

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Farmácia**



**O papel do cobre na doença de Wilson: estratégias terapêuticas**

**Maria Teresa de Seabra Andrade Alvares Barbosa**

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2019**

**Faculdade de Farmácia**



**O papel do cobre na doença de Wilson: estratégias terapêuticas**

**Maria Teresa de Seabra Andrade Alvares Barbosa**

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientadora: Doutora Judite da Conceição Nunes Costa, Prof.<sup>a</sup> Auxiliar**

**2019**



## Resumo

O Cobre é um elemento essencial para a sobrevivência do organismo humano. É imprescindível a determinadas enzimas cuja atividade é dependente do Cobre, atuando como cofator catalítico. Uma vez que estas enzimas apresentam um papel importante em diversos processos fisiológicos, a manutenção da homeostase do Cobre torna-se crucial. Diversas fontes naturais conseguem libertar quantidades significativas de cobre na atmosfera. As dietas incluem quantidades de Cobre adequadas, por isso, qualquer desequilíbrio na quantidade ingerida pode levar a efeitos prejudiciais no organismo.

A absorção de Cobre no intestino vai ser realizada pela proteína ATP7A e pode ser influenciada por diversos fatores. Após entrar na circulação, o cobre tem capacidade para se ligar a variadas proteínas como a Albumina e a Transcupreína. A proteína ATP7B vai ser responsável pela excreção biliar de Cobre e pela sua incorporação na Ceruloplasmina para ser posteriormente libertado na circulação sanguínea. Mutações nos genes que codificam essas proteínas, levam a alterações nos níveis de Cobre no organismo. A Doença de Wilson caracteriza-se como uma doença onde ocorre uma mutação no gene ATP7B, originando uma acumulação de Cobre livre em vários órgãos, predominantemente o fígado e o cérebro.

As principais manifestações clínicas da doença são as manifestações hepáticas, neurológicas e psiquiátricas. Os anéis de Kayser-Fleischer apesar de não serem exclusivos da Doença de Wilson, são a característica clínica mais evidente.

A Doença de Wilson quando não tratada pode ser fatal, reforçando a ideia de que o diagnóstico precoce é uma ferramenta vital. O diagnóstico baseia-se essencialmente na determinação dos níveis de Ceruloplasmina e Cobre no sangue e, na presença dos anéis de Kayser-Fleischer.

O tratamento fundamenta-se na remoção do excesso de cobre com base no uso de agentes quelantes como a D-Penicilamina, a Trietilenotetramina e o Tetratiomolibdato e na inibição da absorção de cobre com o auxílio dos Sais de Zinco. A combinação dos agentes quelantes com os Sais de Zinco apresenta-se atualmente como uma terapêutica promissora.

Palavras-chave: Cobre; ATP7B; Doença de Wilson; Anéis de Kayser-Fleischer; Agentes quelantes

## **Abstract**

Copper is an essential element for the survival of the human organism. It is essential for certain enzymes whose activity is dependent on Copper, acting as a catalytic cofactor. Since these enzymes play an important role in many physiological processes, maintenance of Copper homeostasis becomes crucial. Several natural sources can release significant amounts of copper into the atmosphere. Diets include adequate amounts of copper, so any imbalance in intake can lead to detrimental effects on the body.

Copper absorption in the gut will be performed by the ATP7A protein and may be influenced by several factors. After entering the circulation, copper is able to bind to various proteins such as Albumin and Transcuprein. The ATP7B protein will be responsible for the biliary excretion of Copper and its incorporation into Ceruloplasmin for later release into the bloodstream. Mutations in the genes that encode these proteins lead to changes in copper levels in the body. Wilson's disease is characterized as a disease where a mutation in the ATP7B gene occurs, leading to an accumulation of free copper in various organs, predominantly the liver and brain.

The main clinical manifestations of the disease are hepatic, neurological and psychiatric manifestations. Kayser-Fleischer rings, although not unique to Wilson's disease, are the most obvious clinical feature.

Untreated Wilson's disease can be fatal, reinforcing the idea that early diagnosis is a vital tool. The diagnosis is based essentially on the determination of ceruloplasmin and copper levels in the blood and the presence of the Kayser-Fleischer rings.

The treatment is based on the removal of excess copper based on the use of chelating agents such as D-Penicillamine, Triethylenetetramine and Tetrathiomolybdate and inhibition of copper absorption with the aid of Zinc Salts. The combination of chelating agents with Zinc Salts is currently a promising therapy.

Keywords: Copper; ATP7B; Wilson's disease; Kayser-Fleischer rings; Chelating agents

## **Dedicatória/Agradecimentos**

Após realizar a escrita da monografia “O papel do cobre na Doença de Wilson: estratégias terapêuticas”, gostaria de agradecer à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Judite Costa, pela disponibilidade, dedicação e por todos os conselhos dados para a realização desta monografia.

Um agradecimento especial aos meus pais, pelo apoio e incentivo que me deram nos melhores e piores momentos. Por nunca me deixarem desistir, salientando todas as minhas capacidades e por todo o carinho, paciência e tempo que me dedicaram.

A toda a minha família e amigos, uma palavra de agradecimento por todo o apoio.

# Índice

1.	Introdução.....	12
2.	Materiais e Métodos .....	13
3.	Cobre .....	14
3.1.	Elemento Químico.....	14
3.2.	Fontes de cobre.....	15
3.3.	Funções biológicas .....	16
3.4.	Distribuição nos tecidos e fluidos biológicos.....	17
3.5.	Farmacocinética .....	17
3.5.1	Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção.....	18
3.6.	Toxicidade .....	24
4.	Doença de Wilson .....	27
4.1.	Manifestações clínicas.....	28
4.1.1.	Manifestações hepáticas .....	29
4.1.2.	Manifestações neurológicas .....	29
4.1.3.	Manifestações psiquiátricas.....	30
4.1.4.	Manifestações oftalmológicas .....	30
4.1.5.	Outras manifestações.....	31
4.2.	Diagnóstico.....	32
4.2.1.	Determinação da Cp sérica.....	32
4.2.2.	Determinação de cobre sérico e cobre livre .....	33
4.2.3.	Determinação da excreção de cobre na urina.....	33
4.2.4.	Lâmpada de Fenda .....	34
4.2.5.	Determinação dos níveis de cobre hepático .....	34
4.2.6.	Neuro-imagiologia .....	34
4.2.7.	Testes genéticos.....	34
4.2.8.	Biópsia do fígado .....	35
4.3.	Prognóstico.....	35
4.4.	Tratamento .....	36
4.4.1.	D-Penicilamina .....	37
4.4.2.	Trietilenotetramina (trien) .....	38
4.4.3.	Tetramolibdato (TTM).....	39
4.4.4.	Sais de zinco.....	40
4.4.5.	Outros tratamentos .....	41
4.4.6.	Transplante Hepático.....	41
4.4.7.	Terapêutica durante a gravidez .....	41

5. Conclusão ..... 43

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Absorção dietética do cobre pelos enterócitos no lúmen intestinal. Adaptada da referência (12) .....	19
<b>Figura 2:</b> Transporte do cobre no Hepatócito. Adaptada da referência (12) .....	21
<b>Figura 3:</b> Diagrama da ATP7B. Adaptada da referência (14) .....	22
<b>Figura 4:</b> Proteínas envolvidas no transporte de cobre nos diferentes órgãos. Adaptada da referência (12) .....	24
<b>Figura 5:</b> Presença de anel pigmentado na periferia corneana demonstrando um Anel de Kayser-Fleischer (28).....	31
<b>Figura 6:</b> Estrutura química dos agentes quelantes utilizados no tratamento da Doença de Wilson. Adaptada da referência (10).....	36
<b>Figura 7:</b> Reação química da quelação entre a Trietilenotetramina e o íon $\text{Cu}^{2+}$ . Adaptada da referência (8) .....	39
<b>Figura 8:</b> Reação química de quelação do Tetratiomolibdato e o íon $\text{Cu}^{2+}$ . Adaptada da referência (8) .....	40

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1:</b> Características físicas e químicas do cobre. Elaborada a partir da referência (5) ...	15
<b>Tabela 2:</b> Exemplo de cuproenzimas e respectivas funções. Adaptada da referência (7,8) .....	16
<b>Tabela 3:</b> Mutações no ATP7B comuns em diferentes populações. Adaptada da referência (20) .....	28

## Abreviaturas

Anéis de KF - Anéis de Kayser-Fleischer

ApoCp – Apoceruloplasmina

ATOX 1 – *Chaperone* antioxidante do cobre 1

ATP7A – Transportador de cobre Adenosina Trifosfatase A do tipo P

ATP7B – Transportador de cobre Adenosina Trifosfatase B do tipo P

BHE – Barreira hemato-encefálica

Ccs – *Chaperone* do cobre para a SOD1

COX – Enzima Citocromo c Oxidase

Cp – Ceruloplasmina

CTR1 – Transportadora de cobre 1

Cu<sup>+</sup>-GSH – Complexo cobre-glutationa

∂DNA - Ácido desoxirribonucleico complementar humano

DW - Doença de Wilson

Asm - Esfingomielinase Ácida

GSH - Glutationa

IAPs - Proteínas inibidoras da Apoptose

MNK - Proteínas de Menkes

MTs - Metalotioneínas

MTF-1 - Fator de transcrição da metalotioneínas

TGN - Rede trans-golgi

Trien - Trietilenotetramina

TTM - Tetratiomolibdato

RM - Ressonância Magnética

ROS - Espécies reativas de oxigénio

SOD1 - Enzima Cobre/Zinco Superóxido Dismutase

## **1. Introdução**

O cobre (Cu) é um oligoelemento essencial no organismo humano. A homeostasia deste metal é fundamental para o normal desenvolvimento. Em níveis normais, o cobre vai ter um papel crítico nas funções exercidas pelas enzimas, uma vez que estas são dependentes dele. Já o cobre em excesso, devido a uma mutação no gene ATP7B, vai levar à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), originando várias lesões que se expressam através de diferentes manifestações clínicas.

Na presente monografia, realiza-se uma revisão da literatura sobre a patologia genética associada à acumulação anormal de cobre no organismo, denominada por Doença de Wilson (DW). Serão abordados aspetos genéticos e fisiopatológicos, bem como os meios de diagnóstico e as terapêuticas mais indicadas disponíveis para cada situação em particular.

## 2. Materiais e Métodos

Para a realização da presente monografia “O papel do Cobre na Doença de Wilson: estratégias terapêuticas” foi realizada uma revisão da literatura publicada, através das bases de dados PubMed, Sciverse e do motor de busca Google e Google Scholar.

A pesquisa de artigos foi realizada utilizando as seguintes palavras-chaves: “*copper*”, “*copper homeostasis*”, “*ATP7B*”, “*copper metabolismo*”, “*Wilson’s disease*”, “*Wilson’s disease manifestations*”, “*Wilson’s disease treatment*”, “*quelation*”, entre outras.

É ainda de referir a utilização do Mendeley como organizador das referências e as normas de Vancouver para elaboração da bibliografia. Não foram feitas restrições nas datas de publicação dos artigos, contudo, foi dada prioridade às referências mais recentes. Foram consultadas referências dos próprios artigos, quando necessário.

### 3. Cobre

O cobre apresenta-se como um oligoelemento essencial para as espécies que vivem em ambientes que exigem oxigénio para a sua sobrevivência. (1) É um metal extraordinariamente ativo no que diz respeito a reações de oxidação-redução (reações redox). Permuta com facilidade entre o estado oxidado ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e o estado reduzido ( $\text{Cu}^+$ ), o que o torna num metal essencial para vários processos biológicos, mas prejudicial quando há uma desregulação na sua homeostase.(1)

Foi um dos primeiros metais a ser descoberto pelo homem o que fez com que fosse um dos primeiros a ser explorado. A produção e utilização de cobre tem vindo a aumentar nos últimos anos, promovendo maiores níveis de cobre no meio ambiente. (2)

Caracteriza-se por ser um metal com elevada maleabilidade, alta capacidade para formar ligas, baixa corrosão (3) e por apresentar elevada condutividade elétrica e térmica, o que faz com que seja um dos metais com maior relevância para a Indústria. Compostos de cobre são usados na produção de moedas, utensílios de cozinha e materiais de construção. (3,4)

Está presente em produtos como fungicidas, inseticidas e conservantes da madeira, servindo também na produção de corantes, gravuras e em pirotecnia. Acresce ainda a sua utilização variada na indústria eletrónica, no crescimento de plantas e animais, uma vez que se encontra na composição de diversos tipos de fertilizantes e alimentos para animais. O cobre também pode ter aplicação na área da medicina, onde é encontrado em alguns dispositivos contraceptivos e no uso de ligas à base de cobre em odontologia. (5)

#### 3.1. Elemento Químico

O cobre tem uma cor vermelho-acastanhada, é brilhante e opaco. (5,6) Encontra-se na natureza na forma de cuprite ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ), calcopirite ( $\text{CuFe}_2$ ) e calcocite ( $\text{CuS}_2$ ). A sua forma metálica mostra-se estável ao ar seco mas suscetível de sofrer uma reação lenta na presença de baixas condições de temperatura e de ar húmido.(6) É um metal que apresenta baixa solubilidade em água, em soluções salinas e em soluções moderadamente ácidas. Tem facilidade em ser dissolvido na presença de soluções de ácido

nítrico ou sulfúrico. Quando se encontra dissolvido, o cobre pode originar uma cor azul clara ou azul esverdeada, proporcionando um sabor amargo e metálico à água. (4)

O cobre ocupa a 29ª posição da tabela periódica, pertencendo assim à 1ª série dos metais de transição. Pode apresentar até 4 estados de oxidação,  $\text{Cu}_0$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{3+}$  no entanto, a química do cobre é dominada maioritariamente por dois desses estados de oxidação, o  $\text{Cu}^+$  e o  $\text{Cu}^{2+}$ . (1,6) Apresenta a seguinte configuração eletrónica:  $1s^2, 2s^2, 2p^6, 3s^2, 3p^6, 3d_{10}, 4p^1$  (6)

**Tabela 1:** Características físicas e químicas do cobre. Elaborada a partir da referência (5)

<b>Símbolo químico</b>	Cu
<b>Massa atómica</b>	63,54
<b>Número atómico</b>	29
<b>Densidade</b>	8,94 g/cm <sup>3</sup>
<b>Ponto de fusão</b>	1083 °C
<b>Ponto de ebulição</b>	2595 °C

A facilidade com que o cobre muda de estado de oxidação, proporciona-lhe propriedades que podem tanto ser essenciais como prejudiciais para o organismo. Uma vez que o  $\text{Cu}^+$  é rapidamente oxidado por reagentes oxidantes, o estado de oxidação que tem maior relevância é o  $\text{Cu}^{2+}$ . O  $\text{Cu}^{2+}$  coordena-se principalmente a ligandos inorgânicos como  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , a ligandos orgânicos e a grupos carboxílicos. (6)

Os equilíbrios redox dos sais de  $\text{Cu}^+$  são raros e difíceis de manter, devido à instabilidade que este ião apresenta. Esta realidade é verificada pela elevada facilidade com que o ião se desproporciona em solução aquosa, em  $\text{Cu}_0$  e  $\text{Cu}^{2+}$ . (1)

Como já foi referido, o cobre encontra-se no organismo humano, ligado a diversas macromoléculas biológicas, nas formas  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ . Enquanto que o  $\text{Cu}^+$  domina o espaço intracelular, o  $\text{Cu}^{2+}$  ocupa maioritariamente o espaço extracelular. (2)

### **3.2. Fontes de cobre**

O teor de Cu na atmosfera varia entre 5 a 20 ng Cu/m<sup>3</sup>. (3)

Os níveis de cobre no meio ambiente, resultam principalmente de operações industriais, de processos de combustão e da produção de fertilizantes. Fontes naturais como os vulcões, poeira conduzida pelo vento e incêndios florestais são também fontes de libertação de cobre para o ecossistema. (3,5) A água potável apresenta grandes variações nas concentrações de cobre que vão depender, por exemplo, do pH. (3)

É recomendado pela OMS, um consumo diário de 1,2 mg Cu/dia para as mulheres e 1,3 mg/dia para os homens. A necessidade de ingestão diária de cobre em crianças e bebês lactentes varia com a idade. Carnes como o fígado e o rim, alguns vegetais, frutos do mar, frutos secos e cereais apresentam elevados níveis de cobre. Produtos lácteos e outros tipos de carne contém baixos níveis do metal. (5) Na generalidade, as dietas englobam quantidades adequadas de Cu para prevenir, por um lado, um estado de carência e por outro lado, um estado de toxicidade. (3)

### 3.3. Funções biológicas

O cobre é um oligoelemento vital para a sobrevivência dos organismos vivos, sendo essencial na formação de mielina nos neurónios do Sistema Nervoso Central, na formação da melanina na pele, nos olhos e no cabelo. (3) Tem ainda um papel preponderante na manutenção dos ossos uma vez que participa na formação e conservação de colagénio. (7)

A química redox apresentada por este elemento, torna o cobre um cofator catalítico altamente adequado em enzimas oxidativas. (5)

**Tabela 2:** Exemplo de cuproenzimas e respetivas funções. Adaptada da referência (7,8)

<b>Enzima</b>	<b>Função</b>
<b>Citocromo c-oxidase</b>	Transporte de eletrões na cadeia respiratória mitocondrial
<b>Proteína Lisina-6-oxidase</b>	Crosslinking do colagénio e da elastina
<b>Dopamina beta- hidroxilase</b>	Produção de norepinefrina a partir da dopamina
<b>Sulfidril-Hidroxilase</b>	Crosslinking da queratina
<b>Tirosinase</b>	Formação de melanina
<b>Cu, Zn-Superóxido dismutase</b>	Defesa antioxidante: desintoxicação do radical superóxido
<b>Ceruloplasmina</b>	Ferroxidase; Transporte de cobre
<b>Aminas oxidases</b>	Oxidação de aminas primárias

Estas enzimas precisam da atividade redox do cobre para as imprescindíveis ações biológicas, envolvidas no crescimento, desenvolvimento e manutenção dos vários sistemas do nosso organismo. (9)

### **3.4. Distribuição nos tecidos e fluidos biológicos**

O cobre pode ser encontrado em pequenas quantidades numa grande variedade de células e tecidos, sendo o fígado e o cérebro a apresentarem as maiores concentrações. (9)

No sangue, o cobre encontra-se coordenado a diversas proteínas. A maior parte está ligado à Ceruloplasmina (Cp), Albumina e Transcupreína, sendo que estas duas últimas apresentam percentagens inferiores de ligação ao cobre. Percentagens ainda mais baixas de cobre estão ligadas a pequenos peptídeos e aminoácidos. (5)

O teor de cobre no plasma é de 1 mg/L e pode variar até 1,5 mg/L. Geralmente, os níveis de cobre nas mulheres apresentam-se superiores aos dos homens. Um caso interessante, prende-se com o facto de que as mulheres quando estão a tomar contraceptivos orais ou na menopausa a receber tratamento com estrogénios apresentarem níveis mais elevados.(5) A gravidez caracteriza-se como uma condição em que a concentração de cobre apresenta um aumento significativo. No cordão umbilical os níveis de cobre rondam os 400 µg/L. O teor de cobre no leite materno é mais facilmente absorvido do que o cobre presente no leite de animais, como o do leite de vaca. (5)

### **3.5. Farmacocinética**

A Homeostase do cobre é rigorosamente controlada por um sistema complexo e competente de transportadores de Cu e proteínas “*chaperone*” que estabelecem uma correta distribuição nos diferentes compartimentos e nas diversas proteínas que requerem a sua presença para realizarem as suas funções. Quando ocorre uma interrupção nestes mecanismos homeostáticos, o Cu tem tendência a acumular-se, tornando-se num potencial metal tóxico. (3)

O controle dos níveis de cobre está principalmente associado a 3 processos: Absorção, Distribuição e Excreção. (10) Estes três processos têm de ser mantidos com elevada precisão. (11)

A ligação de proteínas ao cobre diminui a probabilidade do Cu livre de participar em reações redox. O cobre quando se encontra no estado livre, está disponível para catalisar um conjunto de reações e iniciar danos oxidativos, perturbando eventos fisiológicos fundamentais. (3,9) A Homeostase pode igualmente estar comprometida por outros fatores como através da ingestão de suplementos minerais e vitamínicos bem como pela ação da glândula adrenal. Esta glândula produz diversas hormonas que promovem a produção de Ceruloplasmina no fígado, a principal proteína de ligação ao cobre. Assim, uma disfunção hepática e uma deficiência na glândula adrenal, vai facilitar a acumulação de cobre no organismo. (3)

Torna-se imprescindível, um controle rigoroso da Homeostase deste metal, fazendo com que a sua acumulação e subsequente toxicidade, sejam relativamente raras. (3)

### **3.5.1 Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção**

O fígado apresenta-se como o principal órgão envolvido na absorção, distribuição e excreção do cobre. (3) Como já houve oportunidade de salientar, a Homeostase do cobre é assegurada por um grupo de proteínas que apresentam domínios de ligação ao cobre, ricos em resíduos de cisteína, metionina ou histidina. (10)

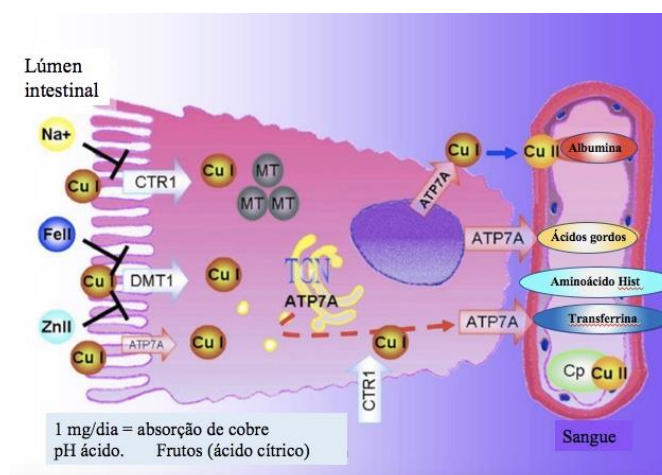
A absorção do cobre vai depender de vários fatores como a sua forma química e a presença de outros elementos na dieta que podem facilitar ou dificultar o processo. (11) O pH intestinal é considerado o fator mais relevante na absorção intestinal, facilitando a desagregação dos complexos formados nos alimentos e a posterior libertação do Cu. (12)

A Glutathione (GSH) reduzida e alguns ácidos orgânicos como o ácido cítrico e o ácido láctico, formam complexos com o cobre que são facilmente absorvidos. Por outro lado, alguns elementos como o zinco, o ferro, o cálcio e o fósforo podem afetar a sua absorção. (9)

Esta absorção vai ser executada por células que revestem o estômago e o intestino delgado. (11)  
O estômago absorve quantidades menores de Cu, contrariamente ao que acontece no intestino delgado, onde aproximadamente 50% do cobre é absorvido. (3)

Um DNA complementar humano (cDNA) codifica uma determinada proteína transportadora de cobre, a hCTR1, que vai permitir a sua difusão através da mucosa que delimita a parede intestinal. É uma proteína com elevada afinidade para o cobre, constituída por 190 aminoácidos. Apresenta na sua constituição um domínio amino-terminal rico em resíduos de metionina e histidina. Expressa-se abundantemente no fígado, coração e pâncreas. Já no que diz respeito ao intestino, apresenta níveis intermediários e manifesta-se ligeiramente no músculo e cérebro. (11)

O transporte de cobre pelo epitélio intestinal inclui a sua passagem pelo citoplasma. Esta movimentação é realizada pelas metalotioneínas (MTs), cuja síntese é influenciada pelos elevados níveis de cobre e está dependente da ligação do zinco ao fator de transcrição da metalotioneína (MTF-1). Uma vez que o Cu apresenta maior afinidade para as MTs do que o zinco, o aumento dos níveis de Cu vai proporcionar uma deslocação do zinco para se ligar ao MTF-1, aumentando assim a expressão de genes que codificam para as MTs. (5,12) Estas proteínas representam uma unidade essencial de incorporação do cobre, para impedir uma possível toxicidade induzida por este metal e assim prevenir o aparecimento de lesões oxidativas. Tornam-se no principal transportador de cobre entre o polo luminal e o polo basal do enterócito. (12)



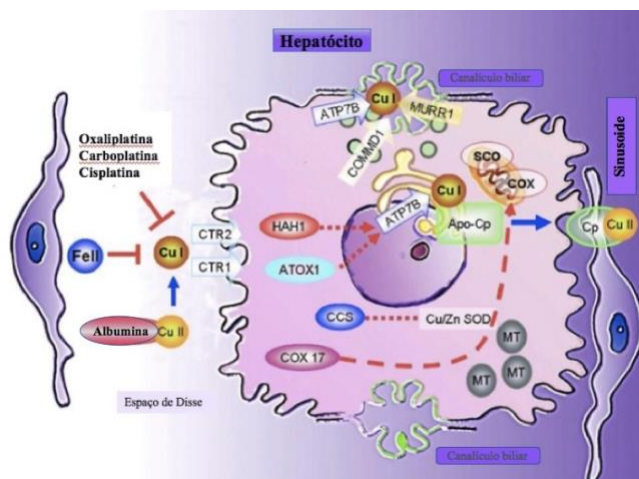
**Figura 1:** Absorção dietética do cobre pelos enterócitos no lúmen intestinal. Adaptada da referência (12)

Numa fase seguinte, o cobre entra na circulação sanguínea a partir da parede intestinal após intervenção de uma proteína, a ATP7A, também conhecida como proteína de *Menkes* (MNK). Esta proteína apresenta pouca expressão no fígado, evidenciando-se com maior perçetibilidade no músculo, rim e pulmão. (11) Na sua estrutura, exibe uma região de ligação ao ATP, uma vez que a sua ação está dependente de energia e de seis locais de ligação ao cobre, (12) que incluem o motivo de ligação, GMTCCXXC. (10,11) Uma mutação no gene que codifica esta proteína, representaria uma interrupção na absorção intestinal de cobre. (13)

Na presença de baixas concentrações de cobre a proteína MNK situa-se na rede trans-golgi (TGN), onde atua para libertar Cu para a via secretora. Um aumento nos níveis de Cu desloca o TGN para a membrana plasmática, potenciando o efluxo de Cu para proteger a célula de níveis eventualmente tóxicos. Esta deslocalização requer energia e é reversível. Na circulação, a Ceruloplasmina apresenta-se como a principal proteína que contém cobre na forma de  $\text{Cu}^{2+}$  seguida da Albumina, a proteína plasmática mais abundante e da Transcupreína. (11,12)

Um evento que precede a absorção de Cu pelos hepatócitos é a sua redução de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  por uma Redutase. (3,12) Este entra na célula do fígado, pelo hCTR1, que como já foi referido é uma proteína localizada na membrana plasmática servindo de transportador. (10) O cobre absorvido pelo fígado pode seguir três vias: ser armazenado nos hepatócitos, secretado no plasma ou excretado pela bÍlis. (9)

Dentro da célula, o Cu é distribuído em diferentes compartimentos, incluindo as mitocôndrias, o núcleo e o citosol. (14) É libertado para moléculas específicas por vias complexas e intensamente controladas. A maior fração de cobre encontra-se ligada à GSH, presente em elevadas concentrações. Este complexo  $\text{Cu}^+$ -GSH vai desempenhar um papel de veículo para distribuir cobre à família de proteínas intracelulares, as metalotioneínas. (10,13)



**Figura 2:** Transporte do cobre no Hepatócito. Adaptada da referência (12)

A transferência de Cu para as diversas “cuproenzimas” (enzimas dependentes de Cu) e a sua eliminação é realizada pelas “chaperone proteins” e pelas ATPases transportadoras de Cu. (3,12) A proteína *chaperone* Atox-1, fornece Cu às ATPases, para um direcionamento do Cu para a via secretora. A Cox-17 é uma “*chaperone protein mitochondrial*”, tem um papel crucial na função respiratória, onde fornece íons cobre à citocromo c oxidase (COX), atuando assim na distribuição de cobre nas mitocôndrias. A CCS vai ser necessária para a introdução de cobre na Cu, Zn-superóxido dismutase (SOD1), uma enzima que na ausência de Cu apresenta-se com os níveis normais, mas num estado inativo. (3,11,12)

O complexo de golgi incorpora as duas bombas de cobre, a ATP7A e ATP7B, encontradas na rede trans-golgi. (3,5) ATP7B é uma enzima essencial para a excreção biliar de Cu e incorporação deste na Ceruloplasmina para ser libertado na circulação sanguínea. (5)

Na presença de altos níveis de cobre, ocorre uma deposição de cobre na ATP7B pela Atox-1, onde de seguida é inserido na Cp. Este excesso de Cu, vai mobilizar a ATP7B do TGN para um compartimento pós-golgi, onde vai ser inserido em vesículas citosólicas, protegendo assim a célula dos níveis tóxicos. (5,14) Pode também ocorrer uma mobilização do TGN para o lisossoma, onde é excretado para a bÍlis por exocitose. (14) Baixas concentrações de Cu, fazem com que a ATP7B seja reciclada de volta à rede trans-golgi. (5)

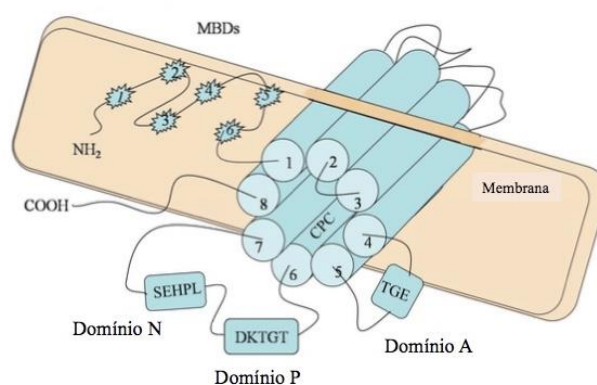
A Cp é uma proteína sintetizada principalmente no fígado e que vai coordenar 7 átomos de cobre. (11) A ATP7B vai assim mediar a biossíntese da Ceruloplasmina, incorporando o cobre na Apoceruloplasmina (ApoCp) na via secretora. A Ceruloplasmina tem um papel importante no metabolismo do ferro, em consequência de estar envolvida na oxidação do  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ . Uma

diminuição dos níveis de ferro, pode levar a anemia, uma vez que menos ferro estará disponível para a síntese de hemoglobina. (5) A ATP7B localiza-se maioritariamente no fígado, mas pode ser expressa na grande maioria dos órgãos. (14)

Todas as moléculas de ATP7B apresentam um domínio de ligação ao ATP (domínio N), um domínio de fosforilação (domínio P) e um domínio de fosfatase (domínio A). (5,14) A funcionalidade desta proteína vai ser dependente de energia. A ligação do cobre à proteína vai suscitar uma hidrólise do ATP, fornecendo energia para transportar o cobre do citosol para o lúmen. (14)

Assim como a ATP7A, a ATP7B exibe na região N-terminal 6 domínios de ligação ao cobre (MBDs), cada um exibindo um motivo de sequência repetitiva, GMXCXXC. Cys-Pro-Cys, (CPC), é um motivo de sequência, situado no sexto domínio transmembranar, preservado em todas as ATPases e é considerado um sítio de ligação ao cobre, auxiliando no seu transporte. (14)

SEHPL é um motivo único de aminoácidos, residente no domínio N. Foi demonstrada uma ligação entre a ocorrência de uma mutação no motivo SEHPL e a Doença de Wilson. O domínio P apresenta o motivo de sequência DKTGT, essencial para a fosforilação do resíduo de ácido aspártico deste mesmo motivo, fundamental para o transporte de cobre. O domínio A possui um motivo de sequência, Thr-Gly-Glu (TGE). (14)



**Figura 3:** Diagrama da ATP7B. Adaptada da referência (14)

A via de excreção pela bÍlis é a principal via de eliminação do cobre. É responsável pela maior percentagem de Cu que sai do fígado e de seguida é excretado nas fezes. Tanto a perda de Cu

pelo suor, como pela urina, representam percentagens inferiores, 50-100 mg/dia e 10-50 mg/dia respectivamente. (9)

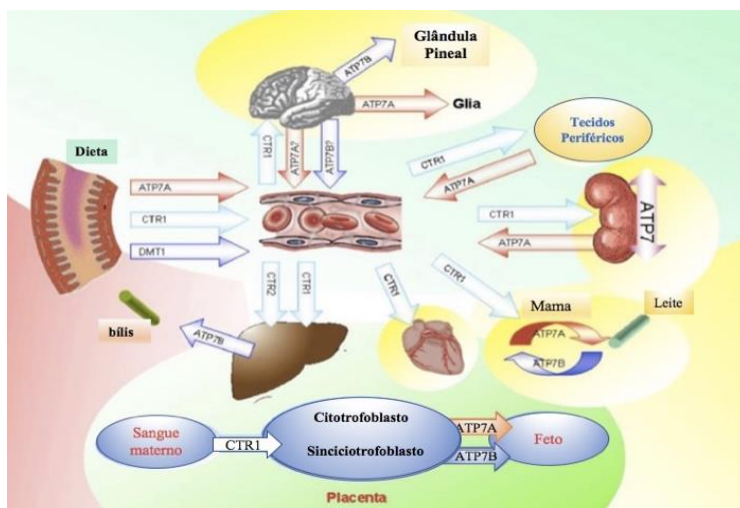
A absorção de cobre no cérebro, é controlada principalmente pela barreira hemato-encefálica (BHE). As proteínas envolvidas no transporte de cobre como a Ctr1, a Atox-1 e a ATP7A, demonstraram estar envolvidas no deslocamento de cobre através do plexo coroide. (5)

O Ctr1 é considerado o principal intermediário na absorção de cobre nos tecidos periféricos. (12) O cobre apresenta-se no cérebro como um íão livre. Algumas enzimas dependentes de cobre, importantes para a função neurológica, podem ser expressas. As metalotioneínas são encontradas nas células epiteliais do plexo coroide, servindo de armazenamento para o metal. (5)

A placenta é considerada fundamental para o transporte de cobre para o feto durante a gravidez. Caracteriza-se como um dos raros órgãos no corpo humano, que evidencia a ATP7A e ATP7B. A ATP7B mantém os níveis normais de cobre na placenta, transportando o excesso de cobre para a o sangue materno. A ATP7A vai distribuir cobre às enzimas dependentes do mesmo. Nas glândulas mamárias foram identificados três transportadores de cobre, as duas ATPases, ATP7A e ATP7B e a hCTR1. A necessidade de cobre por parte das glândulas mamárias é reforçada durante a lactação. (12)

Na retina foram localizadas as duas ATPases do cobre. A retinopatia verificada na Doença de Wilson, relacionada com a deposição anormal de cobre, pode resultar da perda de função quer da ATP7A e da ATP7B e da consequente desregulação dos níveis de cobre. (12)

O rim apresenta um papel relevante no metabolismo do cobre. A ATP7A e ATP7B localizam-se em diferentes regiões do rim, sendo fundamentais para a regulação do Cu. A ATP7A localiza-se no túbulo proximal e distal e ATP7B encontra-se na ansa de Henle. A Ctr1 expressa-se com níveis elevados no rim. (5,12)



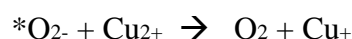
**Figura 4:** Proteínas envolvidas no transporte de cobre nos diferentes órgãos. Adaptada da referência (12)

### 3.6. Toxicidade

Relativamente, à toxicidade do cobre há que ter em consideração as alterações neurodegenerativas e os distúrbios hepáticos que dela provém. (3)

São vários os fatores implicados na sobrecarga de cobre. É exemplo disso a exposição ao Cu por acidente, fatores relacionados com o metabolismo, risco ocupacional e contaminação ambiental. Estes últimos dois podem também implicar uma exposição a outros metais e produtos químicos. (3)

Os efeitos da acumulação de Cu na Doença de Wilson, são tipicamente atribuídos a lesões causadas por radicais de oxigénio. O cobre pode sofrer reações oxidação-redução e promover assim a formação de ROS com capacidade para alterar a estrutura e/ou função de várias biomoléculas. É de realçar que a formação destas espécies é favorecida pela presença do ião superóxido ou de agentes redutores como o ácido ascórbico e a GSH que vão ter a capacidade de reduzir o  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$ , o qual é capaz de formar radicais hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) a partir do peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) através da reação de *Haber-Weiss*.(3,9)



O radical hidroxilo é o mais poderoso radical oxidante. Tem a capacidade de reagir com praticamente todas as moléculas biológicas. Vai iniciar o dano oxidativo através da formação de radicais lipídicos, quebra das cadeias de DNA e oxidação de bases. (3,9)

A reação entre dois radicais, o óxido nítrico e o superóxido, resulta na formação do Peroxinitrito. Este é um poderoso radical citotóxico com capacidade para danificar proteínas e lípidos, apresentando simultaneamente a capacidade para destruir a Ceruloplasmina levando à libertação dos iões cobre. (3,9)

Os danos peroxidativos surgem após se verificar uma acumulação de Cu. A peroxidação lipídica ocorre pela reação entre radicais lipídicos e oxigénio, originando radicais peróxidos, que podem deteriorar as células, provocando uma alteração na fluidez das membranas celulares e atacar moléculas como as proteínas. (3) Esta peroxidação lipídica é verificada nas mitocôndrias e nas membranas lisossomais dos hepatócitos. (3,9)

Nos ratos, o aumento dos níveis de cobre mostrou originar uma diminuição dos níveis de GSH e de  $\alpha$ -tocoferol, provocando uma forte presença de produtos resultantes da peroxidação lipídica mitocondrial, prejudicial à atividade da enzima citocromo c oxidase e à respiração nas mitocôndrias hepáticas. (3)

O cobre provoca uma alteração no metabolismo do colesterol, uma vez que é um ativo catalisador da oxidação das LDL, uma lipoproteína de baixa densidade. Este favorece assim a aterogénese, potenciando propriedades vasoconstritoras e pró-trombóticas. (3,9)

Uma alteração na expressão genética é igualmente verificada. O cobre vai induzir algumas proteínas como as metalotioneínas e a enzima catalase, esta última com capacidade para provocar um aumento nas concentrações de NAD<sup>+</sup> e lactato. Estes dois produtos vão ser consistentes com alterações no metabolismo anaeróbico e na expressão genética. (3,15) O cobre pode induzir apoptose, potenciando ativação da Esfingomielinase Ácida (Asm) e a libertação de Ceramida, um sinal apoptótico abundante na bicamada lipídica. Alterações neste processo de morte celular programada vão ser determinantes para a hepatotoxicidade e neurotoxicidade induzidas pelo cobre. (3)

A distribuição hepática de cobre encontra-se alterada. A incorporação de cobre nas proteínas que requerem o metal para as suas atividades, fica comprometida devido a um transporte inadequado. Este transporte desajustado, conduz a um aumento do nível de cobre no fígado, de que resulta uma saída deste para fora do fígado alcançando o sangue e outros tecidos, como o cérebro. (15) Todos estes danos, vão dificultar e limitar os sistemas antioxidantes presentes, promovendo assim o desenvolvimento de doenças como a diabetes, aterosclerose, doenças cardiovasculares e alterações neurológicas. (3)

Os complexos formados entre um metal e uma proteína desempenham várias funções na Homeostase dos metais. Esses complexos representam uma forma de reservatório temporário, auxiliando no transporte de metais essenciais e podem desempenhar um papel de desintoxicação, limitando o excesso de metal livre.(15)

## 4. Doença de Wilson

Enfatizando mais aprofundadamente a Doença de Wilson, conclui-se que é uma doença autossômica recessiva caracterizada por um erro no metabolismo do cobre. Esse erro é causado por uma mutação no gene ATP7B que é responsável por codificar a proteína transportadora de cobre. (16) Tal circunstância, origina uma acumulação do metal em vários órgãos, como o fígado, cérebro, rins e sistema esquelético, (17) provocando diversas manifestações, que podem abranger distúrbios hepáticos, neurológicos, psiquiátricos, oftálmicos e outros menos comuns. *Kinnier Wilson*, em 1912, foi o primeiro a publicar um artigo com informação detalhada dos pormenores clínicos e patológicos da DW, contudo o primeiro paciente com DW, foi apenas diagnosticado em 1968. (17,18)

A prevalência da doença em todo o mundo é de sensivelmente 1 em 30.000 habitantes. (8,14) A prevalência na China é superior em comparação com os países do Ocidente, (19) com a população europeia a apresentar uma prevalência a oscilar entre 12 e 29 por 100.000 e os países asiáticos entre 33 e 68 por 100.000. (17) Prevê-se que existam cerca de 600 casos da DW nos Estados Unidos da América (EUA) com 1% da população a ser caracterizada como portadora da doença. (18)

Como anteriormente elucidado, a DW é causada por uma mutação no gene ATP7B localizado no cromossoma 13, levando à deposição anormal de cobre. (16) Foram identificadas mais de 500 mutações (20), sendo que destas, 380 foram confirmadas como estando relacionadas com a patogénese da doença.(21) Estas mutações podem surgir em qualquer parte do gene, abrangendo exões, intrões e algumas regiões promotoras. (14) As mutações mais frequentes no gene ATP7B são as “*missense*”, porém outras podem ser frequentemente encontradas como as designadas de pequenas deleções ou inserções, mutações de substituição incluindo as “*nonsense*” e mutações apelidadas de “*splice junction*”. (18,20)

As mutações “*nonsense*” e “*frameshit*” estão associadas a um início precoce dos sintomas e a um fenótipo mais grave da doença. (12,18) A mutação H1069Q é a mais comum nos Estados Unidos da América e nos povos Europeus, estando relacionada com um início tardio dos sintomas e a um distúrbio menos severo da doença. Já a mutação R778L afeta principalmente a população Asiática. (18)

**Tabela 3:** Mutações no ATP7B comuns em diferentes populações. Adaptada da referência (20)

	Alteração nucleótido do DNA	Alteração de aminoácidos proteicos	Exão	Frequência	Outras mutações comuns
Leste Asiático	2333G→T	Arg778Leu	8	30-50%	2871delC
Europa	3207C→A	His1069Gln	14	35-45%	2299insG 1934T→G
Índia	813C→A	Cys271Stop	2	~20%	3305T→C 2975C→T
Médio Oriente	4196A→G	Gln1399Arg	21	~30%	

A enorme variabilidade no número de mutações dificultou a elaboração de uma associação entre um padrão genótipo-fenótipo perceptível e claro. (22) Algumas dúvidas ainda subsistem se a enorme variabilidade de manifestações clínicas e a idade de início dos sintomas, se encontra relacionada com as inúmeras mutações identificadas. Pacientes com a mesma mutação, demonstram elevada variabilidade na idade de início os sintomas e na apresentação das manifestações, propondo a existência e participação de outros elementos determinantes. (18)

Como já foi referido anteriormente, a presença da ATP7B defeituosa não permite a realização das suas funções corretamente, existindo uma incorporação imperfeita de cobre na Apoceruloplasmina o que origina um déficit de Ceruloplasmina. A acumulação de cobre nas células do fígado começa a intensificar-se comprometendo a função hepática, até que a capacidade deste para armazenar cobre é excedida, incentivando uma deposição anormal de cobre noutros tecidos e órgãos. (18) O aumento dos níveis de cobre nos diferentes espaços vai originar reações bioquímicas nocivas, produzindo diversos radicais livres, com competência para causar danos provocados por exemplo pelo stress oxidativo, lesando a estrutura e integridade das mitocôndrias. (12)

Alguns indícios mostram também, que na DW ocorre uma diminuição das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), induzida pela elevação do cobre, verificando-se uma intensificação da apoptose iniciada pela caspase 3 o que provoca a morte celular. (18)

#### 4.1. Manifestações clínicas

A DW é uma patologia que pode estar presente em qualquer idade e não apenas em crianças e adultos jovens. (21) Estudos demonstraram que a doença pode manifestar-se e tornar-se sintomática em qualquer faixa etária. (23)

#### **4.1.1. Manifestações hepáticas**

Na DW podem ser encontrados diferentes perfis de doença hepática. (21) As alterações hepáticas expõem-se por volta dos onze anos de idade. Embora a presença destes sintomas seja rara antes dos cinco anos de idade, sintomas hepáticos já foram diagnosticados antes dos dois anos de idade. Após os 40 anos de idade estas manifestações são raras. Os sintomas hepáticos são a manifestação clínica inicial em quase 50% das pessoas com DW. (18) Podem anteceder os sintomas neurológicos em até 10 anos e na maioria dos casos, os doentes com alterações neurológicas, apresentam um determinado nível de transformação hepática. (21) Os sintomas hepáticos podem variar desde hepatite aguda, que representa os sintomas em 25% dos doentes quando as manifestações hepáticas espelham o início da doença, a hepatite crónica, cirrose e até mesmo insuficiência hepática fulminante. (8,18) A hepatite aguda pode ser confundida com hepatite viral, mas um aumento da bilirrubina não conjugada ou a presença de uma anemia hemolítica, conduzem para uma suspeita de DW. (18) Já a cirrose manifesta-se discretamente, desenvolvendo-se ao longo da doença e é umas das manifestações mais comuns na DW, se não a mais comum. (18,24) A insuficiência hepática fulminante pode ser reconhecida em cerca de 3% dos casos de insuficiência hepática aguda. (24) Algumas enzimas hepáticas apresentam-se aumentadas, devido a um aumento reservado e assintomático do fígado e baço. (18,25) A grande maioria dos sintomas não são suficientemente específicos e encontram-se associados a diversas doenças. Algumas manifestações reveladas como a ascite, icterícia, hematémese e melena são causados pela hipertensão portal. (25)

#### **4.1.2. Manifestações neurológicas**

As alterações neurológicas apresentam-se como a manifestação de apresentação da DW em 40-50% dos casos. (18,24) A idade de expressão destes sintomas é mais avançada, contrastando com aqueles doentes que só apresentam manifestações hepáticas, dado que a idade de apresentação aproxima-se dos 18 anos, ainda que alguns casos de doentes com apenas 6 anos de idade tenham sido identificados. (18,24)

O comprometimento neurológico expressa-se de maneira muito subtil. (25) As manifestações são intervaladas, pouco consistentes e desenvolvem-se precipitadamente. Tornam-se difíceis de classificar, visto que um doente expõe mais do que uma alteração com diferentes graus de expressividade. Estes desequilíbrios neurológicos dividem-se em Síndrome acinética-rígida semelhante à doença de Parkinson, Pseudoesclerose dominada por tremores, Ataxia, Síndrome Distónica. (21) O tremor é a alteração neurológica mais frequente na DW. Categoriza-se em três tipos: Tremor de repouso, postural e cinético. Quando o tremor atinge os membros superiores, assemelha-se a um “bater de asas”, denominando-se como tal. (18) A disartria, representa um sinal das irregularidades motoras que abrangem a região craniana e são extraordinariamente comuns. (21) A distonia, identificada em cerca de 40% dos casos, compreende a língua, face e faringe, produzindo salivação excessiva e alterações na expressão facial. (18) Também foram observadas alterações na fala e perturbações na marcha. (18,21) Cefaleias e convulsões podem surgir como o sintoma neurológico inicial em 10% dos doentes. (18) Muitos dos sintomas neurológicos podem ser atribuídos a fármacos antipsicóticos, prescritos para uma determinada condição psicológica. (25)

#### **4.1.3. Manifestações psiquiátricas**

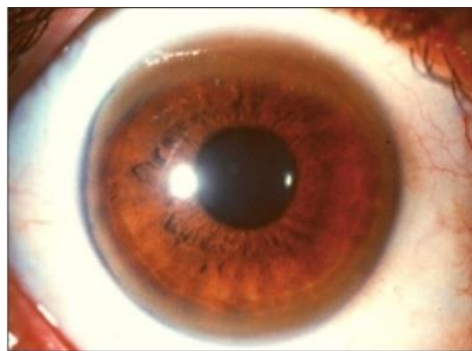
Às principais características da DW podem-se incluir os distúrbios psiquiátricos. Aproximadamente 1/3 dos doentes apresenta alterações psiquiátricas antes de exibir outros sintomas neurológicos ou hepáticos. (21) Assim como nos sintomas neurológicos, o diagnóstico é desafiante. As manifestações psiquiátricas são pouco específicas e podem incluir episódios de depressão ou até mesmo episódios psicóticos agudos. (26,27) Esta inespecificidade das características psiquiátricas, adverte para que a DW não seja completamente excluída nos jovens que apresentam disfunções psiquiátricas. (18) A manifestação psiquiátrica mais recorrente na DW é a alteração de humor, o que engloba as alterações comportamentais e as alterações de personalidade. Agressividade e comportamento anti-social são alguns dos distúrbios relacionados com a mudança de comportamento. (26) Foi relatado que 16% dos pacientes com episódios de depressão, apresentaram tentativas de suicídio. (18)

#### **4.1.4. Manifestações oftalmológicas**

Os anéis de *Kayser-Fleischer* (KF) foram relatados previamente à descrição da Doença de Wilson por *Kayser* e *Fleischer* numa publicação em 1912. (18) A sua presença representa a

principal característica clínica da DW, exibindo-se em 95% dos pacientes com sintomas neurológicos. (21) Relevante será dizer que estes anéis não são exclusivos da DW, uma vez que já foram identificados em pacientes com outras doenças, principalmente em doenças hepato-biliares, onde uma deposição de cobre excessiva também pode ser documentada. (21,28) Estes anéis exibem-se como alterações pigmentadas, formadas a partir da deposição de grânulos de cobre na córnea do olho. Contudo, os grânulos só se formam na membrana de Descemet. (18,28) Os grânulos formados apresentam diferentes formas e tamanhos e estão relacionados com o tempo de evolução da doença. Dividem-se em quatro estágios, conforme o grau de comprometimento da córnea: 0- sem anel corneano identificável, 1- presença de anel apenas no polo superior, 2- presença de anel no polo superior e inferior e 3- anel por toda a área da córnea. (28)

Estes anéis expõem-se de modo bilateral e simétrico, mas casos em que os anéis se apresentavam unilateralmente já foram relatados. Curiosamente, o nome que lhes foi atribuído, refere-se à cor “dourada-acastanhada” que os caracteriza após formação dos complexos. (18,28)



**Figura 5:** Presença de anel pigmentado na periferia corneana demonstrando um Anel de Kayser-Fleischer (28)

Outra manifestação viável de acontecer na DW são as Cataratas em girassol. Tal característica manifesta-se em apenas 17% dos doentes com DW e consiste num anel na região pupilar do cristalino que adquire uma forma e cor semelhante às pétalas de um girassol. A sua formação é causada pelo depósito de cobre no cristalino. (18,28)

#### **4.1.5. Outras manifestações**

Para além do fígado e do cérebro, o cobre em níveis elevados e tóxicos tem a capacidade de se movimentar para diferentes regiões do corpo e provocar assim danos que originam diversos sintomas. A anemia hemolítica pode apresentar-se como manifestação inicial da DW em até 15% dos casos. (18) Diversos pacientes já foram diagnosticados com picos de hemólise ao

mesmo tempo que apresentavam níveis elevados de cobre, levantando suspeitas de que após ocorrer acumulação do cobre, este é suficientemente eficaz para se movimentar até à corrente sanguínea e exercer um dano oxidativo nos eritrócitos, diminuindo o seu tempo de vida. (29) Apesar de serem manifestações pouco reconhecidas em casos de DW, comprometimentos ósseos e articulares podem vir a desenrolar-se, com a osteoporose a representar a manifestação mais comum. Na presença desta patologia, os pacientes expressam uma densidade mineral óssea inferior ao normal, ficando assim sujeitos a sofrer mais fraturas espontâneas. (18,30) No que diz respeito a alterações da pele, alguma hiperpigmentação pode ser visível em determinada zona da perna. Desequilíbrios na menstruação, presença de ginecomastia, atraso no início da puberdade e o aparecimento de algumas intolerâncias podem ser igualmente identificadas na DW. (18)

## **4.2. Diagnóstico**

O Diagnóstico da DW baseia-se nas características clínicas, nos parâmetros bioquímicos, na presença do já referenciado, anel de *Kayser-Fleischer* e num sistema de pontuação estabelecido recentemente para o diagnóstico. (25)

As orientações para o diagnóstico foram aprovadas pela Associação Americana para o estudo das doenças hepáticas (AASLD) em 2008. (8) Um sistema de pontuação criado numa conferência em Leipzig para auxiliar no diagnóstico da DW, dividiu os pacientes em 3 categorias: aqueles onde outro diagnóstico deve ser considerado, aqueles onde testes de diagnóstico adicionais são necessários e por fim aqueles em que a DW está provavelmente presente. (31) Os níveis séricos de cobre e Cp, as elevadas concentrações de cobre no fígado e a excreção de cobre na urina são algumas das referências que vão ajudar no diagnóstico da doença. As manifestações clínicas da DW são de carácter variável e pouco exclusivas, o que torna o diagnóstico precoce um desafio. O tempo entre o início dos sintomas e o diagnóstico pode ser de 6 meses para os pacientes que apresentam sintomas hepáticos e 18 meses para aqueles com sintomas neurológicos. (8)

### **4.2.1. Determinação da Cp sérica**

Como foi referido anteriormente, a Cp é uma proteína transportadora de cobre que tem a capacidade para coordenar 6 átomos de cobre, intitulando-se de Holoceruloplasmina. (22) Em pessoas isentas da doença, os níveis apresentam-se baixos nos primeiros meses de vida, evoluindo para valores mais altos nos anos de infância antes de apresentarem uma nova diminuição dos valores na fase adulta. A Cp é descrita como um reagente de fase aguda que apresenta uma propriedade de óxido nítrico oxidase dependente de cobre, cujos níveis podem ser medidos por métodos enzimáticos mediante a sua atividade em relação a determinados substratos. Ensaio imunológico também podem ser utilizados, como o radioimunoensaio e a imunodifusão radial. (22) Em doentes que manifestam sintomas neurológicos, os níveis de Cp costumam estar 5 a 15% abaixo da faixa normal. Já nos que apresentam doença hepática, os níveis de Cp podem apresentar-se numa faixa normal. (21,22)

Uma diminuição da Cp no sangue levanta suspeitas de DW, mas não é suficiente por si só. Na grande maioria dos casos é usada em conjunto com outras análises visto que também pode apresentar níveis reduzidos em outras patologias, como síndromes de má absorção ou presença de doença hepática terminal e níveis aumentados numa inflamação aguda e em estados onde há uma estimulação da produção de estrogénios como na gravidez e na suplementação de estrogénio. (22)

#### **4.2.2. Determinação de cobre sérico e cobre livre**

Os níveis séricos de cobre que traduzem o cobre sérico total, isto é, o ligado e o não ligado à Cp não representam grande valor para o diagnóstico. O cobre que se encontra ligado à Cp representa 90% do cobre total no sangue. Sendo assim, uma diminuição dos níveis de Cp pressupõe uma redução desse cobre. Já níveis aumentados de cobre apesar da diminuição de Cp, retratam o cobre livre ou não ligado à Cp e estes sim, apresentam valores elevados na DW. (18,22)

#### **4.2.3. Determinação da excreção de cobre na urina**

A medição do cobre urinário de 24 horas é um parâmetro útil para o diagnóstico da doença e monitorização do tratamento instituído. Os níveis de cobre na urina em pacientes com DW ultrapassam os 100 µg/dia. Os portadores heterozigóticos da Doença de Wilson podem ter níveis ligeiramente elevados, mas nunca acima dos 100 µg /dia. No entanto, a excreção de cobre

urinária pode sobrepor-se a outras doenças como a hepatite autoimune, a insuficiência hepática aguda e a doença hepática crônica. (18,22)

#### **4.2.4. Lâmpada de Fenda**

A presença de anéis de KF em doentes com DW é uma ferramenta fulcral para o diagnóstico, visto que, os anéis estão inquestionavelmente presentes em todos os doentes com manifestações neurológicas e psiquiátricas. Contudo, a ausência destes anéis já foi referida em pacientes com sintomas neuropsiquiátricos na DW. (18) A detecção destes anéis é realizada usando uma lâmpada de fenda e requer vasta experiência do oftalmologista. (17,18) Este exame também pode detetar as cataratas em girassol, resultantes do depósito de cobre no cristalino. (32)

#### **4.2.5. Determinação dos níveis de cobre hepático**

A determinação de cobre no fígado por meio de biópsia hepática, é considerada um dos poucos ou até mesmo o único teste que distingue e caracteriza com precisão a Doença de Wilson de outras doenças hepáticas. A concentração de cobre encontra-se elevada na generalidade dos indivíduos com DW. A avaliação é beneficiada com um tamanho de amostra de pelo menos 1 cm de comprimento. Uma medição de cobre hepático superior a 250 µg/g de peso seco, constitui um claro diagnóstico para a Doença de Wilson. Já uma concentração inferior a 50 µg/g de peso seco, é útil para excluir qualquer suspeita de DW. Em pacientes com sintomas neurológicos e psiquiátricos, este método não é habitualmente usado uma vez que outros exames permitem o diagnóstico, estando assim reservado para situações onde esses mesmos exames não tenham fornecido um diagnóstico conclusivo. (18,22)

#### **4.2.6. Neuro-imagiologia**

A introdução da ressonância magnética (RM) como exame complementar no diagnóstico à DW, permitiu estabelecer e compreender as relações patológicas e anatómicas das manifestações da doença. (17) Cerca de 100% dos indivíduos com sintomas neurológicos na DW, evidenciaram alterações atípicas na RM. (18) A RM pode auxiliar no diagnóstico, prognóstico e monitorização da terapia aplicada na doença. (17)

#### **4.2.7. Testes genéticos**

Os testes genéticos, são testes que detetam mutações no gene ATP7B. Apesar destes testes serem limitados e insuficientes para sentenciar um diagnóstico conclusivo, uma vez que existem mais de 500 mutações no gene ATP7B e a grande maioria dos pacientes apresentar duas mutações diferentes (21,22), estes tornaram-se cada vez mais úteis no diagnóstico da doença, devido à constante evolução das técnicas utilizadas. (20) Os testes genéticos apenas conseguem confirmar o diagnóstico de DW se as duas mutações responsáveis pela doença forem identificadas. (32) Quando um caso de DW é detetado, os familiares de primeiro grau devem realizar diversos exames de diagnóstico, incluindo a determinação sérica de cobre e de Ceruloplasmina, testes de função hepática, o exame de lâmpada de fenda e a análise urinária de cobre. Em determinados casos, uma biópsia ao fígado pode tornar-se útil para determinar o teor de cobre presente. A probabilidade de detetar irmãos homozigóticos não ultrapassa os 25%. (22)

#### **4.2.8. Biópsia do fígado**

A biópsia hepática pode ser um complemento útil no diagnóstico da DW nos casos em que tanto os sinais clínicos como os testes não invasivos não foram conclusivos. As alterações histológicas do fígado numa fase inicial incluem esteatose leve, núcleos glicogenados nos hepatócitos e necrose hepatocelular focal. Já numa fase mais tardia, a distribuição inapropriada de cobre no fígado pode levar a uma subestimação. (21,22)

### **4.3. Prognóstico**

A DW quando não convenientemente tratada apresenta um desfecho fatal, (25) reforçando a ideia de que um diagnóstico prévio e um tratamento adequado e imediato são pontos fulcrais nesta doença. (22) Pacientes diagnosticados com DW, necessitam de intervenção terapêutica para toda a vida, uma vez que a suspensão da mesma pode levar à morte num curto espaço de tempo. (25,27)

Um prognóstico concreto e justificável vai depender da gravidade das complicações decorrentes da doença hepática, dos problemas neurológicos que vão progredindo ao longo do tempo e da adesão à terapêutica. (21,25)

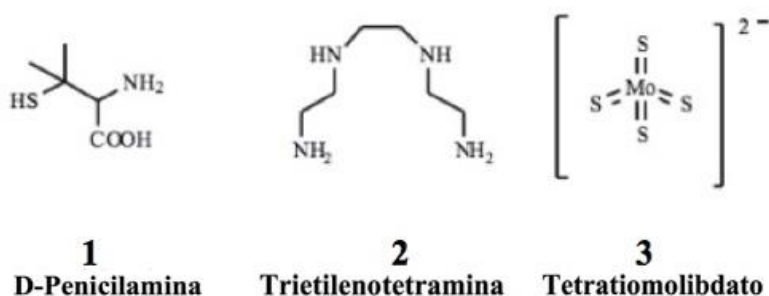
Doentes que apresentam sintomas neurológicos, apresentam um prognóstico mais favorável, principalmente nos casos onde há doença hepática limitada. No entanto, estas manifestações

nerológicas são parcialmente reversíveis, podendo até piorar após o início do tratamento. Foi desenvolvido um sistema de pontuação para o prognóstico da DW, modificado posteriormente por *Dhawan et al*, de acordo com o qual uma pontuação superior a 11 requer indiscutivelmente que seja efetuado um transplante hepático (21)

#### 4.4. Tratamento

O grande objetivo terapêutico na DW é remover o excesso de cobre do organismo e assim produzir um balanço negativo de cobre, impedindo a sua acumulação. A terapêutica estabelecida vai depender de diversos fatores tais como a gravidade dos sintomas, a possibilidade de gravidez e se estamos na presença de manifestações hepáticas ou neurológicas. (8)

O uso de agentes quelantes para eliminar o excesso de metal livre presente no cérebro ou noutras áreas do corpo, está a ganhar cada vez mais preponderância e a caracterizar-se como uma terapêutica promissora. (33) A D-Penicilamina, Trietilenotetramina (trien), Tetratiomolibdato de Amónio (TTM) incluem-se nos medicamentos disponíveis para esta terapêutica. Outra estratégia baseia-se na redução da absorção de cobre através do uso de Sais de Zinco (22)



**Figura 6:** Estrutura química dos agentes quelantes utilizados no tratamento da Doença de Wilson. Adaptada da referência (10)

A monitorização da terapêutica, realizada através da medição dos níveis de cobre sérico livre e da sua excreção na urina, (25) é um ponto chave para confirmar melhorias clínicas ou uma possível não-adesão da terapêutica pelo doente. (22)

#### 4.4.1. D-Penicilamina

A D-Penicilamina foi introduzida por *Walshe* e afirma-se como a terapia padrão para o tratamento da DW. (34) É um produto da degradação da Penicilina apresentando um grupo sulfidrilo livre. A D-Penicilamina também tem capacidade para promover a síntese de MT, favorecendo assim a captação de cobre livre. (22) A dose recomendada tanto para adultos como para crianças é de 250 mg quatro vezes por dia. Uma vez que a absorção da D-Penicilamina é reduzida na presença de alimentos, é aconselhável que a toma desta seja feita 30 minutos antes ou 2 horas após as refeições. (34) O principal objetivo da terapêutica com D-Penicilamina é aumentar a excreção urinária de cobre e a monitorização deste tratamento deve ser feita continuamente para avaliar os efeitos colaterais. Nos primeiros meses o paciente deve ser monitorizado semanalmente. Se nenhuma complicação for detetada nos primeiros 2 ou 3 meses, o acompanhamento pode passar a ser realizado mensalmente no primeiro ano e a cada 3 meses nos anos seguintes. (34) Parâmetros bioquímicos, hematológicos e urinários incluem-se no grupo das referências que requerem monitorização durante o tratamento. (25,34) Em pacientes com sintomas hepáticos, uma melhoria clínica do doente é verificada nos primeiros 2 a 6 meses. A interrupção da terapia pode levar a um desenvolvimento significativo da doença hepática. (21)

Pacientes com sintomas neurológicos, apresentam um desenvolvimento positivo dos sintomas mais lento, podendo ser apenas reconhecido três anos após o início da terapêutica. (21) Estes pacientes podem apresentar diferentes respostas ao tratamento. Um dos casos é o doente apresentar uma melhoria significativa nos primeiros meses e permanecer apenas com algumas limitações neurológicas leves. Outro caso, é o doente não alterar com relevância o seu perfil clínico, apresentando melhorias em alguns sintomas. Num último caso, os sintomas neurológicos do paciente pioram após instituição da terapia com Penicilamina, traduzindo-se uma síndrome de agravamento neurológico, já referenciada há algum tempo mas que apenas alertou os especialistas recentemente. (34) Algumas hipóteses para reverter este agravamento neurológico passam pela suspensão total da terapêutica, a sua reintrodução em doses menores às habituais e uma monitorização constante do cobre na urina. (25,34) O grande objetivo da manutenção a longo prazo da terapia com D-Penicilamina é impedir que haja uma elevação do cobre no organismo, um controlo rigoroso em relação à toxicidade do cobre e à recorrência dos sintomas. Torna-se imprescindível atingir um balanço dos níveis de cobre e monitorizar o seu metabolismo. O balanço do cobre deve ser efetuado através de uma análise do cobre nas fezes

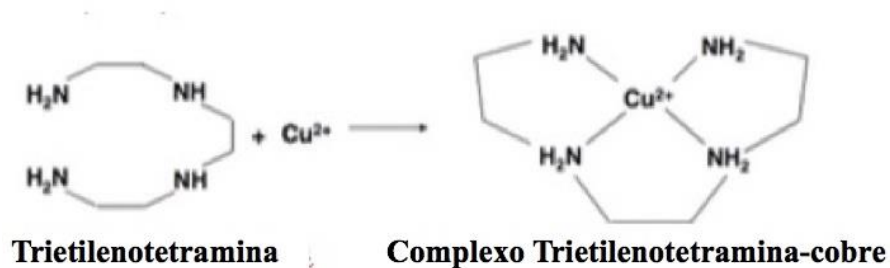
e na urina. (34) Os efeitos adversos da D-Penicilamina encontram-se em quase 20% dos pacientes e podem ocorrer tanto no início do tratamento como numa fase final. A D-Penicilamina está associada a muitos efeitos secundários como febre, defeitos na pele como erupção cutânea e complicações articulares, fazendo com que o testemunho do doente sobre todos os sintomas que eventualmente tenha sentido se torne num pormenor relevante. (8,34) As reações de hipersensibilidade podem ser revertidas pela utilização de uma terapêutica alternativa como a Trietilenotetramina ou os Sais de Zinco, interrupção da terapêutica até que a reação hipersensível desapareça e o restabelecimento da terapêutica com doses mais baixas, com aumento gradual da dose por um período de tempo longo. (25,34) Algumas reações manifestam-se tardiamente como a nefrotoxicidade, revelada pela presença de proteínas na urina, síndrome semelhante ao lúpus e síndrome de *Goodpasture*. Nestes casos a suspensão da Penicilamina é vital. (21)

#### **4.4.2. Trietilenotetramina (trien)**

A terapia com o agente quelante Trietilenotetramina na DW foi aprovada em 1986. (34) A trien atua igualmente no aumento da excreção urinária de cobre e foi explorada como uma terapia alternativa à Penicilamina. (13) Pequenas quantidades de ferro e zinco podem ser excretadas juntamente com a trien, apesar de em menor quantidade. (8)

A dose inicial recomendada em adultos é de 1,0 g/dia em doses divididas, já em crianças com menos de 10 anos de idade, a dose aconselhável é de 0,5 g/dia igualmente em doses repartidas e com um espaçamento entre a toma e as refeições. (34)

Algumas das reações adversas verificadas na terapêutica com Penicilamina são igualmente verificadas com a trien, tal como o lúpus eritematoso sistémico ou a elastose perforante, (25) mesmo assim, é considerada menos tóxica e igualmente eficaz, razões que fazem com que seja a terapia escolhida em pacientes intolerantes à D-Penicilamina e com um quadro de sintomas neurológicos agravados. (8,22)



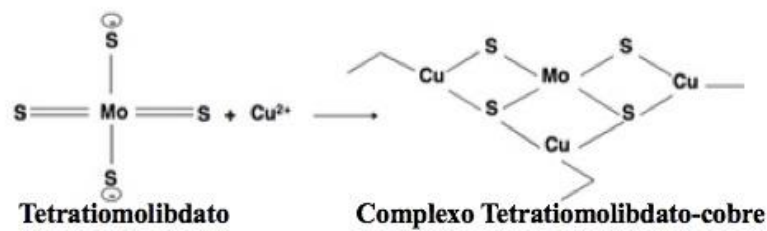
**Figura 7:** Reação química da quelação entre a Trietilenotetramina e o íon  $\text{Cu}^{2+}$ . Adaptada da referência (8)

#### 4.4.3. Tetratiomolibdato (TTM)

O Tetratiomolibdato é um fármaco desenvolvido nomeadamente para doentes com DW neurológica e apresenta um mecanismo de ação particular. (8) Foi testado pela primeira vez na DW em 1984. (18) O TTM tem um duplo mecanismo de ação. Quando administrado com os alimentos, o TTM forma um complexo com o cobre e com uma proteína, mais precisamente a albumina, impedindo a sua absorção no trato gastrointestinal. Se for administrado entre as refeições, é facilmente absorvido na corrente sanguínea e complexa com o cobre sérico livre, impedindo-o assim de estar disponível para exercer a sua toxicidade a nível celular. (8,22) Em virtude deste duplo carácter, a dose de 20 mg recomendada é administrada seis vezes por dia, três vezes durante as refeições e as restantes três, entre as refeições. (18) A sua utilização tem sido defendida devido ao seu perfil tóxico ser relativamente baixo. (25) Pressupõe-se que, ao contrário do que acontece na terapêutica com a Penicilamina e a trien, em que um pico nos níveis de cobre pode ser observado após o início do tratamento, levando assim ao agravamento dos sintomas neurológicos, no tratamento com o TTM esse máximo não é observado, razão pela qual a degeneração neurológica não é tão acentuada, sendo apenas verificada em 4% dos pacientes. (8,18) Apesar de apresentar um perfil tóxico inferior em relação aos outros agentes quelantes, não está isento de originar algumas reações adversas. Entre elas incluem-se, uma supressão da medula óssea, já que esta exige a presença de um determinado nível de cobre para a proliferação celular, o aumento das enzimas hepáticas, como as aminotransferases, devido à mobilização de cobre do fígado e uma potencial disfunção neurológica resultante de uma redução excessiva de cobre. (21,33)

A finalidade da terapêutica com TTM não se identifica como uma terapia de longa duração, mas sim apenas por um período de 8 semanas, utilizando-se de seguida, os Sais de Zinco como terapia de manutenção. (18) O TTM não se encontra ainda comercialmente disponível, no

entanto a sua aprovação parece estar próxima. Novos estudos têm de ser desenvolvidos para avaliar a sua eficácia e segurança. (8,18,25)



**Figura 8:** Reação química de quelação do Tetratiomolibdato e o ião  $Cu^{2+}$ .  
Adaptada da referência (8)

#### 4.4.4. Sais de zinco

A administração de Zinco (na forma de acetato, sulfato ou gluconato) é uma alternativa à terapêutica por quelação. Foi inicialmente proposto em 1962 e, desde aí tem vindo a assumir um papel importante no tratamento da DW. (22) Apresenta um mecanismo de ação completamente diferente do da Penicilamina e da trien. Os Sais de Zinco inibem a absorção de cobre pelo trato gastrointestinal, processo efetuado pela indução da metalotioneína enterócita, uma proteína rica em resíduos de cisteína com elevada afinidade para o cobre, que atua como agente quelante para este e outros metais, inibindo a sua entrada na circulação portal. Esta possibilita uma eliminação do metal pelo conteúdo fecal e origina um balanço negativo do cobre. (22,34,35)

Para além de induzirem esta metalotioneína, os Sais de Zinco também podem auxiliar na defesa do fígado contra a toxicidade do cobre ao induzir outra metalotioneína, a metalotioneína hepatocelular, formando esta um complexo não tóxico com o cobre. (8,22) Como já foi anteriormente referido, os Sais de Zinco são o agente de eleição quando se trata de adotar uma terapêutica de manutenção, (22) no entanto, não representa a escolha ideal para uma terapia inicial e única, já que se caracteriza por apresentar um mecanismo de ação lento, necessitando de 4-6 meses para controlar os níveis elevados de cobre, período durante o qual a doença pode evoluir. (33) A monoterapia com Sais de Zinco requer um cuidado especial em pacientes que apresentam doença hepática de Wilson, dado que já foram relatados casos de deterioração hepática após o início de uma terapêutica unicamente com Zinco, permanecendo ainda como uma monoterapia discutível e duvidosa. (21) Apesar disso, este elemento tem sido utilizado

como terapêutica de primeira linha em doentes assintomáticos ou pré-sintomáticos. A combinação de Sais de Zinco com agentes quelantes como a D-Penicilamina e a Trietilenotetramina tem vindo a ser desenvolvida. (22)

A dosagem recomendada é de 50 mg de Zinco, três vezes por dia, apesar da dose de 25 mg ter-se mostrado eficaz. (18,34) É recomendável que a toma desta medicação fora do período das refeições, uma vez que os alimentos podem interferir na absorção. (21) A monitorização do tratamento com Zinco é feita com base numa avaliação do perfil clínico e bioquímico e pela medição da excreção urinária de cobre em 24 horas. A excreção urinária de Zinco também pode ser medida rotineiramente para verificar uma conformidade. (34,35) O Zinco caracteriza-se por ser um agente que origina poucos efeitos adversos. Irritação gástrica, efeitos imunossupressores e uma redução da quimiotaxia dos leucócitos podem ser alguns dos efeitos observados. Um aumento das enzimas pancreáticas, lipase e amilase pode ocorrer, mesmo sem indícios de pancreatite. Já uma degeneração neurológica é pouco comum na terapêutica com o Zinco. (21)

#### **4.4.5. Outros tratamentos**

Antioxidantes como por exemplo a Vitamina E, podem ser usados como terapêutica adjuvante. Apesar dos níveis séricos de Vitamina E estarem baixos na DW e uma melhoria dos sintomas ter sido detetada após acréscimo deste antioxidante à terapêutica estabelecida, são necessários mais estudos para fundamentar e correlacionar estes efeitos. (21)

#### **4.4.6. Transplante Hepático**

O transplante hepático está indicado principalmente para doentes que apresentam insuficiência hepática aguda ou cirrose descompensada. Como a origem do problema na DW situa-se essencialmente no fígado, o transplante deste provou ser um tratamento eficaz. O transplante hepático também é indicado em pacientes que não apresentam insuficiência hepática mas com manifestações neurológicas acentuadas, nas quais as terapias de quelação não tiveram qualquer efeito. (21,25)

#### **4.4.7. Terapêutica durante a gravidez**

Apesar de uma gravidez numa doente com DW levantar diversas questões, um tratamento eficaz é um excelente indicador para que as mulheres com esta doença possam engravidar. A

teratogenicidade da Penicilamina tem sido discutida, dado que existem relatos de bebês com uma síndrome que se acredita ser causada pela Penicilamina. O maior risco de teratogenicidade da Penicilamina ocorre no primeiro trimestre e por isso recomenda-se uma diminuição da dose neste período. Contudo, há um consenso quando se aborda a questão de uma possível interrupção da terapêutica durante a gravidez de modo a proteger o feto de qualquer efeito da Penicilamina, sendo que os riscos de uma interrupção do tratamento superam os riscos da continuação. O mesmo acontece para a terapêutica com a Trietilenotetramina e o Zinco. Do ponto de vista teórico, há uma maior vantagem em usar o Zinco durante a gravidez devido à sua baixa toxicidade, no entanto, mais estudos são necessários para confirmar esta afirmação. (21,34)

## **5. Conclusão**

Apesar de ser uma doença rara, a Doença de Wilson não pode ser desvalorizada e deve ser considerada em qualquer paciente, independentemente da idade e dos sintomas clínicos que apresenta.

No que diz respeito à terapêutica, vários estudos ainda precisam de ser desenvolvidos. A compreensão aprofundada dos mecanismos de ação das diferentes moléculas utilizadas na terapêutica farmacológica e os potenciais efeitos benéficos quando administradas em conjunto, têm de ser compreensivelmente definidos. É necessária uma pesquisa continuada de novos agentes terapêuticos que apresentem menores efeitos adversos, do que aqueles que já existem.

## 6. Bibliografia

1. Simerska P, Moyle PM, Toth I. Peptide-Based Delivery Systems for Peptide , accine , and Gene Products. *Med Res Rev.* 2009;29(4):520–47.
2. Tegoni M, Valensin D, Toso L, Remelli M. Copper Chelators: Chemical Properties and Bio-medical Applications. Vol. 21, *Current Medicinal Chemistry.* 2014. 3785–3818 p.
3. Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK. Copper: toxicological relevance and mechanisms. *Arch Toxicol.* 2014;88(11):1929–38.
4. Florio M. The economic rate of return of infrastructures and regional policy in the European Union. *Ann Public Coop Econ.* 1997;68(1):39–64.
5. Ellingsen DAGG, Møller LB, Aaseth JAN. *Chapter 35.* 2015;(29).
6. World Health Organization. Copper: Environmental Health Criteria [Internet]. 200. 1998 [cited 2019 Nov 7]. Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm>
7. Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of copper in humans. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(5 SUPPL.):952–9.
8. Kodama H, Fujisawa C, Bhadhprasit W. Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *Curr Drug Metab.* 2012;13(3):237–50.
9. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2003;189(1–2):147–63.
10. Wang T, Guo Z. Copper in Medicine: Homeostasis, Chelation Therapy and Antitumor Drug Design. *Curr Med Chem.* 2006;13(5):525–37.
11. Peña MMO, Lee J, Thiele DJ. A Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution. *J Nutr.* 1999;129(7):1251–60.
12. Crisponi G, Nurchi VM, Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, Faa G. Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. *Coord Chem Rev* [Internet]. 2010;254(7–8):876–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.018>
13. Sarkar B. Treatment of wilson and menkes diseases. *Chem Rev.* 1999;99(9):2535–44.
14. Wu F, Wang J, Pu C, Qiao L, Jiang C. Wilson ’ s Disease : A Comprehensive Review of the Molecular Mechanisms. 2015;6419–31.
15. Sinicropi MS, Amantea D, Caruso A, Saturnino C. Chemical and biological properties of toxic metals and use of chelating agents for the pharmacological treatment of metal poisoning. *Arch Toxicol.* 2010;84(7):501–20.
16. Article R. Wilson ’ s Disease - A Rehabilitation Perspective Case history. 2007;7(4).
17. Taly AB, Prashanth LK, Sinha S. Wilson’s disease: An Indian perspective. *Neurol India.* 2009;57(5):528–40.
18. Pfeiffer RF. Wilson ’ s Disease. 2007;27(2):123–32.
19. Horn N, Møller LB, Nurchi VM, Aaseth J. Chelating principles in Menkes and Wilson diseases: Choosing the right compounds in the right combinations at the right time. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2019;190(August 2018):98–112. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.10.009>

20. Bandmann O, Weiss KH, Kaler SG. Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol* [Internet]. 2015;14(1):103–13. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70190-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70190-5)
21. Guidelines CP. Clinical Practice Guidelines EASL Clinical Practice Guidelines : Wilson ' s disease Clinical Practice Guidelines. 2012;56(November 2011).
22. Patil M, Sheth KA, Krishnamurthy AC, Devarbhavi H. A review and current perspective on wilson disease. *J Clin Exp Hepatol* [Internet]. 2013;3(4):321–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jceh.2013.06.002>
23. Ferenci P, Członkowska A, Merle U, Ferenc S, Gromadzka G, Yurdaydin C, et al. Late-Onset Wilson's Disease. *Gastroenterology*. 2007;132(4):1294–8.
24. Chanprasert S, Scaglia F. Adult liver disorders caused by inborn errors of metabolism: Review and update. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2015;114(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.10.011>
25. Das SK, Ray K. Wilson's disease: An update. *Nat Clin Pract Neurol*. 2006;2(9):482–93.
26. Josh Geffen and Kieran Forster. Treatment of ADHD in adults. *Ther Adv Vaccines*. 2018;8(1):25–32.
27. Hedera P. Wilson's disease: A master of disguise. *Park Relat Disord* [Internet]. 2019;59:140–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.02.016>
28. Moreira DM, Moreira JSR, Fritscher LG, De Garcia RG, Rymer S. Anéis de Kayser-Fleischer. *Arq Bras Oftalmol*. 2001;64(6):589–93.
29. Forman SJ, Kumar KS, Redeker AG, Hochstein P. Hemolytic anemia in wilson disease: Clinical findings and biochemical mechanisms. *Am J Hematol*. 1980;9(3):269–75.
30. Liu J, Luan J, Zhou X, Cui Y, Han J. Epidemiology, diagnosis, and treatment of Wilson's disease. *Intractable Rare Dis Res*. 2017;6(4):249–55.
31. Schilsky ML. Wilson disease: Clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Clin Liver Dis*. 2014;3(5):104–7.
32. Hedera P. Wilson's disease: A master of disguise. *Park Relat Disord*. 2019;59(February):140–5.
33. Simerska P, Moyle PM, Toth I. Peptide-Based Delivery Systems for Peptide , accine , and Gene Products. *Med Res Rev*. 2009;30(4):520–47.
34. Freeman A. Treatment of Wilson disease. *Curr Clin Neurol*. 2019;7(2):323–5.
35. Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology*. 2008;47(6):2089–111.

