

## D-AMINOÁCIDOS EM BIOLOGIA – MAIS DO QUE SE JULGA

João J. R. Fraústo da Silva\* e José Armando L. da Silva

Centro de Química Estrutural – Complexo I, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Av. Rovisco Pais, 1, 1049-001 Lisboa - Portugal

Recebido em 21/4/08; aceito em 25/7/08; publicado na web em 26/1/09

D-AMINO ACIDS IN BIOLOGY – MORE THAN ONE THINKS. It is still frequently referred, even in reference text-books, that the D-enantiomers of amino acids are not present in living organisms, which is not right. In the present revision/informative paper we describe a large number of D-amino acids that are present in all forms of organisms, from bacteria to human beings, in the free state, in peptides and in proteins, and give a short overview of their characteristics, physiological interaction and roles.

Keywords: neuropeptides; neuromodulators; toxins.

## INTRODUÇÃO

É unanimemente reconhecido pela comunidade científica que os aminoácidos são componentes fundamentais dos seres vivos desde a emergência da vida na Terra e que muitos deles podem ter tido origem prebiótica, ou mesmo extraterrestre, não obstante o eventual incremento da degradação da matéria orgânica ao entrar na atmosfera terrestre ou no impacto dos eventuais transportadores, cometas ou meteoritos, com a superfície do nosso planeta.

É certo que vários aminoácidos foram já detectados em meteoritos, como o de Murchison, mas não é seguro que não resultem da contaminação por seres vivos terrestres embora alguns dos aminoácidos identificados tenham características diferentes dos que ocorrem nos organismos no que respeita à sua composição química, estrutural e até isotópica. A sua síntese na Terra em condições prebióticas é também uma possibilidade e tem sido um tema de investigação activa desde o trabalho pioneiro de Stanley Miller, mas ainda sem resultados conclusivos.<sup>1</sup>

Os aminoácidos são moléculas pequenas que se caracterizam por terem, pelo menos, um grupo funcional amina e outro carboxílico, embora algumas moléculas que não têm estas características sejam também designadas por aminoácidos, como é o caso da taurina que é, de facto, o ácido aminoetilsulfónico ( $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ ).

A importância dos aminoácidos nos seres vivos é, como referimos, relevante, podendo ocorrer neles na forma livre, mas sobretudo como constituinte de péptidos, proteínas (e enzimas), polímeros resultantes de reacções de condensação que podem incluir outros componentes, e ainda associados a outras moléculas biológicas, como é o caso da vitamina B<sub>5</sub>. Os péptidos como, por exemplo, a glutatona, que regula o potencial de oxidação/redução no interior das células, têm uma massa molecular menor que a das proteínas, que são polipéptidos, mas não há uma definição unanimemente aceite sobre a massa molecular que os distingue. As proteínas, porém, em geral, têm funções estruturais, catalíticas (enzimas), sinalizadoras, de transporte de iões ou moléculas, etc., mais amplas que as dos péptidos.

Actualmente conhecem-se nos sistemas biológicos 22 aminoácidos codificados no DNA, os quais são sintetizados por mais de uma via metabólica, embora sejam conhecidas algumas centenas que resultam de reacções pós-translacionais. Têm também a particularidade de terem, pelo menos, um carbono quirál, com excepção

da glicina. Todavia, associadas a estes dois aspectos, há afirmações divulgadas em muitos artigos e livros de texto, mesmo recentes, sobre as características dos aminoácidos que não correspondem ao que, de facto, ocorre nos organismos. É por exemplo, comum referir-se que o número de aminoácidos codificados no DNA é 20, embora no ser humano esse valor seja realmente 21, facto conhecido desde a década de 1960 em que se descobriu que a selenocisteína é também codificada, e mais recentemente, já em 2002, foi identificado um vigésimo segundo aminoácido, a pirrolisina, codificada na bactéria metanogénica *Methanosarcina barkeri* mas que ocorre também em outras espécies do mesmo género. O equívoco resulta de, na época, os aminoácidos expressos serem associados a certos grupos de codões, sem considerar a possibilidade dos organismos seguirem estratégias de adaptação e utilizarem outros tipos de codões. Nos dois casos referidos são, de facto, utilizados codões usualmente identificados como indicadores de paragem, isto é de STOP.<sup>2</sup>

Outra afirmação corrente é a de todos os aminoácidos biológicos serem os seus L-enantiómeros,<sup>3</sup> exceptuando o caso já mencionado da glicina. Porém, é conhecida, já desde os anos 40 do século passado, a ocorrência de D-aminoácidos em organismos vivos, inicialmente em bactérias, mas um número crescente de exemplos tem sido registado em todos os tipos de organismos, incluindo os seres humanos, estando mesmo, neste caso, envolvidos em funções importantes no sistema nervoso central, como adiante referiremos.

É verdade que há um predomínio dos L-aminoácidos nos seres vivos, mas predomínio não significa exclusividade. Qual será então a razão do predomínio? Têm sido propostas várias hipóteses, entre as quais a de ser termodinamicamente mais favorável a formação dos enantiómeros L- quando comparados com os D-, embora a diferença seja mínima. Outras hipóteses baseiam-se na possibilidade de amostras com maior percentagem de um dos enantiómeros, gerados na Terra ou vindos do espaço, poderem ter sido progressivamente enriquecidas numa das formas,<sup>4,5</sup> o que poderia acontecer numa superfície quirál,<sup>6</sup> bem como em processos selectivos de cristalização, tanto a partir de uma fase líquida como por sublimação.<sup>7</sup>

São, realmente, conhecidos processos que favorecem a formação de estruturas estereo-selectivas a partir de reacções de polimerização de unidades quirais mais simples, incluindo os aminoácidos,<sup>8</sup> fenómeno que pode justificar o predomínio dos L-aminoácidos se os processos subsequentes favorecerem a selecção destes. De facto, em estruturas mais complexas, ao ser gerada uma determinada arquitectura tridimensional a homociralidade pode tornar possível

\*e-mail: pcd1950@ist.utl.pt

uma maior especificidade catalítica e favorecer também certos tipos de interações fundamentais dando azo a uma mais ajustada organização estrutural das macromoléculas que se reflecte numa sua maior eficiência operacional.<sup>9</sup> De notar, porém, que no início do processo o argumento é válido para qualquer dos enantiómeros, L- ou D-, se ambos forem igualmente abundantes, pelo que, a nosso ver, a selecção (natural) de um deles depende dos passos seguintes, mas uma vez seleccionado torna-se predominante, como terá sido o caso dos L-enantiómeros. Isto não significa, porém, que os D-aminoácidos não estejam também presentes, livres ou ligados, como adiante descreveremos, o que é já um facto comprovado por muitos investigadores e contra factos não há argumentos.

## OS D-AMINOÁCIDOS – ALGUMAS NOTAS SOBRE A SUA OCORRÊNCIA NOS ORGANISMOS VIVOS

Como foi antes referido, na década de 40 do século XX foram identificados D-aminoácidos nas paredes de células de bactérias Gram-positivas,<sup>5</sup> mas já antes, nos anos 30, tinha sido verificada a presença da D-aminoácido oxidase EC 1.4.3.3<sup>10</sup> em mamíferos, facto que seria estranho se este tipo de aminoácidos não participasse no metabolismo deste grupo de organismos ou em sistemas a eles associados. Na verdade, os D-aminoácidos ocorrem em todos os tipos de organismos, procariotas e eucariotas, unicelulares e pluricelulares, embora com valores relativamente baixos, geralmente inferiores a 1% dos L-aminoácidos, mas que em alguns casos podem atingir teores significativos nas suas fracções solúveis, por exemplo a D-alanina e o D-glutamato em eubactérias<sup>11</sup> Gram-positivas (11,7% no *Staphylococcus epidermis* e 10,3% no *Streptococcus pyrogenes* para a D-alanina, e 22,3% no *Bacillus* YN-1 para o D-glutamato).<sup>9</sup> Nas eubactérias Gram-negativas os teores parecem ser menores, por exemplo cerca de 8% para o D-glutamato no *Thiobacillus ferrooxidans*.<sup>12</sup> Valores bem mais elevados foram detectados para o D-aspartato em estirpes hipertermófilas de arqueobactérias como os *Thermococcus*, *Pyrococcus* e *Desulfurococcus*, atingindo teores variando entre 43 e 49%.<sup>13</sup> Nas eubactérias estudadas os teores de D-aspartato são bastante mais baixos, o que suscita alguma reflexão.

Nas plantas, os teores totais de D-aminoácidos variam entre 0,2 e 8%, sendo a D-asparagina o mais abundante, mas nelas ocorrem também dipéptidos contendo, por exemplo, D-alanina e outro D-aminoácido, como foi verificado numa espécie de arroz, *Oryza australiensis*.<sup>14</sup>

Também nos invertebrados foram identificados vários D-aminoácidos, por exemplo no *Bombix mori* (Linnaeus, 1758), o bem conhecido bicho-da-seda, em que foram doseadas quantidades significativas de D-serina<sup>15</sup> variando entre 5 e 59% segundo as fases da vida desta espécie, e o mesmo foi verificado noutras duas espécies da mesma ordem, Lepidoptera, também capazes de produzir outros tipos de seda. Tendo em conta a concentração elevada de D-serina nalgumas fases de desenvolvimento do *B. mori*, seria interessante verificar a importância deste aminoácido na estabilização da estrutura da seda, facto que não conseguimos verificar na literatura. Refira-se que nas folhas de amoreira, seu alimento, não foi encontrada nenhuma fracção solúvel contendo este aminoácido mas foi detectada uma serina racemase, enzima envolvida na síntese da D-serina no *B. mori*, na sua fase pupa<sup>16</sup> (entre as fases larvar e adulta).

Nos fluidos corporais de vertebrados superiores (saliva, urina, plasma sanguíneo, soro sanguíneo, leite e líquido céfalo-raquidiano) foram igualmente identificados e quantificados D-aminoácidos, encontrando-se teores mais elevados na urina, sobretudo para a D-alanina e a D-serina.<sup>17,18</sup> Curiosamente, foi verificado que em doentes renais a percentagem de D-aminoácidos no plasma sanguíneo era muito superior ao das pessoas saudáveis,<sup>19</sup> o que carece

investigação aprofundada. De notar que foram também identificados D-aminoácidos nas fezes de roedores<sup>17</sup> e em ratos [*Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)] foi observado que a absorção de D-aminoácidos é possível através dos intestinos, tal como a dos L-aminoácidos. A absorção máxima dos primeiros dá-se até às 8 semanas de vida, decrescendo depois, mas na sua maioria parecem ser oxidados pela D-aminoácido oxidase EC 1.4.3.3.

É claro que tanto no caso das plantas, como nos animais, não se pode pôr de parte a possibilidade de alguns dos D-aminoácidos identificados serem provenientes de bactérias ou de alimentos ingeridos (leite, ovos, frutos, legumes, etc.), mas não é de excluir a ocorrência de biosíntese endógena dado que, como veremos adiante, certos D-aminoácidos podem ser necessários para o funcionamento dos organismos, embora outros possam resultar de reacções secundárias.<sup>20</sup>

É de assinalar ainda o facto de, por vezes, se registarem alterações ao longo do tempo nos teores de D-aminoácidos, o que pode ser provocado pela presença de microrganismos ou, na ausência destes, por um processo de racemização, o qual pode, eventualmente, ser usado na datação de amostras.<sup>20</sup>

Estas breves notas sobre a ocorrência de D-aminoácidos livres em diferentes organismos são suficientes para contestar a ideia quase generalizada de que aqueles enantiómeros não ocorrem em sistemas biológicos, mas o tema será desenvolvido nas alíneas seguintes e estendido a péptidos e proteínas em que estão envolvidos, reforçando assim a ideia de que o “dogma” da sua exclusão dos seres vivos não pode manter-se, pelo menos nos moldes actuais, mas que funções podem desempenhar?

## FUNÇÕES DOS D-AMINOÁCIDOS EM PROCARIOTAS

O primeiro caso conhecido de ocorrência de D-aminoácidos em procariotas derivou da observação de que estão presentes nas paredes celulares de eubactérias Gram-positivas como componentes dos peptidoglicanos (que são parte da estrutura membranar nestes organismos), em especial o D-glutamato e a D-alanina. As células destas eubactérias são estabilizadas por um exoesqueleto constituído por mureína, um peptidoglicano, e um polímero de cadeia longa formada alternadamente por resíduos de N-acetilglucosamina e ácido D-acetil murâmico. Outras macromoléculas adjacentes estão também ligadas por cadeias peptídicas, mas o número e a composição dos seus aminoácidos é variável nas diferentes espécies bacterianas. A presença de D-aminoácidos neste conjunto contendo outros enantiómeros D- deve, logicamente, favorecer a estabilidade da estrutura, o que é confirmado pelo facto deste tipo de paredes celulares ser sensível aos antibióticos  $\beta$ -lactam<sup>21</sup> ou à vancomicina<sup>22</sup> que inibem a formação de ligações cruzadas.<sup>23</sup>

Conhecem-se também outros casos, menos comuns, da ocorrência de peptidoglicanos em bactérias, contendo resíduos de D-serina e D-treonina. Estes resíduos favorecem a formação de pontes de hidrogénio que reforçam a estrutura, sendo curioso verificar que a presença destes aminoácidos aumenta a resistência a alguns antibióticos,<sup>24</sup> ao contrário dos casos antes referidos.

Não é, porém, o reforço das estruturas membranares a única função dos D-aminoácidos que ocorrem nas eubactérias. Conhecem-se muitos casos de compostos em que têm, aparentemente, funções de antibióticos, embora o seu número seja bastante menos significativo que os que contêm L-aminoácidos. Estes compostos, que são por vezes designados por péptidos antimicrobianos, têm geralmente de 12 a 50 resíduos de aminoácidos, na sua grande maioria catiónicos mas com uma proporção significativa de resíduos hidrófobos, e têm conformações e estruturas variadas adoptando uma conformação anfipática quando actuam na membrana das células que atacam, provocando a rotura dessas membranas, do que resulta a quebra da

homeostase celular e a provável inibição da actividade metabólica. Por outro lado, o carácter catiónico de muitos dos aminoácidos destes péptidos favorece a interacção com as membranas dos procariotas e eucariotas inferiores dado que estas contêm fosfolípidos com carga negativa.<sup>25,26</sup>

Saliente-se que nem todos estes agentes antimicrobianos têm apenas resíduos de D-aminoácidos na sua estrutura, como são os casos da valinomicina, que na sua constituição tem L-lactato, da tolaasina, que é um lipopéptido, e da hassallidina A, que é também um lipopéptido mas glicosilado.

Um outro aspecto a salientar é o facto de um número significativo

destes compostos terem uma estrutura cíclica que pode favorecer a complexação de iões metálicos de forma específica e afectar assim a homeostase celular. Na Tabela 1 apresentam-se alguns exemplos de compostos com actividade antibiótica que ocorrem em bactérias.<sup>27-35</sup>

Nos procariotas são também conhecidas outras biomacromoléculas contendo D-aminoácidos, como a endopeptidase da bactéria Gram-positiva *Streptococcus pyogenes* (causadora da faringite comum), a qual contém alguns resíduos de D-alanina.<sup>36</sup> São ainda de referir outros compostos naturais, o lipopéptido serrawetina W2, D-3-hidroxi-decanoil-D-leucil-L-seril-L-treonil-D-fenilalanil-

**Tabela 1.** Exemplos de compostos contendo D-aminoácidos com actividade antibiótica que ocorrem em bactérias

Péptido	Proveniência	Tipo de D-aminoácido	Forma de actuação
Bacteriocinas*	Algumas espécies de <i>Staphylococcus</i> e <i>Lactobacillus</i>	Ver*	Despolarizam as membranas citoplasmáticas, processo iniciado pela formação de poros nessas estruturas
(R)-4-amino-3-isoxazolidinona	<i>Streptomyces garyphalus</i>	D-ciclo-serina (um derivado da D-serina)	Inibe a síntese da parede celular devido à semelhança entre a D-ciclo-serina e a D-alanina
Valinomicina	Várias estirpes de <i>Streptomyces</i>	D-valina	Transportador específico de K <sup>+</sup> através das membranas lipídicas alterando desta forma o potencial electroquímico ao nível celular
Actinomicinas	Várias estirpes de <i>Streptomyces</i>	D-valina ou D- <i>alo</i> -isoleucina	Ligam-se ao DNA nos resíduos de desoxiguanosina e desta forma interferem na acção das enzimas envolvidas na replicação e na duplicação
Gramicidinas	<i>Bacillus brevis</i>	D-leucina e D-valina	Aumentam a permeabilidade dos cátions inorgânicos, eliminando o gradiente iónico
Tirodricidinas	<i>Bacillus brevis</i>	D-fenilalanina	Provocam a rotura da membrana celular e de organelos
Bacitracinas	Estirpe de <i>Bacillus brevis</i>	D-aspartato, D-glutamato, D-ornitina e D-fenilalanina	Provavelmente afectam a síntese de peptidoglicanos por sequestrarem o undecaprenil difosfato e desta forma reduzem a quantidade de transportador lipídico disponível
Polimixinas	<i>Bacillus polymyxa</i>	D-fenilalanina, D-leucina, D-serina e ácido D-2,4-diaminobutírico	Alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática e inibem a respiração celular
Micobacilina	<i>Bacillus subtilis</i>	4 D-aspartato e 2 D-glutamato	Antifúngico; aglutina células da <i>Candida albicans</i> (Berkhout, 1923)
Tolaasina I	<i>Pseudomonas tolaasii</i>	D-prolina, D-serina, D-leucina, D- <i>alo</i> -treonina, D-valina, D-glutamina, D-homoserina e ácido D-2,4-diaminobutírico (alguns repetidos)	Antifúngico; forma canais na bicamada lipídica
Hassallidina A	<i>Tolypothrix</i> , cianobactéria	D- <i>alo</i> -treonina, D-treonina, D-tirosina e D-glutamina	Antifúngico
Ramoplanina	<i>Actinoplanes</i> ATCC 33076	D-hidroxi-fenilglicina, 2 D-ornitina e D- <i>alo</i> -treonina	Eficiente no combate a numerosas bactérias Gram-positivas, por impedir a síntese das paredes celulares

\* Dividem-se em duas classes - na classe I, os lantibióticos caracterizam-se por conterem pelo menos um resíduo de um aminoácido pouco comum, a lantionina, embora nem todos tenham resíduos D; entre os que têm estes resíduos referam-se a epidermina, a galidermina, a mutacina (com S-[(Z)-2-aminovinil]-D-cisteína) e a mersacidina (com S-[(Z)-2-aminovinil]-metil-D-cisteína). Ainda na classe I, em espécies de *Lactobacillus*, a lacticina 3147 e a lactocina S contêm D-alanina. Na classe II, a gassericina A e a reutericina 6 contêm 18 resíduos de aminoácidos com 2 e 1 resíduos de D-alanina, respectivamente.

na-L-isoleucil lactona, que ocorre em algumas estirpes da bactéria patogénica *Serratia marcescens*, por vezes encontradas em ambiente hospitalar.<sup>37</sup>

## FUNÇÕES DOS D-AMINOÁCIDOS EM EUCARIOTAS

A ocorrência de D-aminoácidos livres nos eucariotas não é comum, mas conhecem-se casos em que se verifica e vários outros exemplos em que figuram como resíduos dos péptidos.

O primeiro péptido contendo D-aminoácidos detectado em eucariotas foi a chamada dermorfina identificada em secreções da pele (de onde deriva o seu nome) de uma espécie de rã, a *Phyllomedusa sauvagii* (Boulenger, 1882), da América do Sul.<sup>38</sup> Foram também identificados na América Latina alguns péptidos do mesmo tipo, ou com este relacionados, noutras rãs da mesma subfamília, Phyllomedusinae, por exemplo a chamada deltorfina. É, todavia, admitido que estes péptidos possam provir de um organismo não identificado associado com a rã.<sup>39</sup> Os batráquios não são, porém, a única espécie em que os péptidos contendo D-aminoácidos foram detectados, pois ocorrem também em moluscos, gastrópodos marinhos, polvos, crustáceos, ornitorrincos, aranhas e animais superiores, e também em fungos. No estado livre os D-aminoácidos foram identificados em animais como o polvo e outros invertebrados, em rãs e em mamíferos, sendo de particular interesse a sua ocorrência nos seres humanos, caso que analisaremos adiante em maior pormenor. Na Tabela 2 apresentam-se diversos exemplos de moléculas contendo D-aminoácidos que foram identificados em eucariotas e algumas das suas características.<sup>26,27,35,40-60</sup> Nos péptidos, os D-aminoácidos localizam-se perto da zona N-terminal ou C-terminal, mas conhecem-se algumas excepções, como é o caso da  $\omega$ -agatoxina IVB.

## FUNÇÕES DE D-AMINOÁCIDOS NOS SERES HUMANOS (E OUTROS ANIMAIS SUPERIORES)

Uma das funções mais significativas dos D-aminoácidos livres em animais superiores é a sua participação nos processos de transmissão da informação ao nível do sistema nervoso central. Sabe-se, por exemplo, que os teores de D-serina extracelulares no encéfalo são superiores aos de muitos L-aminoácidos, tais como a asparagina, a valina, a isoleucina e o triptofano. O teor da D-serina livre é cerca de um terço do da L-serina. Nos mamíferos, a D-serina ocorre nos astrócitos protoplasmáticos e nos neurónios, actuando como agonista<sup>61</sup> no sítio da glicina do receptor N-metil-D-aspartato, NMDAR, um dos tipos de receptores de glutamato.<sup>62</sup> Alterações da actividade da D-serina podem estar relacionadas com esquizofrenias, isquémias, epilepsias e doenças neurodegenerativas. O N-metil-D-aspartato não ocorre normalmente nos tecidos biológicos mas já foi identificado no sistema nervoso e nas glândulas endócrinas de um mamífero<sup>63</sup> e em invertebrados.<sup>64,65</sup> O D-aspartato ocorre nos neurónios e em tecidos endócrinos, tanto na glândula pineal (com uma concentração que é cerca de metade da do L-aspartato) como no lobo frontal e noutras localizações do sistema nervoso central.<sup>41,66</sup> Actua como agonista no sítio do glutamato e pode ter um papel importante no desenvolvimento do organismo e estar associado a funções endócrinas.<sup>40</sup> No organismo pode ser libertado por um mecanismo envolvendo o transportador de L-glutamato.<sup>67</sup>

É curioso notar que na 14<sup>a</sup> semana do feto humano o teor de D-aspartato no lobo frontal é superior ao do L-aspartato.<sup>42</sup> Também nos embriões de outros mamíferos, em que o D-aspartato está presente nos tecidos endócrinos e nervosos, ocorrem valores elevados e aumentos temporários do seu teor nas glândulas endócrinas em determinadas fases do desenvolvimento inicial, assim como nos testículos antes do nascimento e durante a maturação.<sup>43</sup> Em estudos

com ratos, *R. norvegicus*,<sup>68</sup> verificou-se uma redução da absorção de D-aminoácidos no período que se segue àquele em que o feto é “abastecido” pela mãe, o que parece indicar a importância que estes enantiómeros têm na fase anterior ao seu desenvolvimento. A redução, determinada por uma maior selectividade à sua passagem através da barreira intestinal, para além da actividade dos sistemas enzimáticos que eliminam os D-aminoácidos exógenos (que podem ser prejudiciais), deve resultar do facto do organismo estar mais preparado para satisfazer por si próprio as suas necessidades, provavelmente mais reduzidas, recorrendo eventualmente à biossíntese interna quando necessário.

O D-aspartato tem também sido identificado em várias proteínas de idosos, provavelmente devido à redução da sua eficiência metabólica, tendo sido detectado nos dentes (na fosfoforina), nos ossos (na osteocalcina), nas proteínas dos cristalinos, em que a sua ocorrência pode estar relacionada com a formação de cataratas, e ainda na aorta, nos pulmões, na pele (nestes casos na elastina) e nos eritrócitos. No caso da aorta a presença de D-aspartato pode estar associada à arterosclerose e no encéfalo pode ocorrer na mielina e na proteína  $\beta$ -amilóide cuja formação está associada à doença de Alzheimer. Neste último caso foi também detectada na sua composição a presença de D-serina,<sup>5,69,70</sup> o que não é de estranhar pois tanto o D-aspartato como a D-serina actuam no encéfalo como neuromoduladores.

Tendo, nestes exemplos, efeitos prejudiciais, a presença destes D-aminoácidos deve resultar de uma deficiente ou mais reduzida actividade metabólica dos organismos envelhecidos, sendo ou mantendo-se, assim, armazenados nos tecidos. Já desde 1939 tem também sido referido que os tecidos tumorais contêm teores apreciáveis de D-aminoácidos,<sup>71</sup> mas os resultados são controversos e não é de excluir a possibilidade da sua presença resultar de os tecidos tumorais terem um crescimento rápido e da formação de D-aminoácidos nos tumores poder afectar a actividade dos tecidos sãos.

## OS D-AMINOÁCIDOS E AS SUAS INTERACÇÕES COM OS ORGANISMOS VIVOS

Observando as Tabelas 1 e 2 verifica-se que os D-aminoácidos estão, de facto, presentes nos seres vivos, no estado livre ou combinado, e que os procariontes usam uma variedade daqueles enantiómeros superior à dos usados pelos eucariotas, mas de uma forma geral e com algumas excepções a presença de L-aminoácidos é predominante. Os D-aminoácidos podem formar-se porque nos processos (bio)químicos a selectividade enantiomérica não é necessariamente 100%. Verificando-se que na maioria dos casos estudados os D-aminoácidos têm efeitos tóxicos nos organismos ou são usados com esse objectivo (muitos são antibióticos), pode admitir-se que a sua presença com funções úteis ou mesmo essenciais se deve à sua sequência no processo evolutivo quando os organismos são confrontados com um produto tóxico não essencial que lhes é estranho: toxicidade→protecção→rejeição→sinalização→integração→utilização (tal como terá ocorrido com o aumento de disponibilidade de alguns elementos químicos no meio ambiente devido à oxigenação progressiva do mesmo).

Deste modo, no caso de formação inesperada ou de contacto com moléculas contendo resíduos com D-aminoácidos, os organismos devem ter tendido numa primeira fase a rejeitá-las e posteriormente a eliminá-las, dada a sua natureza estranha, por acção de enzimas específicas, a expulsá-las (actuando eventualmente como toxinas capazes de causar problemas a outras espécies indesejáveis vivendo no mesmo habitat), a armazená-las em localizações em que não sejam excessivamente nocivas (ossos, dentes, tecidos, etc.), a torná-las menos tóxicas englobando-as noutras moléculas, como acontece no fungo *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E.C. Hansen), formando compostos acetilados, a dar-lhes uma função estrutural (como acon-

**Tabela 2.** Exemplos de D-aminoácidos em eucariotas

Péptido	Proveniência	Tipo de D-aminoácido	Função	Forma de actuação
Dermorfina*	Segregada na pele de alguns anfíbios	D-metionina, D-alanina ou D- <i>alo</i> -isoleucina(?) (pode ter vários resíduos)	Neuropéptidos	Actividade antimicrobiana
Péptido 39 natriurético tipo C	<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (Shaw 1799), Ornitorrinco	D-leucina (resíduo 2)	Componente de um veneno	Afecta a homeostase iónica
Péptido 2/4, como a defensiva	<i>Ornithorhynchus anatinus</i> (Shaw 1799), Ornitorrinco	D-metionina (resíduo 2)	Componente de um veneno	
Neuropéptidos de moluscos	Vários moluscos	Ver **	Neuropéptidos	Actividade excitatória e/ou moduladora em diversos órgãos e neurónios
Hormona hiperglicémica dos crustáceos***	Alguns crustáceos das ordens Decapoda e Isopoda	D-fenilalanina (resíduo variável, geralmente no 3)	Neuropéptido	Regulam o teor de açúcar no sangue; pode actuar com hormona de stresse e estar envolvida na reprodução
Contrifans	Género <i>Conus</i> , gastrópodes marinhos	D-triptofano ou D-leucina (resíduo 4 ou 58 em 63)	Neurotoxina	Afecta canais do potássio
Conofans	Género <i>Conus</i> , gastrópodes marinhos	D-4-hidroxiserina ou D-valina (resíduo 6, entre 8)	Provável neurotoxina	
$\omega$ -agatoxina IVB	<i>Agelenopsis aperta</i> (Gertsch, 1934), uma aranha	D-serina (resíduo 46)	Neurotoxina	Paralisa os insectos por bloqueio pré-sináptico na transmissão neuro-muscular; actuando em canais específicos do cálcio
Bombininas H***	Segregada na pele <i>Bombina variegata</i> (Linnaeus, 1758), um anfíbio	D- <i>alo</i> -isoleucina (resíduo variável, geralmente no 2)	Antibiótico	
Virotoxinas***	<i>Amanita virosa</i> (Fr.) (Bertillon, 1866), um fungo	D-serina (resíduo 6)	Toxina	Podem induzir a polimerização da actina**** (o grupo OH da D-serina pode ter um papel importante no contacto com a superfície da actina e induzir a fragmentação da membrana celular)
Malforminas	<i>Aspergillus niger</i> (van Tieghem, 1867), um fungo	2 D-cisteínas e um outro D-aminoácido em arranjo cíclico	Fitotóxico	
Aminoácidos livres	Animais, incluindo invertebrados	D-serina***** e D-aspartato	Neuromoduladores	No encéfalo ligam-se a alguns receptores do glutamato
	<i>Rana clamitans</i> (Latreille, 1801), uma rã	D-aspartato		Controla a secreção andrógena
	Polvo	D-alanina	Pode contribuir para a força iónica do ambiente celular	

\*As deltorfinas incluem-se neste grupo. \*\*No caracol gigante africano *Achatina fulica* (Ferussac, 1821) o neuropéptido achatina I contém um resíduo de D-fenilalanina que ocupa o segundo lugar na sequência. Neste organismo este péptido coexiste com um outro com L-fenilalanina, e ainda com os designados fulicina (com D-asparagina) e fulial (contendo D-alanina). No mexilhão *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) ocorre o péptido mytilus-FFRFamida com D-leucina e em alguns gastrópodes *Aplysia* os péptidos NdWFamida e afins contêm D-triptofano. Conhece-se ainda o péptido helix CCAP-RP-III, proveniente de um caracol, mas sobre este não foi possível obter mais informação.

\*\*\*Nem todos têm um resíduo D. \*\*\*\* Proteína expressa em todo o tipo de células de eucariotas e associada a vários tipos de motilidade celular. \*\*\*\*\*A D-serina actua também como gliotransmissor, isto é, participa no mecanismo de transmissão de mensagens a partir das células gliais (as células mais numerosas no sistema nervoso central).

tece nas bactérias Gram-positivas, associando-as a outras moléculas D-), ou a associá-las a processos de sinalização com funções de neuromoduladores ou de neuropéptidos (em teores reduzidos, para evitar quaisquer eventuais efeitos nocivos).

Note-se que nos organismos superiores não são usados, ou não se conhecem ainda, neuropéptidos com D-aminoácidos, como os observados em alguns invertebrados estudados, o que poderá indicar algumas dificuldades ou inconveniência dos primeiros na inactivação ou eliminação deste tipo de moléculas.

Todavia, quando os compostos contendo D-aminoácidos passaram a ser usados pelos organismos, ainda que de forma limitada, tiveram que ser produzidos endogenamente nas quantidades necessárias para evitar a sua dependência da dieta alimentar ou de outros organismos. Naturalmente, as estratégias de síntese (e de eliminação) são diversificadas entre os tipos de organismos, ainda que seja de esperar a manutenção de alguns processos metabólicos gerais. Nas células os D-aminoácidos são incorporados pelas aminoácido permeases.<sup>72</sup>

No que se refere à biossíntese conhecem-se várias enzimas envolvidas nos diferentes processos, por exemplo as glutamato racemases, EC 5.1.1.3, as alanina racemases, EC 5.1.1.1, e as D-aminoácido transaminases, EC 2.6.1.21, que usam como substratos diversos D-aminoácidos e estão envolvidas na síntese das paredes celulares das bactérias. A glutamato racemase pode participar noutras funções deste tipo de organismos, por exemplo no processamento do DNA por modulação da DNA girase, EC 5.99.1.3, na *Escherichia coli*.<sup>35,73,74</sup>

Embora os D-aminoácidos sejam mais correntes nas eubactérias, também ocorrem em arqueobactérias nas quais foram já detectadas racemases. Nos eucariotas, incluindo invertebrados, conhecem-se serina racemases, EC 5.1.1.-, que são dependentes do cofactor piridoxal 5-fosfato. Nos mamíferos estas enzimas têm uma homologia de cerca de 30% com a treonina desidratase, EC 4.3.1.19, bacteriana, e podem ainda desidratar a serina e formar piruvato na presença de iões divalentes, pelo que poderão estar envolvidas no metabolismo energético ao nível do encéfalo, com implicações nas interacções entre as células gliais e os neurónios.<sup>35,75-77</sup> Nas plantas são também conhecidas racemases de várias proveniências, mas alguns autores admitem outras formas de síntese de D-aminoácidos envolvendo a participação de aminotransferases e outros não excluem a possibilidade da síntese ocorrer por vias não-enzimáticas ou das moléculas provirem de bactérias associadas simbioticamente às plantas.<sup>73</sup>

A formação de macromoléculas contendo D-aminoácidos é específica para cada espécie de organismos, procariotas ou eucariotas, pois cada um produz moléculas com características próprias e diferentes D-aminoácidos, Tabelas 1 e 2. Por exemplo, em bactérias, uma aminoaciltransferase da *Saccharothrix* sp AS-2 pode estar envolvida na síntese de péptidos contendo D-aminoácidos.<sup>78</sup> Também as não-ribossomais péptido sintetases, complexos contendo várias enzimas que ocorrem em bactérias e em fungos, podem estar envolvidas na síntese de péptidos com actividade antibiótica, como as tirocidinas, gramacidinas, siringomicina, ramoplanina e artrofactina, etc.,<sup>79,80</sup> enquanto que a biossíntese da  $\omega$ -agatoxina IVB pela aranha *A. aperta*, por exemplo, deve-se à acção específica da proteína-serina epimerase, EC 5.1.1.16, a qual actua apenas num dos dois resíduos de serina do substrato convertendo-o em D-serina,<sup>81</sup> enquanto que noutros organismos a síntese de péptidos é assegurada por péptido sintetases.<sup>35,82</sup>

Os conhecimentos sobre a síntese de macromoléculas contendo D-aminoácidos são todavia ainda reduzidos sendo de esperar novos desenvolvimentos em anos futuros.

No que se refere à inactivação ou eliminação de D-aminoácidos conhecem-se enzimas capazes de oxidar os D-aminoácidos que foram identificados em fungos e em animais, as quais actuam por desaminação dos substratos. Foram particularmente estudadas a D-aminoácido oxidase, EC 1.4.3.3., que não actua sobre o aspartato e o glutamato,

a D-aspartato oxidase, EC 1.4.3.1, que actua especificamente sobre o D-aspartato e o seu derivado N-metilado, a D-glutamato oxidase, EC 1.4.3.7, que actua sobre o glutamato, e a D-glutamato (D-aspartato), oxidase, EC 1.4.3.15, cujos substratos são apenas o glutamato e o aspartato.<sup>35,82,83</sup>

Embora se saiba que algumas destas enzimas são fundamentais para a actividade neuromoduladora dos D-aminoácidos (que têm de ser inactivados para que nova informação seja transmitida), a presença da D-aminoácido oxidase em fungos, que não têm actividade de neuromodulação, sugere que possa ser de proveniência externa ou resultado de associações simbióticas.<sup>83</sup>

Outro processo de inactivação dos D-aminoácidos é a sua transformação em derivados acetilados, geralmente menos nocivos, o que ocorre no fungo *S. cerevisiae* com a enzima D-aminoácido N-acetiltransferase.<sup>84</sup> Todavia, os D-aminoácidos livres podem provir de péptidos, os quais terão de ser hidrolizados antes da remoção ou inactivação do aminoácido. As enzimas capazes de hidrolizar os péptidos são conhecidas em bactérias e podem ser importantes na defesa contra antibióticos, mas ocorrem também noutros organismos. Um caso particular é o da dipeptidase não específica EC 3.4.13.17 que ocorre nos sucos digestivos dos cefalópodes e actua sobre péptidos com L- ou D-aminoácidos,<sup>82</sup> sendo interessante notar que os D-aminoácidos livres têm algumas funções nestes organismos (é curioso o facto de alguns estudiosos considerarem que o polvo<sup>85</sup> é o mais “inteligente” dos invertebrados).

Note-se, finalmente, que a inclusão indevida de resíduos de D-aspartato em macromoléculas pode ser corrigida pela enzima L-isoaspartato (D-aspartato) O-metiltransferase, EC 2.1.1.77, que converte o enantiómero D- no enantiómero L-<sup>86</sup> e ainda o caso das D-aminoacil-tRNAs, que quebram a ligação do grupo éster entre tRNA e os D-aminoácidos;<sup>87</sup> ambos os tipos ocorrem em vários organismos.<sup>35</sup>

Na formação de péptidos com resíduos com D-aminoácidos são conhecidas a D-alanina  $\gamma$ -glutamiltransferase, EC 2.3.2.14, que forma um dipéptido a partir da D-alanina e a D-glutamiltransferase, EC 2.3.2.1, que adiciona D- ou L-glutamina a um péptido com um resíduo de D-glutamina. Relativamente à cisão de ligações de D-aminoácidos, nos casos apresentados envolvendo um resíduo de D-alanina, são de referir a tipo-serina D-Ala-D-Ala carboxipeptidase, EC 3.4.16.4, a muramoilpentapéptido carboxipeptidase, EC 3.4.17.8, a muramoiltetrapéptido carboxipeptidase, EC 3.4.17.13, e a zinco D-Ala-D-Ala carboxipeptidase, EC 3.4.17.14.<sup>35,82</sup>

## COMENTÁRIOS FINAIS

Do que foi antes descrito poderá concluir-se que, contrariamente ao que antes se julgava (e ainda hoje é, por vezes, admitido como se de um dogma se tratasse), os D-aminoácidos podem ter ocorrido originalmente nos seres vivos em resultado de reacções metabólicas secundárias, mas ao longo do processo evolutivo os organismos passaram a utilizá-los em algumas funções e tornaram-se essenciais em alguns casos, designadamente, mas não só, no funcionamento do sistema nervoso central dos seres humanos. A utilização dos D-aminoácidos origina uma diversificação no metabolismo por facilitar a diferenciação das células ou tecidos, aumentar a variedade de produtos sintetizados pela via pós-translacional a partir de um determinado gene, e responder à necessidade de desenvolver receptores apropriados e de mecanismos de defesa, contribuindo assim para o desenvolvimento do processo evolutivo.

O seu uso é, actualmente, incontroverso, mas uma análise cuidada dos aminoácidos codificados cujos estereoisómeros D- já foram detectados em moléculas biológicas mostra que dos 21 casos possíveis (a glicina não tem actividade óptica) e excluindo destes os casos marginais da selenocisteína e da pirrolisina, no grupo dos aminoácidos catiónicos

(arginina, lisina e histidina) não foram ainda identificadas macromoléculas contendo este tipo de resíduos (apenas foi na ornitina, mas esta não é um aminoácido codificado). É possível que este facto resulte de alguma limitação experimental na sua identificação, mas no caso dos péptidos antimicrobianos e nos neuropéptidos, geralmente catiónicos, não foram ainda descobertos exemplos destas moléculas contendo resíduos de D-aminoácidos com carga positiva que actuem em membranas ou como receptores; todos contêm L-aminoácidos catiónicos. Também não foi ainda detectada a presença de D-isoleucina, mas a D-*alo*-isoleucina<sup>88</sup> ocorre em alguns casos, o que sugere que se a sua formação se der a partir da L-isoleucina a alteração de conformação envolve os dois centros de quiralidade.

Saliente-se que nos organismos superiores não são usados, ou não se conhecem ainda, neuropéptidos com D-aminoácidos, como acontece no caso dos invertebrados. Este facto parece indicar a dificuldade dos primeiros inactivarem esse tipo de moléculas. É curioso notar que os neuropéptidos são bastante semelhantes aos péptidos antimicrobianos no que se refere à sua composição de aminoácidos, característica anfipática, carga catiónica e tamanho.<sup>89</sup> Este facto pode indicar que este tipo de estruturas tem desenvolvimentos próprios, mas tem uma matriz comum, sendo de salientar que as dermorfinas podem actuar como neuropéptidos e ainda como agentes antimicrobianos, Tabela 2.

É de esperar que o número de moléculas biológicas contendo resíduos com D-aminoácidos seja mais vasto e muitos não tenham sido ainda identificados pelas técnicas geralmente utilizadas, como é também admissível que em alguns casos as espécies detectadas sejam artefactos.<sup>90</sup> A substituição dos D-aminoácidos pelos L-aminoácidos correspondentes pode em alguns casos provocar alterações muito significativas na actividade das moléculas em que participam (por exemplo no caso da chamada NdWfamida a forma sintética com L-triptofano é cerca de 1000 vezes menos potente na contracção da aorta do que a forma natural contendo D-triptofano), mas noutros casos as diferenças de actividade são reduzidas, como acontece no caso da  $\omega$ -agatoxina IV, nas hormonas hipoglicémicas dos crustáceos ou nas bombininas H.<sup>48,91</sup> Este é, de facto, um domínio de investigação que se vem desenvolvendo progressivamente envolvendo todos os tipos de organismos, em alguns casos por motivos de ciência básica e noutros pelas aplicações importantes que têm sido descobertas, designadamente na área da terapia médica,<sup>90,92</sup> por exemplo o desenvolvimento de novos antibióticos eficazes contra estirpes resistentes aos actualmente utilizados, de anticoagulantes do sangue como as cicloteonamidas A e B extraídas da esponja *Theonella sp.*, e as hirutoninas -2 e -6 extraídas da sanguessuga *Hirudo medicinalis* que actuam como inibidores da enzima trombina podendo por isso reduzir os efeitos de trombose,<sup>93</sup> bem como de imunossupressores como a ciclosporina produzida pelo fungo *Tolypocladium inflatum*,<sup>94</sup> para além de outros produtos como, por exemplo, o alitame, um dipéptido formado por ácido L-aspartico e D-alanina, o qual é 2000 vezes mais doce que a sacarose e 10 vezes mais que o aspartame, sendo usado em alguns países como adoçante.

A importância crescente deste tema levou à publicação, no início de 2007, de um livro de revisão sobre D-aminoácidos,<sup>95</sup> que embora aborde outras questões, dá ênfase à sua determinação analítica.

## REFERÊNCIAS E NOTAS

- Orgel, L. E.; *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39*, 99.
- Zhang, Y.; Baranov, P. V.; Atkins, J. F.; Gladyshev, V. N.; *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20740.
- Não significa que sejam levógiros, isto é, causarem o desvio da luz polarizada para a esquerda. Esta classificação vem da comparação estrutural, que não se reflecte necessariamente na sua interacção com a luz polarizada, com a molécula quiral (aquelas que possuem um carbono ligado a grupos químicos todos diferentes, pelo que a sua estrutura não é sobreponível à sua imagem no espelho) do gliceraldeído. A designação advém da distribuição espacial dos grupos químicos em torno do carbono quiral, sendo L- ou D- para os aminoácidos, por analogia com o L-gliceraldeído ou o D-gliceraldeído, respectivamente.
- Caglioti, L.; Holczknecht, O.; Fujii, N.; Zucchi, C.; Palyi, G.; *Orig. Life Evol. Biosph.* **2006**, *36*, 459.
- Fujii, N.; Saito, T.; *Chem. Rec.* **2004**, *4*, 267.
- Hazen, R. M.; Filley, T. R.; Goodfriend, G. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 5487.
- Ball, P.; *Chemistry World* **2007**, *4*, 30.
- Nanita, S. C.; Cooks, R. G.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 554.
- Fuchs, S. A.; Berger, R.; Klomp, L. W. J.; de Koning, T. J.; *Mol. Genet. Metab.* **2005**, *85*, 168.
- Sistema de classificação das enzimas oficialmente adoptado no Brookhaven Protein Data Bank (PDB). EC 1.4.3.3 é uma oxidoreductase actuando sobre o grupo CH-NH<sub>2</sub> do doador tendo O<sub>2</sub> como receptor.
- Actualmente, segundo Wöese, adopta-se uma divisão dos organismos vivos em três domínios: archaea (arqueobactérias), bacteria (eubactérias) e eukaria. Os dois primeiros correspondem aos procariotas, isto é, não têm o material genético separado do resto da célula, e o último aos eucariotas (os restantes organismos unicelulares e os multicelulares). As eubactérias dividem-se em Gram-positivas e Gram-negativas. Esta designação é proveniente das respostas diferentes a um teste químico e estão associadas a aspectos estruturais das suas membranas celulares (as primeiras não apresentam uma segunda camada lipídica externa, diferentemente do que acontece com as Gram-negativas).
- Nagata, Y.; Fujiwara, T.; Kawaguchi-Nagata, K.; Fukumori, Y.; Yamana, T.; *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1998**, *1379*, 76.
- Matsumoto, M.; Homma, H.; Long, Z. Q.; Imai, K.; Iida, T.; Maruyama, T.; Aikawa, Y.; Endo, I.; Yohda, M.; *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 6560.
- Bruckner, H.; Westhauser, T.; *Amino Acids* **2003**, *24*, 43.
- A designação serina tem a sua origem na palavra latina *sericum*, isto é, seda, porque esta fibra é rica neste aminoácido.
- Srinivasan, N. G.; Corrigan, J. J.; Meister, A.; *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3844.
- Patzold, R.; Schieber, A.; Bruckner, H.; *Biom. Chromatogr.* **2005**, *19*, 466.
- Nagata, Y.; Higashi, M.; Ishii, Y.; Sano, H.; Tanigawa, M.; Nagata, K.; Noguchi, K.; Urade, M.; *Life Sci.* **2006**, *78*, 1677.
- Bruckner, H.; Hausch, M.; *J. Chromatogr.-Biomed. Appl.* **1993**, *614*, 7.
- Friedman, M.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3457.
- A penicilina G produzida pelos fungos (*Penicillium*) faz parte deste grupo e tem como matéria-prima precursora a D-valina.
- Perkins, H. R.; *Bacteriological Reviews* **1963**, *27*, 18.
- Asano, Y.; Lubbehusen, T. L.; *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, *89*, 295.
- de Jonge, B. L. M.; Gage, D.; Xu, N. X.; *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3151.
- Brogden, K. A.; *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238.
- Mangoni, M. L.; Papo, N.; Saugar, J. M.; Barra, D.; Shai, Y. C.; Simmaco, M.; Rivas, L.; *Biochemistry* **2006**, *45*, 4266.
- Fujii, N.; *Orig. Life Evol. Biosph.* **2002**, *32*, 103.
- Cotter, P. D.; O'Connor, P. M.; Draper, L. A.; Lawton, E. M.; Deegan, L. H.; Hill, C.; Ross, R. P.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 18584.
- Blaesse, M.; Kupke, T.; Huber, R.; Steinbacher, S.; *EMBO J.* **2000**, *19*, 6299.
- Blaesse, M.; Kupke, T.; Huber, R.; Steinbacher, S.; *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2003**, *59*, 1414.
- Kreil, G.; *Annu. Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 337.
- Jourdan, F.; Lazzaroni, S.; Mendez, B. L.; Lo Cantore, P.; de Julio, M.; Amodeo, P.; Iacobellis, N. S.; Evidente, A.; Motta, A.; *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **2003**, *52*, 534.

33. Neuhofer, T.; Schmieder, P.; Preussel, K.; Dieckmann, R.; Pham, H.; Bartl, F.; von Dohren, H.; *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 695.
34. Cudic, P.; Kranz, J. K.; Behenna, D. C.; Kruger, R. G.; Tadesse, H.; Wand, A. J.; Veklich, Y. I.; Weisel, J. W.; McCafferty, D. G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 7384.
35. <http://expasy.org/sprot/>, acessado em Abril 2008.
36. Lee, S. G.; Fischetti, V. A.; *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46649.
37. Pradel, E.; Zhang, Y.; Pujol, N.; Matsuyama, T.; Bargmann, C. I.; Ewbank, J. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 2295.
38. Montecucchi, P. C.; Decastiglione, R.; Piani, S.; Gozzini, L.; Erspamer, V.; *Int. J. Pept. Protein Res.* **1981**, *17*, 275.
39. Charpentier, S.; Amiche, M.; Mester, J.; Vouille, V.; Le Caer, J. P.; Nicolas, P.; Delfour, A.; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14690.
40. Boehning, D.; Snyder, S. H.; *Annu. Rev. Neurosci.* **2003**, *26*, 105.
41. D'Aniello, A.; Strazzullo, L.; *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 4237.
42. Hashimoto, A.; Kumashiro, S.; Nishikawa, T.; Oka, T.; Takahashi, K.; Mito, T.; Takashima, S.; Doi, N.; Mizutani, Y.; Yamazaki, T.; Kaneko, T.; Ootomo, E.; *J. Neurochem.* **1993**, *61*, 348.
43. Furuchi, T.; Homma, H.; *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1566.
44. Lazarus, L. H.; Bryant, S. D.; Cooper, P. S.; Salvadori, S.; *Progress in Neurobiology* **1999**, *57*, 377.
45. Auvynet, C.; Seddiki, N.; Dunia, I.; Nicolas, P.; Amiche, M.; Lacombe, C.; *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, *85*, 25.
46. Torres, A. M.; Tsampazi, M.; Tsampazi, C.; Kennett, E. C.; Belov, K.; Geraghty, D. P.; Bansal, P. S.; Alewood, P. F.; Kuchel, P. W.; *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1587.
47. Torres, A. M.; Tsampazi, C.; Geraghty, D. P.; Bansal, P. S.; Alewood, P. F.; Kuchel, P. W.; *Biochem. J.* **2005**, *391*, 215.
48. Morishita, F.; Nakanishi, Y.; Kaku, S.; Furukawa, Y.; Ohta, S.; Hirata, T.; Ohtani, M.; Fujisawa, Y.; Muneoka, Y.; Matsushima, O.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *240*, 354.
49. Sheeley, S. A.; Miao, H.; Ewing, M. A.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V.; *Analyst* **2005**, *130*, 1198.
50. Fujisawa, Y.; Ikeda, T.; Nomoto, K.; Yasudakamatani, Y.; Minakata, H.; Kenny, P. T. M.; Kubota, I.; Muneoka, Y.; *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol. & Endocrinology* **1992**, *102*, 91.
51. Yasuda-Kamatani, Y.; Kobayashi, M.; Yasuda, A.; Fujita, T.; Minakata, H.; Nomoto, K.; Nakamura, M.; Sakiyama, F.; *Peptides* **1997**, *18*, 347.
52. Fanjul-Moles, M. L.; *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **2006**, *142*, 390.
53. Buczek, O.; Yoshikami, D.; Watkins, M.; Bulaj, G.; Jimenez, E. C.; Olivera, B. M.; *FEBS J.* **2005**, *272*, 4178.
54. Pisarewicz, K.; Mora, D.; Pflueger, F. C.; Fields, G. B.; Mari, F.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6207.
55. Adams, M. E.; Mintz, I. M.; Reily, M. D.; Thanabal, V.; Bean, B. P.; *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44*, 681.
56. Zanolini, G.; Kobayashi, N.; Muneoka, E.; Zobeley, S.; Faulstich, H.; *Biochemistry* **1999**, *38*, 10723.
57. Gicquaud, C.; Pare, M.; *Biochem. Cell Biol.* **1992**, *70*, 719.
58. Kim, K. W.; Sugawara, F.; Yoshida, S.; Murofushi, N.; Takahashi, N.; Curtis, R. W.; *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **1993**, *57*, 787.
59. Miao, H.; Rubakhin, S. S.; Scanlan, C. R.; Wang, L. P.; Sweedler, J. V.; *J. Neurochem.* **2006**, *97*, 595.
60. Oliet, S. H. R.; Mothet, J. P.; *Glia* **2006**, *54*, 726.
61. Composto que se liga a um receptor produzindo uma resposta fisiológica.
62. Fraústo da Silva, J. J. R.; da Silva, J. A. L.; *A Química Inorgânica do Cérebro – os Elementos Químicos e o Sistema Nervoso Central*, Gradiva: Lisboa, 2008.
63. D'Aniello, A.; Di Fiore, M. M.; Fisher, G. H.; Milone, A.; Seleni, A.; D'Aniello, S.; Perna, A. F.; Ingrosso, D.; *FASEB J.* **2000**, *14*, 699.
64. D'Aniello, A.; Spinelli, P.; De Simone, A.; D'Aniello, S.; Branno, M.; Aniello, F.; Fisher, G. H.; Di Fiore, M. M.; Rastogi, R. K.; *FEBS Lett.* **2003**, *552*, 193.
65. Sato, M.; Inoue, F.; Kanno, N.; Sato, Y.; *Biochem. J.* **1987**, *241*, 309.
66. O D-aspartato participa também na actividade do sistema nervoso central do polvo mas admite-se que a sua proveniência seja resultante da alimentação.
67. Homma, H.; *Amino Acids* **2007**, *32*, 3.
68. Oguri, S.; Kumazaki, M.; Kitou, R.; Nonoyama, H.; Tooda, N.; *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **1999**, *1472*, 107.
69. Ingrosso, D.; Perna, A. F.; *EXS* **1998**, *85*, 119.
70. Fujii, N.; *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, *28*, 1585.
71. Fisher, G. H.; *EXS* **1998**, *85*, 109.
72. Young, K.; Seale, R. B.; Olsson, K.; Aislabie, J.; Cook, G. M.; *Polar Biol.* **2003**, *26*, 560.
73. Yoshimura, T.; Esaki, N.; *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *96*, 103.
74. Ashiuchi, M.; Kuwana, E.; Yamamoto, T.; Komatsu, K.; Soda, K.; Misono, H.; *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 39070.
75. Fujitani, Y.; Nakajima, N.; Ishihara, K.; Oikawa, T.; Ito, K.; Sugimoto, M.; *Phytochemistry* **2006**, *67*, 668.
76. Uo, T.; Yoshimura, T.; Shimizu, S.; Esaki, N.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *246*, 31.
77. de Miranda, J.; Panizzutti, R.; Foltyn, V. N.; Wolosker, H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 14542.
78. Sugihara, A.; Shimada, Y.; Sugihara, S.; Nakai, T.; Kakuno, T.; Nagao, T.; Watanabe, Y.; Tominaga, Y.; *J. Biochem.* **2002**, *131*, 247.
79. Sieber, S. A.; Linne, U.; Hillson, N. J.; Roche, E.; Walsh, C. T.; Marahiel, M. A.; *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 997.
80. Balibar, C. J.; Vaillancourt, F. H.; Walsh, C. T.; *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1189.
81. Heck, S. D.; Siok, C. J.; Krapcho, K. J.; Kelbaugh, P. R.; Thadeio, P. F.; Welch, M. J.; Williams, R. D.; Ganong, A. H.; Kelly, M. E.; Lanzetti, A. J.; Gray, W. R.; Phillips, D.; Parks, T. N.; Jackson, H.; Ahlijanian, M. K.; Saccomano, N. A.; Volkmann, R. A.; *Science* **1994**, *266*, 1065.
82. <http://www.brenda.uni-koeln.de>, acessado em Abril 2008.
83. Pollegioni, L.; Piubelli, L.; Sacchi, S.; Piloni, M. S.; Molla, G.; *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1373.
84. Yow, G. Y.; Uo, T.; Yoshimura, T.; Esaki, N.; *Arch. Microbiol.* **2006**, *185*, 39.
85. Hochner, B.; Shomrat, T.; Fiorito, G.; *Biol. Bull.* **2006**, *210*, 308.
86. Ryttersgaard, C.; Griffith, S. C.; Sawaya, M. R.; MacLaren, D. C.; Clarke, S.; Yeates, T. O.; *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 10642.
87. Ferri-Fioni, M. L.; Fromant, M.; Bouin, A. P.; Aubard, C.; Lazennec, C.; Plateau, P.; Blanquet, S.; *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 27575.
88. Aminoácidos que têm mais do que um carbono quiral, isto é, no grupo R, referindo-se a alo ao isômero correspondente ao segundo carbono assimétrico.
89. Brogden, K. A.; Guthmiller, J. M.; Salzet, M.; Zasloff, M.; *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 558.
90. Mitchell, J. B. O.; Smith, J.; *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **2003**, *50*, 563.
91. Jilek, A.; Mollay, C.; Tippelt, C.; Grassi, J.; Mignogna, G.; Mullegger, J.; Sander, V.; Fehrer, C.; Barra, D.; Kreil, G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 4235.
92. As peculiaridades das moléculas contendo resíduos D- advêm de estes serem mais resistentes à quebra catalítica do que os L-, dado serem necessárias enzimas específicas.
93. Zdanov, A.; Wu, S.; Dimagio, J.; Konishi, Y.; Li, Y.; Wu, X. J.; Edwards, B. F. P.; Martin, P. D.; Cygler, M.; *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **1993**, *17*, 252.
94. Maryanoff, B. E.; Zhang, H. C.; Greco, M. N.; Glover, K. A.; Kauffman, J. A.; Andradegordon, P.; *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1025.
95. *D-Amino Acids: A New Frontier in Amino Acids and Protein Research*; Konno, R.; Fujii, N.; Homma, H.; Brückner, H.; Fisher, G.; D'Aniello, A., eds.; Nova Science, Inc.: Hauppauge, 2007.