



Universidade do Algarve

Doença de Wilson e o metabolismo do cobre

Ana Margarida Mateus Pires

Dissertação
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação:
Professor Doutor Manuel Aureliano Alves

2012



Universidade do Algarve

Doença de Wilson e o metabolismo do cobre

Ana Margarida Mateus Pires

Dissertação
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação:
Professor Doutor Manuel Aureliano Alves

2012

Doença de Wilson e o metabolismo do cobre

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Ana Margarida Mateus Pires

Faro, 5 de novembro de 2012

© Ana Margarida Mateus Pires

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Manuel Aureliano Alves por toda a disponibilidade, apoio e insistência em aperfeiçoar esta dissertação, e também pelos conhecimentos transmitidos ao longo de todo o processo.

À Direção de Curso do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, pelo apoio dado em todas as dificuldades que me foram surgindo, e que apesar dos obstáculos tem feito um ótimo trabalho.

Aos Professores do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas que estiveram disponíveis para me ajudar e apoiar ao longo de todo este percurso.

Um grande agradecimento aos meus amigos por todo o apoio e força transmitidos nesta etapa final e por estarem sempre presentes.

Aos meus pais, à minha irmã, avós e restante família por todo o apoio prestado, pela amizade, pelo incentivo e força de vontade, e principalmente por todo o carinho que sempre me deram.

Resumo

A doença de Wilson é uma desordem genética rara que afeta o metabolismo do cobre. Esta doença é caracterizada pela acumulação de cobre no organismo e é causada por mutações no gene *ATP7B* que codifica uma Cu^{2+} -ATPase, uma proteína transportadora de cobre, localizada no complexo de Golgi dos hepatócitos.

Esta dissertação tem como objetivo analisar os sistemas envolvidos no metabolismo do cobre, bem como os mecanismos de ação dos fármacos usados na doença de Wilson, e sugerir possíveis novas abordagens terapêuticas para esta doença.

No diagnóstico da doença de Wilson são analisados diversos parâmetros bioquímicos, nomeadamente: ceruloplasmina sérica, cobre sérico, excreção urinária de cobre e concentração hepática de cobre. É feita também a observação de anéis de Kayser – Fleischer e podem ser realizados estudos genéticos, de forma a complementar o diagnóstico que se torna muitas vezes difícil pois muitos sintomas e alterações nestes parâmetros podem estar associados a outras patologias.

O metabolismo do cobre inclui canais de cobre, proteínas “chaperone”, proteínas que contêm cobre, Cu^{2+} -ATPases e ainda proteínas que atuam como quelantes do metal. O mecanismo de transporte de Cu^{2+} associado à hidrólise de ATP pela Cu^{2+} -ATPase, através de um mecanismo E1/E2, é semelhante ao da Ca^{2+} -ATPase. Contudo estas ATPases apresentam algumas diferenças estruturais e funcionais.

De cinco fármacos utilizados no tratamento da doença de Wilson, a maior parte (British Anti-lewisite, penicilamina, trientina e tetramolibdato) apresenta um mecanismo de ação através da terapia de quelação e apenas um, o zinco, atua intracelularmente aumentando proteínas quelantes de cobre, bloqueando assim os efeitos tóxicos deste.

Palavras – chave: doença de Wilson, Cu^{2+} -ATPase, metabolismo de cobre, terapia com zinco.

Abstract

Wilson's disease is a rare genetic disorder that affects copper's metabolism. This disease is characterized by the accumulation of copper in the organism and it is caused by mutations in the *ATP7B* gene that encodes for a Cu^{2+} -ATPase, a copper transport protein, found in the Golgi complex of hepatocytes.

This dissertation's purpose is to analyze the systems involved in copper's metabolism, as well as the mechanism of action of drugs used in Wilson's disease, and suggest new possible therapeutic approaches for this disease.

Wilson's disease diagnosis includes biochemical analyses such as: serum ceruloplasmin, serum copper, urinary copper excretion and hepatic copper content. There is also the examination of Kayser – Fleischer rings and the realization of genetic studies, in order to complement the diagnosis that becomes usually difficult since many symptoms and changes in these parameters can be related to other diseases.

Copper's metabolism includes copper's channels, chaperone proteins, copper containing proteins, Cu^{2+} -ATPases and proteins that act as metal chelating agents. Copper's transport mechanism associated to the hydrolysis of ATP by Cu^{2+} -ATPase, through an E1/E2 mechanism, is similar to the Ca^{2+} -ATPase. However they have some structural and functional differences.

Between the five studied drugs used for Wilson's disease treatment, most of them (British Anti-lewisite, penicillamine, trientine and tetramolybdate) act through chelation therapy and only one, zinc, has an intracellular action by increasing copper's protein chelators, therefore, blocking copper's toxicity.

Keywords: Wilson's disease, Cu^{2+} -ATPase, copper's metabolism, zinc therapy

Índice

Resumo	5
Abstract.....	6
Índice de Figuras	9
Índice de Tabelas	11
Lista de abreviaturas	12
1. Doença de Wilson	13
1.1 Sintomas.....	17
1.1.1 Características hepáticas.....	17
1.1.2 Características neurológicas	18
1.1.3 Características psiquiátricas	19
1.2 Diagnóstico	20
1.2.1 Ceruloplasmina.....	20
1.2.2 Cobre sérico.....	21
1.2.3 Excreção urinária de cobre	22
1.2.4 Concentração hepática de cobre	23
1.2.5 Estudos genéticos	23
1.2.6 Anéis de Kayser-Fleischer.....	24
2. Aspectos gerais do cobre.....	25
3. Metabolismo do cobre.....	27
3.1 Transportadores de cobre.....	29
3.1.1 Aporte de cobre	29

3.1.2	Transporte de cobre através do citoplasma dos enterócitos	30
3.1.3	Transporte de cobre no hepatócito	31
3.2	ATPases E1/E2	33
3.2.1	Ca ²⁺ -ATPase.....	33
3.2.2	Cu ²⁺ -ATPase.....	35
3.3	Semelhanças e diferenças entre Ca ²⁺ -ATPase e Cu ²⁺ -ATPase.....	37
4.	Patologias associadas ao cobre.....	38
4.1	Doença de Menkes e OHS	38
4.2	Doença de Wilson.....	39
4.3	Cirrose infantil Indiana, cirrose infantil endémica de Tirol e toxicose idiopática por cobre	39
5.	Toxicidade e Stress oxidativo	40
6.	Terapêutica da Doença de Wilson.....	43
6.1	British Anti-lewisite (BAL)	43
6.2	Penicilamina.....	44
6.3	Trientina.....	44
6.4	Zinco	45
6.5	Tetratiomolibdato (TM).....	47
6.6	Medicamentos órfãos	51
	Bibliografia.....	53

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Função da Cu^{2+} -ATPase (ATP7B) no metabolismo do cobre. A extrusão do Cu^{2+} envolve a Cu^{2+} -ATPase localizada no complexo de Golgi, sendo posteriormente incorporado em vesículas ligado à ceruloplasmina ou deslocalizado juntamente com a Cu^{2+} -ATPase (A). Na ausência de translocação de Cu^{2+} para o complexo de Golgi, a excreção fica afetada (B).....	14
Figura 1.2 - Anel de Kayser-Fleischer. Localização indicada pelas setas (Scharg <i>et al</i> , 2012).....	17
Figura 3.1 - Trajeto do cobre no organismo. Absorção intestinal, passagem pelo fígado antes da libertação para a circulação ou excreção para a bÍlis.....	27
Figura 3.2 - Trajeto do cobre no enterócito. Incorporação em MT e no ATOX1 e posterior inclusão no complexo de Golgi pela Cu^{2+} -ATPase ATP7A. Deslocalização da Cu^{2+} -ATPase para introdução do cobre na circulação hepática.	30
Figura 3.3 - Trajeto do cobre no hepatócito. Incorporação em MT e no ATOX1 e posterior inclusão no complexo de Golgi pela Cu^{2+} -ATPase ATP7B. Incorporação de cobre na ceruloplasmina para distribuição no organismo e deslocalização da Cu^{2+} -ATPase para excreção de cobre para a bÍlis.	32
Figura 3.4 - Características estruturais da Ca^{2+} -ATPase, indicando-se os três domínios citoplasmáticos e o domínio transmembranar (Inesi, 2011).....	34
Figura 3.5 - Mecanismo de transporte de cálcio associado à hidrólise de ATP pela Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (Inesi, 2011).	35
Figura 3.6 - Características estruturais da Cu^{2+} -ATPase, indicando-se os três domínios citoplasmáticos, o domínio transmembranar e a extensão amino – terminal (Inesi, 2011).	36
Figura 5.1 - Proteínas anti-oxidantes envolvidas no processo de eliminação de espécies reativas de oxigénio produzidas pelo Cu^{2+} (adaptado de Wakamatsu <i>et al</i> , 2008).	40
Figura 5.2 - O aumento da concentração de Cu^{2+} induz o aumento de ROS com consequente aumento dos danos oxidativos (adaptado de Wakamatsu <i>et al</i> , 2008).	41

Figura 5.3 - A diminuição da ativação de SOD por deficiência de Cu^{2+} vai promover o aumento de ROS (adaptado de Wakamatsu *et al*, 2008). 41

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Proteínas de cobre e respectivas funções (adaptada de Fraústo da Silva <i>et al</i> , 2011).....	25
Tabela 6.1- Fármacos utilizados na doença de Wilson: mecanismo de ação, aplicação e efeitos adversos.	49

Lista de abreviaturas

γ -GTP – γ -glutamiltanspeptidase

ALP – Fosfatase alcalina

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

BAL – “British Anti-lewisite”

CP – Ceruloplasmina

CTR1 – “Copper transporter 1”

DW – Doença de Wilson

ETIC – “Endemic Tyrolean Infantile Cirrhosis” – Cirrose Infantil Endemica de Tirol

FDA – “Food and Drug Administration”

GSH – Glutathiona

MT - Metalotioneína

NMBD – “N-metal binding domain”

OHS – “Occipital Horn Syndrome”

ROS – “Reactive Oxygen Species” – Espécies Reativas de Oxigénio

RS – Retículo Sarcoplasmático

SERCA1 – “Sarco(endo)plasmic Reticulum Calcium ATPase1”

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD – Superóxido Dismutase

TGN – “Trans-Golgi Network”

TM – Tetramolibdato

TMBS – “Transmembrane Binding Site”

1. Doença de Wilson

A doença de Wilson (DW) é uma doença rara caracterizada pela excreção deficiente de cobre (Cu^{2+}) do organismo. É hereditária, de uma forma autossômica recessiva, e tem uma incidência estimada entre 1:30 000 e 1:100 000 (Bruha et al, 2010; Bie et al, 2007). As características desta doença resultam da acumulação tóxica de cobre, inicialmente no fígado e no cérebro, podendo assim o doente apresentar deficiências hepáticas (cirrose e hepatite crónica, culminando na falha hepática progressiva), alterações neurológicas (características parkinsonianas, convulsões), e sintomas psiquiátricos (alterações de personalidade, depressão e psicose) (Bie et al, 2007). A idade de início da doença pode variar entre os 2 e os 70 anos (Li et al, 2011).

Esta doença é causada por uma deficiência numa proteína transportadora de cobre, uma ATPase do tipo P, codificada pelo gene *ATP7B* localizado no cromossoma 13 (Lorincz, 2010). Esta ATPase transporta cobre contra o gradiente, utilizando ATP como fonte de energia e o mecanismo de transporte é semelhante ao das ATPases E1/E2 tais como a Na^+/K^+ -ATPase e a Ca^{2+} -ATPase (Inesi, 2011; Toyoshima *et al*, 2011).

A proteína Cu^{2+} -ATPase ATP7B, localizada no fígado, é pois uma bomba de transporte de cobre envolvida no metabolismo deste. O cobre no fígado pode seguir então duas vias: é incorporado na ceruloplasmina (CP, proteína que contém cobre), para distribuição sistémica através da circulação sanguínea, ou é excretado na bÍlis, quando excede as necessidades do organismo. Neste último caso, ocorre a deslocalização da Cu^{2+} -ATPase. O ser humano tem um aporte de cerca de 0,25 mg de cobre a mais do que o necessário por dia, sendo preciso excretar esse excesso. O não funcionamento da Cu^{2+} -ATPase ATP7B, como se verifica na DW, provoca então uma falha na excreção do excesso de cobre, resultando no aumento da sua concentração em Cu^{2+} (Fig. 1.1) (Li et al, 2011; Brewer, 2012).

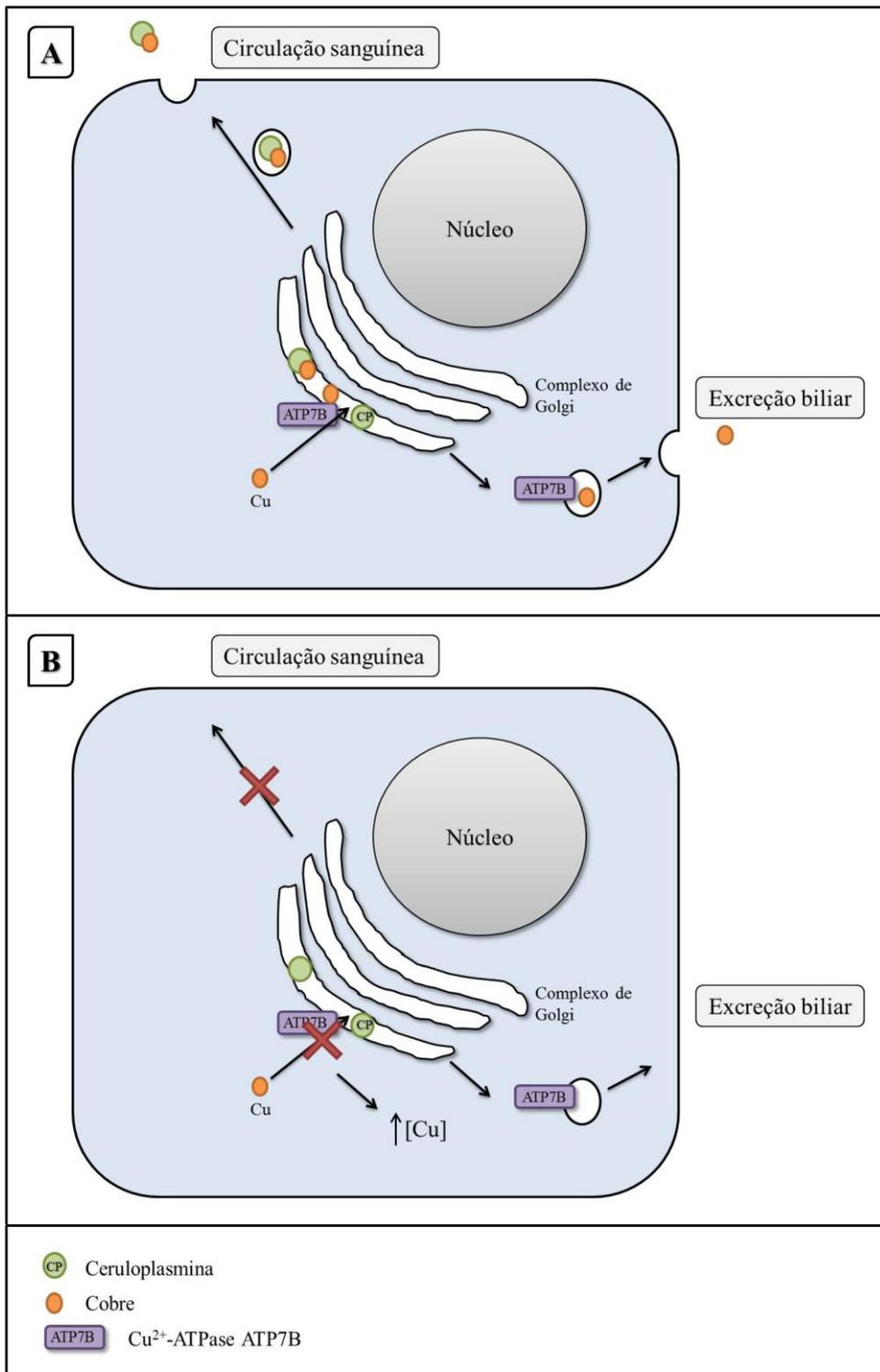


Figura 1.1 - Função da Cu²⁺-ATPase (ATP7B) no metabolismo do cobre. A extrusão do Cu²⁺ envolve a Cu²⁺-ATPase localizada no complexo de Golgi, sendo posteriormente incorporado em vesículas ligado à ceruloplasmina ou deslocalizado juntamente com a Cu²⁺-ATPase (A). Na ausência de translocação de Cu²⁺ para o complexo de Golgi, a excreção fica afetada (B).

Foram identificadas mais de 500 mutações diferentes neste gene responsáveis por esta doença, sendo que na Europa Central, a mutação prevalente é a H1069Q. Muitas das mutações são extremamente raras e limitadas a apenas um indivíduo (Bruha et al, 2010; Li et al, 2011). Esta mutação H1069Q representa a substituição de uma histidina por glutamato no aminoácido 1069 e resulta numa diminuição ou quase completa ausência de ligação do ATP à Cu^{2+} -ATPase ATP7B (Bie et al, 2007; Ala et al, 2007).

Se a DW não for diagnosticada e tratada, leva a graves incapacidades ou até à morte, sendo as principais causas de morte as deficiências progressivas neuropsiquiátricas ou a doença hepática (falha aguda do fígado ou cirrose). Uma das características mais extraordinárias da DW é a grande variabilidade de manifestações fenotípicas em pacientes que possuem a mesma mutação (Bruha et al, 2010).

História

Em 1912, foi escrito o primeiro artigo sobre esta doença, por Samuel Alexander Kinnier-Wilson, um neurologista americano que trabalhava no Hospital Nacional de Queen Square em Londres. Samuel Wilson descreveu uma doença neurológica associada à degeneração lenticular (núcleo lenticular - estrutura localizada no cérebro que participa na coordenação de movimentos) progressiva do cérebro e cirrose hepática, que posteriormente veio a ser conhecida como a doença de Wilson, ou degeneração hepatolenticular. Apenas mais tarde o parkinsonismo foi reconhecido como a principal característica da doença de Wilson (Lorincz, 2010).

Pensa-se que em 1913 possa ter sido feita a descrição da relação da DW com o metabolismo do cobre. Já em 1929 e 1930, foi descrito o excesso de cobre no cérebro e no fígado e em 1952 foi demonstrado que a ceruloplasmina apresentava valores baixos de concentração em pacientes com DW. Desde 1963 até meados dos anos 70, a utilização de cobre radioativo por Walshe e os seus colegas demonstrou que na doença pré-sintomática o fígado é capaz de sequestrar cobre injetado. Por outro lado, nos pacientes sintomáticos, o cobre injetado era incapaz de ficar ligado no fígado e foi encontrado noutros tecidos como o cérebro. Uma baixa excreção biliar de cobre mostrou mais tarde ser responsável pela falha na regulação do balanço do metal.

Em 1921, Hall tinha delineado um padrão autossômico hereditário, que foi confirmado por Bearn em 1960. Mais tarde, foi identificada a localização cromossômica do gene da DW no cromossoma 13 e a identificação do já referido gene em causa, *ATP7B* (Lorincz, 2010).

Em 1951, começaram a surgir as primeiras hipóteses de tratamento, começando pelo British-anti Lewisite (BAL), e depois com penicilamina, trientina, zinco e ainda tetramolibdato. Pormenores sobre a terapêutica destes fármacos encontram-se descritos no último capítulo.

1.1 Sintomas

No início da doença, o paciente não apresenta quaisquer sintomas, mas está progressivamente a acumular cobre no fígado. Mais tarde, geralmente entre a infância e a quinta ou sexta década de vida, mas com um pico de incidência a rondar os 17 anos, o paciente apresenta manifestações hepáticas, neurológicas e psiquiátricas (Lorincz, 2010).

1.1.1 Características hepáticas

As manifestações hepáticas da doença de Wilson podem ser divididas em quatro principais apresentações: hepatite aguda, hepatite crónica ativa, cirrose e falha aguda hepática fulminante (que requer transplante para se poder salvar o paciente), existindo no entanto outras manifestações hepáticas. Um começo precoce da DW (entre os 11-15 anos de idade) tem sido visto naqueles cujos primeiros sintomas são hepáticos. No caso dos sintomas hepáticos, assim como nos neurológicos, o diagnóstico torna-se difícil pois as manifestações podem ser atribuídas a outras causas (Roberts et al, 2008).

Em 1912, Kayser descreveu anéis pigmentados na córnea (Fig. 1.2), que se soube mais tarde que seriam consequência da acumulação de cobre no fígado e sua posterior libertação para deposição noutros locais do organismo. Foram batizados como anéis de Kayser – Fleischer e representam a deposição de cobre na córnea, apresentando uma cor dourado-acastanhada (Roberts et al, 2008).

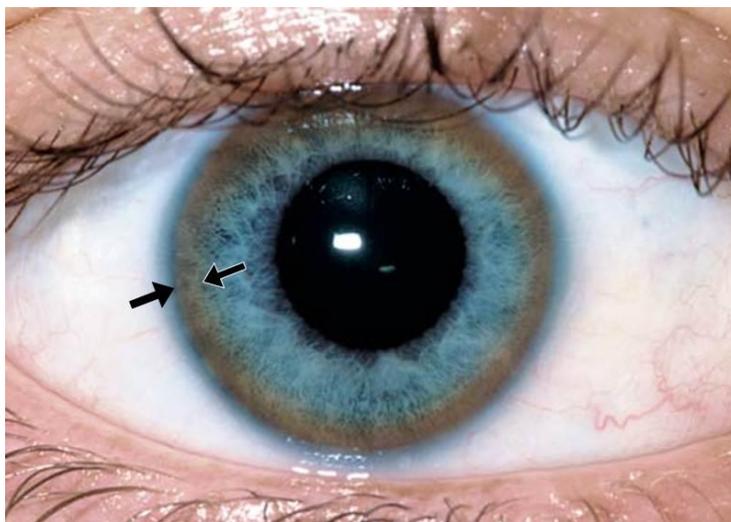


Figura 1.2 - Anel de Kayser-Fleischer. Localização indicada pelas setas (Scharg *et al*, 2012).

1.1.2 Características neurológicas

Os sintomas neurológicos da DW aparecem normalmente entre os 15 e os 21 anos de idade. O decurso da doença é altamente variável, e apesar dos sintomas serem normalmente graduais neste decurso, verificam-se agravamentos repentinos, com ou sem tratamento, assim como flutuações da severidade dos sintomas de um dia para o outro (Lorincz, 2010).

As categorias clínicas que envolvem a maior parte das manifestações neurológicas na DW são disartria (incapacidade de articular as palavras de forma correta), distonia (movimentos repetitivos ou posturas anormais), tremores, parkinsonismo (bradicinesia, rigidez e instabilidade postural) e ataxia (falta de coordenação de movimentos) (Lorincz, 2010).

A disartria é provavelmente a manifestação neurológica mais comum da DW, sendo encontrada em cerca de 85-97% dos pacientes com doença neurológica. A distonia, presente em 11-65% dos casos, pode ser focal, afetando apenas algumas zonas do corpo como por exemplo os músculos utilizados no ato de engolir, provocando disfagia, ou pode evoluir para uma distonia generalizada. Os tremores mostraram estar presentes em cerca de 22-55% dos casos, podendo envolver os braços, a cabeça e as pernas. Podem ocorrer quando o indivíduo se encontra em repouso, quando se assume uma postura ou durante a realização de um movimento (Lorincz, 2010).

Os sintomas de parkinsonismo, considerado como uma categoria sintomática em separado, surgem em cerca de 19-62% dos casos. A bradicinesia, uma das manifestações mais comuns do parkinsonismo, é caracterizada pela lentidão de movimentos. Para além das características já referidas, existe a chamada “rigidez de roda dentada” na qual os movimentos são feitos como se a articulação fosse uma roda dentada (Lorincz, 2010).

1.1.3 Características psiquiátricas

As manifestações psiquiátricas apresentam-se em 30 a 50% das vezes antes do diagnóstico da DW. Por os sintomas psiquiátricos estarem mal definidos e serem atribuídos a outras causas, o diagnóstico da DW raramente é feito durante o período em que os sintomas psiquiátricos são a única manifestação, contribuindo assim para o atraso no diagnóstico e tratamento. Os sintomas mais comuns na altura do diagnóstico são alterações de personalidade, comportamentos impróprios, irritabilidade e depressão. Durante o percurso da doença, para além dos referidos, podem surgir outros sintomas como impulsividade, desinibição, irritabilidade, ansiedade, abuso de substâncias, catatonia (alternância entre períodos de passividade e elevada agitação), emocionalidade e mania (distúrbio mental com alteração do pensamento e alteração do comportamento dirigido) (Lorincz, 2010).

Foi sugerido que a depressão, que ocorre em 20-30% dos pacientes com DW, possa ser reativa (derivada de fatores vivenciais/situações). As manifestações psiquiátricas da DW mostram ser mais comuns quando há envolvimento neurológico e são incomuns quando há apenas envolvimento hepático (Lorincz, 2010).

1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da DW é baseado em manifestações clínicas (sintomas hepáticos, neurológicos, psiquiátricos e a presença de anéis de Kayser-Fleischer) e testes bioquímicos. Entre os testes bioquímicos, encontram-se a medição de vários parâmetros, nomeadamente a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e γ -glutamiltanspeptidase (γ -GTP) que são marcadores de lesão hepática e encontram-se alterados nesta patologia. São ainda medidos os níveis séricos de ceruloplasmina, o cobre sérico, assim como a excreção urinária de cobre e a concentração de cobre no fígado. Contudo, estes marcadores bioquímicos podem ser afetados por outras patologias, fazendo com que o diagnóstico da DW se torne difícil na ausência dos sintomas típicos. Por essa razão, os testes genéticos tornaram-se o método de escolha para estabelecer um diagnóstico preciso (Li et al, 2011; Shimizu et al, 2010).

1.2.1 Ceruloplasmina

A medição dos níveis séricos de ceruloplasmina é um método seguro, simples e prático utilizado no diagnóstico da DW, mas não é suficiente por si só. A perda de função da Cu^{2+} -ATPase ATP7B leva à falha na incorporação de cobre na apoceruloplasmina (ceruloplasmina sem cobre). Os níveis baixos de ceruloplasmina (produzida no fígado) encontrados nos pacientes com DW são resultado da sua rápida degradação, que na ausência de cobre apresenta um tempo de meia-vida reduzido (Pfeiffer, 2007; Bie et al, 2007; Roberts, 2008) .

Os níveis de CP podem ser medidos enzimaticamente pela sua atividade oxidase dependente de cobre, ou por testes imunológicos. Estes ensaios imunológicos podem sobrestimar as concentrações de ceruloplasmina pois não discriminam entre a apoceruloplasmina e a ceruloplasmina. Isto faz da ceruloplasmina sérica um diagnóstico difícil de interpretar (Roberts, 2008).

Os valores de referência para os níveis de ceruloplasmina sérica encontram-se à volta dos 333 mg/L para os homens e 366 mg/L para as mulheres (Walshe, 2003) e um nível inferior a 200 mg/L foi considerado como consistente com a doença de Wilson. É de referir que valores de ceruloplasmina sérica que se encontrem dentro dos valores de referência não excluem o diagnóstico (Roberts, 2008).

1.2.2 Cobre sérico

Apesar de ser uma doença de excesso de cobre, o cobre total sérico (que inclui o cobre ligado e o cobre não ligado à ceruloplasmina) na doença de Wilson está geralmente baixo em proporção com os baixos níveis de ceruloplasmina em circulação (Roberts, 2008), estando os valores de referência de cobre sérico total entre 14 e 24 $\mu\text{mol/L}$ (90 – 150 $\mu\text{g}/100\text{ mL}$) (Walshe, 2003). Em pacientes com danos severos no fígado, o cobre sérico pode-se apresentar dentro dos valores de referência, apesar dos níveis baixos de ceruloplasmina. No caso de existir falha aguda do fígado devido à DW, os níveis de cobre sérico podem-se apresentar elevados, devido à repentina libertação do metal das reservas nos tecidos. Níveis normais ou elevados de cobre apresentados juntamente com valores baixos de ceruloplasmina, indica um aumento na concentração de cobre não ligado à ceruloplasmina no sangue (Roberts, 2008).

A medição dos níveis séricos de cobre não ligado à ceruloplasmina foi proposta como um teste de diagnóstico para a DW e reflete o cobre que se encontra livre para se depositar em tecidos em que é potencialmente tóxico (Roberts, 2008; Pfeiffer, 2007), estando os valores normais à volta de 1,6 $\mu\text{mol/L}$. O cobre total é a soma do cobre ligado à CP e do cobre não ligado à CP, sendo que a ceruloplasmina contém cerca de 0,3% de cobre. Tendo em conta estes dados, um paciente saudável com 17,3 $\mu\text{mol/L}$ de cobre total sérico e 330 mg/L de ceruloplasmina apresenta 15,6 $\mu\text{mol/L}$ de cobre ligado à CP (cerca de 90% do cobre total) e 1,7 $\mu\text{mol/L}$ de cobre livre (Walshe, 2003). A maior parte dos pacientes não tratados apresenta valores de Cu^{2+} não ligado à CP superiores a 250 $\mu\text{g/L}$ (Roberts, 2008), equivalente a 3,9 $\mu\text{mol/L}$, o que é aproximadamente o dobro do valor de referência (1,6 $\mu\text{mol/L}$) resultando em elevada toxicidade.

De notar que quando se fala de “cobre total sérico”, está-se a incluir o cobre ligado à ceruloplasmina (90%) e o cobre não ligado à ceruloplasmina (10%). Na DW não ocorre ligação deste metal à ceruloplasmina, fazendo com que os níveis de cobre total sérico sejam baixos. Por outro lado, quando é analisado o “cobre não ligado à ceruloplasmina” encontram-se valores elevados, pois este encontra-se ligado a outras proteínas como a albumina. Por esta parte representar apenas 10%, não é suficiente para fazer elevar o valor total de cobre sérico.

1.2.3 Excreção urinária de cobre

Uma ferramenta que pode ser útil no diagnóstico da DW e na monitorização do tratamento é a quantidade de cobre excretado na urina. Esta excreção urinária, de 24 horas, reflete a quantidade de cobre não ligado à ceruloplasmina que está presente em circulação, apresentando valores elevados. Os valores apresentados como diagnóstico para a DW são uma excreção urinária de cobre superior a 100 µg/24 horas em pacientes sintomáticos (Roberts, 2008; Shimizu, 2010). É importante que os pacientes recolham a urina em recipientes livres de cobre para evitar resultados falsos (Pfeiffer, 2007).

Por vezes é utilizado o termo cobre “livre” em circulação, um termo que é incorreto pois não existe cobre iónico livre presente no plasma. Isto é, a quantidade de metal que não se encontra ligado à ceruloplasmina, está provavelmente complexado com proteínas, por exemplo a albumina. Os valores de excreção urinária de cobre estão relacionados com vários aspetos, entre eles a função renal. A perda de proteínas na urina (proteinúria) vai aumentar a excreção de cobre. Um nível diminuído de albumina em circulação vai permitir ao cobre encontrar ligandos de menores dimensões, permitindo assim que uma maior quantidade do metal seja filtrada nos rins (Walshe, 2012).

1.2.4 Concentração hepática de cobre

O facto da biópsia ao fígado ser invasiva e do procedimento ter alguns riscos, o seu uso deve ser reservado a situações nas quais as abordagens mais simples não asseguram um diagnóstico conclusivo. A biópsia não é normalmente necessária em indivíduos com problemas neurológicos ou psiquiátricos porque o diagnóstico nestes pacientes é possível por outros testes. O seu uso principal é em indivíduos que apresentam disfunção hepática, na qual o cobre pode ainda não ter sido despejado do fígado para afluir a outros órgãos e tecidos (Pfeiffer, 2007).

Os valores de concentração hepática de cobre, obtidos através de uma biópsia ao fígado, encontram-se elevados na maior parte dos indivíduos com DW, mesmo aqueles que são assintomáticos. Valores superiores a 250 µg/g de tecido seco estão normalmente presentes nestes indivíduos, sendo que os valores normais variam de 15 a 55 µg/g de tecido seco (Pfeiffer, 2007). A deteção de cobre nos hepatócitos por meios histoquímicos é altamente variável. No início da doença o cobre encontra-se principalmente no citoplasma ligado a proteínas específicas e não é detetável por este método. Por sua vez, nas etapas mais avançadas da doença, o cobre é encontrado principalmente nos lisossomas (Roberts, 2008).

1.2.5 Estudos genéticos

Outra possibilidade de diagnóstico é a realização de testes genéticos para verificar se existe ou não mutação no gene *ATP7B*. Este teste deve ser efetuado em indivíduos nos quais o diagnóstico é difícil de estabelecer por testes clínicos e bioquímicos (Roberts, 2008). Estes estudos genéticos estão a tornar-se cada vez mais importantes na validação do diagnóstico e também na identificação de familiares afetados mas pré-sintomáticos. Neste último caso, os testes utilizados para determinar as concentrações de cobre hepático são desnecessários (Huster, 2010).

Atualmente, os testes genéticos moleculares incluem a análise do haplótipo e análise direta de mutações através da sequenciação. Se for o caso de ser uma mutação conhecida, é utilizada a amplificação e sequenciação da região utilizada. A análise completa de todo o gene *ATP7B*, no caso de se tratar de uma mutação desconhecida, é ainda um processo complexo e ainda dispendioso atualmente (Huster, 2010).

Apesar de os testes genéticos poderem vir a ser uma prova certa do diagnóstico da DW, a grande quantidade e diversidade de mutações identificadas na DW faz com que este teste não seja prático a nível comercial (Pfeiffer, 2007).

1.2.6 Anéis de Kayser-Fleischer

Para além da determinação de diversos parâmetros bioquímicos, recorre-se também à observação com uma lâmpada específica de anéis de Kayser – Fleischer. No entanto, estes anéis podem estar ausentes em 50% dos pacientes e não são específicos da DW, podendo ser encontrados em pacientes com doenças colestáticas (relacionadas com a biliar) (Roberts, 2008).

Num indivíduo que apresente sintomas neurológicos, a presença dos anéis de Kayser-Fleischer suporta fortemente o diagnóstico da DW. No entanto, já foi também registada a ausência dos anéis em indivíduos com disfunções no sistema nervoso central (SNC). Por sua vez, a maior parte dos pacientes com apenas sintomas hepáticos não apresentam anéis de Kayser-Fleischer (Pfeiffer, 2007).

Tanto os marcadores bioquímicos como os sintomas neurológicos e psiquiátricos podem estar associados a outras patologias. Antes de se diagnosticar uma doença rara, normalmente aponta-se para outras patologias mais comuns que estariam relacionadas com os resultados obtidos, sendo por isso difícil chegar ao diagnóstico da DW.

2. Aspetos gerais do cobre

O cobre é um metal de transição de símbolo químico Cu e número atómico 29. Pertence ao grupo 11 e ao 4º período da tabela periódica, tem uma massa atómica de 63,546, existindo em dois estados de oxidação: Cu^+ e Cu^{2+} (Stern, 2010). O cobre tem grande afinidade com o grupo tiol, um dos grupos de coordenação mais importante no ambiente biológico. O facto de o cobre poder variar entre dois estados de oxidação faz deste metal de transição um elemento importante nas reações oxidação – redução, discutidas posteriormente (Culotta, 2009; Crisponi *et al*, 2009).

O cobre é considerado um elemento essencial vestigial e atua em várias partes do metabolismo, salientando-se a destoxificação de radicais livres, através da enzima superóxido dismutase (SOD), e o metabolismo do ferro, através da ceruloplasmina, entre outras (Crisponi *et al*, 2009).

O cobre é usado como cofator por aproximadamente 30 enzimas (Culotta, 2009), ocorrendo também associado a proteínas de transferência eletrónica e a proteínas de transporte de oxigénio molecular em alguns invertebrados (Fraústo da Silva *et al*, 2011).

Na seguinte tabela encontram-se alguns exemplos de proteínas de cobre e suas funções.

Tabela 2.1 - Proteínas de cobre e respetivas funções (adaptada de Fraústo da Silva *et al*, 2011).

Proteína	Função
Citocromo c oxidase	Fosforilação oxidativa
Dismutase do superóxido Cu/Zn	Dismutação do anião superóxido
Ferroxidase (ceruloplasmina)	Oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} no metabolismo do ferro
Metalotioneína	Protege a célula contra a toxicidade do cobre, armazenando-o como Cu^+
Família ATOX1 ("chaperones" de cobre)	Transporta cobre para as Cu^{2+} -ATPases
ATPases do tipo P	Transporte de cobre através da membrana

O cobre tem um papel essencial no desenvolvimento do cérebro, o que é mostrado pela presença de desmielinização e neurodegeneração em pacientes afetados com a doença de Menkes. O metal mostra-se também essencial para a reprodução, regulação da expressão de genes e no desenvolvimento e crescimento normais, sendo também importante para a mucosa intestinal ser mantido um nível normal de cobre (Crisponi *et al*, 2009).

A biodisponibilidade de cobre no organismo humano depende de três principais fatores: absorção no trato gastrointestinal, transporte no sangue e excreção do excesso de cobre dos hepatócitos. Esta biodisponibilidade pode ser alterada por diversos fatores, nomeadamente: o envelhecimento, no qual ocorre uma diminuição na eficiência da homeostase do cobre, resultando assim em níveis mais elevados do metal no sangue; o género, tendo a população do sexo feminino valores médios de cobre sérico mais elevados; e fatores hormonais, ou seja, mulheres que tomem a pílula contraceptiva têm níveis de cobre sérico mais elevados (Crisponi *et al*, 2009).

O organismo humano tem a potencialidade de controlar os níveis de cobre através de diversos processos. O metabolismo do cobre envolve várias proteínas transportadoras, desde que é absorvido no trato gastrointestinal, passando pelo seu transporte para o fígado, todo o percurso intracelular e posterior eliminação através da biliar. São mecanismos que funcionam em conjunto para garantir que, num organismo saudável, exista um equilíbrio nos níveis de cobre, evitando assim o excesso ou a escassez deste, o que poderia levar a diversos problemas de saúde, como foi descrito anteriormente (Culotta, 2009).

3. Metabolismo do cobre

Num indivíduo saudável, o cobre proveniente da dieta é absorvido no intestino delgado, direcionado para o fígado antes de ser libertado para a circulação, sendo o excesso excretado na bÍlis para ser eliminado pelo trato gastrointestinal (Fig. 3.1) (Crisponi *et al*, 2009). Quando os nÍveis de cobre no organismo apresentam valores baixos, o aporte de cobre é mais eficiente. Por sua vez, quando as reservas de cobre são as adequadas, o aporte deste é reduzido (La Fountaine *et al*, 2007).

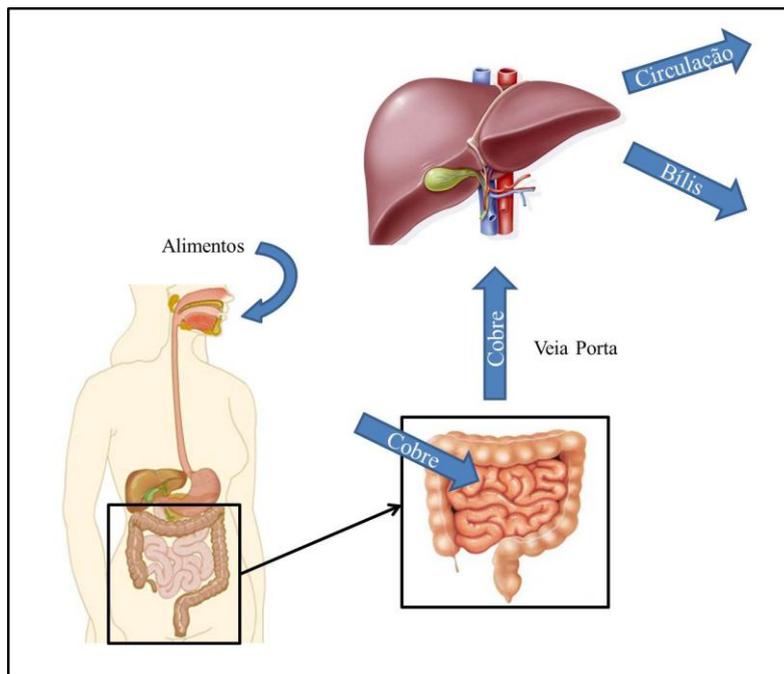


Figura 3.1 - Trajeto do cobre no organismo. Absorção intestinal, passagem pelo fígado antes da libertação para a circulação ou excreção para a bÍlis.

As necessidades diárias de cobre em adultos são de 1 mg, sendo as principais fontes de cobre na dieta as seguintes: chocolate, fÍgado animal, crustáceos, marisco, vegetais verdes e frutos secos. O cobre estÁ muito mais biodisponÍvel na carne do que nos vegetais (Crisponi *et al*, 2009).

As concentrações de cobre nos alimentos referidos variam entre 20 e 50 mg/kg, cerca de 500 vezes mais elevado do que no leite materno humano, uma das fontes mais pobres em cobre. Este conteúdo em cobre no leite materno decresce aproximadamente 50% a partir do 4º mÊs de lactaçaõ, sendo que um tempo de amamentaçaõ prolongado pode levar a uma deficiênciA em cobre na criançA. Um bebÊ tem uma necessidade de cobre de

aproximadamente 80 µg/dia, e quanto apresenta uma diarreia prolongada deve-se sempre suspeitar de deficiência em cobre (Crisponi *et al*, 2009).

Um adulto saudável, de 70 kg, contém no organismo cerca de 110 mg de cobre, a maior parte (46 mg) no esqueleto e medula óssea, 26 mg no músculo esquelético, 10 mg no fígado, 8,8 mg no cérebro e 6 mg no sangue (Crisponi *et al*, 2009).

3.1 Transportadores de cobre

Os principais sistemas conhecidos que se encontram envolvidos no transporte, acumulação e metabolismo de cobre no organismo humano incluem: canais de cobre, no caso do “copper transporter 1” (CTR1); bombas de Cu^{2+} , a Cu^{2+} -ATPase; proteínas “chaperone” como a ATOX1; proteínas que contêm Cu^{2+} (ceruloplasmina), proteínas com ação quelante, as metalotioneínas (MT) (Crisponi *et al*, 2009; Wang *et al*, 2011), e o tripeptídeo glutationa (GSH).

3.1.1 Aporte de cobre

O cobre ingerido, quando passa no tubo digestivo, é introduzido no enterócito pelo CTR1 ou “copper membrane transporter” (CMT1), que medeia o transporte do Cu^{2+} através da membrana plasmática (Fig. 3.2) (Bie *et al*, 2007; Culotta, 2009).

O aporte de cobre pela CTR1 é específico para a forma reduzida Cu^+ e é saturável, depende do tempo, temperatura e pH, sendo considerado um transportador com alta afinidade para o cobre. Esta proteína é também considerada essencial no desenvolvimento embrionário e pode localizar-se na membrana plasmática ou em compartimentos vesiculares, dependendo da linha celular de que se trata (Crisponi *et al*, 2009; Wang *et al*, 2011). Os estudos dos autores demonstram que elevadas concentrações de cobre vão estimular a endocitose de CTR1 marcado (humano) e sobre-expresso. Pode-se dizer então que os níveis de cobre controlam a abundância de CRT1, sendo este um mecanismo regulador que previne a acumulação de níveis tóxicos de cobre (Wang *et al*, 2011).

A importância desta proteína pode ser demonstrada através de experiências de biologia molecular com ratinhos “knock-out” CTR1, que apresentam defeitos graves no crescimento e viabilidade, apresentando ainda deficiência em cobre a nível sistêmico, sobrecarga de ferro, hipertrofia cardíaca e um déficit severo de crescimento devido ao bloqueio de absorção intestinal de cobre (Crisponi *et al*, 2009).

3.1.2 Transporte de cobre através do citoplasma dos enterócitos

Dentro do enterócito, uma parte do cobre liga-se às metalotioneínas (Fig. 3.2), que são proteínas intracelulares ricas em cisteína (cerca de 30%) (Thirumorthy *et al*, 2007) importantes para proteger a célula dos efeitos tóxicos não apenas de Cu^{2+} , bem como de outros metais tóxicos ou contaminantes tais como o Pb^{2+} , Hg^{2+} e Cd^{2+} . A afinidade da proteína MT varia conforme o metal, sendo que o cobre apresenta maior estabilidade de ligação, seguido do Cd e do Zn. Podem ligar-se até 7 metais divalentes ou 12 íons monovalentes de Cu^+ por molécula (apenas o Cu^+ se liga às metalotioneínas) (Coyle *et al*, 2001; Bie *et al*, 2007).

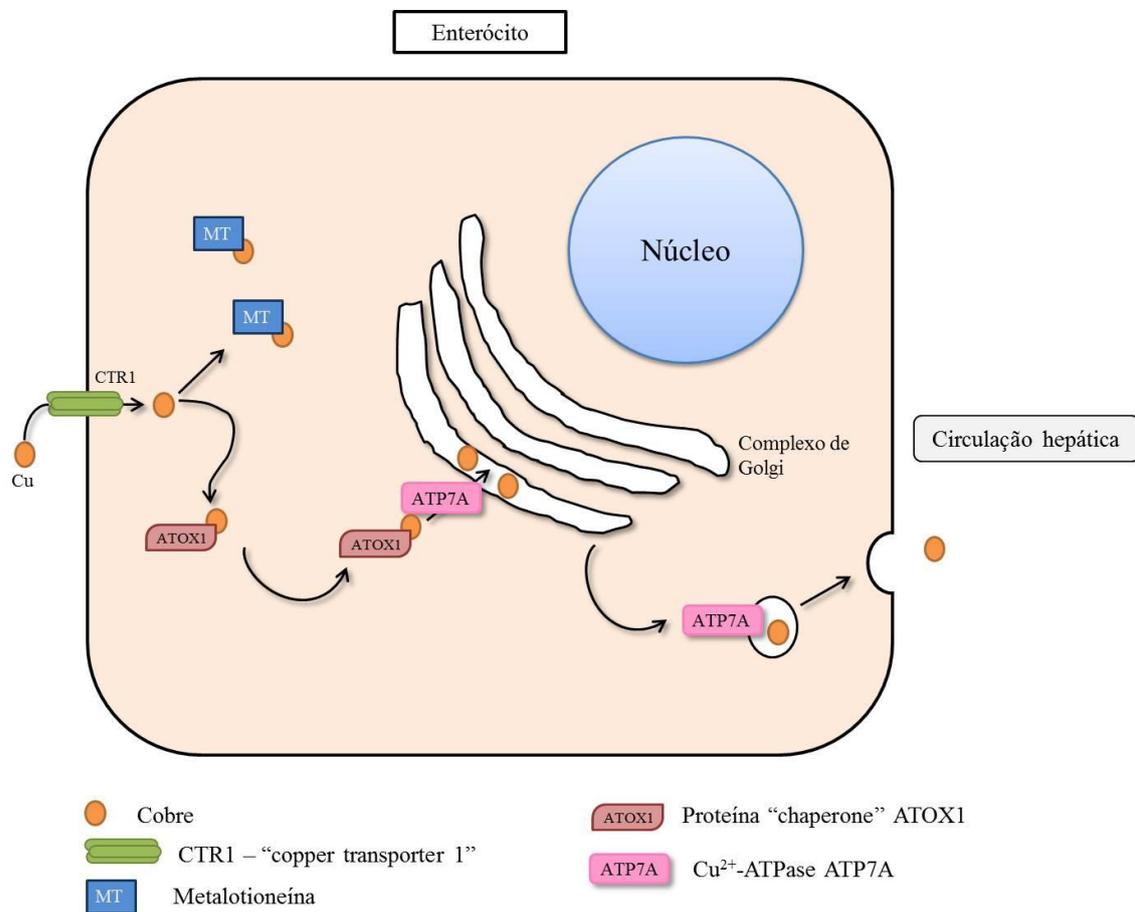


Figura 3.2 - Trajeto do cobre no enterócito. Incorporação em MT e no ATOX1 e posterior inclusão no complexo de Golgi pela Cu^{2+} -ATPase ATP7A. Deslocalização da Cu^{2+} -ATPase para introdução do cobre na circulação hepática.

A outra parte do cobre liga-se à proteína ATOX1, que tem como função mobilizar o cobre para locais específicos, neste caso entregando-o à Cu^{2+} -ATPase ATP7A, localizada no “trans-Golgi network” (TGN, o compartimento final do complexo de Golgi) (Bie *et al*, 2007; La Fountaine *et al*, 2007; Wang *et al*, 2011).

Recentemente, foi sugerido que para que o cobre seja introduzido na circulação e transportado para o fígado, ocorre uma deslocalização da Cu^{2+} -ATPase do complexo de Golgi até à membrana plasmática (Wang *et al*, 2011). Depois de excretado, o Cu^{2+} é transportado na circulação ligado à albumina e a outras proteínas sanguíneas (La Fountaine *et al*, 2007).

3.1.3 Transporte de cobre no hepatócito

O trajeto de Cu^{2+} nas células hepáticas é em parte semelhante ao que acontece nos enterócitos, o que pode gerar alguma confusão. Nos hepatócitos existem igualmente as proteínas CTR1, ATOX1 e MT. As diferenças estão na bomba de Cu^{2+} , que é neste caso a Cu^{2+} -ATPase ATP7B, na existência de ceruloplasmina e nos destinos do cobre (distribuição para o organismo ou excreção biliar).

Se os níveis de cobre se mantiverem dentro dos valores normais, a maior parte do cobre é incorporada na ceruloplasmina após ser transportado pela Cu^{2+} -ATPase ATP7B, que se encontra no TGN, sendo depois secretado na corrente sanguínea para posterior distribuição pelo organismo, como se pode verificar na figura 3.3 (La Fountaine *et al*, 2007; Uriu-Adams *et al* 2005).

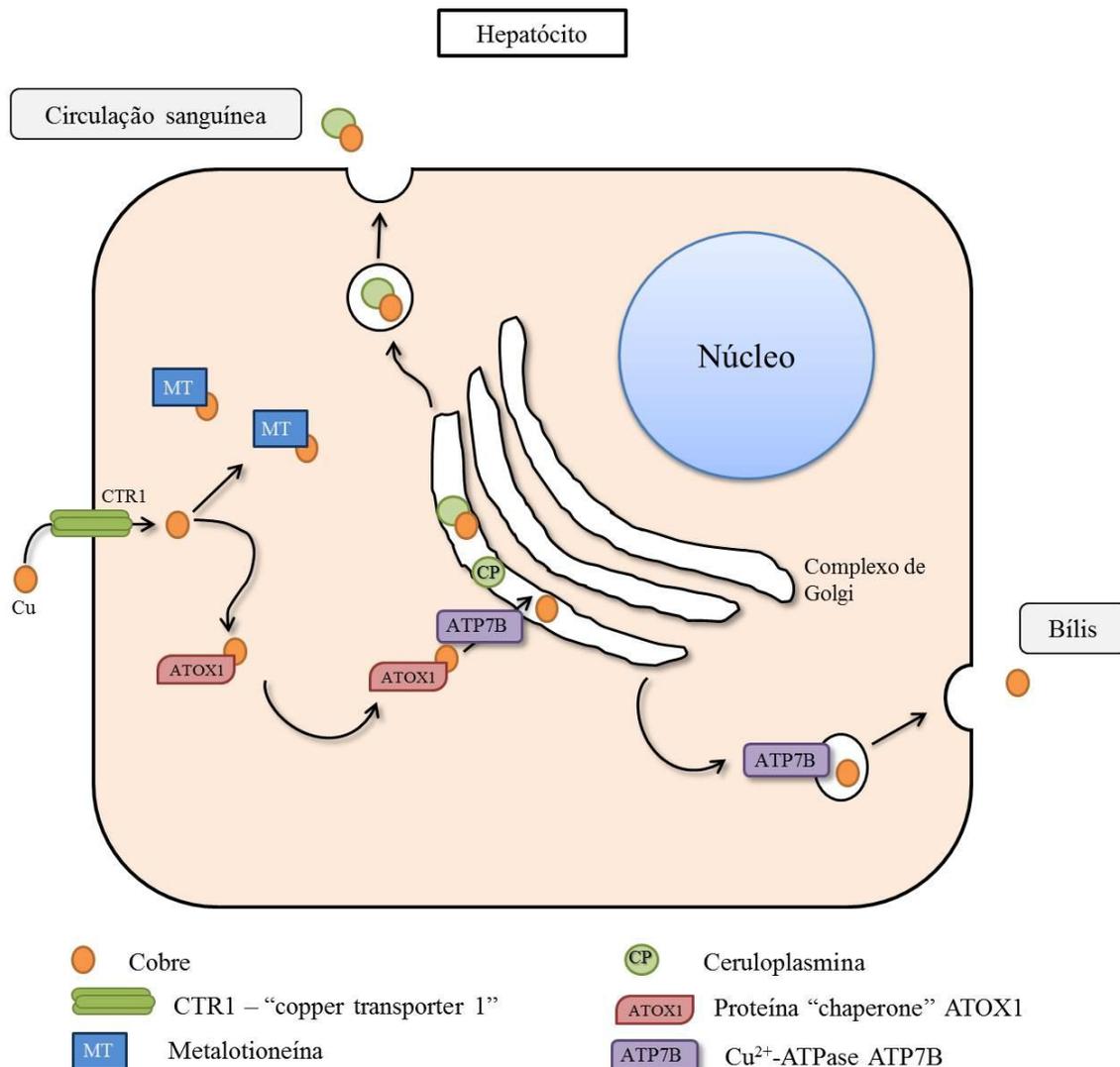


Figura 3.3 - Trajeto do cobre no hepatócito. Incorporação em MT e no ATOX1 e posterior inclusão no complexo de Golgi pela Cu²⁺-ATPase ATP7B. Incorporação de cobre na ceruloplasmina para distribuição no organismo e deslocalização da Cu²⁺-ATPase para excreção de cobre para a bília.

No caso de existir um excesso de reservas de cobre, ocorre uma deslocalização da Cu²⁺-ATPase ATP7B, semelhante à que ocorre com a Cu²⁺-ATPase ATP7A nos enterócitos, mas neste caso de forma a excretar o cobre na bília (La Fontaine *et al*, 2007; Wang *et al*, 2011), sendo esta uma das vias mais importantes de excreção do metal, pois cerca de 80% do cobre é eliminado através das fezes (Gaetke *et al*, 2003).

O mecanismo de transporte de cobre associado à hidrólise de ATP pela Cu²⁺-ATPase foi classificado como apresentado um funcionamento típico das ATPases E1/E2 (Inesi, 2011).

3.2 ATPases E1/E2

As ATPases do tipo P seguem o mecanismo clássico E1/E2 (Fig. 3.5) (Inesi, 2011). Um aspeto que caracteriza este tipo de ATPases, é o facto da enzima ser fosforilada por ATP durante o ciclo de reação, sendo por isso designadas ATPases do tipo P. Estas proteínas são componentes essenciais de mecanismos como os de sinalização, homeostase e metabolismo energético, sendo também importantes em doenças do músculo cardíaco, cancro, osteoporose, degeneração da retina, deficiência imunológica, fibrose cística, diabetes, úlcera gástrica, perda de audição, alterações na pele e desordens relacionadas com o cobre (Inesi, 2011). Entre os vários membros das ATPases do tipo P encontram-se a Ca^{2+} -ATPase, a Na^+/K^+ -ATPase, a H^+/K^+ -ATPase gástrica e a Cu^{2+} -ATPase (Toyoshima *et al*, 2004). A inibição da H^+/K^+ -ATPase pelo omeprazol, por exemplo, é uma terapia utilizada no tratamento da úlcera gástrica (Horn, 2000).

3.2.1 Ca^{2+} -ATPase

A Ca^{2+} -ATPase pode estar localizada na membrana plasmática (PCMA) e nas membranas do retículo sarco-endoplasmático (SERCA1 – “sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase1”) (Inesi, 2011).

A SERCA1, é a mais bem caracterizada das ATPases do tipo P, estruturalmente e funcionalmente (Toyoshima, 2008). É uma proteína integral da membrana, constituída por uma cadeia polipeptídica de 994 aminoácidos e participa no processo de relaxamento muscular. Transporta dois Ca^{2+} do citoplasma para o lúmen do retículo sarcoplasmático (RS) contra o gradiente de concentração, por ATP hidrolisado. Nas células musculares os iões de cálcio que estão armazenados no RS são libertados através de canais de cálcio para que se inicie o processo de contração muscular, sendo depois transportados de volta ao RS para que se dê o relaxamento. O transporte é realizado pela Ca^{2+} -ATPase por transporte ativo, isto é, consumindo energia na forma de ATP (Toyoshima *et al*, 2004).

Globalmente, a Ca^{2+} -ATPase (figura 3.4) é composta por um domínio citoplasmático e um domínio transmembranar composto por 10 hélices α (M1 – M10). As quatro hélices transmembranares M2 – M5 têm extensões citoplasmáticas longas. O domínio citoplasmático consiste, por sua vez, em três domínios: domínio A (modulação energética), N (de ligação do ATP) e P (fosforilação). A fosforilação ocorre no resíduo aspartato 351 (Toyoshima *et al*, 2004).

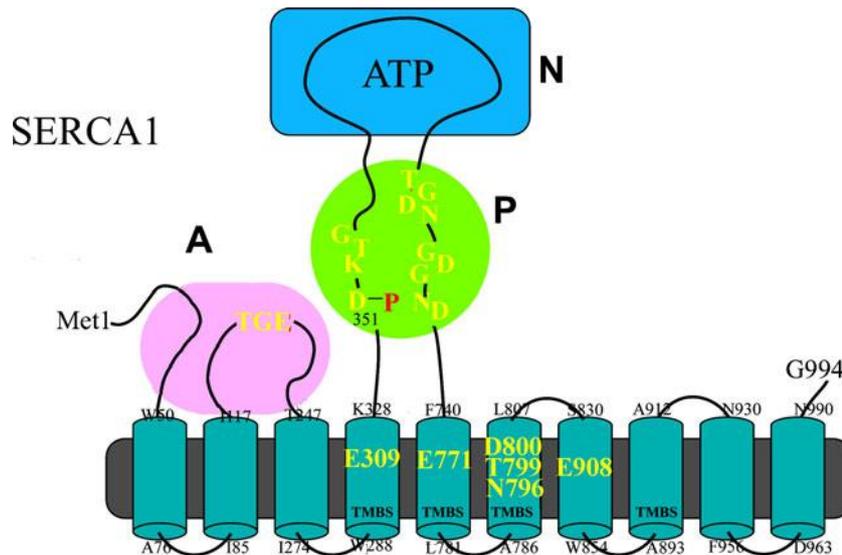


Figura 3.4 - Características estruturais da Ca^{2+} -ATPase, indicando-se os três domínios citoplasmáticos e o domínio transmembranar (Inesi, 2011).

A SERCA1 contém locais de ligação de cálcio, denominados “Transmembrane Binding Site” (TMBS), que são essenciais para a ativação da enzima e para o transporte do cálcio (Inesi, 2011). Portanto, o íon Ca^{2+} liga-se a uma zona da proteína transmembranar enquanto que o ATP se liga a uma zona citoplasmática da proteína, bem distinta da ligação de Ca^{2+} .

O mecanismo E1/E2 de hidrólise de ATP associado ao transporte de cálcio pela Ca^{2+} -ATPase foi recentemente reavaliado (Fig. 3.5) (Toyoshima *et al*, 2004; Toyoshima, 2008):

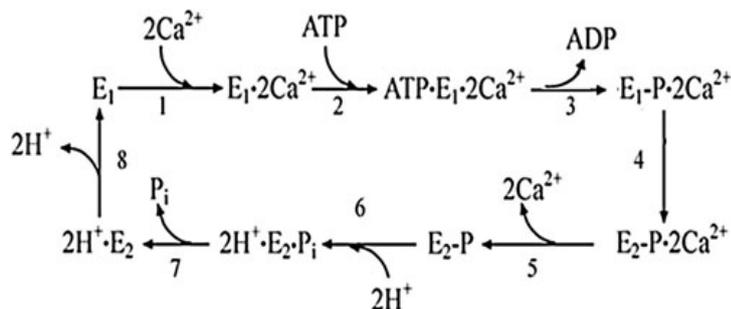


Figura 3.5 - Mecanismo de transporte de cálcio associado à hidrólise de ATP pela Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (Inesi, 2011).

De uma forma sucinta, inicialmente a enzima liga Ca^{2+} (passo 1) e ATP (passo 2), levando a uma rápida formação do intermediário fosforilado e consequente oclusão de dois Ca^{2+} , que se tornam indisponíveis para troca na superfície membranar. Seguidamente, ocorre a isomerização (passo 4) da enzima e a dissociação dos dois Ca^{2+} ligados (passo 5). Por fim dá-se a clivagem hidrolítica do fosfato (passo 7) (Inesi, 2011).

No estado E1, os locais de ligação de cálcio têm uma elevada afinidade e estão acessíveis do citoplasma, enquanto que no estado E2, os locais de ligação de cálcio já têm uma baixa afinidade e abrem para o lúmen (Toyoshima *et al*, 2004), isto é, para o espaço interior do retículo sarcoplasmático.

3.2.2 Cu^{2+} -ATPase

A função de exportação de cobre é feita pelas Cu^{2+} -ATPases do tipo-P, ATP7A e ATP7B, partilhando 60% de identidade entre elas, sendo homólogas do ponto de vista funcional (Wang *et al*, 2011).

Estas Cu^{2+} -ATPases não são semelhantes às Ca^{2+} -ATPases acima descritas. Assim, estruturalmente, a Cu^{2+} ATPase é constituída por 8 segmentos transmembranares (Fig. 3.6), por um local de ligação de cobre (TMBS), que está envolvido na ativação catalítica e no transporte de cobre, e por um domínio transmembranar, que inclui os domínios N, P e A. A Cu^{2+} -ATPase ATP7B dos mamíferos tem uma característica específica: uma extensão amino – terminal (NMBD – “N-metal binding domain”), que inclui seis locais de ligação ao cobre, em acréscimo ao TMBS. Esta extensão está envolvida em interações com proteínas vizinhas (Wang *et al*, 2011; Inesi, 2011).

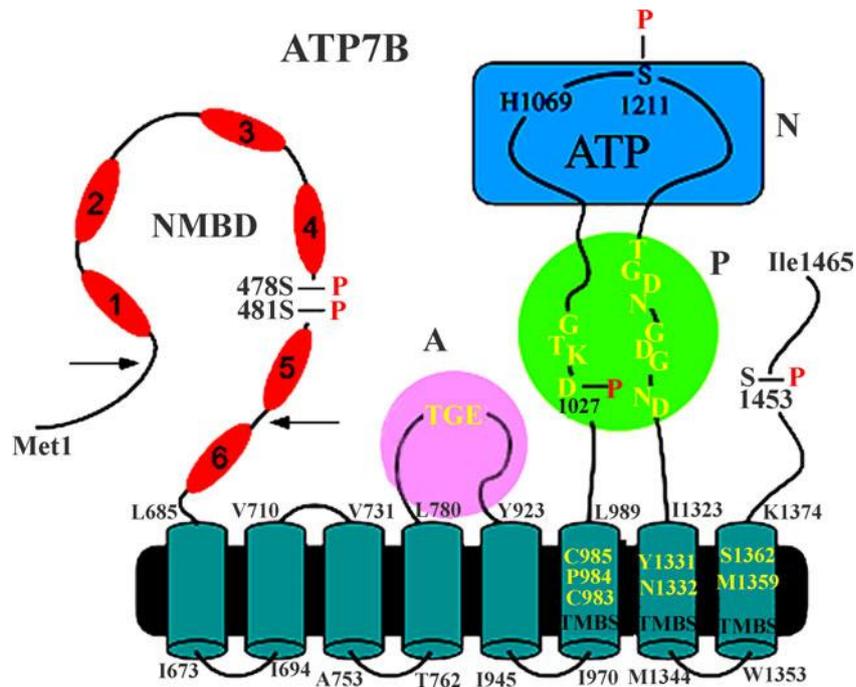


Figura 3.6 - Características estruturais da Cu^{2+} -ATPase, indicando-se os três domínios citoplasmáticos, o domínio transmembranar e a extensão amino – terminal (Inesi, 2011).

O transporte de cobre para as cuproenzimas é feito através de um processo de troca de cobre entre o domínio citosólico N-terminal das ATPases e a proteína “chaperone” ATOX1 (Wang *et al*, 2011).

As Cu^{2+} -ATPases ATP7A e ATP7B têm funções bioquímicas semelhantes, estando a ATP7A expressa na maior parte dos tecidos, exceto no fígado (La Fontaine *et al*, 2007) e a ATP7B expressa mais seletivamente no fígado, rins, placenta, células epiteliais mamárias, cérebro e olhos. A Cu^{2+} -ATPase ATP7A atua numa grande variedade de tecidos que têm papéis importantes na fisiologia do cobre, estando entre eles a absorção de cobre no intestino, o transporte de Cu^{2+} para o líquido céfalo-raquidiano e o transporte de Cu^{2+} para cuproenzimas nas membranas do complexo de Golgi (Wang *et al*, 2011).

3.3 Semelhanças e diferenças entre Ca^{2+} -ATPase e Cu^{2+} -ATPase

A nível funcional, a Ca^{2+} -ATPase e a Cu^{2+} -ATPase são semelhantes pois são ambas ATPases do tipo P, tendo um mecanismo análogo, catalítico, pela utilização de ATP (Inesi, 2011).

São diferentes do ponto de vista funcional porque enquanto a Ca^{2+} -ATPase adquire cálcio livre com maior afinidade de um lado da membrana, a Cu^{2+} -ATPase adquire cobre por troca com outras proteínas dadoras. Para além disso a Cu^{2+} -ATPase desloca-se intracelularmente para entregar o cobre a proteínas aceitadoras (Inesi, 2011).

Existem diferenças a nível estrutural, sendo que a Cu^{2+} -ATPase ATP7B possui 8 segmentos transmembranares e, por sua vez, a Ca^{2+} -ATPase SERCA1 possui 10 segmentos transmembranares. A existência dos 6 locais de ligação ao cobre na extensão amino-terminal (NMBD) da ATP7B não se verifica, de forma correspondente, na Ca^{2+} -ATPase (Wang *et al*, 2011; Inesi, 2011).

No que diz respeito ao papel que desempenham no organismo humano, as Cu^{2+} -ATPases regulam os níveis de cobre e estão relacionadas com várias doenças, destacando-se a doença de Wilson e a doença de Menkes.

Por sua vez, a Ca^{2+} -ATPase, para além de estar envolvida no processo de relaxamento muscular, está envolvida no processo de termogénese. O calor produzido varia conforme a isoforma de SERCA em questão. Por outro lado, a hormona da tiroide T_3 regula a expressão e a função destas isoformas termogénicas da SERCA. Acredita-se que a elevada termogénese encontrada no hipertiroidismo possa ser devida ao mecanismo de modulação de produção de calor pela SERCA devido à hormona T_3 (Meis *et al*, 2005). Outra patologia associada à Ca^{2+} -ATPase é a doença de Brody, caracterizada por uma falha no processo de relaxamento muscular devido à deficiência no transporte de Ca^{2+} para o RS (Benders *et al*, 2003).

4. Patologias associadas ao cobre

Existem diversas patologias associadas ao cobre. Dentro das patologias relacionadas com a deficiência em cobre, encontram-se a doença de Menkes e a “Occipital horn syndrome” (OHS). No que diz respeito a patologias associadas ao excesso de cobre, encontram-se as seguintes: doença de Wilson, Cirrose infantil Indiana, cirrose infantil endémica de Tirol (“endemic Tyrolean infantile cirrhosis” - ETIC) e também a toxicose idiopática por cobre (Bie *et al*, 2007).

4.1 Doença de Menkes e OHS

Representam doenças de carácter recessivo, ligado ao cromossoma X, tendo como principal característica uma deficiência geral em cobre. As características clínicas e os diversos sintomas resultam da disfunção de diversas enzimas dependentes de cobre. (OMIM Online Mendelian Inheritance in Man).

A doença de Menkes é causada por mutações no gene *ATP7A*, que codifica para a Cu^{2+} -ATPase *ATP7A* localizada em muitos tecidos do organismo humano. Nos enterócitos, sob condições normais, a *ATP7A* desloca-se do TGN para a membrana plasmática, de forma a excretar o cobre para a circulação, tal como foi anteriormente descrito na secção 3.1.2. Na doença de Menkes, devido a uma deficiência no funcionamento da *ATP7A*, há uma falha no transporte de cobre para a circulação hepática, resultando na acumulação de cobre na mucosa intestinal e deficiência deste nos órgãos periféricos (Lenartowicz *et al*, 2011; Crisponi *et al*, 2009; Bie *et al*, 2007).

Foram descritas duas principais formas da doença de Menkes: a forma clássica, que é a mais severa, e a OHS, uma forma mais leve ou moderada. Os principais sintomas que surgem na forma clássica da doença de Menkes são: atraso mental, cabelo anormal, defeitos nos ossos e na pele, aneurismas vasculares e doenças dos rins e trato urinário, sendo que a maioria dos pacientes morre por volta dos 3 a 5 anos. Pacientes que sofram de OHS apresentam manifestações neurológicas menos graves, sendo os principais sintomas a nível de defeitos no tecido conjuntivo e apresentam uma esperança de vida mais longa (Lenartowicz *et al*, 2011).

4.2 Doença de Wilson

Como já foi descrito nas secções 1. e 1.1, na DW há uma deficiente excreção de cobre do organismo, provocando assim a sua acumulação, inicialmente no fígado e posteriormente noutros órgãos, e causando danos a diversos níveis (danos hepáticos, neurológicos e psicológicos) (Bie *et al*, 2007).

4.3 Cirrose infantil Indiana, cirrose infantil endémica de Tirol e toxicose idiopática por cobre

Foram observadas diversas famílias com vários irmãos afetados por cirrose induzida por excesso de cobre. Neste estudo, foi sugerido que em alguns casos os fatores implicados nesta patologia poderiam não ser genéticos. Verificou-se, dentro da mesma família, que os casos de cirrose apresentavam idade de início, percurso clínico e dados de biopsias muito semelhantes, mas bastante diferentes quando comparados com outras famílias. Na Índia, a cirrose infantil Indiana afeta vários irmãos, tendo uma idade de início entre os 6 e 18 meses, sendo mais frequente em indivíduos do sexo masculino. Foi relatado ainda que a ETIC apresenta uma hereditariedade autossómica recessiva, assim como a DW (OMIM Online Mendelian Inheritance in Man).

Foram várias as investigações feitas sobre estas patologias, destacando-se entre elas as seguintes:

- Em 1982, Lefkowitz et al. descreveu o caso de 4 irmãos Americanos que faleceram entre os 4 e os 6 anos com cirrose.
- Em 1983, segundo Tanner et al., a ETIC, a cirrose infantil Indiana e a toxicose idiopática por cobre necessitavam de dietas ricas em cobre para se manifestarem. Apesar disso foi colocada a hipótese de que estas doenças seriam variações alélicas da DW.
- Já em 1996, Muller et al. descreveu 138 casos de ETIC que era indistinguível, clinicamente e patologicamente, da cirrose infantil Indiana. (OMIM Online Mendelian Inheritance in Man).

5. Toxicidade e Stress oxidativo

Muitos dos danos e manifestações clínicas da DW anteriormente descritos são resultado do stress oxidativo. Este stress oxidativo é causado pelo excesso de espécies reativas de oxigénio (ROS – “reactive oxygen species”) que surge quando há um desequilíbrio entre a sua formação e a sua eliminação por parte do sistema de defesa antioxidante do organismo (Wakamatsu *et al*, 2008).

As ROS são produzidas no processo de fosforilação oxidativa e podem provocar diversos danos como peroxidação lipídica das membranas, modificação oxidativa de proteínas e danos oxidativos no ADN. O sistema de defesa do corpo humano contém várias enzimas que vão eliminar as ROS, entre elas a dismutase do superóxido, que elimina o $O_2^{\cdot -}$ produzindo H_2O_2 que por sua vez pode ser eliminado pela glutathiona peroxidase (GSH peroxidase) ou pela catalase (Fig.5.1). Metais como o ferro, o cobre e o crómio catalisam reações de Fenton que vão também dar origem a ROS. Na reação de Fenton o ião metálico reage com H_2O_2 produzindo-se OH^- e OH^{\cdot} (Wakamatsu *et al*, 2008).

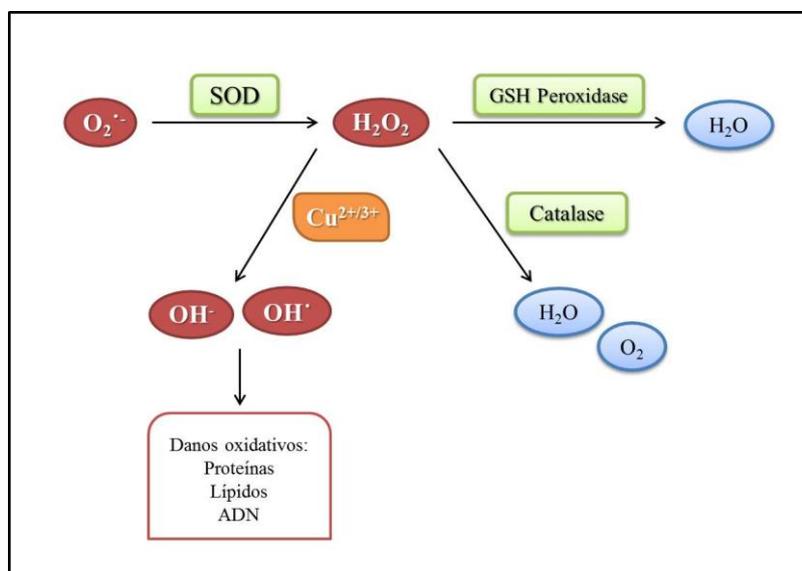


Figura 5.1 - Proteínas anti-oxidantes envolvidas no processo de eliminação de espécies reativas de oxigénio produzidas pelo Cu^{2+} (adaptado de Wakamatsu *et al*, 2008).

No caso da doença de Wilson, um excesso de cobre vai contribuir para um aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (Fig. 5.2).

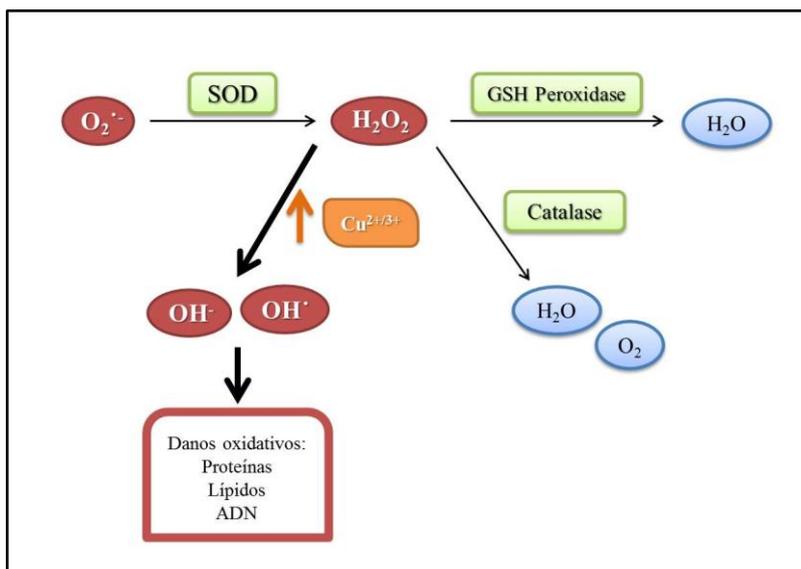


Figura 5.2 - O aumento da concentração de Cu^{2+} induz o aumento de ROS com conseqüente aumento dos danos oxidativos (adaptado de Wakamatsu *et al*, 2008).

No entanto, não é só o excesso de cobre que conduz ao stress oxidativo. Como foi visto anteriormente na secção 2, o cobre faz parte da enzima SOD, e a deficiência deste metal vai comprometer o funcionamento da enzima em questão, prejudicando assim o sistema de defesa antioxidante do organismo (figura 5.3) uma vez que a SOD tem um papel importante na diminuição da concentração da espécie $O_2^{\bullet-}$ (Gaetke *et al*, 2003; Uriu-Adams *et al*, 2005).

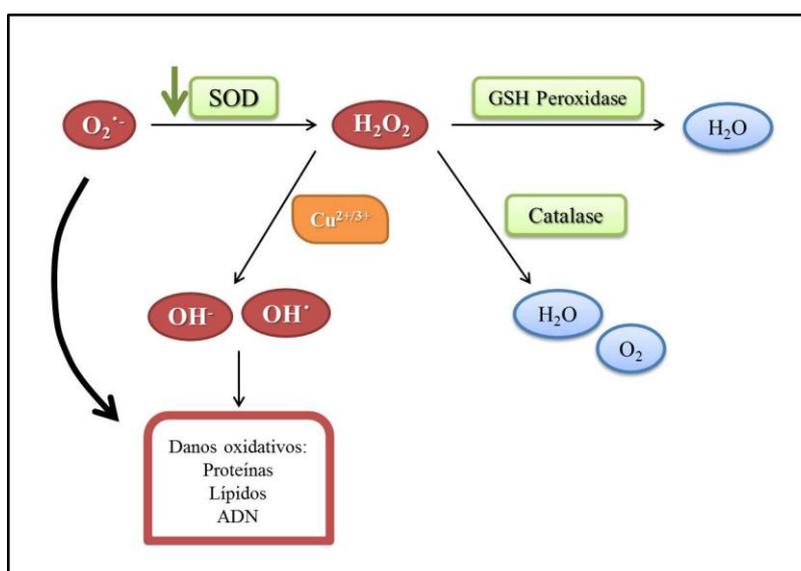


Figura 5.3 - A diminuição da ativação de SOD por deficiência de Cu^{2+} vai promover o aumento de ROS (adaptado de Wakamatsu *et al*, 2008).

Muitos destes processos podem ser prevenidos por nutrientes que possuem capacidades antioxidantes, diminuindo os efeitos provocados por ROS, destacando-se a vitamina E, vitamina C e o beta-caroteno (Gaetke *et al*, 2003).

6. Terapêutica da Doença de Wilson

A doença de Wilson era fatal, até surgirem tratamentos nos anos 50, tendo sido introduzido o primeiro tratamento em 1951 com o uso da molécula BAL (2,3-dimeercaptopropanol) que aliviou os pacientes dos sintomas neurológicos (Crisponi *et al*, 2009; Delangle *et al*, 2012). Desde a descoberta do gene responsável pela doença de Wilson, em 1993, a análise genética tem permitido aos investigadores a descoberta de várias mutações que levam à doença. Tem surgido, por isso, uma grande esperança de que tal conhecimento poderá melhorar a habilidade de prever o desenvolvimento da doença e assim, melhorar as condições dos doentes o mais cedo possível nas suas vidas (Delangle *et al*, 2012). Todos os tratamentos são sistémicos e atuam limitando a acumulação de cobre no organismo. O tratamento sugerido inclui os agentes quelantes de cobre e/ou sais de zinco, cuja principal diferença entre estes é precisamente o modo distinto de atuação do zinco através da redução de absorção intestinal de cobre e a indução de metalotioneínas. Visto que não existe tratamento curativo, estes fármacos terão de ser tomados durante toda a vida do paciente e um transplante de fígado pode ser necessário (Delangle *et al*, 2012; Ala *et al*, 2007; Weiss *et al*, 2011).

6.1 British Anti-lewisite (BAL)

Cumings sugeriu que a terapia de quelação com BAL podia ser benéfica. Este agente foi usado durante a 2ª Guerra Mundial para tratar a intoxicação por lewisite, um gás tóxico derivado de arsénio (Lorincz, 2010) e atualmente já não é utilizado no tratamento da DW.

Como já foi referido, o BAL aliviou os pacientes dos sintomas neurológicos, e atua como agente quelante de vários iões metálicos tóxicos como o arsénio, ouro, chumbo ou mercúrio. O BAL e alguns derivados são ainda usados em casos de envenenamento agudo por estes iões tóxicos. Visto que este fármaco apresenta muitos efeitos adversos, foi-se procurar por outros agentes quelantes, tendo sido a D-Penicilamina introduzida em 1956 (Delangle *et al*, 2012). Entre os principais efeitos adversos encontram-se: aumento da pressão arterial, taquicardia, náuseas, vómitos; sensação de queimadura nos lábios, boca e garganta; sensação de constrição e até de dor na garganta, peito ou mãos; blefaroespasmos (contração involuntária das pálpebras e musculatura facial), entre outros (Vilenksy *et al*, 2003).

6.2 Penicilamina

A penicilamina, considerado historicamente como o tratamento de escolha para a DW, atua por formação de complexos, melhorando a função hepática em pacientes com doença severa do fígado. Tem uma constituição semelhante à cisteína, acrescentando dois grupos metil, existindo um grupo sulfidrílo (R-SH) que atua como quelante de cobre. O tratamento tem mais efeito quando a penicilamina é tomada 1 hora antes ou 2 horas depois da refeição, pois a sua absorção pode ser de apenas 50% se for tomada em conjunto com alimentos. É recomendada a monitorização de um hemograma completo e das proteínas urinárias devido aos possíveis efeitos adversos que ocorrem em cerca de 10 a 20% dos pacientes, podendo ser graves o suficiente para levar ao abandono da terapêutica (Crisponi *et al*, 2009; Ala *et al*, 2007).

Os efeitos adversos iniciais, que surgem entre as semanas 1 e 3 do tratamento, incluem febre, erupções cutâneas, neutropenia (diminuição do número de neutrófilos – células leucocitárias), trombocitopénia (redução do número de plaquetas no sangue) e proteinúria (aumento na presença de proteínas na urina). Posteriormente pode surgir nefrotoxicidade e supressão da medula óssea, devendo ser procurado um fármaco alternativo assim que surgem os primeiros efeitos adversos. Os efeitos adversos e a deterioração neurológica inicial, detetada em cerca de 20 a 50% dos pacientes com sintomas neurológicos, têm levado à consideração de outros agentes quelantes como tratamento inicial (Ala *et al*, 2007).

6.3 Trientina

O fármaco trientina (“triethylenetetramine dihydrochloride”) foi introduzido em 1969 por Walshe como alternativa a pacientes com intolerância à penicilamina, sendo hoje em dia uma alternativa aceitável para iniciar o tratamento (Crisponi *et al*, 2009; Ala *et al*, 2007). Tem a sua ação de quelação do cobre pela formação de complexos estáveis com os quatro azotos constituintes num anel planar (Ala *et al*, 2007). A trientina tem uma fraca absorção intestinal e é um forte agente quelante do cobre (II), sendo também agente quelante do Zn (I) e do Fe (II), formando com estes, complexos de menor estabilidade do que os formados com Cu^{2+} (Crisponi *et al*, 2009). O facto de ter sido reconhecido como uma boa escolha para o tratamento inicial da doença de Wilson

provém dos poucos efeitos secundários que tem e da inferior frequência de deterioração neurológica que ocorre em relação à penicilamina. Como principal efeito adverso pode-se referir a pancitopenia (redução global dos elementos celulares do sangue) (Ala *et al*, 2007).

6.4 Zinco

Inicialmente o zinco estava a ser dado em doses relativamente elevadas a pacientes com anemia falciforme, tendo sido descoberto que deveria ser administrado longe das refeições de modo a obter uma absorção significativa, pois muitos componentes da comida ligam-se ao zinco e evitam que seja absorvido no intestino. Sabia-se, de estudos em animais, que o zinco podia provocar deficiência em cobre e podia resultar em efeitos na medula óssea. Durante o estudo com pacientes com anemia falciforme mediram-se os níveis ceruloplasmina destes e verificou-se que estavam baixos. Pensou-se então que este efeito adverso do zinco poderia ser útil na terapia da doença de Wilson (Brewer, 2009).

O cientista que conduzia a investigação da anemia falciforme era hematologista e não tinha conhecimentos aprofundados de neurologia nem hepatologia, e apesar de ter trabalhado com zinco neste estudo, não tinha qualquer experiência com o cobre. Antes de iniciado este trabalho de pesquisa, já tinha sido demonstrado em animais que o mecanismo de ação do zinco envolvia indução de metalotioneínas nas células intestinais, que ligavam o cobre proveniente da dieta e preveniam a sua distribuição pelo organismo. Os autores conseguiram demonstrar que o mesmo mecanismo era aplicável em humanos pela medição da metalotioneína em biopsias intestinais e ensaios de absorção do cobre oral durante o início da terapia com zinco (Brewer, 2009).

Apesar de o zinco competir com o cobre na entrada para os enterócitos, tem como principal efeito a tal indução de metalotioneínas nos enterócitos. Como as MT têm uma maior afinidade para com o cobre do que para com o zinco, o excesso de cobre é excretado nas fezes. A toma do zinco é normalmente feita 3 vezes por dia, preferencialmente longe das refeições e pode ser usado após a terapêutica de quelação inicial, como terapia de manutenção. (Ala *et al*, 2007; Roberts, 2011).

Por o zinco ser conhecido e estudado quando a investigação foi feita, não houve a necessidade de serem realizados estudos químicos ou de formulação, e como a suplementação de zinco era considerada segura, não foram necessários estudos detalhados de toxicidade em animais. Para além disso, foram feitos estudos da terapêutica com zinco em mulheres com doença de Wilson durante a gravidez e em crianças também com doença de Wilson que mostraram a sua eficácia e segurança (Brewer, 2009).

Em janeiro de 1997 o acetato de zinco foi então aprovado pela FDA, baseando-se nos dados do autor, para a manutenção da terapêutica da doença de Wilson, com excelente eficácia e sem efeitos adversos significantes (Brewer, 2009).

Contudo, os dados que existem são limitados quando toca a decidir quando e sob que condições o paciente pode começar a utilizar zinco como terapêutica de manutenção. Deste modo, os agentes quelantes são normalmente continuados, apesar da terapêutica com zinco ser mais apropriada (Weiss *et al*, 2011).

Num estudo realizado no Japão, 37 indivíduos receberam tratamento com acetato de zinco. Foram medidos diversos parâmetros para controlar e verificar a eficácia do tratamento. Alguns pacientes apresentavam apenas danos hepáticos enquanto que outros apresentavam danos neurológicos, verificando-se também a presença de anéis de Kayser-Fleischer em certos indivíduos. A hepatomegália inicialmente existente em 9 pacientes desapareceu, mas é um resultado que pode ter sido influenciado por tratamentos anteriores, visto que todos os participantes já se encontravam em tratamento antes de participarem neste estudo. Os sintomas hepáticos e neurológicos já existentes nos pacientes não foram agravados pelo tratamento com acetato de zinco. O desaparecimento dos anéis de Kayser-Fleischer nos 3 pacientes em questão veio demonstrar que o zinco elimina o cobre da córnea. No que diz respeito aos níveis de atividade das enzimas hepáticas, estas não sofreram nenhum aumento com este tratamento e os efeitos adversos associados foram leves, o que não levou ao abandono da terapêutica (Shimizu *et al*, 2010).

O zinco é assim o tratamento de escolha para manutenção da terapia, sendo também considerado o melhor tratamento para pacientes pré-sintomáticos, assim como pacientes grávidas ou na pediatria. No caso dos pacientes que apresentem doença hepática, o autor recomenda a combinação de trientina e zinco durante 4 a 6 meses, reduzindo apenas

para o zinco após esse período (Brewer, 2012). Os efeitos adversos não são significativos, sendo o mais frequente a irritação gastrointestinal (Roberts *et al*, 2008).

Curiosamente, em 2012, Brewer afirma que num estudo onde foram utilizados ratinhos “knock-out” de metalotioneínas, a administração de zinco continuava a bloquear a absorção de cobre, concluindo assim que o mecanismo de ação do fármaco poderá não ser o da indução de metalotioneínas (Brewer, 2012) deixando em aberto futuras investigações para esclarecer estes mecanismos.

6.5 Tetratiomolibdato (TM)

Os pacientes com incapacidades neurológicas sérias não conseguiram benefícios com o zinco, pois essas incapacidades já eram prolongadas e permanentes. Com a história destes pacientes, soube-se que tinham apenas sintomas moderados quando começaram o tratamento com penicilamina, mas que o seu estado se deteriorou gravemente em termos de condição neurológica durante as primeiras semanas de terapia e não houve recuperação. O zinco é demasiado lento a atuar, levando entre 9-12 meses a controlar a toxicidade pelo cobre, e durante esse tempo a doença pode progredir por si própria (Brewer, 2009).

Foi observado que os ruminantes que pastavam em zonas cujo solo era rico em molibdénio desenvolveram deficiência em cobre, isto porque o bolo alimentar, rico em enxofre, converte o molibdénio em diferentes tiomolibdatos, que têm uma atividade quelante de cobre em animais (Ala *et al*, 2007). O TM tinha então uso veterinário e era um excelente tratamento para salvar ovelhas do envenenamento por cobre que normalmente morriam de falha hepática (Brewer, 2009).

O TM pode ser administrado em conjunto com a refeição ou longe dela, reagindo de forma diferente nestas duas situações: se for tomado com alimentos, o TM forma complexos com o cobre proveniente da dieta e com as proteínas também presentes, prevenindo assim a absorção de cobre; por outro lado, se o TM for administrado longe das refeições é bem absorvido, formando complexos triplos com o cobre e a albumina em circulação, tornando assim o cobre indisponível para exercer a sua toxicidade. Este complexo formado em circulação é lentamente eliminado provavelmente através do metabolismo hepático (Brewer, 2012).

complexo formado em circulação é lentamente eliminado provavelmente através do metabolismo hepático (Brewer, 2012).

Foi considerado que o TM seria uma melhor escolha do que a trientina no que diz respeito a preservar a função neurológica em pacientes com esses sintomas. O TM tem também efeitos adversos, sendo um deles a anemia, que desaparece quando se suspende a toma do medicamento, podendo-se voltar à terapia com uma dose mais baixa, e o outro efeito a elevação dos níveis de transaminases, efeito este que desaparece ao fim de 2 a 3 semanas de tratamento (Ala *et al*, 2007; Brewer, 2012).

Comparando os estudos que foram feitos, chegou-se à conclusão que o TM controla o cobre livre rapidamente, chegando a níveis significativamente mais baixos em 3 a 4 semanas (Brewer, 2009).

A “Food and Drug Administration” (FDA) rejeitou a utilização do TM como terapia para a DW, preocupando-se com o aumento dos níveis das transaminases, mesmo sendo este um efeito adverso de carácter transitório. Na ausência do TM, o autor recomenda a utilização de zinco, se for tomado em conta que a penicilamina e a trientina causam um agravamento dos sintomas neurológicos (Brewer, 2012).

Assim, os fármacos descritos apresentam na sua maioria um mecanismo de ação através de terapia de quelção, exceto o zinco que bloqueia a absorção de cobre (tabela 6.1).

Tabela 6.1- Fármacos utilizados na doença de Wilson: mecanismo de ação, aplicação e efeitos adversos.

Fármaco	Mecanismo de ação	Aplicação	Efeitos adversos
BAL	Agente quelante	Sintomas neurológicos	Diversos efeitos incluindo: aumento da pressão arterial, sensação de queimadura (boca, garganta), sensação de constrição/dor no peito, entre outros.
Penicilamina	Agente quelante	Sintomas hepáticos	Febre, trombocitopenia, proteinúria, etc. Podem levar ao abandono da terapêutica Deterioração neurológica
Trientina	Agente quelante	Sintomas hepáticos Intolerantes à penicilamina	Pancitopénia Menor frequência de deterioração neurológica
Zinco	Bloqueio da distribuição de cobre no organismo	Pré-sintomáticos, grávidas e pacientes pediátricos; Terapia de manutenção	Poucos efeitos, sendo o mais frequente a irritação gastrointestinal.
Tetramolibdato	Agente quelante	Sintomas neurológicos	Anemia Elevação das transaminases

Como se pode verificar na tabela 6.1, as estratégias adotadas para eliminar o cobre são na sua maioria por sequestração. Novas abordagens passariam por atuar por exemplo no transportador CTR1, visto que este medeia o transporte de cobre para dentro da célula, evitando assim desde logo a acumulação do metal intracelularmente. Podia-se partir do facto deste transportador ter a capacidade de ser internalizado e utilizar este mecanismo para desenvolver uma técnica que não permitisse a entrada de mais cobre na célula. Outra possível abordagem seria a terapia utilizando antioxidantes, que se apresentam como potenciais agentes terapêuticos e/ou de prevenção de doenças em que o stress oxidativo se encontre envolvido. Correndo o risco destes não serem suficientes por si só, poderia ser ainda utilizada uma terapia de combinação, na qual se utilizavam antioxidantes e outros fármacos já existentes.

6.6 Medicamentos órfãos

A doença de Wilson, por ser uma doença rara, é tratada com os chamados medicamentos órfãos. Estes são designados como fármacos utilizados para diagnóstico, prevenção ou tratamento de doenças que possam colocar a vida do paciente em risco, ou de doenças raras. Na Europa, uma doença é considerada rara quando afeta menos de 1 em cada 2000 cidadãos. Estes fármacos são designados “órfãos” pois a indústria farmacêutica tem pouco interesse em desenvolver e comercializar produtos que são destinados apenas a um número reduzido de pacientes (EURORDIS. Rare Diseases Europe).

A pesquisa em medicamentos órfãos não é geralmente do interesse das companhias farmacêuticas devido à falta de potencial de lucro. Posto isto, esta área de investigação fica nas mãos dos académicos, normalmente médicos-cientistas, que têm de ultrapassar múltiplos problemas se querem fazer progressos. Estes cientistas têm de criar as condições e desempenhar as funções de uma grande companhia farmacêutica durante o desenvolvimento de um fármaco, mas normalmente só têm ajuda destas nas últimas etapas da investigação (Brewer, 2009).

Essas funções incluem síntese química, purificação, formulação, testes de toxicidade em animais, testes de eficácia em animais, preparar o fármaco para o primeiro uso em humanos, interações e aprovação por parte da FDA, fase I de testes em humanos, fase II de ensaios clínicos na doença que pode incluir ajuste de dose, estudos de farmacocinética e farmacodinâmica, e finalmente a fase III de ensaios duplamente cegos contra a melhor hipótese terapêutica (já existente) (Brewer, 2009).

Problemas, prós e contras

Os investigadores em questão não são treinados na maior parte destas áreas, e é de facto difícil para algum cientista ter experiência em todas estas áreas. Para além disso, como já foi referido, o financiamento não está geralmente disponível para muitos destes testes (Brewer, 2009).

Como aspeto positivo de grande peso, o autor refere que é recompensador desenvolver algo que ajude os pacientes. Por outro lado, os contras deste tipo de investigação são vários: há novas áreas que têm de ser aprendidas, existem barreiras como a falta de

financiamento e a possibilidade da ausência de efeitos positivos na carreira, especialmente de jovens cientistas (Brewer, 2009).

A investigação em medicamentos órfãos é extremamente importante. A terapêutica é muito personalizada pois no fim de todo o processo o médico deve ser capaz de selecionar e prescrever o tratamento que é eficaz e seguro para uma única pessoa, apesar de aquele ser talvez o único paciente com aquela doença particular que esse médico vê nesse ano ou até em toda a carreira (Brewer, 2009).

Os lucros podem ser poucos e a despesa pode ser muita, mas considerando que os medicamentos órfãos são capazes de salvar a vida ou de melhorar a qualidade desta a vários pacientes, mesmo que poucos, deveriam ser feitos esforços nesta área. Esforços estes que passariam por mais apoios e incentivos a quem investiga medicamentos órfãos. São muitos anos de investigação e nem sempre os resultados são os desejados. Felizmente, graças ao empenho de muitos profissionais, hoje em dia já existem tratamentos para doenças que em tempos nunca se pensou que poderiam ter cura ou melhoramento. O papel dos investigadores, entre eles muitos farmacêuticos, deve ser valorizado e reconhecido, pois acabam por passar despercebidos aos olhos da comunidade em geral, da qual a maior parte não faz ideia do mundo que envolve a investigação de fármacos.

Bibliografia

- Ala A., Walker A., Ashkan K., Dolley J. S., Schilsky M. L. Wilson's disease. *Lancet*. 2007; **369**: 397-408.
- Benders A. G. M., Veerkamp J.H., Oosterhof A., Jongen P. J. H., Bindels R. J. M., Smit L. M. E. *et al.* Ca²⁺ Homeostasis in Brody's Disease. *J. Clin. Invest.* 1994; **94**: 741-748.
- Bie P., Muller P., Wijmenga C., Klomp L. W. J. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet.* 2007; **44**: 673-688.
- Brewer G. J. Drug development for orphan diseases in the context of personalized medicine. *Translational Research.* 2009; **154**: 315-322.
- Brewer G. J., Metals in the causation and treatment of Wilson's disease and Alzheimer's disease, and copper lowering therapy in medicine. *Inorg. Chim. Acta.* 2012. Online em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2012.06.014>
- Bruha R., Marecek Z., Pospisilova L., Nevsimalova S., Vitek L., Martasek P. *et al.* Long-term follow-up of Wilson Disease: natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver International.* 2010; **31**: 83-91.
- Coyle P., Philcoz J. C., Carey L. C., Rofe A. M. Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 2001; **59**: 627-647.
- Crisponi G., Nurchi V., Fanni D., Gerosa C., Nemolato S., Faa G. Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. *Coordination Chemistry Reviews.* 2009; **254**: 876-889.
- Culotta V. Cell biology of copper. *J Biol Inorg Chem.* 2009; **15**: 1-2
- Delangle P., Mintz E. Chelation therapy in Wilson's disease: from D-penicillamine to the design of selective bioinspired intracellular Cu(I) chelators. *Dalton Trans.* 2012; **41**: 6359-6370.
- EURORDIS. Rare Diseases Europe. *What is an orphan drug?* <http://www.eurordis.org/content/what-orphan-drug>, acedido em outubro de 2012. Página criada em: 19/08/2009. Última atualização em: 23/03/2012.
- Fraústo da Silva J. J., Luísa da Silva J. A., 2011, Os Elementos Químicos e a Vida, Instituto Superior Técnico.
- Gaetke L. M., Chow C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003; **189**: 147-163.
- Horn J. The Proton-Pump Inhibitors: Similarities and Differences. *Clinical Therapeutics.* 2000; **22**: 266-280.
- Huster D. Wilson Disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology.* 2010; **24**: 531-539.
- Inesi G. Calcium and copper transport ATPases: analogies and diversities in transduction and signaling mechanisms. *J. Cell Commun. Signal.* 2011; **5**: 227-237.

- La Fontaine S., Mercer J. F. B. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in copper homeostasis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2007; **463**: 149-167.
- Lenartowicz M., Grzmil P., Shoukier M. *et al.* Mutation in the CPC motif-containing 6th transmembrane domain affects intracellular localization, trafficking and copper transport efficiency of ATP7A protein in mosaic mutant mice – an animal model of Menkes disease. *Metallomics*. 2011; **4**: 197-204.
- Li X., Lu Y., Ling Y., Fu Q., Zang G., Zhou F. *et al.* Clinical and molecular characterization of Wilson's disease in China: identification of 14 novel mutations. *BCM Medical Genetics*. 2011; **12**: 1-13.
- Lorincz M. T. Neurologic Wilson's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2010; **1184**: 173-187.
- Meis L., Arruda A. P., Carvalho D. P. Role of Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Thermogenesis. *Bioscience Reports*. 2005; **25**: 181-190.
- OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. <http://omim.org/entry/309400>, acessado em setembro de 2012.
- OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. <http://omim.org/entry/215600>, acessado em setembro de 2012.
- Pfeiffer R. F. Wilson's Disease. *Semin Neurol*. 2007; **27**: 123-132.
- Roberts E., Schilsky M. L. Diagnosis and Treatment of Wilson Disease: An Update. *Hepatology*. 2008; Vol. **47**, No. 6: 2089-2111.
- Roberts E. Zinc Toxicity: From "No, Never" to "Hardly Ever". *Editorials continued*. 2011; **140**: 1132-1134.
- Scharg A., Schott, J. M. Kayser – Fleischer Rings in Wilson's Disease. *New England Journal of Medicine*. 2012; **12**.
- Shimizu N., Fujiwara J., Ohnishi S., Sato M., Kodama H., Kohsaka T. *et al.* Effects of long-term zinc treatment in Japanese patients with Wilson disease: efficacy, stability, and copper metabolism. *Translational Research*. 2010; Vol. **156**, No. 6:350-357.
- Stern B. Essentiality and Toxicity in Copper Health Risk Assessment: Overview, Update and Regulatory Considerations. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2010; **73**: 114-127.
- Thirumoorthy N., Kumar KT. M., Sundar A.S., Panayappan L., Chatterjee M. Metallothionein: An overview. *World J Gastroenterol*. 2007; **13**: 993-996.
- Toyoshima C., Inesi G. Structural Basis of Ion Pumping by Ca²⁺-ATPase of the Sarcoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 2004; **73**: 269-292.
- Toyoshima C. How Ca²⁺-ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008; **1793**: 941-946.
- Uriu-Adams J. Y., Keen C. L. Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005; **26**: 268-298.

Vilenksy J. A., Redman K. British Anti-Lewisite (Dimercaprol): An Amazing History. *Ann Emer Med.* 2003; **41**: 378-383

Wakamatsu T. H., Dogru M., Tsubota K. Tearful relations : oxidative stress, inflammation an eye diseases. *Arq Bras Oftalmol.* 2008; **71**: 72-79.

Walshe J.M. Wilson's disease: the importance of measuring serum caeruloplasmin non-immunologically. *Ann Clin Biochem.* 2003; **40**: 115-121.

Walshe J. M. Serum 'free' copper in Wilson disease. *Q J Med.* 2012; **105**: 419-423.

Wang Y., Hodgkinson V., Zhu S., Weisman G. A., Petris M. J. Advances in the Understanding of Mammalian Copper Transporters. *Adv. Nutr.* 2011; **2**: 129-137.

Weiss K. H., Gotthardt D. N., Klemm D., Merle U., Ferenci-Foerster D., Schaefer M., *et al.* Zinc Monotherapy Is Not as Effective as Chelating Agents in Treatment of Wilson Disease. *Gastroenterology.* 2011; **140**: 1189-1198.