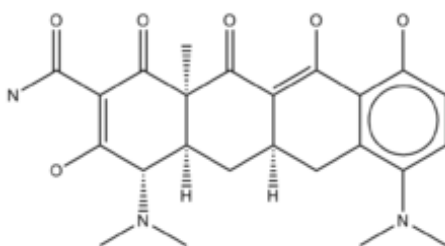
Pode-se ainda referir alguns tratamentos experimentais. Nesta vertente de tratamentos, o clínico deverá ser prudente e controlar os pacientes sujeitos ao tratamento e pré determinar qual é a magnitude dos efeitos desejáveis (Mena et al, 2015).

A coenzima Q10 (Q10® Forte) (Figura 19) mostrou eficácia em modelos de animais transgênicos com DH e conseqüentemente uma melhoria farmacológica nos ensaios clínicos humanos. Acredita-se que esta substância melhora a função mitocondrial na DH (O Walker, 2007).



**Figura 19.** Estrutura da coenzima Q10 (Wikipedia, the free encyclopedia, 2016).

A minociclina (Minotrex®) (Figura 20), uma droga com efeito anti-inflamatória e anti-apoptótica, pode também ser utilizada (O Walker, 2007).



**Figura 20.** Estrutura da minociclina (Wikipedia, the free encyclopedia, 2016).

Tem vindo a ser desenvolvido uma técnica utilizando marcadores específicos para a doença- marcadores serológicos (O Walker, 2007).

Interferir com o catabolismo da mHtt pode ser possível através da caspase 6. Sem esta enzima não se desenvolvem os sintomas (O Walker, 2007).

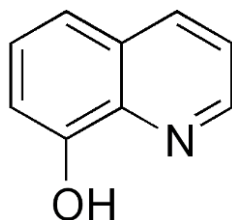
Como alternativa às terapêuticas moleculares de base, neuroblastos fetais foram transplantados dentro de regiões do corpo estriado em cinco portadores da DH. Três destes mostraram melhoria dos sintomas clínicos durante períodos de quatro a seis anos (Smith et al., 2016).

### 2.4.2. Agentes quelantes

A terapia com quelantes metálicos é uma estratégia que consiste em eliminar o excesso de iões metálicos do corpo. Neste tratamento é preciso ter em conta as alterações intrínsecas associadas à quelação e à inerente complexidade da dinâmica dos metais no corpo. A primeira grande dificuldade destes agentes passa por ultrapassar a BHE (Mitra et al., 2015).

A acumulação do ferro conduz ao stress oxidativo. Isto sugeriu que os quelantes de ferro podem ser benéficos na doença (Rivera- Mancía et al., 2010). Em particular, a 8-hidroxiquinolina e a deferiprona são candidatas ao tratamento de doenças neurodegenerativas com acumulação de ferro (Mena et al., 2015).

Quando abordamos a 8-hidroxiquinolina (Figura 21), podemos afirmar que é a mais efetiva para a prevenção da proteotoxicidade causada pelas proteínas com mau enrolamento através do mecanismo metalo-dependente (Barnham e Bush, 2014). A 8-hidroxiquinolina, também chamada de PBT2, falhou em ensaios clínicos de fase III devido à falha de eliminação das placas  $\beta$ -amilóide (Mitra et al., 2015).

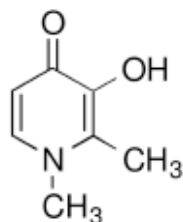


**Figura 21.** Estrutura da 8-hidroxiquinolina (Wikipedia, the free encyclopedia, 2016).

A deferiprona (Figura 22) diminui a acumulação de ferro pela transformação do ferro quelatado em transferrina insaturada, levando a um balanceamento da retenção e à redistribuição química do ferro pelo corpo (Mitra et al., 2015).

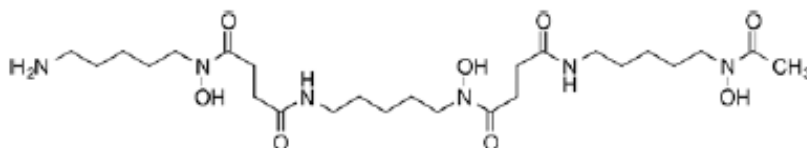
O tratamento com deferiprona mostrou resultados promissores num estudo duplamente cego realizado com um grupo placebo. Os pacientes que tomaram o fármaco (durante 12 meses de tratamento) mostraram um tratamento precoce e significativamente eficaz na redução de depósitos de ferro presente na substância negra (Mena et al., 2015). Outro

estudo revelou o desaparecimento dos benefícios do tratamento passados 24 meses, voltando o ferro a depositar-se na substância negra (Mitra et al., 2015).



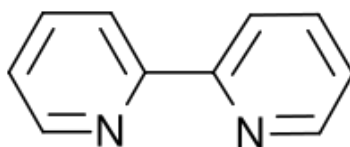
**Figura 22.** Estrutura da deferiprona (Bergeron et al., 2015).

A desferrioxamina (Figura 23), também um quelante do ferro, foi a primeira a ser usada no tratamento de pacientes com DH, causando um declínio dos níveis de placas amilóides e diminuição da deterioração da cognição. Provoca, na maioria dos casos, anemia (Mitra et al., 2015). Um pré tratamento com a desferrioxamina levou à diminuição do tamanho dos corpos de inclusão (Rivera-Mancia et al., 2010).



**Figura 23.** Estrutura da desferrioxamina (Bergeron et al., 2015).

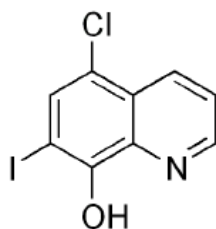
O 2,2-bipiridina (Figura 24), agente quelante do ferro, mostrou eficácia na redução da hemorragia intra-cerebral e isquemia. Surgiu para prevenir a ocorrência de problemas após a ocorrência de um acidente vascular encefálico. Esta terapêutica suscita ainda muitas dúvidas quanto à sua utilidade (Mitra et al., 2015).



**Figura 24.** Estrutura da 2,2-bipiridina (Wikipedia, the free encyclopedia, 2016).

O clioquinol (Figura 25) e os seus derivados, como PBT1 e M30, pertencem à nova geração de quelantes, provando a sua efetividade no tratamento experimental da DH (Mena et al., 2015).

O clioquinol é um agente quelante neuroprotetivo utilizado para o ferro e cobre, diminuindo os agregados metálicos no cérebro (Barnham e Bush, 2014). Este quelante devolve a homeostasia metálica. Atravessa eficazmente a BHE, captando o cobre, inibindo ainda a deposição  $\beta$ -amilóide (Mitra et al., 2015). A dissolução das placas  $\beta$ -amilóide deve-se, provavelmente, à redistribuição do cobre e ferro (Mena et al., 2015). O clioquinol diminui a expressão da mHtt, diminuindo assim a patologia. Isto deve-se, possivelmente, ao silenciamento da atividade redox da mHtt (Muller, Leavitt, 2014).

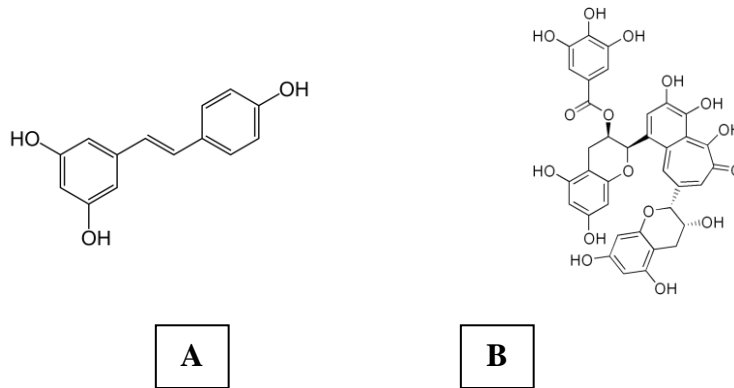


**Figura 25.** Estrutura do clioquinol (Wikipedia, the free encyclopedia, 2016).

Os quelantes metálicos naturais, incluindo-se os curcuminóides e os flavonóides, encontram-se presentes na dieta da Ásia rural. Acredita-se que estes são benéficos no combate da neurotoxicidade (Mitra et al., 2015). A curcumina, presente no açafrão da Índia, apresenta um largo espectro de ação farmacológica. Nos últimos anos, tem vindo a ganhar popularidade a captar os iões metálicos e na proteção dos neurónios (Mitra et al., 2015). A *epigallocatechin gallate* é a mais abundante catequina existente no chá, tendo função ação quelante de metais, inibe o mau enrolamento da Htt e diminui a toxicidade (Barnham e Bush, 2014). Esta substância encontrada nas bagas, cacau e cebolas é uma catequina com ação neuroprotetiva e quimioprotetiva. Possui propriedades quelantes do ferro. Porém, necessita de mais investigação (Mitra et al., 2015).

### 2.4.3. Tratamento antioxidante

Este tipo de tratamento recorre ao ativador da sirtuina, resveratrol (potente antioxidante) e ao polifenol encontrado no vinho tinto (Figura 26) (Solans et al., 2006).



**Figura 26.** Estrutura do resveratrol (**A**) e do polifenol (**B**) (Wikipedia, the free encyclopedia, 2016).

O tratamento antioxidante preserva parcialmente a respiração celular mas não diminui o defeito de crescimento celular exercido pelo domínio da poliQ mutante (Solans et al., 2006). Até ao momento não existe cura para a DH e a maioria das estratégias de tratamentos disponíveis ajuda a aliviar os sintomas motores e psiquiátricos associados à doença. Deste modo, o conhecimento dos mecanismos neurodegenerativos envolvidos na DH permitirá desenvolver uma combinação de estratégias terapêuticas eficazes e novas investigações (Solans et al., 2006).

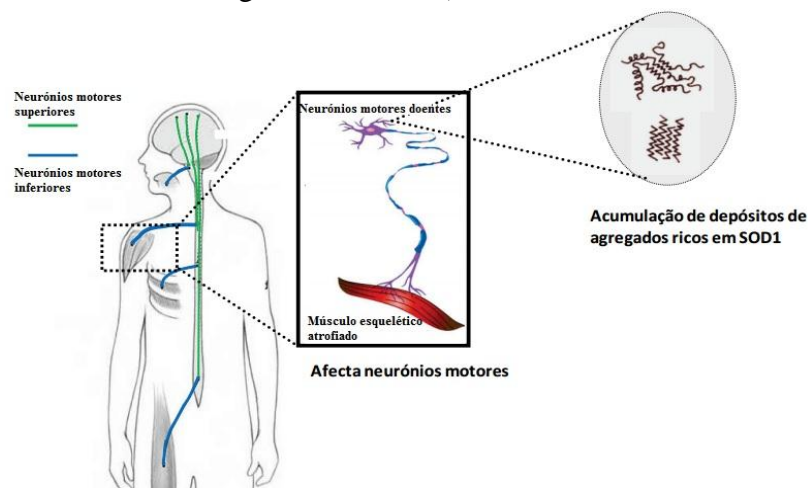
### III. Esclerose lateral amiotrófica

#### 3.1. Caracterização da esclerose lateral amiotrófica

A ELA é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva da função motora e da capacidade respiratória, cuja mortalidade se deve fundamentalmente à repercussão respiratória (Rodrigues et al., 2004).

A ELA é caracterizada por uma degeneração dos neurónios motores superiores e inferiores, na idade adulta, com um aumento da sua ocorrência normalmente após os 40 anos de idade, atingindo um pico máximo no final dos 60 anos ou meados dos 70 anos. Afeta mais de 30.000 pessoas por ano nos EUA, tornando-se na doença mais comum do neurónio motor (Bourassa et al., 2014; Keskin et al., 2016). Nesta patologia estima-se uma ocorrência mundial de cerca de 2 por 100.000 habitantes e uma prevalência de 4 a 7 por 100.000 habitantes (Kaur et al., 2015).

A neurodegeneração ocorre principalmente no córtex motor, tronco cerebral e medula espinhal e é mais comum nos homens do que nas mulheres, em que a sobrevivência média está compreendida entre 3 a 5 anos, podendo em alguns casos chegar aos 10 anos (Figura 27) (Kaur et al., 2015; Rodrigues et al., 2004).



**Figura 27.** Esquema representativo dos neurónios motores afetados pela ELA e respectivos músculos associados. Entre os músculos afetados encontram-se os músculos dos membros inferiores, superiores, língua e músculos peitorais envolvidos na respiração.

A primeira evidência do aparecimento da doença caracteriza-se pelo surgimento da fraqueza simétrica num dos membros (lateral), associada à atrofia progressiva dos músculos (amiotrófica). Dentro do corpo, as células nervosas envelhecem (esclerose) e os nervos envolvidos morrem, deixando o doente cada vez mais limitado, chegando mesmo na fase final da doença a uma paralisia total, ficando completamente dependente nas suas atividades diárias. Por outro lado, quando a desnervação inicial compromete a musculatura bulbar, em vez da musculatura dos membros, o principal problema associado é a dificuldade de deglutição, mastigação e dos movimentos da face e da língua, chegando mesmo a um estado de afasia (Rodrigues et al., 2004).

Aproximadamente 90% de todos os casos de ELA não possuem componente genética ou causa conhecida e são chamados esporádicos. Os restantes 10% têm uma ligação genética e são conhecidos como casos de ELA familiar e são causados por mutações em vários genes. Nos casos de ELA familiar, sendo esta responsável por 2,5% de todos os casos de ELA, 25% são causados por mutações no gene que codifica a SOD1, que representa o exemplo mais estudado (Bourassa et al., 2014). No entanto, pelo menos 160 mutações na SOD1 têm sido associadas com os casos de ELA esporádica e ELA familiar (Lovejoy e Guillemin, 2014). As duas formas da doença partilham a mesma via de neurodegeneração e são clinicamente e patologicamente indistinguíveis, sugerindo que têm um mecanismo semelhante para gerar a doença.

### **3.2. Superóxido dismutase 1 na esclerose lateral amiotrófica**

Uma mutação no gene que codifica a SOD1, expressa ubiquamente na eliminação de radicais livres, parece estar na base desta patologia, encontrada em 1 a 9% dos pacientes com ELA. Está presente no cromossoma 21, ao qual está associado a uma forma autossómica dominante da ELA (Kaur et al., 2015; Keskin et al., 2016).

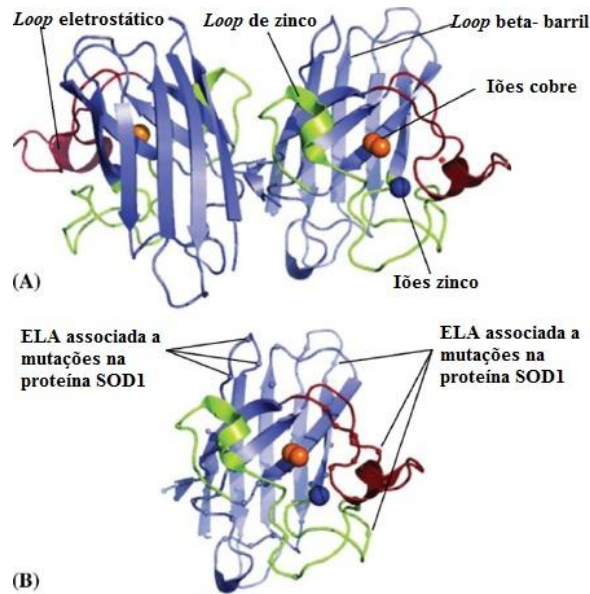
Estudos genéticos conduziram à identificação de uma ligação ao cromossoma 21 em cerca de 40% das famílias. Até 20% dos casos de ELA familiar contêm uma mutação no gene SOD1. No entanto, na maioria dos casos de ELA familiar, o defeito do gene e a patogénese são ainda desconhecidos (Kaur et al., 2015).

SOD1 é uma proteína altamente solúvel, pequena e globular. Esta enzima humana é homodimérica com uma ligação Cu/Zn, composta por oito cadeias  $\beta$  antiparalelas e dois átomos de metal que catalisam a conversão do anião tóxico superóxido em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . O íon cobre possui uma função catalítica e o íon zinco apresenta apenas uma função estrutural, ligados a cada monómero (Kaur et al., 2015; Mulligan e Chakrabartty, 2013).

A cadeia polipeptídica da SOD1 é enrolada num padrão em forma de barril, constituído por 8 folhas  $\beta$  interligadas por *loops*. Existem dois *loops* que têm grande importância funcional – o *loop* eletrostático e o *loop* de zinco. O *loop* eletrostático comprime resíduos polares cruciais para auxiliar o transporte eletrostático do substrato para o centro ativo. O zinco é coordenado por três histidinas e um resíduo de aspartato que formam o *loop* de zinco (Valentine et al., 2005).

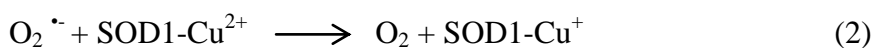
A estrutura da SOD1 humana e as mutações relacionadas com a ELA em SOD1 são mostradas na Figura 28A. A SOD1 é largamente expressa e constitui cerca de 0,5-0,8% da proteína solúvel no cérebro (Kaur et al., 2015).

As mutações patogénicas da SOD1 são classificadas em dois grupos, com base na sua posição na proteína (Figura 28B). As formas mutantes do  $\beta$ -barril têm geralmente uma perturbação estrutural próximo do sítio mutante. Por outro lado, a SOD1 com mutações em que afetam os locais de ligação dos metais têm geralmente falta de cobre e/ou de zinco, e são caracterizadas por uma disfunção conformacional dos elementos do *loop* eletrostático e de zinco, os quais são conhecidos por serem responsáveis pela ligação do íon metálico. As mutações  $\beta$ -barril em SOD1 podem resultar numa instabilidade da proteína que afeta a estabilidade do monómero. Em ambos os tipos de mutações de desestabilização da estrutura de SOD1 pode levar a uma oligomerização e à formação de agregados (Kaur et al., 2015).



**Figura 28.** A) Estrutura da SOD1 humana. O  $\beta$ -barril, o *loop* de zinco e o *loop* eletrostático são mostrados na cor azul, verde e vermelho, respectivamente. Os íons de cobre e zinco são exemplificados como esferas laranja e azul, respectivamente. B) Mutações na SOD1 relacionadas com a ELA. As mutações SOD1 são representadas como pequenas esferas dentro do monômero da proteína SOD1 (Adaptado de Kaur et al., 2015).

A SOD1 constitui um dos principais componentes do mecanismo de defesa das células contra os danos oxidativos. Ela converte o superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), uma espécie de radicais livres reativos altamente perigosos, produzidos na mitocôndria como um subproduto do metabolismo oxidativo, em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e  $H_2O_2$ . A reação envolve um mecanismo de "ping-pong" em que o local ativo das enzimas do átomo de cobre deslocam-se entre os estados de  $Cu^+$  e  $Cu^{2+}$  [(Equações (1) e (2))] (Mulligan e Chakrabarty, 2013).



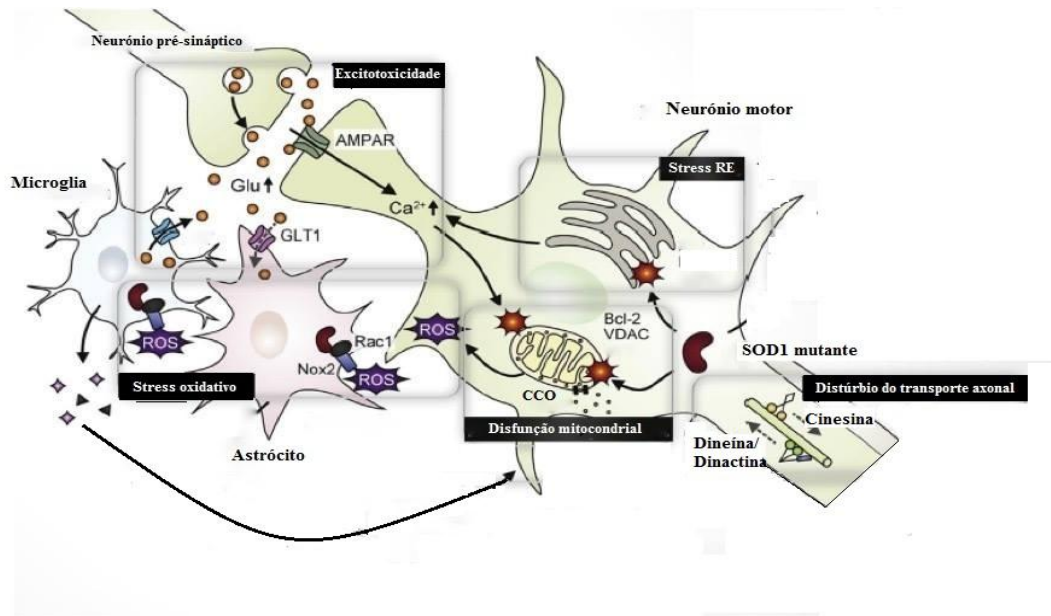
A concentração intracelular da SOD1 é relativamente elevada, entre 10 e 100  $\mu M$ , sendo esta aparentemente suficiente para consumir os níveis fisiológicos do radical superóxido (Mulligan e Chakrabarty, 2013).

A SOD1 constitui assim uma metaloproteína, uma apoproteína dependente do cobre e zinco para realizar a sua atividade antioxidante. Esta proteína desempenha um papel central na proteção da célula contra o stress oxidativo. No entanto, esta função de proteção pode tornar-se numa atividade pró-oxidante, no caso da SOD1 mal dobrada, onde o metal é deslocado, podendo este servir como um auxiliador da oxidação. Várias pesquisas vieram a comprovar que a SOD1 mal dobrada induz a oxidação, em vez de atuar como um antioxidante, podendo levar à geração do radical hidroxilo tóxico. Também foi demonstrado que a proteína pode libertar o cobre, ficando este no organismo no estado livre, tornando-se altamente reativo, induzindo deste modo o dano oxidativo intracelular através da reação de Fenton (Cavaleri, 2015).

Outra característica, que continua ainda por se descobrir relativamente à ELA, é o porquê de os portadores de mutações SOD1 serem aparentemente saudáveis até ao final da meia idade e, em seguida, submeterem-se a um rápido declínio neurológico (Keskin et al., 2016).

### **3.3. Mecanismos de neurodegeneração**

Os mecanismos pelos quais as espécies mal dobradas da SOD1 causam a doença estão ainda mal compreendidos. No entanto, têm sido sugeridos um envolvimento na perturbação da função mitocondrial, na indução de stress no retículo endoplasmático (RE) e no distúrbio do transporte axonal e agregação (Figura 29) (Keskin et al., 2016).



**Figura 29.** Mecanismos neurotóxicos que originam a ELA mediada pela SOD1 (Adaptado de Hayashi et al., 2015).

A SOD1 mutada associa-se ou interage com o RE, mitocôndria, complexo glial Nox/Rac1, resultando num stress do RE, numa disfunção mitocondrial e numa superprodução de ERO, respetivamente. A quebra do transporte axonal e a perda de suporte metabólico das bainhas de mielina que são formadas por oligodendrócitos parecem contribuir para a vulnerabilidade do axónio motor (Hayashi et al., 2015).

### 3.3.1. Excitotoxicidade pelo glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC. A libertação excessiva de glutamato a partir dos neurónios pré-sinápticos ou a depuração retardada pela fenda sináptica resulta numa ativação sustentada de recetores pós-sinápticos. Isto provoca, em seguida, uma sobrecarga de  $Ca^{2+}$  nas células pós-sinápticas e provavelmente subsequentes eventos tóxicos, tais como a disfunção mitocondrial. Esta neurotoxicidade mediada pelo glutamato é chamada de excitotoxicidade e foi considerada como um possível mecanismo patogénico da ELA, mesmo antes da identificação do gene SOD1 como causador (Hayashi et al., 2015).

O transportador de glutamato (GLT1) é expresso em astrócitos e tem um papel significativo na recaptção de glutamato. A perda seletiva do GLT1 tem sido relatada na ELA e é considerada um mecanismo causador da excitotoxicidade. No entanto, a

importância da redução do GLT1 na SOD1 relacionada com a ELA permanece controverso (Hayashi et al., 2015).

O glutamato extracelular excessivo aumenta o nível de  $Ca^{2+}$  nos neurónios pós-sinápticos pela sobreativação dos recetores de glutamato permeáveis ao  $Ca^{2+}$ . Como efeito adicional, os astrócitos que expressam a SOD1 mutante perdem a capacidade de regular a composição do recetor neuronal ionotrópico do ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA), resultando assim numa redução da sua importante subunidade do recetor de glutamato 2 (GluR2). A ausência da subunidade GluR2 aumenta a permeabilidade de  $Ca^{2+}$  dos recetores AMPA (AMPA), aumentando deste modo a vulnerabilidade dos neurónios motores para a excitotoxicidade. No entanto, o mecanismo preciso dos distúrbios na homeostase do cálcio neuronal no contexto da ELA ainda não é claro (Hayashi et al., 2015).

### **3.3.2. Stress oxidativo**

As ERO são geradas pelo metabolismo aeróbio e possuem um potencial para danificar as células por oxidação de várias biomoléculas, tais como proteínas, lípidos e ADN. Para evitar esta sinalização nociva, existem antioxidantes que exercem uma função na remoção das ERO. O equilíbrio colapsado entre a geração e a remoção de ERO é definido como stress oxidativo e está implicado em várias doenças, incluindo a ELA (Hayashi et al., 2015).

Os neurónios motores são conhecidos por serem particularmente vulneráveis ao stress oxidativo e o stress oxidativo coincidentemente é conhecido por causar na SOD1 uma alteração na sua forma monomérica inativa. Além disso, as ERO são conhecidas por causar a inibição do transporte axonal, podendo ocorrer várias horas antes de quaisquer sinais e sintomas de degeneração axonal (Kaur et al., 2015).

Efetivamente, vários marcadores de stress oxidativo encontram-se elevados em pacientes com ELA. Embora a SOD1 normalmente funcione como uma enzima antioxidante por desintoxicar o superóxido, o dano oxidativo por SOD1 mutante é predominantemente atribuído a um ganho de toxicidade através de uma regulação positiva de ERO, em vez de uma perda da função enzimática (Hayashi et al., 2015).

As ERO são geradas por meio de vários mecanismos, incluindo a atividade da NADPH-oxidase. Em células gliais, a NADPH-oxidase 2 (Nox2) forma um complexo com uma GTPase Rac1, cujo estado ativado está ligada a guanosina trifosfato (GTP) e promove a geração de ERO através da Nox2. A SOD1 mutada liga-se firmemente a Rac1, o que mantém Rac1 no seu estado ativo e conduz à ativação prolongada de Nox2, bem como o excesso de produção de superóxido (Figura 29) (Hayashi et al., 2015).

A cadeia respiratória mitocondrial também produz ERO e a disfunção mitocondrial induzida pela SOD1 mutada aumenta a geração de ERO através de alterações na atividade do complexo da cadeia transportadora de elétrons ou com uma sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hayashi et al., 2015). A perda de função da SOD1 resulta numa degradação insuficiente de ERO, que por sua vez danifica os substratos necessários pelos neurónios motores (Kaur et al., 2015).

### **3.3.3. Stress do retículo endoplasmático**

Entre os mecanismos moleculares envolvidos na patogénese da ELA, o stress do RE constitui o evento patológico mais antigo detetado nos neurónios motores invulneráveis (Taiana et al., 2016).

O stress do RE ocorre quando as proteínas com uma conformação aberrante se acumulam no lúmen do RE, devido a uma rutura no controlo de qualidade das proteínas ou devido a uma sobrecarga de polipéptidos sintetizados de novo no RE. A resposta de proteínas desdobradas (UPR) lida com o stress do RE através da indução de várias respostas adaptativas para reduzir a quantidade de proteínas deformadas. No entanto, a falha na UPR ou o stress do RE prolongado, resulta numa morte celular mediada por apoptose. O envolvimento do stress do RE na patogénese da ELA tem sido sugerido em ambos os casos de ELA relacionados com a SOD1 (Hayashi et al., 2015).

Além disso, uma análise longitudinal que utiliza camundongos transgênicos com SOD1 mutante revelou que a vulnerabilidade dos neurónios motores na ELA está intimamente relacionada com o stress do RE crónico e que neurónios motores vulneráveis expressam marcadores de stress do RE, mesmo em estágios pré-sintomáticos e muito antes dos neurónios motores resistentes (Hayashi et al., 2015).

### 3.3.4. Disfunção mitocondrial

A patogénese da ELA é ainda desconhecida, mas várias linhas de evidências indicam que a acumulação mitocondrial de SOD1 mutante é um mecanismo importante na disfunção mitocondrial, levando à patologia do neurónio motor e consequentemente à sua morte (Tafari et al., 2015).

A disfunção mitocondrial tem sido observada em grandes desordens neurodegenerativas. Embora os neurónios motores sejam altamente dependentes da fosforilação oxidativa, a relevância da mitocôndria na patogénese da ELA tem estado sob um estado de avaliação durante muitos anos. No entanto, os sinais de disfunção mitocondrial têm sido observados em múltiplos pacientes com ELA, em tecidos, incluindo o músculo (Tafari et al., 2015).

A diminuição da atividade da fosforilação oxidativa dos complexos I + III, II + III, IV e da citrato sintetase foram notados na mitocôndria da medula espinal de pacientes com ELA. Mais importante ainda, a disfunção mitocondrial evidenciada pela respiração reduzida e síntese de ATP precede, ao invés de resultar em défices comportamentais, indicando um papel importante da disfunção mitocondrial na progressão da doença. Além disso, muitos casos de ELA associados a mutações na perda da atividade antioxidante da SOD1 e ao excesso de produção de ERO, relatando um aumento do stress oxidativo ou danos oxidativos na medula espinal dos pacientes com ELA (Jiang et al., 2015).

Assim, um organelo alvo da SOD1 mutante é a mitocôndria. Em ratinhos transgênicos com SOD1 mutante, as funções mitocondriais principais, tais como a atividade da cadeia respiratória e a capacidade de tamponamento de  $\text{Ca}^{2+}$ , são diminuídas pelo tempo de início da doença. Além disso, a SOD1 mutante acumula-se seletivamente na face citosólica das mitocôndrias da medula espinal, mesmo na fase pré-sintomática, o que implica que os agregados de SOD1 mitocondriais contribuem para a iniciação da doença (Hayashi et al., 2015).

A homeostase mitocondrial pode ser interrompida através da interação da SOD1 mutante com várias proteínas alvo. Os alvos principais são a Bcl-2 e o seu parceiro de

ligação dependente da tensão do canal de aniões 1 (VDAC1), ambas proteínas de membrana integrais que estão incorporadas na membrana mitocondrial externa. A SOD1 mutante liga-se a Bcl-2 e converte-a numa conformação tóxica, através do qual a transferência de metabolito através da VDAC1, tais como o influxo de ADP para a mitocôndria, é inibida (Figura 29) (Hayashi et al., 2015).

A disfunção mitocondrial pode desencadear a apoptose através da libertação da CCO do espaço intermembranar mitocondrial (Hayashi et al., 2015). Em suma, a patologia mitocondrial pode causar deficiência na produção de energia, alterações na homeostase do cálcio e por fim a morte do neurónio motor (Pizzuti e Petrucci, 2011).

### **3.3.5. Distúrbio do transporte axonal**

Observações em camundongos transgênicos com SOD1 mutante revelaram que os defeitos no transporte de vesículas sinápticas axonais eram detetáveis nos neurónios motores vulneráveis durante as fases iniciais da ELA. Considerando-se que o transporte axonal é importante para os neurónios motores altamente polarizados com longos axónios, pode inferir-se que o transporte axonal revogado promove a progressão da doença, interrompendo o fornecimento de componentes celulares essenciais. A cinesina medeia o transporte axonal rápido (FAT) do corpo celular para a junção neuromuscular, movendo-se ao longo de filamentos dos microtúbulos (Figura 29) (Hayashi et al., 2015).

A SOD1 mutante inibe também o transporte rápido retrógrado que é facilitado pelo complexo Dineína/ Dinactina, mesmo durante as fases de pré-sintomáticas, levando deste modo a uma interrupção no transporte axonal que contribui para a neurodegeneração na ELA (Hayashi et al., 2015).

### **3.3.6. Agregados de superóxido dismutase 1**

A formação de agregados de SOD1 na medula espinal constitui a patologia primária encontrada em pacientes com ELA com mutações na SOD1, porém, pouco se sabe sobre o processo de agregação (Bourassa et al., 2014). A descoberta de agregados insolúveis de SOD1 em casos humanos de ELA levou à suposição de que a formação

dessas inclusões aberrantes pode representar um mecanismo tóxico através da qual a SOD1 induz a morte em neurónios motores (Hilton et al., 2015).

A produção de espécies monoméricas deficientes em metais destabilizadas num estado reduzido de ligação dissulfureto, auxiliada por meio de mutações, poderia apresentar uma via através da qual se poderão formar agregados insolúveis (Figura 30) (Hilton et al., 2015).



**Figura 30.** Esquema representativo da hipótese de agregação da SOD1, com a forma monomérica como precursor da agregação.

A ubiquitina detetada dentro dos agregados sugere que estas inclusões insolúveis foram marcadas para a sua degradação proteossômica em que esta pode ter sido impedida, talvez por meio de uma sobrecarga do sistema ubiquitina-proteassoma (Hilton et al., 2015).

Os agregados insolúveis estão tipicamente presentes em fases tardias da progressão da doença. No entanto, os agregados são susceptíveis de constituir uma consequência a jusante de processos patológicos (Hilton et al., 2015).

### 3.4. Efeito dos metais na esclerose lateral amiotrófica

Alterações do potencial tóxico dos metais de transição ferro e cobre estão implicados em processos neurodegenerativos, incluindo a ELA. No entanto, o papel preciso desempenhado por estes metais é ainda muito pouco claro (Lovejoy e Guillemin, 2014).

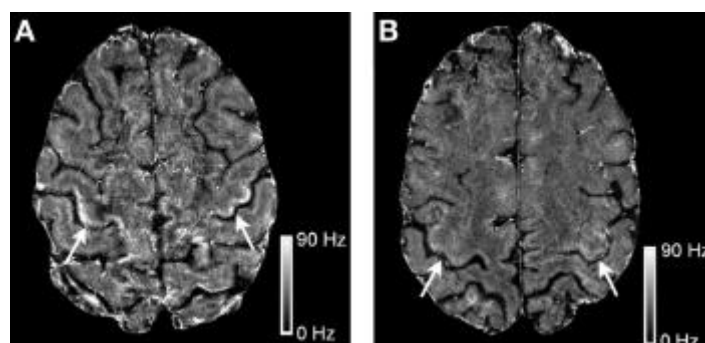
A descoberta de mutações na enzima antioxidante Cu/Zn SOD1 em doentes com ELA, constitui a primeira causa conhecida para a doença (Lovejoy e Guillemin, 2014).

A homeostase do cobre é perturbada na ELA, e pode ser relevante para a sua patogénese (Lovejoy e Guillemin, 2014). Outro conjunto de observações identificado em pacientes com ELA envolve o ferro. A ELA pode ser vista como uma doença que oferece um melhor suporte para uma ligação direta entre o ferro, stress oxidativo e neurodegeneração. Porém, apesar dos progressos significativos no conhecimento molecular, o verdadeiro impacto do ferro na ELA é ainda incerto (Hadzhieva et al., 2014).

### 3.4.1. Mecanismo neurodegenerativo do ferro

Concentrações elevadas de ferro têm sido recentemente reportadas no SNC de pacientes com ELA. O metabolismo desequilibrado do ferro pode envolver uma desregulação da Tf, aumento da regulação do TMD1, alteração do nível de ferritina, ativação de células gliais e comprometimento do tráfico de ferro retrógrado ao longo do axónio. No entanto, a função exata da má gestão do ferro na patologia da ELA é ainda pouco clara (Li et al., 2010).

A ressonância magnética em pacientes com ELA mostra uma acumulação de ferro no córtex motor, responsável por anomalias frequentemente observadas em pacientes com ELA (Figura 31) (Lovejoy e Guillemin, 2014).



**Figura 31.** Acumulação de ferro no córtex motor de um paciente com ELA. **(A)** As setas identificam a comparação com um controlo saudável. **(B)** Acumulação *post-*

*mortem* de ferro no meio e nas camadas mais profundas da matéria cinzenta cortical (Adaptado de Lovejoy e Guillemin, 2014).

A progressão da doença, de acordo com uma escala de avaliação funcional da ELA, foi positivamente correlacionada com os níveis de ferritina sérica. Do ponto de vista clínico, existe outra sugestão recente, que aponta para uma possível relação entre a sobrecarga de ferro no cérebro e a ELA (Hadzhieva et al., 2014). Em pacientes com ELA, a carga de Fe pode ser então inferida por estudos que demonstram um aumento da expressão de ferritina sérica, com níveis de ferritina sérica alta e níveis menores de Tf. No entanto, observa-se um aumento da saturação da Tf, correlacionando, deste modo, com um mau prognóstico (Lovejoy e Guillemin, 2014; Hadzhieva et al., 2014). Os níveis de ferritina sérica elevados foram correlacionados com o tempo reduzido de sobrevivência em pacientes com ELA por 300 dias, em comparação com pacientes, também com ELA, mas com níveis de ferritina sérica baixos. Após estudos comparativos entre pacientes com ELA e controlos saudáveis, os níveis séricos de ferro não foram significativamente diferentes e o aumento da saturação da Tf poderia sugerir o aumento de ferro (Lovejoy e Guillemin, 2014).

Níveis aumentados de ferro em neurónios motores da medula espinal foram também relatados recentemente em dois modelos de ratos com ELA, abrangendo mutações na SOD1 envolvidas na causa da ELA familiar. A SOD1 mutante causou uma degeneração rápida dos neurónios motores espinais levando à morte num prazo de três meses. Durante o seu tempo de vida, observou-se uma grande desregulação de ferro, suficiente para se verificar uma sobrecarga de ferro mensurável (Hadzhieva et al., 2014). Estes resultados implicam uma homeostase do ferro perturbada na ELA. Um impacto patogénico desta desregulação foi adicionalmente suportado pelos efeitos parcialmente protetores de quelantes de ferro em cultura de células e modelos de ratos com ELA (Hadzhieva et al., 2014).

Diversos estudos apoiam a ideia de que o stress oxidativo está envolvido na ELA. O modelo de cultura celular utilizado revelou que os níveis de mRNA de genes relacionados com o ferro (TfR1, ferritina, TMD1, Mfrn2) podem aumentar ainda mais, quando os níveis de ERO citoplasmáticos aumentam em resposta a um tratamento. Esta observação sugere o envolvimento de ERO na desregulação dos genes relacionados com

o ferro nas células mutantes. Contudo, ainda continua por descobrir o que se manifesta em primeiro lugar na ELA, se a desregulação do ferro ou o stress oxidativo (Hadzhieva et al., 2014). O mecanismo molecular da neurodegeneração na ELA é bastante complexo. Sugere-se que a regulação da transcrição dependente de ERO pode afetar os mecanismos de importação mitocondrial de ferro (Mfrn-2), uma vez que estes mARNs estavam entre aqueles que foram sob-regulados em condições de níveis de ERO aumentados (os submetidos a tratamento) (Hadzhieva et al., 2014).

Uma questão central é, se um aumento de ferro armazenado nos neurónios leva ou não a um aumento de ferro lábil, podendo este catalisar a produção de radicais hidroxilo (Hadzhieva et al., 2014).

### **3.4.2. Mecanismo neurodegenerativo do cobre**

O cobre constitui um metal especialmente perigoso devido à sua atividade catalítica e potencial redox, resultando desta forma, na produção de ERO, o que leva à propagação do stress oxidativo encontrado em pacientes com ELA (Bourassa et al., 2014).

Existem algumas evidências de acumulação de cobre em humanos com ELA. Mais recentemente, 52 pacientes com ELA apresentaram um aumento significativo de cobre no fluído cerebrospinal. Um estudo no tecido da espinal medula de pacientes com ELA esporádica, encontraram um aumento significativo de cobre, levando desta forma a uma avaliação de vários quelantes de cobre para tentar retardar o avanço da doença (Lovejoy e Guillemin, 2014).

O cobre desperta um grande interesse na ELA, correlacionando-se em torno de mutações na SOD1 e em mais de 160 mutações associadas com a ELA (Lovejoy e Guillemin, 2014). Para a SOD1, o cobre é transportado através de uma proteína chaperona de cobre (CCP). Esta chaperona contém um domínio de ligação para a SOD1 que possui, aproximadamente, 50% de homologia da sequência de aminoácidos para a SOD1, o que é importante para o reconhecimento e ligação da SOD1 (Bourassa et al., 2014). Várias mutações estudadas e relacionadas com o aparecimento da ELA possuem resíduos que residem no domínio de ligação homólogo da CCP, podendo desta forma

impedir a ligação eficiente da CCP para a SOD1, possivelmente alterando o transporte de cobre (Bourassa et al., 2014).

Após vários estudos, concluiu-se a existência de uma relação entre os agregados deficientes em metais e a diminuição de cobre encontrados em células que sobre-expressam a SOD1 mutante. Na SOD1 mutante, o transporte de cobre deficiente para a proteína pode reduzir ainda mais o teor de cobre na célula. Uma vez que as proteínas mutantes são pouco estáveis e o teor de cobre está menos disponível, a formação de agregados da proteína SOD1 mutante deficiente em metais torna-se propícia, agregando-se (Bourassa et al., 2014). A formação de agregados tóxicos de SOD1 é fortemente implicada na ELA e vários dados descrevem um defeito na ligação do Cu através de vários SOD1 mutantes (Lovejoy e Guillemin, 2014).

Independentemente do mecanismo preciso de agregação, os agregados de SOD1 geralmente adquirem um "ganho de função tóxica" relacionada com a promoção do stress oxidativo e de outros mecanismos que levam à neurodegeneração, sendo estes já descritos em cima (Lovejoy e Guillemin, 2014).

Existem dois mecanismos ou processos que podem levar à morte neuronal na SOD1:

1. Através de uma mutação que pode alterar a dobragem da SOD1, abrindo assim a conformação da proteína que vai libertar deste modo, o cobre que é potencialmente tóxico;
2. A SOD1 mutante pode catalisar a oxidação de substratos presentes em neurónios motores, atuando assim como uma peroxidase, ou poderá catalisar a redução de  $H_2O_2$ , conduzindo à formação do radical tóxico hidroxilo (Azzouz et al., 1999).

### **3.5. Diagnóstico da esclerose lateral amiotrófica**

A ELA é uma patologia de difícil diagnóstico precoce, devido à sua similaridade com outras doenças neurológicas severas (Kaur et al., 2015). Foi observado que o tempo decorrido entre o diagnóstico e o início dos sintomas da doença são de aproximadamente 12 meses (González et al., 2003).

O diagnóstico passa pela realização de uma cuidada história clínica, um exame físico pormenorizado, podendo ainda ser completado com estudos eletrofisiológicos ou imagiológicos de nível cerebral (Díaz et al., 2003). Durante a história clínica o cálculo da taxa de perda de peso pode ser um dos preditores da progressão da doença no momento do diagnóstico (Kaur et al., 2015). Aquando do exame clínico, posterior à realização da história clínica, devem ser tidas em conta as estruturas anatómicas bulbar, cervical, torácica e ainda a lombossagrada (Daroff et al., 2012).

Na ausência dos marcadores biológicos estabelecidos para o diagnóstico, este baseia-se na procura de características clínicas com investigações que excluam outras síndromes. As radiculomielopatias cervicais levam a um erro de diagnóstico na ordem dos 5-10% dos casos (Silani et al., 2011). Outras situações que podem levar a um diagnóstico errado são a coexistência de outras patologias, conclusões erradas dos exames neurofisiológicos ou imagiológicos e ainda a não familiarização com a doença (Díaz et al., 2003).

O diagnóstico é baseado na procura de características clínicas severas incluindo o envolvimento combinado de neurónios motores superiores (UMNs) e neurónios motores inferiores (LMNs) (Kaur et al., 2016). É necessário existir uma evidência de degeneração dos neurónios motores inferior e superior através de um exame clínico, eletrofisiológico ou neuropatológico (Díaz et al., 2003). Uma maioria de médicos tentam diagnosticar esta doença através da identificação de sinais de UMN e LMN numa determinada região corporal e posterior comprovação da progressão da patologia para outros locais do corpo (Kiernan et al., 2011). Esta combinação neurodegenerativa dos neurónios não pode ser explicada por outro processo patológico, tentando-se diagnosticar a ELA através de exames imagiológicos e eletrofisiológicos no líquido cefaloraquidiano ou em estudos sorológicos (Silani et al., 2011).

Os resultados neurofisiológicos por si só não são suficientes para a realização do diagnóstico, devendo ser interpretados de acordo com a história clínica do paciente e com os achados clínicos (Silani et al., 2011). O diagnóstico é geralmente confirmado pela medição da atividade muscular e dos nervos usando a eletromiografia e estudos da condução nevrál. Estes testes permitem distinguir danos musculares de danos nevrálgicos como causa de disfunção muscular (Kaur et al., 2016). Esta técnica ajuda

num diagnóstico mais precoce, estabelecendo a presença de sintomas ainda não manifestados nos LMN (Kiernan et al., 2011). No entanto, a eletromiografia e os estudos de neuroimagem podem levar a vários diagnósticos errados como esclerose múltipla, hérnia discal, osteoporose, entre outros (Díaz et al., 2003). A aplicação de potenciais de fibrilação e de ondas positivas agudas vão demonstrar se o funcionamento dos músculos se encontra normal (Kiernan et al., 2011).

A Ressonância Magnética é outra opção que pode ser usada para eliminar diagnósticos de patologias com sintomas semelhantes como os tumores da medula espinal e as hérnias nos discos vertebrais do pescoço (Kaur et al., 2015).

As biópsias musculares podem ter um valor acrescido no diagnóstico, levando à exclusão de outras miopatias incomuns, como a doença 83 do corpo do poliglucosan. Estas podem ainda confirmar a presença de ELA demonstrando a atrofia das fibras mistas musculares (Kiernan et al., 2011).

Quanto às biópsias da pele, são utilizadas para avaliar as anormalidades nas fibras nervosas com frequente dano mitocondrial nos axónios e fibras nervosas (Kaur et al., 2015).

A estimulação magnética transcraniana do motor do córtex é uma técnica adicional que mede o dano dos neurónios motores e pode ser particularmente útil na confirmação da ELA (Kaur et al., 2015).

Os biomarcadores do sangue podem também ser usados no diagnóstico da ELA, sendo que incluem marcadores relativos ao stress oxidativo, citotoxicidade, inflamação, disfunção metabólica e neurodegeneração (Kaur et al., 2015).

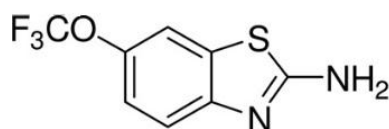
### **3.6. Terapêutica da esclerose lateral amiotrófica**

Até ao momento não existe cura para esta doença neurodegenerativa, desconhecendo-se qual é a melhor abordagem perante um paciente com esta patologia. Podem ser tomadas muitas medidas paliativas, sintomáticas, psicológicas e ainda de apoio ao doente (Díaz

et l., 2003). Para fazer face a esta patologia é necessária uma equipa multidisciplinar com enfermeiros especializados, fisioterapeutas e terapeutas da fala. Além disso, é também necessário adaptar as infra-estruturas com espaços para cadeiras de rodas, equipamentos de ventilação e alimentação por sondas (Díaz et l., 2003). O tratamento da ELA é complexo e tem mudado consideravelmente nos últimos anos (Junior, 2013).

### 3.6.1. Tratamento farmacológico

O riluzole (Rilutek®) (Figura 32) é a única droga aprovada, até ao momento, para o tratamento da doença da ELA, reduzindo a excitotoxicidade mediada pela inibição da libertação do glutamato (Bourassa et al., 2014).



**Figura 32.** Estrutura do riluzole (McDonnell et al., 2012).

Esta droga tem pelo menos três propriedades que podem contribuir para a eficácia do tratamento. Inibe a libertação de glutamato, inibe os níveis de NMDA no SNC e estabiliza a inatividade dos canais de cálcio (Díaz et l., 2003).

A posologia recomendada é de um comprimido de 50 mg, duas vezes ao dia. Este fármaco é tomado por via oral, em períodos de 12 em 12 horas e sempre à mesma hora do dia (Infarmed, 2012).

O riluzole 100mg pode prolongar a sobrevivência de pacientes com ELA, em cerca de dois meses. Ensaios clínicos demonstraram que pacientes que tomam este fármaco têm uma maior sobrevivência do que aqueles que tomam um placebo (Miller et al., 2003). Não há qualquer benefício em aumentar a dose para mais de 100 mg por dia. No entanto, este aumento de dose pode levar a uma maior predisposição para efeitos adversos (Infarmed, 2012). De entre os efeitos adversos podem-se destacar, náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, parestesias, sedação e convulsões (Díaz et al., 2003).

Apesar dos efeitos adversos serem controlados, esta droga apresenta efeitos benéficos reduzidos e um preço elevado. Foi aprovada como a droga de eleição para o tratamento desta patologia, mas não em todos os países (Miller et al., 2003).

### **3.6.2. Agentes quelantes**

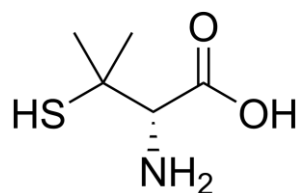
Num estudo da medula espinal de pacientes com a patologia em questão, foram encontrados níveis elevados de cobre (Lovejoy and Guillemin, 2014). A viabilidade das células neuronais que expressam SOD1 mutante aumenta através de quelantes de cobre, sugerindo que o cobre está envolvido na patologia destas células (Azzouz et al., 1999).

Foi demonstrado em variados estudos que alguns quelantes de cobre poderiam reverter a reatividade da SOD1 mutante, resultando numa proteção contra a perda de neurónios motores, com uma correspondente melhoria do tempo de vida e da função locomotora (Lovejoy and Guillemin, 2014). Os mecanismos de ação terapêuticos sugerem (Hilton et al., 2015):

1. A atenuação da toxicidade do ião de cobre;
2. Uma diminuição dos níveis de cobre presentes na medula espinal;
3. Redução da peroxidação lipídica;
4. Pode ainda diminuir os marcadores de danos oxidativos e da inflamação.

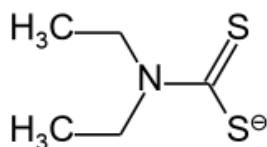
Os agentes quelantes de cobre utilizados incluem a D-penicilamina e a trientina (Lovejoy and Guillemin, 2014). Podem também ser utilizados enquanto agentes quelantes do cobre, o DP-109, o DP-480 e a N-acetilcisteína. Todos estes quelantes atrasam o início da doença (por poucos dias), aumentam a resposta motora e diminuem ainda a progressão da mesma (Rivera-Mancía et al., 2010).

A D-penicilamina (Kelatine®) (Figura 33) encontra-se indicada aquando de intoxicações graves por metais, como o cobre (no caso da ELA), ouro, chumbo e mercúrio. A atividade deste fármaco é devida às propriedades do aminotiol, isto é, formação de complexos de quelatação, reação com grupos carboxilados e a participação na formação de pontes dissulfureto e a trocas ao nível dos grupos tiol (Infarmed, 2007).



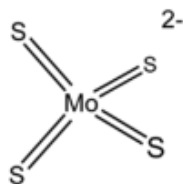
**Figura 33.** Estrutura da D-penicilamina (Wikipedia, the free encyclopedia, 2016).

O tratamento recorrendo ao dietilditiocarbamato (Figura 34) reduz a produção dos radicais hidroxilo, aumentando desta forma a sobrevivência celular (Rivera-Mancía et al., 2010).



**Figura 34.** Estrutura do dietilditiocarbamato (Wikipedia, the free encyclopedia, 2016).

Recentemente surgiu o tetratiomolibdato de amónio (TTM) (Figura 35) que leva à melhoria dos sintomas e da sobrevivência em casos de SOD1 mutante. Isto ocorre devido à remoção de cobre por parte deste quelante (Lovejoy and Guillemin, 2014). O TTM, que começou por ser utilizado na doença de Wilson, tem ação quelante de forma intracelular e extracelular de iões de cobre, apresentando uma vantagem comparativamente com a D-penicilamina e a trientina pois apenas removem o cobre livre extracelular (Rivera-Mancía et al., 2010).



**Figura 35.** Estrutura do tetratiomolibdato de amónio (Wikipedia, the free encyclopedia, 2016).

Múltiplos quelantes de ferro têm demonstrado uma ação neuroprotetiva e neuroreparadora no caso de doenças neurodegenerativas como a ELA. Os quelantes com componentes que bloqueiem a atividade redox do ferro e a progressão da doença

são uma estratégia neuroprotetora promissora (Li et al., 2010). Estes quelantes não atenuam unicamente os níveis de ferro, mas reduzem também os marcadores do stress oxidativo nos tecidos e diminuem a perda neuronal e ainda a ativação microglial e astrogliar (Hadzhieva et al., 2014).

Os quelantes de ferro utilizados em estudos pré-clínicos são a desferrioxamina (Figura 23) e análogos de 8-hidroxiquinolina (Figura 21) (Li et al., 2010).

Quanto aos análogos de 8- hidroxiquinolina, o clioquinol (Figura 25) é um quelante não específico lipofílico que consegue ultrapassar a BHE, no entanto apresenta efeitos nocivos (Li et al., 2010). O ALA-20 é um forte agente quelante para o  $Fe^{3+}$ , dupurando os radicais com efeito inibitório do MAO-B (Li et al., 2010). O VK8 e o MK30, outros análogos, atrasam o início da ELA, diminuindo a perda de neurónios motores, aumentando assim o tempo de vida (Lovejoy and Guillemin, 2014). O VK8 é um quelante potente que atravessa a membrana mitocondrial e o MK30 sequestra o ferro e inibe a MAO-A e a MAO-B (Li et al., 2010). Estes últimos quelantes atenuam a elevação dos níveis de ferro e da expressão da TfR. Diminuem as ERO e suprimem a ativação microglial e astrocítica na medula espinal de portadores da SOD1 mutada (Lovejoy and Guillemin, 2014).

## IV. Conclusão

Há uma crescente evidência de que os metais desempenham um papel crucial na patogênese de doenças neurodegenerativas. Contudo, a existência de níveis adequados de íons metálicos no organismo humano são fundamentais para as diversas funções vitais. A ausência ou o excesso de alguns metais podem ser prejudiciais para a saúde humana e ocasionar várias doenças. Deste modo, a homeostasia dos metais representa um mecanismo de extrema importância.

Vários estudos têm vindo a demonstrar que alguns metais estariam na base da DH e da ELA. O ferro, cobre e manganês estariam implicados na DH e o ferro e cobre na ELA. Porém, os mecanismos exatos pelos quais estes metais causam a doença ainda continuam pouco claros, necessitando de novas confirmações por novos estudos. Contudo, têm sido sugeridos alguns mecanismos neurotóxicos causados pelos metais, que eventualmente levariam à neurodegeneração observada nas duas doenças estudadas.

A DH, uma doença de transmissão autossômica dominante, é causada por uma mutação na proteína Htt, que conduz à formação de corpos de inclusão, originando mecanismos neurodegenerativos. São característicos, a ocorrência de perturbações motoras, défices cognitivos e ainda perturbações psiquiátricas. Estes vão conduzir invariavelmente a uma incapacidade e em situações mais tardias à morte. Sendo esta uma doença de carácter genético, ainda não existe nenhum tipo de tratamento que leve à cura. Porém, existem métodos terapêuticos que aliviam os sintomas motores e psiquiátricos, retardando o progresso da doença.

A terapia, recorrendo a agentes quelantes de metais, é vista como um tratamento de futuro, estando estes ainda sob investigação. Esta estratégia consiste na eliminação, por quelatação, do excesso de íons metálicos no organismo, diminuindo, deste modo, a neurotoxicidade induzida pelos mesmos. Porém, detetou-se desde logo uma dificuldade que consiste no mecanismo dos agentes quelantes atravessarem a BHE. O clioquinol, utilizado para quelatar o ferro e o cobre, diminui os agregados metálicos no cérebro, atravessando eficazmente a BHE, quelatando o cobre e ainda inibindo a deposição  $\beta$ -amilóide. Esta inibição está relacionada com a redistribuição de cobre e de ferro. Sem

dúvida, é considerado um dos quelantes mais promissores.

Quanto à ELA, é uma doença neurodegenerativa que leva à perda progressiva da função motora e da capacidade respiratória, em que a mortalidade está relacionada com a falência respiratória. De entre os sintomas, destacam-se, atrofia muscular severa, atividade involuntária dos músculos (espasmos), câimbras e fadiga.

Esta doença rara, que evolui de forma progressiva, apresenta uma origem genética em apenas 10% dos casos (ELA familiar), dos quais 2,5% ocorrem devido a inúmeras mutações, em que a mutação na SOD1 constitui o exemplo mais bem estudado, ou então, surge de uma forma esporádica sem causa conhecida. A par da DH, também ainda não se descobriu a cura, desconhecendo-se qual é a melhor abordagem a ter nestes casos. Podem ser adotadas medidas paliativas, sintomáticas, psicológicas e de apoio ao doente.

Provou-se, em vários estudos, que os agentes quelantes de cobre podem reverter a reatividade da SOD1 mutante levando a uma proteção contra a perda de neurónios motores, aumentando a função locomotora e a sobrevivência. O TTM, um agente quelante que surgiu recentemente, consegue levar à remoção do cobre, melhorando os sintomas e a sobrevivência em casos de SOD1 mutante. Este atua de forma intra e extracelular, quelatando os iões de cobre, apresentando-se deste modo como uma vantagem à D-penicilamina e à trientina, visto que estas apenas removem o cobre livre extracelular. O VK8 e o MK30, análogos do 8-hidroxiquinolina, atrasam o início da ELA levando a uma diminuição da perda dos neurónios motores e aumento do tempo de vida.

Concluindo o tema, são ainda necessários mais estudos que se traduzam em certezas que permitam clarificar o verdadeiro papel dos metais em ambas as patologias bem como encontrar uma terapêutica que seja eficaz no combate às manifestações das doenças.

## V. Bibliografia

Arrasate, M., Finkbeiner, S. (2012). Protein aggregates in Huntington's disease. *National Institutes of Health*, 238(1), pp. 1-13.

Arruda, S. (2016). The adverse role of iron in the organismo. *ResearchGate*, 17(3), pp. 229-36.

Azzouz, M., et al. (1999). Prevention of Mutant SOD1 Motoneuron Degenerative by Copper Chelators In Vitro. *Journal of Neurobiology*, 42, pp. 49-55.

Barbosa, L., et al. (2006). Danos Oxidativos e Neurodegeneração: O Quê Aprendemos Com Animais Transgênicos e Nocautes?. *Química Nova*, 29(6), pp. 1352-60.

Barnham, K., Bush, A. (2014). Biological metals and metal- targeting compounds in major neurodegenerative diseases. *Royal Society of Chemistry*, 43, pp. 6727-49.

Bergeron, R., et al. (2015). Metabolically Programmed Iron Chelators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(17), pp. 1-43.

Borrell- Pagès, M., et al. (2006). Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, pp. 2642-60.

Bourassa, M., et al. (2014). Metal- deficiente aggregates and diminished copper found in cells expressing SOD1 mutations that cause ALS. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 110, pp. 1-5.

Carrì, M., et al. (2016). Pathways to mitochondrial dysfunction in ALS pathogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 16, pp. 1-7.

Cavaleri, F. (2015). Review of Amyotrophic Lateral Sclerosis, Parkinson's and Alzheimer's diseases helps further define pathology of the novel paradigm for Alzheimer's with heavy metals as primary disease cause. *Medical Hypotheses*, 85, pp. 779-90.

Chattopadhyay, M., Valentine, J. (2009). Aggregation of Copper-Zinc Superoxide Dismutase in Familial and Sporadic ALS. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(7), pp. 1603-1614.

Chen, Y., et al. (2014). Cell-based therapies for Huntington's disease. *The Journal of the American Society of Experimental NeuroTherapeutics*, 19(7), pp. 980-84.

Ciechanover, A., Kwon, Y. (2015). Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Experimental & Molecular Medicine*, 47, pp. 1-11.

Daroff, R., et al. (2012). Disorders of Upper and Lower Motor Neurons. *Brandley's Neurology in Clinical Practice*. Filadélfia. Elsevier.

Desai, V., Kaler, S. (2008). Role of copper in human neurological disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88, pp. 855-858.

Farina, M., et al. (2012). Metals, oxidative stress and neurodegeneration: A focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry International*, 62, pp. 575-94.

Finkbeiner, S. (2011). Huntington's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, pp. 1-24.

Fox, J., et al. (2007). Mechanisms of Copper Ion Mediated Huntington's Disease Progression. *Plosone*, 2(3), pp.1-11.

Gil-Mohapel, J., Rego, A. (2011). Doença de Huntington: Uma Revisão dos Aspectos Fisiopatológicos. *Revistas de Neurociências*, 19(4), pp. 724-34.

Grotto, H. (2010). Fisiologia e metabolismo do ferro. *Associação Brasileira de Hematologia e Hematoterapia*, 32, pp. 8-17.

Hadzhieva, M., et al. (2014). Review: Iron metabolism and the role of iron in neurodegenerative disorders. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40, pp. 240-57.

Hands, S., et al., (2010). Metallothioneins and copper metabolismo are candidate therapeutic targets in Huntington's disease. *Biochemical Society Transactions*, 38, pp.552-58.

Hatori, Y., Lutsenko, S. (2016). The Role of Copper Chaperone Atox1in Coupling Redox Homeostasis to Intracellular Copper Distribution. *Antioxidants*, 25, pp. 1-16.

Hayashi, Y., et al. (2015). SOD1 in neurotoxicity and its controversial roles in SOD1 mutation-negative ALS. *Advances in Biological Regulation*, 60, pp. 95-104.

Hilton, J., et al. (2015). Metal-deficient SOD1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Molecular Medicine*, 93, pp. 481-87.

Horning, K., et al. (2015). Manganese Is Essential for Neuronal Health. *The annual Review of Nutrition*, 35, pp. 71-108.

Infarmed. (2007). [Em linha]. Disponível em <http://www.infarmed.pt/> [Consultado em 08/06/2016].

Infarmed. (2012). [Em linha]. Disponível em <http://www.infarmed.pt/> [Consultado em 08/06/2016].

Kaur, S., et al. (2015). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Gene*, 577, pp. 109-118.

Kawada, H., Kador, P. (2015). Orally Bioavailable Metal Chelators and Radical Scavengers: Multifunctional Antioxidants for the coadjutant Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, pp. 8796-8805.

Keskin, I., et al. (2016). Effects of Cellular Pathway Disturbances on Misfolded Superoxide Dismutase-1 in Fibroblasts Derived from ALS Patients. *Plos One*, 10, pp. 1-15.

Kwakye, G., et al. (2011). Novel high-throughput assay to assess cellular manganese levels in a striatal cell line model of Huntington's disease confirms a deficit in manganese accumulation. *NeuroToxicology*, 32, pp. 630-39.

Jiang, Z., et al. (2015). Mitochondrial dynamic abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Translational Neurodegeneration*, 4, pp. 1-6.

La Fontaine, M., et al. (2000). 3-Nitropropionic acid induced in vivo protein oxidation in striatal and cortical synaptosomes: insights into Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 852, pp. 356-62.

Lee, J., et al. (2012). CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology*, 78, pp. 690-95.

Lim, J., et al. (2015). Proteotoxic Stress Induces Phosphorylation of p62/SQSTM1 by ULK1 to Regulate Selective Autophagic Clearance of Protein Aggregates. *Plos Genetics*, 11(2), pp. 1-28.

Lovejoy, D., Guillemin, G. (2014). The potential for the transition metal-mediated neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 173(6), pp. 1-10.

Madison, J., et al. (2012). Disease-Toxicant Interactions in Manganese Exposed Huntington Disease Mice: Early Changes in Striatal Neuron Morphology and Dopamine Metabolism. *Plos One*, 7(2), pp. 1-12.

Maiti, P., et al. (2014). Molecular Chaperone Dysfunction in Neurodegenerative Diseases and Effects of Curcumin. *Biomedical Research International*, 2014, pp. 1-14.

Martelli, A. (2014). Aspectos clínicos e fisiopatológicos da Doença de Huntington. *Archives Health Investigation*, 3(4), pp. 32-8.

McDonnel, M., et al. (2012). Riluzole prodrugs for melanoma and ALS: design, synthesis, and in vitro metabolic profiling. *National Institutes of Health*, 20(18), pp. 1-16.

Mehrotra, A., et al. (2015). Mitochondrial modulators in experimental Huntington's disease: reversal of mitochondrial dysfunctions and cognitive deficits. *Neurobiology of Aging*, 36, pp. 2186-200.

Mena, N., et al. (2015). Mitochondrial iron homeostasis and its dysfunctions in neurodegenerative disorders. *Mitochondrion*, 21, pp. 92-105.

Menon, A., et al. (2015). Mechanisms of divalent metal toxicity in affective disorders. *Toxicology*, 339, pp. 58-72.

Mitra, J., et al. (2014). Revisiting Metal Toxicity in Neurodegenerative Diseases and Stroke: Therapeutic Potential. *National Institutes of Health*, 1(2), pp. 2-9.

Muller, M., Leavitt, B. (2014). Iron dysregulation in Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 130, pp. 328-50.

Mulligan, V., Chakrabarty, A. (2013). Protein misfolding in the late-onset neurodegenerative diseases: Common themes and the unique case of amyotrophic lateral sclerosis. *Wiley Periodicals*, 81, pp. 1285-1303.

Novak, M., et al. (2012). Altered brain mechanisms of emotion processing in pre-manifest Huntington's disease. *Brain A journal of Neurology*, 135, pp. 1165-79.

O Walker, F. (2007). Huntington's disease. *The Lancet*, 369, pp. 218-28.

Ortuño J., et al. (2007). A New Tiapride Selective Electrode and Its Clinical Application. *Sensors*, 7, pp. 400-09.

Pereira, L. (2012). Mitocôndria como Alvo para Avaliação de Toxicidade de Xenobiótico. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 25, pp. 1-14.

Pizzuti, A., Petrucci, S. (2011). Mitochondrial dysfunction as a cause of ALS. *Archives Italiennes de Biologie*, 149, pp. 113-19.

Raymond, L., et al. (2011). Pathophysiology of Huntington's Disease: Time- Dependent Alterations in Synaptic and Receptor Function. *National Institutes of Health*, 198, pp. 252-73.

Rego, A., Almeida, L. (2005). Molecular Targets and Therapeutic Strategies in Huntington's Disease. *Bentham Science Publishers*, 4, pp. 361-81.

Rivera-Mancía, S., et al. (2010). The transition metals cooper and iron in neurodegenerative diseases. *Chemico-Biological Interactions*, 186, pp. 184-99.

Rodrigues, G., et al. (2004). Avaliação sociológica de doentes com esclerose lateral amiotrófica. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 6, pp. 645-53.

Rosas, D., et al. (2012). Alterations in Brain Transition Metals in Huntington Disease: An Envolving and Intrigate Story. *American Medical Association*, 69(79), pp. 1-7.

Rotilio, G., et al. (2000). Copper- Dependent Oxidative Stress and Neurodegeneration. *IUBMB Life*, 50, pp. 309-14.

Scheiber, I., et al. (2014). Metabolism and functions of copper in brain. *Progress in Neurobiology*, 116, pp. 33-57.

Singh, G., et al. (2012). N- demethylation of cyamemazine via non-classical Polonovski reaction and its conjugation to bovine serum albumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, pp- 2160-2162.

Smith, D., et al. (2016). The therapeutic potential of cell identity reprogramming for the treatment of aging- related neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 10, pp. 1-18.

Solans, A., et al. (2006). Cytotoxicity of a mutante huntingtin fragmente in yeast involves early alterations in mitochondrial OXPHOS complexes II and III. *Human Molecular Genetics*, 20, pp. 3060-81.

Tafari, F., et al. (2015). SOD1 misplacing and mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, pp. 1-9.

Taiana, M., et al. (2016). Mutant SOD1 accumulation in sensory neurons does not associate with endoplasmic reticulum stress features: Implications for differetial vulnerability of sensory and motor neurons to SOD1 toxicity. *Neuroscience Letters*, 627, pp. 107-14.

Tidball, A., et al. (2014). A novel manganese-dependent ATM-p53 signaling pathway is selectively impaired in patient-based neuroprogenitor and murine striatal models of Huntington's disease. *Oxford University Press*, 24(7), pp. 1929-44.

Urrutia, P., et al. (2014). The interplay between iron accumulation, mitochondrial dysfunction, and inflammation during the execution step of neurodegenerative disorders. *Frontiers in Pharmacology*, 5, pp.1-7.

Webscolar. (2016). Prevenção, tratamento y Sintomas de la Enfermedad de Huntington (corea de Huntington). [Em Linha]. Disponível em <<http://www.webscolar.com/enfermedad-de-huntington>>. [Consultado em 05/08/2016].

Xiao, G., et al. (2013). Huntington disease arises from a combinatory toxicity of polyglutamine and copper binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37), pp.14995-15000.

Zhang, Z., et al. (2016). Autophagy in Neurodegenerative Diseases and Metal Neurotoxicity. *Neurochemical research*, 41, pp. 409-22.