



# UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

*Tânia Dalila de Jesus Barcelos*

## **COBRE:** VITAL OU PREJUDICIAL PARA A SAÚDE HUMANA?

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM MEDICINA PELA  
UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

**ORIENTADOR:** *Professor Doutor José Luís Ribeiro Themudo Barata*

**Covilhã, Junho de 2008**



**UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



*Tânia Dalila de Jesus Barcelos*

## **COBRE:**

**VITAL OU PREJUDICIAL PARA A  
SAÚDE HUMANA?**

Dissertação realizada sob orientação de  
**Professor Doutor José Luís Ribeiro Themudo Barata<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Licenciado em Medicina pela Faculdade de Medicina em Lisboa, Especialista em Medicina Interna com Graduação em Consultor, Especialista em Medicina Desportiva pela Ordem dos Médicos, Mestre em Medicina Desportiva pela Faculdade de Medicina de Lisboa, Doutorado em Medicina Interna pela Faculdade de Medicina de Lisboa, Professor da Faculdade de Medicina da Universidade da Beira Interior e de Fisiologia do Esforço do Departamento de Ciências do Desporto da UBI e Director do Serviço de Nutrição e Actividade Física do Centro Hospitalar da Cova da Beira, e da Consulta de Obesidade e Controle do Peso do mesmo Centro Hospitalar.

*“O princípio da sabedoria é desejá-la”*  
**[Ibn Gabirol]**

# Resumo

O cobre é um oligoelemento essencial para muitas funções fisiológicas. Existem mecanismos homeostáticos que permitem que este actue como co-factor em processos enzimáticos e que previnem a acumulação de cobre em níveis tóxicos. Esta dissertação tem como objectivo primordial compreender o papel biológico do cobre na fisiologia humana. A importância do cobre é justificada pelo seu papel na transferência de electrões nas actividades enzimáticas de oxidação-redução, fisiologicamente importantes. Destaca-se o envolvimento do cobre na defesa contra o dano oxidativo e, ao mesmo tempo, a sua capacidade para formar radicais hidroxil, através da reacção de Fenton. Nesta dissertação procurou-se avaliar as necessidades nutricionais diárias de cobre, com exposição das DDRs recomendadas, da biodisponibilidade e do metabolismo do cobre. Incidiu-se sobre as consequências da deficiência bem como do excesso de cobre. Foi também focada a existência de erros genéticos do metabolismo do cobre. Para tal, organizou-se uma revisão da literatura publicada sobre a temática, utilizando a base de dados MEDLINE. A principal conclusão é que, apesar de ser necessária a reavaliação dos dados publicados e a realização de novas investigações, o cobre é um elemento Vital para a Saúde Humana.

# Palavras Chave

Cobre

Bioquímica do cobre

Papel biológico do cobre

Dose diária recomendada

Metabolismo do cobre

Cuproenzimas

Doença de Wilson

Doença de Menkes

Deficiência de cobre

Toxicidade do cobre

Radicais livres

# Abstract

Copper is an essential trace element for many physiological functions. Homeostatic mechanisms exist to allow copper to act as a cofactor in enzymatic processes and to prevent the accumulation of copper in toxic levels. The primary objective of this thesis is understand the copper biological role in human physiology. Copper importance is justified by its role in the electrons transfer in the enzymatic oxidation-reduction activities, physiologically importants. It was here presented the copper involvement in defence against oxidative damage and at the same time, their ability to form hydroxyl radical by the Fenton reaction. In this dissertation it was evaluated the daily nutritional copper needs, with exposure of recommended DDRs, bioavailability and copper metabolism. It was focused the consequences of copper deficiency and copper excess, and the existence of genetic errors of copper metabolism. To this end, it was organized a review of published literature on this thematic, using the database MEDLINE. The main conclusion is that, although it is required a re-assessment of the published data and new researchs, copper is a Vital element to Human Health.

# Keywords

Copper

Copper biochemistry

Biological role of copper

Recommended daily needs

Copper metabolism

Cuproenzymes

Wilson's disease

Menke's disease

Copper deficiency

Copper toxicity

Free radicals

# Agradecimentos

*“Pela primeira vez sentimo-nos desassossegados. As palavras ganham um novo sentido quando não se tornam previsíveis; ganham nova vida quando propõem olhares e despertam perplexidades, quando inquietam o pensamento. E tornam-se sempre insuficientes quando com elas queremos dizer o que nos vai para lá da alma.” Como agora.*

Desejo expressar o meu agradecimento ao Professor Doutor José Luís Ribeiro Themudo Barata, responsável como orientador, pelo espírito crítico e construtivo que me incutiu no decorrer deste trabalho, marcante na minha forma de encarar a investigação científica.

Aos meus pais, por incutirem o amor ao estudo e à realização profissional, entre outros valores que regem a minha vida, pelo apoio na superação dos diversos obstáculos e por terem suportado os encargos dos meus estudos. Sei que é a vós que devo o facto de ser aquilo que sou hoje. À minha restante família, pela sua compreensão, carinho e pelos seus sábios conselhos.

Ao Sérgio, pelo apoio incondicional e incentivo sempre demonstrado, pela companhia, pelo carinho e toda a confiança em mim depositada.

---

# Índice

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Motivação e Enquadramento Teórico	2
1.2 Metodologia	4
1.3 Organização do texto	4
1.4 Notação	5
<b>CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO DO COBRE</b>	<b>6</b>
2.1 Generalidades	7
2.2 Identificação do elemento	7
2.3 Propriedades físicas e químicas	9
<b>CAPÍTULO 3. QUÍMICA FISIOLÓGICA</b>	<b>10</b>
3.1 Resenha Histórica	11
3.2 Papel biológico do cobre	13
3.3 Aspectos nutricionais, biodisponibilidade e recomendações gerais	19
3.4 Metabolismo	23
3.4.1 Absorção	23
3.4.2 Transporte e Distribuição	26

3.4.3 Excreção	28
3.5 Bases Moleculares da Homeostase do Cobre	29
3.5.1 Transferência do cobre através das membranas celulares	30
3.5.2 Redução do Cobre	32
3.5.3 ATPases transportadoras de cobre	33
3.5.4 Metalotioneínas e Metalochaperones	34
<u>CAPÍTULO 4. ERROS GENÉTICOS DO METABOLISMO DO COBRE</u>	<u>37</u>
4.1 Introdução	38
4.2 Doença de Menkes	39
4.3 Doença de Wilson	41
4.4 Outros síndromes hereditários relacionados com o cobre	44
<u>CAPÍTULO 5. EFEITOS BIOLÓGICOS DA DEFICIÊNCIA E DO EXCESSO DE COBRE</u>	<u>46</u>
5.1 Deficiência	47
5.2 Toxicidade	54
5.2.1 Bases bioquímicas para a toxicidade do cobre	54
5.2.2 Toxicidade do cobre em humanos	56
5.2.3 Cobre como um pró-oxidante	58
<u>CAPÍTULO 6. CONCLUSÃO</u>	<u>60</u>
6.1 Principais Conclusões	61
6.2 Linhas orientadoras de trabalhos futuros	62
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>64</u>

---

# Lista de Tabelas e Figuras

<b>Tabela 2.1</b> – Estados oxidativos do cobre	8
<b>Tabela 2.2</b> – Propriedades físicas e químicas do cobre e de alguns sais de cobre	9
<b>Tabela 3.1</b> - Enzimas cupro-dependentes	14
<b>Tabela 3.2</b> - Factores de transcrição genética dependentes do cobre	17
<b>Tabela 3.3</b> - Concentração de cobre nos alimentos	21
<b>Tabela 3.4</b> - Dose Diária Recomendada para o cobre ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )	22
<b>Tabela 3.5</b> - Promoção e inibição da absorção intestinal de cobre	26
<b>Tabela 3.6</b> - Locais de armazenamento de cobre	27
<b>Tabela 3.7</b> - Concentração de cobre nos fluídos e tecidos corporais em adultos	28
<b>Tabela 4.1</b> - Doenças genéticas associadas a alterações do metabolismo do cobre	38
<b>Tabela 4.2</b> - Manifestações clínicas da Doença de Wilson	43
<b>Tabela 5.1</b> - Valores séricos normais de cobre e ceruloplasmina	54
<b>Figura 3.1</b> - Modelo da transcrição regulada pelo cobre	18
<b>Figura 3.2</b> - Elementos da homeostase do cobre e defeitos da DW e da DM	31
<b>Figura 3.3</b> - Modelo do metabolismo do cobre na célula hepática	36
<b>Figura 4.1</b> - Anéis de Kayser-Fleischer	43

---

# Abreviaturas e Acrónimos

**aC** – Antes de Cristo

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**BHE** – Barreira Hematoencefálica

**Ca** – Fórmula química do cálcio

**CP** – Ceruloplasmina

**Cu** – Fórmula química do cobre

**DDR** – Dose diária recomendada

**DM** – Doença de Menkes

**DW** – Doença de Wilson

**K** – Fórmula química do potássio

**MT** – Metalotioneína

**Na** – Fórmula química do sódio

**RL** – Radicais livres

**SOD1** – Superóxido Dismutase 1

**WHO** – World Health Organization

---

# CAPÍTULO

# 1

---

Introdução

## 1.1 Motivação e Enquadramento Teórico

A motivação que me impulsionou para esta temática, está primordialmente relacionada com a convivência e com o acompanhar da evolução clínica de um familiar portador da Doença de Wilson (DW). Sendo o cobre o elemento implicado na progressão da mesma, tornou-se importante, para mim, aprofundar o conhecimento acerca deste mineral que, como outros oligoelementos, influi sobre vários processos biológicos. Naturalmente impôs-se a questão: “Será o cobre vital ou prejudicial para a saúde humana?”, a qual acabou por ser o fundamento desta dissertação, constituindo a sua intitulação. Por outro lado, a fraca incidência durante a minha formação académica neste tema, reforçou a opção pelo mesmo. Desta forma, esta abordagem facilitará ainda a consolidação e aquisição de conhecimentos que certamente se revelarão importantes na minha vida futura enquanto profissional de saúde.

Em pleno século XXI, e apesar dos conhecimentos científicos até agora adquiridos pelas várias pesquisas experimentais e clínicas, em Portugal, deparamo-nos ainda com uma considerável lacuna em termos de informação sistematizada acerca da complexidade do papel do cobre na Saúde Humana. Torna-se então preponderante reunir e sintetizar os pontos de vista prevaletentes sobre a importância e o impacto deste elemento na população em geral. Assim, e tendo por base esta premissa, a presente tese tem por objectivo mostrar aspectos actuais, reforçados pela literatura, não só sobre o papel biológico mas também sobre aspectos deletérios do cobre na Saúde Humana.

Sendo o cobre o principal interesse científico desta dissertação, segue-se uma nota introdutória acerca deste elemento que se tem revelado essencial para o ser humano.

O cobre é um elemento químico que apresenta quatro estados de oxidação ( $\text{Cu}^0$ ,  $\text{Cu}^{+1}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+3}$ ) predominando nos sistemas biológicos como  $\text{Cu}^{+2}$ . O ião cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) é instável sendo facilmente oxidado a ião cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) [Linder *et al.*, 1996]. As mudanças do estado de oxidação podem alterar os sistemas biológicos, afectando diversas moléculas através da oxidação (peroxidação de lípidos, dano do DNA por oxidação das bases nitrogenadas, por exemplo). Por outro lado, a transição entre estes diferentes estados de oxidação permite a participação deste elemento numa diversidade de actividades catalíticas próprias da transferência de electrões [Uauy *et al.*, 1998].

Até 1928 sabia-se que o cobre era um constituinte da hemocianina – pigmento responsável pelo transporte de oxigénio em invertebrados. Após esta data, foi reconhecido como um elemento essencial para os vertebrados quando se demonstrou que a anemia em ratos alimentados somente à base de leite podia ser corrigida pela adição de cinzas de origem animal e vegetal que continham sulfureto de cobre [Uauy *et al.*, 1998]. Além disso, hoje é largamente conhecido que organismos tão diferentes como as leveduras e os mamíferos compartilham requisitos idênticos na regulação do metabolismo do cobre para garantir a correcta função de várias proteínas. Recentemente, estudos bioquímicos e moleculares demonstraram que o cobre intervém em vários processos homeostáticos celulares agindo tanto como co-factor como componente alostérico de várias cuproenzimas, conferindo-lhes uma estrutura apropriada para a acção catalítica. O cobre tal como outros iões, interfere também, na regulação da expressão genética [Uauy *et al.* 1998; Caballero, 2005].

Sendo então o cobre um micronutriente necessário para a fisiologia humana e o terceiro oligoelemento mais comum do corpo humano, importa dissertar sobre os mecanismos envolvidos na bioquímica deste elemento.

## 1.2 Metodologia

Organizou-se uma revisão da literatura publicada sobre o estado da arte, utilizando-se a base de dados MEDLINE para a procura dos artigos.

Foram pesquisados artigos utilizando as seguintes palavras-chave: “copper”, “copper essentiality”, “copper diseases”, “copper metabolism”, “copper functions”, “copper excess” e “copper deficiency”. Filtraram-se os documentos pelo idioma (inglês, espanhol e português) e pela sua data de colocação on-line (2000 até à presente data). Após leitura do abstract e, em alguns casos, após leitura integral, foi possível a selecção dos artigos mais relevantes para este trabalho e, por não ter informação suficiente acerca de determinados aspectos relevantes nesta área, procedeu-se ao alargamento do intervalo das datas para incluir os artigos disponíveis desde 1998. Foram também utilizados artigos referenciados nos artigos primordialmente escolhidos, mesmo que publicados anteriormente às datas referidas.

Foram incluídos trabalhos de revisão, estudos prospectivos, meta-análises e ensaios clínicos.

Por fim, procedeu-se à pesquisa de alguns livros publicados na área da Nutrição e da Bioquímica.

## 1.3 Organização do texto

O texto da tese está organizado em 6 capítulos. O Capítulo 2 é destinado à caracterização e descrição química do cobre. No Capítulo 3 é discutido o papel fisiológico do cobre, são apontados os aspectos fundamentais do metabolismo e da sua homeostase. No Capítulo 4 é feita uma revisão das doenças genéticas associadas à

deficiência – Doença de Menkes (DM) e ao excesso de cobre – Doença de Wilson. No Capítulo 5 versa-se acerca do efeitos biológicos da deficiência e do excesso de cobre, bem como sobre a sua contribuição para a formação de radicais livres. O Capítulo 6 conclui a tese e apresenta algumas direcções que se crêem importantes para o desenvolvimento de trabalhos futuros.

## **1.4 Notação**

As figuras e tabelas são identificadas com referência ao capítulo em que são apresentadas e são numeradas de forma sequencial no capítulo respectivo. A identificação das referências bibliográficas é representada entre parênteses rectos [].

---

# CAPÍTULO

# 2

---

## Caracterização do Cobre

## 2.1 Generalidades

O cobre aparece na Natureza, na sua forma metálica, em minérios e minerais, sendo um dos primeiros metais utilizados pelo Homem. Esta utilização tem sido referenciada desde 5000 aC na região do Egeu, onde o cobre serviu para a criação de objectos de arte valiosos. A palavra cobre tem origem do latim *cuprum*, derivada de *Cyprum*, nome latino da ilha do Chipre, considerada país do cobre por excelência, assim como Espanha. O cobre é utilizado em sistemas internos, canalizações e utensílios de cozinha, na produção de fios eléctricos, em aplicações de microelectrónica, na galvanoplastia e fotografia, como material de telhados e como catalisador na indústria química.

## 2.2 Identificação do elemento

O cobre é um membro dos elementos de transição, sendo o primeiro do grupo IB da Tabela Periódica. Tem símbolo químico Cu, número atómico 29 e peso atómico de 63.546. Possui dois isótopos estáveis,  $^{63}\text{Cu}$  e  $^{65}\text{Cu}$ , com uma abundância relativa de 69.2% e de 30.8%, respectivamente. Este elemento apresenta quatro estados de oxidação:  $\text{Cu}^0$ ,  $\text{Cu}^{+1}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+3}$ , de forma excepcional (**Tabela 2.1**). Nos sistemas biológicos predomina como  $\text{Cu}^{+2}$ . O ião cuproso é instável sendo facilmente oxidado a ião cúprico [Linder *et al.*, 1996]. Têm sido caracterizados isótopos radioactivos, sendo os mais estáveis o  $^{67}\text{Cu}$ , o  $^{64}\text{Cu}$  e o  $^{61}\text{Cu}$  com uma vida média de 61.83, 12.7 e 3.333 horas, respectivamente. Os restantes, com massas atómicas entre 54.966 ( $^{55}\text{Cu}$ ) e 78.955 ( $^{79}\text{Cu}$ ), têm uma vida média inferior a 23.7 minutos, sendo que a maioria não alcança os 30 segundos.

**Tabela 2.1** – Estados oxidativos do cobre

<b>Estado Oxidativo</b>	<b>Cobre</b>	<b>Considerações</b>
$\text{Cu}^0$	Cobre metálico	
$\text{Cu}^+$	Ião cuproso	Instável em pH neutro, oxidado a $\text{Cu}^{+2}$ pelo ar
$\text{Cu}^{+2}$	Ião cúprico	Estável
$\text{Cu}^{+3}$	Ião trivalente	
<b>Fórmula estrutural</b>	<b>Cu</b>	

O cobre é encontrado numa grande variedade de sais minerais e de compostos orgânicos, podendo também ser encontrado na Natureza na sua forma metálica, como anteriormente referido. O metal possui uma cor castanho-avermelhada, é maleável, um bom condutor térmico e um excelente condutor eléctrico. A forma metálica é estável em ar seco e em baixas temperaturas, no entanto sofre uma reacção lenta na presença de ar húmido para produzir um hidroxicarbonato ou um hidrosulfato que forma uma película de cor cinzento-esverdeado sobre a superfície subjacente para protecção do metal. O cobre metálico é moderadamente solúvel em água, sal e em soluções ligeiramente ácidas, podendo ser dissolvido em ácido nítrico e ácido sulfúrico bem como em soluções básicas de hidróxido de amónio, carbonato de amónio e cianeto, na presença de oxigénio [EHC 200, 1998].

A configuração electrónica da forma metálica ( $\text{Cu}^0$ ) é  $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4p^1$ . Os estados de oxidação mais comuns são o cuproso ( $\text{Cu}^{+1} 3d^{10}$ ) e o cúprico ( $\text{Cu}^{+2} 3d^9$ ). A química do elemento, especialmente nos sistemas biológicos, é profundamente alterada pelo estado electrónico/de oxidação. A facilidade com que ocorre alteração do estado de oxidação fornece a este elemento propriedades redox que podem ser de natureza essencial ou deletéria nos sistemas biológicos.

O estado de oxidação mais importante em ambientes aquosos é o cúprico. O íon cúprico liga-se, preferencialmente através do oxigênio, a ligandos inorgânicos (H<sub>2</sub>O, OH<sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>-2</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, etc.) e a ligandos orgânicos através de grupos fenólicos e carboxílicos.

A forma trivalente de cobre é encontrada apenas em alguns compostos e é um forte agente oxidante.

### 2.3 Propriedades físicas e químicas

As propriedades físicas e químicas do cobre e alguns dos seus sais encontram-se sumarizadas na **Tabela 2.2**.

**Tabela 2.2** – Propriedades físicas e químicas do cobre e de alguns sais de cobre

	<b>Cobre</b>	<b>Sulfato de Cobre</b>	<b>Óxido cuproso</b>	<b>Hidróxido de Cobre</b>	<b>Cloreto de Cobre</b>
Fórmula Molecular	Cu	CuSO <sub>4</sub>	Cu <sub>2</sub> O	Cu(OH) <sub>2</sub>	CuCl <sub>2</sub>
Massa molecular relativa	63.55	159.6	141.3	97.56	134.45
Ponto de ebulição	2567	Decompõe-se em CuO a 650°C	-	Decompõe-se a 140°C	Decompõe-se a 993 °C
Ponto de fusão	1083,4	Decompõe-se parcialmente a > 200°C	1235	Decompõe-se	620
Solubilidade na água	Insolúvel	143 g/L a 0°C	Praticamente Insolúvel	2.9 mg/L a 25°C	706 g/L

Adaptado de EHC 200, 1998

---

# CAPÍTULO

# 3

---

Química Fisiológica

### 3.1 Resenha Histórica

O cobre foi identificado em plantas e animais no século XIX e proclamado como catalisador biológico no século XX. Ao longo dos anos foram surgindo novos conhecimentos acerca deste elemento, que ajudaram a estabelecer o seu importante papel nas funções fisiológicas do ser humano.

Estudos delineados para testar a necessidade de cobre, em animais de grande porte foram primordialmente incitados pela hemocianina, molécula que transporta oxigénio nos invertebrados e que contém cobre [Pedroso e Lima, 2001]. No entanto, a potencial necessidade de cobre nos humanos não foi reconhecida até 1928, altura em Hart *et al.* documentaram que o cobre seria um elemento essencial para a formação de eritrócitos em ratos alimentados com uma dieta exclusivamente à base de leite. A consequente anemia foi corrigida pela adição de cinzas de origem animal ou vegetal à dieta, na qual o precipitado de sulfureto de hidrogénio, que continha sulfureto de cobre, foi responsável pela recuperação. Achados semelhantes em humanos estabeleceram a base para a essencialidade deste elemento [Pedrosa e Cozzolio, 1999]. Estudos realizados no século passado, nos anos 60 em crianças desnutridas do Peru e nos anos 70 no Chile, evidenciaram a recuperação dos doentes com anemia refractária ao tratamento com ferro, neutropenia e anomalias na medula óssea, após suplementação da dieta com cobre [Uauy *et al.*, 1998]. No conjunto, estes estudos estabeleceram que o cobre é necessário para o crescimento, mecanismos de defesa, mineralização óssea, maturação de eritrócitos e leucócitos, transporte de ferro, metabolismo do colesterol, contractilidade do miocárdio, metabolismo da glicose e desenvolvimento cerebral [Linder *et al.*, 1998].

Depois de reconhecida a particular importância do cobre na síntese de hemoglobina em ratos, o metabolismo do cobre passou a ser objecto de discussão e alvo de proficua investigação. Foram realizados vários estudos em cadáveres humanos, entre 1930 e 1940 [Turnlund, 1998], no entanto, os resultados desta investigação nunca terão sido publicados até 1944 [Wintrobe *et al.*, 1952], altura em que Cartwright e Wintrobe iniciaram uma investigação acerca do metabolismo do cobre num grupo de indivíduos saudáveis, composto por estudantes de medicina, médicos, enfermeiros e técnicos de laboratório, com idades compreendidas entre os 17 e 45 anos. Estes autores estimaram a percentagem de cobre que seria absorvida perante uma dieta normal, a percentagem que seria excretada pelas diferentes vias de excreção e a quantidade de cobre presente nos diferentes órgãos de acumulação de cobre [Mercer, 1998].

Foi descrito que o cobre seria um componente essencial da dieta para a manutenção da cor do pêlo em várias espécies de animais. Keil e Nelson, em 1931, constataram que ratos pretos tornaram-se cinzentos quando alimentados com uma dieta pobre em cobre.

As doenças genéticas associadas a alterações do metabolismo do cobre, nomeadamente a doença de Wilson e a doença de Menkes, são conhecidas pelo Homem à vários anos. A doença de Wilson é conhecida desde 1883, quando Westphal a denominou de pseudoesclerose ao observar a presença de tremores e rigidez em dois pacientes. Strümpell, em 1898, evidenciou uma doença no fígado aquando da autópsia de dois pacientes portadores de tremores. Em 1912, Kinnier Wilson descreveu a forma clássica da doença, correlacionando a sintomatologia dos gânglios da base à doença do fígado, denominando-a então de degeneração lenticular progressiva. Hall, em 1921, descreveu a doença como degeneração hepatolenticular [Brito *et al.*, 2005]. Em 1930 na

Austrália, cientistas veterinários descreveram o papel importante do cobre no desenvolvimento neurológico através da associação da deficiência de cobre com a doença desmielinizante em borregos com ataxia. Quarenta anos mais tarde, Danks identificou a doença de Menkes como um exemplo humano de desenvolvimento neurológico anormal devido à deficiência de cobre.

Todos estes estudos contribuíram, de alguma forma, para estabelecer o papel biológico do cobre, compreender a cinética e o metabolismo e interpretar a reacção orgânica perante o défice ou excesso de cobre, nos seres humanos.

### 3.2 Papel biológico do cobre

O cobre foi reconhecido como um nutriente essencial para o Homem há cerca de 80 anos, quando, como já mencionado, Hart *et al.* documentaram que este seria um elemento essencial para a eritropoiese em ratos alimentados exclusivamente com leite. O rápido desenvolvimento no campo analítico e na biologia celular permitiram uma melhoria da compreensão do papel do cobre nas deficiências imunológicas, no tecido conjuntivo e esqueleto, na eritropoiese, nos vasos sanguíneos e no sistema nervoso.

A necessidade biológica de cobre deve-se há sua incorporação específica num grande número de proteínas estruturais e enzimáticas [Linder e Hazegh-Azam, 1996]. O papel do cobre nas actividades enzimáticas de oxidação/redução é consequência da sua capacidade para funcionar como um intermediário da transferência de electrões. Deste modo, o cobre está presente nas enzimas envolvidas na respiração celular, na defesa contra radicais livres, na função de neurotransmissão, na síntese de tecido conjuntivo e no metabolismo celular do ferro [EHC 200, 1998]. Em algumas delas, o cobre é

necessário como co-factor, como no caso da superóxido dismutase 1 (SOD1), da citocromo-c oxidase, da ceruloplasmina e da tirosinase, também conhecida como monofenol monooxigenase (**Tabela 3.1**). Além disso, a actividade oxidase da ceruloplasmina e da SOD1 requer especificamente a presença de cobre. Noutros casos, o cobre parece actuar como componente alostérico de algumas enzimas, conferindo-lhes uma estrutura apropriada para as suas actividades catalíticas. O cobre não pode ser substituído por outro elemento já que apenas este proporciona as propriedades redox necessárias nestas proteínas.

**Tabela 3.1** - Enzimas cupro-dependentes.

Enzima	Função
Citocromo-c oxidase	Respiração celular
Superóxido dismutase 1	Defesa antioxidante
Tirosinase	Síntese de melanina, metabolismo de aminoácidos
Proteína-lisina 6-oxidase	Ligação cruzada do colagénio e elastina
Amino-oxidases	Desaminação das aminas primárias
Ceruloplasmina	Transporte de cobre, oxidação
Dopamina- $\beta$ -monooxigenase (ou hidroxilase)	Síntese de catecolaminas
Peptidilglicina monooxigenase	$\alpha$ -amidação de neuropéptidos

Adaptado de Uauy *et al.* (1998), *Essentiality of copper in humans*, Am J Clin Nutr, 67: 952S - 959S.

A citocromo-c oxidase é uma proteína complexa da membrana mitocondrial interna, a última da cadeia transportadora de electrões, que catalisa a redução do oxigénio molecular em água, um passo essencial da respiração celular. Neste processo, dá-se a translocação de quatro protões que ajudam na formação de um potencial quimiosmótico que é usado pela ATP sintetase para a formação de ATP. Nesta enzima, estão presentes 3 átomos de cobre: dois átomos na subunidade I, envolvidos na transferência de electrões do citocromo para o centro heme  $a_3$ -Cu<sub>B</sub> e um átomo na

subunidade II, cuja função consiste na redução do dióxigénio. A deficiência de cobre resulta numa redução da actividade da citocromo-c oxidase e da capacidade respiratória das mitocôndrias, particularmente no fígado, coração e cérebro [Uauy *et al.*, 1998].

A ceruloplasmina (CP) é uma oxidase, produzida principalmente ou exclusivamente no fígado, que contém mais de 90% do cobre sérico total encontrado nos vertebrados. A sua estrutura cristalóide confirma a presença de seis iões de cobre fortemente ligados, três dos quais formam o centro I, envolvido no processo de transferência de electrões. Os restantes três consistem num centro trinuclear único o qual corresponde ao local de activação do oxigénio durante o ciclo catalítico da enzima. Esta enzima está envolvida nas reacções de fase aguda da inflamação e na remoção de radicais livres (RL), protegendo as células contra o dano celular oxidativo.

O metabolismo do ferro e do cobre estão interligados pela actividade ferroxidase da ceruloplasmina. A ceruloplasmina oxida o  $\text{Fe}^{+2}$  (ião ferroso), libertado pela ferritina intracelular, através de uma redução ou chelação, para que possa ser ligado à transferrina, que apenas se une ao  $\text{Fe}^{+3}$  (ião férrico). Assim, a deficiência de ceruloplasmina é acompanhada pela acumulação de ferro no fígado [Harris e Gitlin, 1996].

O papel da SOD1 foi alvo de estudo intensivo. Esta enzima, abundante no fígado, rim e eritrócitos, catalisa a dismutação dos aniões superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) no citoplasma, os quais são sub-produtos da respiração celular. Durante a dismutação, o cobre do centro activo da SOD1 é reduzido pelo substrato  $\text{O}_2^-$  dando origem a dois metabolitos: o oxigénio molecular ( $\text{O}_2$ ) e o peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e proporcionando uma defesa contra radicais livres de oxigénio. Nesta reacção o cobre

não pode ser substituído por qualquer outro metal, porque apenas este confere actividade catalítica a esta enzima, como anteriormente referido. Isto fundamenta a função antioxidante do cobre [Pedrosa e Cozzolino, 1999].

Mutações genéticas que modifiquem a SOD1 estão relacionadas a um aumento da apoptose das células neuronais. Estas mutações estão associadas a 20-25% dos casos de Esclerose Lateral Amiotrófica.

A tirosinase é a enzima responsável pela síntese de melanina, a qual confere protecção contra a exposição a raios ultra-violeta e é responsável pela coloração do cabelo, pele e olhos. Esta enzima é composta por uma, duas ou quatro subunidades com um centro binuclear de cobre [Linder e Hazegh-Azam, 1996].

A dopamina- $\beta$ -monooxigenase ou hidroxilase é a enzima principal da produção de catecolaminas, envolvidas na transmissão neuronal no sistema nervoso central assim como na resposta ao stress mediada pelas glândulas supra-renais. Esta enzima possui dois átomos de cobre em cada uma das suas quatro subunidades.

Assim, o cobre é considerado um componente major para dos centros catalíticos das diferentes enzimas redox, sendo a sua presença essencial para a função fisiológica normal, como a respiração celular, defesa contra radicais livres de oxigénio, síntese de melanina, biossíntese de tecido conjuntivo e metabolismo do ferro.

Assim como outros metais, o cobre tem um papel importante na expressão genética, pela activação ou repressão da transcrição genética. Estudos da transcrição em leveduras permitiram a identificação dos mecanismos de acção dos factores de transcrição regulados pelo cobre em eucariontes [EHC 200, 1998].

O papel do cobre na função das proteínas ligadas a este elemento foi demonstrado para Ace1, Mac1 e Amt1 (**Tabela 3.2**), que correspondem a um conjunto de proteínas que actuam a nível fisiológico como factores de transcrição e possuem um domínio obrigatório de cobre, necessário para a ligação ao ADN. O mecanismo da regulação transcricional pelo Ace1 e Amt1 envolve a união do factor de transcrição, induzida pelo cobre, a uma sequência de activação específica do promotor da metalotioneína (MT). Elementos que respondem a metais (**Figura 3.1**) foram encontrados em todos os promotores da metalotioneína, caracterizados por uma série de repetições dos pares de bases 13-15.

Outra proteína reguladora é a Cup 9, identificada em leveduras. Esta proteína pode actuar como um factor transricional que regula a expressão dos genes envolvidos na distribuição intracelular de cobre [Uauy *et al.*, 1998].

**Tabela 3.2** - Factores de transcrição genética dependentes do cobre.

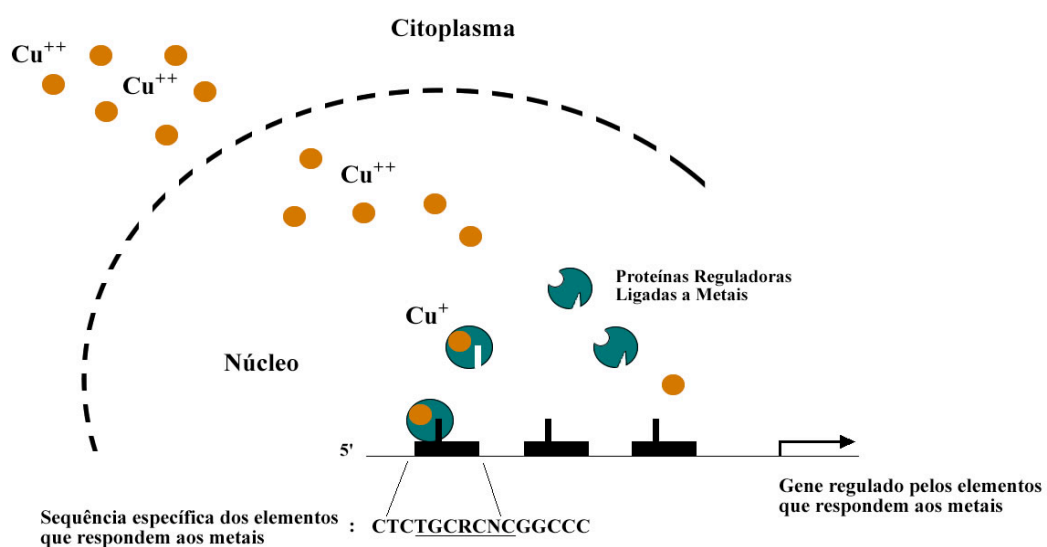
Factor de transcrição	Função
Mac1 <sup>1</sup>	
MT	Armazenamento celular de cobre e tampão
CTT1	Catalase citosólica
FRE1	Redutase cobre/ferro da membrana
Amt1 <sup>1</sup>	
MTI, MTH $\alpha$ e MTH $\beta$	Armazenamento celular de cobre e tampão
SOD1	Dismutação de superóxido
Ace1 <sup>1</sup>	
MT	Armazenamento celular de cobre e tampão
SOD1	Dismutação de superóxido
Cup9 <sup>2</sup>	Distribuição celular de cobre

<sup>1</sup>Cobre como factor alostérico de factores de transcrição. O cobre é absolutamente necessário para a união ao DNA. <sup>2</sup>Gene alvo desconhecido. MT- metalotioneína; SOD- superóxido dismutase. [Uauy *et al.* 1998]

Uma importante característica dos factores de transcrição cupro-dependentes (Ace1, Amt1 e Mac1) é a sua associação com outros genes relacionados com processos fisiológicos. O promotor da SOD1 contém um sítio único de ligação para o Ace1 que regula a transcrição de MT e de SOD1 como resposta ao cobre. Além disso, a Mac1 regula a transcrição de dois genes alvo: o FRE1 (codifica uma proteína de membrana plasmática associada à redução de  $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$ ) e o CTT1 (codifica a catalase citosólica).

Estudos indicam que a ausência de cobre produz efeitos dramáticos em alguns processos celulares, como a proliferação, o crescimento e a actividade metabólica. Alguns destes efeitos relacionam-se com disfunções dos factores de transcrição cupro-dependentes, sugerindo, portanto, que o cobre tem um papel fundamental na fisiologia das células eucariotas.

**Figura 3.1** - Modelo da transcrição regulada pelo cobre.



Os íons de cobre entram no núcleo celular e ligam-se às proteínas reguladoras (Ace1, Mac1 e Amt1). Esta ligação activa-as para interagirem com a sequência específica dos elementos que respondem aos metais na 5' dos genes regulados por estes elementos.

Manifestamente são necessários mais estudos sobre os mecanismos de transcrição regulada pelo cobre em mamíferos incluindo o Homem, especialmente a nível celular e molecular, relacionando os factores de transcrição cuprodependentes e os diferentes processos fisiológicos celulares.

### **3.3 Aspectos nutricionais, biodisponibilidade e recomendações gerais**

O cobre é um micronutriente encontrado em quantidades variáveis na maioria dos alimentos assim como contaminante natural da água. Desta forma, a incorporação corpórea de cobre advém, maioritariamente, por via oral através da alimentação. As maiores concentrações de cobre estão presentes nos órgãos dos animais (por exemplo, o fígado), marisco, frutos secos e cereais (**Tabela 3.3**).

A concentração de cobre nos alimentos varia de país para país, de acordo com o tipo de produto, condições de cultivo (solo, água, uso de fertilizantes e fungicidas que contenham cobre), tipo de processamento e utilização do produto, pH e uso de embalagens ou utensílios de cobre [Pedroso e Lima, 2001].

A ingestão média de cobre através da dieta varia , normalmente, entre 0.9 e 2.7 mg por dia. Esta variação reflecte os diferentes hábitos alimentares assim como os diferentes processamentos agrícolas em todo o mundo, como referido anteriormente. Em alguns casos o consumo de água pode contribuir de forma adicional para a ingestão diária total de cobre, particularmente em habitações mais antigas pela corrosão das canalizações [WHO, 2004].

Considerando que 10% do cobre total ingerido é atribuível ao consumo de água, a WHO propôs uma *guideline* provisória da quantidade de cobre presente na água de 2 mg/l, a qual é considerada protectora contra os efeitos adversos do cobre, fornecendo uma margem de segurança adequada nas populações com homeostase normal [Fitzgerald, 1998; WHO, 2004]. Este valor provisório é explicado da seguinte forma:

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

ID – Ingestão diária de cobre tolerável; P – Peso; % H<sub>2</sub>O – Percentagem de cobre ingerido atribuível ao consumo de água; ID H<sub>2</sub>O – Ingestão diária de água; \*Valor arredondado à unidade.

Para o cálculo do valor desta *guideline*, a WHO utilizou valores de 60 kg e 2 L para o peso corporal e para a ingestão diária de água de um adulto, respectivamente. Foi também utilizada a percentagem de cobre ingerido atribuída ao consumo de água. Na realidade, podem haver variações consideráveis em cada indivíduo no entanto, os valores escolhidos para a obtenção desta *guideline* são considerados suficientemente aceitáveis para valores *standard* [Fitzgerald, 1998]. Uma ingestão diária tolerável é definida como a quantidade de uma substância presente nos alimentos ou na água de consumo alimentar, expressa num peso corporal base, que pode ser ingerida diariamente, por um período indefinido e sem riscos apreciáveis para a saúde. Isto justifica o valor escolhido para a ingestão diária tolerável o qual foi proposto pelo princípio de que não suscitaria quaisquer problemas em termos de saúde humana [Fitzgerald, 1998].

**Tabela 3.3** - Concentração de cobre nos alimentos.

<b>Alimentos</b>	<b>Cobre (mg/Kg)</b>
<b>Leite</b>	
Colostro Humano	0.57 (0.24 - 0.76)
Humano	0.2 - 0.76
Vaca	0.1 - 0.88
Magro (em pó)	0.7
<b>Fígado</b>	
Bovino	157
Cordeiro	56
Rim de Bovino	2.1 - 4.3
<b>Bife</b>	
Bovino	0.1 - 1.8
Porco	0.1 - 9.1
<b>Cereais</b>	
Milho	0.6 - 16.6
Trigo	3.3 - 36.0
Arroz	0.6 - 3.1
Pão de trigo	2.9
Pão de trigo integral	3.4
<b>Vegetais</b>	
Batata	0.48 - 16.0
Batata frita	2.2 - 3.6
Batata-doce	0.15
Cenoura	0.37 - 0.62
Brócolos	0.68 - 0.87
Ervilha	1.9 - 2.4
Alface	0.1 - 2.9
Tomate	0.1 - 3.4
Couve	0.1 - 1.7
<b>Marisco/Peixe</b>	
Atum	0.1 - 1.2
Salmão	0.5 - 0.8
Camarão	2.0 - 2.9
Truta	0.1 - 3.3
Solha	0.1 - 2.5
<b>Fruta</b>	
Maçã	0.1 - 2.3
Banana	
Uva	0.74 - 1.5
Pêssego	1.1 - 1.4
Ananás	0.86 - 0.96
Ameixa	3,7 - 5.0
Laranja	0.8 - 0.9
<b>Gelado</b>	
Chocolate	0.3 - 3.4
Baunilha	0.1 - 0.9
Morango	0.1 - 1.4
<b>Frutos Secos</b>	
Passas	2.7 - 4.1
Amendoim	2.7 - 9.6
Amêndoa	9.7 - 13.6
Noz	2.0 - 13.9

Adaptado de Lönnnerdal (1996), *Bioavailability of copper*, Am J Clin Nutr, 63: 821S - 829S.

Recentemente, o Canadá e os EUA estabeleceram as doses diárias recomendadas (DDRs) para as diferentes idades (**Tabela 3.4**), as quais correspondem às adotadas pela WHO.

Segundo a WHO, o limite inferior do intervalo aceitável de ingestão de cobre é de 12,5 µg/kg/dia, considerando as necessidades dos indivíduos adultos e as variações na absorção, retenção e armazenamento. Para crianças este valor é de 50 µg/kg/dia. A IOM recomenda um limite máximo para a ingestão de cobre em adultos de 10 mg/dia a partir de alimentos e suplementos [WHO, 2004].

**Tabela 3.4** - Dose Diária Recomendada para o cobre (µg/dia).

Idade	DDR
Lactentes	
< 6 meses	200
6-12 meses	220
Crianças	
1-3 anos	340
4-8 anos	440
9-13 anos	700
14-18 anos	890
Adultos	
> 19 anos	900
Mulheres grávidas	1000
Mulheres que amamentam	1300

Adaptado de IOM, 2001; WHO, 2004

Sumarizando, a ingestão de cobre em adultos, no geral, varia entre 1 e 3 mg/dia contudo, o uso de suplementos vitamínicos/minerais podem aumentar este valor até 2 mg/dia. A água consumida contribui com cerca de 0,1-1 mg/dia na maioria das situações. Assim, a ingestão diária pode variar entre 1 e 5 mg/dia [WHO, 2004].

## 3.4 Metabolismo

Como anteriormente referido, desde 1944 vários aspectos do metabolismo do cobre, em seres humanos, têm sido estudados [Cartwright e Wintrobe, 1964]. Desde essa altura, surgiram novos conhecimentos que permitiram estabelecer os mecanismos fisiológicos actualmente descritos. Assim, é possível discutir, por ordem sequencial, a absorção, o transporte, a distribuição e a excreção de cobre.

### 3.4.1 Absorção

Nos mamíferos, o cobre é absorvido no estômago (ao contrário de outros metais) e no intestino delgado, no entanto parecem existir diferenças entre várias espécies no que diz respeito ao local de absorção máxima. Em ratos, o cobre é absorvido a partir do estômago e duodeno, enquanto que nos hamsters a absorção ocorre no íleo e no jejuno. O local de absorção máxima é desconhecido nos seres humanos, contudo presume-se que ocorra no estômago e no intestino delgado proximal devido ao rápido aparecimento de cobre no plasma após a administração oral de  $^{64}\text{Cu}$ . A contribuição do estômago parece, no entanto, ter menor importância devido à digestão incompleta dos alimentos neste órgão [Schümann *et al.*, 2002]. A absorção varia entre 15 e 97%, dependendo do conteúdo de cobre e da composição da dieta alimentar [Turnlund, 1998].

Estudos com isótopos estáveis indicam que, aquando de uma ingestão de cobre dentro dos valores recomendados, ocorre uma adaptação da absorção relativamente às necessidades corporais: elevadas quantidades de cobre são absorvidas perante uma

baixa ingestão e vice-versa [Caballero, 2005]. Em ingestões extremas a percentagem absorvida pode decair para 10% (se as ingestões forem 10 vezes superiores à ingestão recomendada). Em 1989 Turnlund *et al.*, utilizando isótopos estáveis ( $^{65}\text{Cu}$ ), demonstraram que indivíduos adultos apresentavam uma absorção média de 56% com uma dieta pobre em cobre (0,78 mg/dia), de 36% quando o nível de cobre ingerido era de 1,68 mg/dia e de 12% quando a dieta continha 7,53 mg/dia de cobre. Numa actualização deste estudo, Turnlund (1998) calculou a retenção de cobre através da avaliação da sua excreção pelas fezes durante 12 dias após a administração oral ou intravenosa, em indivíduos voluntários. Os resultados indicaram que 67% do cobre era retido pelo organismo perante uma ingestão de 0,38 mg/dia. Se a dose diária de cobre aumentasse para 0,66 mg/dia a percentagem de absorção baixava para 54% e para 44% se a ingestão fosse de 2,49 mg/dia. A percentagem da absorção total antes da excreção biliar endógena foi de 77, 73 e 66%, respectivamente, para as 3 doses. Foi observada uma variação similar da absorção em lactentes alimentados com fórmulas com diferentes conteúdos de cobre, sendo a fracção absorvida mais elevada do que o observado nos adultos para a mesma dose mg/kg.

Existem factores fisiológicos, dietéticos e patológicos capazes de modificar a absorção de cobre [Wapnir, 1998]. Uma produção adequada de ácido clorídrico facilita a digestão no estômago e a disponibilidade de cobre no intestino delgado. Contrariamente, um pH alcalino no intestino promove a formação de hidróxido de cobre e de sais de cobre com uma baixa constante de dissociação, reduzindo assim a quantidade de metal disponível para a absorção.

A absorção também é influenciada pela competição de vários iões, incluindo o zinco, o ferro, o molibdénio, o chumbo e o cádmio. O zinco e o cádmio parecem ser os

inibidores mais potentes da absorção, possivelmente pela competição com o cobre para o transporte e/ou pelo aumento das concentrações intestinais de metalotioneínas. Estas consistem num grupo de pequenas proteínas que se ligam a metais pesados, actuando na desintoxicação e na captação destes elementos. Os polímeros de glicose aumentam o co-transporte de cobre e água para as células intestinais, no entanto, a frutose e outros hidratos de carbono, as fibras vegetais, os fitatos e a diminuição de sódio no lúmen intestinal inibem a absorção intestinal [Wapnir, 1998]. Grandes concentrações de aminoácidos e péptidos podem ligar-se ao cobre e reduzir a sua absorção. Contudo, em concentrações moderadas estes ligandos podem reduzir a formação de hidróxido de cobre e aumentar a absorção deste elemento [Schümann *et al.*, 2002]. Ácidos orgânicos como os citratos, lactatos e o glutamato aumentam a solubilidade e a absorção de cobre (**Tabela 3.5**). Estudos clínicos sugerem que doses elevadas de ácido ascórbico em humanos podem afectar a absorção assim como os níveis séricos de cobre e de ceruloplasmina, no entanto, os resultados deste estudo não foram consistentes com outros estudos.

Os primeiros estudos realizados em segmentos isolados do duodeno sugerem que os iões de cobre entram nas células da mucosa intestinal por difusão simples [Linder e Hazegh-Azam, 1996]. Contudo, trabalhos recentes permitiram a identificação de vários transportadores de cobre que podem transferir o cobre através das membranas celulares.

Foi identificado um transportador de metais divalentes, DMT1, o qual é significativamente expresso no duodeno proximal e nos rins, no entanto, pode ser encontrado em todos os tecidos [Lee *et al.*, 2002]. Também podem existir outros

transportadores intestinais de cobre. Foi sugerido que a absorção intestinal de cobre é catalisada pela Ctr1, a qual foi identificada pela primeira vez em leveduras. Esta proteína é expressa em todos os tipos celulares, até agora investigados, incluindo os enterócitos e catalisa o transporte de  $\text{Cu}^{+1}$  através da membrana celular.

**Tabela 3.5** - Promoção e inibição da absorção intestinal de cobre.

---

<b>Promoção</b>
Digestão gástrica adequada
Concentrações adequadas de aminoácidos e péptidos (reduzem a formação de hidróxido cúprico)
Ácidos orgânicos (aumentam a solubilidade do cobre)
<b>Inibição</b>
Diminuição de sódio e glicose no lúmen intestinal
pH alcalino no lúmen intestinal
Fitatos (pouco impacto)
Elevadas concentrações de aminoácidos e péptidos (aumento da ligação ao cobre no lúmen)
Iões divalentes (zinco e ferro)

---

A absorção de cobre é controlada por processos homeostáticos complexos (ver adiante). No entanto, a idade parece diminuir a sua eficiência originando um aumento das concentrações plasmáticas de cobre na velhice [Wapnir, 1998].

### 3.4.2 Transporte e Distribuição

O cobre libertado a partir das células intestinais através de um transporte activo estabelecido por ATPases do tipo P, move-se através dos capilares da serosa para a circulação portal onde se liga, maioritariamente, à albumina e à transcuprina. Uma pequena quantidade do metal pode ligar-se a péptidos e a aminoácidos, especialmente à

histidina [WHO, 2004]. A maior parte deste cobre chega rapidamente aos hepatócitos e uma pequena parte entra nos rins [Linder e Hazegh – Azam, 1996; WHO, 2004], tornando o fígado o maior órgão distribuidor de cobre. Apenas quando a ceruloplasmina é sintetizada e secretada no plasma se inicia uma incorporação apreciável de cobre noutros tecidos. Assim, esta proteína não participa no transporte de cobre do intestino para o fígado. Isto sugere a existência de duas fases de distribuição após a entrada do cobre na circulação sanguínea, envolvendo o transporte de cobre pela transcuprina e a albumina para o fígado, incorporação do metal na ceruloplasmina durante a sua síntese e distribuição para outros tecidos através desta mesma proteína [Linder e Hazegh-Azam, 1996]. O cobre é então armazenado em vários órgãos, sendo o fígado o único capaz de o mobilizar em caso de balanço negativo (**Tabela 3.6**).

Na gravidez, o feto está dependente do cobre da circulação materna. Este acumula cerca de 50 µg/kg de cobre por dia, principalmente na última metade da gravidez. Mais de metade do cobre é armazenado no fígado, sobretudo na forma de metalotioneína, sendo o cérebro o segundo local de armazenamento para o feto. No fim da gestação este terá armazenado cerca de 15 mg de cobre, dos quais 9 mg se encontram no fígado. Depois do nascimento a concentração de cobre no fígado decai, atingindo os níveis do adulto aos 6 meses de idade [EHC 200, 1998].

**Tabela 3.6** - Locais de armazenamento de cobre.

Órgão	Cobre armazenado (%)
Fígado	20
Músculo esquelético	40
Cérebro	20
Tecido conjuntivo	8
Sangue	8
Rim	8

### 3.4.3 Excreção

Actualmente, os mecanismos pelos quais o cobre é expulso do organismo não estão totalmente compreendidos. No entanto, é evidente que do total absorvido e apesar da perda diária de cobre, apenas uma ínfima parte entra na urina, e que a maior via excretória deste metal parece ser a bÍlis (80%).

A reduzida excreção de cobre pela urina (cerca de 30-60 µg/dia) vai de encontro à evidência já existente de que há pouco ou nenhum cobre livre no plasma sanguíneo e sugere que qualquer complexo de baixo peso molecular que pode ser filtrado a nível renal é reabsorvido [Linder e Hazegh-Azam, 1996].

As células epiteliais descamativas não parecem contribuir de forma significativa para a excreção de cobre. Apesar da elevada concentração deste elemento no cabelo e unhas, as perdas diárias associadas não são importantes. A bÍlis é claramente o fluido corporal com maior concentração de cobre, contribuindo com uma secreção diária de 2,5 mg de Cu no tubo digestivo (**Tabela 3.7**), o qual não é reabsorvido.

**Tabela 3.7** - Concentração de cobre nos fluídos e tecidos corporais em adultos.

Fluído ou tecido	Concentração de cobre (µg/g)	Excreção diária (µg)
Saliva	0,22	330-450
Suco gástrico	0,39	1000
BÍlis	4,0	2500
Suco pancreático	0,3-0,9	400-1300
Urina	0,02-0,05	30-75
Líquido cefaloraquidiano	5	-
Linfá	1,2	-
Sangue	1,1	-
Plasma	1,05	-
Rim	12	-
Fígado	6,2	-
Cérebro	5,2	-
Coração	4,8	-
Músculo Esquelético	0,9	-
Cabelo/Unhas	20/8-20	-

Resumo da literatura de Linder e Hazegh-Azam, 1996.

Indivíduos com DW apresentam uma incapacidade para secretar cobre na bÍlis. Consequentemente manifestam excesso de cobre, especialmente no fÍgado. Assim, a excreção de cobre pela bÍlis é extremamente importante para o controle dos nÍveis hepáticos de cobre [Turnlund, 1998].

### 3.5 Bases Moleculares da Homeostase do Cobre

O transporte e o metabolismo celular do cobre têm sido objecto de investigação activa. Sistemas modelo, incluindo seres procariontes e eucariontes unicelulares, forneceram dados importantes para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na homeostase do cobre em mamíferos, incluindo seres humanos. A manutenção de uma homeostase adequada envolve uma coordenação entre a absorção, distribuição, armazenamento e excreção de cobre. A doença de Menkes e a doença de Wilson, decorrentes de erros genéticos do metabolismo do cobre, permitiram uma melhor compreensão da absorção e excreção de cobre nas células eucarióticas. Estudos realizados em organismos procariontes permitiram avaliar os mecanismos moleculares pelos quais o cobre é transportado e conduziram à identificação e compreensão dos homólogos funcionais em células eucarióticas.

Em termos gerais, o transporte de cobre a nível celular envolve a passagem de cobre extracelular através da membrana celular por bombas especializadas. O cobre intracelular é encaminhado para enzimas e organelos por proteínas especializadas chamadas *metalochaperones*. Por fim, existem mecanismos específicos para libertar o cobre a partir das células. Os detalhes de como todas estas etapas são efectuadas

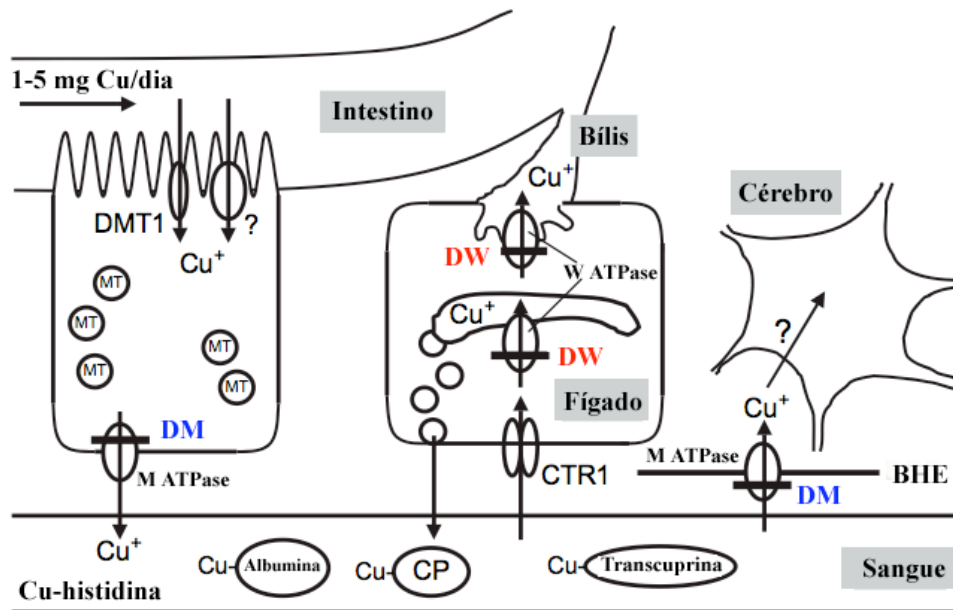
continuam incertos. A **Figura 3.2** mostra os elementos chave da circulação de cobre em humanos, na medida em que se encontram actualmente compreendidos.

### 3.5.1 Transferência do cobre através das membranas celulares

Em mamíferos, o cobre da dieta é absorvido através da membrana apical das células da mucosa intestinal, que revestem as vilosidades intestinais. Desde há muito tempo que se pensa que este transporte é realizado através de difusão passiva, no entanto, foram identificadas várias proteínas que podem estar implicadas neste processo.

O cobre, no intestino, é absorvido pelo transportador de metais divalentes 1 (DMT1). Este transportador, expresso na *Xenopus laevis*, catalisa o transporte de uma variedade de metais, incluindo o magnésio, o ferro, o cobalto, o níquel e o cobre. O papel do DMT1 na absorção de cobre é sustentado pela observação de que o tratamento de células com um oligonucleótido alterado neste transportador resultou na redução de 48% da absorção de cobre [Arredondo *et al.*, 2003]. No entanto, a afinidade da DMT1 para o cobre é baixa e a sua principal função consiste na absorção de ferro. Dados recentes sugerem a existência de uma ATPase na membrana de alta afinidade para a absorção de cobre, contudo ainda não foi identificada a nível molecular. Uma proteína transportadora de alta afinidade para o cobre, CTR1, foi identificada, contudo não está claro o seu papel na membrana da mucosa. Claramente, a questão de como o cobre é absorvido pelas células intestinais requer mais investigação.

Figura 3.2 - Elementos chave da homeostase do cobre e defeitos da DW e da DM.



O cobre da dieta no intestino é absorvido pelas células intestinais através da DMT1 e por um sistema ainda não identificado. As Metalotioneínas (MT) podem suportar o excesso de cobre nestas ou noutras células. As ATPases de Menkes (M ATPase) exportam o cobre das células intestinais para a circulação. No sangue o cobre pode formar complexos com moléculas pequenas como a histidina e ligar-se a proteínas como a albumina e a transcuprina. O cobre passa para o fígado, provavelmente pelo envolvimento da CTR1. No hepatócito, o cobre é transportado para a região trans do aparelho de Golgi pela ATPase de Wilson (W ATPase) para ser incorporado na ceruloplasmina (CP). Esta é secretada na circulação. O excesso de cobre é excretado para a biliar pelos hepatócitos. Este processo também requer a actividade da ATPase de Wilson. O transporte de cobre através da barreira hemato-encefálica (BHE) parece ser catalisado por uma ATPase de Menkes que é expressa nas células endoteliais cerebrovasculares. Na Doença de Menkes (DM) as ATPases de Menkes não são funcionais, levando a uma acumulação de cobre no intestino e, concomitantemente, a uma deficiência na maioria dos tecidos. O cobre administrado a nível sistémico não pode ser transportado até ao cérebro. Na Doença de Wilson, o defeito da ATPase de Wilson resulta na acumulação de cobre nos hepatócitos.

Investigações realizadas em leveduras, nomeadamente na *Saccharomyces cerevisiae*, demonstraram que a CTR1 transporta  $\text{Cu}^{+1}$  através da membrana plasmática. O seu homólogo no ser humano, hCTR1, foi identificado. Este é expresso em todos os órgãos e tecidos examinados, com o fígado, o coração, e o pâncreas a exibirem os níveis mais elevados, o cérebro e o músculo os níveis mais baixos e o intestino os níveis intermédios. Este transportador parece ser o principal sistema de captação de cobre de todas as células [Lee *et al.*, 2002]. Uma segunda proteína também transportadora de cobre (hCTR2) também foi identificada, no entanto a sua função continua pouco esclarecida. A CTR1 não parece necessitar de ATP para o transporte de cobre, no

entanto, o mecanismo para a absorção de cobre permanece incompreendido [Lee *et al.*, 2002]. Achados recentes, sugerem que a incorporação de cobre mediada pela hCTR1 é regulada por um mecanismo pós-translacional que estimula a endocitose de cobre e a degradação do transportador.

Ratos heterozigóticos para o CTR1 apresentam defeitos na acumulação de cobre e uma redução da actividade da citocromo-c oxidase e ratos com CTR1 totalmente deficiente apresentam deficiência profundas do crescimento e desenvolvimento, pelo que morrem *in útero* a meio da gestação [Lee *et al.*, 2001]. Isto demonstra um papel crucial para a aquisição de cobre através do transportador CTR1 para as células dos mamíferos e para o desenvolvimento embrionário.

### 3.5.2 Redução do Cobre

O substrato para a CTR1 e outros transportadores de cobre é o ião cuproso. A maioria do cobre extracelular e do cobre presente no tubo digestivo está sob a forma de ião cúprico, o que exige a presença de uma redutase para converter o  $\text{Cu}^{+1}$  em  $\text{Cu}^{+2}$ . Esta actividade foi descrita nas células hepáticas de ratos, contudo a proteína não foi identificada.

Um gene que aparece para codificar uma ferroxidase foi recentemente clonado a partir de um rato. O gene codifica uma citocromo b a nível do duodeno, Dcytb, que tem uma sequência 45-50% semelhante à família da citocromo b561 das redutases de membrana.

Foi demonstrado que esta proteína exhibe uma actividade redutase no ferro e no cobre estimulada pelo ascorbato e pode assim estar envolvida na redução e na absorção de cobre [Knöpfel e Solioz, 2002].

A redução do cobre extracelular foi amplamente caracterizada nas leveduras. Foi demonstrado que a absorção de cobre na levedura é facilitada pelas redutases da membrana plasmática Fre1p e Fre2p, no entanto vários genes podem desempenhar um papel na redução e na absorção de ferro e cobre. Estas redutases são induzidas pelos quelantes de cobre, sugerindo um papel directo na redução do cobre para a absorção.

Embora seja claro que a redução do cobre desempenha um papel importante na captação e distribuição, o processo e as funções enzimáticas associadas continuam desconhecidas nos humanos. Continua a ser necessária investigação nesta área para compreender a homeostase do cobre, incluindo estudos da absorção intestinal e da disponibilidade deste elemento.

### **3.5.3 ATPases transportadoras de cobre**

Duas enzimas chave responsáveis pela translocação de cobre através das membranas das células eucarióticas parecem estar envolvidas com as ATPases cúpricas das bactérias. Em humanos, estas são designadas de ATPase de Menkes (ou ATP7A) e ATPase de Wilson (ou ATP7B) com base nas doenças associadas. A principal diferença entre estas duas enzimas é distribuição a nível tecidual.

As ATPases são proteínas transmembranares. As Cu-ATPases pertencem à classe das ATPases do tipo P as quais incluem Na-K ATPases, Ca ATPases e enzimas relacionadas. A função das ATPases consiste na translocação de cobre através das membranas celulares.

A ATPase de Menkes consiste numa ATPase de membrana associada ao cobre que é encontrada na maior parte dos tipos celulares, excepto no fígado, tem grande

expressão nas células intestinais epiteliais e parece ser essencial para o transporte de cobre através da membrana celular basolateral para a circulação portal e consequente entrada no fígado. Dados clínicos demonstram uma acumulação de cobre nas células da mucosa intestinal em indivíduos com DM, o que evidencia o importante papel desta ATPase no transporte basolateral de cobre.

A caracterização molecular da DW permitiu a identificação da ATPase de Wilson, a qual apresenta uma sequência 65% semelhante à da ATPases de Menkes e está presente maioritariamente nas células hepáticas. É responsável pela disponibilização de cobre para as cuproenzimas e pela sua excreção biliar. Na DW, um defeito no gene que codifica esta proteína interfere nas suas funções resultando numa excreção deficiente, numa acumulação hepática de cobre e, se não tratada, numa toxicose severa. De forma similar à ATPase de Menkes, a ATPase de Wilson está dependente do cobre: na presença de baixas concentrações de cobre, a ATPase está localizada na zona trans do aparelho de Golgi no fígado e no cérebro, desempenhando um papel de transportador de cobre para o compartimento secretor para a incorporação na ceruloplasmina e outras cuproenzimas. Quando as concentrações de cobre são elevadas, a ATPase move-se do local trans para uma vesícula citoplasmática a qual não é bem caracterizada, no entanto parece estar associada com o transporte de cobre para a membrana canalicular biliar para ser excretado (**Figura 3.3**).

### **3.5.4 Metalotioneínas e Metalochaperones**

A acumulação de cobre no citoplasma representa um risco para dano oxidativo.

Para minimizar esta possibilidade existem dois sistemas protectores que podem participar na desintoxicação. Um destes sistemas parece basear-se numa via de sequestração não específica na qual a glutathione rapidamente se liga ao  $\text{Cu}^{+1}$  e o entrega às metalotioneínas ou a outras proteínas ligadas ao cobre. As metalotioneínas são polipéptidos ricos em cisteína que contêm dois clusters polinucleares onde se ligam iões metálicos, incluindo o  $\text{Cu}^{+1}$ . Perante concentrações intracelulares elevadas de Cu, as metalotioneínas sequestram o metal do citoplasma e, se excessivo, transportam-o para os lisossomas. A expressão destes polipéptidos é reforçada em resposta à elevação dos níveis de iões metálicos. No entanto, parece que funcionam como um local de armazenamento transitório de cobre e outros iões metálicos, quando presentes em excesso.

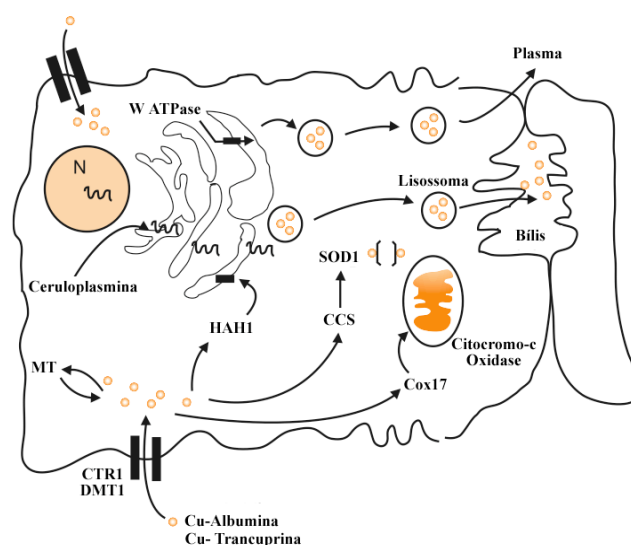
As *Metalochaperones* são proteínas citoplasmáticas que ligam iões metálicos em complexos instáveis. Estas permitem a troca de cobre quando se conjugam com uma proteína alvo. Assim, a função destas proteínas consiste na colocação de cobre em locais intracelulares precisos e em compartimentos específicos.

Foram identificadas pelo menos sete *chaperones* em eucarióticos:

- A Atox1 interage directamente com as ATPases de Wilson/Menkes para ceder-lhes cobre, no entanto não estão esclarecidos os mecanismos intermediários.
- A COX17, demonstrada em leveduras, é responsável pela entrega de cobre nas mitocôndrias para incorporação do metal na citocromo-c oxidase. A COX17 liga-se a três iões  $\text{Cu}^{+1}$ , está presente no citoplasma e no espaço intermembranar da mitocôndria e pode servir como um transportador bidireccional de cobre.

- As Sco1p e Sco2p das leveduras parecem participar na entrega do cobre da COX17 para a citocromo-c oxidase.
- A COX11 codifica uma proteína da membrana mitocondrial interna. De acordo com estudos realizados em leveduras, a COX11 é uma enzima heme A biossintética que é necessária para a formação dos centros de cobre e magnésio da citocromo-c oxidase.
- A CCS disponibiliza cobre no citoplasma para ser incorporado na SDO1. No entanto, os mecanismos de transporte de cobre pela CCS e a sua transferência a superóxido dismutase permanecem desconhecidos.
- A NML45 (*nuclear Menkes-like protein*) pode transportar cobre para o interior do núcleo das células humanas, no entanto não está bem caracterizada.

Figura 3.3 - Modelo do metabolismo do cobre na célula hepática.



O cobre plasmático (ligado a proteínas) entra na célula hepática através dos transportadores CTR1 ou DMT1. Uma vez no citoplasma, e dependendo das necessidades da célula o cobre pode ser “armazenado” na metalotioneína (MT) ou distribuído pelos chaperones (HAH1, CCS, Cox17) até aos organelos ou enzimas. A ATPase de Wilson, localizada na membrana do aparelho de Golgi permite que este seja enviado para os lisossomas para a sua posterior libertação no plasma ou eliminação pela biliar.

---

# CAPÍTULO

# 4

---

## Erros Genéticos do Metabolismo do Cobre

## 4.1 Introdução

Muito do nosso conhecimento acerca dos mecanismos moleculares pelos quais a homeostase do cobre é alcançada, deve-se tanto a estudos em sistemas modelo como a duas doenças do metabolismo do cobre: a Doença de Menkes e a Doença de Wilson (**Tabela 4.1**). A DM manifesta-se como uma aparente deficiência de cobre enquanto que a DW se manifesta como uma toxicose por excesso de cobre [Linder e Hazegh-Azam, 1996; Roberts e Schilsky, 2003]. Estas duas doenças tão diferentes devem-se a alterações similares das bombas de cobre, as Cu-ATPases de Menkes e de Wilson. As ATPases de Menkes são expressas em tecidos como a pele, os rins, a placenta, o cérebro, o tubo digestivo e o sistema vascular, enquanto que as ATPases de Wilson são expressas principalmente no fígado, mas também nas glândulas mamárias e, eventualmente, em outros tecidos especializados [Linder e Hazegh-Azam, 1996; WHO, 2004].

**Tabela 4.1** - Doenças genéticas associadas a alterações do metabolismo do cobre.

	<b>Doença de Wilson</b>	<b>Doença de Menkes</b>
Genética	Autossómico recessivo Cromossoma 13 1 em cada 30 000	Recessivo Ligado ao cromossoma X 1 em cada 200 000
Clínica	Início na adolescência Sintomas dos gânglios basais Doença hepática Anéis de Kayser-Fleischer Distúrbios psiquiátricos	Início depois do nascimento Degeneração da massa cinzenta Alterações do cabelo Hipotermia, Hipopigmentação Morte precoce (< 3 anos)
Laboratório	Diminuição do Cu sérico Diminuição da ceruloplasmina sérica Aumento de Cu no fígado	Diminuição do Cu sérico Diminuição da ceruloplasmina sérica Diminuição de Cu no fígado
Defeito	Excreção biliar de Cu	Transporte Gastrointestinal de Cu
Tratamento	Quelantes são bastante eficazes	Sem tratamento efectivo

Resumo de Harris e Gitlin (1996) e de Kaller (1998).

## **4.2 Doença de Menkes**

### *Background*

A DM, descrita pela primeira vez em 1962 pelo médico John Menkes, resulta de um defeito recessivo ligado ao cromossoma X, originando uma deficiência sistémica profunda de cobre que é fatal na primeira infância, acompanhada por anormalidades neurológicas severas, aparentemente devido ao grande défice de enzimas cupro-dependentes necessárias para o desenvolvimento cerebral [Kaler, 1998; Guitet *et al.*, 1999]. Segundo Julian Mercer, a frequência deste distúrbio é de 1 a cada 200.000 nascimentos vivos. Tipicamente ocorre em rapazes [Kaller, 1998]. Os indivíduos afectados apresentam hipopigmentação do cabelo devido à deficiência de tirosinase, resultando na ausência de síntese de melanina. O cabelo fica com um aspecto em “palha de aço”, frágil e estranho devido à deficiência de uma cuproenzima desconhecida mas necessária para a ligação da queratina. Este achado levou à designação alternativa de “Doença do cabelo estranho” [Kaler, 1994, Mercer, 1998]. A redução da actividade da lisina oxidase resulta numa polimerização defeituosa do colagénio e da elastina com anormalidades do tecido conjuntivo, incluindo aneurismas da aorta, descamação da pele e fragilidade óssea. Pensa-se que os defeitos neurológicos severos se devam à redução da actividade da citocromo-*c* oxidase [Kaler, 1998]. Com o diagnóstico precoce e o tratamento, que consiste em injeções diárias de cobre e histidina a nível intraperitoneal e intratectal para o sistema nervoso central, alguns dos problemas neurológicos podem ser evitados e a sobrevida pode ser prolongada. Contudo, os doentes com DM mantêm anormalidades ósseas, distúrbios do tecido conjuntivo e apresentam atraso mental ligeiro a grave [Kaler, 1996]. Mesmo com um diagnóstico precoce e com tratamento, a DM é, normalmente, fatal. Embora alguns indivíduos

afectados tenham sobrevivido até à adolescência e até ao início dos seus 20 anos, a maioria morre antes dos 10 anos de idade [Kaler, 1998].

Os indivíduos com esta doença absorvem cobre a partir do intestino delgado, no entanto, este elemento não pode ser bombeado das células intestinais para a corrente sanguínea para ser transportado até ao fígado e conseqüentemente até ao resto do corpo [Kaler, 1996, 1998]. Assim, a doença assemelha-se a uma deficiência nutricional severa de cobre.

Também existem variantes clínicas menos severas da DM, das quais a melhor descrita é o muito raro (cerca de 100 casos notificados) *occipital horn syndrome*.

#### *Caracterização Molecular*

Estudos genéticos realizados em indivíduos afectados e em animais demonstraram que cerca de 20% das mutações responsáveis pela DM correspondem a deleções no gene da ATPase de Menkes. Alterações simples dos pares de bases, mutações sem sentido (nonsense), mutações com perda de sentido e duplicações também foram identificadas. A doença severa resulta da ausência ou de níveis muito baixos da actividade das ATPases. Os fenótipos clínicos associados a mutações reflectem, deste modo, o grau de diminuição da função das proteínas, reduzindo assim o transporte e a distribuição de cobre. No entanto, mantém-se difícil associar determinadas mutações com formas severas ou moderadas da doença (Moller *et al.*, 2000).

### 4.3 Doença de Wilson

#### *Background*

A DW, também chamada de degeneração hepatocelular, trata-se de um defeito genético autossômico recessivo (cromossoma 13) do transporte de cobre, que envolve uma pobre incorporação de cobre na ceruloplasmina e um defeito na excreção biliar de cobre são induzidos por mutações que prejudicam a função das ATPases cupricas da DW. Estas mutações produzem toxicidade devido ao excesso da acumulação de cobre predominantemente no fígado, no cérebro, com menos extensão nos rins olhos e outros órgãos. A incidência da DW foi estimada a cerca de 1:30000, resultando numa frequência heterozigótica estimada de 1:90 na população em geral.

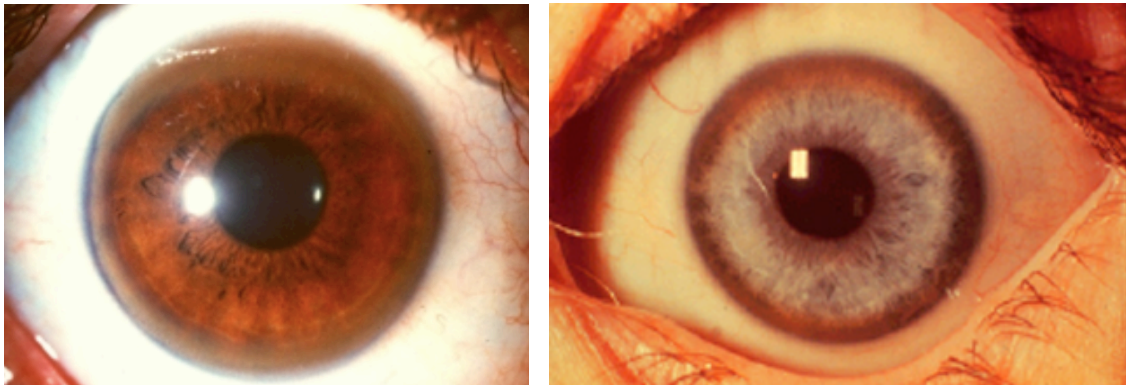
A idade de início da doença varia entre os 3 e os 50 anos de idade e as manifestações clínicas variam muito. A apresentação inicial dos doentes com DW envolve manifestações hepáticas, neurológicas ou psiquiátricas e raramente sintomatologia renal, esquelética ou endócrina. Os sintomas hepáticos podem ser agudos e auto-limitados, mimetizando hepatite aguda, ou podem progredir rapidamente, sugerindo hepatite fulminante, com hepatite inicial severa, frequentemente complicada por anemia hemolítica com Coombs-negativo. As enzimas hepáticas standard são marcadores de diagnóstico de DW pouco fiáveis. Os níveis da actividade da aminotransferase não estão marcadamente elevados e os valores séricos da fosfatase alcalina são quase sempre baixos, apesar de insuficiência hepática grave. A doença progride com icterícia e desenvolvimento de encefalopatia, anomalias severas da coagulação, por vezes associada a coagulação intravascular e insuficiência renal terminal. Na maioria das vezes a morte ocorre se a doença não for tratada.

O cobre acumula-se nos hepatócitos, ocorrendo lise quando a sua capacidade é excedida. O metal libertado, difunde-se para o sangue e é acumulado nos tecidos extra-hepáticos. As lesões neurológicas ocorrem primariamente no putamen e globus pallidus, conjuntamente conhecidos como núcleo lenticular (daí a nomenclatura da degeneração hepatolenticular). Os sintomas da doença incluem um tipo de tremor peculiar nas extremidades superiores, lentidão de movimentos e mudanças do temperamento (**Tabela 4.2**). Os indivíduos podem tornar-se excepcionalmente argumentativos, extremamente emotivas ou apresentar uma diminuição das capacidades mentais. Os anéis de Kayser-Fleischer, são alterações pigmentadas localizadas da membrana de Descemet na região perilímbica na córnea, de cor castanho-dourada, amarelo-dourada ou bronze devido à deposição de cobre (**Figura 4.1**), que se tornam evidentes no início da acumulação de cobre na córnea e aquando da afectação do sistema nervoso [Moreira *et al.*, 2001; Mak *et al.*, 2006; Kaplan, 2007]. Estes anéis são observados em 90% dos doentes com DW e, ocasionalmente, em doentes com colestase prolongada e cirrose criptogénica, sendo geralmente bilaterais [Moreira *et al.*, 2001].

O tratamento da DW inclui terapia quelante com agentes como a D-penicilamina ou terapia com zinco, sulfato de zinco ou acetato de zinco. A terapêutica com zinco é, actualmente, o tratamento escolha. Este mineral produz um bloqueio na mucosa, por indução da metalotioneína, que liga o cobre às células da mucosa até este ser “soltado” e eliminado pelas fezes. Mais recentemente, tratamentos experimentais com tetratiomolibdato, mostraram resultados promissores. Este fármaco parece ser uma excelente forma de tratamento inicial em doentes que apresentam sintomas neurológicos. Contrariamente à penicilamina, o tratamento inicial com tetratiomolibdato raramente leva a uma deterioração neurológica acrescida [Brewer, 2000]. As restrições

dietéticas desta doença implicam a eliminação de alimentos ricos em cobre, referidos no capítulo 2 deste trabalho (**Tabela 3.3**).

**Figura 4.1** - Anéis de Kayser-Fleischer.



Fonte (<sup>1</sup>imagem da direita; <sup>2</sup>imagem da esquerda):

<sup>1</sup>Moreira et al. (2001), *Anéis de Kayser-Fleischer*, Arq Brás Oftalmol, 64: 589-93;

<sup>2</sup>Kaplan (2007), *Diagnosis of Wilson's disease*, UpToDate, [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).

**Tabela 4.2** - Manifestações clínicas da Doença de Wilson.

Alterações	Sintomas
Hepáticas	Cirrose, hepatite crónica, disfunção hepática fulminante.
Neurológicas	Rigidez, tremor, ataxia, discinesia, disartria, convulsões.
Psiquiátricas	Distúrbios comportamentais, disfunção cognitiva, alterações afectivas, psicose.
Oftalmológicas	Anéis de Kayser-Fleisher, cataratas.
Hematológicas	Hemólise, coagulopatia.
Renais	Alterações tubulares renais, diminuição da filtração glomerular, litíase renal.
Cardiovasculares	Cardiomiopatia, arritmia, alterações da condução.
Músculo-esqueléticas	Osteomalácia, osteoporose.
Gastrointestinais	Litíase biliar, pancreatite, peritonite bacteriana espontânea.
Endócrinas	Amenorreia, aborto espontâneo, puberdade tardia e ginecomastia.
Dermatológicas	Hiperpigmentação.

Adaptado de Pedroso e Lima, 2001.

Se a DW for diagnosticada e tratada atempadamente, os doentes podem viver normalmente.

### *Caracterização Molecular*

Na maioria dos casos, técnicas biológicas moleculares permitem a identificação de mutações no gene da ATPase que produz a DW. A variabilidade fenotípica das manifestações da DW são devidas, provavelmente, à natureza das mutações, contudo, não é aparente uma correlação entre a mutação e severidade da doença. Mais de 100 defeitos genéticos causadores da DW têm sido descritos. Algumas mutações têm um foco geográfico, 38% das mutações da DW na América do Norte são uma mutação histidina-1069 para glutamina, enquanto que outras populações têm mutações comuns diferentes. Dado que vários doentes com DW possuem diferentes mutações no cromossoma 13 (isto é, são heterozigóticos), é difícil correlacionar o fenótipo com o genótipo. Mesmo nos indivíduos homozigóticos para uma mutação, o início e a severidade da doença podem variar. Indivíduos homozigóticos para mutações severas têm um início precoce da doença. A severidade da doença pode estar associada a factores ambientais, incluindo o conteúdo de cobre da dieta ou a variações de proteínas que influenciam a homeostase do cobre.

## **4.4 Outros síndromes hereditários relacionados com o cobre**

Outras doenças que parecem estar envolvidas com a alteração do metabolismo de cobre incluem a Cirrose Infantil Indiana e a toxicose idiopática por cobre. Estes síndromes da infância são semelhantes entre si no que respeita à etiologia e apresentação. Ambos parecem possuir um componente genético associado a uma ingestão elevada de cobre. Nos casos de Cirrose Infantil Indiana a elevada ingestão de cobre deve-se ao aquecimento e/ou armazenamento do leite em recipientes de cobre.

Por outro lado, na toxicose idiopática é devida às elevadas concentrações de cobre nas águas de abastecimento [Müller *et al.*, 1998]. Embora a exposição a elevadas concentrações sejam comumente encontradas em ambas as doenças, crianças alimentadas exclusivamente com leite materno ou com uma baixa ingestão de água com elevado teor de cobre também podem desenvolver as respectivas doenças. A hipótese que actualmente prevalece em relação à toxicose idiopática é que esta se deve a uma lesão genética que resulta numa alteração do metabolismo do cobre combinada com uma elevada ingestão de cobre. Esta possibilidade foi apoiada pela frequência de ocorrência de consanguinidade entre os casais, na maioria dos casos, facto que está ausente em zonas com teor elevado de cobre na água potável onde estas síndromes não são documentados [Müller *et al.*, 1998].

---

# CAPÍTULO

# 5

---

## Efeitos Biológicos da Deficiência e do Excesso de Cobre

O cobre é um elemento essencial [EHC 200, 1998]. A maioria dos tecidos possui quantidades mensuráveis de cobre que lhe estão associadas e, geralmente, as células e os tecidos possuem mecanismos mantêm a disponibilidade e limitam a toxicidade do cobre (homeostase). Contudo, podem surgir manifestações clínicas que decorrem das alterações fisiológicas em resposta à alta ou baixa ingestão de cobre e que não estão relacionadas com alterações genéticas do metabolismo do cobre, referidas no capítulo anterior.

## 5.1 Deficiência

Crianças com achados característicos da deficiência em cobre (anemia refractaria ao tratamento com ferro e baixas concentrações plasmáticas de cobre) foram reportadas pela primeira vez no Reino Unido em 1956.

A deficiência em cobre é mais frequente em recém-nascidos pré-termo, especialmente nos de muito baixo peso à nascença, devido às baixas reservas de cobre, quer por possuírem um fígado relativamente pequeno, quer pelas grandes necessidades de cobre requeridas para a sua grande taxa de crescimento, comparativamente aos recém-nascidos de termo. Além disso, as crianças prematuras, além de possuírem uma menor capacidade digestiva têm uma absorção intestinal de cobre pouco desenvolvida. Os recém-nascidos com 36 ou mais semanas de gestação armazenaram aproximadamente 15 a 17 mg de cobre durante a gravidez, encontrando-se no fígado cerca de 2,5 a 9 mg do total armazenado. Estas reservas previnem a deficiência de cobre durante os primeiros 47 meses após o nascimento de bebés de termo [Schümann *et al.*, 2002].

Crianças alimentadas exclusivamente à base de leite de vaca estão mais propensas a desenvolver deficiência de cobre que as crianças alimentadas com leite materno pelo pobre conteúdo de cobre no leite de vaca e devido à absorção limitada deste mineral neste tipo de leite (apenas 15% do cobre é absorvido). Contrariamente, as crianças amamentadas pela mãe absorvem mais cobre, o que pode ser devido ao pobre conteúdo em caseína ou a factores associados ao leite humano que melhoram a absorção de cobre (a absorção é de 60%). Nos países em desenvolvimento, onde a alimentação das crianças é baseada em leite da vaca enriquecido com uma grande quantidade de hidratos de carbono refinados, a deficiência de cobre pode ser mais prevalente dado a frutose e outros açúcares diminuem a sua absorção.

A deficiência de cobre tem sido observada em indivíduos com síndromes de má-absorção como acontece na doença celíaca, no espru tropical e não tropical, fibrose cística e síndrome do intestino pequeno – resultado de uma recessão intestinal. O aumento das perdas gastrointestinais normalmente explicam a ocorrência de deficiência de cobre nestes síndromes. A deficiência de cobre deve ser suspeitada em crianças com diarreia prolongada ou recorrente, perdas anormais de bilis, recessões intestinais ou perda de conteúdo intestinal através de fistulas. A elevada ingestão de zinco e ferro diminui a absorção de cobre e pode predispor à sua deficiência. Este fenómeno é usado na estratégia terapêutica da Doença de Wilson, onde uma ingestão elevada de zinco demonstrou baixar a absorção de cobre. A deficiência de cobre também foi documentada em indivíduos que recebem penicilamina ou outros agentes quelantes de catiões, os quais aumentam as perdas de cobre.

No síndrome nefrótico e nas grandes queimaduras podem ocorrer perdas excessivas de cobre que devem ser repostas [Schümann *et al.*, 2002].

Durante a nutrição parental ocorre um aporte insuficiente de cobre a não ser que haja suplementação com minerais como o cobre. De acordo com a *American Medical Association*, é recomendada a administração de 0,5 a 1,5 mg de cobre por dia durante a nutrição parentérica total. Em indivíduos com colestase ou alterações da secreção biliar, a administração parental de cobre deve ser menor para compensar a limitação das perdas. Indivíduos com alterações da função hepática não devem receber suplementação a não ser que seja documentada deficiência de cobre. A alimentação entérica deve conter uma quantidade de cobre adequada às necessidades de cada indivíduo.

A causa mais comum de deficiência de cobre consiste num aporte insuficiente de cobre durante a recuperação nutricional de crianças desnutridas. Vários factores estão associados às maiores necessidades destas crianças, como o baixo peso à nascença, um curto período de amamentação, o consumo de leite de vaca, o consumo de dietas à base de hidratos de carbono refinados, o aumento das perdas de nutrientes como resultado de uma doença diarreica e infecções frequentes. Durante a recuperação nutricional, estas crianças crescem 5 a 10 vezes mais que as crianças normais da mesma idade, aumentando assim as necessidades impostas pelo crescimento. Este é ainda outro factor de risco que contribui para 30-40% da prevalência da deficiência de cobre nestas crianças. Num estudo comparativo, Castillo-Durán *et al.* avaliaram a magnitude das perdas de cobre em 14 crianças durante um episódio agudo de diarreia com necessidade de internamento hospitalar. As perdas fecais foram duas vezes maiores, quando comparadas com as das crianças do grupo controle. Estas perdas estão directamente relacionadas com o peso fecal. Outro estudo comparou um grupo de crianças com diarreia crónica (19 crianças) com dois grupos controle (19 crianças saudáveis e 11 crianças desnutridas). As concentrações plasmáticas foram 30 % mais baixas e o

conteúdo de cobre diminuiu três a quatro vezes no grupo com diarreia, comparativamente aos grupos controle.

A ingestão de cobre através da dieta é essencial para o Homem e, geralmente, excede as necessidades mínimas deste oligoelemento. A deficiência de cobre clinicamente evidente é relativamente rara em humanos adultos [Uauy *et al.*, 1998]. Em animais pode causar doenças cardíacas e vasculares, que podem, em parte, ser explicadas pela redução da actividade das enzimas cupro-dependentes, défices neurológicos, trombozes, diminuição da motilidade dos espermatozóides e alterações na fertilidade [Schümann *et al.*, 2002].

As manifestações clínicas mais frequentes da deficiência de cobre são a anemia, a neutropenia e anormalidades ósseas, incluindo fracturas. As alterações hematológicas são caracterizadas pela existência de uma anemia hipocrômica, acompanhada pela redução do ferro sérico, diminuição da contagem de reticulócitos, neutropenia e trombocitopenia. [Cordano, 1998]. A neutropenia é a manifestação mais comum e mais precoce da deficiência de cobre. Esta pode ser consequência da diminuição de neutrófilos maduros na medula óssea ou o resultado da redução da sobrevivência das células polimorfonucleares. Estudos revelaram que a deficiência de cobre pode provocar dano celular quer na medula óssea, quer na circulação sanguínea. Além disso, podem existir alterações na proliferação ou diferenciação das *stem cells* ou uma rápida destruição e uma rápida clearance celulares. A observação de uma quantidade normal de células precursoras e um baixo número de células maturadas na medula óssea, sugere que existe um atraso no processo de diferenciação celular como resultado da deficiência de cobre. No entanto, existem também evidências de que o aumento da clearance de neutrófilos é consequência da redução da sua semi-vida e da presença de anti-corpos contra estas

células. No entanto, ainda são necessários mais estudos acerca do mecanismo pelo qual a deficiência de cobre origina neutropenia, focando o processo celular de diferenciação assim como a viabilidade dos neutrófilos quer na circulação sanguínea quer na medula óssea.

Quando os níveis de cobre e os neutrófilos totais foram analisados simultaneamente em estudos realizados no Peru, encontrou-se uma correlação positiva significativa entre eles [Cordano, 1998]. Na deficiência de cobre, a neutropenia tem sido relacionada com o aumento da frequência de infecções respiratórias, já que também ocorrem alterações da capacidade fagocítica dos neutrófilos [Schümann *et al.*, 2002].

A semi-vida dos eritrócitos também está diminuída na deficiência de cobre devido a alterações da fluidez e ao aumento da sensibilidade da membrana à peroxidação lipídica. Estudos citológicos revelaram alterações magaloblásticas e vacuolização tanto dos precursores eritróides como dos mielóides [Uauy *et al.*, 1998].

A deficiência de cobre está associada com a imunidade nos seres humanos. Em 1985, Heresi *et al.* seguiram 19 crianças com hipocuprémia antes e após de 1 mês de suplementação com cobre. Concluíram que a actividade fagocítica dos leucócitos polimorfonucleares aumentou, no entanto, as imunoglobinas mantiveram-se inalteradas. Em 1995, Kelley *et al.*, descreveram uma diminuição da proliferação das células sanguíneas mononucleares periféricas, em 11 indivíduos que receberam uma dieta pobre em cobre. Estudos recentes revelaram que, na deficiência de cobre, há uma diminuição efectiva de interleucina 2, o que determina uma redução da proliferação de células T.

Na deficiência de cobre, é comum ocorrerem anomalias ósseas, principalmente em crianças. O esqueleto tem tendência a tornar-se osteoporótico o que leva a um

aumento do risco de fracturas dos ossos longos e das costelas. Além disso, é possível encontrar erosão e formação de esporões nas metáfises, separação das epífises e formações ósseas subperiosteais [Uauy *et al.*, 1998 e Schümann *et al.*, 2002].

Manifestações menos frequentes da deficiência de cobre são a hipopigmentação do cabelo, a hipotonia, o atraso do crescimento e as alterações do metabolismo do colesterol e da glicose. A prevalência de doenças cardiovasculares esteve associada ao excesso de zinco e ao déficit de cobre na dieta, no entanto esta hipótese ainda não foi validada. Foi observado um aumento da concentração do colesterol total e do colesterol LDL e uma redução do colesterol HDL, em indivíduos submetidos a uma dieta experimental pobre em cobre. Uma fraca ingestão de cobre também mostrou uma diminuição da tolerância à glicose, alterações do ritmo cardíaco e do electrocardiograma. No entanto, as alterações do metabolismo do colesterol e da glicose não estão fortemente validadas.

A importância do cobre para o desenvolvimento fetal foi inicialmente sugerida em animais com sintomas de deficiência deste elemento. Uma paralisia espástica das pernas dos cordeiros está associada à hipomielinização do cérebro na deficiência severa. Este achado deve-se à deficiência da citocromo-c oxidase. Enquanto que uma incorporação deficiente de elastina no tecido pulmonar e uma matriz de colagénio deficiente parece ser consequência de uma diminuição da actividade da lisina-oxidase, ambas dependentes do cobre [Schümann *et al.*, 2002].

O papel da hipocuprémia na alteração do desenvolvimento neurológico no Homem foi postulado tendo por base as elevadas concentrações de cobre no cérebro, especialmente nos gânglios basais. A deficiência de cobre é uma causa improvável de

efeitos teratogênicos, no entanto, esteve associada a defeitos do tubo neural e ao aumento do risco de anencefalia, já que foi sugerida a existência de uma fase crítica pré-natal para o desenvolvimento do sistema nervoso. Isto pode explicar a deficiência mental severa encontrada na Doença de Menkes, ao contrário do que acontece na deficiência de cobre adquirida depois do nascimento que não é acompanhada por alterações neurológicas marcadas [Uauy *et al.*, 1998].

A deficiência de cobre, normalmente, é associada à hipoceruloplasminemia, no entanto, a diminuição da concentração de ceruloplasmina é maior do que seria de prever a partir dos valores da concentração do cobre sérico. Depois da suplementação de cobre em indivíduos com hipocupremia, as concentrações de ceruloplasmina podem aumentar dentro de 24 a 48 horas. Normalmente, as concentrações de cobre retornam aos valores normais antes das concentrações de ceruloplasmina. Por isso, é possível que a repleção de ceruloplasmina não seja de primordial importância na correção da deficiência de cobre.

Uma concentração plasmática de cobre inferior a 0,90 mg/L dá um forte apoio ao diagnóstico de deficiência de cobre (particularmente se for inferior a 0,45 mg/L), assim como concentrações baixas ou ausentes de ceruloplasmina [Cordano, 1998]. Na maioria dos doentes, quando o cobre é inferior a 0,45 mg/L, a concentração de ceruloplasmina é inferior a 20 mg/L. Uma cupremia entre os valores 0,45 e 0,90 mg/L está associada a concentrações de ceruloplasmina entre 20 e 200 mg/L. Em doentes com um processo de deficiência em cobre em desenvolvimento, as concentrações de ceruloplasmina decaem para valores abaixo de 200 mg/L antes do cobre plasmático atingir valores abaixo de 0,90 mg/L. A **Tabela 5.1** sumariza os valores séricos normais de cobre e ceruloplasmina.

**Tabela 5.1** - Valores séricos normais de cobre e ceruloplasmina

Cobre	100 ± 10 µg/dl
Ceruloplasmina	20-40 mg/dl

Adaptado de Brewer (2007), *Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease*, Experimental Biology and Medicine, Vol. 232, pp.323-335.

O estudo da deficiência em cobre em seres humanos realizado por Graham e Cordano, confirma a existência de duas alterações do metabolismo do ferro, perante esta condição. A primeira ocorre precocemente e consiste numa modificação da absorção ou distribuição do ferro. Uma deficiência em ferro não tratada, que precede ou se desenvolve simultaneamente com a deficiência de cobre, é caracterizada por uma hipocromia que persiste apesar do tratamento exclusivamente com cobre. A segunda alteração é tardia e está relacionada com uma eritropoiese inadequada, mesmo na presença de reservas abundantes de ferro. Verificou-se que quando as reservas de ferro mantinham-se inalteradas a anemia respondia à suplementação isolada de cobre.

## 5.2 Toxicidade

### 5.2.1 Bases bioquímicas para a toxicidade do cobre

A necessidade de cobre em vários órgãos ou sistemas do organismo é efectivamente regulada por mecanismos homeostáticos. A toxicidade provavelmente ocorre quando este controle homeostático está sobrecarregado e/ou os mecanismos de defesa ou de reparação estão comprometidos.

A necessidade e a potencial toxicidade do cobre nos sistemas biológicos assenta basicamente na configuração específica do ião, particularmente na camada electrónica

externa. Assim, o íão cuproso é altamente polarizável e liga-se a principalmente a componentes que contêm nitrogénio e enxofre pela partilha das suas orbitas electrónicas. O íão cúprico, por outro lado, é capaz de formar complexos com ligandos que contêm oxigénio e de se ligar parcialmente a centros que contenham nitrogénio e enxofre de forma covalente. Consequentemente, o cobre torna-se muito reactivo e capaz de se ligar fortemente a várias estruturas ricas em electrões. A afinidade do cobre para com um ligando particular é também influenciada pela polarização do próprio ligando.

O cobre em excesso promove as seguintes reacções adversas:

- Deslocação do metal dos seus locais de ligação resultando, por exemplo, em alterações da membrana como a despolarização e dano dos receptores ou de moléculas transportadoras.
- Dano funcional pela ligação de cobre a locais cruciais em macromoléculas, como o DNA ou enzimas. Isto irá conduzir a dano proteico directo, ou a alterações oxidativas do DNA originando várias alterações funcionais, devido ao grande número de enzimas dependentes de cobre e à possível leitura incorrecta dos códigos genéticos.
- Dano celular devido à produção de radicais pela reacção de Fenton:



A produção excessiva destes radicais irão iniciar uma cascata de reacções de oxidação-redução levando a uma perda da integridade celular. Este dano celular deve-se ao aumento dos níveis de cálcio no citoplasma, à deplecção de ATP, oxidação de tiol, peroxidação lipídica, dano do DNA e danos nos organelos vitais como as mitocôndrias e os lisossomas.

### **5.2.2 Toxicidade do cobre em humanos**

A toxicidade associada ao excesso de cobre foi recentemente considerada um problema de saúde pública já que até a esta altura não existiam casos relatados em seres humanos. Contudo, a incidência na população em geral é marcadamente baixa [Bremner, 1998]. A identificação de doenças genéticas do metabolismo do cobre que originam toxicidade severa (Doença de Wilson) ou deficiência de cobre (Doença de Menkes) não só incitou a investigação no domínio da genética molecular e da biologia da homeostase do cobre mas também a focalização das consequências potenciais da toxicidade do cobre quer nos indivíduos normais quer nos mais susceptíveis. Os últimos incluem pacientes hemodialisados (quando as soluções dialisadas são contaminadas com excesso de cobre), indivíduos com doença renal crónica e os doentes com obstrução biliar [Bremner, 1998].

O cobre em excesso também induz toxicidade indirectamente pela interacção com outros nutrientes, por exemplo, o excesso de Cu produz anemia pela interferência com o transporte e/ou metabolismo do ferro.

Em casos de ingestão intencional ou accidental de elevadas concentrações de sais de cobre (as doses não são totalmente conhecidas, no entanto pensa-se que estejam entre 20-70 g de cobre) foi observada uma progressão de sintomas que incluíam dor abdominal, cefaleias, náuseas, vômitos, tonturas, diarreia, taquicardia, dificuldade respiratória, anemia hemolítica, hematúria, hemorragia digestiva maciça, insuficiência hepática e renal e morte. O facto desta toxicose poder progredir para morte se não for reconhecida atempadamente explica o facto de, em tempos, o cobre ter sido utilizado como método suicida através de uma dose cerca de 1 000 vezes superior à da ingestão

diária normal [Bremner, 1998].

### *Toxicose Aguda*

Episódios agudos de alterações gastrointestinais precedidos de uma ingestão única ou repetida de água com elevados níveis de cobre (geralmente cerca 3-6 mg/L) são caracterizados por náuseas, vômitos e epigastralgias, os quais resolvem quando a fonte de água é mudada. A maioria dos casos relatados não fornecem boas estimativas dos níveis de cobre que induzem estes efeitos. Três estudos experimentais realizados por Araya *et al.* (2001) e Pizarro *et al.* (1999), demonstraram um limiar para as alterações gastrointestinais de aproximadamente 4-5 mg/L em adultos saudáveis, embora não seja claro se estes sintomas se devem aos efeitos irritantes agudos do cobre e/ou ao sabor metálico, amargo e salgado.

### *Toxicose crônica*

As exposições de longa duração ao cobre não têm sido bem estudadas nos seres humanos, contudo é rara em populações normais que não têm nenhum defeito hereditário na homeostase do cobre. Uma intoxicação crônica que originou insuficiência hepática foi documentada num indivíduo adulto do sexo masculino sem susceptibilidade genética conhecida que consumiu 30-60 mg/dia de cobre em suplemento mineral durante 3 anos. Contudo, existem indícios de que os seres humanos são capazes de se adaptar a elevadas concentrações de cobre. Indivíduos expostos a concentrações superiores a 3 mg/L, nos EUA, não exibiram efeitos adversos.

A susceptibilidade para desenvolver toxicose induzida pelo cobre depende de vários factores, incluindo a espécie, a genética, a idade e a dieta. Isto parece reflectir não apenas variações na eficiência da absorção e excreção de cobre mas também diferenças na ingestão de outros factores protectores ou hepatotóxicos, na distribuição celular e na expressão de proteínas específicas de transporte e armazenamento de cobre.

O tratamento corrente da maioria das doenças associadas inclui dieta pobre em cobre, dieta com elevado zinco e uso de quelantes como a penicilamina e a trientina. Os indivíduos afectados devem ter a água de consumo analisada para o conteúdo de cobre e beber água desmineralizada se este for superior a 100 µg/L. Sendo o fígado o maior órgão de armazenamento de cobre e o mais afectado, deve ser evitada qualquer actividade que afecte o metabolismo celular hepático. O consumo de álcool é fortemente desaconselhado.

### **5.2.3 Cobre como um pró-oxidante**

É certo que muitos dos efeitos tóxicos do cobre, como o aumento da peroxidação lipídica das membranas celulares e dano do ADN, estão relacionadas com o seu papel na geração de radicais livres [Bremner,1998].

Um RL é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula que contém um ou mais electrões desemparelhados nas suas camadas de valência. Existem vários radicais livres, sendo  $\text{OH}^\cdot$  e o  $\text{O}_2^\cdot$  os que têm maior importância biológica já que são formados durante o processo de redução de  $\text{O}_2$  no interior das mitocôndrias, durante a metabolização de bases purínicas ou devido à redução do

peróxido de hidrogénio pelo anião  $O_2^-$  catalisada por redutores como o  $Cu^+$ , pela reacção de Fenton.

Se o  $O_2$  é parcialmente reduzido pela recepção de dois electrões, o produto final é o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), contudo se receber apenas um electrão o produto será o radical superóxido ( $O_2^-$ ). O  $H_2O_2$  não é considerado um verdadeiro RL, porém por ser uma substância altamente hidrossolúvel e penetrar facilmente nas células, age como um precursor da formação de outros RLs. O  $H_2O_2$  e o  $O_2^-$  são extremamente tóxicos porque atacam os ácidos gordos das membranas celulares, causando lesão celular. Esta toxicidade deve-se em grande parte, à conversão no radical hidroxil ( $OH^\cdot$ ). Este radical é altamente lesivo e causa quebra e modificações na bases de DNA levando a alterações na expressão genética, mutações e apoptose celular, alterações das cadeias proteicas e peroxidação lipídica com conseqüente detrimento do transporte intercelular [Leite e Sarni, 2003].

O cobre também participa na defesa anti-oxidante por intermédio da SOD1. Contudo, esta defesa e outras defesas não conferem protecção completa contra os RLs produzidos pelo organismo.

Assim, o cobre, implicado na peroxidação lipídica produzida nas paredes do endotélio vascular, contribui para a aterosclerose, risco de AVC e enfarte do miocárdio [Leite e Sarni, 2003]. Além disso, existem evidências de que outros processos do envelhecimento bem como doenças (Doença Alzheimer, por exemplo) são causados, pelo menos em parte, pela contribuição do Cu para o dano oxidativo [Brewer, 2007].

---

# CAPÍTULO

# 6

---

Conclusão

## 6.1 Principais Conclusões

O cobre é um oligoelemento essencial para todos os organismos biológicos, desde bactérias até seres humanos. A sua importância biológica, funcional e estrutural está relacionada com as funções metabólicas de enzimas cuprodependentes, as quais catalisam reacções fisiológicas importantes. Assim, a maioria das manifestações da deficiência de cobre são consequência de alterações funcionais nessas mesmas enzimas.

A dose diária recomendada deste mineral é variável, dependendo da faixa etária em que se encontram os indivíduos. Foi estabelecido um intervalo com os valores mínimos e máximos aceitáveis para a ingestão diária de cobre em adultos, que variam entre 0,8 mg/dia (aproximadamente) e 10 mg/dia, respectivamente. A partir dos dados obtidos para o Homem, é possível afirmar que o risco para a saúde decorrente da deficiência de cobre é superior ao resultante da exposição excessiva, em particular nas crianças, já que os valores médios de ingestão diária de cobre, na população em geral que variam entre 1 e 3 mg/dia (sem suplementação) estão próximos do limite inferior admissível.

Por forma a aumentar o nível de protecção da saúde pública, recomenda-se:

- Estabelecer *guidelines* nutricionais a nível nacional e internacional para que seja evitada a deficiência de cobre, com particular atenção para a suplementação mineral de alimentos processados e interacções nutricionais;
- Monitorizar as concentrações de cobre na água potável e nos alimentos.

Existem estudos que promovem a suplementação mineral com cobre em indivíduos sujeitos a alimentação parental e em crianças fortemente susceptíveis à deficiência de cobre. Perante a suplementação oral é importante ter em conta os possíveis modificadores da absorção intestinal de cobre.

Está documentada a existência de mecanismos homeostáticos reguladores das necessidades de cobre que, apesar de não se encontrarem completamente compreendidos no Homem, o protegem contra a toxicidade e, por outro lado, permitem uma adaptação corporal às necessidades de cobre. Existem distúrbios genéticos que alteram a homeostase do cobre que, apesar de não serem o alvo principal desta dissertação, não podem deixar de ser referenciados – Doença de Wilson e Doença de Menkes.

É de salientar o papel do cobre no dano oxidativo, actuando tanto na protecção contra a produção de radicais livres por intermédio da SOD1, como na produção dos mesmos, através da reacção de Fenton, contribuindo desta forma para as doenças relacionadas com o envelhecimento.

Apesar de evidente a predominância de estudos em animais e da fraca abordagem científica nos últimos 10 anos no que concerne aos processos homeostáticos envolvidos no metabolismo do cobre, é claro que este é um elemento vital para a saúde humana. Contudo, quer o excesso quer a deficiência de cobre, se não tratados, podem levar à morte. Perante esta dualidade, “Vital vs Prejudicial”, torna-se pertinente abordar e dar continuidade a este tema.

## **6.2 Linhas orientadoras de trabalhos futuros**

É possível estabelecer um conjunto de direcções de investigação/revisão, quer no âmbito desta dissertação, uma vez que a mesma não esgota os assuntos nela

abordados, quer no que concerne a novas perspectivas, que a própria tese deixa antever, para futura investigação. Assim, salientam-se as seguintes linhas orientadoras:

- Determinação da biodisponibilidade de cobre nas dietas, particularmente nas dietas vegetarianas;
- Caracterização dos mecanismos que influenciam a homeostase do cobre, incluindo a transferência de cobre na barreiras sanguíneas (placentar e encefálica) e a regulação das Cu-ATPases;
- Desenvolvimento de metodologias, em seres humanos, para a identificação dos efeitos adversos do cobre perante a ingestão diária de determinadas doses e relação com os níveis recomendados.

---

## Referências Bibliográficas

AGGETT, P. J., FAIRWEATHER-TAIT, S., 1998, *Adaptation to high and low copper intakes: its relevance to estimated safe and adequate daily dietary intakes*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1061S-3S.

ALBERTS, B. *et al.*, 1997, 3<sup>a</sup> ed., *Biologia molecular da célula*, Porto Alegre, Artmed.

BEARN, A. G., 1961, *Wilson's Disease*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 9, pp.695-699.

BESHGETOOR, D., HAMBIDGE, M., 1998, *Clinical conditions altering copper metabolism in humans*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1017S-21S.

BREMNER I., 1998, *Manifestations of copper excess*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1069S-73S.

BREWER, G. J., 2000, *Recognition, diagnosis and management of Wilson's disease*, Experimental Biology and Medicine, Vol. 223, pp.39-46.

BREWER, G. J., 2007, *Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease*, Experimental Biology and Medicine, Vol. 232, pp.323-335.

BRITO, J. C. F. *et al.*, 2005, *Doença de Wilson, Diagnóstico clínico e sinais das "faces do panda" à ressonância magnética*, Arquivo de Neuropsiquiatria, Vol.63, pp.176-179.

CABALLERO, B. *et al*, 2005, 2<sup>a</sup> ed., *Encyclopedia of Human Nutrition*, Oxford, Elsevier, pp.471-476.

CARTWRIGHT, G. E., WINTROBE, M. M., 1964, *Copper metabolism in normal subjects*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 14, pp.224-232.

CORDANO, A., 1998, *Clinical manifestations of nutritional copper deficiency in infants and children*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1012S-6S.

DAMERON, C. T., HARRISON, M. D., 1998, *Mechanisms for protection against copper toxicity*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1091S-7S.

DEVLIN T. M., 2002, 5<sup>a</sup> ed., *Textbook of biochemistry with clinical correlations*, New York, Wiley-Liss.

FERREIRA, F. A. G., 2005, 3<sup>a</sup> ed., *Nutrição Humana*, Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

FISCHER, P. W. *et al.*, 1980, *The effect of dietary copper and zinco on cholesterol metabolism*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 33, pp.1019-1025.

FITZGERALD, D. J., 1998, *Safety guidelines for copper in water*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1098S-1102S.

GOLLAN, J. L. *et al.*, 1971, ***Binding of copper by human alimentary secretions***, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 24, pp.1025-1027.

GUBLER, C. J. *et al.*, 1952, ***Studies on copper metabolism***, Blood Journal, Vol, 7, pp.1075-1092.

GUITET, M. *et al.*, 1999, ***Enfermedad de Menkes: experiencia en el tratamiento com Sales de cobre***, Revista de Neurología, Vol. 29, pp.127-130.

HARRIS, Z. L., GITLIN J. D., 1996, ***Genetic and molecular basis for copper toxicity***, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 63, pp.836S-41S.

HOU *et al.*, 2001, ***Copper transportation of WD protein in hepatocytes from Wilson disease patients in vitro***, World Journal of Gastroenterology, Vol. 7, pp.846-851.

KALLER, S., 1996, ***Menkes disease mutations and response to early copper histidine treatment***, Nature Genetics, Vol. 13, pp.21-22.

KALLER, S., 1998, ***Diagnosis and therapy of Menkes syndrome, a genetic form of copper deficiency***, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1029S-34S.

KAPLAN, M. M., 2007, ***Diagnosis of Wilson's Disease*** [Acedido em Março de 2008], disponível no World Wide Web: [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).

KNÖPFEL, M., SOLIOZ, M., 2002, ***Characterization of a cytochrome b558 ferric/cupric reductase from rabbit duodenal brush border membranes***, Biochemistry, Vol. 219, pp.220-225.

LEE, J. *et al.*, 2002, ***Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1***, Journal of Biological Chemistry, Vol. 277, pp. 4380-4387.

LEITE H. P., SARNI, R. S., 2003, ***Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição***, Revista Brasileira de Nutrição Clínica, Vol. 18, pp.87-94.

LINDER, M. C., HAZEGH-AZAM, M., 1996, *Copper biochemistry and molecular biology*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 63, pp.797S-811S.

LINDER M. C. *et al.*, 1998, *Copper transport*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.965S-71S.

LÖNNERDAL, B., 1996, *Bioavailability of copper*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 63, pp.821S-9S

LÖNNERDAL, B., 1998, *Copper nutrition during infancy and childhood*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1046S-53S.

MAHAN, L. K., STUMP, S. E., 2005, 11<sup>a</sup> ed., *Krause: Alimentos, Nutrição & Dietoterapia*, Roca Editora.

MAK MC *et al.*, 2006, *Wilson's disease: a patient undiagnosed for 18 years*, Hong Kong Medicine Journal, Vol.12, pp.154-8.

MANN, J., TRUSWELL, A. S., 2002, 2<sup>a</sup>ed., *Essentials of Human Nutrition*, Oxford, Oxford University Press.

MERCER, J. F. B., 1998, *Menkes syndrome and animal models*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp. 1022S-1028S.

MILNE, D. B., 1998, *Copper intake and assessment of copper status*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1041S-5S.

MOREIRA, D. M. *et al.*, 2001, *Anéis de Kayser-Fleischer*, Arquivo Brasileiro de Oftalmologia, Vol. 64, pp.589-93.

MÜLLER, T. *et al.*, 1998, *Idiopathic copper toxicosis*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1082S-6S.

MURRAY R. K. *et al.*, 2000, 25ª ed., **Harper's Biochemistry**, New York, McGraw-Hill.

PANDIT, A., BHAVE, S., 1996, **Present interpretation of the role of copper in Indian childhood cirrhosis**, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 63, pp.830S-5S.

PEDROSA, L. F., COZZOLINO, A. M., 1999, **Alterações metabólicas e funcionais do cobre em diabetes mellitus**, Revista de Nutrição, Vol. 12, pp.213-224.

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

PERCIVAL, S. S., 1998, **Copper and immunity**, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1064S-8S.

PERES, L. A., FORNACIARI, I. B., 2002, **Doença de Wilson: relato de caso**, Jornal Brasileiro de Nefrologia, Vol. 24, pp.60-63.

ROBERTS, E. A., SCHILSKY, M. L., 2003, **A practice guideline on Wilson Disease**, Hepatology, Vol. 37, pp.1475-1492.

SANSTEAD H. H., 1982, **Copper bioavailability and requirements**, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 35, pp.809-814.

SCHÜMANN, K. *et al.*, 2002, **Hohenheim consensus workshop: copper**, European Journal of Clinical Nutrition, Vol. 56, pp.469-483.

SHIM, H., HARRIS, Z. L., 2003, **Genetic defects in copper metabolism**, Journal of Nutrition, Vol. 133, pp.1527-1531.

TURNLUND, J. R., 1998, **Human whole-body copper metabolism**, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.960S-4S.

TURNLUND, J. R., 1998, *Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope <sup>65</sup>Cu*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1219-25.

UAUY, R. *et al.*, 1998, *Essentiality of copper in humans*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.952S-9S.

WAPNIR, R. A., 1998, *Copper absorption and bioavailability*, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 67, pp.1054S-60S.

WINTROBE, M. M. *et al.*, 1952 , *Studies on the function and metabolism of copper*, Journal of Nutrition, pp.395-417.

WHO, 1998, *Copper: Environmental Health Criteria 200*, Geneva, World Health Organization.

WHO, 2004, *Copper in drinking-water - WHO Guidelines for Drinking-Water Quality*, Geneva, World Health Organization.

