

# EFEITO DO ALUMÍNIO NA OXIDAÇÃO NÃO ENZIMÁTICA DA DOPAMINA

C. R. MARINHO, C. F. MANSO

Instituto de Química Fisiológica, Faculdade de Medicina de Lisboa. Lisboa

## RESUMO

Estudou-se o efeito de diferentes concentrações de sulfato de alumínio na reacção de oxidação não enzimática da dopamina. A oxidação da dopamina parece ser o passo inicial da via de síntese de neuromelaninas, polímeros responsáveis pela pigmentação do sistema nervoso central. Os resultados obtidos indicam que o alumínio inibe parcialmente a reacção de autooxidação da dopamina, diminuindo a formação de alguns compostos intermediários desta via, nomeadamente a dopaminaquinona e o dopaminocrómio. Assim, se as neuromelaninas estiverem de alguma forma relacionadas com um mecanismo protector do S.N.C., possivelmente, actuando como neutralizadores de radicais livres e de iões metálicos altamente reactivos, da sua diminuição por acção do alumínio podem resultar graves alterações do foro neurológico.

## SUMMARY

### Effect of aluminum on the nonenzymatic oxidation of dopamine

The effect of different concentrations of aluminum sulphate on the nonenzymatic oxidation of dopamine was studied in order to evaluate the action of this metal on neuromelanin synthesis. Data shows that under the studied conditions, aluminum partially inhibits dopamine self-oxidation, decreasing the formation of some intermediate compounds, namely dopaminequinone and dopaminochrome. If neuromelanins have a cytoprotective function in the central nervous system, possibly acting as intracellular scavengers of free radicals and redox metal ions, their decrease due to aluminum could be responsible for serious damage to neuronal tissues.

## INTRODUÇÃO

O alumínio é o metal mais abundante da superfície terrestre e apesar de não existir na sua forma metálica livre, pode ser encontrado na constituição química de diversas rochas e solos. Desde a Antiguidade, que o alumínio é largamente utilizado como aditivo da água potável, de forma a melhorar a sua aparência límpida. Actualmente, este metal é, ainda utilizado no fabrico de alguns utensílios de cozinha, em produtos enlatados e em pickles e no fabrico de queijos e cerveja.

Nas últimas décadas, tem sido reconhecido que o alumínio poderia ser o agente responsável por vários distúrbios ocorridos em doentes renais sujeitos a longas sessões de hemodiálise, nomeadamente, na encefalopatia e no aparecimento de anemia microcítica e doenças ósseas<sup>1</sup>. O alumínio tem também sido implicado na neurotoxicidade associada com a esclerose lateral amiotrófica<sup>2</sup>, na doença de Alzheimer<sup>3</sup> e mais recentemente, na doença de Parkinson<sup>4</sup>.

Este metal tem a particularidade de, em sistemas biológicos, apenas existir num único estado de valência, Al<sup>3+</sup> e de não reagir como um metal de transição. O mecanismo de absorção do alumínio é desconhecido, e durante muito tempo foi considerado como um metal não tóxico, uma vez que parecia ser pouco provável a sua absorção ao nível do intestino. No entanto, o alumínio parece poder ligar-se ao citrato, formando um complexo neutro capaz de atravessar as membranas celulares. Contrariamente, em presença de fosfato inorgânico o alumínio forma um complexo insolúvel que facilita a sua eliminação<sup>5</sup>.

A doença de Parkinson é caracterizada por despigmentação e degenerescência selectiva dos neurónios dopamínicos da *Substantia nigra*. A causa da morte celular permanece desconhecida, no entanto, tem sido proposto um mecanismo citotóxico que envolve a produção de radicais livres<sup>6</sup>. A oxidação da dopamina, um dos passos da via de síntese de neuromelaninas, resulta na formação de radicais livres de oxigénio, nomeadamente peróxido

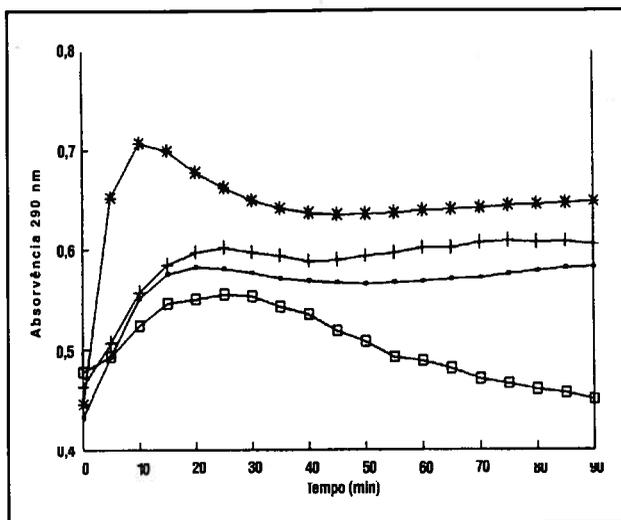


Fig. 1 - Formação de dopaminaquinona e 5,6-dihidroindol durante a oxidação não enzimática da dopamina 0.1 mM em tampão TRIS-salino, pH 10 (\*), na presença de sulfato de alumínio 0.25 mM (+), 0.5 mM (\*) e 1 mM (-).

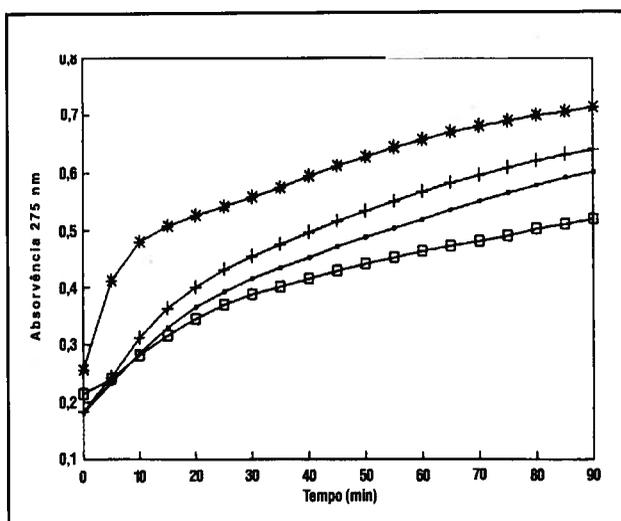


Fig. 2 - Estudo da formação de compostos de natureza indólica durante a reacção de síntese *in vitro* de neuromelaninas

de hidrogénio e superóxido<sup>7</sup>. O ferro tem sido indicado como uma das causas primárias do parkinsonismo, ao catalisar a geração de radical hidroxilo e induzir um stress oxidativo que resulta num aumento da lipoperoxidação das células nervosas<sup>8-9</sup>.

Estudos recentes<sup>4</sup> demonstraram que existe uma acumulação dramática de ferro e alumínio em cérebros de doentes parkinsonianos. Estes metais podem ligar-se aos grânulos de neuromelaninas, os quais fornecem locais de ligação específicos<sup>10</sup>. A acção do alumínio a nível do sistema nervoso central não é conhecida, mas este metal parece não desempenhar qualquer papel fisiológico. Tem sido especulado que o alumínio seria capaz de deslocar o ferro da transferrina, uma vez que a adição de concentrações relativamente pequenas de sais de alumínio podem aumentar a lipoperoxidação induzida pelo ferro<sup>11</sup>, sendo

este efeito atenuado pela coadministração de transferrina<sup>12-13</sup>. Assim, é provável que o alumínio possa facilitar a acção neurotóxica do ferro, ao possibilitar que este participe em reacções redox.

Propusemo-nos neste trabalho, realizar um estudo sobre a possível acção do alumínio na reacção de oxidação não enzimática da dopamina. A dopamina é o precursor da via de síntese *in vitro* de neuromelaninas, o que pode permitir verificar uma possível acção mais directa deste metal sobre estes pigmentos constituintes do sistema nervoso. Alterações induzidas pelo alumínio na formação de neuromelaninas podem explicar de alguma forma o aparecimento de sintomas do tipo parkinsoniano em doentes que apresentam excesso de alumínio.

## MATERIAL E MÉTODOS

A síntese *in vitro* de neuromelaninas pode ser realizada a partir da reacção de oxidação não enzimática da dopamina. Estudos cinéticos da autoxidação de dopamina 0.1 mM em tampão TRIS 0.02M/NaCl 0.15 M, pH 10 foram registados a diferentes comprimentos de onda, em que é possível detectar a formação de compostos intermediários desta via de síntese. A oxidação da dopamina resulta na rápida formação de dopaminaquinona, podendo esta reacção ser seguida a 290 nm. A quinona cicliza, posteriormente, em dopaminocrómio, produto que absorve na zona dos 450 nm, e que ao sofrer posteriores rearranjos origina compostos indólicos, que absorvem a 275 e 290 nm.

A acção do alumínio foi avaliada por adição de soluções de diferentes concentrações de sais de sulfato de alumínio à solução de dopamina 0.1 mM. Para evitar complexações e precipitação, as soluções de sulfato de alumínio foram realizadas em água desionizada, sendo posteriormente diluídas em tampão TRIS-salino e o pH acertado para 10. Espectros de absorção da reacção, foram registados ao longo do tempo, na ausência e na presença de  $[Al^{3+}] = 0.5mM$ , de forma a detectar a possível formação de compostos diferentes dos produtos da via de síntese de neuromelaninas.

Todos os ensaios foram realizados num espectrofotómetro Beckman DU-50, programável através de um módulo Soft-Pac™ de cinética, com acoplamento de um controlador de temperatura. A temperatura da reacção foi mantida a 37°C. A dopamina foi obtida da Sigma, enquanto os restantes reagentes foram fornecidos pela Merck.

## RESULTADOS

O alumínio diminui a formação *in vitro* de neuromelaninas, tendo sido possível verificar que na presença de sais de sulfato de alumínio, os produtos de oxidação da dopamina, como a dopaminaquinona, o dopaminocrómio e 5,6-dihidroindol, sendo este último um dos precursores das neuromelaninas, se formam em menores concentrações.

A formação de dopaminaquinona, produto da autoxidação da dopamina, foi detectada pelo aumento de absorção inicial a 290 nm, e verificou-se que a formação deste composto se encontra diminuída por acção do alumínio, sendo este efeito dependente da concentração deste

metal. Os grupos de natureza indólica, nomeadamente o 5,6-dihidroindol, também têm máximos de absorção nesta zona do espectro, o que de alguma forma dificulta a análise do gráfico representado na *figura 1*, no entanto, estes produtos não são detectados na fase inicial da reacção, mas apenas a partir, aproximadamente, dos 15 minutos de reacção. Assim, é possível verificar a diminuição da concentração de produtos indólicos formados, sendo esta bastante acentuada para  $[Al^{3+}] = 1 \text{ mM}$ .

O dihidroindol, absorve igualmente a 275 nm, o que permitiu analisar se os resultados obtidos anteriormente estariam correctos e se existiria realmente, diminuição da formação deste composto. A análise do gráfico da *figura 2*, permite concluir que o alumínio diminui a formação dos compostos de natureza indólica, que são os principais precursores da síntese de neuromelaninas. De realçar, que é provável que outros compostos também absorvam neste comprimento de onda. Por exemplo, a dopamina absorve, com um pico máximo, a 275 nm. O objectivo do estudo da reacção neste comprimento de onda não teve como finalidade obter resultados quantitativos, mas apenas resultados qualitativos, uma vez que os dados obtidos para a autooxidação da dopamina a 275 nm permitem ter uma ideia do decorrer da reacção.

A oxidação não enzimática da dopamina é, usualmente, estudada seguindo a formação de um aminocrómio característico, o dopaminocrómio, que absorve a 450 nm. Este comprimento de onda é específico dos aminocrómios, donde os dados obtidos fornecem directamente, a concentração de dopaminocrómio formado. Os estudos realizados, indicaram que a formação de dopaminocrómio diminui por acção do sulfato de alumínio.

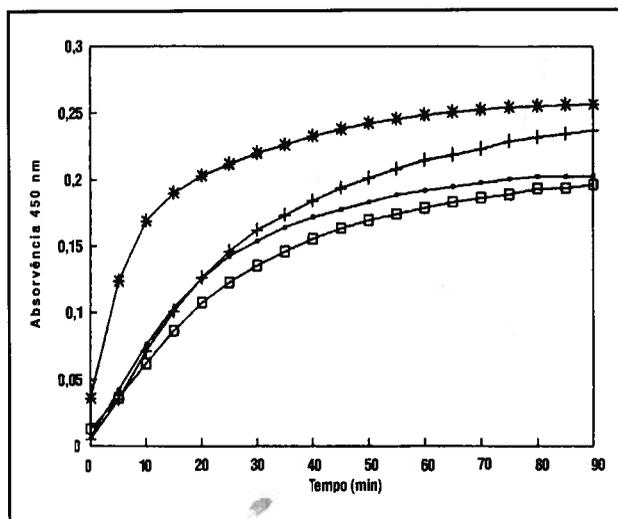


Fig. 3 – Formação de dopaminocrómio durante a reacção de oxidação da dopamina 0.1 mM, em TRIS-salino, pH 10

No *quadro 1* encontram-se registados os valores obtidos nas diferentes experiências, bem como os respectivos desvios padrão. Os resultados são dados como a média de pelo menos 3 ensaios independentes (n). Para o caso da curva padrão, reacção da dopamina em tampão TRIS-salino, o número de ensaios é superior a 40. Por análise da tabela podemos verificar que na presença de  $[Al^{3+}] = 0.25 \text{ mM}$ , ao fim de 1h e 30 min de reacção, temos uma diminuição a 275 nm de cerca de 11%, a 290 nm de 7% e a 450 nm de 8%. Para  $[Al^{3+}] = 0.5 \text{ mM}$ , temos a 275 nm um decréscimo de

#### Quadro 1: Influência do alumínio na oxidação não enzimática da dopamina

Os resultados representam a média de pelo menos 3 ensaios, sendo no caso da dopamina (DA) 0.1 mM superiores a 40 ensaios. Os números entre parênteses indicam o desvio padrão.

Tempo (min)	DA 0.1 mM			DA + Al 3+ 0.25 mM			DA + Al 3+ 0.5 mM			DA + Al 3+ 1 mM		
	275 nm	290 nm	450 nm	275 nm	290 nm	450 nm	275 nm	290 nm	450 nm	275 nm	290 nm	450 nm
5	0.412 (0.025)	0.652 (0.031)	0.124 (0.016)	0.244 (0.002)	0.507 (0.017)	0.035 (0.002)	0.233 (0.017)	0.494 (0.029)	0.042 (0.003)	0.241 (0.010)	0.494 (0.002)	0.036 (0.002)
10	0.480 (0.023)	0.708 (0.028)	0.169 (0.015)	0.312 (0.004)	0.557 (0.017)	0.071 (0.003)	0.286 (0.017)	0.551 (0.030)	0.076 (0.002)	0.281 (0.010)	0.524 (0.001)	0.062 (0.001)
15	0.508 (0.022)	0.700 (0.026)	0.190 (0.014)	0.364 (0.005)	0.582 (0.017)	0.101 (0.004)	0.330 (0.016)	0.576 (0.030)	0.104 (0.003)	0.316 (0.011)	0.547 (0.004)	0.087 (0.000)
30	0.558 (0.027)	0.649 (0.024)	0.220 (0.014)	0.401 (0.006)	0.598 (0.018)	0.162 (0.005)	0.415 (0.014)	0.577 (0.033)	0.154 (0.003)	0.388 (0.010)	0.554 (0.005)	0.136 (0.002)
60	0.657 (0.036)	0.639 (0.025)	0.249 (0.016)	0.567 (0.015)	0.602 (0.022)	0.215 (0.009)	0.519 (0.017)	0.568 (0.034)	0.192 (0.003)	0.463 (0.011)	0.489 (0.008)	0.179 (0.002)
90	0.715 (0.041)	0.648 (0.027)	0.257 (0.017)	0.641 (0.021)	0.606 (0.027)	0.238 (0.012)	0.602 (0.020)	0.583 (0.036)	0.203 (0.006)	0.520 (0.016)	0.450 (0.012)	0.197 (0.004)

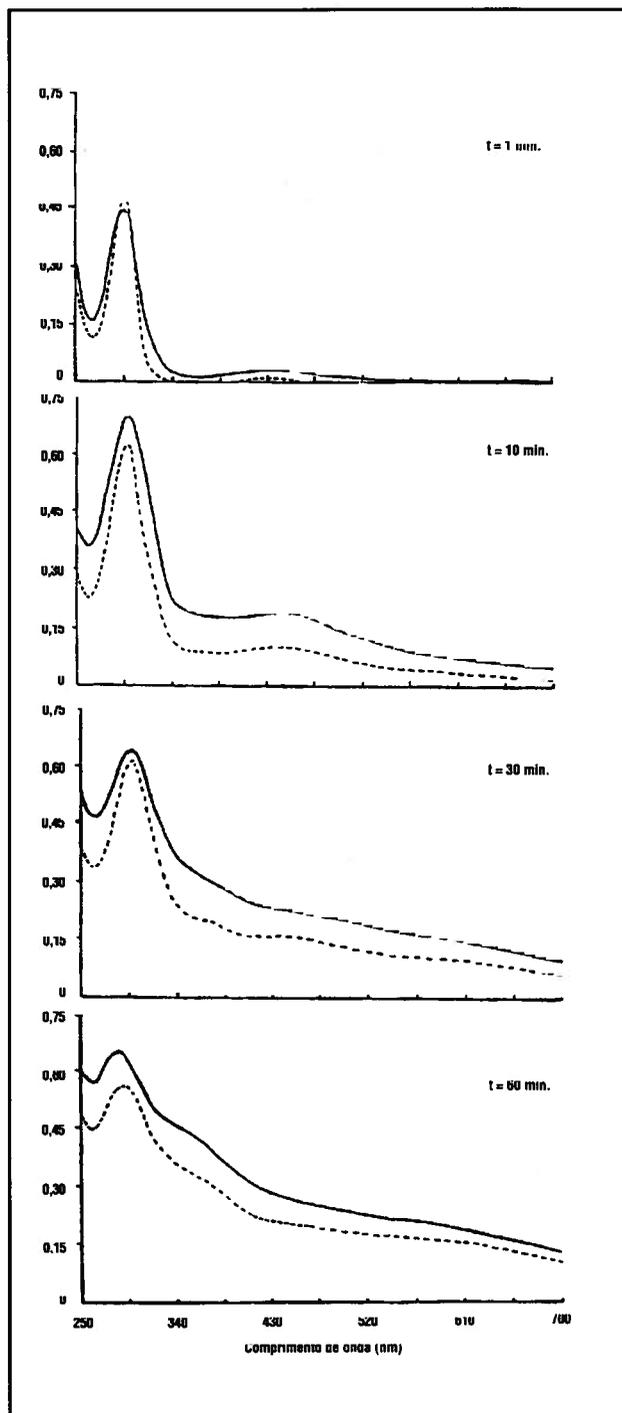


Fig. 4 - Espectros de absorção da reacção de oxidação não enzimática da dopamina 0.1mM, em TRIS-salino, pH 10 (—) e na presença de sais de sulfato de alumínio 0.5 mM (- - -). Espectros registados ao longo de 60 minutos de reacção.

16%, a 290 nm de 11% e a 450 nm de 22% e, finalmente, para  $[Al^{3+}] = 1 \text{ mM}$ , temos uma diminuição de, respectivamente, 28%, 30% e 24%.

Os espectros de absorção da reacção de autooxidação da dopamina, apresentam dois picos, um a 290 nm e outro a 450 nm, correspondentes à dopaminaquinona e ao dopa-

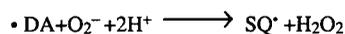
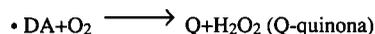
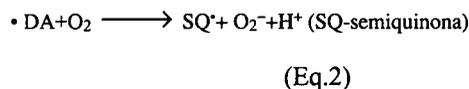
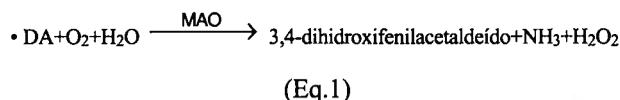
minocrómio. Na presença de  $[Al^{3+}] = 0.5 \text{ mM}$ , pode se verificar um decréscimo dos valores de absorvência ao longo do varrimento do espectro, mantendo-se constantes os picos de absorção máxima. Não se detectou o aparecimento de nenhum outro pico, o que poderia ser indicativo da formação de algum complexo responsável pelo diminuir da formação de neuromelaninas.

## DISCUSSÃO

A doença de Parkinson parece estar relacionada com despigmentação e degenerescência selectiva dos neurónios dopaminérgicos da zona compacta da *Substantia nigra*. A causa da morte celular permanece desconhecida, no entanto, o aumento da lipoperoxidação da *S.nigra* de doentes parkinsonianos<sup>14</sup> levou a que se tenha considerado a hipótese da existência de um potencial mecanismo citotóxico que resulta na geração de radicais livres.

As células do sistema nervoso parecem ser particularmente sensíveis às lesões provocadas por radicais livres. Os ácidos gordos poliinsaturados são o maior constituinte das membranas celulares e o substrato da lipoperoxidação. Os mecanismos de defesa são relativamente deficientes. O cérebro não contém praticamente catalase, e em comparação com o fígado apresenta concentrações reduzidas de glutatióno (GSH), peroxidase do glutatióno e vitamina E<sup>15</sup>. Por sua vez, o ferro, que promove a geração de formas activadas de oxigénio, acumula-se em grandes concentrações na *S.nigra*, uma vez que a capacidade de ligação a este metal é limitada no sistema nervoso<sup>16</sup>.

Os neurónios da *S.nigra* são particularmente vulneráveis a um stress oxidativo, devido ao metabolismo da dopamina. A dopamina pode ser metabolizada pela monoamina oxidase (Equação 1) ou pode sofrer uma oxidação não enzimática com formação de neuromelaninas e geração de radicais livres de oxigénio, nomeadamente peróxido de hidrogénio e radical anião superóxido<sup>7</sup> (Equação 2). Segundo alguns autores, a peroxidase pode estar também envolvida na síntese de neuromelaninas<sup>17</sup>.



A perda característica dos neurónios pigmentados da *S.nigra* de doentes com idades avançadas e em doentes com doença de Parkinson parece estar correlacionada com a acumulação de neuromelaninas<sup>6,18</sup> e com o stress oxidativo existente nesta zona do cérebro<sup>9,19-23</sup>, mas uma associação entre estas observações não está claramente definida.

As neuromelaninas são melaninas que contêm iões metálicos ligados *in situ*, o que sugere que estes políme-

ros podem em condições normais ter uma função citoprotectora, ao neutralizarem, intracelularmente, íons metálicos reactivos. Estudos recentes<sup>24</sup> demonstraram, que as neuromelaninas têm como precursor uma cisteinildopamina e que contêm grandes quantidades de grupos tiólicos. Estes resultados estão de acordo com trabalhos realizados por nós anteriormente, em que se verificou que provavelmente a dopaminaquinona podia ligar-se a grupos -SH, alterando a reacção de autooxidação da dopamina<sup>25</sup>. No entanto, estes dados também são consistentes com um papel potencialmente citotóxico para as neuromelaninas, ao induzirem e exarcebarem um stress oxidativo intracelular.

Neste trabalho verificamos que o alumínio é capaz de inibir parcialmente a oxidação não enzimática da dopamina, diminuindo desta forma a síntese de neuromelaninas. O mecanismo de inibição é desconhecido, mas não deve envolver um processo de oxidação-redução, pois este elemento parece apenas existir no estado de oxidação +3, ao contrário, por exemplo, do manganésio que ao existir em diferentes estados de oxidação é capaz de potenciar esta mesma reacção<sup>7,25</sup>. A formação de algum tipo de complexo entre o alumínio e a dopamina e seus produtos de oxidação pareceria provável, mas não foi possível chegar a resultados conclusivos, uma vez que os espectros de absorção obtidos não forneceram qualquer evidência desse facto.

Se as neuromelaninas tiverem realmente uma função protectora, a sua diminuição por acção do alumínio pode conduzir a graves alterações, além de que este elemento ao facilitar a deslocação do ferro da transferrina, pode provocar um aumento da geração de radicais livres de oxigénio e como tal potenciar um stress oxidativo. Assim, o alumínio pode, por um lado diminuir um siste-

ma protector e por outro, aumentar indirectamente, a formação de formas radicalares citotóxicas, nomeadamente, radical hidroxilo. Parece pois, que o facto de o alumínio se encontrar aumentado em doentes parkinsonianos pode ter particular importância na fisiopatologia desta doença.

## BIBLIOGRAFIA

1. WILLS M R, SAVORY J: *Lancet* ii 1983; 29-34
2. GARRUTO RM et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 1875-1879
3. BIRCHAU JD, CHAPPELL JS: *Lancet* ii 1988; 1008-1010
4. HIRSCH EC et al: *J Neurochem* 1991; 56: 446-451
5. MARTIN, RB: *Clin Chem* 1986; 32: 1797-1806
6. HIRSCH EC, GRAYBIEL AM, AGID Y: *Nature* 1988; 334: 245-248
7. MARINHO CR, MANSO CF: *Acta Méd Port* 1993; 6, 547-554
8. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC: *Trends Biol Sci* 1986; 11: 1372-1375
9. YODIM MBH, BEN-SHACHAR D, RIEDERER P: *Acta Neurol Scand* 1989; 126: 47-54
10. YODIM MBH, BEN-SHACHAR D, RIEDERER P: *Movement Disorders* 1993; 8: 112
11. GUTTERIDGE J M et al: *Biochem Biophys Acta* 1985; 835: 441-447
12. BEN-SHACHAR D, YODIM MBH: *J Neurochem* 1991; 57: 2133-2135
13. SENGSTOCK G J et al: *Movement Disorders* 1991; 6: 272
14. DEXTER D T et al: *J Neurochem* 1989; 52: 381-389
15. OLANOW C W: *Trends Neurol Sci* 1993; 16: 439-444
16. GUTTERIDGE J M C: *Clin Sci* 1992; 82: 315-320
17. GRISHAM M B et al: *J Neurochem* 1987; 48: 876-882
18. GRAHAM D G: *Arch Pathol Lab Med* 1979; 103: 359-362
19. HALLIWELL B: *Acta Neurol Scand* 1989; 126: 23-33
20. BEN-SHACHAR D, YODIM M B H: *J Neural Trans* 1990; 29 (Suppl.): 251-258
21. GOTZ M E et al: *J Neural Trans* 1990; 29 (Suppl): 241-249
22. OLANOW C W: *Neurology* 1990; 40 (suppl. 3): 32-37
23. ADAMS J D, ODUNZE I N: *Free Rad Biol Med* 1991; 10: 161-169
24. ENOCHS W S et al: *J Neurochem* 1993; 61: 68-79
25. MARINHO C R, MANSO C F: *Arquivos Portugueses das Ciências Biológicas* 1991; Tomo XXV: 117-123