

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Farmácia**



# **O Cobre nas Doenças de Menkes e Wilson**

**Ana Catarina dos Santos**

Monografia orientada pela Professora Doutora Lídia Maria Veloso Pinheiro,  
Professora Auxiliar e pela Professora Doutora Maria de Fátima dos Anjos Garcia  
Pereira Cabral, Professora Auxiliar.

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2021**

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



# **O Cobre nas Doenças de Menkes e Wilson**

**Ana Catarina dos Santos**

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentado à  
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Lídia Maria Veloso Pinheiro,  
Professora Auxiliar e pela Professora Doutora Maria de Fátima dos Anjos Garcia  
Pereira Cabral, Professora Auxiliar.

**2021**

## Resumo

O cobre é um metal que se pode encontrar na natureza em estado nativo, tendo sido extraído e trabalhado pelo Homem desde os tempos pré-históricos. A sua descoberta e utilização, assim como o conhecimento das suas propriedades tem contribuído para o desenvolvimento da nossa civilização, tornando-se cada vez mais valioso e com inúmeras aplicações. É um oligoelemento essencial para a maioria dos organismos vivos, e a sua importância a nível estrutural e funcional relaciona-se com as funções metabólicas de uma série de enzimas que são dependentes deste metal, como a citocromo-c oxidase, a lisil oxidase, a ceruloplasmina, a dopamina- $\beta$ -monooxigenase, entre outras. Associadas à alteração do metabolismo do cobre, existem algumas desordens genéticas, onde a Doença de Menkes e a Doença de Wilson constituem os exemplos mais relevantes.

A doença de Menkes é uma doença multissistémica letal do metabolismo do cobre. As principais manifestações são a neurodegeneração progressiva e distúrbios do tecido conjuntivo, aliadas a alterações do cabelo, que se torna frágil, fino, quebradiço e de cor acinzentada clara. Esta doença hereditária recessiva está ligada ao cromossoma X, fazendo com que a maioria dos doentes seja do sexo masculino. A Doença de Menkes ocorre devido a mutações no gene ATP7A. ATP7A é uma proteína transmembranar dependente de energia, que tem como funções o transporte de cobre através das membranas celulares. Estes doentes morrem geralmente antes do terceiro ano de vida. Não existe cura para a doença, mas o tratamento precoce com o complexo cobre-histidina pode corrigir alguns dos sintomas neurológicos.

A doença de Wilson é um distúrbio autossómico recessivo causado por mutação no gene ATP7B, com consequente comprometimento da excreção biliar de cobre. A acumulação de cobre, primeiro no fígado, depois no cérebro e noutros tecidos, produz manifestações clínicas que podem incluir, entre outros, distúrbios hepáticos, neurológicos e psiquiátricos e oftalmológicos. A deteção precoce é fundamental porque tratamentos iniciados tardiamente têm um risco muito maior de resultados clínicos desfavoráveis. O teste genético torna-se impraticável devido à grande quantidade de mutações que foram identificadas, por isso, o diagnóstico depende essencialmente de um conjunto de testes laboratoriais associados às manifestações clínicas. Os tratamentos farmacológicos precisam durar toda a vida. Atualmente, o tratamento consiste na administração de agentes quelantes, os quais podem promover uma deterioração clínica adicional em alguns doentes tratados, e/ou sais de zinco.

**Palavras-chave:** Cobre; Doença de Menkes; Doença de Wilson; ATP7.

# Abstract

Copper is a metal that can be found in its native form in nature, having been extracted and worked by Man since prehistoric times. Its discovery and use, as well as the knowledge of its properties, has contributed to the development of our civilization, becoming increasingly valuable as well and with countless applications. It is an essential trace element for most living organisms, and its structural and functional relevance is related to the metabolic functions of several cupro-dependent enzymes, such as cytochrome-c oxidase, lysyl oxidase, ceruloplasmin, dopamine- $\beta$ -monooxygenase, among others. There are some genetic disorders related with altered copper metabolism, of which Menkes Disease and Wilson Disease are the most relevant examples.

Menkes disease is a lethal multisystemic disease of copper metabolism. Its main manifestations are progressive neurodegeneration and connective tissue disorders, combined with hair changes, which becomes fragile, thin, brittle and with a light gray color. This recessive inherited disease is X-linked, and as a result, most patients are male. Menkes Disease occurs due to mutations in the ATP7A gene. ATP7A is an energy-dependent transmembrane protein that transports copper across cell membranes. These patients usually die before the third year of life. There is no cure for this disease, however early treatment with copper-histidine complex can correct some of the neurological symptoms.

Wilson's disease is an autosomal recessive disorder caused by a mutation in the ATP7B gene, with consequent impairment of biliary copper excretion. The accumulation of copper, first in the liver, then in the brain and other tissues, produces clinical manifestations that can include, among others, liver, neurological and psychiatric and ophthalmological disorders. Early detection is critical because late-initiated treatments have a much higher risk of unfavourable clinical outcomes. Genetic testing becomes unpractical due to the large number of identified mutations, therefore the diagnostic depends essentially on a set of laboratory tests associated with clinical manifestations. Pharmacological treatments need to last all lifetime. Currently, treatment consists in the administration of chelating agents, which can promote in some treated patients additional clinical deterioration, and/or zinc salts.

**Keywords:** Copper; Menkes Disease; Wilson's Disease; ATP7.

# Agradecimentos

Não posso dar esta monografia por terminada sem deixar algumas palavras de agradecimento a todos aqueles que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho ficasse concluído.

Em primeiro lugar, às professoras Lídia Maria Pinheiro e Maria de Fátima Cabral por contribuírem para a elaboração desta monografia. Agradeço que tenham corrigido de forma construtiva, contribuindo com a sua opinião para que ficasse um trabalho mais completo, correto e coerente.

De igual forma, não posso deixar de agradecer à minha família próxima: aos meus pais, à minha irmã e à minha madrinha, por toda a paciência que têm e pelo apoio que me dão em todos os momentos.

Aos meus amigos mais próximos e a todos aqueles que tive a oportunidade de conhecer durante este percurso, um agradecimento especial pelo apoio e pela presença constante.

Por fim, mas não menos importante, não posso deixar de mencionar a professora Judite Costa, e todo o tempo que dispensou comigo, sem dúvida uma professora sempre prestável e simpática. Toda a comunidade da Faculdade de Farmácia ficou mais pobre.

# Abreviaturas

ATOX1 – *Proteína chaperon* antioxidante do cobre 1  
ATP – Adenosina Trifosfato  
ATP7A – ATPase transportadora de cobre ou ATPase de Menkes;  
ATP7B – ATPase transportadora de cobre ou ATPase de Wilson;  
BAL – 2,3-dimercaptopropanol  
CCS – *Chaperon* do cobre para SOD-1  
CE – Comissão Europeia  
COX17 – *Chaperon* de cobre para a citocromo-c oxidase  
CTR1 – Proteína Transportadora de cobre 1  
Cu<sup>+</sup> – Ião Cu(I) ou ião cuproso  
Cu<sup>2+</sup> – Ião Cu(II) ou ião cúprico  
DM - Doença de Menkes  
DMT1 - Transportador de metal divalente 1  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DW – Doença de Wilson  
EDTA – Ácido etilenodiamino tetraacético  
EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos  
GSH – Glutationa  
INR – International Normalized *Ratio*  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade  
MT – Metalotionina  
OHS – *Occipital horn syndrome* (Síndrome do corno occipital)  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
RMI – Ressonância Magnética à Imagem  
ROS – Espécies Reativas de Oxigénio  
SOD-1 – Enzima Cobre/Zinco Superóxido Dismutase 1  
TC – Tomografia Computorizada  
TTM – Tetratiomolibdato de amónio  
WTX101 – Tetratiomolibdato bis-colina

# Índice

Índice de Figuras .....	9
Índice de Tabelas.....	10
1. Introdução .....	11
2. Materiais e Métodos.....	13
3. Cobre.....	14
3.1. Química do Cobre.....	14
3.2. Fontes de Cobre e Quantidade de Cobre Necessária ao Organismo .....	15
3.3. O Cobre como Elemento Essencial .....	17
3.4. O Metabolismo do Cobre .....	19
3.5. Toxicidade do Cobre .....	22
4. Doença de Menkes.....	26
4.1. Caracterização .....	26
4.2. Fisiopatologia .....	27
4.3. Manifestações Clínicas .....	28
4.3.1. Manifestações da Doença de Menkes Clássica .....	28
4.3.2. Manifestações do Síndrome do Corno Occipital.....	30
4.4. Diagnóstico.....	32
4.5. Terapêutica Farmacológica .....	34
5. Doença de Wilson .....	37
5.1. Caracterização .....	37
5.2. Fisiopatologia .....	39
5.3. Manifestações Clínicas .....	41
5.3.1. Manifestações Hepáticas .....	41
5.3.2. Manifestações Neurológicas .....	42
5.3.3. Manifestações Psiquiátricas .....	43

5.3.4.	Manifestações Oftálmicas .....	44
5.3.5.	Outras Manifestações .....	45
5.4.	Diagnóstico .....	46
5.4.1.	Determinação da Ceruloplasmina Sérica .....	46
5.4.2.	Determinação do Cobre Sérico .....	47
5.4.3.	Determinação do Cobre Excretado na Urina.....	47
5.4.4.	Determinação da Concentração de Cobre Hepático.....	48
5.4.5.	Histologia Hepática .....	48
5.4.6.	Neuro-imagiologia .....	49
5.4.7.	Testes Genéticos.....	49
5.4.8.	Rastreios Familiares .....	50
5.5.	Terapêutica Farmacológica .....	50
5.5.1.	D-Penicilamina .....	52
5.5.2.	Trietilenotetramina .....	54
5.5.3.	Tetratiomolibdato de Amônio .....	56
5.5.4.	Sais de Zinco .....	57
5.5.5.	Outros Tratamentos Farmacológicos .....	59
5.5.6.	Transplante Hepático.....	60
6.	Conclusão.....	61
7.	Referências Bibliográficas .....	63

# Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Metabolismo do cobre nos hepatócitos. ....	22
<b>Figura 2</b> - Manifestações clínicas da Doença de Menkes: alterações capilares e flacidez cutânea.....	29
<b>Figura 3</b> - Radiografia lateral do crânio de um doente de 23 anos com OHS.....	31
<b>Figura 4</b> - Microscopia capilar (x 100) de haste de cabelo torcida ( <i>pili torti</i> ) e uma mecha de cabelo normal .....	33
<b>Figura 5</b> – Estrutura da histidina e do complexo Cu(II)-bis (L-histidina). ....	35
<b>Figura 6</b> - Anomalias capilares, melhoraram após o tratamento. Antes do tratamento; depois do tratamento; cabelo normal. ....	36
<b>Figura 7</b> - Anel de Kayser-Fleischer castanho, em torno de uma íris azul; Anel de Kayser-Fleischer com tonalidade cinzenta. ....	44
<b>Figura 8</b> - D-Penicilamina.....	52
<b>Figura 9</b> - Trietilenotetramina e Complexo de Cu(II)-trietilenotetramina. ....	54
<b>Figura 10</b> - Tetratiomolibdato de Amónio. ....	56

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Exemplos de enzimas cupro-dependentes, respectivas reações catalisadas e funções. .....	18
<b>Tabela 2</b> - Índice de Prognóstico na Doença de Wilson.....	39

# 1. Introdução

O cobre é um metal que se pode encontrar na natureza em estado nativo, tendo sido extraído e trabalhado pelo Homem desde os tempos pré-históricos. A utilização ancestral do cobre abriu caminho para o seu relevante contributo no desenvolvimento da nossa civilização, cada vez mais valioso e com inúmeras aplicações que vão desde a arquitetura, passando pelas tecnologias de informação até às aplicações médicas. Além deste metal ser essencial à nossa sociedade como a conhecemos hoje, é também importante para o Homem enquanto organismo vivo.

O cobre é um dos oligoelementos mais abundantes do corpo humano e a manutenção da sua homeostase, através de processos como absorção, transporte e distribuição e excreção são fundamentais para o funcionamento de enzimas que dele dependem. Contudo, podem ocorrer alterações nestes processos que comprometem a sua homeostasia, estando na origem de algumas doenças, nas quais se incluem a Doença de Menkes (DM) e a Doença de Wilson (DW), que serão abordadas na presente monografia.

A importância biológica e estrutural do cobre em animais e humanos é, hoje em dia, reconhecida e relaciona-se com funções metabólicas que são cupro-dependentes, ou seja, o seu correto e eficaz funcionamento depende da existência de cobre e da sua ligação a este elemento químico. Enzimas como a ceruloplasmina, a citocromo-c oxidase, a superóxido dismutase, e a tirosinase são exemplos de enzimas dependentes do cobre. Estas enzimas catalisam reações fisiológicas importantes relacionadas com a fosforilação oxidativa, inativação de radicais livres, síntese de colagénio e elastina, formação de melanina, metabolismo do ferro e síntese de catecolaminas, entre muitas outras.

Ambas as doenças referidas anteriormente são doenças hereditárias em que na sua génese estão incluídas mutações nos genes ATP7A e a ATP7B, respetivamente. Estes genes codificam proteínas que interferem na homeostasia do cobre. Estas doenças são consideradas raras e se não tratadas precocemente o prognóstico não é favorável. Desta forma, torna-se importante aprofundar o seu estudo, de forma a desenvolver formas de diagnóstico sensíveis que permitam a deteção precoce, assim como novas formas de tratamento que aumentem tanto o tempo de sobrevida como a sua qualidade de vida dos doentes.

A presente monografia vem então contribuir com uma revisão das duas principais doenças genéticas associadas ao cobre designadas por Doença de Menkes e Doença de Wilson. Foram exploradas não só as suas características epidemiológicas, genéticas e fisiopatológicas, onde se

abordam as manifestações clínicas mais frequentes, mas também os meios de diagnóstico e a terapêutica farmacológica usualmente utilizada.

## 2. Materiais e Métodos

Para a elaboração da presente monografia “O Cobre nas Doenças de Menkes e Wilson” foi realizada uma revisão da literatura publicada nas bases de dados PubMed e B-On e utilizando os motores de busca Google e Scholar Google.

A pesquisa elaborada foi realizada com base nos termos “*copper*”, “*copper metabolism*”, “*copper chemistry*”, “*copper disorders*”, “*Menkes disease*”, “*ATP7A gene*”, “*Menkes disease treatment*”; “*copper histidine*”. “*Wilson disease*”, “*ATP7B gene*”, “*Wilson’s disease treatment*”, “*penicillamine*”, “*trientine*”, “*tetrathiomolybdate*”, “*zinc salts*”. A pesquisa foi feita essencialmente entre os meses de janeiro e maio do presente ano. Não houve restrição nas datas das publicações, contudo foi dada preferência a publicações mais recentes. Apenas foram utilizados artigos na língua portuguesa ou inglesa.

Os artigos foram selecionados com base na leitura do seu *abstract* ou com base na leitura integral, sendo que também foram consultadas referências de artigos lidos.

De forma a realizar e a elaborar as referências bibliográficas foi utilizado um programa informático, o Mendeley. As referências foram elaboradas de acordo com a norma de Vancouver.

## 3. Cobre

### 3.1. Química do Cobre

O cobre (símbolo Cu), é um elemento químico que pertence ao Grupo 11 e 4º Período da Tabela Periódica, apresentando um número atômico 29 e uma massa atômica relativa de 63,546 u, é classificado como metal de transição.(1-4) À semelhança dos outros metais de transição, as suas orbitais d encontram-se semipreenchidas.(5) À temperatura ambiente encontra-se no estado sólido, tem uma densidade de  $8,94 \text{ g cm}^{-3}$ , e as suas temperaturas de fusão e de ebulição são, respetivamente, iguais a  $1083 \text{ °C}$  e  $2595 \text{ °C}$ .(1-3)

Apresenta uma cor castanha-avermelhada, brilhante e opaca. Juntamente com outros metais como a prata e o ouro, é classificado como um metal nobre e, tal como eles, pode ser encontrado na natureza na forma elementar. As propriedades físicas e químicas exclusivas do cobre tornam-no um dos metais mais importantes. Essas propriedades incluem elevada condutividade térmica e elétrica, alta ductilidade e baixa corrosão. As características descritas do cobre metálico variam de acordo com o seu grau de pureza.(1,2)

O cobre é encontrado naturalmente numa ampla variedade de sais minerais, compostos orgânicos e na forma metálica, ocorre naturalmente em rochas, solo, água, sedimentos e, em baixos níveis, no ar. A concentração média na crosta terrestre é de cerca de 50 ppm, ou seja 50 gramas de cobre por 1 000 000 de gramas de solo.(2,3)

Este metal é moderadamente solúvel em água, soluções salinas ou soluções ligeiramente ácidas, mas pode ser dissolvido em ácidos nítrico e sulfúrico, bem como em soluções básicas de hidróxido e carbonato de amónio.(3)

A sua forma metálica é bastante estável ao ar desde que sujeito a baixas condições de temperatura e humidade. Na presença de humidade produz um filme amorfo cinza-esverdeado sobre a superfície que o protege de ataques posterior.(3)

Possui dois isótopos estáveis  $^{63}\text{Cu}$  e  $^{65}\text{Cu}$ , com uma abundância relativa de 69,2% e de 30,8%, respetivamente.(1,3) Possui também 27 isótopos radioativos, dois dos quais ( $^{64}\text{Cu}$  e  $^{67}\text{Cu}$ , com tempo de semi-vida de 12,7 horas e 61,8 horas, respetivamente) foram utilizados em estudos biológicos.(4) Este elemento apresenta quatro estados de oxidação:  $\text{Cu}^0$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$   $\text{Cu}^{3+}$ .(5–7) A configuração eletrónica da forma metálica é:  $\text{Cu}^0 - 1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^1$ .(3,5,6)

Nos sistemas biológicos predominam o estado oxidado ( $\text{Cu}^{2+}$ , ião cúprico) ou o reduzido ( $\text{Cu}^+$ , ião cuproso). O ião  $\text{Cu}^+$  é oxidado a  $\text{Cu}^{2+}$ , a menos que esteja sob a forma de um complexo

estável (7) e pode ser encontrado no interior das células.(3,5,6) É caracterizado por apresentar um potencial redox baixo para o par  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  (0,158 V em solução aquosa) que lhe confere a capacidade de permutar elétrons com outros compostos, sendo a base dos processos de transferência de energia em sistemas biológicos.(4).

O íon  $\text{Cu}^{2+}$  liga-se, preferencialmente, aos ligandos inorgânicos tais como  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  através do átomo de oxigênio, e aos compostos orgânicos através de ácidos fenólicos ou de grupos carboxilato. Diversos compostos de  $\text{Cu(II)}$  são solúveis em água, conferindo-lhe uma cor azul-esverdeada característica. A forma trivalente do cobre, o íon  $\text{Cu}^{3+}$ , é um forte agente oxidante sendo os seus complexos pouco comuns. O íon cúprico tem a capacidade de adsorver vários óxidos metálicos como o ferro, o alumínio e o manganês.(7)

De entre as aplicações mais relevantes do cobre, destacam-se a sua utilização em fios e cabos para transmissão de eletricidade, na indústria eletrónica, e igualmente como componente de canos e tubos de água, materiais de cobertura e revestimento para edifícios. Os compostos de cobre são também usados em conservantes de madeira e fungicidas, como pigmentos e agentes desincrustantes em tintas, como aditivos nutricionais para gado e como aditivos para fertilizantes. O cobre é um componente importante na constituição de ligas metálicas, destacando-se as ligas cobre-zinco (latão) e cobre-estanho (bronze). Existem também algumas utilizações médicas do cobre, como dispositivos anticoncepcionais intrauterinos.(1,8) Seguido do ferro e do zinco, o cobre é o oligoelemento mais abundante no corpo humano, desempenhando um papel crucial em enzimas que catalisam reações de oxidação-redução com funções relevantes no processo respiratório.(9)

### **3.2.Fontes de Cobre e Quantidade de Cobre Necessária ao Organismo**

A ingestão de cobre, através da alimentação, é a principal forma de exposição a este elemento. Todas as outras formas de exposição, como a inalação e adsorção, são muito baixas quando comparadas à via oral.(2,10)

Os alimentos diferem amplamente no seu conteúdo natural de cobre. Fatores como a estação do ano, qualidade do solo, geografia, fonte de água e uso de fertilizantes influenciam o teor de cobre nos alimentos.(4)

O cobre pode ser encontrado nos alimentos num intervalo que varia de 0,5 a  $37 \mu\text{g g}^{-1}$  de alimento.(6) Os alimentos que são particularmente ricos em cobre são o marisco, vísceras

animais (rim e fígado), sementes, grãos e nozes. Alguns legumes verdes e chocolate são também boas fontes de cobre na dieta.(6,11) Uma boa parte do cobre que ingerimos através da dieta obtemos a partir de pães fermentados, batatas brancas, tomates, cereais, carne bovina, feijões secos e lentilhas.(1,11) Na maioria dos alimentos o cobre não se encontra livre, mas sim ligado a macromoléculas.(10)

Além dos alimentos, a água potável pode ser outra fonte importante de cobre, embora o conteúdo mineral na água potável seja muito variável. Fatores como conteúdo mineral natural, dureza, pH e um sistema de canalização de cobre ou não-cobre determinam a concentração deste na água.(4,12) Uma água macia mais acídica, especialmente quando transportada por canalizações de cobre, tem uma concentração de cobre mais alta.(4,12)

As necessidades nutricionais variam não só ao longo da vida como também de indivíduo para indivíduo, sendo que as recomendações tentam cobrir a maior parte das pessoas saudáveis. Alguns países têm comissões independentes que elaboram recomendações de ingestão específicas para o país, no caso Portugal essas recomendações particulares não existem.(13)

Para a população pediátrica, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e a Comissão Europeia (CE) não fazem distinção em género das necessidades e recomendam que em idades compreendidas entre os 0 e os 6 meses o leite materno é suficiente para suprir necessidades. A tendência é crescente e até 1 ano de idade são necessárias 300 µg/dia, entre 1 e os 3 anos as recomendações são de 400 µg/dia. Entre os 4 e os 10 a recomendação de ingestão diária varia entre os 600 µg e os 700 µg. A partir da adolescência os valores variam entre os 800 µg e os 1000 µg diários.(13) De acordo com as diretrizes da EFSA, a ingestão diária recomendada de cobre é de 1,6 mg em homens e 1,3 mg em mulheres, embora a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomende 2–3 mg/dia. As condições fisiológicas com maior necessidade de ingestão são a gravidez e a lactação (1,5 mg/dia).(4)

As diferenças substanciais nas doses recomendadas propostas podem refletir as dificuldades envolvidas na determinação da ingestão diária ideal. A necessidade diária de crianças e bebés depende da idade. O corpo de um adulto saudável de 70 kg contém aproximadamente 100 mg de cobre, grande parte dele no fígado e cérebro, rins, sangue, tecido músculo esquelético, tecido ósseo incluindo a medula óssea.(14,15)

A deficiência de cobre pode ocorrer por vários mecanismos, como em bebés prematuros e de baixo peso, aporte insuficiente pela dieta, indivíduos a receber nutrição parenteral total sem aporte suficiente, em situações específicas como gravidez, lactação, cicatrização de feridas,

síndromes de má absorção, aumento de perdas e doenças hereditárias.(6,16,17).Pode ainda ocorrer deficiência secundária como consequência da alta ingestão dietética de zinco.(16)

### **3.3.O Cobre como Elemento Essencial**

Após o reconhecimento, durante largas décadas, de que seria um nutriente essencial para o organismo humano, o rápido desenvolvimento no campo analítico e na biologia celular proporcionou uma compreensão crescente do papel fisiológico do cobre nas defesas imunológicas, tecido conjuntivo e esqueleto, respiração celular, eritropoiese, angiogênese, sistema nervoso e no metabolismo celular do ferro.(9)

O papel do cobre nas atividades enzimáticas de oxidação-redução é consequência da sua capacidade para funcionar como um intermediário da transferência de elétrons, atuando como aceitador e dador de elétrons.(4)

Em algumas destas enzimas o cobre é necessário como cofator, como no caso da superóxido dismutase 1 (SOD-1), da citocromo-c oxidase, da ceruloplasmina e da tirosinase. Noutros casos, o cobre parece atuar como componente alostérico de algumas enzimas, conferindo-lhes uma estrutura apropriada para as suas atividades catalíticas. O cobre não pode ser substituído por outro elemento já que apenas este proporciona as propriedades de oxidação-redução necessárias nestas proteínas.(4,17) Existem cerca de 12 enzimas dependentes do cobre (cuproenzimas) em humanos,(4) apresentando-se algumas delas na tabela 1 com as respetivas funções e consequências da sua diminuição.

A citocromo-c oxidase é uma proteína complexa da membrana mitocondrial interna, a última da cadeia transportadora de elétrons, que catalisa a redução do oxigénio molecular em água, um passo essencial da respiração celular, e utiliza a energia livre dessa reação para produzir um gradiente de prótons. Nesta enzima estão presentes 3 átomos de cobre: dois átomos na subunidade I, envolvidos na transferência de elétrons do citocromo para o centro heme  $a_3$ -Cu<sub>B</sub> e um átomo na subunidade II, cuja função é reduzir o oxigénio. Um défice de cobre resulta numa redução da atividade da citocromo-c oxidase e, consequentemente, na diminuição da capacidade respiratória das mitocôndrias, particularmente no fígado, coração e cérebro. A diminuição do metabolismo associado à redução desta enzima leva ao crescimento deficiente em bebés, perda de peso e emagrecimento.(2,6,16,17)

A ceruloplasmina é uma enzima extracelular sintetizada maioritariamente ou quase exclusivamente nos hepatócitos, e atuando como transportadora do cobre a partir do

fígado.(2,10) É formada por seis íons de cobre fortemente ligados, três dos quais formam centros de cobre do tipo I envolvidos em processos de transferência de elétrons. Os outros três íons de cobre constituem um centro trinuclear, que é o local de ativação do oxigênio durante o ciclo catalítico da enzima.(4,17) Contém 60-95% do cobre sérico e desempenha um papel importante no efluxo de ferro das células de mamíferos, incluindo células do cérebro, devido à atividade ferroxidase.(1,4,8)

**Tabela 1 - Exemplos de enzimas cupro-dependentes, respetivas reações catalisadas e funções. Adaptada das referências (15) e (17).**

Enzima	Função	Deficiência
Citocromo-cOxidase	Respiração celular	Diminuição da energia muscular; mielinização prejudicada
Superóxido Dismutase 1	Defesa antioxidante	Diminuição da proteção contra radicais livres de oxigênio
Tirosinase	Síntese de melanina, metabolismo de aminoácidos	Redução da pigmentação
Lisil Oxidase	Ligação cruzada do colagénio e elastina	Anomalias arteriais; divertículos da bexiga; frouxidão cutânea e articulações
Ceruloplasmina	Transporte de cobre, oxidação, ferroxidase	Anemia
Dopamina- $\beta$ -monooxigenase	Síntese de catecolaminas	Redução de catecolaminas; Efeitos neurológicos
Ascobarto Oxidase	Síntese de dehidroascorbato	Desmineralização óssea
Sulfidril Oxidase	Ligação cruzada da queratina	<i>Pili torti</i>

A ceruloplasmina é uma proteína de fase aguda cuja síntese e secreção podem ser fortemente aumentadas durante a gravidez, inflamação, infeção e em doenças como diabetes, cancro e doenças cardiovasculares. A deficiência de cobre não afeta a taxa de síntese e libertação de ceruloplasmina pelos hepatócitos.(16)

O metabolismo do ferro e do cobre está inter-relacionado por meio da atividade da ferroxidase da ceruloplasmina. Em indivíduos com deficiência hereditária de ceruloplasmina, a falta de atividade da ferroxidase diminui a conversão de  $Fe^{2+}$  (ião ferroso) em  $Fe^{3+}$  (ião férrico) e, conseqüentemente, a ligação do ferro à transferrina. A consequência é uma distribuição alterada do ferro. Além disso, a ceruloplasmina tem funções antioxidantes, pois reduz o stress oxidativo dependente de  $Fe^{2+}$ .(9,18)

A dopamina- $\beta$ -monooxigenase é uma enzima constituída por dois átomos de cobre em cada uma das suas quatro subunidades.(7) A dopamina- $\beta$ -monooxigenase é essencial na produção

de catecolaminas, que estão intimamente envolvidas na transmissão nervosa no sistema nervoso central, bem como na resposta ao stress mediada pelas glândulas supra-renais.(11)

A lisil oxidase tem um papel crucial na formação, maturação e estabilização do tecido conjuntivo, catalisando a ligação cruzada de elastina e colagénio. Este comprometimento pode resultar em distúrbios ósseos, no sistema cardiovascular e pulmonar.(2,16,18) A incorporação do cobre na enzima ocorre na rede trans-Golgi, onde é entregue pela ATPase transportadora de cobre, ATP7A. Consequentemente, a atividade é baixa em doentes que sofrem da doença de Menkes, a qual é causada por mutações no gene ATP7A. A atividade da enzima é afetada pela ingestão de cobre na dieta, mas não altera os níveis da proteína nos tecidos.(16,19)

A tirosinase é uma enzima chave na síntese dos pigmentos de melanina, sendo expressa principalmente em melanócitos e em células do epitélio da retina, que confere proteção contra raios ultravioleta.(11,16) Esta enzima é constituída por uma, duas ou quatro subunidades de com um centro binuclear de cobre.(11)

A SOD-1 catalisa a dismutação dos aniões superóxido ( $O_2^-$ ) no citoplasma, os quais são subprodutos da respiração celular. Durante esta reação, o cobre do centro ativo da SOD-1 é reduzido pelo substrato  $O_2^-$  dando origem a dois metabolitos: o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) e o oxigénio molecular ( $O_2$ ) que confere uma defesa contra radicais livres de oxigénio.(11,16,17) Mutações em SOD-1 têm sido associadas a doenças de neurónio motor, como a Esclerose Lateral Amiotrófica. Nenhum outro metal pode substituir o cobre porque apenas este ião metálico confere atividade catalítica à SOD-1.(17)

Tal como outros metais, o cobre tem um papel importante na expressão genética, pela ativação ou repressão da transcrição de genes. A este propósito, referem-se os estudos da transcrição em leveduras que permitiram a identificação dos mecanismos de ação dos fatores de transcrição regulados pelo cobre em eucariotas.(3)

### **3.4.O Metabolismo do Cobre**

O fígado é o principal órgão que mantém a homeostase do cobre.(20) Nos mamíferos, a absorção de cobre é feita ao longo do trato gastrointestinal, em particular no estômago (apesar de pequenas quantidades) no duodeno e jejuno proximal.(9,11,21) Em adultos, a absorção máxima é de 50% e em bebés é de 77%.(9) Estima-se que a eficiência de absorção de cobre nos humanos varie em média entre 12 a 60% e dependa de fatores como a quantidade ingerida, a composição da dieta e fatores fisiológico que podem comprometer a sua absorção.(12)

O pH intestinal é provavelmente o fator fisiológico mais importante que afeta a absorção, uma vez que um ambiente ácido é essencial para a liberação de íons cobre dos complexos formados nos alimentos e nas secreções mucosas, estabelecendo as condições para sua absorção.(18) A produção eficiente de ácido clorídrico facilita a digestão no estômago e permite a disponibilidade de cobre no intestino delgado. Com um pH alcalino no intestino verifica-se a formação de complexos, como o hidróxido de cobre, e de sais de cobre com uma baixa constante de dissociação, havendo por isso uma menor biodisponibilidade para absorção.(9) Os tratamentos através da alimentação também afetam a absorção, onde os sais para preservação dos alimentos podem modificar a solubilidade do cobre ligado às proteínas e sua biodisponibilidade.(18)

Em situações de baixa ingestão deste metal, a retenção absorvida aumenta e a excreção endógena via biliar diminui. Por outro lado, durante os períodos de alta ingestão de cobre, observa-se uma redução da absorção e um aumento das perdas endógenas.(8,9,12) Se a ingestão de cobre for 10 vezes superior à ingestão recomendada, a percentagem absorvida pode reduzir para 10%.(11)

Proteínas e certos prebióticos, como fruto-oligossacarídeos de cadeia curta e inulina, têm um efeito positivo na absorção de cobre, enquanto que a presença de outros metais pode afetar fortemente a sua absorção.(9,12) Concentrações excessivamente altas de zinco e eventualmente também de ferro inibem direta ou indiretamente a captação e a transferência de cobre da dieta para o sangue.(11,17)

A primeira etapa da absorção do cobre é a captação do metal presente na dieta pelas células epiteliais intestinais, os enterócitos, através da proteína transportadora de cobre (CTR1). O processo é mediado pela ação de redutases na membrana apical, que reduzem o  $\text{Cu}^{2+}$  alimentar a  $\text{Cu}^+$ , que é o estado em que CTR1 transporta cobre.(9,12,18)

A CTR1 é uma proteína de alta afinidade para o cobre que facilita o transporte de  $\text{Cu}^+$  para os enterócitos, sendo formada por 3 domínios com por 190 aminoácidos (em especial, metionina e histidina).(1) A captação intracelular de cobre pode ser mediada por CTR1 não apenas nos enterócitos, mas também noutras células, incluindo hepatócitos. Altos níveis de CTR1 são expressos no fígado, coração e pâncreas, e níveis mais baixos no cérebro e músculos.(1,6) É considerada uma proteína essencial tanto para o desenvolvimento embrionário inicial quanto para a absorção intestinal de cobre.(18)

Contudo, a absorção de cobre não se dá apenas com CTR1. O transportador de metal divalente 1 (DMT1) é uma proteína de transporte localizada na membrana apical de enterócitos, que também pode transportar  $\text{Cu}^+$ .(12) Uma vez no citoplasma, o cobre é quelatado pela metalotionina (MT) ou liga-se a um *chaperon* de cobre.(12)

A partir dos enterócitos, o cobre é libertado através de um transporte ativo levado a cabo por uma proteína ATPase do tipo P, designada por ATPase 7A ou ATPase de Menkes, seguindo-se a distribuição para o organismo após a absorção. O cobre é transportado essencialmente ligado à transcupreína, mas também à albumina e a outros ligandos de baixo peso molecular. Uma pequena quantidade de cobre pode ligar-se a péptidos e aminoácidos, especialmente à histidina, cisteína e metionina.(9,11,22)

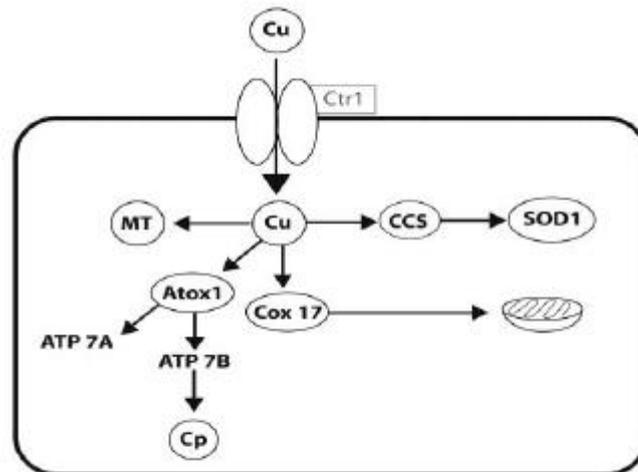
Pensa-se que CTR1 também está presente na membrana do hepatócito, permitindo assim a captação de cobre para o interior desta célula do fígado. Quando o cobre intracelular e/ou sistémico é elevado, a ATP7B, uma ATPase 7B, também designada de ATPase de Wilson, é de salientar a sua importância na remoção e exportação de cobre para a bÍlis, para ser excretado.(12)

O cobre que foi absorvido, rapidamente sai do plasma. A maior parte é levada para o fígado através da circulação portal, uma porção é armazenada nos hepatócitos sob a forma de MT, a restante é secretada no plasma sanguíneo sob a forma de ceruloplasmina, e uma pequena parte é transportada para o rim. No citosol do hepatócito, o cobre monovalente está ligado às *chaperons*.(9)

O envolvimento de *chaperons* é crucial no transporte de cobre para os organelos celulares, e na incorporação de cobre em enzimas. Cada *chaperon* tem tarefas específicas, CCS (*chaperon* do cobre para SOD-1), direciona o cobre para o citoplasma para a síntese da enzima SOD-1; ATOX1, encaminha o cobre para as ATPases 7A e 7B; e a COX17, é responsável pelo transporte de cobre para as mitocôndrias onde será utilizado na síntese da enzima citocromo-c oxidase. Parte do cobre é armazenado pela ligação a MT's citosólica, particularmente quando a quantidade de cobre disponível é elevada.(9)

A exportação de cobre dos hepatócitos, para diferentes tecidos, é mediada pela incorporação do metal na ceruloplasmina por meio de um ATPase localizada no aparelho de Golgi. A inibição da síntese de ceruloplasmina tem um efeito significativo na distribuição de cobre entre os órgãos. No entanto, outros órgãos além do fígado e dos rins podem absorver cobre sem a mediação da ceruloplasmina, embora numa extensão substancialmente reduzida. Embora a

excreção de ceruloplasmina controle a exportação hepática de cobre até certo ponto, ela não afeta a quantidade de cobre no corpo.(9,20)



**Figura 1 - Metabolismo do cobre nos hepatócitos. O Cu (I) é transferido para a célula através de CTR1. Liga-se a chaperonas (CCS, Atox1, Cox17) e é armazenado nas MT ou libertado como ceruloplasmina. Adaptado da referência (4).**

O mecanismo pelo qual o cobre é eliminado do organismo ainda não está totalmente definido. Assume-se que a principal via de eliminação do cobre é a biliar, a qual é produzida e excretada através fígado, um processo que requer ATP7B.(20) O cobre de origem biliar é eliminado predominantemente através das fezes, cerca de 72% do ingerido, embora exista ainda eliminação pelo suor, urina, menstruação e descamação da pele que corresponde geralmente a 0,5 a 3% do ingerido oralmente.(12,20,23) O tempo de semi-vida biológico do cobre na dieta é de 13 a 33 dias.(6)

A excreção de cobre envolve a exocitose deste metal através dos lisossomas e a ligação do cobre a ATPases da membrana canalicular, pequeno canal de passagem onde a biliar, produzida pelos hepatócitos, é drenada. Apenas quantidades reduzidas de cobre são reabsorvidas depois da excreção biliar.(9)

Na Figura 1 encontra-se esquematizada a homeostase do cobre nos hepatócitos, local onde ocorrem os processos fisiológicos fundamentais no que se refere ao metabolismo deste metal.

### 3.5.Toxicidade do Cobre

A maioria dos organismos possui uma combinação de mecanismos de proteção contra a toxicidade induzida por metais. Esses mecanismos regulam o equilíbrio homeostático dos

metais através da ligação destes a proteínas, com funções de cofator em enzimas, ou para sinalizar a ativação de transcrição. Como referido, a presença de um sistema complexo de transportadores de iões metálicos e *chaperons* para regular a homeostase do cobre garante que este seja fornecido às proteínas essenciais sem causar danos celulares. As perturbações na homeostase do cobre estão associadas a danos nos tecidos e a várias doenças, além da interação direta com macromoléculas e minerais essenciais.(8)

A deficiência de cobre pode ser mais prevalente do que se pensava há umas décadas atrás e a toxicidade de cobre é incomum nas condições habituais da vida diária.(8) A toxicidade por excesso de cobre pode ser aguda ou crónica, manifestando diferentes graus de consequências e efeitos tóxicos em indivíduos que não padeçam da Doença de Wilson (uma desordem genética resultante da excreção reduzida de cobre) são raros.(12) A maioria dos mamíferos e vertebrados tem a capacidade de manter a homeostase do cobre por um equilíbrio entre absorção diminuída e excreção aumentada, em caso de excesso de ingestão.(11)

As intoxicações agudas foram observadas principalmente após a ingestão premeditada (no contexto do suicídio) ou acidental incluindo-se a exposição ocupacional. A exposição aguda a elevadas quantidades de cobre é relativamente pouco tóxica para o Homem, podendo a sua ingestão causar vómitos e diarreia. A inalação de vapores de cobre irrita as vias respiratórias superiores e pode causar mal-estar, dor de estômago e diarreia. Em casos mais graves, os compostos solúveis de cobre levam à hemólise, danos no fígado e nos rins, coma e morte.(3,9,11,12) A intoxicação crónica por cobre com alimentos contaminados é rara e afeta principalmente o trato gastrointestinal e o fígado. Em doentes com doença de Wilson, também se observa hemólise, sintomas neurológicos e danos renais.(9)

A potencial toxicidade do cobre em sistemas biológicos depende da configuração do eletrão, particularmente das camadas externas. Consequentemente, o ião  $\text{Cu}^+$  é altamente polarizável e liga-se principalmente a ligantes que contenham nitrogénio e enxofre, partilhando as suas orbitais. Por outro lado, os iões  $\text{Cu}^{2+}$  são capazes de formar complexos de coordenação com ligantes contendo oxigénio e ligações parcialmente covalentes com centros contendo nitrogénio e enxofre. Desta forma, o cobre deve ser considerado reativo e capaz de se ligar fortemente a muitos tipos de estruturas ricas em eletrões. A afinidade dos iões de cobre para um ligante específico também é influenciada pela polarizabilidade do próprio ligante.(3)

A toxicidade do cobre pode surgir quando o excesso de cobre provoca as seguintes reações:

- i. Comprometimento estrutural dos locais de ligação de metal essencial por deslocamento de metais resultando, por exemplo, em alterações de membrana, como despolarização e comprometimento de recetores ou moléculas transportadoras;
- ii. Comprometimento funcional pela ligação do cobre a locais cruciais em macromoléculas como DNA ou enzimas, particularmente contendo grupos sulfidrilo, carboxilatos ou imidazóis o que provoca danos diretos às proteínas, ou alterações oxidativas no DNA, levando a várias alterações funcionais devido ao grande número de enzimas dependentes do cobre e à possível leitura incorreta dos códigos genéticos;
- iii. Lesão celular devido à produção de radicais pela reação de Haber-Weiss:



A produção excessiva destes radicais promove o início de uma cascata de reações de oxidação-redução que leva à perda da integridade celular. As causas de lesão consideradas incluem aumento dos níveis de cálcio citosólico, depleção de ATP, oxidação do grupo tiol, peroxidação lipídica, dano no DNA e em organelos, como mitocôndrias e lisossomas.(3)

Iões de metais de transição, como o ferro e o cobre, são capazes de sofrer reações de oxidação-redução e promover a formação de espécies reativas de oxigénio (ROS). A toxicidade do cobre está associada à propensão dos iões cobre em participar na formação de ROS que modificam a estrutura e/ou função de moléculas essenciais. Na presença de SOD-1 ou agentes redutores como ácido ascórbico ou a glutatona (GSH), o ião  $\text{Cu}^{2+}$  pode ser reduzido a  $\text{Cu}^+$ , que é capaz de catalisar a formação de radicais hidroxilo a partir do peróxido de hidrogénio. O radical hidroxilo é o radical oxidante mais poderoso que pode surgir em sistemas biológicos, tendo a capacidade de reagir com a maioria das moléculas biológicas induzindo quebras na cadeia de DNA e oxidação de bases nitrogenadas.(8)

Além disso, o produto da reação do óxido nítrico e do anião superóxido resulta na formação do peroxinitrito, que promove a peroxidação das membranas de lisossomas dos hepatócitos. Um excesso de cobre no organismo reduz a atividade da citocromo c-oxidase, o que prejudica a respiração mitocondrial no fígado. Observa-se igualmente que o cobre em excesso oxida a lipoproteína de baixa densidade (LDL) promovendo a arterogénese através da transformação de macrófagos em células espumosas.(8)

O excesso de cobre pode levar a danos peroxidativos nos lipídios de membrana por meio da reação de radicais lipídicos e oxigénio para formar radicais peroxilo e causar peroxidação nas membranas dos hepatócitos. A maior parte do cobre em excesso que se acumula liga-se às

MT's, e grande parte disso fica armazenado em lisossomas. Como resultado, as concentrações tóxicas de cobre acumulam-se, principalmente no fígado.(8,11)

A cirrose infantil indiana e a toxicose crónica idiopática são doenças hepáticas crónicas graves que se caracterizam pela acumulação excessiva de cobre hepático na infância, em oposição à Doença de Wilson, em que a acumulação de cobre ocorre mais tarde na vida. A etiologia dessas doenças raras e geralmente fatais foi conjecturada como uma combinação de um defeito genético desconhecido que afeta o metabolismo do cobre e a alta ingestão de cobre na dieta.(16)

Devido à falta de indicadores sensíveis e específicos, amostras de sangue, urina e cabelo são usadas para detetar a toxicidade do cobre. A concentração sérica de cobre e a ceruloplasmina são os indicadores mais usados, embora ambos os indicadores detetem apenas mudanças mais pronunciadas de cobre. Neste contexto, a síntese da ceruloplasmina tem sido proposta como um possível biomarcador do cobre, por ser regulada pela quantidade disponível no fígado.(8)

## 4. Doença de Menkes

### 4.1. Caracterização

A Doença de Menkes (DM) foi identificada pela primeira vez em 1937 por uma equipa australiana de investigação de médicos veterinários que relacionaram a deficiência em cobre com sintomas neurodegenerativos em ovelhas.(24) Mais tarde, em 1962, John Menkes e a sua equipa de investigação da Universidade de Columbia descreveram uma doença a partir de cinco crianças da mesma família de origem inglesa que apresentavam características em comum.(15,24) O que Menkes e a sua equipa descreveram foi uma deterioração neurológica progressiva após alguns meses de vida, alterações da textura capilar e problemas no desenvolvimento.(15,24)

Em 1972, Danks et al relacionou a textura pouco comum do cabelo (frágil) das crianças com DM com a lã produzida pelas ovelhas que pastavam em solos australianos com deficiência em cobre.(15,24) Esta relação levou-os a avaliar o metabolismo do cobre em sete doentes com DM e perceber que todos eles tinham níveis reduzidos de cobre sérico e ceruloplasmina.(15,24)

A DM é uma doença rara hereditária recessiva ligada ao cromossoma X que leva à mutação do gene ATP7A, também conhecida como doença de transporte de cobre, tricopoliodistrofia ou doença do cabelo crespo ou palha de aço.(15,20,24,25) Caracteriza-se por diversas mutações no sistema de transporte do cobre e deficiência na incorporação do cobre em enzimas específicas.(15,24) Encontram-se descritas duas formas da Doença de Menkes: (i) a clássica (retratada neste trabalho como DM), mais severa, e a (ii) Síndrome do Corno Occipital, em inglês *Occipital horn syndrome* (OHS), mais moderada (26).

Por ser uma doença hereditária recessiva ligada ao cromossoma X, os doentes são tipicamente do sexo masculino e as suas progenitoras são normalmente portadoras heterozigóticas da doença.(20)

Como a triagem neonatal para este distúrbio não está disponível, a deteção precoce não é frequente, uma vez que os sinais clínicos da DM são subtis no início. A doença raramente é tratada precocemente o suficiente para fazer uma diferença significativa. O prognóstico para bebés com DM é mau e a maioria das crianças com esta doença morre na primeira década de vida, muitos mesmo antes de completarem três anos.(26–28) No entanto, o prognóstico para os doentes que apresentam OHS é mais favorável em relação ao mencionado anteriormente, sendo a mortalidade infantil muito inferior.(29)

Os dados epidemiológicos publicados para a DM e suas variantes fenotípicas são limitados e dependem da investigação de casos e das taxas de natalidade, que podem conter fontes consideráveis de viés.(26)

As estimativas da incidência da DM variam muito de 1:40000, a 1:300000, e 1:354507. Essas estimativas representam prevalências com base em casos identificados da doença e dados de nascimento da Austrália, Europa Ocidental (Dinamarca, França, Países Baixos, Reino Unido e Alemanha) e Japão, respectivamente.(26,30)

## **4.2.Fisiopatologia**

A DM é então uma doença letal multissistêmica e neurodegenerativa, devido a uma deficiência no transporte do cobre.(30) Este déficit no transporte é consequência de mutações no gene ATP7A, que codifica uma ATPase, uma proteína transportadora de cobre envolvida no efluxo e transporte intracelular de cobre.(30,31)

Como mencionado anteriormente, o gene ATP7A pertence à grande família ATPase do tipo P, localizado no braço longo do cromossoma X (Xq13.3). Tem como funções transportar cobre através das membranas celulares, para a absorção de cobre do trato gastrointestinal, transporte através do sangue até à barreira hematoencefálica e manutenção de gradientes eletroquímicos assim como na homeostase lipídica e catiónica.(15,28,29,32,33) A proteína ATP7A está localizada na membrana do complexo de Golgi, e transporta o cobre do citosol para o interior do complexo de Golgi em resposta ao aumento das concentrações deste metal.(31)

Os diferentes fenótipos da DM podem ser atribuídos à diminuição da atividade de diferentes enzimas que utilizam o cobre como cofator, como a lisil oxidase, citocromo-c oxidase e dopamina- $\beta$ -hidroxilase.(30,31)

O mRNA do gene ATP7A é amplamente expresso em vários tecidos, mas a sua expressão é baixa ou mesmo nula no fígado. A mutação neste gene gera uma redução acentuada na primeira fase do transporte de cobre.(11,34)

Quando ocorre uma mutação, a metabolização e o transporte do cobre ficam comprometidos, havendo uma distribuição ineficaz deste, promovendo concentrações altas nos intestinos e músculos e concentrações baixas no fígado, encéfalo e plasma. A diminuição, ou até a ausência, da atividade funcional desta enzima transportadora origina acumulação de cobre no citosol das células, que por sua vez interfere com as funções das enzimas dependentes do cobre.(27)

A proteína ATP7A encontra-se envolvida numa infinidade de funções que incluem o crescimento axonal, integridade sináptica, respostas à ativação do recetor de N-metil-D-aspartato, transporte de cobre do trato gastrointestinal para a corrente sanguínea, distribuição intracelular de cobre para cuproenzimas (enzimas que são dependentes do cobre) e efluxo do excesso de cobre da célula.(29,34)

Em condições fisiológicas normais, em que a concentração de cobre no corpo é normal, ATP7A permanece na rede trans-Golgi e continua a transportar cobre para cuproenzimas. No entanto, quando a concentração de cobre intracelular total aumenta, o ATP7A expressa-se na membrana celular para promover o efluxo de cobre. Em condições de baixo teor de cobre, o ATP7A é encontrado na rede trans-Golgi, onde é essencial para a produção de cuproenzimas. Pelo contrário, em concentrações mais altas, localiza-se na membrana plasmática, onde é responsável pelo efluxo do cobre excedente da célula.(29)

Na barreira hematoencefálica, o ATP7A promove a passagem de cobre do sangue ao cérebro, através da membrana basal. Assim que o cobre atinge o líquido cefalorraquidiano forma complexos com a albumina e com a histidina. Em seguida, é transportado para os neurónios por meio de proteínas específicas de cobre, DMT1 e CRT1, e entregue por meio de *metalochaperons* à ATP7A.(34)

Nem todas as mutações genéticas do ATP7A conduzem à DM e ao OHS. Por outro lado, não existe uma correlação explícita entre as mutações genéticas e a evolução clínica da DM. Isso é salientado pela presença de variabilidade fenotípica interfamiliar e até intrafamiliar em doentes com DM/OHS portadores da mesma mutação ATP7A. Em geral, os doentes com um fenótipo menos severo têm maior proporção de mutações, que levam a uma proteína parcialmente funcional ou que resultam em quantidades reduzidas de uma proteína normal.(27)

### **4.3. Manifestações Clínicas**

#### **4.3.1. Manifestações da Doença de Menkes Clássica**

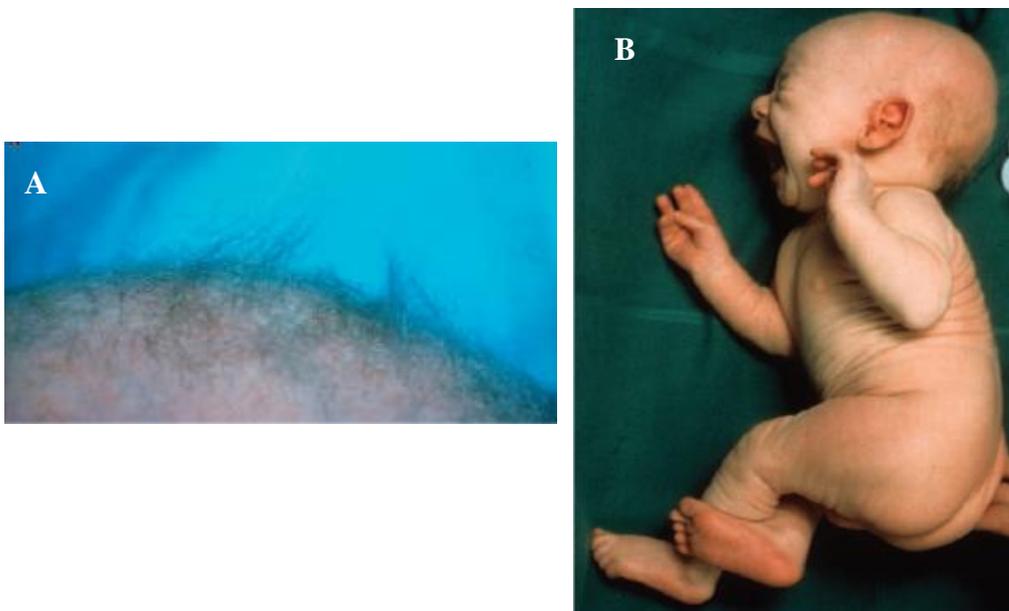
A DM Clássica é a forma mais grave desta patologia, em que o quadro clínico se caracteriza por uma neurodegeneração progressiva e uma disfunção acentuada do tecido conjuntivo.(27)

A gravidez da progenitora, portadora desta doença, ocorre normalmente sem complicações, podendo dar origem a um parto prematuro, devido à fraqueza das membranas; no entanto, a maioria dos doentes do sexo masculino nascem a termo e com medidas antropométricas adequadas.(32,35) Hematomas encefálicos e fraturas espontâneas são ocasionalmente

observados no decurso do nascimento. No período neonatal precoce, os doentes podem apresentar icterícia prolongada, hipotermia, hipoglicemia e dificuldades na alimentação.(27,30)

O primeiro sinal da doença pode ser cabelo raro, pouco pigmentado ou despigmentado disperso e sem brilho, que se assemelha a lã e fica emaranhado no topo da cabeça sendo uma característica da doença no primeiro ou segundo mês de vida.(27,30)

Nesse momento, a aparência da criança pode ser descrita como estranha: pele pálida, mandíbula mais pequena, bochechas rechonchudas e, por norma, alguma apatia. Estas crianças não se riem e têm dificuldade em controlar os movimentos da cabeça e em se sentarem. No entanto, estas alterações costumam ser subtis não constituindo sinais de alarme.(27,32,34)



**Figura 2 - Manifestações clínicas da Doença de Menkes: alterações capilares (A) e cutânea (B). Adaptado da referência (27).**

O desenvolvimento psicomotor inicial é normal, com balbucio e sorriso normais até cerca de 2–4 meses de idade. Após esta idade, o bebé deixa de se desenvolver e, gradualmente perde algumas das capacidades já desenvolvidas. O recuo no desenvolvimento torna-se óbvio por volta dos 5–6 meses de idade. A maioria dos doentes desenvolve convulsões resistentes à terapia por volta dos 2 a 3 meses de idade. Os sintomas adicionais são falta de crescimento, vômitos e diarreia.(27,30)

O tônus muscular é diminuído no início da vida e mais tarde é substituído por espasmos e fraqueza das extremidades. À medida que a disfunção motora progride, os movimentos espontâneos tornam-se limitados e surgem outros como sonolência e letargia. Os indivíduos

são geralmente diagnosticados com 3–6 meses de idade. Nesta altura, observam-se anomalias vasculares, urogenitais e esqueléticas, que são numerosas.(27,30)

Os doentes apresentam alterações esqueléticas, incluindo *pectus excavatum*<sup>1</sup> ou *pectus carrinatum*<sup>2</sup>, e fraturas espontâneas devido à osteoporose generalizada. As articulações são hiperextensíveis e pode ser observada pele flácida e seca. A dermatite seborreica espessa e escamosa também é uma característica frequente. A oftalmoscopia de rotina geralmente é normal, mas em fases da doença mais avançadas os doentes frequentemente deixam de seguir o estímulo visual. As manifestações tardias da doença são cegueira, hematoma subdural e insuficiência respiratória. A maioria destes sujeitos morre no terceiro ano de vida devido a infeções, complicações vasculares (como hemorragia cerebral súbita e maciça devido à rutura vascular) ou da própria degeneração neurológica.(27,36)

Os exames de imagem feitos a estes indivíduos mostram atrofia cerebral e cerebelar com atraso na mielinização. A angiografia por Ressonância Magnética à Imagem (RMI) revela uma aparência de "saca-rolhas" dos vasos cerebrais e radiografias simples do crânio geralmente revelam deformações (ossos wormianos).(37)

Estes doentes devem estar sujeitos a vigilância médica com alguma periodicidade de forma a avaliar a progressão da doença. Monitorizar os sintomas neurológicos como as convulsões e os espasmos musculares, avaliar o desempenho e as necessidades educacionais, averiguar eventuais infeções pulmonares, são algumas das preocupações que devem ser tidas em conta na consulta médica.(37)

#### **4.3.2. Manifestações do Síndrome do Corno Occipital**

O Síndrome do Corno Occipital, também conhecido como Ehlers-Danlos tipo IX, é uma variante alélica da Doença de Menkes e a forma mais ligeira descrita, com um tempo de sobrevida até à vida adulta é normal.(15,27)

As principais características clínicas estão relacionadas com o tecido conjuntivo. A principal distinção entre OHS e a DM Clássica é o diagnóstico através da observação radiográfica de calcificações em forma de cunha que se formam nos músculos trapézio e esternocleidomastóideo e se fixam no osso occipital nos indivíduos afetados.(15,27,29,38)

---

<sup>1</sup> O *Pectus Excavatum* é caracterizado por uma depressão na parede anterior do tórax, provocado pelo crescimento exagerado das cartilagens das costelas, que pode ser simétrica ou assimétrica.

<sup>2</sup> O *pectus carrinatum* é uma deformidade torácica caracterizada por um deslocamento do esterno na parede anterior do tórax.



**Figura 3 - Radiografia lateral do crânio de um doente de 23 anos com OHS. As exostoses occipitais (seta) não estão presentes ao nascimento e tornam-se proeminentes com a idade. Adaptado da referência (27).**

A gravidez da mãe portadora da doença geralmente ocorre de forma normal, sem complicações. A pele do bebê pode parecer enrugada e solta no nascimento, as hérnias umbilicais ou inguinais podem estar presentes e ser recorrentes. Em alguns dias, podem ocorrer hipotermia, icterícia, hipotonia e problemas de alimentação. Os problemas clínicos tornam-se gradualmente óbvios e os primeiros sinais que levam a criança ao médico podem ser diarreia intratável ou infecções recorrentes do trato urinário. Apesar desses problemas, o diagnóstico de OHS geralmente é feito apenas por volta dos 5 a 10 anos de idade.(27)

O desenvolvimento motor é atrasado devido à hipotonia muscular e está associado a falta de destreza o que não é muito comum. A altura é geralmente normal, mas, por outro lado, existe uma desproporção leve caracterizada por tronco longo, tórax e ombros estreitos, cifose toracolombar ou escoliose e deformidade *pectus*. A mobilidade do cotovelo é restrita e há uma tendência ao deslocamento dos cotovelos. A aparência facial torna-se gradualmente distinta.(27)

As características pouco comuns incluem rosto longo e fino, geralmente com testa alta, olhos inclinados para baixo, nariz proeminente e orelhas salientes. A extensão da flacidez da pele é variável e pode aumentar com a idade, resultando em rugas caídas ao redor do tronco. Alguns

doentes podem ter cabelos sem brilho e bastante ásperos. Anomalias vasculares, como veias varicosas, são comuns, e aneurismas arteriais também já foram descritos. Um problema específico é a hipotensão ortostática. A capacidade intelectual é descrita como baixa e limitada quando comparada ao normal desenvolvimento cognitivo.(15,27,34)

O quadro clínico é caracterizado por diarreia crônica, divertículos vesicais com infecções recorrentes do trato urinário e instabilidade articular nas extremidades inferiores e limitações nos cotovelos.(15,27)

É recomendável que os indivíduos com OHS tenham vigilância médica periódica, tal como para a DM, para avaliar o progresso cognitivo, algumas disfunções anatômicas e divertículos vesicais(37). A história natural de doentes com OHS não é bem conhecida devido à escassez de pessoas afetadas nas quais foi relatado acompanhamento a longo prazo. Existem potenciais complicações vasculares que podem ser antecipadas para estes indivíduos em termos dos problemas do tecido conjuntivo, acidentes vasculares cerebrais ou outros eventos cardíacos em sujeitos com este fenótipo.(24)

#### **4.4.Diagnóstico**

O diagnóstico precoce da Doença de Menkes representa ainda nos dias de hoje, um desafio na medida em que necessita de uma apropriada interpretação dos biomarcadores e do quadro clínico, para ser fiável.(34)

O diagnóstico não é difícil quando surgem as características clínicas, como convulsões intratáveis, disfunções do tecido conjuntivo, hemorragia subdural e anomalias capilares. O diagnóstico e o tratamento precoces são essenciais para o prognóstico neurológico da doença.(34)

O diagnóstico inicial da DM é sugerido por características clínicas (especialmente alterações capilares típicas) e apoiado pela demonstração de níveis reduzidos de cobre sérico e ceruloplasmina. No entanto, no período neonatal, estes marcadores devem ser interpretados com cuidado, pois os seus níveis são baixos também em recém-nascidos saudáveis.(27) A distinção para níveis normais torna-se clara a partir das 2 a 3 semanas de idade, quando os níveis basais de cobre sérico e ceruloplasmina aumentam.(32)

Para avaliar as alterações capilares, é utilizada a técnica de microscopia ótica, que permite observar individualmente os fios de cabelo do indivíduo, confirmando que se encontram

torcidos sobre os seus próprios eixos (*pili torti*) e que apresentam diferentes diâmetros (*Monilethrix*), bem como uma fragmentação em intervalos regulares (*Trichorrhaxis nodosa*). No entanto, estas alterações nem sempre são visíveis nas primeiras semanas de vida, o que, aliado ao facto de se poder observar estas mesmas anomalias noutras situações patológicas, faz com que se prefira a realização de outros métodos de diagnóstico mais.(27,32,34)



**Figura 4 - Microscopia capilar (x 100) de haste de cabelo torcida (*pili torti*) (em baixo) e uma mecha de cabelo normal (em cima). Adaptado da referência (27).**

Os níveis de cobre são extremamente baixos em circulação, no cérebro e no fígado, mas muito mais elevados no intestino e nos rins.(32) A deteção bioquímica da acumulação intracelular de cobre é um dos testes realizados, em particular no período neonatal. São então utilizadas culturas celulares de amniócitos do feto ou fibroblastos, nos quais é medida a quantidade retida de cobre radioativo ( $^{64}\text{Cu}$ ), após 20h de exposição.(32,33)

A atividade de várias enzimas de cobre, como a citocromo-c oxidase e a dopamina- $\beta$ -hidroxilase, é reduzida, como resultado da baixa concentração sérica de cobre.(32,34,39) Desta forma, é esperado que: (i) os valores de lactato no líquido cefalorraquidiano estejam aumentados, como consequência da deficiência em citocromo-c oxidase; (ii) os níveis de catecolaminas estejam alterados quer no sangue quer no líquido cefalorraquidiano, com níveis elevados de  $\beta$ -dihidroxifenilalanina (DOPA) e ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), e baixos níveis de dihidroxifenilglicol (DHPG), servindo como indicador de atividade reduzida de dopamina- $\beta$ -hidroxilase. Como resultado, o ratio de DOPA:DHPG é significativamente elevado e pode ser usado para diagnóstico.(27,32,34,40) Também os níveis de catecolaminas no plasma e no líquido cefalorraquidiano são biomarcadores sensíveis e específicos da doença na primeira infância.(33)

A maioria dos indivíduos com DM mostra anomalias moderadas a graves no eletroencefalograma apesar de alguns doentes mostrarem apenas alterações leves em comparação com o eletroencefalograma normal. O grau de irregularidades no

eletroencefalograma parece estar relacionado com a gravidade do comprometimento do neuro desenvolvimento.(32) Outras análises laboratoriais, como incluem a cisturografia, arteriografia, tomografia computadorizada, RMI e radiografia, as quais se revelam úteis na detecção de diferentes características clínicas da doença.(27)

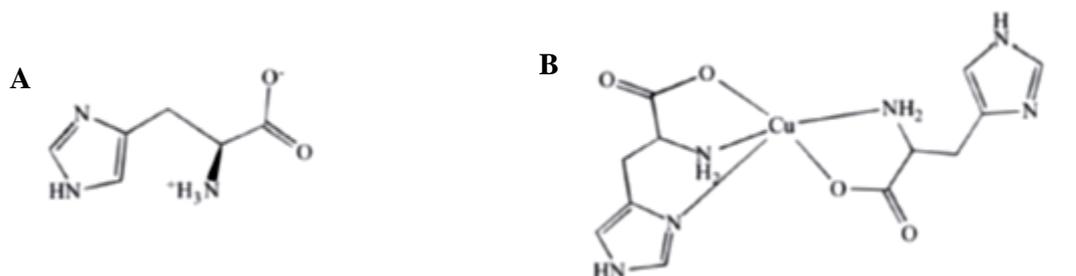
Devem ser suspeitos de OHS indivíduos do sexo masculino com hipotonia muscular e flacidez da pele. Estes doentes podem ser examinados por uma simples radiografia do cérebro para identificar exostoses nos ossos occipitais. Como o cobre e a ceruloplasmina séricos podem variar de níveis normais a baixos em doentes com OHS, o diagnóstico não pode ser feito apenas com base nos níveis séricos destes parâmetros.(41)

Apesar de todos os testes de diagnóstico possíveis, o diagnóstico genético, e essencialmente o diagnóstico pré-natal é a melhor ferramenta para uma detecção precoce da DM. Com efeito, é possível analisar as mutações mais frequentes numa determinada família, contudo esta é uma análise morosa devido ao elevado número de mutações e ao tamanho do gene.(30)

#### **4.5.Terapêutica Farmacológica**

Não existe ainda cura para esta doença, pelo que, o tratamento é essencialmente sintomático. O objetivo de um tratamento específico para a DM é fornecer cobre extra aos tecidos e enzimas dependentes deste metal.(27,30) A DM não tratada está associada a um declínio neurológico que começa na primeira infância o qual, uma vez estabelecido, é irreversível.(26,30)

A abordagem farmacológica da DM consiste em terapia de reposição de cobre em que se deve ter em consideração que a absorção intestinal é praticamente nula; os doentes devem ser identificados e o tratamento iniciado o mais cedo possível na vida, o cobre circulante deve ser fornecido ao cérebro e deve estar disponível nas células para a síntese de cuproenzimas.(38) A administração oral de cobre é pouco eficaz por o cobre ser fracamente absorvido, sendo a administração mais habitual por via parenteral: subcutânea e intravenosa.(27,32) Vários complexos de cobre - incluindo cobre-histidina; acetato, gluconato e sulfato de cobre e cobre-EDTA – têm sido utilizados para o tratamento.(27,32,39)

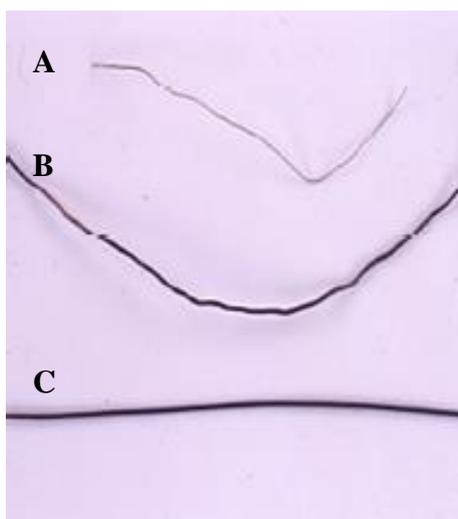


**Figura 5 – (A) Estrutura da histidina e do (B) complexo Cu(II)-bis (L-histidina). Adaptado da referência (35).**

Nenhum destes tratamentos foi considerado como tratamento benéfico para a deterioração neurológica, embora eles melhorem os níveis séricos de cobre e ceruloplasmina. Entre as diferentes formas de cobre, foi relatado que o complexo cobre-histidina atravessa a barreira hematoencefálica de forma mais eficiente, portanto tem sido utilizada para o tratamento.(27,32,38)

Contudo, o início do tratamento poderá determinar a sua eficácia para os efeitos neurológicos, por isso, quanto mais cedo for iniciado maior poderá ser o benefício para o indivíduo.(32) O tratamento precoce, entre os 10 a 28 dias de vida com injeções subcutâneas de cobre-histidina durante três anos tem sido associado a melhores desfechos clínicos, reduzindo a mortalidade de menores de três anos em comparação com indivíduos não tratados.(26,33) A dose recomendada de cobre-histidina é 200–1000  $\mu\text{g}$  uma vez por dia ou 2–3 vezes por semana. A dose é ajustada em função das concentrações plasmáticas de cobre e de ceruloplasmina, da excreção urinária de cobre e da concentração de cobre no fígado. Apesar disso, os benefícios mencionados não são observados em alguns indivíduos portadores de DM, podendo tal facto estar associado aos diferentes níveis de atividade residual da ATPase.(32)

No entanto, os indivíduos afetados que apresentam mutações ATP7A com perda de função severa costumam responder com menos sucesso à intervenção precoce com cobre-histidina. A presença de um nível primitivo de atividade ATP7A no cérebro destes otimizaria claramente a probabilidade de evitar os efeitos neurológicos mais devastadores da doença.(33)



**Figura 6 - Anomalias capilares, melhoraram após o tratamento. (A) Antes do tratamento; (B) depois do tratamento; (C) cabelo normal. Adaptado da referência (41).**

O tratamento precoce não melhora na totalidade os problemas não neurológicos, como a disfunção do tecido conjuntivo e alterações ósseas, mesmo em doentes que apresentem um bom desempenho neurológico. Isto sugere que a atividade da lisil oxidase não pode ser corrigida pela administração de cobre-histidina. Quando o tratamento é iniciado após os 2 meses de idade, não há melhoria da deterioração neurológica nem do tecido conjuntivo laxo ou alterações ósseas, embora possam melhorar os níveis séricos de cobre e ceruloplasmina e as anomalias capilares.(32)

Em Portugal, o Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos é o único produtor de cobre-histidina para doentes com Doença de Menkes,(43) disponibilizando-o para o Serviço Nacional de Saúde. Na fase de ensaios clínicos, encontra-se a formulação injetável CUTX-101 (complexo de cobre-histidina) desenvolvida pela Cyprium Therapeutics.(42)

Atualmente, estão a ser desenvolvidos estudos no sentido da terapia genética, envolvendo a investigação de terapias recombinantes com AAV5/AAV9 (*adeno-associated virus* serotipo 5 e 9, respetivamente) dirigidas ao cérebro, que expressam ATP7A. A investigação desenvolvida aponta para um efeito sinérgico entre a administração concomitante de cobre-histidina com a terapia génica. Estes estudos, que se encontram ainda na fase de utilização de murganhos como modelos animais, têm conduzido a resultados promissores.(24,27,33,36,40,44)

# 5. Doença de Wilson

## 5.1. Caracterização

A Doença de Wilson (DW) foi descrita pela primeira vez em 1912 por Kinnier-Wilson, um neurologista americano, que trabalhava no Hospital Nacional de Queen Square em Londres. A sua descrição referia-se a um distúrbio neurológico associado à degeneração lenticular progressiva do cérebro, e que envolvia o aparecimento de cirrose hepática.(23,43–45) Só mais tarde, o parkinsonismo, que é uma síndrome clínica que se manifesta com bradicinesia, instabilidade postural, tremor de repouso e rigidez, foi reconhecido como uma das principais características clínicas da DW.(43)

Algumas décadas depois, em 1948, Cumings demonstrou pela primeira vez que a DW era causada pela elevada deposição de cobre no fígado e no cérebro, o que levou à classificação desta doença como um distúrbio do metabolismo do cobre.(23,44,45) Em 1951, começaram a surgir as primeiras hipóteses de tratamento, começando pelo 2,3-dimercaptopropanol (conhecido como British anti-Lewisite, BAL), e depois com penicilamina, trientina, zinco e ainda tetratiomolibdato, que serão descritos adiante.(43)

A DW é também conhecida como degeneração hepatolenticular, um distúrbio hereditário autossômico recessivo causado por mutações bialélicas no gene ATP7B. Esta perda de função do transportador ATPase leva posteriormente à deposição cumulativa de cobre nos órgãos-alvo e prejudica as funções normais dos órgãos afetados.(28,46–48) O cobre livre em excesso leva a efeitos citotóxicos nos tecidos hepático e nervoso central, sendo responsável pelos diferentes fenótipos da doença como problemas hepáticos, neurológicos ou psiquiátricos. Mutações no gene ATP7B são a única causa conhecida da DW.(48)

A frequência do portador é estimada em 1:90 a 1:100 com a prevalência da doença entre 1:30000 a 1:100000 indivíduos, dado o risco de 25% de herança de duas mutações.(47–49) Existem algumas populações onde há um aumento na incidência de doença que se pensa estar relacionado à consanguinidade, com a presença de mutações frequentemente dominantes de ATP7B.(47,49,50) Várias populações com maior prevalência foram identificadas, como na Sardenha, onde a frequência da doença é estimada de 1:10000 a 1:7000.(48) A prevalência da doença é maior na China e nos países asiáticos em relação aos países ocidentais.(49)

Em Portugal, a incidência no período entre 2005 e 2008 foi de 0,93:1000000 habitantes, estimando-se que neste mesmo espaço de tempo tenham surgido cerca de 10 novos casos de acordo com os dados obtidos pela eurowilson.org.

Os sintomas variam amplamente e manifestam-se comumente entre os 5 e os 50 anos de idade.(28,44,49) Os sinais e sintomas clínicos variam muito entre os indivíduos afetados, mesmo dentro de uma única família.(44,51) Durante o início da vida, os doentes não apresentam quaisquer sintomas, mas estão a acumular cobre, o que invariavelmente causa doença hepática subclínica. Só mais tarde, surgem as manifestações hepáticas, neurológicas e psiquiátricas.(43)

A idade influencia a apresentação específica da DW. Quase todos os indivíduos que apresentam doença hepática têm menos de 30 anos de idade, enquanto aqueles que apresentam sinais neurológicos ou psiquiátricos podem variar em idade da primeira à quinta década. Isso reflete a sequência de eventos na patogénese da doença. No entanto, independentemente da apresentação clínica, algum grau de doença hepática está invariavelmente presente.(24)

A doença hepática ocorre classicamente em indivíduos com DW que são sintomáticos e diagnosticados desde a infância até a idade adulta. As manifestações neurológicas e psiquiátricas são mais frequentes em indivíduos mais velhos, onde o envolvimento hepático pode ser menos pronunciado. Além disso, já foram relatados início muito tardio (após os 70 anos) e início muito precoce (nove meses de idade) da doença de Wilson, sendo a idade média de início os 15,9 anos.(44,51) Nas crianças, a apresentação mais frequente é a hepatite, com idade média de aparecimento aos 10-13 anos.(52)

Se a DW for diagnosticada numa fase inicial e o indivíduo for submetido a um tratamento apropriado ao longo da vida, estes melhoram e, muitas vezes ficam assintomáticos pelo resto da vida.(28,51) No entanto, características típicas como anéis de Kayser-Fleischer da córnea ou baixos níveis de ceruloplasmina séricos podem estar ausentes e, portanto, atrasar o diagnóstico.(28) Além disso, há uma extensa heterogeneidade clínica, com sintomas que são amplamente inespecíficos, tornando difícil o diagnóstico da doença. Na verdade, o atraso do diagnóstico da doença de Wilson é a principal causa de morte para esta condição.(28,51)

O desenvolvimento clínico da DW é altamente variável. Embora os sintomas sejam geralmente graduais a sua progressão, pode piorar subitamente com e sem tratamento. Observam-se flutuações diárias da gravidade dos sintomas. Antes de se fazer tratamento, a sobrevida média após o desenvolvimento de sintomas neurológicos era entre 2 e 5 anos, mas a DW pode progredir lentamente ao longo de mais de 25 anos. Na ausência de tratamento, os sintomas

neuroológicos são progressivos e inevitavelmente fatais, sendo, no entanto, favorável após a terapia.(55)

Com o tratamento de quelação e o transplante de fígado, a sobrevida prolongada tornou-se normal, embora a mortalidade não tenha sido avaliada prospectivamente. Em geral, o prognóstico depende da gravidade da doença hepática e neurológica e da adesão ao tratamento farmacológico. A função hepática torna-se normal após 1–2 anos de tratamento na maioria dos doentes sem cirrose ou com cirrose compensada. Foi desenvolvido um índice de prognóstico da doença (Tabela 2). Este índice avalia a bilirrubina sérica ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), a AST ( $\text{U L}^{-1}$ ), o INR, a contagem de Leucócitos ( $10^9/\text{L}$ ) e a Albumina ( $\text{g L}^{-1}$ ). Os casos de pontuações iguais ou superiores a 11 são maioritariamente fatais, se não for realizado o transplante hepático.(53)

**Tabela 2 - Índice de Prognóstico na Doença de Wilson. Adaptado da referência (53).**

Pontuação	1*	2*	3*	4*
<b>Bilirrubina sérica (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	100-150	151-200	201-300	>300
<b>AST (<math>\text{U L}^{-1}</math>)</b>	100-150	151-300	301-400	>400
<b>INR</b>	1.3-1.6	1.7-1.9	2.0-2.4	>2.4
<b>Leucócitos (<math>10^9 \text{L}^{-1}</math>)</b>	6.8-8.3	8.4-10.3	10.4-15.3	>15.3
<b>Albumina (<math>\text{g L}^{-1}</math>)</b>	34-44	25-33	21-24	<21

\* Pontuação, limite superior ao normal para AST=20 UI mL<sup>-1</sup>. Uma pontuação  $\geq 11$  está relacionada a uma elevada probabilidade de morte, na ausência de transplante hepático.

Doentes que apresentem sintomas neurológicos têm quase sempre um prognóstico mais favorável, em particular quando a doença hepática é limitada. No entanto, os sintomas neurológicos são apenas parcialmente reversíveis com o tratamento e podem, inclusive, piorar após o início do tratamento.(53)

## 5.2.Fisiopatologia

A DW tem origem numa mutação ocorrida no gene ATP7B, constituído por 21 exões, que está localizado no braço longo do cromossoma 13, na região q14.3.(22,28) O gene, codifica uma proteína de 1411 aminoácidos, uma ATPase (ATP7B) tipo P situada no complexo de Golgi dos hepatócitos.(18,54,55) Como já referido, A ATP7B é altamente expressa no fígado, rim e

placenta e é responsável pelo transporte do cobre a partir de proteínas *chaperons* intracelulares na via secretora, para a excreção biliar e para a incorporação na apoceruloplasmina para a síntese de ceruloplasmina.(54,55)

A ATP7B é redistribuída em vesículas citoplasmáticas, onde transporta o excesso de cobre através da membrana apical do hepatócito para o canalículo biliar para posterior excreção biliar. Em indivíduos com DW, a mutação no gene ATP7B resulta na proteína ATP7B defeituosa que não consegue realizar essas funções. Consequentemente, o cobre acumula-se progressivamente nos hepatócitos. Esta crescente acumulação compromete não só a função hepática, mas também a capacidade de armazenamento hepático que é eventualmente excedida e o cobre não ligado começa por ser depositado noutros órgãos e tecidos, onde também provoca danos e disfunção. Como a capacidade de armazenamento do fígado é perdida, a excreção urinária de cobre aumenta drasticamente, não tendo capacidade de compensar totalmente a deficiente excreção biliar. Supõe-se que o dano celular característico da DW seja devido a um efeito tóxico direto do excesso de cobre.(55)

No entanto, evidências recentes, sugerem que uma redução na proteína, inibidora da apoptose ligado ao X (XIAP, do inglês X-linked inhibitor of Apoptosis), induzida pela elevação do cobre, resulta na aceleração da apoptose iniciada pela caspase 3 com morte celular resultante. Por causa do defeito na incorporação de cobre mediada por ATP7B na apoceruloplasmina, a deficiência de ceruloplasmina também é característica da DW.(56)

Uma baixa incorporação de cobre na ceruloplasmina e um defeito na excreção biliar de cobre são induzidos por mutações que prejudicam a função das ATPases cúpricas. Estas mutações induzem toxicidade devido ao excesso de acumulação de cobre, predominantemente no fígado, seguido do cérebro.(54) No entanto, essa deficiência não está universalmente presente nem permite um diagnóstico absoluto da DW. Até 5 a 15% dos indivíduos com DW podem ter ceruloplasmina normal ou ligeiramente reduzida, enquanto 10 a 20% dos heterozigotas que são clinicamente assintomáticos têm ceruloplasmina reduzida.(55)

Estão descritas mais de 600 mutações, das quais 380 têm um papel confirmado na patogénese da DW.(44,53,57) A distribuição e a frequência das mutações varia consoante a localização geográfica e a população estudada.(44)

## 5.3. Manifestações Clínicas

### 5.3.1. Manifestações Hepáticas

Em cerca de 40 a 50% dos indivíduos com DW, a disfunção hepática é a manifestação clínica inicial. É raro que os sintomas comecem antes dos 5 anos de idade, embora a doença de Wilson já tenha sido diagnosticada aos 2 anos de idade.(55) As manifestações hepáticas podem-se dividir em quatro apresentações principais: hepatite aguda, hepatite aguda fulminante, hepatite crônica ativa e cirrose, existindo no entanto outras manifestações hepáticas.(43,56,58) A DW entra no diagnóstico diferencial de qualquer doente jovem que apresenta hepatite aguda.(53)

A maioria dos doentes com sintoma neurológicos apresenta algum grau de doença hepática, os sintomas podem ser altamente variáveis, desde assintomáticos com algumas variações bioquímicas até cirrose evidente.(53)

A insuficiência hepática aguda devido à DW ocorre predominantemente em mulheres jovens (proporção mulher: homem 4: 1). Uma apresentação aguda com deterioração rápida também pode ocorrer em indivíduos que foram tratados anteriormente, mas interromperam o tratamento. A suspeita de DW aguda deve ser particularmente alta em doentes com icterícia acentuada, hemoglobina baixa, colinesterase baixa, transaminases levemente aumentadas e fosfatase alcalina baixa.(53) A DW também pode aparecer como hepatite fulminante aguda. Na verdade, 5% de todos os casos de insuficiência hepática aguda são devidos à doença de Wilson. Nesse enquadramento, conduz a uma taxa de mortalidade atinge valores extremamente elevados.(55)

A DW é responsável por 6-12% de todos os indivíduos com insuficiência hepática aguda que são encaminhados para transplante de emergência. Embora a cirrose já esteja presente na maioria dos casos, o quadro clínico é agudo e evolui rapidamente para insuficiência hepática e renal e, quando não tratada, acarreta mortalidade de quase 95%.(53)

A anemia hemolítica com teste de Coombs negativo pode ser o único sintoma inicial da DW.(53) A anemia hemolítica pode decorrer dos efeitos tóxicos diretos do cobre nas membranas dos glóbulos vermelhos e geralmente está associada à libertação de grandes quantidades de cobre armazenado, um fenómeno que pode ser súbito e com consequências graves.(24) A hemólise acentuada está comumente associada a doença hepática grave.(53) A hemólise de baixo grau pode estar associada à DW, mesmo quando a doença hepática não é clinicamente evidente.(53) Doentes com histórico de icterícia podem ter tido hemólise.(53) No cenário de insuficiência hepática fulminante, a presença de anemia hemolítica concomitante

pode ser uma pista diagnóstica importante para a DW. A trombocitopenia também pode se desenvolver, em conjunto com a anemia hemolítica ou separadamente.(55)

Muitos doentes apresentam sinais de doença hepática crônica e evidências de cirrose que pode ser compensada ou descompensada. Estes doentes podem apresentar esplenomegalia isolada devido à cirrose clinicamente assintomática com hipertensão portal. Podem manifestar-se outros sintomas que incluem icterícia, mal-estar geral e queixas abdominais.(53,55,59) A cirrose não tem características específicas da DW. Por causa dos vários modos de apresentação hepática que a DW pode assumir, qualquer indivíduo com idade inferior a 50 anos com doença hepática inexplicada deve ser rastreado para a DW.(55) Os neurologistas têm de estar atentos se existir um doente com encefalopatia hepática aparentemente não explicada, uma vez que pode ser consequência de insuficiência hepática crônica.(60)

### **5.3.2. Manifestações neurológicas**

A idade média de aparecimento de sintomas varia entre os 15 e os 21 anos. Doentes com manifestações neurológicas representam aproximadamente 40 a 50% dos doentes. A evolução da doença é altamente variável, e apesar dos sintomas serem normalmente progressivos podem verificar-se agravamentos repentinos, com ou sem tratamento, assim como flutuações da severidade dos sintomas de um dia para o outro.(43,61)

As principais manifestações neurológicas da DW são predominantemente extrapiramidais como a disartria, distonia, parkinsonismo, tremor, comprometimento cognitivo e coreia e atetose. Os sintomas neurológicos geralmente são secundários à deposição de cobre cerebral, que é suficiente para lesar e destruir as células nervosas. A prevalência das manifestações neurológicas é em ordem decrescente a seguinte: disartria, distonia, parkinsonismo, distúrbios cerebelares, coreia e atetose. A prevalência de comprometimento cognitivo é rara.(48,60,62,63)

A disartria é um distúrbio motor da fala caracterizado por movimentos da fala imprecisos, lentos, fracos e descoordenados. Pode resultar de qualquer condição que danifique as estruturas de controle motor necessárias para a produção da fala, incluindo lesões dos neurónios motores inferiores dos nervos cranianos IX, X e XII, distúrbios cerebelares ou dos gânglios da base. Todos os componentes do mecanismo da fala podem ser afetados de diferentes maneiras, como características associadas à articulação, fonação, respiração e ressonância.(43,62)

A distonia descreve uma condição neurológica caracterizada por contrações musculares involuntárias sustentadas ou intermitentes que produzem movimentos repetitivos e anomalia

postural. A manifestação clínica da distonia na DW é ampla. Ela varia de casos leves a doença grave e pode manifestar-se com sintomas focais, segmentares, multifocais ou generalizados. A manifestação focal inclui torcicolo, blefaroespasmos e *risus sardonicus* (espasmos dos músculos faciais). A última manifestação é a apresentação mais característica e traduz-se num sorriso fixo devido à disfunção do músculo risório. A distonia focal das cordas vocais e do músculo da articulação pode produzir disfonia, disartria e disfagia. Numa fase inicial da doença, a localização predominante dos sintomas é unilateral. Através de RMI mostrou-se que o putamen é a principal estrutura afetada na distonia.(43,60,62)

Na DW, o parkinsonismo geralmente apresenta-se de forma simétrica, mas os tremores revelam-se unilaterais, diferenciando-se da Doença de Parkinson idiopática.(48,62)

### **5.3.3. Manifestações Psiquiátricas**

Cerca de 50–70% das pessoas com DW têm sintomas psiquiátricos, uma situação mais frequentemente observada em pessoas que também apresentam disfunção neurológica, refletindo a origem de ambos no sistema nervoso central.(55,64) Estas manifestações variam de distúrbios comportamentais a distúrbios afetivos, sintomas psicóticos e a défice cognitivo. Os sintomas psiquiátricos podem representar o início da doença ou manifestar-se durante o curso da mesma.(64) As manifestações mais frequentes são os distúrbios no humor que engloba alterações na personalidade e comportamentais.(43)

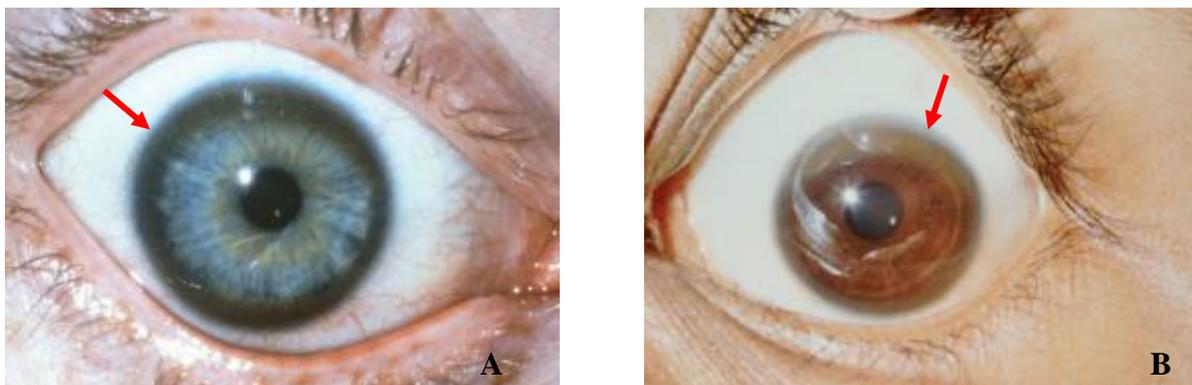
As manifestações psiquiátricas apresentam-se até 30 a 50% das vezes antes do diagnóstico da DW. Como os sintomas psiquiátricos são frequentemente mal definidos e atribuídos a outras causas, o diagnóstico da DW raramente é feito durante o período em que os sintomas psiquiátricos são a única manifestação, contribuindo para o atraso no diagnóstico.(43)

A primeira manifestação psiquiátrica da DW pode ocorrer na infância e aparecer como declínio no desempenho escolar, comportamento inadequado ou impulsividade. Na população adulta é comum observarem-se mudanças comportamentais e de personalidade, ansiedade, depressão, síndrome maníaca e hipomaníaca, problemas de sono e disfunções sexuais, incluindo desejo sexual excessivo. A maioria dos doentes desenvolve pelo menos um dos sintomas psiquiátricos referidos, durante o curso da doença.(65)

Para além da alteração destes comportamentos, poderão ainda ocorrer em algumas situações depressão reativa, derivada dos fatores ambientais e sociais, podendo culminar até em tentativas de suicídio.(43,55,65)

### 5.3.4. Manifestações Oftálmicas

As manifestações oftálmicas mais comuns na DW incluem os anéis de Kayser-Fleischer, que se definem como depósitos de cobre na córnea dentro da membrana de Descemet, aparecendo como uma camada granular pigmentada, resultante do excesso deste metal no fígado.(49,58,66) É de salientar que o cobre está presente em toda a córnea, no entanto, devido ao fluxo de fluido, este tende a acumular-se na região superior e depois na região inferior.(49) Estes anéis não perturbam a visão, sendo normalmente visíveis a olho nu ou observados através de um exame de lâmpada de fenda.(49,56,67,68) Os anéis que são vistos na maioria dos doentes com envolvimento neurológico da doença de Wilson, encontram-se em apenas 50% dos doentes com envolvimento hepático isolado e em doentes pré-sintomáticos. Estes depósitos podem estar ausentes em doentes com doença fulminante e a frequência de anéis na maioria das crianças e jovens assintomáticos é baixa.(56,68)



**Figura 7 - (A) Anel de Kayser-Fleischer castanho, em torno de uma íris azul; (B) Anel de Kayser-Fleischer com tonalidade cinzenta. Adaptado de referência (66).**

O depósito de cobre nem sempre forma um anel completo, começando inicialmente por formar arcos.(66) Estes arcos começam por crescer lateralmente e eventualmente juntam-se para formar um anel completo.(66) A deposição do cobre estende-se da margem central a profundidades variadas, dependendo da duração da doença. Os depósitos são mais densos na periferia, desvanecendo-se centralmente. Em indivíduos tratados com agentes quelantes os anéis vão desvanecendo, primeiro quebram lateralmente, em seguida, dissipam-se em pequenos segmentos antes de desaparecerem completamente. À medida que o cobre é removido, a superfície profunda da córnea aparenta ter cicatrizes ou furos. Este é um sinal valioso de que o tratamento está a ser eficaz.(66)

Em termos visuais, o anel circunda a periferia da íris. Visto em indivíduos com íris azul, o anel parece mais castanho, quando visto sobre uma íris castanha, às vezes pode parecer cinza e, quando visto sob luz infravermelha, o anel parece verde.(49,66)

Os anéis de Kayser-Fleischer não são exclusivos da DW e, apesar de raro, podem ser encontrados noutras doenças hepáticas, como a colestase neonatal.(58,66–68)

As cataratas de girassol também constituem uma manifestação oftalmológica apenas observável, apenas em aproximadamente 17% dos doentes.(67) O cobre deposita-se no cristalino na cápsula anterior e posterior e formam um disco central com folhas radiantes, semelhantes pétalas de girassol.(49,67) A catarata do girassol não prejudica a visão e não pode ser vista a olho nu e requer avaliação com lâmpada de fenda para deteção.(67)

Manifestações oftalmológicas mais raras incluem cegueira noturna, neurite ótica e palidez do disco ótico.(56)

### **5.3.5. Outras Manifestações**

Além das características descritas anteriormente os indivíduos com DW podem ter uma variedade de outras manifestações clínicas menos frequentes uma vez que o cobre em níveis elevados tem uma ação tóxica que pode provocar variados sinais e sintomas.(43)

O envolvimento ósseo e articular (especialmente nos joelhos e punhos) são componentes pouco reconhecidos da DW, mas que podem ocorrer. O excesso de deposição de cobre no osso e na cartilagem pode dar origem a artrites ou artralguas, podendo ocorrer fraturas espontâneas devido a osteoporose ou osteomalacia.(43,55) Nas crianças pode ocorrer um comprometimento músculo-esquelético e dor que, de forma errada, pode direcionar para o diagnóstico de reumatismo.(57)

Nas doentes do sexo feminino pode ocorrer diminuição dos níveis de estradiol e aumento das concentrações de testosterona secundárias à disfunção hepática. Como consequência sucedem-se anomalias do foro ginecológico como irregularidade menstrual, puberdade tardia, ginecomastia, amenorreias e abortos espontâneo.(24,55,57) Podem ainda estar presentes doença pancreática, hipoparatiroidismo e anomalias cutâneas como hiperpigmentação.(43,55)

A disfunção tubular renal na DW leva a perdas irregulares de aminoácidos, eletrólitos, cálcio, fósforo e glicose. Podem ocorrer eventos ao nível da função tubular renal, com consequente acidose tubular renal, amino-acidúria, síndrome nefrótica, hipercalcúria e hiperfosfatúria, hipocaliemia com fraqueza muscular e até mesmo insuficiência respiratória e cardiomiopatia.

O comprometimento renal é raro como sintoma inicial da DW, enquanto a nefrolitíase é frequentemente vista e pode ser uma manifestação precoce da doença.(43,48,55,57)

## **5.4.Diagnóstico**

As manifestações clínicas da DW apresentam variações consideráveis, tornando o diagnóstico precoce um desafio. O intervalo de tempo médio entre a apresentação dos sintomas iniciais e o diagnóstico é aproximadamente 18 meses para doentes com sintomas neurológicos e 6 meses para doentes com sintomas hepáticos.(41)

A combinação de anéis de Kayser-Fleischer e um nível baixo de ceruloplasmina sérica é suficiente para estabelecer um diagnóstico. Quando os anéis de Kayser-Fleischer não estão presentes, os níveis de ceruloplasmina nem sempre são suficientes porque podem estar baixos por outras razões que não a DW (por exemplo, hepatite autoimune, insuficiência hepática grave).(47,53) Desta forma, é necessária uma combinação de testes.

Neste contexto, na 8ª Conferência Internacional sobre a DW realizada em Leipzig (Alemanha) em 2001, um grupo de trabalho desenvolveu uma escala de classificação baseada num número alargado de parâmetros bioquímicos e clínicos, incluindo também testes genéticos, e apelidada de critérios de Leipzig. A sua utilização tem sido validada em populações adultas e pediátricas e incorporada nas diretrizes apresentadas pela *American Association for the Study of Liver Diseases* (AASLD) em 2003 e revista em 2008, pela *European Association for the Study of the Liver* (EASL) em 2012, e pela *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN) em 2018.(47,69,70)

### **5.4.1. Determinação da Ceruloplasmina Sérica**

Como já referido, a ceruloplasmina é o principal transportador de cobre no sangue. Este transportador contém seis átomos de cobre por molécula, designando-se de holoceruloplasmina. Os níveis de ceruloplasmina sérica podem ser medidos enzimaticamente pela sua atividade oxidase dependente de cobre em relação a substratos específicos ou por ensaios dependentes de anticorpos como o radioimunoensaio e a imunodifusão radial.(53)

A ceruloplasmina sérica encontra-se tipicamente diminuída em doentes com doença neurológica de DW, mas pode estar na faixa normal-baixa em cerca de metade dos doentes com doença hepática de DW ativa. Pode também estar baixa noutras condições como perda

acentuada de proteína renal ou entérica, síndromes de má absorção, doença hepática terminal grave ou em recém-nascidos saudáveis.(47,53,71)

Normalmente, a combinação de anéis de Kayser-Fleischer e um nível baixo de ceruloplasmina sérica ( $<0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) é suficiente para estabelecer um diagnóstico. Quando os anéis de Kayser-Fleischer não estão presentes (como é comum na manifestação hepática da doença de Wilson), os níveis de ceruloplasmina nem sempre são confiáveis porque podem estar baixos por outras razões que não a doença de Wilson (por exemplo, hepatite autoimune, insuficiência hepática grave).(47,53)

#### **5.4.2. Determinação do Cobre Sérico**

O cobre sérico total, que inclui cobre livre e o que se encontra incorporado na ceruloplasmina, encontra-se geralmente diminuído em relação à ceruloplasmina em circulação. Em casos de lesão hepática grave, o cobre sérico pode estar dentro dos valores de referência normais, independentemente dos níveis séricos de ceruloplasmina estarem elevados ou baixos. No cenário de insuficiência hepática aguda devido à DW, os níveis de cobre sérico podem até ser acentuadamente elevados devido à liberação repentina do metal das reservas no tecido hepático.(53,72)

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. A maior parte dos doentes não tratados apresenta valores de Cobre não ligado à ceruloplasmina superiores a  $250 \mu\text{g L}^{-1}$ , o que é aproximadamente o dobro do valor de referência, resultando em elevada toxicidade.(53,59)

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. Uma vez que esta parte representa a minoria, cerca de 10%, não é suficiente para fazer elevar o valor total de cobre sérico.(59)

#### **5.4.3. Determinação do Cobre Excretado na Urina**

A quantidade de cobre excretada na urina no período de 24 horas pode ser útil tanto para o diagnóstico como para a monitorização da DW. A excreção urinária de cobre de 24 horas reflete

a quantidade de cobre não ligado à ceruloplasmina na circulação, sendo elevado em doentes com esta patologia. Os níveis considerados como diagnóstico de doença são uma excreção urinária de cobre superior a  $100 \mu\text{g } 24\text{h}^{-1}$  em indivíduos sintomáticos.(72) É ainda de salientar que a coleta de urina deve ser feita num recipiente isento deste metal, de forma a evitar contaminações e resultados erróneos.(72,73)

Um alto nível de excreção urinária de cobre, na ausência de proteinúria, e em associação com um nível baixo ou normal de cobre no plasma também confirmará o diagnóstico.(74) A interpretação de valores elevados pode ser difícil devido a esta característica poder estar presente noutras doenças como em indivíduos portadores heterozigóticos no gene ATP7B.(73) Os indivíduos com anéis Kayser-Fleischer têm um nível mais alto de cobre urinário de 24 horas, mas um nível mais baixo de alanina aminotransferase (ALT) sérica.(58)

A utilização de D-penicilamina é considerada útil para fins de diagnóstico na população pediátrica. A administração de 500 mg de D-penicilamina (independente do peso corporal), administrada por via oral no início e novamente 12 horas após a primeira administração, durante a colheita de urina de 24 horas, demonstrou uma sensibilidade de 92%. Em casos positivos para a doença, esperam-se que os resultados sejam cerca de 5 vezes superiores ao valor normal de referência. A utilização em adultos não está recomendada.(49,72)

#### **5.4.4. Determinação da Concentração de Cobre Hepático**

A determinação de cobre nos hepatócitos constitui a melhor evidência bioquímica para a DW, com maior sensibilidade e especificidade, isto porque o teor deste metal se encontra elevado na maioria dos doentes com esta patologia, mesmo naqueles que são clinicamente assintomáticos. Os níveis de cobre são determinados por meio de espectroscopia de absorção atômica, sendo os valores que normalmente se obtêm superiores a  $250 \mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco de tecido (normalmente o valor varia entre 15 e  $55 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Contudo, os valores também podem encontrar-se elevados noutras situações clínicas hepáticas, ou por exemplo, em caso de intoxicações por este metal. Por outro lado, um valor diminuído não exclui esta patologia.(72,74)

#### **5.4.5. Histologia Hepática**

A biópsia pode ser realizada em diferentes pontos da investigação da doença hepática, antes ou depois do surgimento clínico da suspeita de DW, dependendo da apresentação clínica do

indivíduo, do grau de suspeita e do desenvolvimento dos eventos clínicos.(47) Para fins diagnósticos, a biópsia hepática só é necessária se os sinais clínicos e os testes não invasivos não permitirem um diagnóstico final ou se houver suspeita de outras patologias hepáticas adicionais.(53,59) Embora a biópsia ao fígado seja relativamente segura e frequentemente útil para fins de prognóstico, é um procedimento invasivo e como tal, acarretar alguns problemas em casos particulares.(71)

A detecção de cobre em hepatócitos por avaliação histoquímica é variável, especialmente em fases iniciais da doença. A ausência de cobre histoquimicamente identificável não exclui a DW.(53,72) As alterações histológicas do fígado numa fase inicial incluem esteatose, núcleos glicogenados nos hepatócitos e necrose hepatocelular focal.(72) Frequentemente, essas alterações são diagnosticadas erradamente como outras patologias. A biópsia do fígado pode mostrar características histológicas clássicas de hepatite, com dano parenquimatoso progressivo, desenvolvimento de fibrose e, posteriormente, cirrose.(53,72)

#### **5.4.6. Neuro-imagiologia**

A imagem por RMI ou tomografia computadorizada (TC) do cérebro permitem detetar anomalias estruturais nos gânglios da base. As observações mais frequentes incluem aumento da densidade na TC ou hiperintensidade na RMI, em que esta última poderá ser mais sensível na detecção dessas lesões.(53,59,74) O sinal da "cara do panda gigante" é característico da Doença de Wilson, mas é encontrado apenas numa minoria de doentes.(53,59) Existem outras técnicas de imagem, como espectroscopia de ressonância magnética e tomografia computadorizada de emissão de fóton único (SPECT) que podem ser úteis na detecção de danos cerebrais precoces na DW.(53,59)

#### **5.4.7. Testes Genéticos**

O diagnóstico genético-molecular direto é difícil devido às inúmeras mutações possíveis; exceto em algumas mutações mais frequentes. Além disso, a maioria dos doentes são heterozigotos compostos. O rastreamento genético-molecular abrangente leva vários meses, o que torna esse método impraticável. No entanto, é razoável realizar a análise molecular do gene ATP7B em qualquer doente que tenha um diagnóstico provisório da DW, tanto para fins de confirmação como para facilitar a investigação posterior aos membros da família.(53)

A análise de variantes não é um teste de diagnóstico para a DW. Só deve ser solicitado se houver suspeita clínica desta doença (ou seja, evidência de metabolismo do cobre alterado, doença hepática ou sintomas extrapiramidais inexplicados). Num doente com um diagnóstico clínico claro de DW, a análise de variantes não é necessária, mas pode fornecer informações para orientar a triagem de parentes. Conhecer a variante não é necessário atualmente para a tomada de decisão terapêutica.(75)

#### **5.4.8. Rastreios Familiares**

É essencial fazer a triagem da família dos doentes que apresentam a DW porque a probabilidade de um irmão ser homozigótico e, conseqüentemente, desenvolver doença é de 25%. Nos descendentes, o risco estimado é de cerca de 0,5% e apesar do risco ser baixo, a análise do gene ATP7B para mutações em filhos de pais doentes justifica-se, dado o impacto da doença de Wilson. Os portadores heterozigóticos são mais difíceis de diagnosticar.(53,59,76)

Parentes de primeiro grau de qualquer doente recém-diagnosticado com DW devem ser rastreados para a mesma. A avaliação deve incluir: breve história relacionada à icterícia, doença hepática e características subtis de envolvimento neurológico; exame físico; cobre sérico, ceruloplasmina, testes de função hepática incluindo aminotransferases, albumina e bilirrubina conjugada e não conjugada; exame aos olhos com lâmpada de fenda à procura de anéis de Kayser-Fleischer; e cobre urinário basal de 24 horas.(69,72)

O tratamento deve ser iniciado para todos os indivíduos com mais de 3 anos de idade identificados por triagem familiar.(72) O diagnóstico precoce da DW pode evitar que os indivíduos se tornem sintomáticos. Uma vez que a DW raramente se torna sintomática nos primeiros 3 anos de vida, a identificação precoce da doença de Wilson em recém-nascidos (não relacionada a um doente com DW) permitirá a vigilância regular por pediatras e o início oportuno do tratamento.(75)

#### **5.5. Terapêutica Farmacológica**

Durante a primeira metade do século após a descrição da DW, não existia nenhum tratamento eficaz para esta patologia, até surgirem tratamentos nos anos 50 do século XX o 2,3-dimercaptopropanol.(56,77)

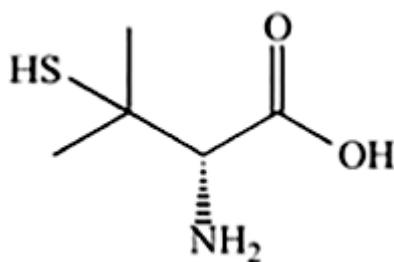
Esta molécula, um agente quelante de diversos metais como arsénio, ouro, chumbo e cobre, mitigou os sintomas neurológicos dos doentes com ela tratados. Este medicamento era administrado através de injeções intramusculares dolorosas, que frequentemente causavam um leque de reações adversas como hematomas e abscessos no local da injeção, hipertensão e taquicardia, em pelo menos, metade dos doentes. Também foram descritos ansiedade, inquietação, náusea e vômito, dor de cabeça, parestesias, disestesias, constrição torácica, dor abdominal, rubor, sudorese, conjuntivite, rinorreia e salivação. Este medicamento era reconstituído em óleo de amendoim o que constituía uma contraindicação para alérgicos ao amendoim. Atualmente, o BAL foi quase totalmente substituído na prática clínica de rotina por dois quelantes de cobre orais, penicilamina e trientina. Ao contrário desses dois, o BAL é lipofílico e tem boa penetração através da barreira hematoencefálica, podendo vir eventualmente a ser considerado como uma terapia de curto prazo em doentes com doença neurológica grave.(28,77)

O tratamento farmacológico para a DW tem como principal objetivo remover o excesso de cobre do organismo e alcançar um balanço negativo de cobre, diminuindo a sua acumulação.(56) O não cumprimento da terapia ao longo da vida leva a sintomas recorrentes e insuficiência hepática, esta última exigindo transplante de fígado para a sobrevivência.(72)

Atualmente a abordagem terapêutica consiste na utilização de agentes quelantes, que promovem a sua excreção do organismo (que incluem D-penicilamina , trientina, tetratiomolibdato) e sais de zinco que minimizam a absorção de cobre, ou ambos associados.(56,72,77) Em geral, a abordagem do tratamento depende se há doença clinicamente evidente ou evidência laboratorial ou histológica de lesão inflamatória agressiva, seja neurológica ou hepática, ou se o doente é identificado antes do início dos sintomas clínicos.(72)

Durante o período inicial da terapêutica de quelação em doentes sintomáticos, alguns médicos sugerem evitar alimentos ricos em cobre, como os já mencionados anteriormente. Essas restrições dietéticas devem estar em prática durante o primeiro ano de tratamento.(50,77) A restrição total de alimentos ricos em cobre, além de difícil para o doente pode contribuir para a desnutrição deste, pois há grupos de alimentos que passam a estar excluídos da dieta.(50) As terapias farmacológicas atuais são eficazes na prevenção da acumulação de cobre e, portanto, a adesão ao tratamento médico, ao invés da restrição dietética de cobre, deve ser o foco no tratamento dos indivíduos afetados.(50)

### 5.5.1. D-penicilamina



**Figura 8 - D-penicilamina. Adaptado de referência (35).**

Em 1950 no estudo de aminoácidos em doenças hepáticas no laboratório Charles Dent e John Walshe identificaram um novo aminoácido contendo enxofre (dimetilcisteína) na urina de um doente que havia feito uma lobectomia hepática recente e recebido como tratamento antibiótico a penicilamina (um produto da hidrólise da penicilina). Baseado nesta experiência e numa outra ocorrida com um doente com insuficiência hepática sofrendo de DW, a dimetilcisteína mostrou ter a estrutura indicada para quelar o cobre.(77)

Conforme previsto, este composto levou a uma rápida cupriurese no doente. Mais tarde, ficou demonstrado que a penicilamina era um quelante de cobre, administrado por via oral eficaz e seguro com benefício clínico sustentado em indivíduos com DW.(77)

A D-penicilamina também designada de Cuprimina,  $\beta$ -dimetilcisteína de nome IUPAC ácido (2S)-2-amino-3-metil-3-sulfanilbutanóico, foi introduzida na forma racémica para o tratamento da doença de Wilson. É uma cisteína dimetilada com o grupo tiol rodeado por dois grupos metilo volumosos, tornando a molécula mais resistente às interações *in vivo*. A D-penicilamina tem menos reações adversas do que a forma L, já que esta forma é tóxica e pode causar neurite ótica, sendo o isômero D a forma terapêutica usada atualmente.(35,77)

A D-penicilamina é rapidamente absorvida a partir do trato gastrointestinal, através da ligação por pontes de dissulfureto à membrana do enterócito, sendo depois incorporada por pinocitose.(78) Atua por formação de complexos cobre-penicilamina formados principalmente no plasma sanguíneo por quelação da fração livre de cobre. Este complexo formado é presumivelmente responsável por induzir um alto nível de excreção urinária e consegue reduzir efetivamente a gravidade da doença.(35,74) A D-penicilamina também pode atuar por indução das MT's hepáticas, aumentando assim a cupriurese e sequestrando o cobre livre(56). Interfere também com a enzima lisil oxidase, que requer cobre, para a formação de ligações cruzadas do colagénio, no seu processo de síntese e apresenta também alguma ação imunossupressora.(28,78)

A taxa de excreção de cobre com penicilamina é maior do que com BAL. Enquanto o BAL duplicou a excreção urinária de cobre em alguns doentes com DW, nos mesmos doentes, a penicilamina aumentou a excreção urinária de cobre de nove a 17 vezes. A penicilamina mobiliza o cobre armazenado nos tecidos e a utilização a longo prazo está associado à homeostasia do cobre no corpo. À medida que o cobre armazenado nos tecidos diminui, a excreção de cobre induzida pela penicilamina diminui também, normalmente ao final de um ano. Ao contrário do BAL, a penicilamina não está associada à taquifilaxia.(77)

Os benefícios clínicos da penicilamina na DW estão bem documentados, mas os efeitos adversos podem exigir a alteração do regime terapêutico.(35,74)

Assim, o regime terapêutico deve iniciar-se com uma dose de 250–500 mg/dia, aumentando 250 mg a cada 4–7 dias até um máximo de 1000–1500 mg/dia em 2–4 doses divididas. A dose de manutenção é geralmente de 750-1000 mg/dia administrada em duas doses divididas(56). A dose na população pediátrica é de 20 mg/kg/dia.(77,79) O início do tratamento com doses mais baixas, prende-se com a tolerabilidade dos doentes ao medicamento, uma vez que é comum o aparecimento de efeitos adversos. Para evitar o aparecimento destes efeitos precoces, incluindo agravamento dos sintomas neurológicos e a redistribuição de cobre para o cérebro, é recomendado iniciar com uma dose baixa. O fármaco deve ser tomado 1 hora antes ou 2 horas após a refeição, a absorção pode reduzir até 50% se for tomada com uma refeição.(35,56) Recomenda-se a monitorização cuidadosa de hemogramas, testes de função hepática e proteína urinária, devido aos possíveis efeitos adversos que ocorrem em alguns dos doentes, e estes podem levar à interrupção do tratamento. Na ausência de efeitos adversos, a dose pode ser aumentada após a primeira semana. A cupriurese de 24 horas induzida pela quelação inicial é superior a 2 mg.(35)

As reações tardias incluem nefrotoxicidade, geralmente com proteinúria ou aparecimento de outros elementos celulares na urina, para os quais a interrupção da penicilamina deve ser imediata. Outras reações tardias incluem uma síndrome semelhante ao lúpus marcada por hematúria, proteinúria.(78)

A melhoria de sintomas clínicos como icterícia e ascite e das funções sintéticas do fígado (albumina e INR) geralmente ocorrem após 2–6 meses de tratamento. A evolução dos sintomas neurológicos pode ser observada em 10–50% dos doentes durante a fase inicial do tratamento.(56,77)

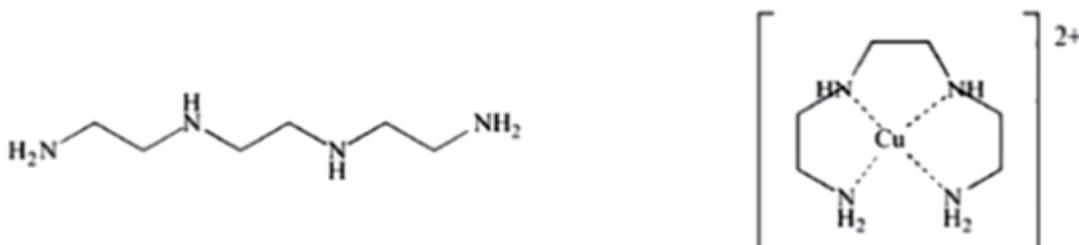
A D-penicilamina aumenta a necessidade de piridoxina, pelo que, deve existir, um aporte de 25 mg por dia de piridoxina durante o tratamento, A maioria dos médicos suplementa esta necessidade em todos os doentes que tomam penicilamina, embora alguns médicos recomendem a suplementação desta vitamina apenas em mulheres grávidas e em casos de doença aguda ou deficiências nutricionais.(56,77,79)

A D-penicilamina é recomendada para uso em doentes sintomáticos durante a fase inicial do tratamento e, posteriormente, como terapia de manutenção. Também é recomendado em doentes pré-sintomáticos. Com esta medicação, os anéis de Kayser-Fleischer diminuem e desaparecem.(77)

A penicilamina pode ser administrada durante a gravidez. Na verdade, a interrupção da penicilamina durante a gravidez leva ao agravamento da DW. A amamentação, no entanto, deve ser suspensa, pois a penicilamina é excretada no leite materno e pode interferir no metabolismo do cobre do bebé.(77)

Em Portugal, a D-penicilamina é comercializada com o nome de Kelatine<sup>®</sup>, sob a forma de comprimidos revestidos, doseados a 300 mg.(79)

### 5.5.2. Trietilenotetramina



**Figura 9 - Trietilenotetramina (à esquerda) e Complexo de  $\text{Cu}(\text{II})$ -trietilenotetramina (à direita). Adaptado de referência (35).**

A trientina também designada de trietilenotetramina e sendo o seu diminutivo oficial trien, foi introduzida em 1969 como alternativa à D-penicilamina para doentes que apresentem reações adversas que os tornem intolerantes ao tratamento.(35,56,78) Faz parte de uma família de quelantes com uma estrutura semelhante à poliamina quimicamente distinta da penicilamina. Não possui grupos sulfidrílo, e o cobre é quelatado formando um complexo estável com os 4 nitrogénios constituintes de um anel planar.(77,78)

Embora com poucos dados farmacocinéticos, contudo, sabe-se que a trientina é pouco absorvida pelo trato gastrointestinal, e o que é absorvido é metabolizado e inativado. Os quatro

grupos amino da trientina formam um complexo de anel estável com cobre e facilitam a cupriurese. Cerca de 1% da trientina administrada e cerca de 8% dos seus metabolitos são detetados na urina, o que faz inferir que esta seja a sua principal via de excreção. A quantidade de cobre, ferro e zinco urinário tendem a aumentar em simultâneo com o aumento de trientina excretada na urina.(56,77,78)

Tal como acontece com a penicilamina, as doses de trientina devem ser administradas em horários diferentes das refeições.(77) Por ser quelante de outros iões metálicos, a coadministração de trientina e ferro deve ser evitada porque o complexo com o ferro é tóxico.

As evidências da eficácia de trietilenotetramina aumentaram e com a vantagem de ter menores efeitos adversos quando comparada com a D-penicilamina.(35). Como já referido, a trientina é particularmente preferida em doentes que mostrem intolerância à D-penicilamina e em doentes com sintomas neurológicos, pois o agravamento dos sintomas neurológicos é menos comum em comparação com a D-penicilamina .(56,78)

Existem relatos isolados de anemia sideroblástica induzida por trientina que foi revertida com uma redução nas doses de trientina.(77) Em geral, os efeitos adversos devido à penicilamina desaparecem quando a penicilamina é substituída por trientina e não reaparecem durante o tratamento prolongado com trientina.(78)

Desta forma, o regime terapêutico habitualmente utilizado inicia-se com 750–1500 mg/dia em duas ou três doses divididas, com 750–1000 mg/dia usados para terapia de manutenção.(56) Na população pediátrica a dose inicial depende da idade e do peso corporal, administrando-se habitualmente 20 mg/kg /dia, o que faz com que em crianças com idade igual ou superior a 5 anos a dose varie regularmente entre 225 mg e 600 mg/dia dividida em 2 a 4 doses.(77,79)

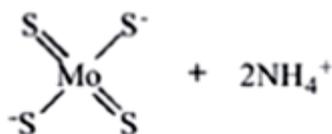
A trientina conduz a uma excreção urinária rápida de cobre (a uma taxa semelhante à penicilamina) em doentes que nunca tomaram medicamentos ou aqueles que receberam apenas tratamento de curto prazo com penicilamina e, portanto, tiveram um grande balanço positivo de cobre. Em contraste, em doentes que estavam em tratamento de longo prazo com penicilamina e, portanto, não tinham um balanço de cobre positivo significativo, a trientina levou a um grau menor de cupriurese do que a penicilamina. A trientina foi desenvolvida como, e provou ser, uma opção de tratamento para doentes nos quais a penicilamina teve que ser descontinuada devido a efeitos adversos. Posteriormente, a trientina foi usada com sucesso em doentes com insuficiência hepática descompensada.(77)

Apesar de ser menos eficaz a excretar o cobre, apresenta menos efeitos adversos o que faz deste fármaco um tratamento de primeira linha, sendo utilizado na fase inicial e na fase de manutenção posterior ao tratamento em doentes sintomáticos(77) Pensa-se que ajustes de doses, se tolerados, são possíveis para colmatar a menor excreção urinária de cobre pela trientina.(78) Também está recomendada a sua utilização em doentes assintomáticos com DW.

Tal como na D-penicilamina, a trientina pode ser administrada a mulheres grávidas, recomendando-se, no entanto, que a amamentação seja evitada durante o tratamento com trientina.(77)

Em Portugal, este fármaco está comercializado com o nome Cuprior® sob a forma de comprimidos revestidos, contendo tetracloidrato de trientina, equivalente a 150 mg de trientina.(80)

### 5.5.3. Tetratiomolibdato de Amónio



**Figura 10 - Tetratiomolibdato de Amónio. Adaptado de referência (35).**

Na década de 1980, quando Walshe investigava um tratamento alternativo para a doença de Wilson para doentes intolerantes à penicilamina, trientina e BAL, ele considerou o uso de uma forma reduzida de molibdato, o Tetratiomolibdato de amónio, para o tratamento. Para verificar os possíveis efeitos adversos, Walshe tomou o medicamento sozinho durante uma semana e, como não tinha sofrido nenhum efeito nocivo, prescreveu-o ao doente. Com este tratamento a histologia hepática havia normalizado ao fim de 1 ano.(45,77)

O tetratiomolibdato de amónio (TTM) é um agente que atua na redução de cobre. Foi desenvolvido através de estudos observados no trato gastrointestinal de animais ruminantes. Pode atuar de forma direta e reversível, pois impede que o cobre se ligue às metaloenzimas. Este composto diminui os níveis séricos de ceruloplasmina, citocromo-c oxidase, ascorbato oxidase, SOD-1 e tirosinase.(18) O TTM, parece atuar por dois mecanismos de ação distintos, formando um complexo tripartido, tornando o complexo não absorvível e não tóxico. Por um lado, se tomado às refeições liga-se ao cobre do lúmen intestinal, bloqueando a sua absorção intestinal e mantendo o metal absorvido na forma quelada que é metabolicamente inerte que

não é captada pelo fígado. Por outro lado, se tomado entre as refeições forma um complexo com a albumina na corrente sanguínea, evitando a entrada do cobre nas células e promovendo a excreção biliar. Assim, ao contrário dos outros fármacos, o TTM induz uma baixa excreção urinária.(28,35,56,57)

Num estudo envolvendo 55 doentes com DW, apenas dois tiveram agravamento dos sintomas neurológicos.(74) Num estudo randomizado duplo-cego comparando TTM e trientina em doentes com sintomatologia neurológica, 6 de 23 doentes na vertente de estudo com trientina e 1 de 25 doentes na vertente com tetratiomolibdato desenvolveram deterioração neurológica, o que leva a crer que TTM apresenta menores efeitos adversos neurológicos e menor agravamento de sintomas neurológicos quando comparado à trientina e à D-penicilamina .(56)

O TTM tem sido recomendado como um excelente medicamento para tratar a DW neurológica. Parecendo minimizar o risco de deterioração neurológica no início da terapia. Os aumentos da aminotransferase sérica foram consideradas uma razão para não se preferir esse medicamento para a DW hepática.(81)

Vários esquemas de dosagem foram tentados para TTM, todos eles exigindo doses múltiplas do medicamento por dia, por exemplo, seis doses diárias, três com as refeições para evitar a absorção de cobre na dieta e três entre as refeições para quelar o cobre nos tecidos. Embora haja relato de seu uso por 8 anos, as recomendações atuais são de que o tratamento com TTM seja limitado a alguns meses.(77)

O TTM também tem efeitos antiangiogénicos. Devido ao seu extenso efeito de remoção de cobre, diminui a fibrose e inflamação ao inibir várias citocinas dependentes de cobre.(53,77)

A segurança e eficácia do TTM foram estudadas para uso como terapia inicial em doentes com sintomas neurológicos, havendo preocupação quanto à segurança do uso de TTM em crianças e adolescentes. Os efeitos adversos incluíram depressão reversível da medula óssea, aumento das aminotransferases, hepatite aguda, níveis acentuadamente elevados de triglicédeos e colesterol e convulsões. Também foram relatadas citopenias relacionadas à deficiência de cobre induzida por TTM.(77)

#### **5.5.4. Sais de Zinco**

A terapia com sais de zinco foi sugerida pela primeira vez pelo neurologista holandês Schouwink, no início da década de 60, que mostrou que o zinco (sob a forma de sais de zinco)

poderia reduzir a absorção intestinal de cobre e ser utilizado como tratamento na DW, o que veio a acontecer com a sua aprovação pela FDA em 1997.(56,77)

O zinco administrado por via oral é absorvido pelas células intestinais e aumenta a produção de metalotionina nas células em 25 vezes em 2–3 semanas após o início da terapia. Estas proteínas são ricas em cisteína e podem-se ligar a vários íons metálicos e estão normalmente presentes no intestino, fígado, cérebro e outros tecidos, sendo que têm uma elevada afinidade com o cobre. As MT's induzidas por zinco nos enterócitos ligam-se, portanto, preferencialmente ao cobre da dieta e ao cobre secretado no intestino. O cobre ligado às MT's é separado nas células intestinais e impedido de ser absorvido. O metal é posteriormente perdido nas fezes quando os enterócitos são eliminados no lúmen intestinal durante a renovação celular fisiológica.(35,77)

O alto teor de zinco oral impede a absorção eficiente de cobre dos alimentos, e a absorção reduzida e a perda fecal resultam gradualmente em um balanço negativo de cobre(35). O zinco, também pode estimular a produção de MT's no fígado reduzindo os danos do cobre nos hepatócitos.(35,77)

No geral, o zinco oferece melhores efeitos na homeostasia do cobre, em relação a outros quelantes orais. Alguns sais não são adequados ao tratamento da DW, outros como acetato, sulfato e gluconato parecem equivalentes em eficácia, mas variam em tolerabilidade. Alguns doentes podem ser mais suscetíveis a náusea ou desconforto abdominal, mas muitas vezes alterando o tipo de sal esses sintomas desaparecem.(81) A adição de uma pequena refeição proteica pode atenuar ainda mais os sintomas gástricos.(77)

A deterioração neurológica é incomum com o zinco. Embora o zinco seja atualmente reservado para o tratamento de manutenção, ele tem sido usado como terapia de primeira linha, mais comumente para doentes assintomáticos o pré-sintomáticos. Parece ser tão eficaz quanto a penicilamina, mas com muito melhor tolerabilidade.(56)

O tratamento combinado com quelantes (trientina ou penicilamina), no qual o quelante e o zinco são administrados em intervalos amplamente espaçados durante o dia, tem sido defendido. A dosagem é baseada em miligramas de zinco elementar. Adultos e crianças de maior peso corporal (>50 kg) requerem que 150 mg/dia sejam administrados em três doses divididas e Crianças com menor peso corporal (<50 kg) necessitam 75 mg/dia.(35,56,74) Tal como acontece com a penicilamina e a trientina, os alimentos interferem na absorção do zinco e, portanto, o zinco não deve ser administrado às refeições. A irritação gástrica induzida por zinco é comum e limita as doses de zinco.(77)

O zinco como monoterapia ou combinado com um quelante tradicional, tem sido estudado tanto nos Estados Unidos quanto na Europa. Em particular, o zinco é considerado aplicável como terapia de manutenção após um período inicial de tratamento com quelante e provou ser eficaz após o tratamento com trientina. Além disso, a suplementação de zinco tem sido eficaz em doenças hepáticas leves, embora a monoterapia com zinco possa não ser suficiente em doentes com doenças hepáticas ou cerebrais mais graves. Os doentes pré-sintomáticos de Wilson podem ser tratados com sucesso pela monoterapia com zinco.(35) O melhor tratamento inicial para crianças com DW sem sintomas clínicos permanece indeterminado entre os especialistas em pediatria. A recomendação é para monoterapia com zinco em tais situações, apesar dos níveis de evidência serem moderados (a alternativa é um quelante oral). O que definitivamente ficou claro nos últimos 5–10 anos é que em todos os grupos etários o tratamento com zinco para DW requer monitorização cuidadoso da excreção urinária de cobre de 24 horas (que deve ser <75 µg/dia) e aminotransferases séricas.(81)

O zinco pode ser administrado com segurança durante a gravidez. Exceto pelos sintomas gástricos, o zinco tem poucos efeitos adversos.(77)

#### **5.5.5. Outros Tratamentos Farmacológicos**

As concentrações tóxicas de cobre no fígado originam fenômenos de peroxidação lipídica e danos oxidativos nas mitocôndrias. Assim, os antioxidantes, como é o caso da vitamina E, podem ter um papel como adjuvantes da terapêutica na DW. Nestes doentes em estudo, os níveis séricos e hepáticos desta vitamina apresentam-se baixos. Desta forma, existem evidências de que a adição desta vitamina ao regime de tratamento poderá ser útil e contribuir para a melhoria da sintomatologia destes indivíduos, embora não haja estudos suficientemente robustos sobre este efeito.(53,56)

Estudos realizados em animais sugerem que a amitriptilina poderá ter um papel na insuficiência hepática, consequência da DW, pois parece reduzir a apoptose induzida por cobre nos hepatócitos e, assim, aumentar a sobrevivência de ratos com deficiência em ATP7B(53). No entanto, não estão ainda disponíveis dados em humanos.(53)

Por outro lado, estudos realizados *in vitro*, com 4-fenilbutirato e curcumina, demonstraram uma melhoria parcial na expressão da proteína de ATP7B, o que pode permitir novas estratégias de tratamento na DW, aumentando diretamente a expressão da proteína do ATP7B. Além disso, a

curcumina é um antioxidante ideal e parece remover de forma eficaz, espécies reativas de oxigênio atuando também como um agente quelante de cobre.(53)

Um dos ensaios clínicos a decorrer atualmente envolve o tetramolibdato bis-colina (WTX101) conhecido como medicamento de segunda geração, desenvolvido com melhor estabilidade, que reduz rapidamente o cobre livre, melhorando o estado de saúde. O fármaco parece apresentar melhores resultados clínicos, havendo melhoria neurológica.(45)

### **5.5.6. Transplante Hepático**

O transplante ortotópico de fígado é reservado aos doentes com DW que apresentam insuficiência hepática aguda ou cirrose descompensada, que não respondam ao tratamento médico instituído, sendo a única opção para quem apresente insuficiência hepática fulminante.(49,56,74,82) Embora o transplante seja um tratamento eficaz, a cirurgia é um risco e a terapêutica de imunossupressão a que o doente é sujeito apresenta também risco.(74) O transplante de fígado corrige os defeitos metabólicos hepáticos da DW e pode servir para iniciar a normalização do metabolismo extra-hepático do cobre. A sobrevida de um ano após o transplante de fígado varia de 79%-87%, e aqueles que sobrevivem a esse período inicial continuam a sobreviver a longo prazo.(72)

Embora a grande maioria dos doentes submetidos a transplante de fígado por DW tenham recebido órgãos de doadores cadavéricos, também podem ser realizados transplantes de doadores vivos. O transplante de dador vivo bem-sucedido é possível quando este é um membro da família heterozigoto para WD.(72)

Nos doentes com sintomas neurológicos graves a indicação de transplante hepático ainda é controversa. Alguns indivíduos que se submeteram a transplante por cirrose descompensada e que apresentam sintomas psiquiátricos ou neurológicos, mostraram melhorias após o transplante de fígado.(72)

O transplante de fígado não é recomendado como tratamento primário para DW neurológica porque a doença hepática é estabilizada através de tratamento farmacológico na maioria desses indivíduos e os resultados do transplante de fígado nem sempre são benéficos. Além disso, os doentes com doença neurológica ou psiquiátrica devido à DW podem ter resultados piores e também dificuldades com a adesão aos regimes médicos após o transplante de fígado.(53,72,74)

## 6. Conclusão

O cobre é um importante oligoelemento para a sobrevivência dos organismos vivos; a sua relevância a nível estrutural e funcional relaciona-se com as funções metabólicas de um conjunto de enzimas que são dependentes deste metal.

É vital para o funcionamento dos órgãos e sistemas que a correta biodisponibilidade de iões de cobre esteja assegurada, na medida em que este elemento encontra-se envolvido em várias funções fisiológicas, nomeadamente no funcionamento cerebral e de todo o sistema nervoso, desempenha um papel relevante na formação de colagénio mantendo osso e a pele saudáveis, ajuda a suportar a elasticidade dos vasos contribuindo para o bom funcionamento vascular, e é necessário para manter um sistema imunitário saudável. Desempenha, ainda, um papel relevante no desenvolvimento fetal e crescimento pós-natal. Para que seja possível manter o equilíbrio homeostático do cobre é necessário que haja um conjunto de mecanismos e processos biológicos que permitam manter as concentrações dos iões de cobre no meio interno reguladas, por um conjunto de proteínas, sendo de destacar as proteínas ATPases 7A e 7B no seu transporte intracelular.

A ocorrência de mutações genéticas que transtornem estas mesmas proteínas levam ao desenvolvimento de patologias como a Doença de Menkes e a Doença de Wilson caracterizadas genericamente por défice e excesso de cobre respetivamente. Hoje em dia, estas doenças estão bem caracterizadas e existe terapêutica eficaz e não tóxica para ambas, contribuindo para aumentar a esperança e a qualidade de vida.

Em relação à Doença de Menkes o prognóstico ainda não é muito favorável e a esperança de vida após o diagnóstico continua a ser baixa, sendo o tratamento essencialmente sintomático, aliviando essencialmente sintomas neurológicos. Apesar do diagnóstico, as alterações no tecido conjuntivo continuam a persistir, o que provavelmente significará que de facto estes indivíduos mesmo após tratamento continuem sem ter capacidade de restaurar os níveis da enzima lisil-oxidase. Desta forma, seria importante fazer mais na tentativa de melhor compreender este mecanismo e, simultaneamente melhorar o tratamento. Sabe-se que a mobilidade do cobre em determinados compartimentos é afetada pelo seu estado de oxidação, e por isso, seria interessante explorar o tratamento tanto sob a forma de ião cúprico como de ião cuproso, em detrimento de apenas uma das formas.

A doença de Wilson mostra um prognóstico muito mais favorável após a terapia de quelação. Este facto prende-se com a minimização dos efeitos tóxicos do cobre, limitando a absorção do

metal através dos alimentos e regulando o conteúdo de cobre no corpo usando a excreção facilitada por quelante pela urina ou através da bÍlis. A doença de Wilson dá origem a sintomas hepáticos, geralmente antes de afetar o sistema nervoso central. Em fases iniciais, o cobre acumula-se no fÍgado devido à excreção biliar ineficiente deste metal. Posteriormente, a fração livre saturada de cobre pode levar a deposições no cérebro e em outros tecidos, constituindo ainda um importante desafio terapêutico a eliminação adequada do cobre cerebral. Apesar de não ter sido ainda totalmente explorada, a terapia combinada é uma abordagem importante na doença de Wilson, pois permite manter a dose de cada medicamento abaixo do limite dos efeitos adversos. Na fase inicial, o tratamento recomendado consiste na combinação de um sal de zinco com um agente quelante, enquanto na fase de manutenção a monoterapia com zinco parece, por vezes, ser suficiente. Um outro desafio que se coloca relativamente à terapêutica na DW é o facto de ter de ser tomada cronicamente, e a menor adesão manifestada habitualmente pelo doente aos medicamentos crónicos, tende a aumentar quando a cronicidade se alia a várias administrações diárias com limitações de horários.

## 7. Referências Bibliográficas

1. Ellingsen DG, Moller LB, Aaseth J. Copper. Em: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, editores. Handbook on the Toxicology of Metals [Internet]. 4th ed. London: Elsevier and Book Aid; 2012. p. 765–82. Acedido a 12 de Fevereiro de 2021 Disponível em: <https://www.taylorfrancis.com/books/9781439807156>
2. Services H. Draft Toxicological Profile for Copper. Agency Toxic Subst Dis Regist Toxicol Profiles. 2002;(205). Disponível em: [http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9781420061888\\_ch65](http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9781420061888_ch65)
3. WHO. Environmental Health Criteria 200 - Copper [Internet]. 1998. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm#SectionNumber:1.1>
4. Bresson JL, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, Hirsch-Ernst KI, et al. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for copper. EFSA J. 2015;13(10):4253. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2015.4253>
5. Baierle M, Valentini J, Paniz C, Moro A, Barbosa Junior F, Garcia SC. Possíveis Efeitos do Cobre s Sanguíneo Sobre Parâmetros Hematológicos em Idosas. J Bras Patol e Med Lab. Dezembro de 2010;46(6):463–70. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1676-24442010000600006&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442010000600006&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)
6. Altarelli M, Ben-Hamouda N, Schneider A, Berger MM. Copper Deficiency: Causes, Manifestations, and Treatment. Nutrition in Clinical Practice. Agosto de 2019;34(4):504–13. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/ncp.10328>
7. Malmström BG, Leckner J. The Chemical Biology of Copper. Current Opinion in Chemical Biology. Abril de 1998;2(2):286–92. Disponível em: <http://biomednet.com/elecref/1367593100200286>
8. Gaetke LM, Chow-Johnson HS, Chow CK. Copper: Toxicological Relevance and Mechanisms. Arch Toxicol. 9 de Novembro de 2014;88(11):1929–38. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s00204-014-1355-y>

9. Schümann K, Classen H, Dieter H, König J, Multhaupt G, Rückgauer M, et al. Hohenheim Consensus Workshop: Copper. *European Journal of Clinical Nutrition* 24 de Junho de 2002;56(6):469–83. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/1601315>
10. Florio M. The economic Rate of Return of Infrastructures and Regional Policy in the European Union. *Annals of Public and Cooperative Economics* Março de 1997;68(1):39–64. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/1467-8292.00035>
11. Linder MC, Hazegh-Azam. Biochemistry and Molecular Biology. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 8 de Abril de 1996;63:797S-811S. Disponível em: [http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J123v27n02\\_05](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1300/J123v27n02_05)
12. de Romaña DL, Olivares M, Uauy R, Araya M. Risks and Benefits of Copper in Light of New Insights of Copper Homeostasis. *Journal Trace Elements Medicine Biology*. Janeiro de 2011;25:3–13. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X10001276>
13. Nazareth M, Rêgo C, Lopes C, Pinto E. Nutritional Recommendations for Paediatric Ages: State of Art. *Acta Portuguesa de Nutrição*. 2016;07(1):18–33.
14. Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N. Copper Transport. *The American Journal of Clinical Nutrition* . 1 de Junho de 1998;67(5):965S-971S. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/67/5/965S/4666200>
15. Ferreira CR, Gahl WA. Disorders of Metal Metabolism. *Translational Science of Rare Diseases*. 18 de Dezembro de 2017;2:101–39. Disponível em: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/TRD-170015>
16. Scheiber I, Dringen R, Mercer JFB. Copper: Effects of Deficiency and Overload BT - Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases. Em: *Interrelations between Essential Metal Ions and Human Diseases*. Springer Science and Business Media Dordrecht 2013; 2013. p. 359–87. Disponível em: [http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7500-8\\_11%5Cpapers3://publication/doi/10.1007/978-94-007-7500-8\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-7500-8_11%5Cpapers3://publication/doi/10.1007/978-94-007-7500-8_11)

17. Uauy R, Olivares M, Gonzalez M. Essentiality of Copper in Humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1 de Junho de 1998;67(5):952S-959S. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/67/5/952S/4666196>
  
18. Crisponi G, Nurchi VM, Fanni D, Gerosa C, Nemolato S, Faa G. Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. *Coordination Chemistry Reviews*. 2010;254(7–8):876–89. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.018>
  
19. Chen J, Jiang Y, Shi H, Peng Y, Fan X, Li C. The Molecular Mechanisms of Copper Metabolism and its Roles in Human Diseases. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. 7 de Outubro de 2020;472(10):1415–29. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00424-020-02412-2>
  
20. Kodama H, Fujisawa C. Copper Metabolism and Inherited Copper Transport Disorders: Molecular Mechanisms, Screening, and Treatment. *Metallomics*. 2009;1:42–52. Disponível em: <https://academic.oup.com/metallomics/article/1/1/42-52/6040610>
  
21. Peña MMO, Lee J, Thiele DJ. A Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution. *Journal of Nutrition* . 1 de Julho de 1999;129(7):1251–60. Disponível em: <https://academic.oup.com/jn/article/129/7/1251/4722574>
  
22. Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C. Copper in Diseases and Treatments, and Copper-Based Anticancer Strategies. *Medicinal Research Reviews*. 2009;30(4):708–49. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/med.20174>
  
23. C.Linder M. *Biochemistry of Copper*. 1st ed. Frieden E, editor. Springer Science and Business Media, LLC; 1991. 135–161; 331–341 p.
  
24. Kaler SG. Inborn Errors of Copper Metabolism. *Handb Clin Neurol* [Internet]. 2013;113:1745–54. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444595652000459>
  
25. NORD. National Organization for Rare Disorders [Internet]. Menkes Disease. 2020 [citado 29 de Abril de 2021]. Disponível em: <https://rarediseases.org/rare-diseases/menkes-disease/>

26. Kaler SG, Ferreira CR, Yam LS. Estimated Birth Prevalence of Menkes Disease and ATP7A-Related Disorders Based on the Genome Aggregation Database (gnomAD). *Mol Genet Metab Reports*. Setembro de 2020;24(June):100602. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2020.100602>
27. Tümer Z, Møller LB. Menkes Disease. *European Journal of Human Genetics*. 4 de Maio de 2010;18:511–8. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ejhg2009187>
28. Sarkar B. Treatment of Wilson and Menkes Diseases. *Chemical Reviews*. 8 de Setembro de 1999;99(9):2535–44. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr980446m>
29. Beyens, Meensel, Pottie, Rycke, Bruyne, Baeke, et al. Defining the Clinical, Molecular and Ultrastructural Characteristics in Occipital Horn Syndrome: Two New Cases and Review of the Literature. *Genes (Basel)*. 12 de Julho de 2019;10(7):528. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/7/528>
30. Vairo FP e., Chwal BC, Perini S, Ferreira MAP, de Freitas Lopes AC, Saute JAM. A Systematic Review and Evidence-Based Guideline for Diagnosis and Treatment of Menkes Disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. Janeiro de 2019;126:6–13. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.12.005>
31. Møller LB, Tümer Z, Lund C, Petersen C, Cole T, Hanusch R, et al. Similar Splice-Site Mutations of the ATP7A Gene Lead to Different Phenotypes: Classical Menkes Disease or Occipital Horn Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*. Abril de 2000;66(4):1211–20. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707601505>
32. Kodama H, Murata Y, Kobayashi M. Clinical Manifestations and Treatment of Menkes Disease and its Variants. *Pediatrics International* Agosto de 1999;41(4):423–9. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1442-200x.1999.01095.x>
33. Haddad MR, Choi E-Y, Zerfas PM, Yi L, Martinelli D, Sullivan P, et al. Cerebrospinal Fluid-Directed rAAV9-rsATP7A Plus Subcutaneous Copper Histidinate Advance Survival and Outcomes in a Menkes Disease Mouse Model. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. Setembro de 2018;10(September):165–78.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.omtm.2018.07.002>

34. Prasad AN, Ojha R. Menkes Disease: What a Multidisciplinary Approach Can Do. *J Journal of Multidisciplinary Healthcare*. Agosto de 2016;9:371–85. Disponível em: <https://www.dovepress.com/menkes-disease-what-a-multidisciplinary-approach-can-do-peer-reviewed-article-JMDH>
35. Horn N, Møller LB, Nurchi VM, Aaseth J. Chelating Principles in Menkes and Wilson Diseases. *Journal of Inorganic Biochemistry*. Janeiro de 2019;190(August 2018):98–112. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.10.009>
36. Blanusa M, Piasek M, Kostial K. New Therapeutic and Experimental Aspects of Chelators as Antidotes of Metal Toxicity. Varnai VM, editor. *Front Med Chem*. 2012;4:130–82. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/node/53925>
37. Kaler SG, DiStasio A. ATP7A -Related Copper Transport Disorders Summary Genetic counseling GeneReview Scope Suggestive Findings. *Gene Reviews*. 2003;1–14. Disponível em: [https://www.dropbox.com/s/xcqbizhxyf6hc2o/Bookshelf\\_NBK1413.pdf?dl=0](https://www.dropbox.com/s/xcqbizhxyf6hc2o/Bookshelf_NBK1413.pdf?dl=0)
38. de Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LWJ. Molecular Pathogenesis of Wilson and Menkes Disease: Correlation of Mutations With Molecular Defects and Disease Phenotypes. *Journal of Medical Genetics*. 23 de Agosto de 2007;44:673–88. Disponível em: <https://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmg.2007.052746>
39. Kaler SG. ATP7A-Related Copper Transport Diseases—Emerging Concepts and Future Trends. *Nature Reviews Neurology* 10 de Janeiro de 2011;7(1):15–29. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrneurol.2010.180>
40. Kaler SG, Holmes CS, Goldstein DS, Tang J, Godwin SC, Donsante A, et al. Neonatal Diagnosis and Treatment of Menkes Disease. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(6):605–14. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa070613>
41. Kodama H, Fujisawa C, Bhadhprasit W. Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *Current Drug Metabolism*. 1 de

- Março de 2012;13(3):237–50. Disponível em:  
<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2002&volume=13&issue=3&spage=237>
42. Cyprium Therapeutics, [Internet]. New York 2020. *CUTX-101 (Copper Histidinate)*. Acedido em 14 de Junho de 2021. Disponível em <https://www.cypriumtx.com/cyprium-therapeutics>
  43. Lorincz MT. Neurologic Wilson’s Disease. A Annals of the New York Academy of Sciences 2010;1184:173–87.
  44. Zeid CA, Yi L, Kaler SG. Copper Metabolism and the Liver. Em: Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Shafritz DA, Thorgeirsson SS, et al., editores. *The Liver: Biology and Pathobiology*. 6th ed. John Wiley & Sons Ltd; 2020. p. 209–14.
  45. Maiti BK, J. G. Moura J. Diverse Biological Roles of the Tetrathiomolybdate Anion. *Coordination Chemistry Reviews*. Fevereiro de 2021;429:213635. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213635>
  46. Wu F, Wang J, Pu C, Qiao L, Jiang C. Wilson’s Disease: A Comprehensive Review of the Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 de Março de 2015;16(12):6419–31. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/3/6419>
  47. Guindi M. Wilson Disease. *Seminars Diagnostic Pathology*. 2019;36(6):415–22. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.07.008>
  48. Hedera P. Wilson’s Disease: A Master of Disguise. *Parkinsonism Related Disorders*. Fevereiro de 2018;59:140–5. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.02.016>
  49. Członkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V, et al. Nature Reviews Disease Primers article: Wilson disease. *Nature Rev Disease Primers*. 6 de Dezembro de 2018;4(1):21. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41572-018-0018-3>
  50. Russell K, Gillanders LK, Orr DW, Plank LD. Dietary Copper Restriction in Wilson’s Disease. *European Journal of Clinical Nutrition*. 6 de Março de 2017;72(3):326–31.

Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41430-017-0002-0>

51. Coffey AJ, Durkie M, Hague S, McLay K, Emmerson J, Lo C, et al. A genetic Study of Wilson's Sisease in the United Kingdom. *Brain : a journal of neurology*. Maio de 2013;136(5):1476–87. Disponível em: <https://academic.oup.com/brain/article-lookup/doi/10.1093/brain/awt035>
52. Drumon Freitas S, Sarmiento H, Alves G, Cotter J. Doença de Wilson: a Propósito de Dois Casos Clínicos [Internet]. Vol. 17, *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna*. Guimarães; 2010. Disponível em: [http://www.spmi.pt/revista/vol17/vol17\\_n1\\_2010\\_21\\_25.pdf](http://www.spmi.pt/revista/vol17/vol17_n1_2010_21_25.pdf)
53. Ferenci P, Czlonkowska A, Stremmel W, Houwen R, Rosenberg W, Schilsky M, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *Journal of Hepatology*. Março de 2011;56:671–85. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827811008129>
54. Tao TY, Gitlin JD. Hepatic Copper Metabolism: Insights From Genetic Disease. *Hepatology*. 2003;37(6):1241–7.
55. Pfeiffer R. Wilson's Disease. *Seminars in Neurology*. Abril de 2007;27(2):123–32. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2007-971173>
56. Patil M, Sheth KA, Krishnamurthy AC, Devarbhavi H. A Review and Current Perspective on Wilson Disease. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. Dezembro de 2013;3(4):321–36. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jceh.2013.06.002>
57. Woimant F, Djebrani-Oussedik N, Collet C, Girardot N, Poujois A. The Hidden Face of Wilson's Disease. *Revue Neurology (Paris)*. Novembro de 2018;174(9):589–96. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.08.001>
58. Xie JJ, Wu ZY. Wilson's Disease in China. *Neuroscience Bulletin*. 2017;33(3):323–30.
59. Ferenci P. Diagnosis of Wilson Disease. Em: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2017. p. 171–80. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63625-6.00014-8>

60. Gong X, Fan J, Liu T, Tian J, Huang B, Li S. Wilson's Disease and Other Neurological Copper Disorders. *Lancet Neurology*. 2015;14(1).
61. Svetel M, Kozić D, Stefanova E, Semnic R, Dragašević N, Kostić VS. Dystonia in Wilson's Disease. *Movement Disorders*. 2001;16(4):719–23.
62. Ortiz JF, Morillo Cox Á, Tambo W, Eskander N, Wirth M, Valdez M, et al. Neurological Manifestations of Wilson's Disease: Pathophysiology and Localization of Each Component. *Cureus*. 2020;12(11).
63. Kant Kumar M, Kumar V, Kumar Singh P. Wilson's Disease With Neurological Presentation, Without Hepatic Involvement in Two Siblings. *JCDR - Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2013;7(7):1476–8.
64. Mura G, Zimbrea PC, Demelia L, Carta MG. Psychiatric Comorbidity in Wilson's Disease. *International Review of Psychiatry*. 2017;29(5):445–62. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09540261.2017.1311845>
65. Soiza RL, Donaldson AIC, Myint PK. Psychiatric Manifestations in Wilson's Disease: Possibilities and Difficulties for Treatment. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology* 2018;8(7):199–211. Disponível em: [journals.sagepub.com/home/tpp](http://journals.sagepub.com/home/tpp)
66. Cairns JE, Walshe JM. The Kayser-Fleischer Ring. *British Journal of Hospital Medicine*. 2014;75(3):187–90.
67. Lorincz MT. Wilson Disease and Related Copper Disorders. Em: *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V; 2018. p. 279–92. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63233-3.00018-X>
68. Pandey N, Jonh S. Kayser-Fleischer Rings. *National Center for Biotechnology Information*. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459187/?report=reader>
69. Schilsky ML. Wilson Disease. *Clinical Liver Disease*. Novembro de 2017;21(4):755–67. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cld.2017.06.011>

70. Palumbo CS, Schilsky ML. Clinical practice guidelines in Wilson disease. 2019;7(Suppl 2):1–6.
71. Bennett J, Hahn S. Clinical Molecular Diagnosis of Wilson Disease. *Seminars Liver Disease*. 7 de Agosto de 2011;31(03):233–8. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0031-1286054>
72. Roberts EA, Schilsky ML. Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology*. 2008;47(6):2089–111.
73. Woimant F, Djebrani-Oussedik N, Poujois A. New tools for Wilson’s Disease Diagnosis: Exchangeable Copper Fraction. *Annals of Translational Medicine* 2019;7(S2):S70–S70.
74. Liu J, Luan J, Zhou X, Cui Y, Han J. Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Wilson’s Disease. *Intractable & Rare Diseases Research* 2017;6(4):249–55.
75. Espinós C, Ferenci P. Are the new genetic tools for diagnosis of Wilson disease helpful in clinical practice? *Journal of Hepatology*. Agosto de 2020;2(4):100114. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100114>
76. Poujois A, Woimant F. Wilson’s Disease: A 2017 Update. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2018;42:512–20. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2018.03.007>
77. c
78. Roberts E. A practice guideline on Wilson disease. *Hepatology*. Junho de 2003;37(6):1475–92. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1053/jhep.2003.50252>
79. Infarmed. [Internet]. Lisboa; 2021. *Kelatine: resumo das características do medicamento*. Acedido em 5 de Junho de 2021. Disponível em <https://www.infarmed.pt/>.
80. European Medicines Agency. [Internet]. Amsterdam 2010. *Cuprior-Resumo das características do medicamento*. Acedido em 30 de Maio de 2021. Disponível em <https://www.ema.europa.eu/en/search/>

81. Roberts EA. Update on the Diagnosis and Management of Wilson Disease. *Current Gastroenterology Reports* . 5 de Dezembro de 2018;20(12):56. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11894-018-0660-7>
82. Lefkowitz JH. Disturbances of Copper and Iron Metabolism. Em: *Scheuer's Liver Biopsy Interpretation*. 2021. p. 323–40.