



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

COBRE: FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

Trabalho submetido por
Catarina Salgueiro de Magalhães Gomes
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2016



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

COBRE: FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA

Trabalho submetido por
Catarina Salgueiro de Magalhães Gomes
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professor Doutor Jorge Fonseca

Outubro de 2016

*“Para ser grande sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes”
Ricardo Reis*

Agradecimentos

Quero agradecer a todos os que contribuíram com apoio moral e amizade para o desenvolvimento desta monografia. Um agradecimento cheio de amor e carinho à minha família por sempre me motivarem a ser melhor e nunca desistir dos meus objectivos, particularmente à minha mãe, Maria Eduarda, por toda a compreensão, paciência, tempo e amor que me dedicou sempre que precisei.

Agradeço especialmente os meus avós maternos, Eduarda e Manuel que apesar de já não estarem aqui para me verem terminar o curso, sempre me motivaram e investiram em mim para me formar em Ciências Farmacêuticas.

Um agradecimento muito especial ao meu “partner in life”, Francisco, por todo o apoio emocional, todo o companheirismo e amor que me dedica todos os dias, mesmo nos menos bons.

Obrigado aos meus amigos Pedro, Rui e Joana por toda a amizade e espírito positivo.

Agradeço, ainda, ao Spike, o meu cão por ter estado sempre a meu lado (literalmente), nunca permitindo que me sentisse sozinha.

Por fim, mas não menos importante, agradeço ao Professor Doutor Jorge da Fonseca por toda a compreensão, disponibilidade e orientação que tão amavelmente me deu.

Queria ainda referir, um agradecimento generalizado, a todos os investigadores que permitem que as suas publicações estejam disponíveis gratuitamente permitindo o evoluir da ciência e do conhecimento.

Resumo

Todos os organismos necessitam de cobre para a sua sobrevivência e desenvolvimento. O cobre é um micronutriente essencial aos humanos e está envolvido em várias funções fisiológicas, sendo indispensável manter o seu equilíbrio homeostático. Existe no organismo em dois estados de oxidação, Cu^+ e Cu^{2+} e é esta dualidade e capacidade de aceitar ou doar elétrons facilmente que o implica como um elemento preponderante nas reações de oxidação-redução, as quais podem dar origem a radicais livres e aos danos celulares a eles associados.

O cobre funciona como cofator de algumas enzimas que estão envolvidas em alguns processos fisiológicos importantes como a respiração celular, produção de energia, manutenção do tecido conjuntivo e neurotransmissão.

A principal fonte de Cu é a dieta alimentar, podendo a deficiência em cobre ser provocada por problemas de má nutrição, de absorção ou por excesso de outros elementos (zinco), casos de toxicidade alimentar por Cu são raros. Desequilíbrios na quantidade de Cu ingerida podem provocar alterações no sistema imunitário, na manutenção do tecido conjuntivo e neurodegeneração.

Algumas doenças estão associadas a mutações genéticas que alteram o metabolismo do cobre provocando situações de deficiência, doença de Menkes e síndrome de Corno Occipital ou de acumulação de Cu nos tecidos, doença de Wilson.

Palavras-chave: cobre, metabolismo do cobre, enzimas cuprodependentes, excesso cobre, toxicidade cobre, doença de Menkes e doença de Wilson

Abstract

All organisms require copper for their survival and development. Copper is an essential micronutrient for humans and is involved in various physiological functions, being a key element to maintain its homeostatic balance. It exists in the body in two oxidation states of Cu^+ and Cu^{2+} and it is this duality, and ability to accept or donate electrons easily which involves Cu as a key element in oxidation-reduction reactions, which may give rise to free radicals and cellular damage associated with them.

Copper has functions as a cofactor for some enzymes that are involved in some important physiological processes such as cell respiration, energy generation, maintenance of connective tissue and neurotransmission.

The main source of Cu is the diet, the copper deficiency may be caused by malnutrition problems, absorption or excess of other elements (zinc), cases of food toxicity by Cu are rare. Imbalances in the ingested amount of Cu may cause changes in the immune system, maintenance of connective tissue and neurodegeneration.

Some diseases are associated with genetic mutations that alter the metabolism of copper deficiency causing situations, Menkes disease and occipital horn syndrome or Cu accumulation in tissues, Wilson's disease.

Keywords: copper, copper metabolism, cuproenzymes, excess copper, copper toxicity, Menkes' disease and Wilson's disease

Índice Geral

| | |
|--|-----------|
| Resumo | 1 |
| Abstract | 2 |
| Índice Geral | 3 |
| Índice de figuras | 6 |
| Índice de tabelas | 7 |
| Lista de abreviaturas | 8 |
| 1. Introdução | 10 |
| 2. Desenvolvimento | 13 |
| Cobre - Identificação do elemento | 13 |
| O cobre na Natureza | 14 |
| Factos Históricos | 15 |
| Papel biológico do cobre | 17 |
| Fontes de cobre | 19 |
| Quantidade de cobre necessária ao organismo | 20 |
| Homeostase e Metabolismo | 21 |
| Enzimas cupro-dependentes (Cuproenzimas) | 23 |
| Amino-oxidases | 25 |
| Ferroxidases | 26 |
| Proteínas (não enzimáticas) que se ligam ao cobre | 27 |
| Componente essencial para a expressão genética | 29 |
| Absorção e biodisponibilidade | 31 |
| Interações com outros nutrientes | 33 |
| Zinco | 33 |
| Ferro | 34 |
| Ácido Ascórbico | 34 |
| Molibdénio | 34 |
| Hidratos de Carbono | 35 |
| Transporte e Distribuição | 36 |
| Distribuição intracelular de cobre | 45 |
| ATPases: ATP7B e ATP7A, CTR1 e <i>Chaperons</i> | 48 |
| Excreção | 51 |

| | |
|---|-----------|
| Fisiopatologia e aspetos clínicos da carência e excesso de Cobre | 51 |
| Fatores que condicionam a deficiência em cobre | 51 |
| Saúde materna e desenvolvimento fetal | 53 |
| Ossos e na pele | 54 |
| Sistema Nervoso e cérebro | 55 |
| Doença de Alzheimer | 57 |
| Doenças de Parkinson | 58 |
| Stress oxidativo | 59 |
| Doença cardiovascular | 60 |
| Mielopatia | 61 |
| Priões | 62 |
| Diabetes Mellitus | 63 |
| Angiogénese e cancro | 64 |
| Resposta Inflamatória | 65 |
| Toxicidade | 66 |
| Toxicidade aguda | 66 |
| Toxicidade crónica | 67 |
| Mecanismos de toxicidade | 67 |
| Danos oxidativos induzidos por radicais livres | 68 |
| Alteração do metabolismo lipídico | 69 |
| Alteração na expressão de genes hepáticos | 69 |
| Alteração da α -sinucleína | 70 |
| Alterações na ativação da esfingomielinase ácida | 70 |
| Alteração na distribuição hepática de Cu | 70 |
| Alteração da interação proteína-metal | 71 |
| Erros genéticos no metabolismo do cobre | 72 |
| Doença de Wilson | 72 |
| Mutações no gene ATP7B | 73 |
| Genes Modificadores e Diversidade de fenótipos | 74 |
| Manifestações Clínicas | 75 |
| Tratamento | 76 |
| Doença de Menkes | 78 |
| Patologia da Doença de Menkes | 79 |
| A síndrome do corno occipital | 80 |

| | |
|--|-----------|
| Mutações no gene para ATP7A | 81 |
| Relação das mutações com os diferentes fenótipos | 82 |
| Tratamento | 82 |
| 3. Conclusão | 85 |
| Bibliografia | 89 |
| Anexos | 98 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Modelo da transcrição regulada pelo cobre | 31 |
| Figura 2. Transporte e distribuição do cobre em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 41 |
| Figura 3. Modelo da absorção e transporte de Cu ao nível dos órgãos e tecidos | 42 |
| Figura 4. Iões de cobre no meio intercelular | 50 |
| Figura 5. Radiografias de indivíduos com corno occipital | 81 |
| Figura 6. Cabelo de um bebé de 3 meses com doença de Menkes | 83 |

Índice de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Estados Oxidativos do Cobre | 13 |
| Tabela 2. Funções fisiológicas do cobre | 18 |
| Tabela 3. Doses diárias de cobre consoante a idade | 21 |
| Tabela 4. Enzimas cupro-dependentes e respetiva função biológica | 23 |
| Tabela 5. Fatores de transcrição dependentes do cobre | 30 |
| Tabela 6. Fatores que influenciam a absorção de cobre no trato-gastrointestinal | 36 |
| Tabela 7. Locais de armazenamento do cobre | 44 |
| Tabela 8. Evidências da participação do cobre na patogénese de doença de Alzheimer e da doença de Parkinson | 59 |
| Tabela 9. Tratamento farmacológico da doença de Wilson | 78 |
| Tabela 10. Sintomas associados ao decair da atividade enzimática na doença de Menkes | 80 |
| Tabela 11. Papel do cobre em algumas perturbações neurológicas | 84 |

Lista de abreviaturas

2CuCO₃.Cu(OH)₂ - Azurite

8-HQ - Oito-Hidroxiquinolina

a.C - antes de Cristo

ADN - Ácido desoxirribonucleico

CO₃²⁻ – Carbonato (sal de ácido carbónico)

COX - Citocromo-C Oxidase

Cu - Cobre

Cu¹⁺ - ião cuproso

Cu²⁺ - ião cúprico

Cu³⁺ - ião trivalente de cobre

2CO₃.Cu(OH)₂ – malachite

Cu₂O - cuprite ou óxido cuproso

Cu₅FeS₄ – bornite

CuFeS₂ – calcopirite

CuS₂ – calcocite

DA - Doença de Alzheimer

DBH - Dopamina-β-hidroxilase

DDR - Dose diária recomendada

DP - Doença de Parkinson

E.hirae - *Enterococcus hirae*

ELA - Esclerose Lateral Amiotrófica

Fe – Ferro

H₂O - molécula de água

H₂O₂ - peróxido de hidrogénio

HCL - Ácido clorídrico

K_m - Constante de Michaelis

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade

Mb – Molibdénio

MNK - Proteína de Menkes

Mts – Metalotioneínas

OH⁻ - Radical hidroxilo

PAM - Peptidilglicina- α -amina-monooxigenase

QBP- Pro-quelante não tóxico

S – Enxofre

SCO - Síndrome do corno occipital

SNC - Sistema nervoso central

SO₄²⁻ - anião sulfato

SOD - Superóxido Sismutase

TGN - Trans-Golgi *network*

WND - Proteína de Wilson

Zn - Zinco

1. Introdução

O cobre é um metal extraído da terra, conhecido e trabalhado pelo Homem desde os tempos pré-históricos, entre sete a dez mil anos atrás. Desde então, tem sido vital para o progresso da nossa civilização, contribuindo para o desenvolvimento social e tecnológico. Várias das suas propriedades são úteis para o funcionamento da nossa sociedade, tais como: condutividade elétrica e, mais recentemente, foram reconhecidas no cobre propriedades antimicrobianas, sendo usado como material constituinte de superfícies hospitalares, diminuindo significativamente o desenvolvimento de bactérias. (www.copperallience.org.uk)

Hoje em dia, o cobre contribui significativamente para o desenvolver de energias renováveis, de tecnologias da comunicação, arquitetura e saúde. A sua produção e utilização são, então, uma parte essencial da nossa economia. O cobre é, simplesmente, essencial para a nossa vida, enquanto parte de uma civilização em constante evolução.

O cobre, para além de ser essencial à nossa vida enquanto sociedade em constante desenvolvimento, é também, essencial à nossa vida enquanto organismo vivo. Contudo, só no início do século XX é que surgiu o interesse pelo cobre como elemento constituinte do nosso metabolismo, necessário para uma vida saudável.

Em 1912, Dr. Kinner Wilson descreveu pela primeira vez uma doença que afetava os mais jovens, em que o principal sintoma consistia numa perda de controlo dos movimentos e, conseqüente, contração dos membros. Este sintoma estaria sempre associado a sinais de fibrose do fígado. Os pacientes com estes sintomas acabariam por morrer alguns meses depois, ficando esta patologia conhecida como a Doença de Wilson. (Bentham e Books, A Quest for a Cure, UK, University of Cambridge, John Walshe)

Só mais tarde, em 1948, o Professor John Cumings, ao trabalhar no mesmo hospital que o Dr. Wilson, descobriu que os pacientes que morriam da doença de Wilson tinham todos associados à já conhecida fibrose do fígado, quantidades excessivas de cobre depositadas no cérebro e fígado.

Desde então, o comportamento bioquímico do cobre tem vindo a ser estudado e avaliado pois são lhe atribuídas funções essenciais à vida.

O cobre foi identificado pela primeira vez como parte dos organismos vivos, em 1816 por Bucholtz nas cinzas de plantas. Só 14 anos depois Sarzeau identificou cobre no sangue de mamíferos – neste caso específico, em sangue de boi – contudo, este resultado não foi considerado relevante ou definitivo, pois foi sugerida a hipótese desta presença de cobre no sangue do animal dever-se a uma contaminação pelos nutrientes do solo.

Apesar disto, os estudos relativamente à presença de cobre em organismos vivos bem como às suas possíveis funções continuaram. Em 1847 e 1878 Harless e Frederiq identificaram cobre em moluscos, entre eles, no polvo. Mas só no século seguinte, em 1921, Badansky finalmente identificou cobre no cérebro humano e foi proposto, com carácter definitivo, que este elemento metálico desempenharia funções importantes e vitais em processos bioquímicos. (Sargentelli et al 1996)

A importância biológica e estrutural do cobre em animais e humanos é, definitivamente, reconhecida e relaciona-se com funções metabólicas cupro-dependentes, ou seja, o seu correto e eficaz funcionamento depende da existência de cobre e da sua ligação ao mesmo. Enzimas como a citocromo-oxidase, a superóxido dismutase citosólica, a tirosinase e a ceruloplasmina são exemplos de enzimas cupro-dependentes.

Estas enzimas catalizam importantes reacções fisiológicas relacionadas com a fosforilação oxidativa, inactivação de radicais livres, biossíntese de cologénio e elastina, formação de melanina, coagulação sanguínea, metabolismo do ferro e síntese de catecolaminas. (Danks 1988)

Para além destas funções, estudos mais recentes visam explorar a toxicidade inata do cobre como agente antimicrobiano. Infecções microbianas resistentes exigem novas opções terapêuticas, assim estes estudos apresentam uma abordagem que permite explorar duas estratégias da resposta antimicrobiana por parte das células imunitárias humanas: o “burst oxidativo” (que envolve a formação de várias espécies reativas de oxigénio) e a “compartimentalização” de cobre dentro dos fagolisossomas (organelo membranar que se forma quando um fagossoma se funde com um lisossoma. As partículas alimentares ou os agentes patogénicos contidos dentro do fagossoma são normalmente digeridos por enzimas contidas no lisossoma).

As espécies reativas de oxigénio produzidas durante o “burst oxidativo” vão transformar o QBP – um pro-quelante não tóxico – em 8-HQ (8-Hidroxiquinolina), induzindo a morte “cupro-dependente” do patogénio. Visto que, a molécula de 8-HQ tem características que lhe permitem transportar iões através de membranas celulares, aumenta a quantidade de Cu^{2+} intracelular, ultrapassando a capacidade de resistência do patogénio ao cobre. A atividade antimicrobiana e fungicida Cu-dependente de 8-HQ contra um determinado espectro de patogénicos sugere que esta estratégia pode ser uma nova abordagem bastante útil no combate a várias infeções. (Festa 2014) (Cavet 2014)

O objetivo desta monografia é fazer uma revisão bibliográfica da fisiologia e fisiopatologia associadas ao cobre, tendo em consideração a sua bioquímica, o seu metabolismo no corpo humano e as consequências do seu excesso ou carência.

2. Desenvolvimento

Cobre - Identificação do elemento

O cobre pertence ao grupo de elementos metálicos que são necessários ao desenvolvimento saudável dos seres humanos.

Na tabela periódica pertence ao grupo dos metais de transição, localizando-se no 11º Grupo e 4º Período da Tabela (Anexo 1). Tem como símbolo químico Cu e o seu número atômico é o 29. A massa atômica do cobre é cerca de 63,55 unidades de massa atômica. (www.copperalliance.uk)

Possui quatro estados de oxidação: Cu^0 , Cu^{+1} , Cu^{2+} e Cu^{3+} , o que significa que tem quatro estados de valência que influenciam a sua biodisponibilidade e toxicidade. Para além destes estados de oxidação, consegue formar compostos organometálicos.

O isótopo mais comum e o mais abundante é ^{63}Cu (69.17%) seguido do isótopo ^{65}Cu (30.83%). Sendo a gama de isótopos estáveis limitada e a sua distribuição comum pela crosta terrestre é difícil realizar estudos sobre a concreta distribuição destes isótopos. ^{64}Cu e ^{67}Cu são isótopos radioativos do cobre com tempo de meia-vida aproximadamente de 12.7 e 61.9 horas, respetivamente; no seu decaimento radioativo produzem partículas β (beta) e raios gama, sendo úteis em estudos no âmbito da Física e da Biologia. (ECH 200,1998)

A configuração eletrónica da forma metálica – Cu^0 – é $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4p^1$, e dos seus estados de oxidação mais comuns são o cuproso – ($\text{Cu(I)} 3d^{10}$) e o cúprico ($\text{Cu(II)} 3d^9$). A química deste elemento, especialmente em sistemas biológicos é profundamente afetada pelo seu estado de oxidação. A grande capacidade de mudar de estado de oxidação atribui a este elemento propriedades oxidação-redução (redox) essenciais para o funcionamento dos sistemas biológicos.

Tabela 1. Estados Oxidativos do Cobre, adaptado de EHC 200, 1998

| Estado Oxidativo | Cobre | Factos |
|------------------|-----------------|--|
| Cu | Sólido Metálico | - Metal castanho alaranjado - Maleável - Bom condutor térmico e elétrico - Existe na Natureza |
| Cu^{1+} | Ião cuproso | - Instável em pH neutro - Oxida para Cu^{2+} com muita facilidade |
| Cu^{2+} | Ião cúprico | - Estado de oxidação mais importante, é o que predomina nos sistemas biológicos |
| Cu^{3+} | Ião trivalente | -Encontra-se apenas em alguns compostos - Forte agente oxidante |

O estado de oxidação mais importante em ambiente natural é o Cu(II), qualquer Cu(I) é rapidamente oxidado em Cu(II) através de um agente oxidante presente a não ser que esteja estabilizado pela formação de algum complexo.

O íon Cu(II) liga-se, preferencialmente, via oxigênio, a ligandos inorgânicos como a água (H₂O), OH⁻, CO₃²⁻, SO₄²⁻. Através de ácidos fenólicos e grupos carboxílicos une-se a compostos orgânicos, sendo estes complexos os mais comuns.

Muitos compostos cúpricos são solúveis em água, dando-lhe uma cor azul esverdeada. A forma trivalente do cobre, o íon Cu³⁺, é um forte agente oxidante sendo os seus complexos pouco comuns. O íon cúprico, Cu²⁺, tem a capacidade de absorver vários óxidos metálicos como o ferro, o alumínio e o manganês. As propriedades físico químicas do cobre e de alguns dos seus sais encontram-se resumidas no Anexo 2.

O cobre na Natureza

Na crosta terrestre o cobre na sua forma nativa, ou seja, no seu estado puro, ocupa a percentagem de 0.006 (Lide e Frederikse, 1993) e nos oceanos a concentração de cobre é aproximadamente 2.4x10⁻⁴ mg/Litro. Encontra-se naturalmente em alguns minerais como a cuprite ou óxido cuproso (Cu₂O), malachite (Cu₂CO₃.Cu(OH)₂), azurite (2CuCO₃.Cu(OH)₂), calcopirite (CuFeS₂), calcocite (CuS₂) e a bornite (Cu₅FeS₄).

Assim, o cobre existe na Natureza na sua fórmula metálica em minérios e minerais, muitos deles utilizados pelo Homem. É um metal de cor castanho-alaranjado, maleável, excelente condutor térmico e elétrico. A forma metálica do cobre é bastante estável ao ar desde que sem humidade e a baixas temperaturas mas na presença de humidade ocorre uma reação que origina produtos como hidroxicarbonato ou hidroxissulfatos que formam uma película esverdeada na superfície do cobre metálico que protege o metal subjacente de um ataque mais profundo. O cobre metálico é moderadamente solúvel em água, soluções básicas e ligeiramente ácidas, mas é totalmente dissolvido em soluções de ácido nítrico e soluções de ácido sulfúrico, bem como em soluções básicas de hidróxido de amónio, carbonato de amónio.

Contudo, encontramos este elemento como sendo parte essencial, em baixas concentrações, para o desenvolvimento de animais e plantas. Devido a esta característica é considerado um oligoelemento.

Nas plantas é essencial, em pequenas quantidades, para o seu crescimento. É um componente essencial de muitas proteínas presentes nas plantas – as metaloproteínas - que compõem enzimas reguladoras de vários processos bioquímicos. Estas enzimas participam na produção de sementes e de clorofila. Intervêm, também, em processos de

resistência das plantas, protegendo-as contra fungos e outras doenças. O cobre é absorvido pela planta na sua forma Cu^{2+} e unido a um quelato. (Bowen 1969)

Os quelatos de cobre (Cu-quelato) são formas que ocorrem a partir de uma reação química; é composto por carbonato de cobre e uma proteína hidrolisada da soja, sendo usado como adubo. Os agentes quelantes vão aumentar os benefícios naturais ao cobre e ajudar na sua absorção. Em excesso o cobre pode ter efeitos letais no crescimento da planta.

Nos animais o cobre participa em vários processos de desenvolvimento do organismo: metabolização do ferro por enzimas cupro-dependentes, formação de elastina e de colagénio, que constituem proteínas presentes em várias partes do corpo dos animais, como a pele, o pelo, a lã e vasos sanguíneos.

O cobre é ainda transportado do fígado para os órgãos periféricos pela ceruloplasmina que armazena este elemento mantendo a sua homeostase.

Cerca de 90% do cobre no plasma dos mamíferos está na forma de metaloproteínas e ceruloplasmina. (Ortulani, E.L. 2002)

Factos Históricos

A utilização de cobre pelo Homem data de há mais de 8000 anos a.C. na região do mar Egeu (Grécia), onde o cobre servia para fabricar vários tipos de utensílios e ferramentas. A palavra cobre tem origem no latim Cuprum, derivada de Cyprum, que significa “proveniente da ilha de Chipre”, local de onde vinha a grande maioria deste metal. (Richard Beaty).

Contudo, a relevância fisiológica do cobre para os animais e humanos é conhecida há, praticamente, um século.

O cobre foi identificado pela primeira vez em animais e plantas no século XIX. Bucholtz e mais tarde Meissner detetaram a sua presença nas cinzas de plantas e Sarzeau encontrou cobre no sangue de boi.

A hipótese de que animais de grande porte necessitariam de cobre para se manterem saudáveis surgiu a partir da hemocianina – proteína que transporta o oxigénio nos invertebrados – visto esta conter cobre na sua composição química.

A curiosidade pela importância deste metal nos organismos vivos foi aumentando e ao longo dos anos novos estudos permitiram desvendar e estabelecer muitas das suas funções biológicas, nomeadamente no ser humano. Em 1921, Badansky identificou cobre no cérebro, considerando-se então a hipótese de que o cobre desempenharia funções catalisadoras em processos bioquímicos. (Vagner Sargentelli). Contudo, só em 1928 Hart

et. al ao testarem vários elementos inorgânicos, verificaram que em relação ao cobre, uma dieta rica neste oligoelemento fazia aumentar os níveis de hemoglobina nos ratinhos. Tendo sido capazes de tratar uma anemia com cinzas de animais e/ou vegetais, sugerindo que o sulfeto de hidrogénio ou ácido sulfídrico precipitaria nas cinzas e como contém sulfeto de cobre a recuperação desta anemia foi possível.

Este facto sugeria que o cobre seria um elemento essencial para a formação de eritrócitos. O resultado foi considerado interessante, aumentando a curiosidade em relação ao cobre, visto que este não fazia parte da composição química dos eritrócitos. Então, Elvehjem em 1938 propôs que o cobre seria apenas essencial para a síntese de hemoglobina dos ratinhos. Após ter sido reconhecida esta importância do cobre nos ratinhos, os estudos avançaram para tentar perceber e desvendar as suas funções nos humanos.

Em 1944, Cartwright e Wintrobe iniciaram uma investigação reunindo um grupo de indivíduos saudáveis entre os 17 e os 45 anos a fim de perceber o metabolismo do cobre na fisiologia humana. (Wintrobe et al. 1952) O estudo permitiu perceber que o cobre está, de facto, presente em processos metabólicos dos humanos. Conseguiram estimar a quantidade de cobre que seria absorvida por dia, a quantidade excretada pelas diferentes vias de excreção e a quantidade presente nos diferentes órgãos. Estas quantidades estimadas foram feitas a partir do isolamento da ceruloplasmina – enzima que transporta o cobre e que circula no plasma.

Ao longo do tempo foram ainda sendo descritas doenças genéticas provocadas por alterações no metabolismo do cobre, como a doença de Wilson e a doença de Menkes. A doença de Wilson foi descrita pela primeira vez em 1912, adquirindo o nome do neurologista que a definiu - Dr. Kimmer Wilson que relacionou a sintomatologia básica da doença, já previamente identificada em 1883 por Wheshthal - como uma doença do fígado, provocada por uma degeneração lenticular progressiva. A doença de Menkes foi descrita em 1962 por John Hans Menkes como uma degeneração do sistema nervoso devido à deficiência de cobre.

Todos estes estudos e descobertas, bem como o próprio desenvolvimento da ciência e dos métodos de investigação, permitiram ao longo do tempo estabelecer o papel biológico do cobre, o seu metabolismo e interpretar as reacções do nosso organismo à sua falta e/ou ao seu excesso (toxicidade).

Papel biológico do cobre

O cobre é essencial para todos os organismos, incluindo plantas, leveduras, mamíferos e os humanos. É um elemento que existe naturalmente nos ecossistemas, tendo a capacidade única de adotar quatro estados de oxidação: Cu^0 , Cu^+ , Cu^{+2} e Cu^{+3} , sendo os mais relevantes no seu papel biológico o Cu^+ e Cu^{+2} .

Os seres vivos, em especial os seres humanos, desenvolveram mecanismos para gerir e utilizar o aporte de cobre. Este oligoelemento não é produzido ou armazenado no organismo, logo tem de ser obtido através dos alimentos e da água ingerida, como parte de uma dieta equilibrada, e quando necessário, através de suplementos alimentares.

Os nossos sistemas digestivos estão preparados para assimilar a quantidade necessária de cobre. A homeostase, conceito definido em 1939 por Walter Cannon, permite a manutenção de um meio interno constante, através de um cuidadoso sistema fisiológico que se opõe à mudança. A este equilíbrio está inerente a contribuição de favorável do meio ambiente na manutenção funcional das células, fornecendo-lhe os nutrientes, oxigénio, água, minerais essenciais e oligoelementos, onde se inclui o cobre. Assim, todas as células do organismo utilizam virtualmente o cobre, sendo vital para a saúde e desenvolvimento desde o estado fetal até à idade mais avançada. Sem este oligoelemento, o organismo não conseguiria funcionar normalmente e os indivíduos não seriam saudáveis.

Tabela 2. Funções fisiológicas do cobre, adaptado de www.copperalliance.org.uk/copperandsociety/health

| Órgão ou Sistema | Função Fisiológica do Cobre |
|-----------------------------|--|
| Cérebro e o Sistema Nervoso | É crucial para o funcionamento normal do cérebro e do sistema nervoso. Participa na origem/criação de novos neurotransmissores, os mensageiros químicos que permitem a comunicação entre células e o movimento dos impulsos elétricos ao longo das mesmas |
| Ossos | Tem um papel vital na formação de colagénio, logo é essencial na formação e reparação de tecido ósseo. O colagénio é o principal fator para a rigidez, força mecânica e funcionalidade dos ossos. De fato, algumas fraturas ósseas, deficiências no esqueleto e osteoporose podem ser atribuídas à deficiência de cobre. |
| Vasos sanguíneos e Coração | Ajuda a suportar a elasticidade dos vasos sanguíneos, o que permite manter a pressão sanguínea com valores normais. Contribui para que as principais artérias e veias funcionem na sua plenitude através da manutenção da sua estrutura elástica. |
| Pele | Desempenha um papel essencial na formação de colagénio, tecido conectivo da pele. O colagénio é a proteína com maior presença na pele humana, essencial para que esta se mantenha com um aspeto saudável. |
| Sistema Imunitário | É necessário para manter um sistema imunitário saudável de modo a que este consiga proteger o organismo de patógenos e prevenir doenças. |

O cobre assegura a comunicação eficaz entre as células nervosas. Alguns estudos mencionam a importância do cobre para que esta comunicação se mantenha eficaz. Segundo David R. Brown em *Neurodegeneration and Prion Disease* existem evidências de uma relação entre o cobre e a PrP – Proteína resistente à protease ou Proteína Prião – que é expressa predominantemente no sistema nervoso com função neuroprotectora. Parecem existir várias evidências de uma relação funcional entre o cálcio, o cobre e esta proteína necessária ao decorrer das sinapses nervosas. Possivelmente, desempenha várias funções essenciais participando na endocitose e no transporte de cobre. Durante a atividade sináptica intensa a concentração de cobre dentro da fenda sináptica aumenta sendo libertado durante a sinapse, isto pode acontecer porque o cobre na sua forma Cu^{2+} , como é fracamente oxidado, liga-se à proteína (PrP) e uma vez ligados o cobre assume uma função catalisadora permitindo que ocorra a dismutação de radicais de oxigénio, devido à redução de Cu^{2+} a Cu^+ . Sendo esta uma das principais fontes de radicais livres nas sinapses.

Por outro lado, de modo a manter o equilíbrio, esta proteína tem uma função neuroprotectora desde que esteja ligada ao cobre. Esta ligação PrP-Cu oferece proteção contra a toxicidade dos radicais livres e contra o *stress* oxidativo.

O cobre é também essencial para o desenvolvimento cerebral fetal e para o crescimento pós-natal. Bem como, para a saúde e funcionalidade cerebral durante a vida, promovendo uma defesa antioxidante. Mantém a comunicação eficaz entre as células nervosas. Ajuda a pele a manter-se saudável permitindo a conectividade entre os tecidos, intervém na cicatrização de feridas e lesões. Desempenha um importante papel em manter a integridade e funções dos vasos sanguíneos e coração, ajudando no crescimento de novos vasos e em manter a estrutura funcional das células sanguíneas. Intervém na formação de novas células que compõem o sistema imunitário, contribuindo para uma resposta imunitária eficaz. Atua no metabolismo da mitocôndria, participando na geração e armazenamento de energia.

Fontes de cobre

A ingestão de cobre é a principal forma de exposição a este oligoelemento por parte dos seres humanos. Todas as outras formas de captação de cobre, como a inalação e a adsorção, são muito baixas em comparação à ingestão oral.

Alguns alimentos são especialmente ricos em cobre: nozes, sementes de girassol e papoila, grão-de-bico, fígado e rins de alguns animais e bivalves, como as ostras. Outros alimentos, cereais, carne e peixe, contem a quantidade suficiente de cobre para fornecer metade da dose diária necessária. O chocolate negro, legumes (espinafres e lentilhas), ajudam a completar a dose diária de cobre. (WHO2004)

A concentração de cobre nestes alimentos (de origem animal e vegetal) é influenciada pelas condições locais. (Bo Lonnerdal, 1996) A concentração de cobre nos alimentos varia, então, de zona para zona, estando dependente das condições de cultivo: solo, água, uso de fertilizantes e fungicidas; tipo de processamento e utilização do produto, pH, embalagem e utensílios usados em fábrica (que podem conter cobre e ocorrer algumas transferências). (Pedroso e Lima 2001)

Mas, como já foi referido, alguns alimentos são sempre ricos em cobre, como é o caso das vísceras (rins e fígado) de bovinos e porcos e alguns cereais e frutos, dos quais se destacam sementes de girassol, pão integral e ameixas. O chocolate negro é outro alimento que nos ajuda a satisfazer a dose diária necessária de cobre, outros alimentos como os lacticínios apresentam sempre valores vestigiais deste elemento.

Uma outra fonte de cobre que deve ser considerada é a água potável, ingerida pelo organismo como fonte de hidratação. A quantidade/concentração de cobre na água potável varia de acordo com os lençóis freáticos e o solo de onde provêm. Concentrações superiores a 5mg/L tornam a água amarga. A água potável deve, idealmente, ter um sabor agradável, fresco, ser incolor e inodora sendo essencial assegurar estas características. Para isto é necessário uma constante atenção à manutenção das tubagens metálicas que fazem a distribuição da água potável porque, na maioria das situações, é neste momento que a quantidade deste mineral aumenta da água.

Quantidade de cobre necessária ao organismo

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), a ingestão média de cobre através da dieta varia, normalmente, entre os 0.9 e 2.7 miligramas por dia. Esta variação deve-se aos diferentes hábitos alimentares e diferentes tipo de processamento agrícola que são praticados por tudo o mundo, como já foi mencionado. A WHO considera que cerca de 10% do cobre total ingerido provem da água potável e tendo em consideração uma margem de segurança que considere também a ingestão de cobre através dos alimentos, a WHO, propôs em 2004 um diretório provisório (guideline) para a quantidade de cobre na água: 2 mg/L. Este valor (arredondado à unidade) foi obtido através de uma fórmula matemática que integra vários fatores: ID – Ingestão diária de cobre tolerável; P – Peso; %H₂O – Percentagem de cobre ingerido atribuível ao consumo de água; ID H₂O – Ingestão diária de água.

$$Guideline = \frac{(ID \times P \times \%H_2O)}{ID\ H_2O} = \frac{0,5 \frac{mg}{kg.d} \times 60kg \times 10\%}{2L / d} = 1,5mg/L \rightarrow 2mg/L^*$$

*Valor arredondado à unidade

Para os valores de Peso (P) e de Ingestão diária de água (ID H₂O) a WHO utilizou os valores médios de 60Kg e 2L, respetivamente. Uma ingestão diária tolerável corresponde à quantidade de uma substância presente nos alimentos ou na água potável, expressa num peso corporal base, neste caso os 60Kg, que pode ser ingerida diariamente, por um período de tempo indefinido sem riscos para a saúde.

O Canadá e os Estados Unidos da América estabeleceram recentemente as doses diárias recomendadas (DDRs) de cobre para as diferentes idades, posteriormente estas DDRs foram também adotadas pela WHO.

A quantidade mínima de cobre ingerida por dia por um individuo adulto e saudável não deve ser inferior a 12.5 µg/Kg e nunca superior a 10 mg/dia. No caso das crianças o valor não deve ser inferior a 50 µg/Kg por dia.

O consumo da dose diária de cobre recomendada é especialmente importante nas mulheres grávidas para permitir um desenvolvimento saudável do feto e, depois, do recém-nascido.

De um modo geral, a WHO recomenda para um indivíduo adulto e saudável uma ingestão de cobre através da dieta diária de 1.2 miligramas.

Tabela 3. Doses diárias de cobre consoante a idade, adaptado de “Copper in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality” WHO, 2004

| | Dose Diária Recomendada de Cobre |
|--------------------|----------------------------------|
| Lactantes | |
| Inferior a 6 meses | 0.2 mg |
| Entre 6 – 12 meses | 0.22 mg |
| Crianças | |
| 1 – 3 anos | 0.34 mg |
| 4 – 8 anos | 0.44 mg |
| 9 – 13 anos | 0.7 mg |
| 14 – 18 anos | 0.89 mg |
| Adultos | |
| Superior a 19 anos | 0.9 mg |
| Mulheres grávidas | 1 mg |
| Mulheres amamentar | 1.3 mg |

Homeostase e Metabolismo

A homeostase configura o conjunto de processos que permite manter o meio interno do organismo constante. Está estabelecido que o cobre é um oligoelemento essencial para a sobrevivência de todos os organismos, desde bactérias até aos humanos. Para se compreender a homeostase do cobre e a sua necessidade biológica, é importante realçar que o cobre é um constituinte de várias proteínas, incluindo várias enzimas com funções vitais. O que o torna um elemento único é a sua capacidade de adotar diferentes estados de oxidação, o estado oxidado Cu(II) ou o estado reduzido Cu(I). Consequentemente, os seus iões são cofatores que permitem a catalização, (através de processos químicos redox) de várias proteínas que desempenham um papel biológico essencial ao crescimento e desenvolvimento das células. Estas enzimas ao estarem envolvidas diretamente em vários processos biológicos significa que, alterações nas suas atividades, conduzem, na maioria dos casos, a estados de doença ou condições fisiopatológicas.

A facilidade com que o Cu muda de estado de oxidação/redução pode também ser potencialmente uma citotoxina (Peña et al. 1999) quando é permitido que este se acumule em excesso a nível celular. O Cu tem a capacidade de catalisar reações que dão origem a espécies de radicais livres, entre os quais, radicais hidroxilo. Estes radicais hidroxilo são

capazes de provocar danos celulares: oxidação direta de proteínas, peroxidação de lípidos nas membranas e clivagem de moléculas de DNA e RNA. (Failla et al. 2001). O Cu tem ainda grande afinidade para se ligar a histidina, cisteína e resíduos proteicos resultando desta ligação a desativação destas proteínas. (Camakari et al. 1991)

Manter a homeostase e o correto metabolismo do Cu permite prevenir estas reações adversas.

Este equilíbrio é ainda influenciado por vários fatores, incluindo o Cu absorvido pela dieta, as suas interações com os outros nutrientes como o zinco e o ferro (Institute of Medicine 2001). Gravidez, inflamação, doenças crónicas como a diabetes vão também influenciar o metabolismo do Cu. (Turnlund J. et al, 1998)

O cobre obtido através da dieta dos humanos situa-se ente os 0.6 e os 1.6 miligramas segundo Linder et al (1996) e provém de alimentos ricos neste elemento. Este Cu ingerido é rapidamente absorvido e distribuído pelas proteínas que dele necessitam. Ao contrário do que acontece com outros elementos metálicos, como o ferro, não parece existir grande capacidade para armazenar Cu nos tecidos orgânicos. (Peña et al, 1999).

É muito provável que o cobre tenha a capacidade de deslocar vários iões metálicos em proteínas celulares, por mecanismos catalíticas ou estruturais. Sendo o Cu essencial, mas também tóxico em quantidades excessivas, é necessário que os organismos tenham a capacidade de implementar mecanismos que permitam a excreção do excesso de Cu, o transporte de Cu através das membranas biológicas e, ainda, capacidade de distribuir o cobre pelas proteínas que dele necessitam.

Para além disto, os mecanismos de regulação devem conseguir impedir a acumulação de Cu em níveis tóxicos. A importância de manter este balanço homeostático equilibrado é exemplificado pela existência de duas doenças genéticas humanas derivadas de alterações no transporte de cobre: a doença de Menkes e a doença de Wilson. (Bull et al. 1993)

A identificação dos genes humanos alterados por estas patologias provocadas por modificações metabólicas do Cu e a caracterização dos produtos que advêm destes genes é indispensável para compreender a homeostase dos iões de Cu.

Como já foi referido anteriormente, o Cu não é tipicamente armazenado no organismo. O seu armazenamento é raro, contudo existem disparidades na concentração de Cu nos diferentes tecidos, sugerindo diferentes concentrações de cuproenzimas.

As cuproenzimas estão envolvidas na respiração celular, na defesa contra os radicais livres, na função de neurotransmissão, na síntese de tecido conjuntivo e no metabolismo celular do ferro e zinco.

Enzimas cupro-dependentes (Cuproenzimas)

Tabela 4. Enzimas cupro-dependentes e respetiva função biológica, adaptado de “Essentiality of copper in humans, Uauy et al 1998.

| Enzimas cupro-dependentes | Função |
|--|--|
| Citocromo c-oxidase | Respiração celular (mitocôndria) |
| Superóxido dismutase 1 | Defesa antioxidante |
| Tirosinase | Síntese de melanina, metabolismo de aminoácidos |
| Amino-oxidases | Desaminação das aminas primárias |
| Monoamina oxidase | Degradação da serotonina, metabolismo de catecolaminas |
| Diamina oxidase | Inativação da histamina, proliferação celular |
| Peptidilglicina- α -amina-monooxigenase (PAM) | α -aminação de neuropéptidos |
| Proteína-lisina-6-oxidase ou lisil-oxidase | Ligação cruzada de colagénio e elastina |
| Ferroxidases | Oxidação do ferro, ligação do ferro à transferrina |
| Ceruloplasmina (ou Ferroxidase I) | Transporte de cobre e oxidação Transporte de ferro |
| Ferroxidases II | Oxidação dos iões de ferro |
| Dopamina- β -monooxigenase (hidroxilase) | Síntese de catecolaminas |

A citocromo-c oxidase é uma proteína complexa da membrana mitocondrial interna, é a última proteína na cadeia transportadora de eletrões e catalisa a redução do oxigénio molecular em água, permitindo a síntese de adenosina trifosfato (ATP). (Failla ML et al. 2001). Contudo, o caminho específico responsável pelo transporte de cobre até à mitocôndria ainda não é conhecido, o que não impede esta reação de necessitar da biodisponibilidade de Cu. (Leary et al. 2013). A atividade desta proteína é maior no cérebro e no fígado.

Quando a sua função se encontra comprometida por defeito ou deficiência ocorrem sintomas de falta de ATP: miopatia, ataxia e tonturas. (Peña et al. 1999)

Na COX (citocromo-c oxidase) estão presentes três átomos de cobre: a subunidade I contem dois átomos de cobre envolvidos na transferência de eletrões da COX para um grupo heme, a subunidade II contém um átomo de cobre que funciona como um redutor do O₂. (Uauy et al. 1998)

A superóxido dismutase-1 (SOD1) está presente na maioria das células do corpo humano, situa-se no citoplasma e protege os componentes intracelulares de danos

oxidativos. (Turnlund et al. 1999) As suas concentrações são mais elevadas no cérebro, tiróide e fígado.

Cataliza a dismutação dos aniões superóxido e estudos indicam que durante o processo de catálise o cobre presente no centro ativo da SOD1 é reduzido pelo substrato O_2^- dando origem a dois metabolitos: o oxigénio molecular, O_2 , em quantidade predominante, e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Proporciona, assim, uma defesa contra os radicais livres de oxigénio.

Nenhum outro metal pode substituir o cobre do centro ativo da SOD1 porque só o Cu consegue atribuir capacidade catalítica à SOD1. Estudos demonstram que o cobre é um dos principais componentes dos centros catalíticos de diferentes enzimas com funções redox, sendo a sua presença essencial para as suas funções fisiológicas normais, como respiração celular, defesa contra radicais livres, síntese de melanina, biossíntese de tecido conjuntivo e metabolismo celular do ferro.

Se a atividade da SOD1 for comprometida ocorre, então, dano oxidativo de componentes celulares.

A importância da relação do cobre com a função catalítica de algumas enzimas é evidenciada em alguns estudos que relacionam mutações na enzima SOD1 com história familiar de Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA). Mutações genéticas na SOD1 estão presentes em cerca de 20 a 25% dos casos hereditários de ELA; o interesse em perceber de que maneira o cobre influencia a atividade da SOD1 aumentou (Marx 1996).

Inicialmente, supunha-se que a morte das células neuronais estava relacionada com a diminuição da dismutação de radicais livres, isto aconteceria devido a uma deficiência na enzima SOD1 mas experiências subsequentes com mutantes inativos da enzima em leveduras e ratinhos transgênicos sugeriu que o efeito tóxico dos mutantes da SOD1 nos humanos em situações de ELA estaria relacionado com o aumento de outra função e não com a diminuição da função da SOD1.

Outras experiências demonstraram que o cobre quando ligado à SOD1 das células neuronais com mutação devido à ELA, aumentava a viabilidade desta enzima em 30 a 70%. Estes e outros estudos permitem supor que o cobre é essencial à atividade da SOD1 e que alterações nesta enzima poderão estar relacionados com manifestações patológicas da ELA. (Uauy et al. 1998)

A tirosinase é uma proteína com funções enzimáticas que depende do cobre para concretizar as suas atividades – é uma oxidase. Cataliza a conversão da tirosina em dopamina e a oxidação da dopamina em dopaquinona. Intervém ainda, na síntese de

melanina: está envolvida em duas reações distintas, a hidroxilação de um monofenol e em segundo lugar, a conversão de um o-difenol, que corresponde ao o-quinona. A molécula de o-quinona é submetida a várias reações para, subsequentemente, formar a melanina, essencial para a proteção da pele (Turnlund, 1999).

Quando a tirosinase está comprometida com alguma alteração patológica, ocorre despigmentação da pele, tornando este órgão mais sensível aos raios solares, aumentando a incidência de melanomas.

Amino-oxidases

As amino-oxidases realizam a desaminação oxidativa das aminas primárias. São compostas por duas subunidades, cada uma contendo um átomo de cobre. Alguns estudos demonstram que só uma destas sub-unidades contendo um átomo de cobre é que é essencial para catalisar a desaminação. (Sargentelli et al. 1995) O processo de desaminação envolve a remoção do grupo amino dos aminoácidos, que é libertado na forma de amónia e que se transforma no cetoácido correspondente.

As amino-oxidases são essenciais pois estão envolvidas no processo que permite utilizar os aminoácidos da dieta para produzir energia. De entre as amino-oxidases destacam-se as monoamino-oxidases e as diamino-oxidases. As primeiras são importantes para a degradação de serotonina e metabolismo de catecolaminas como a epinefrina, norepinefrina e dopamina. As segundas inativam a histamina libertada durante reações alérgicas e inativam também as poliaminas responsáveis pela proliferação celular. (Institute of Medicine 2001)

Outra amino-oxidase cupro-dependente é a PAM (Peptidilglicina monooxygenase) envolvida na síntese e ativação de vários péptidos, em especial neuropéptidos. Logo, várias funções podem ficar comprometidas com possíveis deficiências desta enzima.

A lisil-oxidase (proteína-lisina-6-oxidase) utiliza a lisina e a hidroxilisina existentes no colagénio e elastina para produzir o reticulado necessário ao desenvolvimento do tecido conjuntivo dos ossos, dentes, pele, pulmões e vasculatura. (Turnlund et al. 1999)

Quando esta enzima tem a sua atividade comprometida ocorrem, como é previsível, patologias nos tecidos conjuntivos, como rutura vascular, hemorragias e torção, ossos fragilizados. (Peña et al 1999)

Ferroxidases

A ceruloplasmina é uma proteína de elevada importância para os seres humanos, considerada insubstituível, sendo o maior indicador do teor de cobre no organismo. É uma oxidase que contém mais de 65% do cobre existente no plasma de espécies vertebradas. Tem uma estrutura cristalina com, pelo menos, seis íões de cobre fortemente ligados. Três deles correspondem a cobre tipo I (pode formar complexos ou existir como íão livre), envolvidos em processos de transferência de eletrões. Os outros três íões de cobre estão localizados num único centro trinuclear, o qual corresponde ao local de ativação do oxigénio durante o ciclo catalítico da enzima. (Kaplan et al. 1996)

Apresenta capacidades antioxidantes (Patel et al 2000) prevenindo danos nos tecidos celulares por oxidação dos íões de ferro e ajuda o efluxo do ferro armazenado nos tecidos para ser utilizado na síntese de hemoglobina. (Faila et al 2001)

Sabe-se também que este complexo enzimático desempenha funções ao nível do metabolismo de ferro, sendo a principal ferroxidase – ferroxidase I. Converte Fe^{2+} da ferritina (proteína de reserva de ferro nos tecidos) em Fe^{3+} da transferrina (proteína responsável pelo transporte de ferro na circulação sanguínea).

Isto pode fazer supor que o cobre é um causador secundário de algumas anemias, visto todo este processo essencial ao metabolismo do ferro depender da ceruloplasmina e esta por consequência depender do cobre para desempenhar a sua atividade biológica. (Sargentelli et al 1996)

Como já foi referido, a ceruloplasmina pertence ao grupo das ferroxidases, enzimas cuprodependentes encontradas no plasma com funções no metabolismo do ferro, que facilitam a sua ligação à transferrina, como por exemplo, a ferroxidase II que cataliza a oxidação do ferro. (Turnlund et al 1999)

A dopamina- β -monooxigenase ou dopamina- β -hidroxilase (DBH) é uma enzima cupro-dependente que cataliza a reação que transforma dopamina em norepinefrina utiliza oxigénio (O_2) e liberta moléculas de água (H_2O).

Pertence à família das oxidoreductases – enzimas que catalizam transferências de eletrões de uma molécula para outra. No caso, a DBH utiliza três co-fatores essenciais para o seu funcionamento, entre eles o cobre.

A DBH é uma oxigenase que contém dois átomos de cobre em cada uma das suas quatro subunidades. Esta enzima está envolvida no processo de síntese de catecolaminas, essenciais para a transmissão neuronal do sistema nervoso central e está presente na glândula adrenal onde é necessária para a produção de epinefrina. (Turnlund 1999)

Como consequência de alguma deficiência ou defeito na atividade desta enzima ocorrem sintomas relacionados com a pele e articulações, que ficam “soltas” e mais fragilizadas. Podem, também, ocorrer perturbações no equilíbrio hipotalâmico: hipotermia, hipotensão, desidratação e sonolência.

Proteínas (não enzimáticas) que se ligam ao cobre

Para além das enzimas cupro-dependentes, existem proteínas que apesar de não serem enzimas também se unem ao cobre e desempenham um papel no seu transporte pelo organismo: as Metalotioneínas (MTs). Albumina, Transcupreína, Factor de coagulação V e Ligandos de Baixo Peso Molecular são exemplos de metalotioneínas.

As MTs são um pequeno grupo de proteínas não-enzimáticas, ricas em cisteína, que são responsáveis por se ligarem ao cobre. Cada uma destas proteínas pode ligar-se a onze ou doze átomos de cobre, bem como a átomos de zinco ou de cádmio. As MTs aparentam desempenhar funções de armazenamento destes metais, recolhendo-os, quando em excesso, da circulação sanguínea evitando situações de toxicidade.

A albumina é a proteína com maior concentração no plasma e fluidos intersticiais. Liga-se e transporta o cobre e, tal como as outras MTs, pode ligar-se ao cobre em excesso nestes fluidos impedindo níveis tóxicos. Estima-se que a fração de cobre no plasma ligado à albumina é cerca de 5 a 18%.

Recentemente isolada no plasma humano, a transcupreína, também se liga ao cobre e apesar de as suas características e funções ainda não estarem bem definidas, aparentemente desempenha um papel no transporte do cobre. Contudo, a ligação do cobre a proteínas de transcupreína é inferior à percentagem de cobre ligado à albumina.

Por fim, o Factor de coagulação V é um componente não enzimático envolvido no processo de coagulação sanguínea e que contém um átomo de cobre por cada molécula. Apesar de isto fazer supor que deficiências em cobre poderão induzir problemas de coagulação, isso na realidade não se verifica. Logo, a função do cobre nesta proteína ainda não está completamente esclarecida.

Ligandos de Baixo Peso Molecular são aminoácidos e pequenos complexos péptidos que podem transportar uma pequena quantidade (1 a 4%) de cobre presente no plasma sanguíneo. Histidina, glutamina, treonina e a cisteína são exemplos de aminoácidos que se ligam ao cobre presente no plasma, conseguindo unir-se a pelo menos um átomo de cobre. A função destes ligandos de baixo peso molecular que se ligam ao cobre ainda não está bem esclarecida, apenas um complexo cobre-péptido foi isolado do

plasma humano – glicil-histidina-lisina – mas pensa-se que estejam relacionados com o transporte de cobre para as células.

Contudo, pode supor-se que se existir alguma deficiência nestas proteínas podem ocorrer níveis tóxicos de cobre na circulação sanguínea visto estas serem possivelmente transportadoras e “sequestradoras” do cobre em excesso no sangue e plasma.

Existem ainda três proteínas, que não pertencem ao grupo dos ligantes de baixo peso molecular e que também não têm funções enzimáticas, mas que aparentemente também têm iões de cobre ligados às suas moléculas: a proteína prião, a hepaesteína e o precursor de proteínas β -amilóide. As funções destas proteínas não estão completamente claras, mas relaciona-se a proteína prião com o transporte e captação de cobre envolvido nas sinapses nervosas. Alterações nesta proteína podem provocar mudanças nos padrões de sono e possível insónia fatal e podem ainda estar relacionadas com a doença de Creutzfeld-Jacob (perturbação cerebral caracterizada por perdas de memória, postura rígida e ataques epiléticos), e com a síndrome Gerstmann-Straussler-Scheinker, raro e com características neurodegenerativas fatais.

A hepaesteína, por sua vez, está envolvida no metabolismo e na homeostase do ferro e, possivelmente, do cobre (Chen et al 2006). Pertence, provavelmente ao grupo das ferroxidases. Sendo responsável pelo transporte do ferro proveniente da dieta alimentar e pelo transporte do ferro dos enterócitos (existentes no intestino) para o sistema circulatório.

Como já foi referido, as ferroxidades são dependentes do cobre e a hepaesteína não é exceção. A maior percentagem de hepaesteína é encontrada no intestino delgado, especialmente nas células epiteliais das vilosidades intestinais, os enterócitos. Supõe-se, que é nos enterócitos, onde ocorre a absorção do ferro, esta proteína transforme o ferro II em ferro III, mais facilmente absorvido. A hepaesteína foi encontrada em menor percentagem no cólon, no baço, nos rins, nas células mamárias e na placenta, mas a sua função biológica nestes tecidos ainda não foi estabelecida.

A hepaesteína pode ainda estar relacionada com o transporte e armazenamento de cobre impedindo níveis tóxicos. Pensa-se que cada proteína de hepaesteína se ligue, a pelo menos, seis iões de cobre (Chen et al 2006). Anemias ligadas ao sexo podem ser consequência de deficiência desta proteína (Peña et al 1999).

Quanto ao precursor proteico β -amilóide, é uma proteína integrante das membranas biológicas expressa em vários tecidos mas as suas funções são desconhecidas. Supõe-se que possa estar relacionada com a regulação das sinapses, na plasticidade neuronal

(capacidade do cérebro em formar novas conexões sinápticas) e com o transporte de ferro; deficiências nesta proteína aparentam estar relacionadas com história familiar da doença de Alzheimer (Priller et al 2006, Turner et al 2003, Duce et al 2010).

Componente essencial para a expressão genética

Os metais desempenham um papel importante na biologia sendo essenciais à vida, constituem um produto nutricional indispensável e consoante as suas características podem agrupar-se em três grupos. O primeiro grupo, do qual o zinco pode ser um exemplo, providência cofatores essenciais para uma grande variedade de metaloproteínas, sendo tóxico só em quantidades muito elevadas. O segundo grupo, ao qual pertencem elementos como o cádmio, não tem valor nutricional e são bastante tóxicos mesmo em baixas concentrações. Por fim, o terceiro grupo é composto por metais como o cobre, que são essenciais para a vida sendo cofatores de inúmeras enzimas mas ao mesmo tempo podem ser bastante tóxicos para as células.

De fato, devido as alterações nas concentrações dos elementos metálicos no nosso ambiente quer provocadas pela dieta, zona onde se habita ou poluentes, é necessário que os organismos consigam aceder às concentrações de metais existentes sabendo responder de forma fisiológica significativa.

Um dos exemplos mais relevantes da existência de respostas biológicas consoante as concentrações dos elementos metálicos é a ativação ou repressão de genes de transcrição. A transcrição de genes regulada por metais (entre eles o cobre) já foi bem documentada por vários investigadores, entre eles O'Halloran que em 1989 desenvolveu um estudo sobre o desempenho dos iões metálicos nos sistemas biológicos.

Muita informação sobre como estes processos podem ocorrer e de quais os mecanismos bioquímicos envolvidos já é conhecida. Os metais representam uma classe importante como reguladores de alguns fatores de transcrição em células eucariotas. Estudos em leveduras permitiram a identificação de alguns mecanismos de ação dos fatores de transcrição regulados pelo cobre (Uauy et al 1998).

O desempenho do cobre em relação às proteínas que se ligam a este elemento a fim de regular processos de transcrição - proteínas que se ligam ao cobre - foi já demonstrado para alguns fatores de transcrição: Ace1, Mac1 e Amt1. Estas proteínas atuam a nível fisiológico como fatores de transcrição e possuem um domínio obrigatório do cobre, necessário para a ligação ao ADN. Os fatores de transcrição podem ainda servir como “sensores” da concentração intracelular de cobre ou participarem na ativação ou desativação de processos da transcrição.

Os mecanismos de transcrição regulados por Ace1 e Amt1 envolvem a ligação específica, induzida pelo cobre, do fator de transcrição ao promotor da metalotioneína (MT). Outra proteína reguladora, encontrada também em leveduras, é a Cup9. Esta proteína atua como um fator transcricional que regula a expressão dos genes envolvidos na distribuição intracelular de cobre (Uauy et al. 1998).

Elementos que respondem a metais (MRE's) têm sido encontrados em todos os promotores das metalotioneínas das células eucariotas, caracterizados por uma série de repetições dos pares de bases.

Uma importante característica dos fatores de transcrição dependentes do cobre – Ace1, Amt1 e Mac1 – é a sua associação com outros genes relacionados com processos fisiológicos, o promotor da SOD1 possui um único sítio de ligação para o Ace1 que regula a transcrição da molécula de SOD1 e de MT. O fator de transcrição Mac1 também desempenha um papel essencial ao regular a transcrição de dois genes: FRE1, que codifica uma proteína da membrana plasmática associada à redução de Cu^{2+} e Fe^{3+} , e o CTT1 que codifica a catálise citosólica.

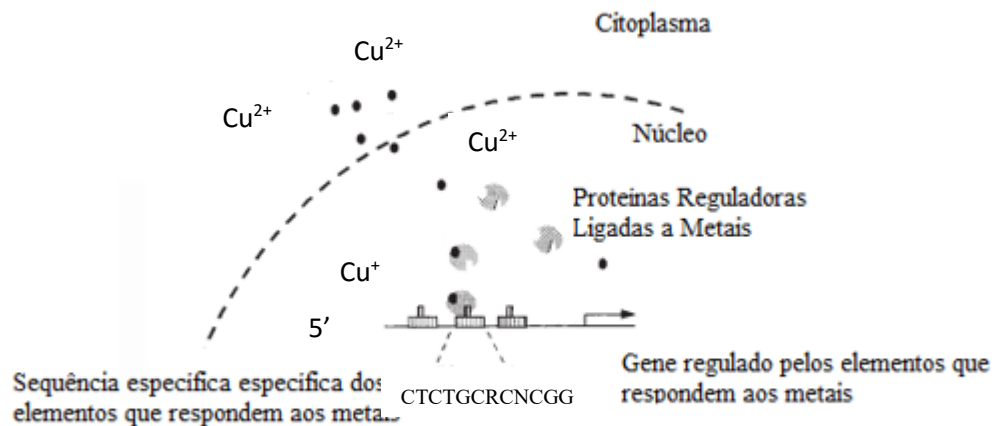
Tabela 5. Fatores de transcrição dependentes do cobre, adaptado de “Metal-regulated transcription in eukaryotes”, Thiele 1991, “Essentialy of copper in humans”, Uauy 1998 e “a delicate Balance: Homeostatic controlo f copper uptake and distribution”, Peña et al 1999

| Fatores de transcrição e genes alvo | Função |
|-------------------------------------|---|
| Mac1 | |
| MT | Armazenamento celular de cobre e tampão |
| CTT1 | Catálise citisólica |
| FRE1 | Redutase cobre/ferro da membrana |
| Amt1 | |
| MTI, MTII α , MTII β | Armazenamento celular de cobre e tampão |
| SOD1 | Dismutação de superóxido |
| Ace1 | |
| MT | Armazenamento celular de cobre e tampão |
| SOD1 | Dismutação de superóxido |
| Cup9 | Distribuição celular de cobre |

A partir destes estudos que relacionam o cobre com a expressão genética, admite-se que a ausência de cobre (pelo menos em leveduras e mamíferos) provoca danos dramáticos nos processos celulares, como na proliferação, crescimento e atividade metabólica destes organismos e, muitos destes danos, estão relacionados com disfunções

dos fatores de transcrição dependentes do cobre, sugerindo que o cobre terá um papel fundamental na fisiologia das células eucariotas.

Figura 1. Modelo da transcrição regulada pelo cobre, adaptado de “Essentiality of copper in humans”, Uauy 1998



Nesta figura os íons de cobre entram no núcleo da célula eucariota e ligam-se às proteínas reguladoras da transcrição – Ace1, Amt1 e Mac1 – ao unirem-se ao cobre a sua estrutura terciária altera-se, tornam-se ativas e prontas para interagir com a sequência específica dos elementos que respondem aos metais (MRE's).

No caso das proteínas reguladoras Ace1, Mac1 e Amt1 o cobre funciona como fator alostérico dos fatores de transcrição e é absolutamente necessário para a união ao ADN. No caso da Cup9, uma proteína reguladora da transcrição que apesar de se assumir que esta envolvida no processo de distribuição de cobre ao nível intracelular, não se conhece o seu gene alvo.

Sendo assim, existe uma necessidade de realizar mais estudos sobre os mecanismos de transcrição regulados pelo cobre, especialmente no âmbito da fisiologia humana, de modo a correlacionar o cobre com a sua intervenção ao nível genético.

Absorção e biodisponibilidade

O cobre proveniente da dieta começa por ser absorvido no estômago. Ao contrário dos outros metais, uma pequena porção do cobre biodisponível é absorvido logo no estômago, fator que tende a não ser muito relevante visto, o processo digestivo ainda não estar completo nesta fase (Peña et al 1999)

É no duodeno e jejuno-íleo, porções que continuam o intestino delgado, que a ocorre absorção do cobre. Cerca de 20% a 70% do cobre ingerido é absorvido. Nos adultos a absorção máxima é de 50% do cobre disponível e nas crianças é de 77%.

A absorção pode ser afetada por ligandos ou outros metais. O tipo de ligandos, a solubilidade e estabilidade que estes componentes formam com o Cu no lúmen intestinal tem grande influência na absorção de Cu. O transporte de Cu através do lúmen intestinal envolve mecanismos de transporte ativo bem como mecanismos de difusão.

A capacidade para absorver Cu é idêntica nas diferentes porções do intestino delgado.

Estudos feitos com ratinhos permitiram verificar que a absorção de Cu em ratinhos bebês não é um processo que dependa de transporte ativo, como acontece nos ratinhos adultos, mas sim de co-transporte e de difusão utilizando a água como solvente.

Verificou-se ainda que uma diminuição de sódio no lúmen intestinal ou inibição do transporte de sódio prejudica a absorção de Cu.

Quanto às MT's, verificou-se que existem em maior quantidade em ratinhos adultos e apenas nestes, parecem ter alguma influência na absorção de Cu. Quando existe uma biodisponibilidade elevada constante de Cu, as Mt's parecem ter a capacidade de reduzir a absorção de Cu. Contudo, não parecem ser responsáveis por casos de retenção de Cu em ratinhos bebês, pois parecem não desempenhar qualquer papel em ratinhos que ainda não atingiram a maturidade.

Utilizando isótopos estáveis, verificou-se que com o aumento de Cu fornecido pela dieta a percentagem de Cu absorvido diminui. Por exemplo, ao aumentar o fornecimento de Cu da dieta de 0,8 mg/dia para 7,5 mg/dia (um aumento cerca de 10 vezes superior), a absorção apenas sofreu um ligeiro aumento.

Para além disto, com uma elevada quantidade de Cu fornecida na dieta, a retenção de Cu diminui para 12% enquanto o organismo pode reter até 65 a 67% da dose disponível.

Assim a absorção, parece encontrar um ponto de equilíbrio entre os 0,8 e os 1,0 mg/dia de Cu de modo a manter a homeostase.

Um aumento excessivo no fornecimento de Cu na dieta faz com que percentualmente a sua absorção diminua, bem como o oposto, se a dieta apresenta uma escassez no fornecimento de Cu o organismo tende a absorver o máximo que consegue da dose disponível. Pode-se, então, afirmar que a absorção, em determinadas circunstâncias, ajuda a manter a homeostase nos níveis fisiológicos de Cu (Wapnir, 1991).

Até hoje pouco se sabe sobre os mecanismos de transporte que envolvem o Cu e a sua regulação na absorção ao nível do lúmen intestinal. Sabe-se, no entanto, que a bomba Na/ATPase está envolvida na transferência do Cu presente nos enterócitos no lúmen para

o corrente sanguínea. Sendo este o ponto de partida para a sua distribuição pelo organismo (Turnlund 1991).

A biodisponibilidade de Cu depende maioritariamente da sua absorção. A quantidade de cobre obtido através da dieta parece ter maior influência que a própria dieta ou algum componente específico da mesma (Turnlund 1989).

Para além disto, a biodisponibilidade de Cu depende ainda de outros fatores, como por exemplo, interações com outros nutrientes (Lonnerdal 1996).

No caso dos humanos, os potenciais antagonistas do cobre incluem o zinco, ferro e o ácido ascórbico. Doses elevadas de ferro ou zinco, na ausência de uma quantidade suficiente de cobre para colmatar esta discrepância, podem levar a um desequilíbrio homeostático do cobre no organismo, provocando deficiência deste elemento (Ralph et al. 2001). Como exemplo de um ratio de ingestão diária destes elementos que favorece o equilíbrio homeostático é: 30mg de ferro, 15mg de zinco e 2mg de cobre (Institute of Medicine 1990).

Interações com outros nutrientes

- **Zinco**

Doses elevadas de zinco provenientes da dieta diminuem a absorção de cobre, aumentando a quantidade deste elemento retido nas células da mucosa intestinal, sendo depois eliminado por via fecal, aumentando as concentrações de cobre nas fezes (Hoffman et al 1998). Um excesso de zinco induz as MT's intestinais a captarem este zinco mas durante este processo, como têm mais afinidade para o cobre, capturam também moléculas de cobre. Como resultado, o Cu fica unido às metalotioneínas, reduzindo o seu transporte para o plasma (Ralph A. et al 2001). Por esta razão, quantidades elevadas de zinco podem ser utilizadas com função terapêutica no tratamento de doenças provocadas por acumulação excessiva de cobre (Doença de Wilson), (Lonnerdal B. 1998).

Apenas doses de zinco muito superiores à dose diária recomendada podem provocar deficiência em cobre em adultos saudáveis, contudo esta margem diminuem em bebés e crianças (Danks 1988). Por exemplo, um bebé de 13 meses pode desenvolver uma deficiência em cobre como resultado de um consumo de zinco diário 3 a 5 vezes superior ao recomendado (Botash et al. 1992).

Doses excessivas de zinco devem ser evitadas, especialmente em grupo de maior risco como mulheres grávidas ou a amamentar e crianças. Os suplementos de zinco, apesar de serem comuns na gravidez, devem ser prescritos com a devida atenção, visto

muitos deles conterem também ferro (outro potencial competidor do cobre na absorção intestinal) e sem a devida quantidade de cobre pode existir a possibilidade de dar origem a uma deficiência de cobre no organismo.

Em situações de deficiência em cobre induzidas por doses excessivas de zinco uma das soluções mais fáceis e eficazes de resolver o problema é a administração oral de suplementos de cobre (Turnlund 1999).

- **Ferro**

Estudos recentes demonstraram que o cobre é essencial para o transporte eficiente de ferro nos animais e humanos. Uma biodisponibilidade reduzida de cobre pode dar origem a sintomatologias ligadas à falta de ferro, como por exemplo, anemias. Estas situações são muitas vezes resolvidas por suplementos de cobre, e não de ferro, adicionados à dieta, aumentando assim a eficácia do organismo em transportar e absorver o ferro biodisponível (Peña et al 1999).

Contudo, o excesso de ferro parece provocar uma diminuição do cobre disponível, ainda não se sabe ao certo os mecanismos envolvidos mas estudos demonstram que existe uma relação entre a deficiência em cobre e a acumulação de ferro no fígado e no lúmen intestinal (Turnlund 1999)

- **Ácido Ascórbico**

O ácido ascórbico parece estar envolvido na absorção gastrointestinal de cobre mas também nos mecanismos transporte para o fígado e no metabolismo intracelular de cobre. Alguns estudos realizados em animais demonstraram que a ingestão de ácido ascórbico em doses relativamente mais elevadas que a DDR pode causar deficiência em cobre, contudo ainda não se sabe qual a relação específica entre o ácido ascórbico e o cobre. (Turnlund 1999) (Lonnerdal 1998)

- **Molibdénio**

Interações entre o cobre e o molibdénio foram descritas pela primeira vez em ruminantes. Um ligeiro excesso de molibdénio na presença de sulfidos produz efeitos tóxicos e, de seguida, deficiência em cobre. Uma dieta rica em molibdénio aumenta a quantidade de cobre excretado na urina e supõe-se que o equilíbrio possa ser restaurado com um aumento da dose de cobre. Pouco se sabe sobre os mecanismos que relacionam o molibdénio com o cobre (Turnlund 1999).

- **Hidratos de Carbono**

Estudos realizados em ratos demonstraram que o tipo de hidratos de carbono ingeridos altera a taxa e a gravidade com que o cobre sofre depleção (redução da quantidade em meio celular). Os ratos têm menos probabilidades de terem deficiência em cobre se ingerirem hidratos de carbono provenientes do amido de milho do que da frutose ou sacarose. Por outro lado, estudos em porcos (com sistema gastrointestinal mais semelhante aos humanos) não se verificaram estas interações. Sendo assim, supõe-se que nos humanos não exista qualquer relação entre o tipo de hidratos de carbono ingeridos e, conseqüente, probabilidade para desenvolver deficiência em cobre. Contudo, ainda pouco se sabe sobre este tema (Schoenemann et al 1990).

Polímeros da glucose aumentam o co-transporte de Cu com a água, que funciona como solvente, aumentando a absorção de Cu. Sendo assim, a substituição de glucose por frutose ou sacarose reduz biodisponibilidade de cobre (Wapnir 1995).

Com grandes concentrações de aminoácidos, os péptidos podem ligar-se ao Cu no lúmen intestinal reduzindo a sua absorção. Em concentrações moderadas, porém, estes péptidos podem reduzir a formação de moléculas de hidróxido de cobre e aumentar a absorção de Cu. Ácidos orgânicos, tais como citrato, malato ou lactato ao aumentarem a solubilidade do meio vão aumentar a absorção de Cu.

O Cu pode ainda interagir com alguns fármacos ou outros elementos que influenciem a sua absorção. Contudo, pouco se sabe sobre interações de Cu com fármacos. A penicilamina é usada como quelante endógeno do Cu para o tratamento da doença de Wilson, pois liga-se ao Cu e forma um complexo que é excretado na urina aumentando eliminação diária de Cu.

Os antiácidos podem interferir com a absorção de Cu, quando são utilizados em quantidades excessivas. Visto que, uma produção adequada de HCL gástrico facilita a digestão, potenciando a biodisponibilidade de Cu no intestino delgado. A existência de um pH mais alcalino no intestino vai diminuir a biodisponibilidade de Cu devido à formação de hidróxidos de cobre e complexos de cobre que levam à sua excreção.

A fibra presente na dieta apesar de influenciar a absorção de outros metais parece não ter grande influência na absorção de Cu. Contudo, este aspeto ainda não está confirmado.

Tabela 6. Fatores que influenciam a absorção de cobre no trato-gastrointestinal

| Fatores que potenciam a absorção de cobre | Fatores que reduzem ou inibem a absorção de cobre |
|--|--|
| Digestão gástrica adequada | Diminuição do sódio biodisponível no lúmen |
| Concentrações moderadas de aminoácidos e péptidos no lúmen intestinal (reduz a formação de hidróxido de cobre) | Concentrações elevadas de aminoácidos e péptidos |
| Ácidos gordos (aumentam a solubilidade do cobre) | Iões divalentes que competem com o cobre (ferro e zinco) |
| pH ácido | pH alcalino |

Transporte e Distribuição

Depois da absorção, segue-se a distribuição do cobre pelo organismo. O cobre é transportado ligado à albumina e à transcrupeína e a outros ligandos de baixo peso molecular. Uma pequena quantidade de cobre pode ligar-se péptidos e aminoácidos, especialmente à histidina (Linder 1991, Frieden 1986).

O cobre recém absorvido desaparece rapidamente do plasma. A maior parte é levada para o fígado através da circulação portal e uma pequena parte é transportada para o rim. Ao chegar ao fígado o cobre é incorporado pela ceruloplasmina (processo que demora só algumas horas). Algum cobre é incorporado por MT's, particularmente quando a quantidade de Cu disponível é elevada.

É possível que as MT's desempenhem um papel na desintoxicação celular (Bremmer 1987).

O papel desempenhado pelo cobre no rim é desconhecido mas é provável que seja filtrado e reabsorvido (Danks 1988).

O cobre ligado à ceruloplasmina é libertado do fígado para a corrente sanguínea e recebido pelas células com recetores específicos. A ceruloplasmina une-se a estes recetores específicos, o cobre é reduzido, liberta-se da ceruloplasmina e entra nas células (Harris 1990).

No interior das células do lúmen intestinal o cobre interage com as MT's (Danks 1988), pequenas proteínas responsáveis por "sequestrarem" o cobre disponível. As MT's atuam principalmente ligando-se ao cobre em excesso e desintoxicarem as células (Danks 1988). Contudo, não é muito claro que as MT's participem na absorção normal de cobre ou se conseguem prevenir a absorção do mesmo quando em excesso.

O fígado é o principal órgão do metabolismo do cobre. Uma vez no fígado, o cobre é incorporado em enzimas que necessitam de cobre para serem ativadas e em proteínas que são levadas para a corrente sanguínea (Ralph 2001). A maior parte do cobre é transportado até ao fígado e incorporado pela ceruloplasmina (Turnlund 1991).

Até recentemente, a ceruloplasmina era considerada como a única proteína responsável pelo transporte de cobre até às células (Kuo, 2001). Contudo, estudos recentes demonstraram que pacientes com aceruloplasmina (níveis reduzidos de ceruloplasmina) continuavam a ter um metabolismo do cobre relativamente normal, ou seja, o cobre continuava a conseguir chegar às células de todo o organismo. Isto veio contrariar a ideia que a ceruloplasmina seria a única transportadora de cobre.

Investigações recentes, relativamente à captação de cobre por parte das células em bactérias Gram positivas (Gram+), as *Enterococcus hirae* (*E.hirae*), têm permitido obter excelentes informações sobre o mecanismo de transporte celular de Cu (Peña et al 1999).

Na *E.hirae* um operão que contém cinco genes – copX, Y, Z, A e B – desempenha um papel fundamental no metabolismo do cobre. As proteínas traduzidas por esse gene CopA e Cop B são proteínas da membrana, necessárias ao transporte de Cu para dentro da célula e permitem ainda a saída de Cu da célula quando está em níveis elevados.

A CopB é a única proteína transportadora de Cu com capacidade (bioquimicamente demonstrado) de impedir a acumulação de Cu no interior da célula. Consistente com a sua função bioquímica, quando se destrói esta proteína – CopB – a *E.hirae* hipersensível ao Cu, não desempenhando o seu papel de expulsão de Cu do interior da célula quando em excesso.

A proteína CopA está envolvida no transporte de vários metais, incluindo no transporte e distribuição de Cu. Se o gene que expressa a CopA for eliminado não ocorrem efeitos significativos na resistência da *E.hirae* ao Cu, contudo, células sem este gene param de crescer ao fim de três dias em contacto com Cu, isto pode sugerir que esta proteína desempenha um papel indispensável no transporte de Cu para até às células.

Estudos iniciais utilizando organismos procariotas forneceram valiosas informações sobre o mecanismo intracelular do Cu e permitiram servir de base para compreender este mecanismo nas células eucariotas.

Para perceber o mecanismo de transporte do ião cobre em células eucariotas foram realizados estudos utilizando leveduras, entre elas a *Saccharomyces cerevisiae*.

Esta levedura escolhida devido à sua simples biologia molecular, permite isolar os transportadores de Cu e como o seu genoma é totalmente conhecido é possível isolar e

estudar genes mutantes. Contudo, não é possível observar o comportamento dos factores de transcrição Ace1 e Mac1, os homólogos humanos dos factores de transcrição das leveduras, já identificados e envolvidos no metabolismo de Cu (Koch et al 1997) (Jensen et al 1998).

Novas evidências genéticas sugerem que a CTR1, uma proteína transportadora de cobre é essencial para o crescimento embrionário, bem como para transportar o cobre até ao cérebro (Uauy, 1998) (Kuo 2001).

Supõem-se que esta proteína específica transportadora de Cu – CTR1 - desempenha um papel essencial neste processo.

A hCTR1 é uma proteína específica com elevada afinidade para o transporte de Cu, composta por 190 aminoácidos e com elevada homologia com as proteínas transportadoras de Cu das leveduras - CTR1 e CTR3. Sugerindo, então, que ao longo do processo evolutivo, as proteínas transportadoras com elevada afinidade para o Cu nos mamíferos podem ter origem na CTR1 e na CTR3 das leveduras.

A hCTR1 tem três domínios, o terminal amino é rico em resíduos de metionina e histidina. Semelhante aos resíduos de metionina existentes no terminal amino da CTR1 das leveduras. É expressa em todos os órgãos e tecidos examinados, com o fígado, coração pâncreas, a exibir os níveis mais elevados, os intestinos um nível de expressão intermédio, enquanto o cérebro e os músculos apresentam os níveis de expressão mais baixos (Lee et al 2002).

O processo de transferência do Cu(I) para a hCTR1 é mediado por redutases da membrana apical que reduzem o Cu(II) proveniente da dieta para Cu(I), visto que a hCTR1 tem afinidade para o Cu(I). esta proteína transportadora situa-se na membrana dos enterócitos. (Hordyjewska et al, 2014)

Estudos recentes sugerem que a hCTR1 é regulada por um mecanismo pós-translacional que estimula a endocitose de cobre e a degradação do transportador.

Em ratos heterozigóticos, com mutações na CTR1 (homóloga da hCTR1 humana) apresentam defeitos na acumulação de cobre e uma redução da atividade da COX e em ratos com CTR1 totalmente deficiente apresentam alterações profundas no crescimento e desenvolvimento, pelo que morrem ainda durante a gestação. Isto parece demonstrar o papel essencial da CTR1 como transportadora de Cu para as células dos mamíferos mesmo durante o processo gestacional (Lee et al 2002)

A CTR1 foi inicialmente identificada, através de ADN complementar, nos processos respiratórios de leveduras, em especial na *Saccharomyces cerevisiae*.

A estas leveduras foram induzidas mal formações no processo de transporte de Cu através da inibição da expressão genética da CTR1 e da CTR3, proteínas transportadoras com elevada afinidade para o Cu (Peña et al 1999).

A CTR1 parece ser a responsável pelo transporte de Cu através da membrana, não parecendo necessitar de ATP para o transporte do cobre.

Apesar de não se conhecer o exato mecanismo de captação do Cu pelas células da levedura, este processo parece iniciar-se com a redução de Cu(II) para Cu (I) através de redutases existentes na membrana, as FRE's: a transcrição da FRE2 e FRE6 é regulada pelo ferro, por meio de um fator de transcrição – Aft1 – que responde à presença de ferro. Enquanto a própria presença de Cu controla a transcrição de FRE1 e FRE7 através da ativação de outro fator de transcrição – Mac1 (Peña et al. 1999). Devido ao seu papel essencial na redução de Cu(II) e de Fe (III) e à sua elevada afinidade para captar estes metais, a transcrição da FRE1 é controlada por ambos os fatores de transcrição Aft1 e Mac1, em resposta ao Fe e ao Cu respetivamente.

As alterações cromossomais da CTR1 na *S.cerevisiae* resulta no aparecimento de vários fenótipos com reduzida afinidade para a captação de cobre, provocando problemas de crescimento, deficiência respiratória devido à incapacidade de fornecer Cu ao citocromo oxidase, desregulação no equilíbrio do *stress* oxidativo provocado pela falta de incorporação do Cu na superóxido dismutase e, por fim, incapacidade de ativar as metalotioneínas, sendo o Cu necessário para ativar os seus fatores de transcrição.

A CTR1 é composta por 406 aminoácidos e nos seus terminais encontram-se resíduos de cisteína, tirosina e fenilalanina. Contudo, ainda não se conhece a verdadeira importância destes resíduos no transporte de Cu.

Quando os níveis de Cu excedem a K_m (constante de Michaelis) - definida como a concentração para a qual a velocidade da reação enzimática é metade de velocidade máxima - é ativado um mecanismo de degradação específico da CTR1, isto representa um novo mecanismo de degradação de proteínas da membrana plasmática.

Estudos utilizando estirpes mutantes de leveduras com alterações na via endocítica revelaram que neste processo de degradação não é necessário que a CTR1 esteja no interior da membrana nem no vacúolo, onde habitualmente se realiza a degradação das proteínas.

Outra proteína transportadora com elevada afinidade para o Cu é a CTR3, composta por 241 aminoácidos com 11 resíduos de cisteína, não se conhecendo também a sua importância para o transporte de Cu por parte desta proteína.

A CTR1 e a CTR3 podem funcionar independentemente uma da outra para transportarem Cu para a célula.

Células que possuem ambos transportadores de Cu apresentam maiores vantagens de crescimento em situações de escassez de Cu. A CTR1 e a CTR3 podem, ainda, funcionar alternadamente mantendo sempre uma elevada afinidade para o Cu mas, existem poucas semelhanças na sua sequência de aminoácidos.

Estudos recentes indicam que a entrada de Cu na célula também pode ser feita por três mecanismos, com afinidade para o Cu, que envolvem a redutase FET4. As condições fisiológicas que ativam estes mecanismos de baixa afinidade ainda não estão definidas.

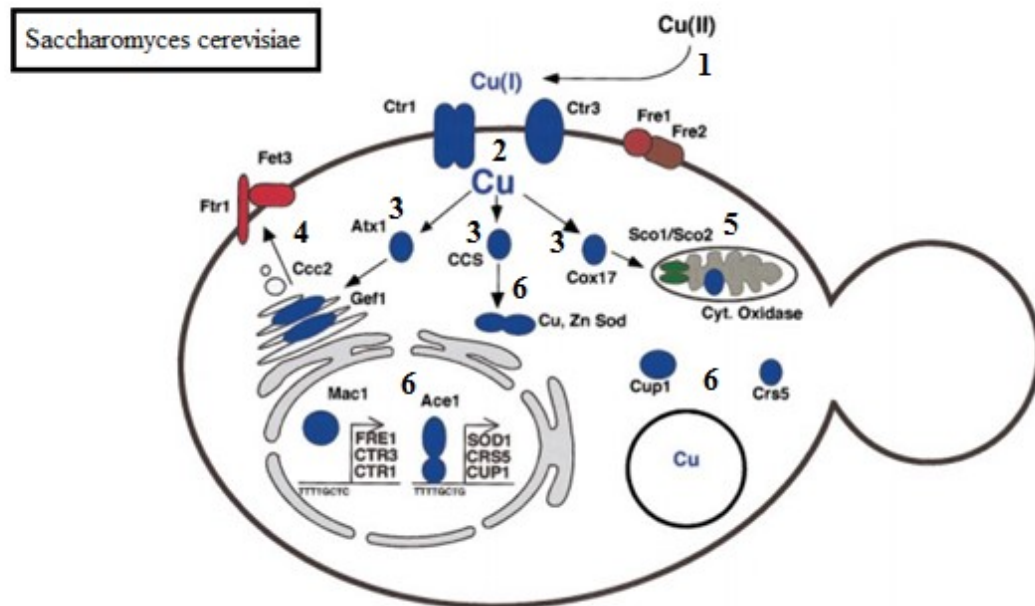
Até agora, nenhum dos mecanismos de entrada do íon Cu nas células eucariotas parece envolver a necessidade de ATPases, não sendo explícito o que fornece energia para conduzir os íons Cu através da membrana plasmática. Como alternativa, supõe-se que o potássio (outro íon) atue como força motriz, contudo neste processo pode estar envolvido o uso de ATP (Peña et al 1999).

Outras experiências recentes mostraram que quando o cobre é transportado até às células e é entregue por moléculas específicas ou por componentes submoleculares através de vias específicas. Isto acontece pela formação de complexos com pequenas proteínas citosólicas conhecidas como chaperons, como a Atox1, Cos17 e CCS. Estes chaperons estão entre as proteínas que transportam cobre para a via secretora, para mitocôndria e para a formação de Cu/Zn SOD (Peña et al 1999).

As proteínas envolvidas no transporte de Cu partilham funcionalidades modulares.

A identificação de proteínas moduladoras de Cu em modelos criados em laboratório tem levado à descoberta de proteínas homólogas em mamíferos, consecutivamente em humanos.

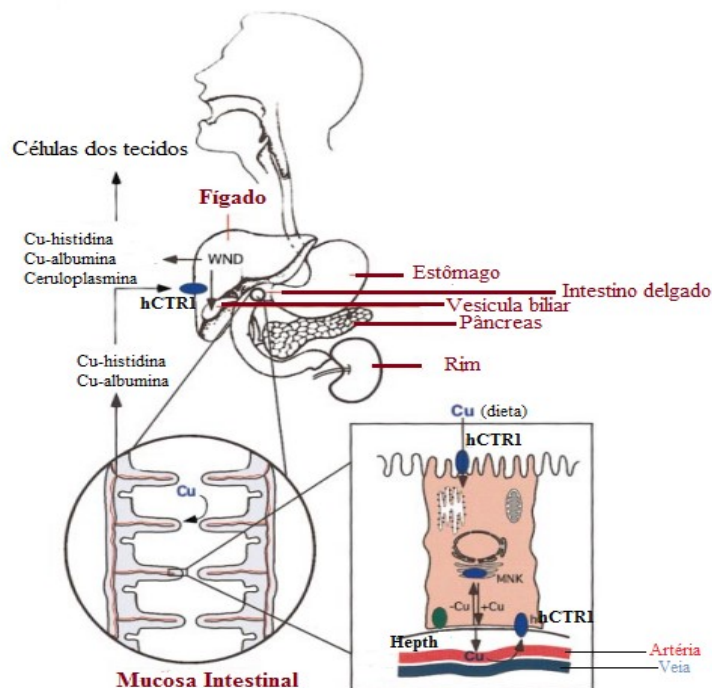
Figura 2. Transporte e distribuição do cobre em *Saccharomyces cerevisiae*, adaptado de Peña et al. 1998.



1. Cu (II) é inicialmente reduzido a Cu (I) pelas redutases FRE1/FRE2 presentes na superfície da membrana plasmática (antes da entrada na célula)
2. A entrada do íon Cu(I) na célula é mediada pelas proteínas transportadoras de alta afinidade para o Cu, CTR1 e CTR3.
3. No interior da célula Cu(I) liga-se aos *chaperons* Atx1, Cox17 e CCS, de modo a ser transportado especificamente para a via secretória, mitocôndria e SOD, respetivamente.
4. Na via secretória, Ccc2 recolhe o Cu(I) de Atx, seguindo a incorporação de Cu(I) pela ferroxidase Fet3. A Fet3 forma um complexo com a permease do ferro Frt1 e ambas as proteínas são responsáveis pela elevada afinidade da membrana plasmática na captação de ferro.
5. Na mitocôndria Cu(I) é entregue pela Cox17 e é incorporado pela Citocromo-C-Oxidase, processo que necessita das proteínas Soc1 e Soc 2 (homólogos).
6. CCS entrega o Cu(I) especificamente ao complexo Cu/Zn, SOD presentes no citosol. Atualmente não se conhece ao certo quais são os *chaperons* que vão incorporar o Cu(I) até às metalotioneínas, Cup1 e Crs5 existentes no citosol. Ou quais os *chaperons* que conduzem o Cu(I) até aos fatores reguladores de transcrição Ace1 e Mac1 e até ao vacúolo.

Estes estudos realizados em leveduras, especialmente em *Saccharomyces cerevisiae*, permitiram estabelecer situações homólogas no transporte e distribuição de Cu nos mamíferos, incluindo nos humanos.

Figura 3. Modelo da absorção e transporte de Cu ao nível dos órgãos e tecidos, adaptado de Peña et al



Na **figura 3** observa-se um modelo da absorção e distribuição do cobre pelos órgãos e tecidos. O cobre obtido através da dieta é inicialmente absorvido pelo estômago e pelo intestino delgado.

A hCTR1, transporta o íon Cu através das células da mucosa intestinal onde a proteína de Menkes (MNK) transporta o Cu através da circulação portal. A MNK foi uma proteína isolada a partir do gene da doença de Menkes, esta proteína é essencial para permitir a ligação do Cu aos tecidos. É uma ATPase tipo P, que se encontra alterada em pacientes com a doença de Menkes, onde o Cu é acumulado nas células epiteliais do intestino.

Uma vez no plasma, o Cu liga-se à albumina e à histidina existentes no sangue portal e é depositado rapidamente no fígado onde a hCTR1 pode desempenhar um papel importante mas que ainda não está bem definido. Supõe-se que transporte os íões Cu(I) ate aos enterócitos.

A ceruloplasmina, a proteína do plasma com capacidade de conter maior quantidade de íões de Cu é sintetizada no fígado e incorpora este Cu através da proteína WND, uma ferroxidase, essencial para o metabolismo do ferro. WND é uma proteína muito semelhante à MNK e encontra-se alterada em pacientes com a doença de Wilson, onde

ocorre uma acumulação de Cu no fígado. Pode-se dizer que a WND é a homóloga da MNK mas localiza-se no fígado enquanto a MNK exerce a sua função no intestino.

A excreção biliar através da vesícula é a principal via de eliminação de Cu e uma pequena quantidade de Cu é encontrada na urina.

Ao entrar no fígado e no rim, o Cu absorvido recentemente, é incorporado por diferentes espécies, entre elas, enzimas endógenas, proteínas que requerem o Cu para exercerem a sua atividade e, no caso do fígado, a bÍlis (Linder et al 1998). A quantidade de Cu incorporado pela bÍlis depende da dose que lhe foi entregue: quando maior a dose de Cu que chega disponível, maior será a quantidade de Cu incorporada. A quantidade de Cu entregue e a quantidade incorporada pela bÍlis estabelecem uma relação de proporcionalidade direta, quando uma aumenta a outra também aumenta. Esta relação é importante para ajudar a manter a homeostase do cobre, visto a ceruloplasmina manter a incorporação de Cu constante quando este é ingerido em doses elevadas, a bÍlis ao incorporar Cu em maiores quantidades nestas situações pode evitar situações de toxicidade provocadas por excesso de Cu (Turnlund et al 1989) (Linder et al 1979).

A ceruloplasmina apenas tem a capacidade de reduzir a incorporação de Cu quando são ingeridas doses reduzidas a fim de evitar deficiências em Cu. Nestas situações supõe-se que a produção da ceruloplasmina não diminui, apenas a captação de Cu por parte da mesma é reduzida de modo a assegurar Cu biodisponível no meio celular.

Através de uma dieta normal o Cu que é ingerido e entra no fígado e nos rins volta a reaparecer no plasma. Isto pode significar que tanto o fígado como o rim podem ser fontes de ceruloplasmina do plasma. De facto, estes dois tecidos têm a maior quantidade de concentração de cobre em comparação aos outros órgãos dos mamíferos, incluindo nos humanos: 4 a 6 $\mu\text{g/g}$ no rim e 7 a 12 $\mu\text{g/g}$ no fígado (Linder 1991).

Estudos sugerem que a maior parte do cobre absorvido pelos outros tecidos parece ocorrer quando a ceruloplasmina ligada ao Cu volta a reaparecer no plasma, sendo lógico assumir que a ceruloplasmina pode ser a fonte de Cu que entra nos outros órgãos. A ceruloplasmina ao ligar-se aos tecidos pode sofrer alterações conformacionais libertando o Cu (Zaitseva et al 1996). Contudo, esta teoria ainda não está completamente definida.

Apesar da maior parte dos tecidos absorver Cu que provém da ceruloplasmina que circula no plasma, absorvem também Cu proveniente de outras formas. Isto foi verificado através de pacientes com doenças que impedem a ceruloplasmina de transportar Cu (aceruloplasminemia) os tecidos continuam a registar concentrações de Cu. É importante relembrar que as quantidades de Cu que entram nos tecidos (expeto fígado e rim) são

pequenas e estes tecidos têm a capacidade de reter o Cu quando existe em escassez, a fim de evitar deficiência em Cu.

Não é fácil induzir deficiência em Cu nos mamíferos, incluindo o Homem, existem mecanismos que permitem controlar o Cu disponível, armazenando-o se necessário, através da dieta de forma a manter o equilíbrio homeostático mesmo quando as doses ingeridas são baixas (Linder et al 1998).

A entrada de Cu pelos tecidos à exceção do fígado e do rim não é rápida e envolve quantidades muito reduzidas. A maior parte do Cu intracelular é reciclado e as células conseguem-se adaptar reduzindo a captação de Cu, aumentar a entrada de Cu na célula ou libertar Cu armazenado. A maior das células consegue, se necessário, captar Cu da albumina, transcupreína e outros complexos de cobre quando a ceruloplasmina está reduzida ou muito reduzida.

Em contraste com um baixo fluxo de circulação de Cu entre a maioria dos órgãos, à exceção do fígado e do rim, existe um fluxo de Cu relevante entre o fígado, o rim, o trato gastrointestinal e alguns fluidos como a saliva, bÍlis e fluidos intestinais que transportam 4 a 5 mg de Cu/dia, grande parte do qual é reciclado.

O cobre é ainda armazenado em vários órgãos, sendo o fígado o único com capacidade para o mobilizar em caso de balanço negativo.

Tabela 7. Locais de armazenamento do cobre, adaptado de Linder et. al 1998.

| Órgão do corpo humano | Percentagem de cobre armazenada (%) |
|-----------------------|-------------------------------------|
| Fígado | 20 |
| Músculo esquelético | 40 |
| Cérebro | 20 |
| Tecido conjuntivo | 8 |
| Sangue | 8 |
| Rim | 8 |

Distribuição intracelular de cobre

Devido à natureza extremamente reativa do cobre, seria muito prejudicial se este íon – Cu (I) – circula-se como um íon livre no interior das células, onde poderia participar em vários tipos de reações cujos produtos poderiam danificar, em muitos casos, irreversivelmente, as células, incluindo a membrana celular, ácidos nucleicos e proteínas.

De acordo com várias experiências, (Peña et al 1999) ao longo dos últimos anos, o cobre, depois de ser transportado até ao interior da célula, é “entregue” em compartimentos submoleculares específicos ou a moléculas específicas e, através de vias rigorosamente controladas, formando complexos com pequenas proteínas presentes no citosol conhecidas como *chaperons*.

A Atx1, uma proteína *chaperon* para o Cu, entrega este íon metálico na sua via secretora, tendo também uma função supressora de danos oxidativos quando a Cu/Zn SOD está em falta.

Atx1 é um polipeptídeo citosólico constituído por uma cadeia de 73 aminoácidos e contém apenas um terminal metálico capaz de se unir ao Cu (Lin et al 1995). O complexo Atx1 – Cu (I) retoma o seu caminho através do complexo de Golgi onde a Atx1 “entrega” o Cu a MNK e/ou WND e Cu-ATPases tipo P que transportam o Cu até ao compartimento secretor (Peña et al 1999).

Alterações cromossomais na proteína Atx1 levam a que as células não consigam crescer nem desenvolverem-se na presença de níveis baixos de ferro, isto pode estar relacionado com a capacidade do Cu se ligar à Atx1 e quando a Atx1 chega ao complexo de Golgi e liberta o Cu, este liga-se novamente a outro *chaperon*, a proteína Cc2, que transporta o íon Cu até este ser incorporado pelo *chaperon* Fet3. Esta proteína *chaperon* possui características de oxidase e é capaz de se unir a mais do que um íon de cobre. É, também, essencial para o transporte do ferro. Sendo assim, existe uma relação entre o transporte de Cu e o de Fe visto partilharem uma proteína *chaperon* ao longo do seu transporte. A profundidade desta relação ainda não está completamente esclarecida mas, por exemplo, uma diminuição na absorção de Cu por parte da Fet3 conduz também a uma diminuição da afinidade da Fet3 para se unir ao ferro.

O facto de ser necessário a presença de Cu para manter uma elevada afinidade da Fet3 para o ferro promete uma forte relação de dependência entre estes dois íões metálicos.

Parece claro que existe uma complexa rede de fatores envolvidos na distribuição do Cu ao nível dos compartimentos celulares (Glerum et al 1996).

Outra proteína *chaperon* para o Cu foi identificada em modelos de estudo utilizando leveduras – Cox 17 – que desempenha um papel fundamental no transporte de Cu para a mitocôndria permitindo a respiração celular. (Beers et al 1997)

A Cox17 é uma proteína constituída por uma cadeia polipeptídica de 69 aminoácidos localizada no citosol e na membrana que envolve a mitocôndria. Contem sete potenciais locais para formação de ligações metálicas com o Cu. Sendo assim, as proteínas *chaperons* Atx1 e Cox17 são específicas para o transporte de Cu através dos compartimentos intracelulares, da via secretora ate à mitocôndria. (Cullota et al 1997)

Estas proteínas citosólicas conseguem incorporar o Cu através da Ccs (*Chaperon* de Cobre para a SOD) que viabiliza esta incorporação. A Ccs é uma proteína constituída por 249 aminoácidos que permite a incorporação de cobre na enzima Cu/Zn SOD. (Peña et al 1999)

O processo de transporte de Cu para esta enzima ainda não esta completamente esclarecido mas pensa-se que ocorre em duas fases distintas. Na primeira fase a Ccs pode coordenar o cobre através do local da ligação metálica com a Atx1. Numa segunda fase, ocorre uma interação proteína-proteína entre a Ccs e a Cu/Zn SOD facilitando a libertação do cobre da Ccs para formar uma nova ligação metálica com a enzima Cu/Zn SOD.

Dada a grande similaridade das estruturas presentes nas leveduras com as dos mamíferos (incluindo humanos), é muito provável que a distribuição celular de Cu ocorra de forma muito semelhante.

Por exemplo, já foram identificados homólogos humanos destas proteínas *chaperons* observadas nas leveduras. O homólogo humano da Atx1 é a Atox1 ou Hah1 e, como era de esperar, tem uma estrutura muito semelhante à Atx1 das leveduras. Reforçando o pressuposto do transporte de Cu ser muito idêntico. O homólogo da Ccs é hCcs, a qual também interage diretamente com a SOD (Klomp et al 1997), sugerindo similaridades bioquímicas entre estas proteínas. (Cullota et al 1997)

Um requisito essencial para a ligação metálica entre os *chaperons* e o Cu é manter os iões de Cu estáveis no complexo molecular formado e esta estabilidade tem de ser mantida ao longo de todo o transporte de Cu para o seu seguinte local de ligação. Ao mesmo tempo, ocorre um equilíbrio entre a estabilidade do complexo e a energia cinética atribuída a este mesmo complexo de modo a ter a habilidade de se deslocar a fim de realizar com sucesso a distribuição de Cu. (Peña et al 1999)

Ainda existem varias questões a clarificar sobre a estrutura dos *chaperons* de Cu, as suas funções e mecanismos de ação.

Por exemplo, a especificidade de cada *chaperon* já identificado para o seu alvo na distribuição sugere, talvez, a existência de mais *chaperons*, sendo possível que um *chaperon* exista para “assinalar” o local de entrada do Cu e acionar os factores de transcrição Ace1 e Mac1.

O mecanismo pelo qual os iões de Cu são transportados do plasma para os *chaperons* citosólicos sem permitir que os iões se libertem e circulem livres no citosol ainda não é conhecido.

É possível que os transportadores do plasma interajam diretamente com os *chaperons* do citosol ou talvez exista um receptor central que recebe todos os iões de Cu para depois serem incorporados pelos *chaperons*.

A especificidade de cada *chaperon* para o seu local de destino é intrigante, talvez exista algum tipo de competição entre os *chaperons* pelos iões Cu e que uma mudança no meio intracelular provocada por condições externas afete os níveis dos diferentes *chaperons* para o Cu e assim direcione o trajeto de cobre no interior da célula.

Por exemplo, a expressão do *chaperon* Atx1 é parcialmente regulada pelos níveis de ferro através de um sensor que controla os níveis de ferro (Aft1). Em condições em que o ferro está em níveis muito baixos, é possível que exista um aumento da expressão do *chaperon* Atx1, direcionando o cobre para a via secretória, aumentando a afinidade para a captação de ferro.

Também não está esclarecido se outras enzimas que contêm Cu (lisil-oxidase, dopamina e beta hidroxilase), têm os seus próprios *chaperons* ou se partilham os *chaperons* que lhes entregam o Cu com os *chaperons* que distribuem o Cu pelos organelos celulares.

Apesar de algumas questões ainda estarem a ser estudadas, a identificação destes *chaperons* de Cu já permitiu uma maior compreensão dos mecanismos pelos quais o Cu é distribuído na célula.

ATPases: ATP7B e ATP7A, CTR1 e Chaperons

As ATPases transportadoras de cobre (Cu-ATPases) são essenciais para o desenvolvimento do organismo. Estão envolvidas em numerosos processos biológicos que dependem do seu funcionamento adequado disponibilizando os íões Cu atempadamente. (Lutsenko et al 2007)

As Cu-ATPases são proteínas da membrana que necessitam da energia da hidrólise do ATP. Utilizam esta energia para transportar os íões Cu através da membrana celular. (Manto 2014)

O transporte de Cu serve para reduzir a concentração destes íões no meio intracelular e contribui para o controlo homeostático dos níveis de Cu no corpo.

Para além disto, as Cu-ATPases, apresentam outras funções importantes: entregam os íões de cobre à via secretora de modo a alcançar e a ser incorporado pelas enzimas cupro-dependentes, como é o caso da dopamina- β -hidroxilase, superóxido-dismutase, monoamina oxidase, citocromo-c-oxidase e outras.

De entre as Cu-ATPases destacam-se a ATP7A e a ATP7B, pertencentes à família PIB tipo P. A ATP7A existe na maioria dos órgãos, à exceção do fígado e está envolvida no transporte de Cu para o complexo de Golgi, onde o íão é incorporado pela enzima. É essencial para que o cobre consiga atravessar a barreira hemato-encefálica permitindo ao cérebro receber a quantidade de íões Cu necessários ao seu funcionamento. (Manto 2014)

A ATP7A é então essencial ao sistema nervoso central, as também ao sistema nervoso periférico, permitindo ao Cu alcançar outros órgãos.

A ATP7B, por sua vez, está envolvida na entrega de íões de cobre aos hepatócitos, situando-se na membrana apical.

Ambas ATPases podem ser recolocadas quando os níveis de cobre aumentam, de modo a facilitar a saída de Cu do meio intracelular.

A importância fisiológica das Cu-ATPases pode ser comprovada pelas consequências na sua inativação no metabolismo celular. Mutações nos genes que traduzem ATPases podem provocar patologias graves e, por vezes fatais, como é o caso da doença de Menkes.

Assim, entende-se que o controlo intracelular dos íões de Cu deve ser rígido e o equilíbrio homeostático deve ser mantido.

A CTR1, é uma proteína que transporta o cobre proveniente da dieta para o interior das células e é reguladora do fluxo de cobre. (Thiele et al 2009). Existe maioritariamente nas células intestinais, nas células endoteliais dos capilares cerebrais e no parênquima

cerebral. É uma proteína transmembranar que se movimenta com facilidade entre a membrana plasmática das células e o meio intracelular. Cerca de 80% do cobre absorvido é controlado por esta proteína.

Supõe-se que a CTR1 transporte apenas iões Cu^+ e não iões Cu^{2+} , pois em modelos de estudo com leveduras, a CTR1 necessita de uma metaloredutase como mediadora para exercer a sua função. Para além disto, a CTR1 controla o efluxo de cobre que alcança o cérebro. (Thiele et al 2009)

O fator de transcrição da CTR1 é o SP1 (Proteína Específica 1), que se adapta a diferentes valores da concentração de cobre. Quando a concentração intracelular de iões Cu aumenta a CTR1 é interiorizada pela membrana, passando a estar em contacto com o meio intracelular.

Mutações na CRT1 são fatais sugerindo que desempenha um papel vital no transporte de cobre para o embrião em desenvolvimento.

Por fim, os *chaperons* de cobre funcionam como um *shuttle*, regulam o tráfico de cobre no organismo. A Atox1 é um exemplo de *chaperon* do Cu, sendo principalmente expressa no cérebro, e entrega o cobre às Cu-ATPases ATP7A e ATP7B.

Supõe-se que desempenha um papel importante em estabelecer a ligação entre o cobre e as enzimas do qual é cofator.

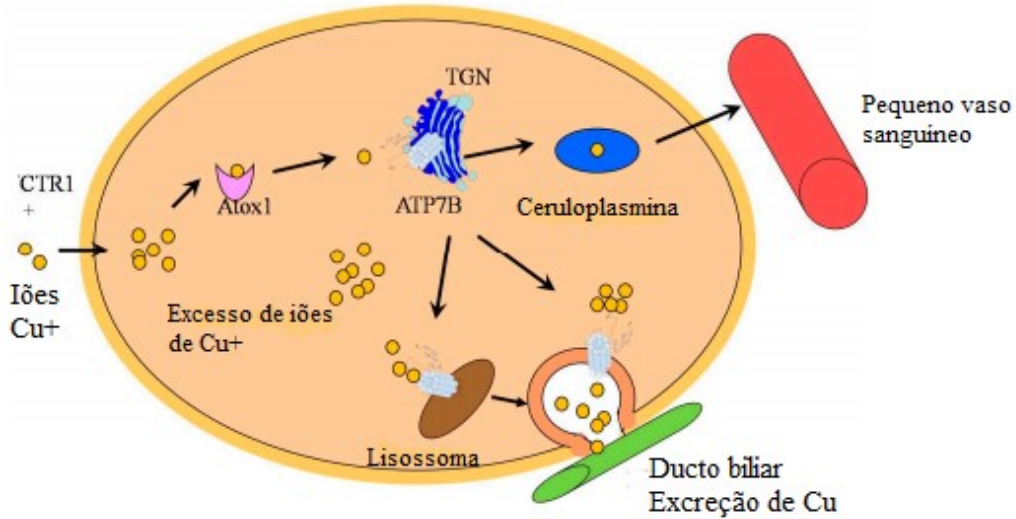
A CSC (*Chaperon* para o Cu/Zn SOD), e a COX17 (*chaperon* do citocromo-c-oxidase) são, também, maioritariamente expressas no cérebro. Sendo que a COX17 esté envolvida na maturação enzimática da citocromo-c-oxidase.

Esta proteína consegue ainda regular o transporte de fármacos utilizados em quimioterapia, como a cisplatina. (Manto 2014)

A CTR2 é uma homóloga da CTR1, contudo o seu perfil ainda está pouco estudado. Supõe-se que desempenha um papel na reciclagem do cobre no meio intracelular.

Este controlo é feito através da coordenação de varias proteínas, incluído as Cu-ATPases, a Ctr1, uma proteína com elevada afinidade para o cobre e pelo conjunto de pequenas proteínas transportadoras de Cu, as *metallochaperons* (Lutsenko et al 2008)

Figura 4. Iões de cobre no meio intercelular, adaptado de Wilson's Disease: A Comprehensive Review of the Molecular Mechanisms.



Os iões de cobre entram no meio intracelular (citossol) por meio da proteína transmembranar CTR1, já no citossol unem-se à Atox1, chaperon do Cu, que o transporta até ao TGN (*Trans-Golgi network*) onde alcança o lúmen com a ajuda da Cu-ATPases tipo P, a ATP7B. O cobre é, então, incorporado pela ceruloplasmina, a qual é seguidamente libertada no pequeno vaso sanguíneo. O excesso de cobre facilita a ação da ATP7B do TGN para o lisossoma, para depois o excesso de cobre ser excretado através do ducto ou canal biliar.

Os mecanismos envolvidos no transporte e distribuição de Cu são precisos e minuciosos. O seu funcionamento eficaz e eficiente está relacionado com complexas interações entre proteínas e transporte de iões, regulado através de respostas a variações na homeostase.

Excreção

O mecanismo pelo qual o cobre é eliminado do organismo ainda não está bem definido. Assume-se que a primeira via de eliminação de cobre é a biliar, a qual é produzida e excretada pelo fígado.

Este processo envolve a exocitose de Cu pelos lisossomas e a ligação do Cu a ATPases da membrana canalicular, pequeno canal de passagem onde a biliar, produzida pelos hepatócitos, é drenada. Apenas quantidades reduzidas de cobre são reabsorvidas depois da excreção biliar (Linder 1991).

O cobre de origem biliar é eliminado nas fezes, contudo as doses diárias reduzidas (Faila 2001). Esta excreção biliar varia (em pequena escala) de modo a manter a homeostase do cobre. Existem, ainda, quantidades vestigiais de cobre eliminadas através da urina e do suor, bem como, pela descamação da pele (Turnlund 1990).

Alguns estudos demonstram que a excreção de cobre endógeno é marcadamente influenciada pela quantidade de cobre obtido através da dieta. Quando a quantidade de cobre absorvido da dieta é baixa, só pequenas quantidades de cobre endógeno são excretadas. À medida que a quantidade de cobre obtido dos alimentos aumenta, a excreção de cobre endógeno aumenta também. (Turnlund 1998)

A regulação da absorção e da excreção endógena de cobre mantêm os níveis de cobre retidos pelo organismo controlados, protegendo-o contra deficiências ou toxicidade.

Fisiopatologia e aspetos clínicos da carência e excesso de Cobre

Fatores que condicionam a deficiência em cobre

A deficiência em cobre é encontrada maioritariamente em indivíduos sujeitas a nutrição parental sem suplementação mineral adequada ou em indivíduos com síndrome nefrótica que sofrem constantes perdas de Cu. (Hordyjewska et al 2014)

Níveis reduzidos de cobre no organismo durante o seu crescimento podem aumentar o risco de desenvolver algumas patologias, como é o caso de, má formação óssea, osteoporose, perda da integridade da síntese de melanina, enfraquecimento do sistema imunitário, aumentando a frequência de infeções, doenças cardiovasculares, alterações no metabolismo do colesterol e alterações no metabolismo de outros elementos, como o ferro. (Hordyjewska et al 2014)

Manifestações clínicas da deficiência em cobre são extremamente raras e, normalmente, existem devido a falhas nutricionais. (Uauy et al 1998)

Sintomas como neutropenia, anemias e aumento da fragilidade óssea são representativos de baixos níveis de cobre nos indivíduos. Parece, também, existir um impacto para o sistema imunitário quando os níveis de cobre estão baixos. (Hordyjewska et al 2014)

O cobre proveniente da dieta alimentar deveria ser suficiente para suprir as necessidades diárias deste elemento, contudo, se alguma alteração alimentar ou física for introduzida de modo a alterar a quantidade de cobre absorvido pode, então, ocorrer deficiência em cobre.

Estudos feitos em animais revelaram que a falta de Cu pode provocar doenças cardiovasculares, explicado parcialmente pela redução da atividade das enzimas cuprodependentes (em que o cobre é co-factor). Registaram-se, também, anomalias neurológicas associadas a estes níveis reduzidos de Cu.

Em humanos, especificamente em crianças, a deficiência em cobre provoca anemia hipocrômica e prejudica a formação de mielina nas células da medula óssea. Devido a um aumento da peroxidação lipídica o tempo de meia vida dos eritrócitos diminui, provocando danos hematológicos, sendo um dos primeiros sintomas neutropenia.

O número de granulócitos (basófilos, eosinófilos e neutrófilos) produzidos pela medula óssea também diminui, comprometendo o sistema imunitário. (Cordano 1998)

É pouco provável o desenvolvimento de efeitos teratogênicos nos humanos por deficiência em cobre. Contudo, algumas anormalidades no tubo neural (estrutura embrionária que dará origem à medula óssea e cérebro) e um aumento de anencefalia (anomalias no tubo neural caracterizada por ausência parcial do encéfalo, fatal para o feto) estão associadas à escassez de Cu durante a gravidez.

A importância do cobre para o desenvolvimento fetal tornou-se óbvia a partir de estudos realizados com animais. Verificou-se que animais com depleção de Cu demonstravam sintomas espasmódicos associados a paralisia e perda da integridade da estrutura da mielina. Supõe-se que estes sintomas estejam relacionados com a diminuição da atividade de enzimas dependentes do cobre como co-factor, sendo o caso da Citocromo-C-Oxidase interveniente na respiração celular.

Foram, ainda, identificados danos nos vasos sanguíneos, provavelmente consequência da diminuição da atividade da lisil-oxidase, com funções na síntese do colagénio e elastina, essenciais para manter a integridade vascular.

Algumas interações com outros elementos podem provocar deficiência de cobre, como é o caso de níveis excessivos de zinco (Zn). Quando o zinco está em excesso, ocorre

um aumento da expressão das metalotioneínas que capturam o Cu disponível, pois têm mais afinidade para o Cu do que para o Zn, o complexo Cu-MT é absorvido pelo lúmen sendo depois eliminado. (Jaiser et al 2010)

Algumas cirurgias ao trato gastrointestinal superior e cirurgias bariátricas (redução de peso) ao afetarem o duodeno e o intestino delgado, principais locais de absorção de Cu, reduzem, conseqüentemente, absorção de Cu. Se não for feita a profilaxia necessária, ocorrem situações de deficiência em cobre. (Winston et al 2010)

Saúde materna e desenvolvimento fetal

A ingestão diária de cobre deve aumentar ligeiramente durante a gravidez para valores de 0.9 a 1.0mg/dia (Institute of Medicine, Washington). Um feto totalmente desenvolvido adquire através da mãe 15mg de Cu, dos quais 9mg ficam armazenados no fígado (Ralph 2001).

A dieta alimentar da mãe, a absorção e transporte de Cu para o útero e da placenta para o feto são fatores que influenciam a disponibilidade de Cu para o desenvolvimento fetal.

Situações de grande deficiência nos níveis de Cu durante a gravidez podem levar a problemas do desenvolvimento fetal, provocando atraso mental, teratogênese e morte do feto (Ralph 2001). Fetos e recém-nascidos que sofreram privação crônica de cobre durante a gestação são, normalmente, caracterizados por anomalias no desenvolvimento do tecido cognitivo e pulmões, bem como, deficiências ósseas (Keen 1998).

Durante a gravidez pode ainda ser induzida uma deficiência em cobre devido a uma ingestão excessiva de zinco (antagonista do cobre durante a absorção). Para prevenir esta situação recomenda-se a ingestão simultânea de 2,0 mg de cobre juntamente com os suplementos de zinco, mantendo o equilíbrio entre os efeitos do zinco e a homeostase do cobre (Institute of Medicine) (National Academy of Sciences 2001).

No líquido amniótico e no leite materno tanto o cobre como a ceruloplasmina estão presentes e alguns estudos sugerem que a ceruloplasmina pode estar presente neste líquido de modo a servir como uma fonte adicional de Cu para feto, para além do cobre proveniente da ingestão materna.

Foram realizadas algumas experiências laboratoriais utilizando ratos fêmeas grávidas às quais foram injetados um complexo Cu-Ceruloplasmina (correspondente a 4 nanogramas de cobre) no líquido amniótico: uma hora depois os resultados foram analisados e ocorreu armazenamento de Cu do complexo Cu-ceruloplasmina no fígado do feto. Este facto pode sugerir que a ceruloplasmina pode, também estar presente no leite

materno, onde será o modo preferencial de disponibilizar Cu para absorção no meio intestinal do recém-nascido. Assume-se ainda que a ceruloplasmina pode desempenhar um papel relevante no transporte de Cu do leite materno para o recém-nascido (Linder et al 1998).

Durante a lactação, a mãe, deve aumentar a ingestão de Cu cerca de 1.3mg/dia (Institute of Medicine 2001). Enquanto as concentrações de Cu no leite materno diminuem com o tempo, o Cu e a ceruloplasmina de bebês alimentados a leite materno aumenta de forma constante (Ralph 2001). Os níveis de Cu do leite materno são mais baixos do que muitas das fórmulas para bebês que têm como base leite de vaca ou leite de soja, contudo a absorção de Cu a partir da amamentação é significativamente superior (Ralph 2001) (USDA).

Ossos e na pele

Enzimas dependentes do cobre desempenham um papel importante na saúde dos ossos e da pele, por exemplo, uma deficiência na tirosinase provoca albinismo (distúrbio congênito caracterizado por ausência de pigmentação da pele, olhos e cabelos). Simultaneamente, deficiências em cobre provocam alterações na estrutura desta enzima dando origem a problemas de despigmentação em várias espécies de animais e nos humanos, onde se manifesta através da doença de Menkes (Turnlund 1999).

O cobre é essencial para a formação do tecido reticulado entre o colagénio e a elastina, permitindo a construção de um tecido conjuntivo forte e flexível. Este tecido depende também da atividade da enzima lisil-oxidase, a qual necessita do cobre para desempenhar a sua função. Assim, uma deficiência em cobre pode ser responsável pela perda de estrutura e massa óssea (Eaton-Evans 1996).

Experiências realizadas em animais demonstraram que níveis baixos de Cu no organismo provoca um aumento da fragilidade óssea, caracterizada por ossos leves, finos e quebradiços. Sugerindo que existem alterações no tecido reticulado de colagénio e elastina (Peña 1999).

Uma diminuição na atividade de outras enzimas dependentes do Cu podem estar envolvidas na alteração da estrutura óssea. Os osteoclastos, células ósseas envolvidas na reabsorção, produzem Superóxido dismutase Cu/Zn (Cu/Zn SOD) durante este processo. Uma diminuição na produção desta enzima devido a uma escassez na biodisponibilidade de Cu leva ao aumento da reabsorção óssea (Eaton-Evans 1996).

O cobre é necessário ao longo de toda a vida sendo indispensável para o ciclo de vida dos ossos – formação, reabsorção e metabolismo. Logo, a deficiência crónica em Cu

é uma causa, muito provável, de fraturas na anca relacionadas com osteoporose, sendo mais comuns após a menopausa.

Sistema Nervoso e cérebro

O cobre desempenha várias funções no sistema nervoso central (SNC), particularmente no tecido cerebral. A concentração de cobre no cérebro humano é relativamente alta em comparação com outros mamíferos e a sua distribuição depende da região do cérebro e de outros fatores externos (Prohaska et al 1997).

O cobre é necessário para a formação e manutenção da mielina, que constitui a camada protetora dos neurónios.

A mielina é composta por fosfolípidos cuja síntese depende da SOD (Cu/Zn SOD), uma cupro-enzima. Uma deficiência em cobre resulta na diminuição da produção de mielina e, conseqüentemente, necrose do tecido cerebral

Para além do mais, o papel da SOD no metabolismo das catecolaminas indica que o cobre é essencial para o decorrer normal do funcionamento cerebral (Turnlund et al 1999).

O cobre acumula-se no cérebro do bebé durante a fase final da gravidez e durante a fase inicial da lactação. Mudanças na biodisponibilidade do cobre durante a gestação podem produzir um grande impacto na concentração de Cu no tecido cerebral do recém-nascido. (Prohaska et al 1997)

Estudos feitos em ratinhos sugerem que existe uma fase no desenvolvimento embrionário onde a falta de cobre pode causar danos no desenvolvimento cerebral e, isto, apenas pode ser evitado se nos primeiros sete dias desta fase crítica provocada pela escassez de Cu forem administradas doses de cobre. Contudo, a falta de cobre durante mais de dez dias consecutivos, provoca danos irreversíveis no desenvolvimento cerebral dos ratinhos. (Dank 1988).

Estudos em ratinhos privados de cobre durante o período perinatal apresentam deformações e um comportamento anormal mesmo depois de ingerirem as doses corretas de cobre durante os seis meses após o nascimento (Keen et al 1998), verificando-se que mesmo com a ingestão das doses certas de Cu os níveis das cuproenzimas no cérebro podem manter-se em níveis muito baixos durante o longo período de tempo.

O desenvolvimento de anomalias cerebrais devido à deficiência em cobre pode ter como causa vários fatores, incluindo diminuição dos níveis da Cu/Zn SOD no cérebro, um aumento do *stress* oxidativo, danificando proteínas e ácidos nucleicos, diminuição da

atividade da enzima Cu/Zn SOD (porque existe em níveis muito baixos), alterações na angiogênese e integridade vascular comprometida. (Peña et al 1999).

Como consequência, apenas uma quantidade muito reduzida de Cu alcança o cérebro do feto e os outros tecidos em desenvolvimento. Assim, o desenvolvimento neurológico raramente avança para além das seis/oito semanas e com o tempo também essas funções são perdidas. Os efeitos da Doença de Menkes começam na formação do feto no útero e são normalmente fatais na infância. (Ralph 2001)

O cobre desempenha, ainda, um papel muito importante na defesa antioxidante das células. Por exemplo, Atox 1, uma proteína *chaperon* do cobre, foi identificada como supressora do dano oxidativo provocado pelas funções enzimáticas da enzima Cu/Zn SOD. Aparentemente, a Atox1 protege as células do dano oxidativo (Kelner et al 2000)

Muitas doenças neurológicas nos humanos foram associadas a mudanças provocadas por danos oxidativos, incluindo a ELA, doença de Parkinson e doença de Alzheimer.

Apesar de ser pouco comum, o cobre pode promover estados oxidativos quando está em níveis excessivos.

Especula-se que radicais livres induzidos pelo cobre contribuam para a neurodegeneração que caracteriza a Doença de Alzheimer (Prohaska et al 1997), visto que uma das principais causas da degeneração neuronal envolve danos oxidativos (Patel et al 2000)

Mudanças no estado oxidativo de cobre alteram a atividade da enzima Cu/Zn SOD, que tem como função proteger o SNC.

Alterações na expressão genética provocadas por irregularidades do metabolismo do Cu também podem afetar o SNC. No caso da Doença de Wilson, uma doença autossômica recessiva, caracterizada por um excessivo armazenamento de cobre, provocando, a acumulação de cobre no cérebro, fígado e córnea. (Turnlund 1999)

A terapêutica recomendada passa pelo uso de um quelante, D-penicilamina, que é eficaz na remoção do excesso de Cu e previne o seu rearmazenamento.

Indivíduos com aceruloplasmina (níveis reduzidos de ceruloplasmina) sofrem de armazenamento excessivo de ferro em vários órgãos, incluindo o cérebro, onde conseqüentemente, causa a degeneração dos tecidos.

Como já foi referido anteriormente, a ceruloplasmina é uma enzima que contém iões cobre na sua constituição e necessita destes iões para desempenhar a sua atividade

com eficácia, transporte de ferro e uma importante função oxidante. Sem os iões de cobre presentes esta enzima tem as suas funções comprometidas.

Assim, existe uma acumulação de ferro nos órgãos, em especial no cérebro e consequentemente danos celulares.

Alguns fármacos quelantes conseguem acelerar a captação de Cu por parte do SNC de modo, a que os iões de cobre possam incorporar a ceruloplasmina e aumentar o seu nível na circulação sanguínea (Prohaska 1997).

Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer (DA) é caracterizada pela alteração de vários processos celulares, como por exemplo, alterações no *stress* oxidativo, inflamação dos neurónios e no metabolismo de produção de energia. (Hordyjewska et al 2014)

As principais características histopatológicas desta doença estão associadas às placas senis e aos novos neurofibrilares, relacionados com a deposição excessiva de β -amiloide. (Bird 1998)

As zonas do cérebro mais afetadas são o córtex cerebral, o hipocampo, encéfalo frontal e a amígdala, resultando em atrofia do cérebro. (Campos et al 2015)

Os aspetos clínicos mais comuns dos indivíduos com DA são a perda de memória, alterações na personalidade e de comportamento, perda de funções executivas como a atenção, planeamento, flexibilidade e raciocínio abstrato. (Bird 1998)

A quantidade de cobre no cérebro de um indivíduo saudável é entre 7 a 10% da totalidade de Cu no corpo humano e localizam-se no hipocampo e na substância *nigra*.

Estudos recentes demonstram que alterações no equilíbrio homeostático de alguns iões metálicos como o zinco, ferro, alumínio e cobre desempenham um papel relevante na patologia de DA. (Hordyjewska et al 2014)

É, particularmente, importante manter o equilíbrio homeostático do cobre, pois sendo um metal de transição envolvido em vários eventos metabólicos como co-factor de várias enzimas previne actividade excessiva por parte dos receptores N-metil-aspartato, responsáveis pelos receptores excitatórios neurotransmissores.

Os níveis de cobre no plasma vão aumentando com a idade e são muito elevados em indivíduos com DA.

Alguns autores demonstraram que iões livres de cobre (iões Cu^{2+} não ligados à ceruloplasmina) estão em níveis elevados em indivíduos com DA, existindo uma relação de proporcionalidade direta entre o aumento dos níveis de Cu em relação a perda de funções cognitivas. (Hordyjewska et al 2014)

Outros estudos tentam suportar a teoria que o cobre tem a capacidade de promover a agregação das moléculas de β amiloide, pois, de facto, as placas senis de doentes com DA registam níveis de Cu muito elevados.

Alguns estudos, referem ainda, que a proteína precursora da amiloide, na qual já foram identificados domínios de ligação metálica a iões Cu, pode sofrer alterações com efeitos na produção da β amiloide. Estes erros podem ser provocados, de alguma forma, pela ligação do cobre ao seu domínio.

O *stress* oxidativo induzido por iões metálicos e também considerado um precursor dos danos neurodegenerativos na DA. (Noda et al 2013)

Como o cobre é um ião metálico com capacidades redox, alterações na sua homeostase podem dar origem a condições favoráveis para a produção de radicais livres conduzindo a danos oxidativos em regiões mais suscetíveis do cérebro, onde substratos oxidados se ligam com facilidade. (Hordyjewsk et al 2014)

A natureza dicotónica do cobre, Cu(I) e Cu (II), obriga a uma regulação apropriada no seu nível de distribuição no cérebro prevenindo interações com outros componentes celulares.

O cobre pode iniciar e propagar eventos inflamatórios e pode, então, contribuir para o aumento da proteína precursora da amiloide. A relação entre o cobre e um fenótipo da doença de Alzheimer parece evidente. (Manto 2014)

Doenças de Parkinson

É uma das doenças neurodegenerativas mais comuns, caracterizada por distúrbios involuntários nos movimentos, problemas na função motora, tremores, rigidez, bradicinesia (diminuição da capacidade de movimento).

A fisiopatologia inclui degradação dos neurónios dopaminérgicos e acumulação de corpos de Lewy, associados a mutações na α -sinucleína (proteína expressa no sistema nervoso central). (Desai et al 2008)

A α -sinucleína tem a capacidade de se ligar a iões cobre e, assim, promover a contribuição do ferro (exerce a função de uma ferroxidase) para a formação de radicais livres. A agregação destes complexos pode ser uma das hipóteses a considerar na origem desta patologia. (Manto 2014)

Supõe-se que um dos efeitos da agregação de α -sinucleínas seja o dano oxidativo, provocando degradação das células neuronais.

In vitro, o cobre é o ião mais efetivo a favorecer a agregação destas proteínas prometendo uma relação entre a doença de Parkinson e a homeostase do cobre. (Desai et al 2008)

Estudos ambientais sugerem uma correlação entre uma exposição prolongada ao cobre e ao manganês com o risco de desenvolver doença de Parkinson. (Manto 2014)

Tabela 8. Evidências da participação do cobre na patogênese de doença de Alzheimer e da doença de Parkinson, adaptado de “Abnormal Copper homeostasis: mechanism and roles in neurodegeneration”.

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------|
| Doença de Alzheimer | Doença de Parkinson |
| Agregação β -amiloide | Produção excessiva de radicais livres |
| <i>Stress</i> oxidativo | Disfunções nas mitocôndrias |
| Eventos inflamatórios | Eventos inflamatórias |
| Deterioração na neurotransmissão | Alterações da homeostasia de metais |
| Alterações no metabolismo | Exposição a poluentes ambientais |

Stress oxidativo

O cobre existe no organismo em dois estados de oxidação: Cu^+ e Cu^{2+} , o que permite a sua funcionalidade como cofator em várias reações metabólicas com características redox.

É, por exemplo, cofator da enzima citocromo-c-oxidase, envolvida na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, é também cofator, da enzima superóxido dismutase que atua na neutralização de espécies reativas de oxigênio.

Um excesso de cobre pode resultar em situações de *stress* oxidativo que, consequentemente, provocam danos no organismo. (Win-Shwe et al 2011)

O excesso de cobre vai facilitar a danificação dos tecidos celulares como é sugerido pela reação de *Fenton*. Esta reação tem relevância pois envolve a criação de radicais livres por meio por moléculas presentes no organismo (*in vivo*). Iões de metálicos como o ferro e cobre podem doar ou aceitar elétrons através de reações intracelulares e contribuir para a formação de radicais livres.

O cobre intracelular está em forma Cu^{2+} , participando, assim, na reação de *Fenton* dando origem a Cu^{3+} e a H_2O_2 . Os iões superóxido e os iões metálicos atuam de forma sinérgica provocando danos por radicais livres. (Halliwell and Gutteridge 1992)

Contudo, a deficiência em cobre também pode afetar os componentes que constituem a defesa antioxidante do organismo, resultando num aumento das reações *Fenton* que formam os radicais livres, o que se traduz num aumento do dano oxidativo que afeta os lípidos, as proteínas e o DNA. (Hordyjewska et al 2014)

O cobre na forma Cu(I) pode ligar-se diretamente aos tióis de cisteína ou de metionina livres, conduzindo à sua oxidação, alterando a sua factividade proteica. O íão Cu(II) tem maior afinidade para doadores de azoto (N) como a histinida, ou doadores de oxigênio (O) como o glutamato, provocando também a oxidação destes elementos. (Hordyjewska et al 2014)

Doença cardiovascular

É difícil afirmar que apenas a falta ou excesso de um único nutriente é responsável por uma doença cardiovascular (DCV). Provavelmente, a DCV é provocada por uma combinação de excessos e/ou deficiências de vários agentes que contribuem para a aterosclerose, fatores que influenciam a formação de ateromas nas paredes internas das artérias. (Angelova et al 2011)

Aproximadamente 35 alterações anatómicas foram identificadas provocadas pela deficiência em cobre, entre elas: degeneração da elasticidade dos tecidos, fragmentação das artérias, hipertrofia cardíaca, degeneração do músculo liso das artérias, aneurismas ventriculares (Klevay 2000).

De facto, o cobre é um elemento raramente presente quando se discutem as DCV. Contudo tem um papel fundamental, sendo, por exemplo, um elemento chave que mantém a integridade do tecido conjuntivo do coração e do sistema vascular.

Quando a atividade da lisil-oxidase diminui drasticamente pode resultar em danos na formação deste tecido conjuntivo comprometendo a integridade do sistema cardiovascular. (Turnlund 1999)

A influência do cobre na função cardíaca tem vindo a ser estudada por vários autores. Um estudo que envolveu homens adultos sujeitos a uma dieta baixa em cobre levou ao desenvolvimento de arritmias, sugerindo que um nível consecutivamente baixo de cobre proveniente da dieta pode levar a alterações na função cardíaca e contribuir para o desenvolvimento de DCV. (Klevay 2000)

Um dos fatores conhecido para a aterosclerose é a hipercolesterolémia, especialmente em conjunto com níveis elevados de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Alguns autores sugerem uma relação entre a hipercolesterolémia e a falta de cobre. A hipercolesterolémia provocada por níveis baixos de Cu no organismo já foi identificada em cerca de 25 espécies. (Klevay 2000)

O desenvolvimento de aterosclerose pode estar relacionado com processos que envolvem peroxidação lipídica (radicais livres) e modificações oxidativas das LDL.

No caso da aterosclerose, as LDL presentes nas paredes das artérias estão oxidadas de modo a atrair macrófagos, provocando as lesões. (Fields 1999)

A deficiência em cobre esta associada a um aumento da suscetibilidade das LDL de oxidarem provocando danos nas artérias.

Apesar das células possuírem mecanismos eficientes para se protegerem contra este danos oxidativos, como moléculas com propriedades antioxidantes, estas defesas podem ser sobrecarregadas e tornarem-se ineficazes.

O aumento da suscetibilidade das LDL à peroxidação, em casos de deficiência em cobre, deve-se a uma defesa antioxidante inadequada, com redução da atividade da enzima Cu/Zn SOD. (Fields 1999)

Em indivíduos com diagnóstico recente de hipertensão registaram-se baixos níveis de cobre no plasma e baixa atividade da enzima Cu/Zn SOD, bem como elevados níveis de peroxidação. (Klevay 2000)

Apesar dos estudos sobre a influência do cobre nas DCV, parece óbvio que o ião cobre desempenha um papel vital em manter a saúde cardiovascular.

Mielopatia

O cobre é um ião metálico que actua como co-factor de várias enzimas e é igualmente essencial para estas enzimas manterem a sua integridade estrutural e funcional. (Wintson et al 2010)

O cobre é, também, essencial para manter a estrutura e integridade da medula óssea e do sistema nervoso. A deficiência em cobre pode ser responsável por provocar anemia e, mais raramente, outras citopenias como leucopenia e trombocitopenia.

Só nos últimos dez anos começaram a realizar-se estudos para associar a deficiência em cobre com alguns casos de mielopatia. Através de estudos feitos em ratinhos verificou-se que é muito difícil de distinguir, por meio de imagiologia ou radiologia, a mielopatia provocada por deficiência em vitamina B12 da mielopatia provocada por deficiência em cobre. (Jaiser 2010)

Contudo, existem alguns sintomas que podem ajudar a diferenciar estas duas causas de mielopatia. Em situações em que uma deficiência em cobre no organismo compromete a medula espinal e provocando perda gradual dos movimentos, identificam-se alguns sintomas característicos como a neuropatia periférica, doenças do neurónio motor (grupo de patologias que afetam seletivamente os neurónios motores), miopia, desmielização cerebral, disfunção cognitiva e neuropatia do nervo ótico. (Kumar 2006)

A mielopatia por deficiência em cobre (MDC) deve ser clinicamente diferenciada dos outros casos de mielopatias. Para atribuir um diagnóstico correto de MDC o indivíduo deve apresentar análises com um nível sérico baixo de Cu e de ceruloplasmina. Outros sintomas que ajudam a definir este diagnóstico são, por exemplo, citopenias, leucopenias e anemias.

O risco de adquirir MDC aumenta com a diminuição da eficiência em absorver Cu. Situações como operações/cirurgias do trato superior do intestino delgado, excesso de zinco, suplementos de ferro e hemodiálise contribuem para a mielopatia por deficiência em cobre.

Depois de uma cirurgia bariátrica, considerada como um fator de risco, é necessário fazer vigilância dos níveis de Cu e, em algumas situações, é aconselhado o tratamento profilático com suplementos de Cu. (Jaiser et al 2010)

Com o restabelecimento dos níveis de Cu as patologias hematológicas resolvem-se rapidamente e, na maioria dos casos, na sua totalidade.

Em contrapartida, os danos neurológicos são dificilmente reversíveis, estabilizando em 50% dos casos. Sendo assim, é vital um diagnóstico bem definido, de modo a evitar danos neurológicos irreversíveis. (Jaiser et al 2010)

Priões

Os priões são compostos desprovidos de ácidos nucleicos e, aparentemente, são constituídos exclusivamente por uma proteína modificada, a PrP^{SC}.

Esta proteína prião, PrP^{SC}, surge da proteína PrP celular normal (PrP^C) quando esta adota uma conformação alterada.

Todas as doenças provocadas por priões envolvem a modificação da proteína PrP^C e apresentam sintomas como distúrbios genéticos, infecciosos ou apenas esporádicos. Priões são então proteínas com capacidade de invadir um hospedeiro, alcançando o seu sistema nervoso central e destruindo-o progressivamente. Constituem um grupo de agentes infecciosos patogênicos, responsáveis por doenças neurodegenerativas fatais, denominadas de doenças priônicas. (Prusiner 1998)

É a própria acumulação da proteína modificada PrP^{SC} que causa neurodegeneração

A PrP^C e a PrP^{SC} são muito semelhantes com sequências primárias idênticas e, ainda não foi identificada nenhuma modificação pós-translacional relacionada com a patogênese.

A única diferença entre ambas ocorre numa estrutura secundária. A PrP^C e a PrP^{SC} são compostas por dois domínios, um deles corresponde a uma região N-terminal com

capacidade para estabelecer ligações metálicas com os íons de cobre Cu^{2+} . Supõe-se, que a PrP^{C} seja dependente destes íons cobre para manter a sua estrutura conformacional e, conseqüentemente, a sua correta funcionalidade. O cobre oferece, então, uma estabilidade conformacional à PrP^{C} quando de liga ao seu domínio em N-terminal. Esta estabilidade é essencial para não adotar uma conformação alterada, adquirindo a sua forma patogénica, PrP^{SC} .

A estrutura secundária da PrP^{C} é constituída por um elevado número de hélices α e um número mais reduzido de folhas β pregueadas. Por sua vez, a PrP^{SC} apresenta maior número de folhas β paraquedas em relação há quantidade de hélices α . Supõe-se que esta alteração conformacional na estrutura secundária da PrP normal que cause a patogénese.

Estudos realizados já demonstraram que o cobre estimula a endocitose da proteína príão PrP^{SC} : os íons Cu(II) ligam-se repetidamente à proteína promovendo a sua endocitose (forma de transporte ativo pela qual a célula transporta moléculas para o seu interior).

Os íons de Cu facilitam a renaturação das moléculas de guanidina presentes na proteína alterada contribuindo para a formação de PrP^{SC} , estando também a sua endocitose favorecida, esta proteína príão patogénica alcança os endossomas acumulando-se no seu interior, provocando neurodegeneração.

Foi descrita também uma relação entre a expressão da PrP^{C} e uma melhor captação dos íons Cu^{2+} , provavelmente a existência de níveis excessivos de íons cobres livres pode contribuir para a formação de PrP^{SC} ; sendo, aparentemente, essencial para a estabilidade da PrP^{C} níveis adequados dos íons cobre no meio.

A expressão correta da PrP assegura também uma resistência mais eficaz aos danos oxidativos e à toxicidade que pode advir dos íons de cobre.

Aparentemente, o papel dos íons cobre na patogénese da proteína príão é bastante complexo. O cobre pode ter a capacidade de alterar a estrutura da PrP normal mas, por outro lado, uma maior (ou até excessiva) biodisponibilidade de Cu pode aumentar o *stress* oxidativo o que induz a formação de PrP normal para combater os danos oxidativos. (Win-Shwe et al 2011) (Desai et al 2008)

Diabetes Mellitus

As diabetes mellitus são um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia causada por defeitos na secreção de insulina e/ou na acção da insulina.

Os níveis crônicos elevados de hiperglicemia em indivíduos com diabetes estão associados a danos e a disfunções em vários órgãos: olhos, rins, coração, sistema nervoso e vasos sanguíneos.

As diabetes mellitus são identificadas com frequência em indivíduos com aceruloplasmina (níveis baixos de ceruloplasmina do sangue). Supõe-se que nestas situações, as diabetes sejam uma consequência do aumento dos níveis de ferro e, conseqüentemente, acumulação dos íons ferro no pâncreas devido à diminuição da atividade das peroxidases. As peroxidases, como é o caso da enzima cupro-dependente citocromo C, têm um papel essencial na desintoxicação dos tecidos, eliminando o peróxido de hidrogênio (espécie reativa). Uma diminuição da biodisponibilidade de Cu, pois ao não ser transportado pela ceruloplasmina até as células nunca vem a incorporar o citocromo C, não podendo este, por sua vez, exercer a sua função antioxidante nos tecidos do pâncreas.

Alterações no transporte e distribuição do cobre podem ainda afetar o metabolismo da glicose e vice-versa, ou seja, alterações no metabolismo da glicose podem alterar o caminho percorrido pelos íons cobre.

Estudos realizados em ratos, revelaram que se um rato é afetado pelas diabetes mellitus os valores de concentração de Cu são substancialmente superiores aos de um indivíduo saudável. Isto acontece devido a um aumento da síntese de metalotioneínas.

A presença de íons cobre no sangue aumenta a taxa de glicolização dos hidratos de carbono às moléculas recetoras (lípidos, proteínas, algumas enzimas) o que provoca as complicações associadas as diabetes.

Concentrações de cobre no plasma parecem ser mais elevadas em doentes diabéticos do que em indivíduos saudáveis. E entre os doentes diabéticos, aqueles com sintomas associados a complicações das diabetes mellitus como retinopatia, hipertensão e doenças cardiovasculares tem níveis de concentração de Cu superiores. (Hordyjewska et al, 2014)

Angiogénese e cancro

A angiogénese consiste num mecanismo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de outros pré-existentes.

A formação de novos tecidos que necessitam de ser alimentados por novos vasos sanguíneos é uma situação normal onde a angiogénese é essencial.

Contudo, o mecanismo de formação de novos vasos sanguíneos pode tornar-se uma preocupação quando ocorre em tumores alimentando-os e sustentando-os. (Finney et al 2009)

Os novos vasos sanguíneos permitem as células tumorais saírem do local inicial e a alcançarem diferentes órgãos através da corrente sanguínea.

O papel do cobre no crescimento e desenvolvimento de tumores tem sido alvo de muitos estudos. Visto que, os íons cobre geram radicais livres os quais contribuem para a proliferação celular.

De um modo geral, as células cancerígenas, necessitam de uma maior concentração de íons Cu de modo a crescerem e a aumentarem o seu metabolismo.

Assim, agentes que afetam a homeostase do cobre são relevantes para a terapêutica cancerígena.

Elevada concentração de Cu é encontrada no plasma e tecidos de vários tumores humanos: linfoma de Hodgkin's, linfoma, leucemia, sarcoma, tumores cerebrais, pulmão, peito e fígado. Foi também identificado que os níveis de concentração de Cu diminuem quando o tumor entra em remissão ou é removido.

O cobre é essencial para a angiogénese, assim como muitas moléculas promotoras da angiogénese parecem depender de valores de concentração de Cu normais.

A angiogénese é um processo complexo, essencial para a reconstituição de tecidos mas também para o crescimento e manutenção de tumores. (Finney et al 2009)

Estudos *in vitro* revelaram que o cobre atua promovendo a angiogénese, contribuindo para a proliferação das células tumorais. Limitar a biodisponibilidade de Cu, usando um quelante que implique transportar o Cu diretamente para a via eliminatória e modo a diminuir a concentração dos íons Cu pode diminuir também a taxa de desenvolvimento do tumor. (Hordyjewska et al, 2014)

Estudos demonstram que uma dieta com privações de Cu (deficiência em Cu) inibe a resposta de vários promotores da angiogénese reduzindo o crescimento e as propriedades nocivas do tumor. (Finney et al 2009) (Hordyjewska et al, 2014)

Resposta Inflamatória

As citocinas são conjunto de proteínas que regulam as células do sistema imunitário, regulando por exemplo, a resposta inflamatória.

Recentemente, verificou-se que estas citocinas, as IL-2, são cupro dependentes.

No decorrer do processo inflamatório, o metabolismo do Cu é alterado e a concentração de Cu no plasma aumenta.

O cobre é essencial para o processo da resposta inflamatória, produção de IL-2 (interleucinas produzidas pelos linfócitos T), suporta a atividade e eficiência da imunidade influenciando os linfócitos T. (Hordyjewska et al, 2014)

Toxicidade

Existem dois tipos diferentes de toxicidade por excesso de cobre: toxicidade aguda e toxicidade crônica

A toxicidade aguda traduz-se por fatores gastrointestinais e, em casos mais severos, em coma podendo causar a morte.

Quando a toxicidade é crônica os sintomas são prologando ao longo do tempo, provocando, danos em órgãos chave para o metabolismo do Cu e pode depender de uma predisposição genética. (Schümann et al 2002)

Toxicidade aguda

A ingestão de uma quantidade excessiva de cobre é, relativamente, pouco tóxica para indivíduos adultos.

As intoxicações agudas por cobre têm sido registradas como acidentais, exposição ao Cu através do meio ambiente ou da ocupação profissional. Tubagens da distribuição da água potável, material de cozinha, pilulas contraceptivas, dispositivos anticoncepcionais intrauterinos, suplementos alimentares, compostos químicos adicionados às piscinas são alguns exemplos de fontes de Cu para além dos alimentos, que podem contribuir para situações de toxicidade aguda.

Algumas atividades profissionais, tais como, canalizadores, soldadores, operários fabris que trabalham na presença de – Cu correm um risco mais elevado de intoxicação aguda. Agricultores que usam pesticidas com Cu na sua composição também pertencem a este grupo de risco.(Gaetke et al 2014)

Os sintomas provocados por intoxicação aguda são: dor no estomago, náuseas, vômitos e diarreia. (Schümann et al 2002)

Estes dois últimos sintomas, apesar de desconfortáveis, ajudam a eliminar (expelir do organismo) o excesso de Cu.

Contudo, em situações excepcionais podem registrar-se manifestações mais graves: oligúria, necrose hepática, colapso vascular, coma e morte.

A inalação de gases com Cu irrita o trato respiratório superior podendo provocar mal-estar, dores de estomago e diarreia. (Schümann et al 2002)

A ingestão diária de cobre varia bastante entre os indivíduos dependendo da sua dieta alimentar, bem como de fatores ambientais., como já foi referido.

De um modo geral uma dieta normal contem entre 1 a 5 miligramas de cobre, quantidade suficiente para não provocar situações de deficiência nem de excesso.

Determinar o nível máximo limite antes de atingir valores tóxicos é mais difícil do que pode parecer. Existem uma variedade de fatores externos e endógenos para além da alimentação diária que ditam a quantidade total de cobre ingerida. É possível que os valores máximos admitidos variem entre indivíduos sendo difícil estabelecer um valor fixo a partir do qual definir a toxicidade. (Gaetke et al 2014)

A WHO recomenda como dose máxima diária 10mg para mulheres e 12mg para os homens.

Toxicidade crónica

Intoxicações crónicas provocadas pela dieta alimentar são extremamente raras.

A toxicidade crónica é caracterizada por um acumular de Cu ao longo do tempo, em órgãos específicos, essencialmente o fígado. (Schümann et al 2002)

Os sintomas clínicos de toxicidade crónica de cobre são menos evidentes e só aparecem quando a capacidade dos hepatócitos para “sequestrar” o Cu é excedida, provocando hepatite, cirrose, icterícia e, em casos mais raros, hemólise. (Gaetke et al 2014)

Em indivíduos com a doença de Wilson, existe uma acumulação de cobre (crónica) no fígado e cérebro e observam-se sintomas hemolíticos, neurológicos e insuficiência renal e hepática.

O consumo de fórmula de substituição de leite materno para bebés em fase de amamentação armazenado em contentores compostos com minerais de cobre contaminou a fórmula láctea provocando uma doença caracterizada pela acumulação massiva de cobre no fígado, a Cirrose Infantil Indiana. (Hordyjewska et al, 2014)

Alguns indivíduos são mais suscetíveis a intoxicações crónicas devido à manifestação de alterações genéticas que contribuem para a acumulação de Cu nos tecidos, especialmente no fígado e cérebro. (Gaetke et al 2014)

Mecanismos de toxicidade

A maioria dos organismos possui uma combinação de mecanismos que regulam a absorção, distribuição, transporte e metabolismo dos iões metálicos, nomeadamente dos

iões de cobre. Protegendo, assim, organismo da toxicidade inerente aos iões metálicos. (Gaetke et al 2014)

Estes mecanismos regulam o equilíbrio homeostático dos metais através da ligação destes metais a proteínas, com funções de cofator em enzimas, ou para sinalizar a ativação de transcrição.

A existência de uma rede transportadora de iões metálicos, composta essencialmente por *chaperons* controla a homeostase do Cu e assegura que os iões Cu alcançam as proteínas que deles dependem evitando danos nos tecidos. (Manto 2014)

Para além destes mecanismos, alguns estudos reuniram outras hipóteses que ajudam a evitar danos induzidos por radicais livres que podem advir da toxicidade do Cu.

Recentemente, demonstrou-se que alterações no metabolismo lipídico, na expressão genética de genes hepáticos, na agregação da proteína alfa-sinucleína, na ativação da esfingomielinase ácida, na distribuição hepática de cobre e alterações na interação metal-proteína desempenham um papel importante na temática dos mecanismos de toxicidade do cobre. (Gaetke et al 2014)

Danos oxidativos induzidos por radicais livres

Metais de transição, como o Cu, formam iões capazes de participar em reações redox, promovendo a formação de espécies reativas de oxigénio.

A toxicidade do Cu pode ser atribuída a esta propensão dos iões de cobre a participar na formação destas espécies reativas de oxigénio, as quais modificam estrutural e funcionalmente biomoléculas essenciais. (Gaetke et al 2014)

Na presença de superóxidos ou de outros agentes redutores, como o ácido ascórbico, o ião Cu^{2+} é reduzido para Cu^+ , o qual é capaz de catalisar a formação de radicais hidroxilo (HO^\cdot), a espécie mais reativas de entre todos os radicais livres.

Como só é necessário um eletrão para fazer reduzir o Cu^{2+} , o outro eletrão fica livre e também pode envolver-se na formação de radicais hidroxilo que provocam danos oxidativos. Os principais alvos da ação dos radicais livres são as bases de ADN levando à rutura da sua cadeia dupla e os ácidos gordos insaturados que sofrem peroxidação formando radicais lipídicos.

Para além disto, o produto da reação entre o superóxido e o óxido nítrico, a peroxinitrite, promove a libertação de iões Cu de alguns complexos proteicos, nomeadamente da ceruloplasmina.

Os danos oxidativos desempenham um papel relevante na toxicidade do Cu.

Os iões Cu participam nas alterações do estado de oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e promovem a agregação dos macrófagos aos depósitos de gordura dos vasos sanguíneos. Os macrófagos envolvem o depósito de gordura na tentativa de o destruir, contudo, em situações de hiperlipidémia, as lipoproteínas unem-se intimamente entre elas e aos vasos sanguíneos, tornando-se oxidadas pelos radicais livres.

As LDL oxidadas acumulam-se nos macrófagos levando, por sua vez, à acumulação nos vasos sanguíneos, o que provoca aterosclerose.

O excesso de cobre pode conduzir, também, a danos na membrana lipídica das células, causando por exemplo, peroxidação das membranas dos lisossomas dos hepatócitos.

Os danos oxidativos provocados por níveis excessivos de Cu provocam diminuição dos níveis de glutathione (um antioxidante essencial para os sistemas biológicos) e de α -tocoferol. Diminui, ainda, a atividade do complexo IV e a atividade da enzima citocromo c oxidase prejudicando a respiração celular das nas mitocôndrias dos hepatócitos.

Ao exceder a capacidade dos sistemas antioxidantes do organismo e induzindo danos no ADN, peroxidação lipídica, modificação estrutural e funcional das proteínas, as espécies reativas de oxigénio conduzem ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes, aterosclerose e inflamação crónica.

Além da ação dos radicais livres, existem outros mecanismos que podem também atuar como mecanismos de toxicidade de cobre:

- Alteração do metabolismo lipídico

Estudos em ratinhos aos quais foi induzida a doença de Wilson, a qual se traduz por acumulação excessiva de Cu no fígado, fizeram surgir a possibilidade de existir uma relação entre os níveis de Cu e o metabolismo lipídico.

O metabolismo lipídico que ocorre no fígado, com o avançar da doença de Wilson, sofre alterações na sua regulação. Assim, supõe-se que o acumular de Cu nos hepatócitos leve a um decaimento no metabolismo lipídico.

Pode supor-se ainda que algumas das consequências destas alterações no metabolismo lipídico possam ser consideradas consequências adversas da toxicidade do Cu. (Gaetke et al 2014)

- Alteração na expressão de genes hepáticos

Alguns estudos sustentam a teoria que o excesso de Cu pode provocar alteração na expressão de genes hepáticos, induzindo a actividade das metalotioneínas e da catalase,

umentando assim as concentrações de adenosina difosfato (NAD⁺) e de lactato. Ocorre então a alteração no metabolismo passando a ser anaeróbio, o que provoca alterações nos genes hepáticos. (Gaetke et al 2014)

- Alteração da α -sinucleína

A α -sinucleína é uma fosfoproteína, com tendência para se agregar entre ela, sendo a principal constituinte dos corpos de Lewy. A α -sinucleína tem ainda a capacidade de se unir a metais, incluindo o Fe e o Cu.

Os íons Cu favorecem a agregação das α -sinucleínas, contribuindo para a formação dos corpos de Lewy, inclusões proteicas patológicas, intracitoplasmáticas.

Quanto maior a quantidade em excesso de Cu, maior também a acumulação de α -sinucleína na forma de agregados filamentosos intracelulares sendo uma das características patológicas das doenças neurodegenerativas designadas por sinucleinopatias, nas quais se inclui a doença de Parkinson.

O aumento da expressão de α -sinucleína aumenta a sensibilidade das células à toxicidade de Cu

Assim supõe-se existir uma relação entre a capacidade do Cu de se ligar à α -sinucleína e a sua tendência para formar os agregados. (Gaetke et al 2014)

- Alterações na ativação da esfingomielinase ácida

A esfingomielinase ácida é uma enzima fosfodiesterase lisossômica que hidrolisa a esfingomielina, substância que armazena os fosfolípidos e existe no cérebro, fígado, pulmões, baco e nódulos linfáticos.

A ceramida e a fosfocolina são produtos da hidrólise da esfingomielina

Deficiência nesta enzima resultam em incapacidade do corpo de degradar a esfingomielina dando origem à Doença de Niemann-Pick.

Metais de transição como o cobre podem promover a apoptose celular (auto destruição celular programa), e alterações nas bases nucleicas do ADN.

Estudos demonstram que o Cu²⁺ atua como um gatilho na apoptose de hepatócitos através a antecedente ativação da esfingomielinase ácida e, conseqüente, produção de ceramida após a hidrólise da esfingomielinase. A ceramida induz os hepatócitos a autodestruírem-se. Assim um aumento excessivo nos níveis de Cu vai provocar a ativação da esfingomielinase e conseqüente destruição de hepatócitos. (Gaetke et al 2014)

- Alteração na distribuição hepática de Cu

Quando a dieta alimentar provoca excesso de Cu no organismo, este Cu vai acumular-se nos lisossomas causando danos hepáticos quando é posteriormente libertado para o citoplasma, diminuindo os níveis de ceruloplasmina.

Consequentemente, desenvolvem-se fibroses hepáticas culminando em cirrose e o Cu difunde-se para fora do fígado, por meio da circulação sanguínea, alcançando outros tecidos.

O excesso de Cu é, então, depositado no cérebro e na córnea, desenvolvendo danos neurológicos.

De um modo geral, os sintomas são hepatite, anomalias no sistema nervoso que afetam a área motora e alterações cognitivas.

Contudo, experiências demonstraram que pode não se acumular continuamente nos hepatócitos. A interrupção desta acumulação é, provavelmente, devida à perda da molécula transportadora de Cu, a CTR1, que transporta o Cu do plasma para o interior do fígado. Observou-se a acumulação de Cu nos linfócitos e no meio extracelular. (Gaetke et al 2014)

- Alteração da interação proteína-metal

A interação entre as proteínas e os metais nos sistemas biológicos parece ser essencial para manter o equilíbrio e evitar acumulação destes iões metálicos no sistema, protegendo de danos que daí possam advir.

Alguns mecanismos que conduzem à acumulação de iões metálicos, incluindo de Cu, podem ser o resultado de mecanismos compensatórios de modo a melhorar a biodisponibilidade destes metais no meio celular.

Por exemplo, um estudo realizado utilizando métodos computacionais para analisar o comportamento da ligação Cu^+ com o seu *chaperon* Atox1 e posterior ligação à proteína da Doença de Wilson, verificou-se que a passagem do Cu^+ da Atox1 para a proteína da Doença de Wilson é cineticamente muito acessível podendo existir alguma relação entre os iões Cu se unirem a proteínas alteradas e contribuírem para a toxicidade de Cu. (Gaetke et al 2014)

Como vários processos biológicos são sensíveis a alterações redox, a produção intracelular de espécies reativas de oxigénio pode alterar a expressão e activação de genes vitais, alterando assim a proliferação celular, biossíntese de neurotransmissores, diferenciação e apoptose celular.

As alterações provocadas pelos íons Cu quando em níveis tóxicos alteram estados oxidativos das moléculas e produzem radicais podendo todos os outros mecanismos de toxicidade serem consequência de um inicial dano oxidativo.

Erros genéticos no metabolismo do cobre

Existe um grupo de doenças caracterizadas por serem derivadas de alterações no metabolismo do cobre, os seus principais sintomas são neurológicos: doença de Wilson, doença de Menkes, síndrome do corno occipital. (Kaler 2013)

A ocorrência destas doenças deve-se maioritariamente a erros na expressão genética dos genes ATP7A e ATP7B, duas ATPases transportadoras de cobre.

Mutações o gene que codifica para a ATP7A implicam vários fenótipos. A doença de Menkes (MNK) ligada ao cromossoma X, à síndrome do corno occipital e a uma neuropatia específica dos músculos distais (músculos das mãos e pés). (Kaler 2013)

A doença de Wilson envolve alterações na codificação do gene de ATP7B. (Manto 2014)

Doença de Wilson

A doença de Wilson (DW) é autossómica recessiva, ou seja, não está ligada ao sexo, sendo a prevalência igual em homens e mulheres e ambos os progenitores têm de possuir o alelo com a mutação genética e, ATP7B. (Coffey et al 2013)

Tem aproximadamente, uma incidência de 1 em 30 000 nascimentos e afeta indivíduos dos 3 aos 80 anos. (Kaler et al 2013) (Wu et al 2015)

A DW é caracterizada por uma alteração no metabolismo do cobre que conduz à acumulação e, conseqüente, deposição de Cu em vários órgãos impedindo-os de realizarem as suas funções normais. (Jiang et al 2015)

O fígado é principal órgão de deposição de cobre seguido pelo cérebro. (Kaler 2013) O excesso de cobre no fígado vai causar danos hepáticos que podem ser pequenas manifestações de toxicidade até hepatite crónica ou aguda, cirrose ou hepatite fulminante. O excesso de deposição de cobre no cérebro pode causar danos cerebrais semelhantes aos sintomas observados em doentes de Parkinson, bradicinesia (lentidão anormal dos movimentos voluntários), tremor e distonia. Para além destes sintomas, os indivíduos afetados com DW, especificamente com diagnóstico de danos cerebrais, podem sofrer de sintomas neuropsiquiátricos, entre eles, hipomnesia (diminuição de memórias evocáveis), disgnosia (falsa interpretação dos fatos/ percepção incompleta) e alterações na personalidade. (Jiang et al 2015)

O anel de Kayser-Fleischer (KF), que desenha uma circunferência acastanhada à volta da córnea do olho como resultado da deposição de Cu, não considerado suficiente para um diagnóstico exato.

A deposição de cobre pode provocar, ainda, outros sintomas consoante os restantes órgãos que vai afetando: osteoartrite, debilidades na função renal e cardiomiopatia. (Wu et al 2015)

As manifestações clínicas da DW incluem danos no fígado, deformidades neurológicas, distúrbios psiquiátricos, anemia hemolítica, síndrome de Fanconi (patologia renal) e deformidades ósseas. (Kaler 2013)

Atualmente, supõe-se que alterações no gene ATP7B sejam responsáveis pela DW. Este gene foi identificado pela primeira vez em 1993 e codifica para uma ATPase tipo-P transportadora de cobre a ATP7B (Kaler 2013) que é expressa na maior parte dos órgãos, em níveis mais elevados no fígado, rim e placenta. (Wu et al 2015)

É no fígado que exerce a sua função principal de excreção do cobre hepático para o trato biliar. (Kaler 2013)

Fisiologicamente, a ATP7B desempenha dois papéis no fígado: participa no transporte dos iões de cobre do citosol para o complexo de Golgi, onde o cobre é incorporado pela ceruloplasmina e promove a excreção biliar de cobre. (Gaetke et al 2013) A mutação no gene ATP7B provoca, então, um detrimento na excreção de cobre, conduzindo à sua deposição nos órgãos. O acumular de cobre nos órgãos leva ao aumento reações bioquímicas prejudiciais os tecidos, aumentando o *stress* oxidativo, o que pode danificar a estrutura e integridade da mitocôndria conduzindo a danos celulares irreversíveis. (Wu et al 2015)

- Mutações no gene ATP7B

A função do gene ATP7B pode ser alterada devido a mutações genéticas, que são, muitas vezes, esporádicas mas que também podem hereditárias e afetar múltiplas regiões do gene. Mais de 300 mutações causadoras de doença de DW foram identificadas no ATP7B. Indivíduos da mesma família podem ter mutações em sítios diferentes, isto faz com que a terapia genética seja tecnicamente mais difícil pois tem de ser adaptada a cada indivíduo consoante a sua mutação. Para além deste facto, o gene ATP7B é grande o que torna difícil a construção de vetor transportador de genes (moléculas transportadoras usadas para levar o gene terapêutico para as células alvo). (Gupta 2015)

As mutações associadas ao ATP7B podem ocorrer em qualquer região do gene, incluindo nos intrões, exões e regiões promotoras. A mutação mais comum é a *missense*

. Outros tipos de mutação como *frameshift*, *nonsense* e *splicing* estão associadas a fenótipos mais graves da DW manifestando-se como alterações graves no metabolismo e insuficiência hepática fulminante (Wu et al 2015)

A maioria das mutações genéticas estão localizadas nos domínios N e M, especialmente em pacientes com sintomas hepáticos. Uma mutação específica localizada no exão 14 é a mais comum, H1069Q. Esta mutação ocorre quando a histidina do domínio N é substituída por ácido glutâmico. Fisiologicamente, isto provoca alterações conformacionais nas proteínas do domínio-N, na fosforilação das proteínas do domínio P e diminui a afinidade de ligação ao ATP em cerca de 50%.

Indivíduos com esta mutação sofrem danos neurológicos mais tarde.

Existem mais hipóteses identificadas como mutações possíveis para este gene, entre elas, outra mutação no domínio N mais severa que causa total perda da afinidade para ligação com ATP associada a sintomas mais graves. Uma mutação no exão 8, que consiste na substituição da arginida pela leucina, influencia o transporte transmembranar de Cu^{2+} e está relacionada com manifestações hepáticas em idade jovem. (Wu et al 2015)

Estudos e análises à prevalência da DW demonstraram heterogeneidade por entre as diferentes raças e regiões. Por exemplo, a mutação mais comum (exão 14), tem maior prevalência na Europa. A mutação no exão 8 ligada a sintomas mais severos tem maior prevalência na no este da Ásia. (Wu et al 2015)

- Genes Modificadores e Diversidade de fenótipos

Os genes modificadores têm a capacidade de agravar ou melhorar fenótipos de outros genes. A Apolipoproteína E (ApoE) é o gene modificador com maior correlação com a DW. (Wu et al 2015) (Chen et al 2015)

É constituída, principalmente, por 3 alelos, os quais influenciam os diferentes fenótipos de DW.

Um dos alelos desempenha um papel relevante no metabolismo lipídico, podendo estar relacionada com alterações lipídicas e doenças neurodegenerativas, como por exemplo a doença de Alzheimer. Os outros dois são como opostos, um dos alelos parece ter propriedades neuroprotetoras e anti-oxidantes e, conseqüentemente, os sintomas de DW só aparecem com uma idade mais avançada. O outro alelo está relacionado com sintomas de DW em idade jovem. (Chen et al 2015) (Wu et al 2015)

A DW tem um conjunto de fenótipos complexos, incluindo: um intervalo grande de idades de quando aparecem os primeiros sintomas, diferentes tipos de alterações metabólicas.

As mutações identificadas para o gene que codifica a proteína ATP7B provocam-lhe diferentes alterações na estrutura e função.

Um estudo realizado com dois gémeos monozigóticos com DW e com a alteração mais comum em ATP7B, apresentaram manifestações clínicas diferentes, sugerindo que em adição ao fator genético hereditário associado à DW existem outros factores que contribuem para a variedade de fenótipos da DW.

A relação entre o genótipo e o fenótipo dos doentes com DW é multifactorial e é difícil estabelecer uma correlação direta entre os dois.

Alem da hereditariedade, diferenças epigenéticas que consistem na transmissão de experiências ocorridas com os pais para os filhos e que não ocorre através do DNA mas são reescritas através de informações contidas no DNA, genes que aumentam ou reduzem a sua atividade em resposta a sinais do meio, contribuem para a variedade de fenótipos.

- Manifestações Clínicas

Num estudo realizado com uma amostra de 400 indivíduos com DW, metade (50%) apresentavam sintomas neurológicos e psiquiátricos, enquanto os restantes dividiam-se em 20% sintomas neurológicos e hepáticos, outros 20% só neurológicos e os restantes 10% assintomáticos.

Os distúrbios neurológicos podem traduzir-se em dificuldades na fala, distonia, rigidez muscular, tremor, movimentos involuntários rápidos dos pés e das mãos, irregularidades na marcha, escrita descoordenada. (Kaler 2013) Estes sintomas estão associadas à acumulação de cobre no cérebro, que afetando os gânglios basais, envolvidos na função motora e cognitiva.

As alterações psiquiátricas estão associadas a mudanças na personalidade, depressão e ansiedade.

Ao nível hepático os sintomas incluem icterícia, edema, astites e aumento do tamanho do fígado. Efeitos secundários endócrinos em jovens incluem um atraso na puberdade e ausência de menstruação.

Podem, ainda, ocorrer situações de cirrose ou hepatite, por vezes, fulminante. (Kaler 2013)

Para além destes sintomas relacionados com o sistema neurológico e funcionamento hepático, o olho sendo um dos principais locais de deposição de cobre produz uma alteração cromática, forma-se um anel acastanhado à volta do olho que corresponde à acumulação de cobre na córnea. Este anel designa-se como Anel de

Kayser-Fleischer. Ainda no olho podem aparecer cataratas no cristalino em forma de “girassol”. (Desai et al 2008)

Em alguns pacientes com DW registram-se insuficiências renais devido aos depósitos de cobre nos rins, com perda de aminoácidos, eletrólitos, cálcio, fósforo e glucose. Estas perdas de cálcio e fósforo podem causar anomalias ósseas, como a osteoporose.

Por vezes pode ocorrer a libertação de doses elevadas de cobre proveniente dos depósitos hepáticos, para a corrente sanguínea, situação que pode ser fatal. (Kaler 2013)

- Tratamento

A doença de Wilson encontrou a sua primeira tentativa terapêutica em 1956 com o uso de penicilamina, um tiol com capacidade para estabelecer ligação com os iões de cobre. A penicilamina exerce a função de quelante do cobre e, como tal, não corrige o motivo pelo qual o cobre se acumula e não é devidamente excretado na bÍlis.

Contudo, ao ligar-se ao cobre, promove a sua excreção pela urina tentando, assim manter o equilíbrio homeostático.

Para evitar deficiência em vitamina B6, carência associada aos tratamentos com penicilamina, aconselha-se a administração de piridoxina.

A penicilamina tem alguns efeitos adversos como nefrotoxicidade, distúrbios hematológicos, eczema nas axilas e pescoço e, em alguns casos de DW com sintomas neurológicos, pode agravá-los. (Kaler 2013)

A trientina é semelhante à penicilamina, promove a excreção de cobre pela urina. (Hordyjewska et al 2014). Supõe-se que tenha menos efeitos adversos em comparação à penicilamina. (Kaler 2013)

O complexo tetratiomolibdato diminui a absorção de cobre e reduz os iões de cobre livres. Atua rapidamente (algumas semanas) até restaurar os níveis de cobre endógeno. (Kaler 2013)

O zinco é a primeira linha de terapia em doentes assintomáticos, com ligeiro dano hepatocelular. O zinco é administrado sob a forma de acetato ou sulfato.

O principal mecanismo pelo qual o zinco é eficaz no tratamento da doença de Wilson consiste na sua habilidade para competir pelos mesmos locais de ligação que o cobre. Assim, interfere com a absorção gastrointestinal de cobre.

Supõe-se que o zinco consiga induzir as metalotioneínas das células do epitélio intestinal, que têm elevada afinidade para se ligarem ao cobre, prevenindo a sua transferência para a corrente sanguínea, sendo excretado.

O zinco bloqueia o zinco alimentar e o zinco endógeno (saliva e fluidos gastrointestinais), sendo capaz de provocar um balanço negativo de cobre. (Hordyjewska et al 2014)

Alguns estudos realizados sugerem que para alcançar o tratamento ideal para a DW é necessário considerar a terapia celular para remover o excesso de cobre.

O objetivo é restaurar a excreção biliar de Cu reconstituindo o fígado com células saudáveis, corrigindo o defeito no gene ATP7B, através do uso de vetores com cópias saudáveis de ATP7B capazes de repovoarem o fígado. (Gupta 2015)

O interesse em células estaminais endógenas para o tratamento DW centra-se na hipótese de conseguir manipular as células estaminais para gerarem células hepáticas saudáveis. Este processo foi testado com sucesso *in vitro* mas restam algumas dúvidas de como se comportaram estas células *in vivo*. Serão capazes de proliferar o fígado de modo a anular as células hepáticas com mutações em ATP7B?

Contudo, a ativação de células estaminais endógenas para o tratamento da doença de Wilson pode ser benéfico para a reparação de danos celulares hepáticos, mas só assim não seria corrigido o acumular de Cu nas células, Então, simultaneamente com a inserção de células estaminais para reparar o fígado seriam também administradas cópias saudáveis de ATP7B. (Gupta 2015)

Tabela 9. Tratamento farmacológico da doença de Wilson, adaptado de “Inherited copper transport Disorders: biochemical Mechanisms, diagnosis and treatment.”

| Fármaco | Ação | Dose | Efeitos secundários |
|-------------------|---|---|---|
| D-penicilamina | Quelante dos íons de cobre Induz a sua excreção pela urina | Adultos: 750 a 1000 mg/dia 3x ao dia Crianças: 20mg/kg/dia | Febre, eczema, proteinúria, alterações hematológicas, síndrome nefrótico, hepatotoxicidade e danos neurológicos na fase inicial |
| Zinco | Bloqueia a absorção de cobre induzindo as metalotioneínas nos enterócitos | Adultos: 150 mg/dia Crianças: 50 a 75 mg/dia | Gastrite, acumulação de zinco e mudanças na função imune |
| Trientina | Quelante dos íons de cobre Induz a sua excreção pela urina | Adultos: 750 a 1000 mg/di 3x dia Crianças: 20 a 25 mg/kg/dia | Gastrite, anemia aplástica e anemia sideroblástica (raros) |
| Tetratiomolibdato | Forma complexos com os íons de cobre e bloqueia a sua absorção Ajuda no processo de desintoxicação | 20 mg/dia 3x dia com refeições e 3x entre refeições | Anemia, neutropenia, hepatotoxicidade, deterioração neurológica na fase inicial do tratamento |

Doença de Menkes

A doença de Menkes (DM) é uma doença hereditária recessiva ligada ao cromossoma X e foi identificada pela primeira vez em 1937 por um médico veterinário australiano que relacionou a deficiência em cobre com sintomas neurodegenerativos em cordeiros. (Kaler 2013)

Em 1962, Menkes et al., descreveu uma patologia a partir de cinco crianças inglesas que apresentavam neurodegeneração específica, textura de cabelo peculiar e problemas no desenvolvimento. Mais tarde, em 1972, Danks et al. estabelece a associação entre os sintomas neurodegenerativos dos cordeiros e as características do seu pelo com os sintomas e sinais apresentados pelos pacientes de Menkes. Definindo-se, assim, a doença de Menkes. (Kaler 2013)

A DM traduz-se por um distúrbio no metabolismo de cobre que provoca neurodegeneração progressiva e alterações no tecido conjuntivo e cabelo áspero, frágil e escasso.

A neurodegeneração e os problemas no tecido conjuntivo (fraqueza muscular e atraso no desenvolvimento) são os traços principais do fenótipo mais severo da doença de Menkes.

Os fetos portadores de DM podem nascer antes do tempo e com cefalohematomas. Enquanto recém-nascidos apresentam icterícia durante mais tempo que os bebês saudáveis, hipotermia, hipoglicémia e dificuldades alimentares. O primeiro sinal visível de DM é, normalmente, o couro cabelo com pouco cabelo e sem brilho, o que costuma ocorrer entre 1 a 2 meses de idade. (Türner et al 2010)

Inicialmente o desenvolvimento psicomotor parece não sofrer danos mas a partir dos 5-6 meses de idade não se observam mais progressos e começam a registrar-se atrasos. Os bebês desenvolvem tonturas e incapacidade de se continuarem a desenvolver. Observam-se sintomas gastrointestinais (vômitos e diarreia).

O tônus muscular está atrofiado e não existe progressão da função motora e instalam-se momentos de letargia.

Um sinal que ajuda a estabelecer o diagnóstico é a existência de um cabelo fraco e em pouca quantidade, localizado especialmente no escalpe.

Problemas vasculares, urogenitais e deformidades ósseas são comuns. Um pouco mais tarde podem surgir sintomas oftalmológicos, como a cegueira.

A maior parte dos portadores da DM morre o terceiro ano de vida devido ao culminar de todos estes problemas neurológicos e físicos. (Türner et al 2010)

A prevalência da DM é de 1 em 140 000 nascimentos de bebês do sexo masculino, pois é uma doença recessiva ligada ao cromossoma X.

Bioquimicamente, DM apresenta baixos níveis de cobre no plasma sanguíneo, no fígado e no cérebro, devido aos problemas de absorção dos íons de Cu no intestino, redução da atividade de proteínas dependentes do cobre e acumulação do cobre em determinados tecidos (duodeno, rim, baço, pâncreas, musculo esquelético e placenta). (Kaler 2013)

- Patologia da Doença de Menkes

A DM pertence a um grupo de doenças, Síndromes por deficiência em cobre, que englobe uma grande variedade de fenótipos.

Mutações no gene que codifica para a ATPase transportadora ATP7A é responsável por esta patologia. A maior parte das mutações são intragénicas ou são deleções parciais do gene. (Manto 2014)

A ATP7A localiza-se na membrana do complexo de Golgi e transporta o cobre do citosol para o interior do complexo de Golgi. Existe e realiza esta função na maior parte das células do organismo, exceto nos hepatócitos.

Na doença de Menkes, devido a mutações na ATP7A, o cobre acumula-se no citosol de células afetadas e não é excretado. Estudos mostraram que o cobre acumula-se nas células endotélio intestinal, o que resulta numa incapacidade de o absorver, provocando deficiência em cobre e redução da atividade enzimática de enzimas cupro-dependentes. (Kodama et al. 2012)

Os sintomas característicos da DM, atraso mental, tonturas, cabelo fraco e pigmentado, fragilidade óssea e problemas vasculares, podem estar relacionados com o decair da atividade enzimática.

Tabela 10. Sintomas associados ao decair da atividade enzimática na doença de Menkes, adaptado de “Inherited copper transport disorders: biochemical mechanism, diagnosis and treatment”.

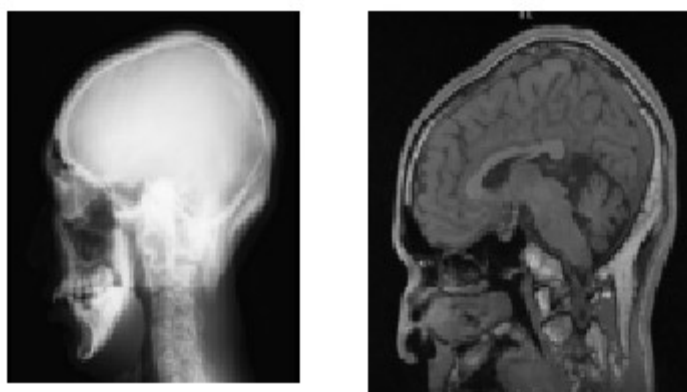
| Enzima | Função | Sintomas |
|--|--|--|
| Citocromo-C-oxidase | Transporte de electro na respiração mitocondrial e produção de energia | Danos cerebrais Hipotermia Atrofia muscular |
| Lisil-oxidase | Ligação do colagénio à elastina | Distúrbios vasculares Hemorragias cerebrais Danos renais Osteoporose, fraturas hérnias |
| Dopamina β -hidroxilase | Produção de norefedrina | Hipotensão Hipotermia Diarreia |
| Tirosinase | Formação de melanina | Hipopigmentação |
| Superoxido dismutase Cu/Zn | Propriedades anti-oxidantes | Neurodegeneração |
| PAM (Peptidilglicina- α -amina-monooxigenase) | Bioativação de neuropéptidos | Danos cerebrais |
| Ceruloplasmina | Transporte de cobre | Anemia |
| Hepaestina | Absorção de ferro | Anemia |

- A síndrome do corno occipital

A síndrome do corno occipital (SCO) é a forma ligeira da doença de Menkes. (Manto 2014)

As suas principais manifestações clínicas estão relacionadas com alterações no tecido conjuntivo. A principal diferença entre o DM e SCO é através da observação de radiografias, onde no caso da SCO se observa-se um característico corno occipital.

Figura 5. Radiografias de indivíduos com corno occipital, exostoses simétricas e salientes ao osso occipital, retirada de “Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment”.



Durante a gravidez o feto portador de SCO tem um desenvolvimento normal, os primeiros sintomas aparecem nos primeiros dias de vida e são semelhantes aos da DM: icterícia, hipotermia, atrofia do tónus muscular e dificuldades alimentares. Um pouco mais tarde surgem os sintomas gastrointestinais (diarreia) seguidos de infeções urinárias recorrentes.

Contudo, na maioria dos casos, o diagnóstico é definido entre os 5 e 10 anos de idade.

Ao longo do tempo os indivíduos com esta síndrome apresentam um atraso no desenvolvimento muscular que pode ser associado com falta de destreza. Esta atrofia muscular não é tão severa como nos casos de DM.

Com o crescimento a sua fisionomia traduz características da doença: trono longo, peito e ombros esguios, articulações soltas (tendência para deslocar os cotovelos e ombros). Face longa e magra com testa grande e olhos inclinados para baixo.

Contudo, o desenvolvimento durante a puberdade é relativamente normal e a capacidade intelectual é considerada baixa a normal.

A esperança de vida para doente com SCO é viável mas substancialmente superior à DM. (Turner et al 2010)

- Mutações no gene para ATP7A

ATP7A é considerada uma importante proteína transportadora do cobre com várias funções celulares. É uma molécula multifuncional, que está envolvida no transporte de cobre para dentro e para fora das células.

Mutações em ATP7A podem causar três diferentes fenótipos, dependendo de qual é o defeito molecular: doença de Menkes, síndrome do corno occipital e neuropatia dos músculos distais. (Kaler 2015)

Defeitos cromossomais que afetam ATP7A são encontrados mais em mulheres que em homens (ligada ao cromossoma X). Estas alterações hereditárias são transmitidas usualmente das mães para os filhos do sexo masculino.

Aproximadamente 25% das mutações de ATP7A são deleções que podem afetar um único exão como o gene por inteiro (à exceção dos dois primeiros exões).

Estão identificadas cerca de 120 mutações genéticas para ATP7A: 33% missense, 16% nonsense, 16% splice-site e 33% correspondem a deleções inserções e duplicações.

Apenas algumas destas mutações identificadas foram relacionadas com alterações no funcionamento da ATP7A, sugerindo que nem todas as mutações conduzem à DM ou SCO. Quase todas as alterações que causam mutações conduzindo a patologias ocorrem são missense e afetam os resíduos que estão dentro das regiões conservadas das ATPases.

Estas mutações conduzem à substituição de aminoácidos e podem afetar a função proteica: síntese, estabilidade, transporte e localização da proteína. (Turner et al 2010)

- Relação das mutações com os diferentes fenótipos

Não existe uma relação óbvia entre os fenótipos e o desenvolver da DM, membros da mesma família com a mesma mutação em ATP7A podem desenvolver DM ou a sua forma menos severa SCO.

Verificou-se que pacientes com um fenótipo mais ligeiro (SCO) têm uma maior proporção de mutações, o que leva a uma proteína parcialmente funcional ou resulta em quantidades mais reduzidas de uma proteína normal.

De um modo geral, grandes deleções resultam no fenótipo mais severo (DM) (Turner et al 2010)

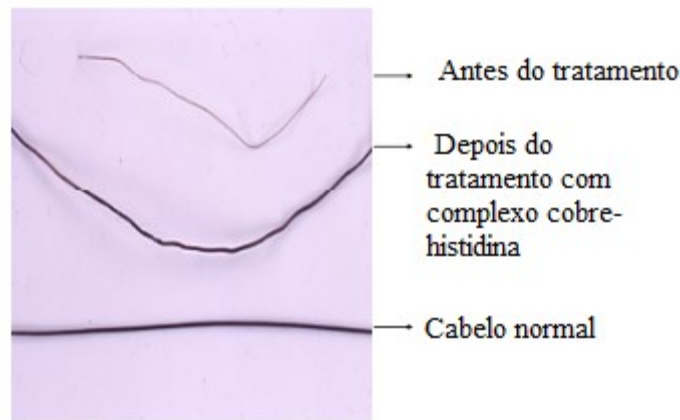
- Tratamento

O tratamento atual para a doença de Menkes passa por administração parental de cobre. Os componentes de cobre disponíveis para este tratamento são: cobre-histidina, gluconato de cobre, sulfato de cobre e cloreto de cobre. (Kaler 2013)

De entre estes, o mais recomendado, com registos de maior eficácia, é o complexo cobre-histidina.

A administração de cobre-histidina melhora as anomalias capilares, as concentrações de cobre no fígado, no plasma e da ceruloplasmina.

Figura 6. Cabelo de um bebé de 3 meses com doença de Menkes antes e depois do tratamento com o complexo cobre-histidina e comparação com um cabelo de um bebé saudável, retirada de “Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment”



A administração do complexo histidina-cobre não consegue colmatar os sintomas neurodegenerativos. Provavelmente porque o cobre vai acumular-se na barreira hemato-encefálica não alcançando o cérebro. (Kodama et al 2012) Seria a ATP7A a permitir o cobre ultrapassar a barreira hemato-encefálica. (Manto 2014)

Contudo, se o tratamento for iniciado durante a fase logo a seguir o nascimento, é possível prevenir a neurodegeneração em alguns doentes.

Um tratamento eficaz para os sintomas neurológicos e do atrofias do tecido conjuntivo ainda não está estabelecido. (Kodama et al 2012)

A terapia genética é considerada uma opção promissora. (Manto 2014)

De um modo geral, pode-se afirmar que o cobre está envolvido, direta ou indiretamente com várias perturbações neurológicas.

O efeito do excesso de cobre ou da sua falta no organismo associa-se a estas patologias sugerindo a necessidade de criar biomarcadores dos níveis de Cu no plasma de modo a diagnosticar ou controlar alterações na homeostase do Cu.

Tabela 11. Papel do cobre em algumas perturbações neurológicas, adaptado de “Role of copper in human neurological disorders”.

| Patologia | Correlação com iões de Cu | Consequências fisiopatológicas | Efeitos neurodegenerativos |
|-------------------------------|---|--|--|
| Aceruloplasminemia | Ausência de ceruloplasmina provocada por escassez de iões Cu essenciais para a sua ativação | Acumulação de ferro nos tecidos | Neurodegeneração progressiva Distonia Demência |
| Doença de Alzheimer | Iões de Cu interagem com precursor da proteína amiloide promovendo a agregação Induz <i>stress</i> oxidativo | Acumulação de proteína β -amiloide | Problemas de memória Alterações da personalidade Neurodegeneração Demência |
| Doença de Parkinson | Iões de Cu intarem com a α -sinucleína promovendo a sua agregação | Oxidação da dopamina | Degradação dos neurónios dopaminérgicos Acumulação intracelular de corpos de Lewy |
| Esclerose lateral amiotrófica | Mutações na enzima superóxido-dismutase Cu/Zn | Formação de radicais livres Decaimento da proteção antioxidante | Degeneração da função motora e respiratória |
| Doença de Huntington | Elevadas concentrações de iões Cu Ligam-se a locais com pouca afinidade | <i>Stress</i> oxidativo Falta de energia Degradação dos neurónios estriatais | Reações oxidativas Neurodegeneração |
| Doenças provocadas por priões | | | Modificação da PrP normal para PrP alterada Encefalopatias espongiiformes |
| Doença de Wilson | Mutações em ATPases transportadoras de Cu – ATP7B | Acumulação de cobre no fígado e cérebro | |
| Doença de Menkes | Mutações em ATPases transportadoras de Cu – ATP7A | Deficiência severa em Cu com diminuição de atividade enzimática essencial | Atrofia cerebral progressiva e neurodegeneração |
| Síndrome do corno occipital | Mutações em ATPases transportadoras de Cu – ATP7A | Deficiência moderada em Cu | Ligeira atrofia cerebral Sintomas de atrofia muscular |

3. Conclusão

O cobre é um micronutriente essencial à vida dos organismos desde bactérias procariontas, fungos, plantas e animais, incluindo os seres humanos.

Desde o início do século XX que este elemento metálico tem vindo a ser foco de estudo a fim de compreender os seus mecanismos de ação no corpo humano. Ficou claro que desempenha um papel vital para a nossa existência.

O cobre possui vários estados oxidativos mas os únicos relevantes para a fisiologia humana são o estado cúprico (Cu(II)) Cu^{2+} e o cuproso (Cu(I)) Cu^+

O organismo está preparado para absorver o cobre na forma destes dois iões, Cu^{2+} e Cu^+ . A principal fonte deste nutriente são os alimentos e a quantidade diária ingerida para um adulto saudável, segundo a Organização Mundial de Saúde, deve ser de 1,2 miligramas.

É vital para o funcionamento dos órgãos e sistemas que a correta biodisponibilidade de iões Cu seja assegurada pois está envolvido em várias funções fisiológicas: é crucial para o funcionamento do cerebral e de todo o sistema nervoso, tem um papel relevante na formação de colagénio mantendo osso e pele saudáveis, ajuda a suportar a elasticidade dos vasos contribuindo para o bom funcionamento vascular, é necessário para manter um sistema imunitário saudável. Desempenha, ainda, um papel relevante no desenvolvimento fetal e crescimento pós-natal.

Para manter o equilíbrio homeostático do Cu é necessário um conjunto de mecanismos e processos biológicos que permitam manter as concentrações dos iões de Cu no meio interno reguladas.

O Cu é cofator de várias enzimas e liga-se, ainda, a outras proteínas não enzimáticas como as metalotioneínas. De entre as várias enzimas do qual o Cu faz parte como peça essencial ao desempenho das suas atividades enzimáticas, encontra-se, por exemplo, a citocromo-c-oxidase responsável pela respiração celular da mitocôndria e como tal pela produção de energia, a superóxido dismutase, importante na defesa antioxidante, a lisil-oxidase envolvida na manutenção dos tecidos conjuntivos e a β -dopamina-hidroxilase responsável pela síntese de catecolaminas.

Em todas estas enzimas os iões de Cu não podem ser substituídos por outros elementos metálicos sem comprometer a actividade enzimática.

Para além da sua relevância na função enzimática, o cobre é essencial para a transcrição de alguns genes. A presença de iões Cu no meio intracelular activa a

transcrição de genes como o *Ace1* que regula a transcrição da enzima superóxido dismutase (SOD).

Até alcançar as células, o Cu, percorre um longo percurso. O Cu proveniente da dieta alimentar é, na sua grande maioria, absorvido no duodeno e intestino delgado, sendo esta absorção influenciada por vários fatores. Outros nutrientes interagem com o cobre e influenciam a sua capacidade de ser absorvido. Doses elevadas de zinco (Zn) diminuem a absorção de cobre e a presença de hidratos de carbono pode facilitar a absorção.

Depois de absorvido, o seu transporte é assegurado por um conjunto de moléculas proteicas com elevada afinidade para os iões Cu. Os complexos proteicos, *chaperons* do Cu, como a *Atox1* regulam a circulação dos iões de cobre. A proteína específica 1, a CRT1, é responsável pela entrega de Cu no meio intracelular, as Cu-ATPases do tipo P, como a ATP7A e a ATP7B, são responsáveis pela circulação no interior da célula, as ATP7A existem em quase todas as células à exceção dos hepatócitos e transferem os iões de Cu⁺ para o complexo de Golgi. As ATP7B são exclusivas dos hepatócitos e exercem função semelhante. Por fim, as metalotioneínas, existentes em, praticamente, todos os órgãos, ao ligarem aos iões de Cu impedem o seu envolvimento em reações redox com produção de radicais livres, evitando situações de *stress* oxidativo.

A facilidade com que o cobre assume estados de oxidação diferentes, oscila entre o Cu²⁺ e o Cu⁺, confere-lhe, claramente, características úteis para ser utilizado nos sistemas biológicos mas também o torna uma espécie apetecível para ser envolvido em reações de *Fenton*, por exemplo, que têm como produtos radicais livres de oxigénio. O contato destas espécies reativas, com elevado poder oxidante, com o sistema biológico pode ter consequências danosas, por exemplo, modificação do estado de oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) induzindo a aterosclerose, pode ainda provocar danos da respiração celular da mitocôndria. Os danos oxidativos induzidos pelos radicais livres podem ter consequências dramáticas ao nível da estrutura e funcionalidade das biomoléculas. O radical hidroxilo, a espécie com maior poder oxidante, pode inclusive danificar as bases do ADN.

É, então, evidente que o equilíbrio homeostático deve manter-se regulado através de processos minuciosos e precisos. Contudo, este equilíbrio pode ser quebrado por casos de excesso ou carência de cobre.

A deficiência em cobre ocorre devido a carência alimentares e pode conduzir a problemas ósseos, enfraquecimento do sistema imunitário, alterações cardiovasculares e alterações no metabolismo de outros nutrientes, como é o caso do ferro. Este tipo de

carência pode ser ultrapassada com a introdução da dosagem correta de cobre na alimentação diária.

A toxicidade aguda é rara e, normalmente, está associada à ingestão de alimentos contaminados, que foram acondicionados em recipientes com cobre na sua composição. É importante que as autoridades competentes garantam que a água potável não apresenta quantidades tóxicas de metais onde se inclui o cobre devido à degradação das tubagens. Por vezes, ocorrem situações de exposição prolongada devido à atividade profissional.

Contudo, existem um grupo de patologias associadas ao excesso (acumulação) ou carência deste micronutriente. A doença de Wilson é caracterizada por acumulação de Cu nos hepatócitos e, seguidamente, no cérebro. Mutações na Cu-ATPases ATP7B provoca alterações no efluxo de Cu. Existem vários fenótipos para a doença de Wilson o que suporta a possibilidade de ocorrerem diferentes mutações em vários locais da ATP7B. Quase todos os fenótipos têm associados sintomas de degradação hepática e neurodegeneração.

A doença de Menkes e o seu fenótipo mais suave a síndrome do Corno Occipital são, também, provocadas por mutações numa Cu-ATPases, a ATP7A, que causam carência de Cu nos tecidos. As células do epitélio intestinal perdem a capacidade de absorver o Cu, que se acumula no intestino causando sintomas gastrointestinais. Contudo, rapidamente aparecem sintomas mais severos, a falta de Cu prejudica irreversivelmente o funcionamento das células e de todos os sistemas, causando neurodegeneração, atrofia motora e cerebral, sendo os doentes de Menkes raramente ultrapassam os 3 anos de vida.

A Síndrome do Corno Occipital, como é o fenótipo mais suave, apresenta uma taxa de sobrevivência substancialmente mais elevada mas com sintomas característicos associados, alterações capilares e o desenvolvimento de uma protuberância óssea na parte superior do osso occipital. Sintomas como articulações soltas, ligeira atrofia muscular também estão associados à síndrome do Corno Occipital.

Outras patologias que envolvem degradação neurologia, estão também envolvidas com alterações no equilíbrio dos níveis de Cu, entre elas, doença de Alzheimer, Parkinson e Esclerose Lateral amiotrófica.

Apesar de ser considerado o micronutriente e de não ter o devido reconhecimento, o papel do cobre no organismo é vital. Uma pequena quantidade diária de Cu garante o desenvolvimento normal e a manutenção de um corpo saudável.

Uma alimentação saudável e equilibrada com a ingestão da quantidade de cobre essencial é um dos primeiros passos para ter um sistema imunitário forte, bem como, reduzir o risco de algumas doenças.

Não há dúvida que os estudos sobre os mecanismos que tornam o cobre essencial à vida vão continuar e promover tratamentos mais eficazes para as doenças relacionadas com alterações no metabolismo do cobre.

Bibliografia

- Angelova, M., Asenova, S., Nedkova, V., & Koleva-Kolarova, R. (2011). Copper in the human organism. *Trakia J Sci*, 9(1), 88-98
- Beers, J., Glerum, D. M., & Tzagoloff, A. (1997). Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *Journal of Biological Chemistry*, 272(52), 33191-33196.
- Bird, T. D. (2014). Alzheimer disease overview.
- Botash AS, Nasca J, Dubowy R, Weinberger HL, Oliphant M. Zinc -induced copper deficiency in an infant. *Am Dis Child* 146:709-U.
- Bremner I. Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr* 1998(suppl);67: I 069S - 73S.
- Bremner, I. (1987). Nutritional and physiological significance of metallothionein. In *Metallothionein II*(pp. 81-107). Birkhäuser Basel.
- Bowen, J. E. (1969). Absorption of copper, zinc, and manganese by sugarcane leaf tissue. *Plant physiology*, 44(2), 255-261.
- Brewer GJ, Yuzbasiyan-Gurkan V. *Medicine* 1992;71:139–64.
- Bull, P. C., Thomas, G. R., Rommens, J. M., Forbes, J. R., & Cox, D. W. (1993). The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nature genetics*, 5(4), 327-337.
- Camakari J, Voskoboinik I, Mercer JF. Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;261:225-232.
- Campos, C., Rocha, N. B., Vieira, R. T., Rocha, S. A., Telles-Correia, D., Paes, F., ... & Caixeta, L. (2016). Treatment of Cognitive Deficits in Alzheimer's disease: A psychopharmacological review. *Psychiatria Danubina*, 28(1), 2-12.
- Cavet, J. S. (2014). Copper as a Magic Bullet for Targeted Microbial Killing. *Chemistry & biology*, 21(8), 921-922.
- Chen, C., Shen, B., Xiao, J. J., Wu, R., Canning, S. J. D., & Wang, X. P. (2015). Currently Clinical Views on Genetics of Wilson's Disease. *Chinese medical journal*, 128(13), 1826.

- Chen, H., Attieh, Z. K., Su, T., Syed, B. A., Gao, H., Alaeddine, R. M., ... & McKie, A. T. (2004). Hephaestin is a ferroxidase that maintains partial activity in sex-linked anemia mice. *Blood*, 103(10), 3933-3939.
- Coffey, A. J., Durkie, M., Hague, S., McLay, K., Emmerson, J., Lo, C., ... & Mieli-Vergani, G. (2013). A genetic study of Wilson's disease in the United Kingdom. *Brain*, awt035.
- Connor, J. R. (Ed.). (2013). *Metals and oxidative damage in neurological disorders*. Springer Science & Business Media.
- Cousins RJ. *Physiol Rev* 1985;65:238–309.
- Culotta, V. C., Klomp, L. W., Strain, J., Casareno, R. L. B., Krems, B., & Gitlin, J. D. (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23469-23472.
- Danks DM. Copper deficiency in humans. *Ann Ver Nutr* 1988;8:235-57
- Danks, D. M. (1988). Copper deficiency in humans. *Annual review of nutrition*, 8(1), 235-257.
- Desai, V., & Kaler, S. G. (2008). Role of copper in human neurological disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 88(3), 855S-858S.
- Eaton -Evans J, McIlrath EM, Jackson WE, McCartney H, Strain JJ. Copper supplementation and the maintenance of bone mineral density in middle-aged women. *J Trace Elem Exp Med* 1996;9:87-94.
- Failla ML, Johnson MA, Prohaska JR. Copper. In: *Present Knowledge in Nutrition*. Washington D.C.: Life Sciences Institute Press, 2001:373-83.
- Festa, R. A., Hessel, M. E., Franz, K. J., & Thiele, D. J. (2014). Exploiting innate immune cell activation of a copper-dependent antimicrobial agent during infection. *Chemistry & biology*, 21(8), 977-987.
- Fields M. Role of trace elements in coronary heart disease. *Br J Nutr* 1999;81:85-6.
- Finney, L., Vogt, S., Fukai, T., & Glesne, D. (2009). Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 36(1), 88-94.

- Fleming, C. R. (1989). Trace element metabolism in adult patients requiring total parenteral nutrition. *The American journal of clinical nutrition*, 49(3), 573-579.
- Frieden, E. (1985). Perspectives on copper biochemistry. *Clinical physiology and biochemistry*, 4(1), 11-19.
- Gaetke, L. M., Chow-Johnson, H. S., & Chow, C. K. (2014). Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Archives of toxicology*, 88(11), 1929-1938.
- Glerum, D. M., Shtanko, A., & Tzagoloff, A. (1996). Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(24), 14504-14509.
- Gupta, Sanjeev. "Cell therapy to remove excess copper in Wilson's disease." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1315.1 (2014): 70-80.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. (1992). Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation An update. *FEBS letters*, 307(1), 108-112.
- Harris, E. D. (1990). Transport of Copper. In *Trace Elements in Clinical Medicine* (pp. 421-424). Springer Japan.
- Hoffman HN, Phyliky RL, Fleming CR. Zinc –induced copper deficiency. *Gastroenterology* 1998;94:508-12.
- Hordyjewska, A., Popiołek, Ł., & Kocot, J. (2014). The many “faces” of copper in medicine and treatment. *Biometals*, 27(4), 611-621.
- Howard G, Andon M, Bracker M, Saltman P, Strause L. Low serum copper, a risk factor additional to low dietary calcium in postmenopausal bone loss. *J Trace Elem Exp Med* 1992;5:23-31.
- Inesi, G., Pilankatta, R., & Tadini-Buoninsegni, F. (2014). Biochemical characterization of P-type copper ATPases. *Biochemical Journal*, 463(2), 167-176.
- Institute of Medicine. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington: National Academy Press, 2001.
- Institute of Medicine. *Nutrition During Pregnancy: Part 2: Nutrient Supplements*. Washington: National Academy Press, 1990.

- Jaiser, S. R., & Winston, G. P. (2010). Copper deficiency myelopathy. *Journal of neurology*, 257(6), 869-881.
- Jensen, L. T., & Winge, D. R. (1998). Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 17(18), 5400-5408.
- Johnson MA, Fisher JG. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992;32:1–31.
- Kaler, S. G. (2014). Translational research investigations on ATP7A: an important human copper ATPase. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1314(1), 64-68.
- Kaler, Stephen G. "Inborn errors of copper metabolism." *Handbook of clinical neurology* 113 (2013): 1745.
- Keen CL, Uriu-Hare JY, Hawk SN, Jankowski MA, Daston GP, Kwik-Urbe CL, Rucker RB. Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 1998(suppl);67:1003S-1 IS.
- Kelley, D. S., Daudu, P. A., Taylor, P. C., Mackey, B. E., & Turnlund, J. R. (1995). Effects of low-copper diets on human immune response. *The American journal of clinical nutrition*, 62(2), 412-416.
- Kelner GS, Lee M, Clark ME, Maciejewski D, McGrath D, Rabizadeh S, Lyons T, Bredesen D, Jenner P, Maki RA. The copper transport protein Atox1 promotes neuronal survival. *J Biol Chem* 2000;275:580-84.
- Klevay LM. Cardiovascular disease from copper deficiency - a history. *J Nutr* 2000;130:489S -92S.
- Klomp, L. W., Lin, S. J., Yuan, D. S., Klausner, R. D., Culotta, V. C., & Gitlin, J. D. (1997). Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(14), 9221-9226.
- Koch, K. A., Peña, M. M. O., & Thiele, D. J. (1997). Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chemistry & biology*, 4(8), 549-560.
- Kodama, H., Fujisawa, C., & Bhadhprasit, W. (2012). Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment. *Current drug metabolism*, 13(3), 237-250.

- Kumar, N. (2006, October). Copper deficiency myelopathy (human swayback). In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 81, No. 10, pp. 1371-1384). Elsevier.
- Kuo YM, Shou B, Cosco D, Gitschier J. The copper transporter CTR I provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001;98(12):6836-41.
- Leary, S. C., Cobine, P. A., Nishimura, T., Verdijk, R. M., De Krijger, R., De Coo, R., ... & Shoubridge, E. A. (2013). COX19 mediates the transduction of a mitochondrial redox signal from SCO1 that regulates ATP7A-mediated cellular copper efflux. *Molecular biology of the cell*, 24(6), 683-691.
- LEE, J. et al., 2002, Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, pp. 4380-4387.
- Linder, M. C. *Biochemistry of copper*. 1991.
- Linder, M. C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R., & Lomeli, N. (1998). Copper transport. *The American journal of clinical nutrition*, 67(5), 965S-971S.
- Lonnerdal B. Copper nutrition during infancy and childhood. *Am J Clin Nutr* 1998(suppl);67:1046S-53S.
- Lönnerdal, B. (1996). Bioavailability of copper. *The American journal of clinical nutrition*, 63(5), 821S-829S.
- Mann, K. G., Lawler, C. M., Vehar, G. A., & Church, W. R. (1984). Coagulation Factor V contains copper ion. *Journal of Biological Chemistry*, 259(21), 12949-12951.
- Manto, M. (2014). Abnormal copper homeostasis: mechanisms and roles in neurodegeneration. *Toxics*, 2(2), 327-345.
- Marx, J. (1996). Neurobiology: Mutant Enzyme Provides New Insights Into the Cause of ALS. *Science*, 271(5248), 446-447.
- Mills, C. F., & Davis, G. K. (1987). Molybdenum. Trace elements in human and animal nutrition, 1, 429-457.
- Noda, Y., Asada, M., Kubota, M., Maesako, M., Watanabe, K., Uemura, M., ... & Uemura, K. (2013). Copper enhances APP dimerization and promotes A β production. *Neuroscience letters*, 547, 10-15.

O'Dell BL. *Nutr Rev* 1990;48:425–34.

Olivares, Manuel, and Ricardo Uauy. "Copper as an essential nutrient." *The American journal of clinical nutrition* 63.5 (1996): 791S.

Patel BN, Dunn RJ, David S. Alternative RNA splicing generates a glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin in mammalian brain. *J Biol Chem* 2000; 275:4305-10.

Peña MO, Lee J, Thiele DJ. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr* 1999;129:1251-60.

Peña, Maria MO, Jaekwon Lee, and Dennis J. Thiele. "A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution." *The Journal of nutrition* 129.7 (1999): 1251-1260.

Prohaska JR. Neurochemical roles of copper as antioxidant or prooxidant. In: Connor JR, ed. *Metals and Oxidative Damage in Neurological Disorders*. New York: Plenum Press, 1997.

Prohaska, J. R., & Failla, M. L. (1993). Copper and immunity. In *Nutrition and immunology* (pp. 309-332). Springer US.

Ralph A, McArdle H. *Copper Metabolism and Copper Requirements in the Pregnant Mother, Her Fetus, and Children*. New York: International Copper Association, 2001.

Rico H, Roca-Botran C, Hernandez ER, Seco C, Paez E, Valencia MJ, Villa LF. The effect of supplemental copper on osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Menopause* 2000;6:413-16.

Sargentelli, V., Mauro, A. E., & Massabni, A. C. (1996). Aspectos do metabolismo do cobre no homem. *Química Nova*, 19(3), 290.

Schoenemann, H. M., Failla, M. L., & Steele, N. C. (1990). Consequences of severe copper deficiency are independent of dietary carbohydrate in young pigs. *The American journal of clinical nutrition*, 52(1), 147-154.

Schümann, K., Classen, H. G., Dieter, H. H., König, J., Multhaup, G., Rückgauer, M., ... & Biesalski, H. K. (2002). Hohenheim consensus workshop: copper. *European journal of clinical nutrition*, 56(6), 469-483.

Shaw, J. C. L. (1992). Copper deficiency in term and preterm infants. In Nestle nutrition workshop series.

Strain JJ. Trace elements and cardiovascular disease. *Bibl Nutr Diets* 1998;54:127-40.

Thiele, Dennis J. "Metal-regulated transcription in eukaryotes." *Nucleic acids research* 20.6 (1992): 1183.

Tümer, Z., and Møller, L. B. (2010). Menkes disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 5, 511–518. doi: 10.1038/ejhg.2009.187

Turnlund J. Copper. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, eds. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1999:241-52.

Turnlund J. Human whole -body copper metabolism. *Am J Clin Nutr* 1998 (suppl);67:960S-4S.

Turnlund, J. R. (1998). Human whole-body copper metabolism. *The American journal of clinical nutrition*, 67(5), 960S-964S.

Turnlund, J. R., Keen, C. L., & Smith, R. G. (1990). Copper status and urinary and salivary copper in young men at three levels of dietary copper. *The American journal of clinical nutrition*, 51(4), 658-664.

Turnlund, J. R., Keyes, W. R., & Peiffer, G. L. (1995). Molybdenum absorption, excretion, and retention studied with stable isotopes in young men at five intakes of dietary molybdenum. *The American journal of clinical nutrition*, 62(4), 790-796.

Turnlund, J. R., Keyes, W. R., Anderson, H. L., & Acord, L. L. (1989). Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope ⁶⁵Cu. *The American journal of clinical nutrition*, 49(5), 870-878.

Turnlund, J. R., Scott, K. C., Peiffer, G. L., Jang, A. M., Keyes, W. R., Keen, C. L., & Sakanashi, T. M. (1997). Copper status of young men consuming a low-copper diet. *The American journal of clinical nutrition*, 65(1), 72-78.

Turski, M. L., & Thiele, D. J. (2009). New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2), 717-721.

Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr* 1998(suppl);67:952S-9S.

Uauy, Ricardo, Manuel Olivares, and Mauricio Gonzalez. "Essentiality of copper in humans." *The American journal of clinical nutrition* 67.5 (1998): 952S-959S.

Wapnir, Raul A. "Copper-sodium linkage during intestinal absorption: inhibition by amiloride." *Experimental Biology and Medicine* 196.4 (1991): 410-414.

Win-Shwe, T. T., & Fujimaki, H. (2011). Nanoparticles and neurotoxicity. *International journal of molecular sciences*, 12(9), 6267-6280.

WHO, FAO, and I. A. E. A. Iodine. "Trace elements in human nutrition and health." Geneva: World Health Organization (1996): 49-47.

World Health Organization. Copper. In: Trace elements in human nutrition and health. Geneva: World Health Organization, 1996;123–43.

World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality. Geneva: World Health Organization, 1998.

World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality: recommendations. Vol. 1. World Health Organization, 2004

Wu, F., Wang, J., Pu, C., Qiao, L., & Jiang, C. (2015). Wilson's disease: a comprehensive review of the molecular mechanisms. *International journal of molecular sciences*, 16(3), 6419-6431.

Zaitseva, I., Zaitsev, V., Card, G., Moshkov, K., Bax, B., Ralph, A., & Lindley, P. (1996). The X-ray structure of human serum ceruloplasmin at 3.1 Å: nature of the copper centres. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1(1), 15-23.

Livros:

Beatty, R. (2001). *The elements: Copper*. New York, EUA: Benchmark Books, Marshall Cavendish Corporation

Brown, David R., ed. *Neurodegeneration and prion disease*. Springer Science & Business Media, 2005.

Johanson, P. (2007). *Understanding the metals of the periodic table: Copper*. The Rosen Publishing Group.

Leone, A., & Mercer, J. F. (Eds.). (1999). *Copper Transport and Its Disorders: Molecular and Cellular Aspects* (Vol. 448). Springer Science & Business Media.

Lide, D. R., & Frederikse, H. P. R. (1993). CRC handbook of chemistry and physics. 74th edn CRC Press. *Boca Raton*.

Linder, Maria C. Biochemistry of copper. Vol. 10. Springer Science & Business Media, 2013.

Luparello, C. (2007). Novel Aspects of PTHrP Physiopathology. Nova Publishers.

Pedroso, M. F., Lima, I. V., 2001, Ecotoxicologia do cobre e seus compostos, Salvador, Série Cadernos de Referência Ambiental, Vol. 2


Walshe, J. (Ed.). (2009). Copper: quest for a cure. Bentham Science Publishers.

Hiperligações:

www.copperalliance.org.uk

Anexos

Anexo 1: Tabela Periódica da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) versão de 8 de Janeiro de 2016 (www.iupac.org).



| 1 | | | | | | | | | | | | 18 | | | | | |
|---|--|--|---------------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------------------|--|-------------------------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|---|--|--|--|---|-------------------------------------|
| 1 H hydrogen [1.007, 1.008] | 2 He helium [4.003] | | | | | | | | | | | 13 B boron [10.80, 10.83] | 14 C carbon [12.00, 12.02] | 15 N nitrogen [14.00, 14.01] | 16 O oxygen [15.99, 16.00] | 17 F fluorine [18.99] | 18 Ne neon [20.18] |
| 3 Li lithium [6.938, 6.997] | 4 Be beryllium 9.012 | | | | | | | | | | | 5 Al aluminum 26.98 | 6 Si silicon [28.06, 28.09] | 7 P phosphorus 30.97 | 8 S sulfur [32.05, 32.06] | 9 Cl chlorine [35.44, 35.46] | 10 Ar argon 39.95 |
| Key: atomic number Symbol name standard atomic weight | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 Na sodium 22.99 | 12 Mg magnesium [24.30, 24.31] | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 Al aluminum 26.98 | 14 Si silicon [28.06, 28.09] | 15 P phosphorus 30.97 | 16 S sulfur [32.05, 32.06] | 17 Cl chlorine [35.44, 35.46] | 18 Ar argon 39.95 |
| 19 K potassium 39.10 | 20 Ca calcium 40.08 | 21 Sc scandium 44.96 | 22 Ti titanium 47.87 | 23 V vanadium 50.94 | 24 Cr chromium 52.00 | 25 Mn manganese 54.94 | 26 Fe iron 55.85 | 27 Co cobalt 58.93 | 28 Ni nickel 58.69 | 29 Cu copper 63.55 | 30 Zn zinc [65.382] | 31 Ga gallium 69.72 | 32 Ge germanium 72.63 | 33 As arsenic 74.92 | 34 Se selenium 78.97 | 35 Br bromine [79.90, 79.91] | 36 Kr krypton 83.80 |
| 37 Rb rubidium 85.47 | 38 Sr strontium 87.62 | 39 Y yttrium 88.91 | 40 Zr zirconium 91.22 | 41 Nb niobium 92.91 | 42 Mo molybdenum 95.96 | 43 Tc technetium | 44 Ru ruthenium 91.1 | 45 Rh rhodium 102.9 | 46 Pd palladium 106.4 | 47 Ag silver 107.8 | 48 Cd cadmium 112.4 | 49 In indium 114.8 | 50 Sn tin 118.7 | 51 Sb antimony 121.8 | 52 Te tellurium 127.6 | 53 I iodine 126.9 | 54 Xe xenon 131.3 |
| 55 Cs caesium 132.9 | 56 Ba barium 137.3 | 57-71 lanthanoids | 72 Hf hafnium 178.5 | 73 Ta tantalum 180.9 | 74 W tungsten 183.8 | 75 Re rhenium 186.2 | 76 Os osmium 190.2 | 77 Ir iridium 192.2 | 78 Pt platinum 195.1 | 79 Au gold 197.0 | 80 Hg mercury 200.6 | 81 Tl thallium [204.3, 204.4] | 82 Pb lead 207.2 | 83 Bi bismuth 208.6 | 84 Po polonium | 85 At astatine | 86 Rn radon |
| 87 Fr francium | 88 Ra radium | 89-103 actinoids | 104 Rf rutherfordium | 105 Db dubnium | 106 Sg seaborgium | 107 Bh bohrium | 108 Hs hassium | 109 Mt meitnerium | 110 Ds darmstadtium | 111 Rg roentgenium | 112 Cn copernicium | 113 Uut ununtrium | 114 F1 flerovium | 115 Uup ununpentium | 116 Lv livermorium | 117 Uus ununseptium | 118 Uuo ununoctium |
| 57 La lanthanum 138.9 | 58 Ce cerium 140.1 | 59 Pr praseodymium 140.9 | 60 Nd neodymium 144.2 | 61 Pm promethium | 62 Sm samarium 150.4 | 63 Eu europium 152.0 | 64 Gd gadolinium 157.3 | 65 Tb terbium 158.9 | 66 Dy dysprosium 162.5 | 67 Ho holmium 164.9 | 68 Er erbium 167.3 | 69 Tm thulium 168.9 | 70 Yb ytterbium 173.0 | 71 Lu lutetium 175.0 | | | |
| 89 Ac actinium | 90 Th thorium 232.0 | 91 Pa protactinium 231.0 | 92 U uranium 238.0 | 93 Np neptunium | 94 Pu plutonium | 95 Am americium | 96 Cm curium | 97 Bk berkeleyum | 98 Cf californium | 99 Es einsteinium | 100 Fm fermium | 101 Md mendelevium | 102 No nobelium | 103 Lr lawrencium | | | |

Anexo 2: Propriedades físico-químicas do cobre e de alguns dos seus sais, adaptado de EHC 200, 1998.

| | Cobre | Sulfato de cobre (II) | Oxido Cuproso (I) | Hidróxido de cobre (I) | Cloreto de cobre (II) | Cobre-8 hidroxiquinolinato ou oxina-cobre |
|--------------------------|-----------|---|------------------------|------------------------|-----------------------|---|
| Fórmula Molecular | Cu | CuSO ₄ | Cu ₂ O | Cu(OH) ₂ | CuCl ₂ | C ₁₈ H ₁₂ CuN ₂ O ₂ |
| Massa molecular relativa | 63.55 | 159.6 | 141.3 | 97.56 | 134.45 | 351.9 |
| Ponto de ebulição (°C) | 2567 | Decompõe-se em CuO a 650°C | | Decompõe-se a 140°C | Decompõe-se a 993°C | |
| Ponto de fusão (°C) | 1083.4 | Decompõe-se ligeiramente a temperaturas ≥ 200°C | 1235 | | 620 | Decompõe-se a 270°C |
| Solubilidade em água | Insolúvel | 143g/L a 0°C | Praticamente insolúvel | 2.9mg/L a 25°C | 706g/L | Insolúvel |

Anexo 3: Quantidade de cobre nos diferentes alimentos (WHO 2004)

| Alimentos | Cobre (mg/Kg) |
|-----------------------|------------------|
| <i>Leite</i> | |
| Colostro humano | 0.57 (0.24-0.76) |
| Humano | 0.2-0.76 |
| Vaca | 0.1-0.88 |
| Magro em pó | 0.7 |
| <i>Visceras</i> | |
| Rim de bovino | 2.1-4.3 |
| Fígado de bovino | 157 |
| Fígado de cordeiro | 56 |
| <i>Carne</i> | |
| Bife de vaca/bovino | 0.1-1.8 |
| Bife de porco | 0.1-9.1 |
| <i>Cereais</i> | |
| Milho | 0.6-16.6 |
| Trigo | 3.3-36.0 |
| Arroz | 0.6-3.1 |
| Pão de trigo | 29 |
| Pão de trigo integral | 34 |
| <i>Vegetais</i> | |
| Batata | 0.48-16.0 |
| Batata frita | 2.2-3.6 |
| Batata doce | 0.15 |
| Cenoura | 0.37-0.62 |
| Brocolos | 0.68-0.87 |
| Ervilha | 1.9-2.4 |
| Alface | 0.1-2.9 |
| Tomate | 0.1-3.4 |
| Couve | 0.1-1.7 |
| <i>Peixe/ Marisco</i> | |
| Atum | 0.1-1.2 |
| Salmão | 0.5-0.8 |

| | |
|----------------------|-----------|
| Truta | 0.1-3.3 |
| Solha | 0.1-2.5 |
| Camarão | 2.0-2.9 |
| <i>Fruta</i> | |
| Maçã | 0.1-2.3 |
| Banana | 0.7-3.0 |
| Uvas | 0.74-1.5 |
| Pêssego | 1.1-1.4 |
| Ananás | 0.86-0.96 |
| Ameixa | 3.7-5.0 |
| Toranja | 0.3-0.6 |
| Laranja | 0.8-0.9 |
| <i>Frutos secos</i> | |
| Passas | 2.7-4.1 |
| Amendoim | 2.7-9.6 |
| Amêndoa | 9.7-13.6 |
| Noz | 2.0-13.9 |
| Sementes de girassol | 14.3-19.0 |
| <i>Gelados</i> | |
| Chocolate | 0.3-3.4 |
| Baunilha | 0.1-0.9 |
| Morango | 0.1-1.4 |