



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Fabielly Scolari Grotto

O que há de novo sobre alterações nas concentrações de cobre e sua relação com as doenças de Alzheimer e de Parkinson? Uma revisão sistemática de artigos publicados entre 2011 e 2020

Florianópolis

2022

Fabielly Scolari Grotto

O que há de novo sobre alterações nas concentrações de cobre e sua relação com as doenças de Alzheimer e de Parkinson? Uma revisão sistemática de artigos publicados entre 2011 e 2020

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientadora: Prof.^a Viviane Glaser, Dra.

Florianópolis

2022

Grotto, Fabielly

O que há de novo sobre alterações nas concentrações de cobre e sua relação com as doenças de Alzheimer e de Parkinson? Uma revisão sistemática de artigos publicados entre 2011 e 2020 / Fabielly Grotto ; orientador, Viviane Glaser, 2022.

107 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Revisão de literatura. 3. cobre . 4. doença de Parkinson . 5. doença de Alzheimer. I. Glaser, Viviane . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Fabielly Scolari Grotto

O que há de novo sobre alterações nas concentrações de cobre e sua relação com as doenças de Alzheimer e de Parkinson? Uma revisão sistemática de artigos publicados entre 2011 e 2020

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 30 de agosto de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Evelise Nazari, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.^a Alexandra Susana Latini, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.^a Juliana Lindenau, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.^a Roberta de Paula Martins, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.^a Viviane Glaser, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, a todos os professores que de alguma forma contribuíram para a construção deste trabalho. À minha orientadora, a professora Viviane Glaser, que esteve ao meu lado a cada etapa, a minha gratidão. Ensinando-me, auxiliando e contribuindo para a construção deste trabalho, em todas as discussões, com paciência e dedicação, apesar de todos os desafios que vieram na construção deste trabalho, sendo um exemplo de pesquisadora e professora. Sinto honrada e tenho profunda admiração pela pessoa que é.

Meu agradecimento também aos membros da banca da defesa da dissertação e os membros suplentes, que aceitaram e dedicaram seu tempo para fazer parte deste momento. A todas as contribuições, debates e enriquecimento na minha dissertação. Tenho a honra dessas contribuições na minha formação.

Aos meus pais e ao meu irmão que sempre estiveram comigo ao longo do caminho, aceitando qualquer desafio, por todo carinho, paciência, amor e dedicação. Obrigado por nunca medirem esforços, por sempre estarem ao meu lado e por sempre acreditarem em mim. Obrigado por nunca desistirem e me deixarem desistir, e me ensinarem a buscar sempre mais, principalmente a buscar a ser melhor e essa qualificação na minha carreira profissional; e por “aguentarem” com paciência minhas crises de ansiedade.

Ao restante dos meus familiares, colegas e amigos, meu agradecimento por estarem comigo ao longo de todo tempo, por cada palavra amiga e conselho, por também acreditarem em mim e na pessoa que eu sou.

Com muito carinho,
Fabielly Scolari Grotto

RESUMO

O cobre (Cu) desempenha um papel crucial e importante nas funções do sistema nervoso central. Ele participa, por exemplo, como cofator para enzimas responsáveis pela respiração celular, neurotransmissão e defesa antioxidante. Porém, o excesso deste metal é neurotóxico, pois contribui para a formação de espécies reativas de oxigênio, enquanto que a sua diminuição afeta a síntese de cuproenzimas. Ainda, descreve-se na literatura que um desequilíbrio na homeostase do cobre pode estar envolvido com doenças neurodegenerativas. Neste contexto, o objetivo desta revisão foi de realizar uma pesquisa na literatura acerca das concentrações de cobre encontradas em indivíduos diagnosticados com doença de Alzheimer (DA) ou de Parkinson (DP), verificando se os níveis do metal estão alterados. Buscou-se também analisar os resultados obtidos pelos autores sobre os efeitos de excesso de cobre e sua relação com essas doenças em modelos experimentais *in vivo*. Ainda, foram incluídas as publicações que mensuraram os níveis de cobre em modelos utilizados para mimetizar essas doenças. As buscas foram realizadas nas bases de dados PubMed (MEDLINE), Embase, LILACS e SciELO, usando as palavras-chaves “copper” AND “Parkinson”, e “copper” AND “Alzheimer”, em artigos publicados entre 2011 e 2020. Ao fim das buscas e da seleção, 53 artigos cumpriam os critérios de inclusão pré-estabelecidos para as publicações relacionadas à DA, mostrando que 14 observaram aumento nas concentrações de cobre, 11 observam diminuição, e nove não observaram diferenças nas concentrações do metal em diferentes amostras analisadas. Quinze artigos utilizando modelos experimentais relacionaram o excesso de cobre com a doença, e quatro mediram as concentrações de cobre em modelos que mimetizam a DA. Para a DP, 27 artigos cumpriam os critérios pré-estabelecidos, sendo que três observaram aumento nas concentrações de cobre nos participantes, 12 observam diminuição, e seis não observaram diferenças. Quatro publicações avaliaram os efeitos do excesso de cobre em modelos experimentais e relacionaram os resultados com a doença, e duas mediram as concentrações de cobre em modelos que mimetizam a DP. Após análise, observou-se que os diferentes resultados observados nos estudos podem estar associados à baixa quantidade de indivíduos participantes, aos diferentes biofluidos analisados ou distintas regiões cerebrais entre as publicações, e a não levar em conta nas comparações tanto o sexo dos participantes como o estágio da doença que os

indivíduos se encontram. Os artigos que analisaram os efeitos do excesso do metal em animais verificaram que o cobre está relacionado ao estresse oxidativo, agregação de proteínas, neuroinflamação, disfunção mitocondrial, morte celular, perda das funções cognitivas e redução da atividade locomotora, os quais também são descritos na DA e na DP. Apenas um dos artigos verificou que as concentrações de cobre estavam diminuídas no encéfalo de um dos modelos usados para mimetizar a DP. Conclui-se que nos estudos com humanos existem discrepâncias nas concentrações de cobre nas amostras analisadas; e que os animais expostos ao cobre apresentaram alterações semelhantes às observadas nos indivíduos afetados pelas doenças. Ainda, nos animais utilizados para mimetizar as doenças neurodegenerativas não foram verificadas modificações nas concentrações de cobre na maioria dos artigos analisados.

Palavras-chave: metais, doenças neurodegenerativas, toxicidade.

ABSTRACT

Copper performs an important role in the central nervous system functions. For example, it is a cofactor of enzymes responsible for cell respiration, neurotransmission and antioxidant defense. However, high copper levels are neurotoxic, since it contributes to the generation of reactive oxygen species, while copper decrease affects the synthesis of cuproenzymes. Moreover, it is described in the literature that copper dyshomeostasis could be related with neurodegenerative diseases. In this way, this review was performed with the aim of carrying out a search in the literature about copper levels in Alzheimer's and Parkinson's diseases patients (AD and PD, respectively), verifying if the metal levels are modified. Also, it was intended to gather the literature results about the effects of high copper levels and its relationship with AD and PD in experimental models *in vivo*. Publications that measured copper levels in models used to mimic these diseases were also included. PubMed (MEDLINE), Embase, LILACS and SciELO databases were used, using the keywords "copper" AND "Parkinson", and "copper" AND "Alzheimer"; and articles published between 2011 and 2020 were selected. At the end of searches and selection, 53 articles related to AD were included. Fourteen observed an increase in copper levels, 11 a decrease, and nine did not observe differences in the metal levels in different samples analyzed. Fifteen articles established a relationship between high copper levels and AD, and four measured copper concentrations in models that mimic this disease. Related to PD, 27 articles met the pre-established criteria, three of which observed an increase in the copper status of patients, 12 observed a reduction and six did not observe differences. Four publications evaluated the effects of copper in experimental models and established a relationship between high copper levels and PD development, and two evaluated copper concentrations in experimental models that mimic this disease. After analysis, it was observed that the different results observed in the studies could be associated with low number of participants, or with biofluids or cerebral area that authors used to measure copper; besides some publications did not take into account both the sex of the participants and the stage of the disease in which the individuals were. Articles that analyzed the effects of high copper levels in animals verified that this condition is related to oxidative stress, neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, cell death, and reduced both cognitive functions and locomotor activity, which are also described in

AD and PD. It could be concluded that the studies with humans have presented discrepancy in the copper concentrations in different samples analyzed; and animals exposed to high copper levels presented modifications similar to that observed in humans with AD or PD. Moreover, in animal models used to mimic neurodegenerative diseases changes in copper concentrations were not observed in most of the articles analyzed.

Keywords: metals, neurodegenerative diseases, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Absorção e metabolismo do cobre no organismo	20
Figura 2 - Reação de Fenton e de Haber-Weiss	26
Figura 3 - Vias não amilodoigênica e amilodoigênica de formação de peptídeos A β 29	
Figura 4 - Formação dos corpos de Lewy	32
Figura 5 - Fluxograma indicando as diferentes fases de seleção dos estudos relacionados à DA.....	42
Figura 6 - Países onde os estudos foram realizados	44
Figura 7- Fluxograma indicando as diferentes fases de seleção dos estudos relacionados à DP	56
Figura 8 - Escala <i>Nature Reporting Checklist</i> para os estudos em modelos animais que relacionam o excesso de cobre com a DA ou que mensuraram os níveis de cobre em modelos experimentais da doença.....	64
Figura 9 - Escala <i>Nature Reporting Checklist</i> para os estudos em modelos animais que relacionam o excesso de cobre com a DP ou que mensuraram os níveis de cobre em modelos experimentais da doença.....	65
Figura 10 - Principais alterações observadas após a exposição ao excesso de cobre e a sua relação com a DA e/ou com a DP	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de cobre em participantes com doença de Alzheimer em comparação com controles	45
Tabela 2 - Principais características da relação entre exposição ao cobre e doença de Alzheimer em animais	49
Tabela 3 - Valores de cobre em modelos animais de doenças de Alzheimer	54
Tabela 4 - Valores de cobre em participantes com doença de Parkinson comparados aos controles	57
Tabela 5 - Principais características da relação entre exposição ao cobre e doença de Parkinson em animais	59
Tabela 6 – Valores de cobre em modelos animais de doenças de Parkinson	60
Tabela 7 - Escala <i>Newcastle-Ottawa</i> para estudos em humanos, referente aos artigos que analisaram os níveis de cobre em indivíduos com DA	61
Tabela 8 - Escala <i>Newcastle-Ottawa</i> para estudos em humanos, referente aos artigos que analisaram os níveis de cobre em indivíduos com DP	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Protocolos de busca para as bases de dados pesquisadas.....	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A β	Beta amiloide
AChEI	Inibidores da Acetilcolinesterase
AP-1	Proteína ativadora-1
APP	Proteína precursora amiloide
Atox1	Chaperona antioxidante 1 de cobre
ATP	Adenosina trifosfato
ATP7A	ATPase alfa transportadora de cobre
ATP7B	ATPase beta transportadora de cobre
BACE1	β -secretase
BHE	Barreira hematoencefálica
CCA	Angiopatia amilóide cerebral
CcO	Citocromo c oxidase
CCS	Chaperona de cobre para superóxido dismutase 1
CDR	Do inglês <i>clinical dementia rating</i>
CDR-1	Demência leve
CDR-2	Demência moderada
CDR-3D	Demência grave
(CH ₃ COO) ₂ Cu	Acetato de cobre
CML	N(épsilon)carboximetilisina
Cox	Chaperona de citocromo c oxidase
Cp	Ceruloplasmina
Cp-Cu	Cobre ligado à Cp
CPLX-1/2	Complexinas 1 e 2
Ctr1	Transportador de cobre 1
Ctr2	Transportador de cobre 2
Cu	Cobre
Cu ⁺	Cobre monovalente
Cu ²⁺	Cobre divalente
Cu/Kg	Cobre por quilograma
Cu não-Cp	Cobre não ligado a ceruloplasmina
CuCl ₂	Cloreto de cobre
CuSO ₄	Sulfato de cobre

DA	Doença de Alzheimer
DβH	Dopamina-β-hidroxilase
DCYTB	Citocromo B duodenal
DM	Doença de Menkes
DMT1	Transportador de metal divalente 1
DP	Doença de Parkinson
Drp1	Proteína do tipo dinamina 1
DW	Doença de Wilson
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fis1	Proteína de fissão 1
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GSH	Glutathiona
GPx	Glutathiona peroxidase
HCO	Heme-cobre oxidases
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
LOX	Lisil oxidase
LRP1	Proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade
MAPT	Promotor do gene tau
MDA	Malondialdeído
Mfn1 e Mfn2	Mitofusinas 1 e 2
Mg	Miligrama
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridina
MT	Metalotioneína
mtDNA	DNA mitocondrial
NEP	Neprilisina
NNT	NAD(P) ⁺ transidrogenase mitocondrial
NRF1 e 2	Fatores nucleares de respiração 1 e 2
OMS	Organização Mundial da Saúde

Opa1	Proteína 1 de atrofia óptica
PAL	Peptidil- α -hidroxiglicina α -amidante liase
PAM	Peptidil-glicina α -amidante monooxigenase
PGC-1 α	Proteína coativadora-1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissomo
PHM	Peptidilglicina- α -hidroxilante monooxigenase
PPM	Partes por milhão
PRISMA	Do inglês <i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis</i>
PROSPERO	Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas
PS1	Gene da presenilina-1
SciELO	Do inglês <i>Scientific Electronic Library Online</i>
Sco	Chaperona de cobre para citocromo c oxidase
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
SOD1	Cu/Zn superóxido dismutase
SOD3	Superóxido dismutase extracelular
STEAP2	Do inglês <i>Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 2</i>
TFAM	Fator A de transcrição mitocondrial
TH	Tirosina hidroxilase
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
WT	Do inglês <i>wild type</i> (selvagem)
WT-Cu	Animais WT expostos ao cobre
WT-Cu-Cho	Animais WT expostos ao cobre e alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica
WT-Cho	Animais WT alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 METABOLISMO DO COBRE	19
1.2 CUPROENZIMAS	23
1.3 ALTERAÇÕES NA HOMEOSTASE DO COBRE	25
1.3.1 Doença de Menkes (DM)	26
1.3.2 Doença de Wilson (DW)	27
1.3.3 Relação do excesso de cobre com a Doença de Alzheimer (DA)	28
1.3.4 Relação do excesso de cobre com a Doença de Parkinson (DP)	31
1.3.5 Relação da diminuição dos níveis de cobre com a DA e com a DP	33
2 OBJETIVOS	34
2.1 OBJETIVO GERAL	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3 JUSTIFICATIVA	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 TIPO DE ESTUDO	36
4.2 REGISTRO E PROTOCOLO	37
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO E INCLUSÃO	37
4.3.1 Estudos sobre alterações nas concentrações do cobre em biofluidos ou tecidos <i>post-mortem</i> de indivíduos com DA ou DP	37
4.3.2 Estudos que relacionam o excesso de cobre com a DA e com a DP em modelos experimentais <i>in vivo</i>.	38
4.4 ESTRATÉGIAS DE BUSCA	38
4.5 SELEÇÕES DOS ARTIGOS E EXTRAÇÃO DOS DADOS	40
4.6 AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DOS ESTUDOS	41
5 RESULTADOS	41
5.1 DOENÇA DE ALZHEIMER.....	41
5.2 DOENÇA DE PARKINSON	55
5.3 ANÁLISE DE QUALIDADE DOS ARTIGOS	61
6 DISCUSSÃO	65
6.1 ESTUDOS EM INDIVÍDUOS COM DA OU COM DP	65
6.2 ESTUDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS: EFEITOS DO EXCESSO DE COBRE EM ANIMAIS	75

6.3. ESTUDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS: MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE COBRE EM MODELOS ANIMAIS DAS DOENÇAS DE ALZHEIMER E DE PARKINSON	82
7 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXO A – Escala Newcastle-Ottawa para estudos em humanos	104
ANEXO B – Tabela <i>Nature Reporting Checklist</i> para os estudos em modelos animais.....	106

1 INTRODUÇÃO

O cobre (Cu) é um elemento integrante da tabela periódica essencial em metabolismos oxidativos para realizar processos biológicos vitais e fundamentais. Encontrado em pequenas quantidades, faz parte do grupo de oligoelementos necessários para o organismo, sendo adquirido através da dieta alimentar, da água ou suplementos alimentares (SCHWARZ, 2013, BOST *et al.*, 2016, ALTARELLI *et al.*, 2019). Alimentos como nozes e miúdos são ricos em cobre, cereais e frutas em menor grau. A concentração de Cu na água potável também pode variar dependendo da composição do lençol freático e dos sistemas de encanamento doméstico (BOST *et al.*, 2016).

Intracelularmente, esse metal atua principalmente como cofator ou componente estrutural de várias enzimas, incluindo Cu/Zn superóxido dismutase (SOD1), citocromo c oxidase (CcO), ceruloplasmina (Cp) e dopamina- β -hidroxilase (D β H) (TROCELLO *et al.*, 2010, KAPLAN; MARYON, 2016, NAVARRO, SCHNEUWLY, 2017); sendo a diminuição dos níveis deste metal crítico para a correta manutenção da atividade dessas enzimas. Ainda, o cobre desempenha vários outros papéis importantes no sistema nervoso central (SNC), sendo liberado nas sinapses, afetando a transmissão neuronal, a potenciação a longo prazo, a plasticidade sináptica e a morte celular por excitotoxicidade, além de modular vias de sinalização induzidas por fatores neurotróficos em várias etapas do processo de transdução do sinal (D'AMBROSI; ROSSI, 2015). No entanto, um aumento nas concentrações deste metal possui efeito citotóxico, principalmente relacionados à inibição de função de proteínas (LETELIER *et al.*, 2005) e à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela reação de Fenton (URIU-ADAMS; KEEN, 2005), o que pode levar ao estresse oxidativo, danos ao DNA e até à morte celular (SCHEIBER; DRINGEN, 2013).

Neste sentido, o SNC é altamente suscetível a danos oxidativos, visto que requer um alto nível de oxigênio, devido sua alta demanda energética e contém uma abundância de lipídios suscetíveis à peroxidação. Além disso, possui uma baixa defesa antioxidante em comparação a outros tecidos, o que colabora para a propagação do estresse oxidativo (LIMON-PACHECO; GONSEBATT, 2009). Ainda, o cérebro concentra uma grande quantidade de cobre para uso metabólico e alterações na homeostase do metal neste tecido podem estar relacionado a algumas

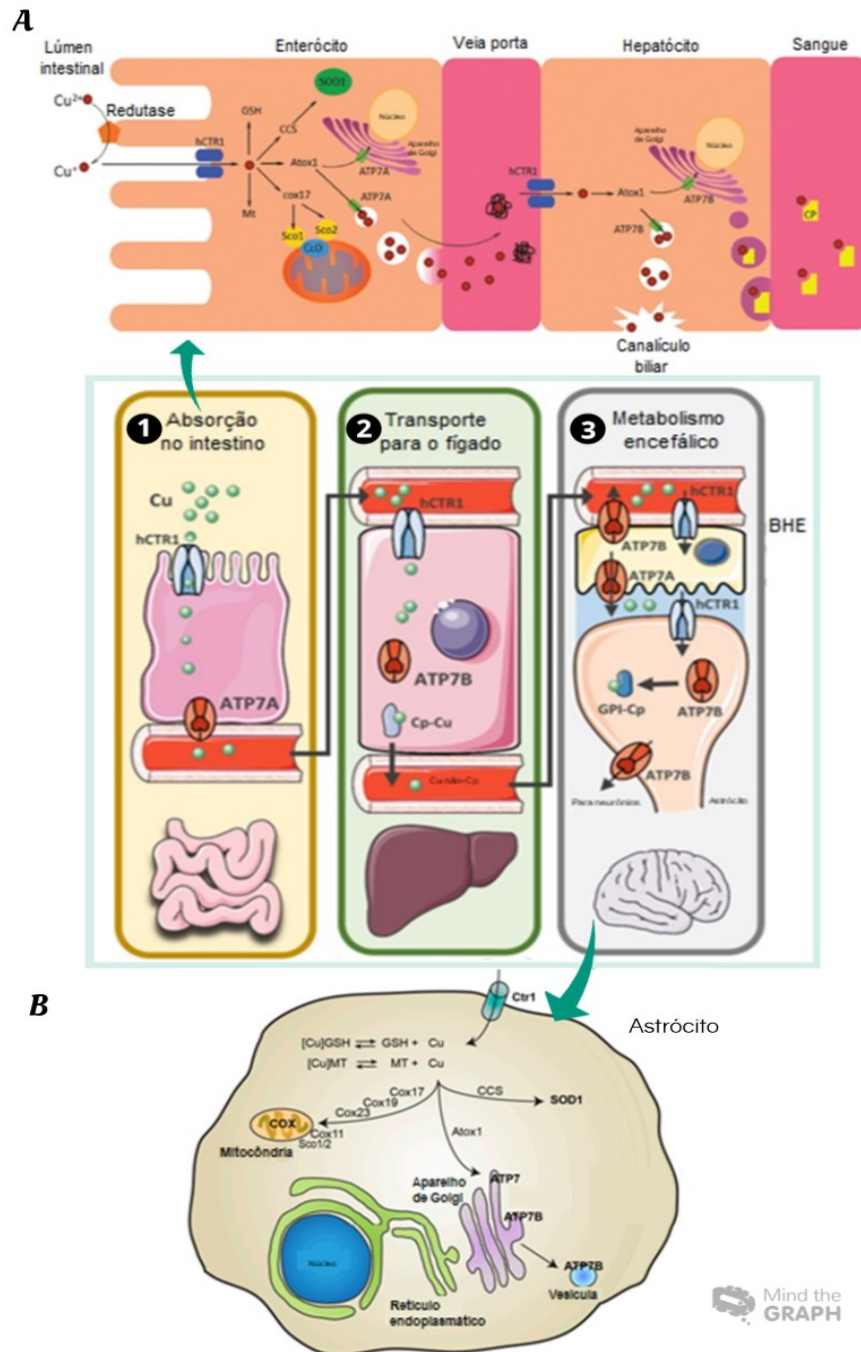
patologias neurológicas ou neurodegenerativas, como as doenças de Wilson (DW), de Menkes (DM), de Parkinson (DP) e de Alzheimer (DA).

1.1 METABOLISMO DO COBRE

O cobre proveniente da dieta tem sua absorção na mucosa intestinal, mais especificamente no duodeno, pelos enterócitos (célula do epitélio intestinal que absorve os produtos da digestão), através de transportadores específicos de cobre. O metal é então transferido para enzimas dependentes de cobre através de metalochaperonas. Dos enterócitos, o metal é liberado para a circulação porta através da proteína de transporte ATPase7A (ATP7A), presente na membrana basolateral destas células, sendo transportado até o fígado ligado à albumina, à transcuprina, às α 2-macroglobulinas, ou a aminoácidos (Figura 1) (CATER *et al.*, 2006, GOTO *et al.*, 2020, BISAGLIA; BUBACCO, 2020, SQUITTI *et al.*, 2021).

O fígado é o principal órgão que regula e controla a concentração e distribuição de cobre para os demais tecidos do organismo, incluindo o cérebro (DOGUER; HA; COLLINS, 2018, GOTO *et al.*, 2020, WITT; SCHAUMLÖFFEL; SCHWERDTLE, 2020). Nos hepatócitos, a captação desse metal é realizada pelos transportadores de cobre, os quais transferem o metal às chaperonas para ser incorporado nas proteínas dependentes de cobre, como ATPase7B (ATP7B), que incorpora o metal na Cp. Em condições normais, 85-95 % do cobre total está ligado à Cp (Cp-Cu). Assim, ocorre a liberação do Cp-Cu na corrente sanguínea para que o metal seja distribuído aos demais tecidos (Figura 1). Ainda, em torno de 10-15 % de cobre é liberado na corrente sanguínea como cobre não ligado à ceruloplasmina (Cu não-Cp), que pode se ligar à albumina, transcuprina ou a outras moléculas (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2003, BREWER, 2008, SQUITTI *et al.*, 2021). Ainda, o excesso de cobre é eliminado do organismo através da bile, também pelo transportador ATP7B (COBINE; MOORE; LEARY, 2021).

Figura 1- Absorção e metabolismo do cobre no organismo humano



A) Absorção do cobre na mucosa intestinal. O cobre é reduzido pelas redutases de Cu^{2+} a Cu^{+} , para que possa ser absorvido pelos enterócitos. A internalização do cobre por essas células ocorre através dos transportadores de cobre. A transferência para enzimas dependentes de cobre é feita pelas metalochaperonas. A proteína de transporte ATPase7A (ATP7A) é responsável pela exportação do metal dos enterócitos, e sua liberação para a circulação portal. Nos hepatócitos, os transportadores de cobre transferem o metal às chaperonas de cobre, para este ser incorporado nas cuproproteínas. O cobre é eliminado do organismo através da bile, pelo transportador ATP7B. Este transportador também incorpora o cobre na ceruloplasmina (Cp), que é liberada na corrente sanguínea (Cp-Cu) para que o cobre seja distribuído aos demais tecidos, inclusive ao sistema nervoso central, onde os astrócitos fazem a captação do metal e o disponibilizam para outras células neurais. B) Detalhamento sobre o metabolismo intracelular do cobre. A captação do cobre ocorre pelos transportadores específicos presentes na membrana plasmática, onde este é incorporado no citoplasma trafegando intracelularmente até as proteínas de ligação ao cobre (chaperonas de cobre

ou metalochaperonas), como Atox1 (chaperona antioxidante 1 de cobre, disponibiliza o cobre às ATPases ATP7A e ATP7B, dependendo da célula), CCS (chaperona de cobre para superóxido dismutase) e Cox e Sco (chaperonas de cobre para citocromo c oxidase). Ainda, intracelularmente o cobre pode ligar-se à metalotioneína (MT) ou à glutatona (GSH).

Fonte: adaptado de VERWILST; SUNWOO; KIM, 2015, BISAGLIA e BUBACCO, 2020, SQUITTI *et al.*, 2021.

Independentemente do tipo celular, primeiramente o cobre deve ser reduzido para ser transportado até o citoplasma. Sabe-se que o cobre tem dois estados de oxidação, Cu^+ (monovalente) e Cu^{2+} (divalente), sendo inicialmente encontrado na forma de Cu^{2+} . Para que seja incorporado na célula, o Cu^{2+} é reduzido por uma redutase que converte-o em Cu^+ , para que, desta forma seja transportado para o meio intracelular através de transportadores específicos do tipo Ctr1, Ctr2 (transportadores de cobre 1 e 2) ou DMT1 (transportador de metal divalente 1) (DOGUER; HA; COLLINS, 2018, GOTO *et al.*, 2020, WITT; SCHAUMLÖFFEL; SCHWERDTLE, 2020). Três redutases cúpricas foram identificadas até o momento: citocromo b férrica/cúprica redutase, STEAP2 (do inglês *six-transmembrane epithelial antigen of prostate 2*) e DCYTB (citocromo B duodenal) (DOGUER; HA; COLLINS, 2018).

O Ctr1 é a principal proteína de importação de cobre, sendo encontrado na membrana plasmática. O transportador Ctr2 realiza principalmente o transporte do cobre para as organelas, mas pode ser encontrado presente na membrana plasmática, porém, em menor quantidade sendo menos utilizado, por ser um transportador mais seletivo (WEE *et al.*, 2013). Além disso, o DMT1 também atua no transporte do cobre para o interior da célula. Tanto o Ctr1 quanto o DMT1 são os transportadores mais utilizados na entrada do cobre nas células (CHEN *et al.*, 2016, ILYECHOVA *et al.*, 2019), mas se ambos atuam no transporte através da membrana eles devem ter uma relação compensatória, como sugerido por LIN e colaboradores (2015). Estes pesquisadores relataram que quando há um aumento da concentração de cobre extracelular há uma diminuição da captação do cobre pelo Ctr1, assim o DMT1 desempenharia um maior papel no transporte deste metal de forma compensatória (LIN *et al.*, 2015).

O cobre é incorporado no citoplasma onde trafega intracelularmente até as proteínas de ligação ao cobre, denominadas chaperonas de cobre ou metalochaperonas (Figura 1). Essas incluem a Atox1 (chaperona antioxidante 1 de cobre), CCS (chaperona de cobre para SOD1), e Cox e Sco (chaperonas de CcO;

onde as mais conhecidas e importantes são Cox19, Cox17, Cox23, Cox11, Sco1 e 2). As proteínas Cox e Sco são responsáveis pela destinação do cobre para as mitocôndrias. A Cox17, 19 e 23 atuam na transferência do cobre para a Sco1/2 e a Cox11, localizadas na membrana mitocondrial interna, que atuam na montagem da CcO (BARROS; JOHNSON; TZAGOLOFF, 2004, BODE *et al.*, 2015). No entanto, alguns estudos relatam que o cobre é destinado às mitocôndrias ligado a uma molécula não proteica, e não pelas chaperonas citadas acima, e somente no interior das mitocôndrias que este metal seria incorporado às metalochaperonas responsáveis pela montagem da enzima CcO (COBINE *et al.*, 2004, COBINE *et al.*, 2006, DODANI *et al.*, 2011).

A Atox1 disponibiliza o cobre às ATPases ATP7A e ATP7B (dependendo da célula), localizadas na rede trans do Aparelho de Golgi, e responsáveis pela formação de cuproenzimas nesta organela. Um aumento nas concentrações do metal no citosol estimula a translocação de ATP7A/B do Aparelho de Golgi para a membrana plasmática e/ou para uma vesícula próxima à membrana, para que ocorra a exportação do cobre. Sendo assim, essas ATPases são uma das principais responsáveis por manter a homeostase do cobre intracelularmente (SKOPP *et al.*, 2019, GOTO *et al.*, 2020, BISAGLIA; BUBACCO, 2020). Já a CCS fornece cobre para a SOD1 e é responsável pela sua maturação, o que leva à sua ativação (SKOPP *et al.*, 2019, GOTO *et al.*, 2020, BISAGLIA; BUBACCO, 2020). Além disso, intracelularmente o cobre está ligado à metalotioneína (MT) ou à glutathiona (GSH), dois antioxidantes que evitam que haja danos oxidativos durante o processo de internalização do cobre (Figura 1) (KUMAR *et al.*, 2016).

Em relação ao SNC, as primeiras células a entrarem em contato com o cobre proveniente da circulação são os astrócitos, que fazem parte da barreira hematoencefálica (BHE). Essa localização privilegiada permite que sejam as primeiras células do SNC a terem contato com diversos íons e moléculas provenientes da corrente sanguínea (DRINGEN *et al.*, 2007, SCHEIBER; SCHMIDT; DRINGEN, 2012). Neste contexto, são células eficientes na captação do cobre, protegendo os neurônios do efeito tóxico do Cu, já que os neurônios são células mais susceptíveis à uma elevação nas concentrações deste (ASHRAF *et al.*, 2019). A eliminação do cobre pelos astrócitos é realizada pelas ATPases ATP7A e ATP7B, sendo o mais expresso nestas células o transportador ATP7A (SCHEIBER; SCHMIDT; DRINGEN, 2012). Os astrócitos são também os responsáveis por

disponibilizar o cobre para as demais células do SNC, como os neurônios (SCHEIBER; DRINGEN, 2013).

1.2 CUPROENZIMAS

A homeostase do cobre é essencial para que este metal possa desempenhar várias funções intracelularmente. Ele atua principalmente como cofator ou componente estrutural das enzimas lisil oxidase, D β H, peptidil-glicina α -amidante monoxigenase, tirosinase, CcO, SOD1 e superóxido dismutase extracelular (SOD3) (TROCELLO *et al.*, 2010, KAPLAN; MARYON, 2016, NAVARRO, SCHNEUWLY, 2017).

A lisil oxidase (LOX) atua principalmente na síntese do colágeno e de elastina, proteínas presentes na matriz extracelular de tecidos conjuntivos. As quatro diferentes isoformas desta enzima contêm um domínio de ligação ao cobre (POMILIO; CIPRIAN-OLLIVIER; VITALE, 2016). O metal é essencial para a reoxidação de outro cofator da LOX, a lisil tirosilquinona, a qual atua na desaminação oxidativa dos resíduos de lisina e hidroxilisina presentes em precursores do colágeno e da elastina (AKAGAWA; SUYAMA, 2001). Este processo é essencial para a estabilização das fibrilas de colágeno e para a integridade e elasticidade da elastina madura (SIEGEL *et al.*, 1982, POMILIO; CIPRIAN-OLLIVIER; VITALE, 2016).

A D β H faz parte de uma via que envolve várias enzimas para a produção de catecolaminas, que atuam como neurotransmissores ou hormônios (VACCARI *et al.*, 1996, RAHMAN *et al.*, 2014, GONZALEZ-LOPEZ; VRANA, 2020). Nesta via, a D β H realiza a conversão da dopamina em norepinefrina/noradrenalina, possuindo dois sítios catalíticos contendo cobre, que desempenham diferentes funções na atividade enzimática da D β H (ASH *et al.*, 1984). A D β H pode ser encontrada tanto na forma solúvel ou ligada a membrana (LI *et al.*, 2020).

Outra enzima dependente de cobre é a peptidil-glicina α -amidante monoxigenase (PAM), a qual é essencial para a síntese de vários neuropeptídeos importantes, como ocitocina, vasopressina, corticotrofina, substância P, neuropeptídeo Y, colecistocinina e gastrina. A PAM apresenta dois domínios catalíticos (PROHASKA *et al.*, 2005, BOUSQUET-MOORE; MAINS; EIPPER, 2010) sendo que um de seus domínios, denominado peptidilglicina- α -hidroxilante

monooxigenase (PHM), é capaz de se ligar ao cobre e catalisa a hidroxilação da glicina C-terminal em um grande número de neuropeptídeos inativos (PROHASKA *et al.*, 2005, PROHASKA; BRODERIUS, 2006). O outro domínio é peptidil- α -hidroxiglicina α -amidante liase (PAL), que é responsável por hidrolisar o produto anterior liberando glioxilato e o produto peptídico amidado resultante ao final do processo (PROHASKA *et al.*, 2005, PROHASKA; BRODERIUS, 2006).

A cuproenzima tirosinase atua na oxidação de tirosina para a síntese da melanina, que dá pigmentação a pele humana, sendo a ação enzimática desta proteína também dependente de cobre (HARIRI; SAEEDI; AKBARZADEH, 2021). O sítio ativo dessa enzima contém dois átomos de Cu sendo cada um ordenado por três resíduos de histidina (RAMSDEN; RILEY, 2014).

Na CcO, componente do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons, o cobre também tem um papel como cofator. Esta enzima pertence à família de heme-cobre oxidases (HCO), que são proteínas que possuem em sua estrutura um átomo de cobre associado ao grupamento heme (GAO *et al.*, 2012, KHALFAOUI-HASSANI *et al.*, 2018). O complexo IV é responsável por bombear prótons através da membrana mitocondrial interna, assim como os complexos I e III, para a formação do potencial de membrana mitocondrial, essencial para a síntese de ATP. Ainda, é o complexo terminal da cadeia respiratória, atuando como catalisador da redução do oxigênio (O_2) à água (H_2O) (KHALFAOUI-HASSANI *et al.*, 2018). A CcO possui 14 subunidades, sendo três formando seu centro catalítico, e duas destas possuem cobre. Uma delas (subunidade MT-CO1) contém um centro redox que possui dois grupamentos heme (*a* e *a3*) com um átomo deste metal (Cu_B) associado ao heme *a3*; e a outra (subunidade MT-CO2) contém um centro redox contendo dois átomos de cobre (Cu_A). Os elétrons provenientes do citocromo *c* fluem no sentido Cu_A , heme *a*, heme *a3*- Cu_B e O_2 (BRISCHIGLIARO; ZEVIANI, 2020). Desta forma, os íons de cobre são essenciais para a transferência de elétrons neste complexo, tanto que um defeito na inserção do cobre nesta oxidase leva a doenças mitocondriais em humanos, ressaltando a importância do metal para a sua atividade enzimática (EKICI *et al.*, 2014).

Por fim, as enzimas superóxido dismutases (SOD) são responsáveis por desempenhar papel antioxidante por serem capazes de dismutar radicais superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (TIWARI *et al.*, 2019). A Cu/Zn SOD ou SOD1 é um homodímero, com cada um de seus monômeros ligados a íons de cobre

e zinco sendo encontrada em maior quantidade no citoplasma das células (FETHEROLF *et al.*, 2017). Já a SOD extracelular (SOD3), que também possui cobre e zinco, é um tetrâmero que consiste de dois dímeros ligados entre si por pontes dissulfeto e é encontrada no espaço extracelular (OURY *et al.*, 1996, KIM *et al.*, 2015). O cobre é essencial para que essas duas isoformas da SOD possam exercer sua atividade redox, que ocorre em dois passos (PERRY *et al.*, 2010). Primeiramente, a ligação da enzima ao superóxido promove a redução de Cu(II) a Cu(I), formando O_2 . Após, a reação da enzima com um segundo superóxido resulta na oxidação de Cu(I) e geração de H_2O_2 (FETHEROLF *et al.*, 2017).

Além de ser essencial para a atividade das cuproenzimas citadas acima, este metal também age na homeostase do ferro, sendo que o ferro e o cobre são essenciais para a atividade da ceruloplasmina, que atua convertendo o ferro a íon férrico, permitindo que este possa se ligar a transferrina (principal meio de transporte do ferro sérico) e ser transportado para o plasma. A ceruloplasmina também transporta cobre no plasma (DÍAZ *et al.*, 2015).

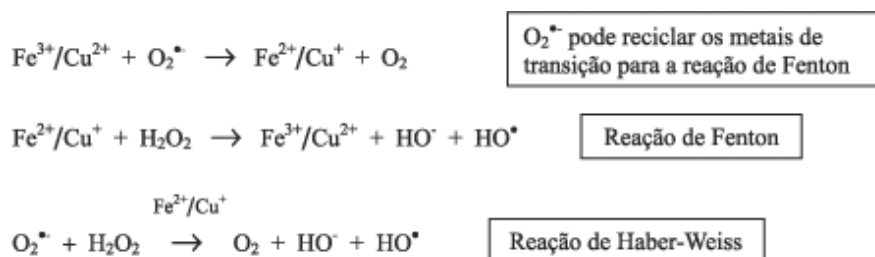
1.3 ALTERAÇÕES NA HOMEOSTASE DO COBRE

Uma alteração na homeostase do cobre pode levar ou a um acúmulo deste metal, o que é tóxico, ou a uma diminuição da sua concentração, levando a uma deficiência. Estes danos podem ser reversíveis ou não, mas em ambos os casos o organismo responde com resultados negativos, como ocorre na progressão de algumas doenças neurodegenerativas ou na fisiopatologia da DW e da DM (ZISCHKA; EINER, 2018).

O cobre possui atividade redox, o que é de suma importância para o papel biológico de várias proteínas (como descrito acima), por isso, a deficiência deste metal pode levar a alterações na atividade das cuproenzimas. Porém, a sua atividade redox também o torna tóxico, pois pode formar radicais livres por reações de Fenton e Haber-Weiss. A reação de Fenton envolve a transformação do H_2O_2 em um radical hidroxila (URIU-ADAMS; KEEN, 2005). Na reação de Haber-Weiss, ocorre a geração de radicais hidroxila a partir de H_2O_2 e superóxido na presença de íons de ferro e/ou cobre (Figura 2) (KEHRER, 2000, LEITÃO *et al.*, 2017). As ERO geradas nessas reações podem reagir com lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (MONTES *et al.*, 2014), o que pode levar ao estresse oxidativo, danos ao

DNA e até à morte celular, causando problemas cognitivos nos indivíduos ou em modelos animais onde a concentração deste elemento encontra-se elevada (SCHEIBER; DRINGEN, 2013, ZHOU *et al.*, 2015, PAL; PRASAD, 2015).

Figura 2 - Reação de Fenton e de Haber-Weiss



Reação de Fenton: é catalisada pelo ferro (Fe²⁺) ou cobre (Cu⁺), junto com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), formando o radical hidroxila (HO•) altamente reativo. Já a reação de Haber-Weiss ocorre através da união entre superóxido (O₂^{•-}) e H₂O₂, para a formação do HO•, onde o Fe²⁺ ou Cu⁺ são os catalisadores da reação

Fonte: GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLA, 2007.

Ainda, os efeitos citotóxicos associados à elevação das concentrações de cobre podem estar relacionados a ligação do metal diretamente às proteínas, principalmente em resíduos de cisteína e histidina, o que pode levar à inibição dessas enzimas (BRYCE; GURD, 1966, SUZUKI; KARASAWA; YAMANAKA, 1989, LETELIER *et al.*, 2009).

1.3.1 Doença de Menkes (DM)

A DM é uma doença autossômica recessiva ligada ao X, caracterizada por sintomas neurológicos, como retardo mental e convulsões, além de hipotermia, dificuldades de alimentação e diminuição do tônus muscular (CANKORUR-CETINKAYA; ERASLAN; KIRDAR, 2013). A doença resulta da mutação na proteína transportadora ATP7A, a qual é expressa em quase todos os tipos celulares, exceto nos hepatócitos (CANKORUR-CETINKAYA; ERASLAN; KIRDAR, 2013). Devido a isso o cobre se acumula no citosol por não ser transportado para fora da célula. Considerando que a ATP7A está presente nos enterócitos, ocorre uma falha na absorção do metal e transporte para o fígado e, conseqüentemente, para as demais células do organismo, o que leva a deficiência geral de cobre, que é a principal característica desta doença (BHADHPRASIT *et al.*, 2012). Dependendo da localidade, os relatos acerca da incidência da doença diferem. Na Austrália, a

incidência é de 1 para 40.000 nascidos vivos, enquanto na Europa é de 1 para 300.000 (VAIRO *et al.*, 2018), sendo uma doença com maior predominância em crianças do sexo masculino. No Brasil não há relatos sobre a incidência da doença (AGUIAR *et al.*, 2012). A doença tem tratamento, sendo utilizado uma suplementação de cobre-histidina pela via intravenosa (PULKIT; NEERA, 2018, VAIRO *et al.*, 2018). Entretanto, estudos têm demonstrado que esse tratamento é eficiente somente se realizado durante o período neonatal (VAIRO *et al.*, 2018).

1.3.2 Doença de Wilson (DW)

Ao contrário da DM, na DW ocorre o acúmulo de cobre no organismo. A DW é uma doença autossômica recessiva causada por uma mutação no transportador ATP7B, o que leva a um defeito na excreção de cobre do organismo pelo fígado, ocorrendo o acúmulo de cobre principalmente neste órgão, mas também em tecidos extra-hepáticos como córnea, cérebro e rins (SEO *et al.*, 2018, GREIG *et al.*, 2019, DONG *et al.*, 2020). Acredita-se que os efeitos observados em outros tecidos, como no SNC de indivíduos com DW, são secundários aos danos hepáticos, já que a exposição do SNC a elevadas concentrações de cobre está relacionada com o aumento deste metal na corrente sanguínea, devido ao excesso de cobre no fígado ou mesmo devido à morte dos hepatócitos (PFEIFFER, 2007, ROBERTS *et al.*, 2012).

Os sintomas neurológicos são tardios, mas quando apresentados são variados, desde alterações neurológicas como irritabilidade, ansiedade, depressão, até alterações psiquiátricas (BEHARI; PARDASANI, 2010, BANDMANN; WEISS; KALER, 2015). Ainda, os pacientes com DW apresentam tremor, parkinsonismo, perturbações da marcha, disartria ou convulsões (ALA *et al.*, 2007). A incidência global mostrada na literatura é 1: 30.000 pessoas acometidas pela DW, podendo mudar de país para país (CZŁONKOWSKA *et al.*, 2018, MULLIGAN; BRONSTEIN, 2020). É uma doença sem cura, mas é controlada com ajuda de fármacos quelantes, diminuindo o acúmulo do cobre (SMOLINSKI *et al.*, 2019). No entanto, a administração destes deve ser finamente regulada, para não causar uma deficiência do metal nos pacientes.

Além de sujeitos com DW e DM, alterações na homeostase do cobre no SNC têm sido relacionados ao envelhecimento (SERPA *et al.*, 2008) e também com a

progressão de doenças neurodegenerativas, como a DA e a DP (RIVERA-MANCIÁ *et al.*, 2010, TIFFANY-CASTIGLIONI; HONG; QIAN, 2011).

1.3.3 Relação do excesso de cobre com a Doença de Alzheimer (DA)

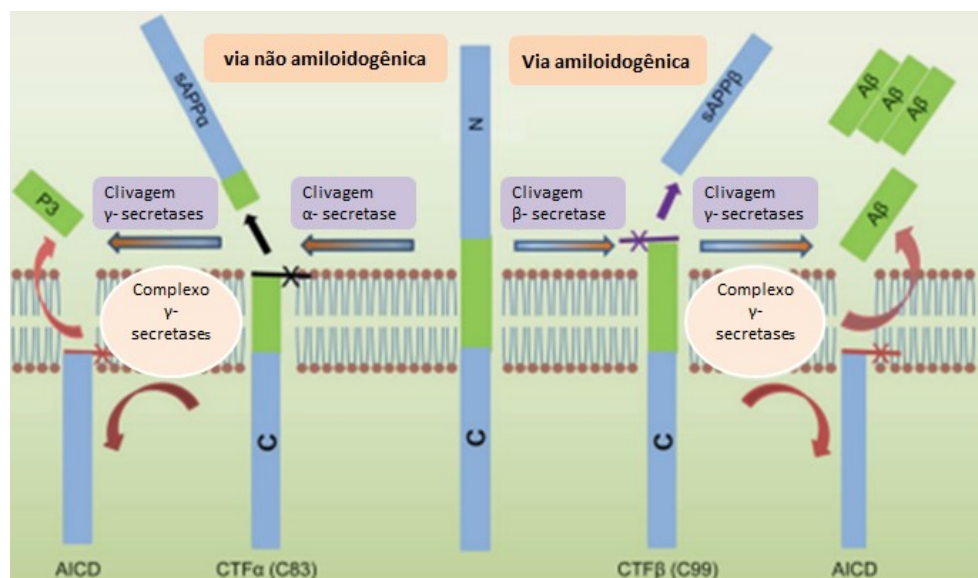
A DA é a doença neurodegenerativa, multifatorial, que mais acomete as pessoas com mais de 60 anos, sendo as principais características desta doença a perda da memória, alterações na personalidade e de comportamento, declínio cognitivo, perda das funções sensoriais e motoras, e problemas psiquiátricos (SIMUNKOVA *et al.*, 2019). Segundo relatório da Organização Mundial da Saúde de 2015 (OMS, 2015) se estima que a prevalência mundial de demência seja de 47,5 milhões, sendo que no Brasil o número de pessoas com a doença atinge cerca de 1,2 milhão. Prevê-se que o número de pessoas com DA no mundo chegue a 65,7 milhões em 2030, e a 115,4 milhões em 2050 (DADALTO; CAVALCANTE, 2021).

A DA está associada com o acúmulo e agregação do peptídeo β -amiloide ($A\beta$) extracelular - que formam as placas amiloides, conhecidas também como placas senis - e com a hiperfosforilação da proteína tau, presente em emaranhados neurofibrilares intracelulares (YANO *et al.*, 2003, PATEL; ASCHNER, 2021). Ainda, características comuns às doenças neurodegenerativas, como neuroinflamação, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e morte celular também são descritos na DA (MATHYS; WHITE, 2017). O avanço desta doença neurodegenerativa influencia no papel da comunicação entre neurônios, podendo resultar na morte neuronal ou na perda das suas funções devido ao acúmulo de placas amiloides entre os neurônios, bloqueando a comunicação neuronal (PATEL; ASCHNER, 2021).

Como pode ser observado na Figura 3, os peptídeos β -amiloide são formados por cerca de 38 a 43 resíduos de aminoácidos, sendo gerados através da clivagem enzimática da proteína precursora amiloide (APP), presente na membrana plasmática, pela β - e γ -secretases, que formam assim os peptídeos $A\beta$. A ação destas enzimas pode ocorrer por duas vias diferentes: a via não amiloidogênica e a via amiloidogênica. Na primeira, a APP é primeiramente clivada pela α -secretase e posteriormente pela γ -secretase, formando peptídeos $A\beta_{17-40/42}$ ou pela β -secretase (BACE1), ocorrendo a formação do peptídeo $A\beta_{1-16}$. Já na segunda via, a APP sofre clivagens consecutivas pelas β - e γ -secretases formando peptídeos $A\beta_{1-40/42}$

(CHEIGNON *et al.*, 2018). As placas senis são formadas devido à clivagem da APP por essa via, pois esses peptídeos tendem a se agrupar (CHEIGNON *et al.*, 2018).

Figura 3 - Vias não amiloidogênica e amiloidogênica de formação de peptídeos A β



Via não amiloidogênica: ocorre a clivagem da proteína precursora amiloide (APP) através da α -secretase, a qual ocorre dentro do domínio A β (em verde) para gerar o fragmento C terminal CTF α (C83), que permanece na membrana, e o fragmento N-terminal sAPP α (solúvel). O fragmento CTF α é então clivado por γ -secretases formando o fragmento P3 extracelular e o domínio intracelular da APP (AICD). Via amiloidogênica: ocorre devido a ação da β -secretase, que cliva a APP em fragmentos CTF β (ou C99) e sAPP β , seguido pela clivagem de CTF β por γ -secretases em fragmentos extracelulares A β e fragmento intracelular da APP (AICD).

Fonte: adaptado de CHEN *et al.*, 2017.

Em relação aos emaranhados neurofibrilares intracelulares característicos da DA, estes são gerados a partir da hiperfosforilação da proteína tau, que faz com que esta se agregue formando esses emaranhados, o que causa um colapso no citoesqueleto neuronal (MARTELLI; MARTELLI, 2014). A hiperfosforilação reduz a capacidade da proteína tau em estabilizar os microtúbulos, afetando a dinâmica microtubular, o que consequentemente leva a alterações no transporte intraneural (PAULA; GUIMARÃES; FORLENZA, 2009).

Além disso, alguns estudos têm demonstrado a relação entre alterações na homeostase de íons metálicos, como o cobre, com o início e progressão desta doença. O cobre possui capacidade de se ligar ao peptídeo A β , acelerando a sua agregação e assim promovendo a formação das placas senis (ROBERTS *et al.*, 2012, MATHYS; WHITE, 2017). De fato, íons de Cu²⁺ foram observados nessas placas, diretamente ligados ao peptídeo A β , e estão envolvidos na geração de estresse oxidativo via reação de Fenton e Haber-Weiss nos pacientes com esta

patologia (MATHYS; WHITE, 2017) e nos demais efeitos neurotóxicos observados na DA, como a inibição da CcO ou a ativação da micróglia (CROUCH *et al.*, 2005, ESKICI; AXELSEN, 2012, GHOSH; DEY, 2013, YU *et al.*, 2015, BULCKE *et al.*, 2017). Já foi mencionado que essa capacidade de ligação do cobre às placas senis pode provocar diminuição nos níveis desse metal nas células cerebrais (DEIBEL; EHMANN; MARKESBERY, 1996, SIMUNKOVA *et al.*, 2019). Outros estudos mencionam que esse acúmulo de cobre dentro das placas A β faz com que ocorra um aumento dos níveis do metal no cérebro de indivíduos em comparação com controles (MATHYS; WHITE, 2017, LIU *et al.*, 2019).

O excesso de cobre também pode diminuir o conteúdo de neprilissina (NEP), uma protease envolvida na degradação do peptídeo A β (IWATA *et al.*, 2000, SHIROTANI *et al.*, 2001, LI *et al.*, 2010). Relata-se na literatura que os níveis de NEP são menores no cérebro de indivíduos com DA do que em indivíduos que não apresentam a doença (YASOJIMA *et al.*, 2001, MARUYAMA *et al.*, 2005, IWATA; HIGUCHI; SAIDO, 2005, SHI *et al.*, 2005). Ainda, o excesso de cobre poderia aumentar a expressão da BACE1, que por sua vez possui alta afinidade pelo metal (ANGELETTI *et al.*, 2005, KITAZAWA; CHENG; LAFERLA, 2009, CHAMI; CHECLER, 2012). A APP também é uma proteína ligante de cobre, reduzindo Cu²⁺ a Cu⁺ (HESSE *et al.*, 1994, ATWOOD *et al.*, 2004). Nesta reação, pode ocorrer a geração de ERO contribuindo para o estresse oxidativo observado no cérebro com DA (MULTHAUP *et al.*, 1996, ESKICI; AXELSEN, 2012). Estudos *in vitro* demonstram que células neuronais expostas ao cobre têm um aumento de APP na membrana plasmática, pois, além de aumentar a expressão dessa proteína, esse metal estimula o tráfego desta para a superfície celular (ACEVEDO *et al.*, 2011). Desta forma, é possível concluir que o excesso de cobre pode indiretamente aumentar a produção do peptídeo A β , por aumentar o conteúdo de BACE1 e a translocação de APP para a membrana plasmática, além de diminuir a degradação de A β devido à diminuição do conteúdo de NEP.

Nesta patologia, o cobre também está envolvido na fosforilação e agregação da proteína tau, além de aumentar a toxicidade de seus agregados proteicos (BULCKE; DRINGEN; SCHEIBER, 2017). Para os autores, existe uma relação entre o cobre e a proteína tau através do promotor do gene tau (MAPT) que é regulado pelo fator de transcrição Sp1, o qual é responsivo ao Cu (BULCKE; DRINGEN; SCHEIBER, 2017). Ainda, os resíduos de histidina contidos em diferentes regiões da

proteína tau são potenciais sítios de ligação para íons metálicos, como o cobre, e esta ligação pode aumentar a tendência da proteína a se agregar (BACCHELLA *et al.*, 2019).

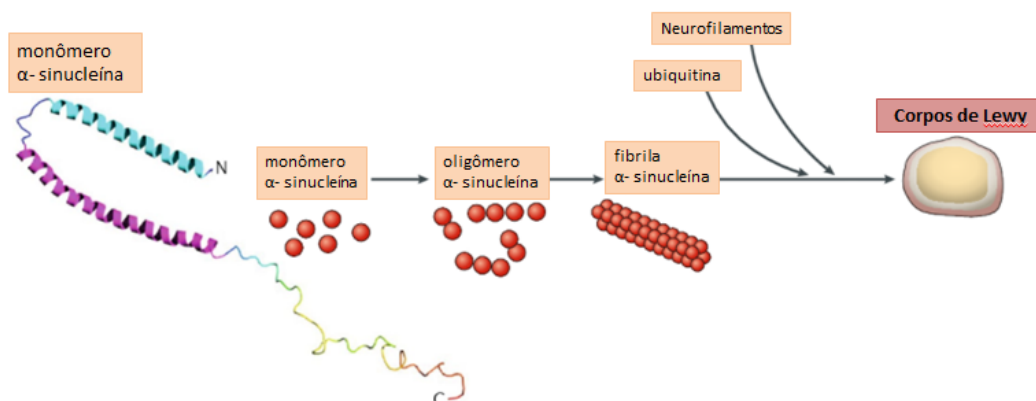
1.3.4 Relação do excesso de cobre com a Doença de Parkinson (DP)

A DP é a segunda doença neurodegenerativa de maior incidência na população idosa e, assim como a DA, é um exemplo de doença multifatorial relacionada ao envelhecimento que afeta milhares de pessoas todos os anos (FU, GAO, YUNG, 2019, Parkinson's Foundation). É uma doença neurodegenerativa debilitante, que afeta a capacidade de locomoção dos indivíduos (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2019). Os principais sintomas da doença são tremor, rigidez, bradicinesia / acinesia, instabilidade postural, podendo incluir outros sintomas motores e não motores, evoluindo conforme a doença progride (BJORKLUND *et al.*, 2018; BALESTRINO; SCHAPIRA, 2019). Estima-se que afete 6 milhões de pessoas ao redor do mundo com 60 anos ou mais (AASETH; DUSEK; ROOS, 2018). No Brasil, a notificação da DP não é obrigatória, o que dificulta a exatidão dos números de indivíduos acometidos, mas se estima que pode chegar a 200 mil pessoas afetadas (SANTOS *et al.*, 2022). A expectativa de vida dos indivíduos acometidos por esta doença é mais curta do que a da população idosa em geral, mas com tratamento adequado essa expectativa volta a aumentar (AASETH; DUSEK; ROOS, 2018). A DP afeta duas vezes mais homens do que mulheres, mas nas mulheres a doença evolui mais rapidamente com taxa de mortalidade mais elevada (CERRI, MUS, BLANDINI, 2019).

As principais características desta patologia são a perda dos neurônios dopaminérgicos na substância negra do cérebro (AASETH; DUSEK; ROOS, 2018, CERRI, MUS, BLANDINI, 2019) e a presença de agregados de proteínas intracelulares, denominados corpos de Lewy, que são constituídos por fibrilas de α -sinucleína (LI *et al.*, 2020, BISAGLIA; BUBACCO, 2020, BALESTRINO; SCHAPIRA, 2019). Os corpos de Lewy recebem essa nomenclatura devido a Fritz Heinrich Jakob Lewy que foi o primeiro a relatar seu surgimento na DP (ENGELHARDT, 2017). Esses corpos são formados principalmente pela proteína α -sinucleína, por proteínas neurofilamentares e pela ubiquitina (VAZ *et al.*, 2010). O surgimento dos corpos de Lewy ocorre através do mal dobramento da proteína α -sinucleína,

ocorrendo a formação de oligômeros e posteriormente fibrilas insolúveis. No momento que essas fibrilas se associam a moléculas como proteínas neurofilamentares e ubiquitina, ocorre a formação dos corpos de Lewy (Figura 4) (FRANCO; NAVARRO; MARTÍNEZ-PINILLA, 2019, FAN; LIU; WU, 2021).

Figura 4 - Formação dos corpos de Lewy



Estrutura em 3D da proteína α -sinucleína e a progressão de monômeros à oligômeros e fibrilas, que podem interagir com diferentes proteínas e resultar na formação dos corpos de Lewy, observados na doença de Parkinson.

Fonte: adaptado de ARNAOUTOGLU; O'BRIEN; UNDERWOOD, 2018.

Análises *in vitro* sugerem que o cobre pode promover a formação de conformações da proteína α -sinucleína que tendem a se agregar, pois a mesma apresenta afinidade por este metal (PAIK *et al.*, 1999, UVERSKY; LI; FINK, 2001, BINOLFI *et al.*, 2006, BISAGLIA; BUBACCO, 2020). Além disso, o cobre está envolvido na oxidação da dopamina, o qual promove a geração de compostos tóxicos, como ERO e dopamina-quinona (PALUMBO *et al.*, 1987, PHAM; WAITE, 2014). Estudo de Spencer e colaboradores demonstrou semelhanças com a afirmação anterior, pois em seus estudos observaram que o produto final dessa oxidação da dopamina com o cobre gera danos ao DNA (SPENCER *et al.*, 2011). Em outro estudo foi observado a diminuição da enzima antioxidante SOD e de GSH, junto com um acentuado aumento do malondialdeído (MDA), produto da lipoperoxidação, em cérebro de ratos expostos ao cobre (OZCELIK; UZUN, 2008).

Ainda, como já citado anteriormente, o excesso de cobre que alguns autores relatam nesta patologia pode ser neurotóxico por catalisar a formação de ERO pelas reações de Fenton e Haber-Weiss, e pela ligação direta do metal com resíduos de

cisteína e histidina de proteínas, o que pode alterar a função destas (LETELIER *et al.*, 2009).

1.3.5 Relação da diminuição dos níveis de cobre com a DA e com a DP

Em contrapartida ao excesso do cobre, a diminuição deste metal também tem sido descrita na DA e DP, sendo as consequências da deficiência do metal semelhantes nas duas patologias. A diminuição das concentrações de cobre pode promover a redução da atividade de cuproenzimas, o que pode estar relacionado com a neurodegeneração observada nestas doenças. Isso pode ocorrer, por exemplo, com a atividade da ceruloplasmina (também conhecida como ferroxidase ou ferro(II):oxigênio oxidoredutase), onde o *déficit* de cobre ocasiona o aumento dos níveis de ferro devido ao mal funcionamento desta enzima, que é responsável pela redução de Fe^{2+} a Fe^{3+} (GANGANIA *et al.*, 2016, GENOUD *et al.*, 2017). O aumento das concentrações de ferro também leva ao estresse oxidativo pelas reações de Fenton e Haber-Weiss (BUSH, 2003, BELAIDI; BUSH, 2016).

Outras enzimas que podem apresentar a atividade prejudicada pela deficiência de cobre são a SOD1 e a CcO (BULCKE *et al.*, 2017). O mal funcionamento da CcO acarreta em falhas na respiração celular e consequentemente na produção de ATP, o que pode levar à disfunção mitocondrial, a qual já é amplamente descrita tanto na fisiopatologia da DA como na da DP (WANG *et al.*, 2014, MISRANI; TABASSUM; YANG, 2021). Já a diminuição da atividade da SOD1 pode ocasionar o acúmulo de ERO intracelular levando ao estresse oxidativo, também envolvido na fisiopatologia destas doenças (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). Neste sentido, já foi observado que a SOD1 pode ser encontrada nos corpos de Lewy, e que a agregação dessas proteínas ocorre devido a um decréscimo na incorporação do cobre, que pode estar relacionado com a deficiência do metal (ROUDEAU *et al.*, 2015). Ainda, o *déficit* do metal diminui a expressão de proteínas relacionada ao sistema antioxidante por afetar a translocação de Nrf2 para o núcleo, fator de transcrição relacionado à expressão de genes que codificam para essas proteínas, o que também colabora com o estabelecimento do estresse oxidativo (JIANG *et al.*, 2014, SONG *et al.*, 2014).

Ainda, a atividade da D β H pode ser alterada quando há uma diminuição das concentrações de cobre. Foi demonstrado que a deficiência do metal diminui a

atividade da enzima, causando uma deficiência da dopamina, resultando em vários distúrbios neurológicos, incluindo a DP, pois é a partir da dopamina que se tem a formação de neurotransmissores essenciais (RAHMAN *et al.*, 2014).

Outro fato importante que deve ser ressaltado é que o cobre é de extrema importância ao SNC, pois ele está ligado ao processo de desenvolvimento do encéfalo, atuando na mielinização, além de atuar também diretamente nos receptores dos neurotransmissores e com proteínas sinápticas, afetando desta forma o comportamento neuronal (GAIER; EIPPER; MAINS, 2013, GROMADZKA *et al.*, 2020). Estudos também destacam o papel do cobre no aprendizado, na memória e no ritmo circadiano (ACKERMAN; CHANG, 2018). Assim sendo, uma diminuição nas concentrações desse metal ocasionaria um defeito nas sinapses, não ocorrendo a transmissão adequada de impulsos nervosos, os quais são responsáveis, por exemplo, pela aquisição e consolidação da memória e pelo aprendizado, o que pode estabelecer uma relação entre a deficiência em cobre e o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

Desta forma, estudos são necessários para compreensão da relação entre a homeostase do cobre no SNC e o início e progressão de doenças neurodegenerativas, pois ainda existem controvérsias na literatura sobre este tema (BISAGLIA; BUBACCO, 2020). Além disso, estudos em animais tem observado que a absorção, o conteúdo e a distribuição desse metal são alterados durante o envelhecimento, aumentando a vulnerabilidade para a progressão de doenças relacionadas ao SNC (WANG *et al.*, 2010). Neste sentido, a presente revisão sistemática da literatura tem o intuito de fornecer informações para melhorar a compreensão entre alterações na homeostase do cobre e a progressão das doenças neurodegenerativas de Alzheimer e de Parkinson, reunindo estudos que analisaram os níveis de cobre em tecidos *post-mortem* e em biofluidos de indivíduos com estas doenças, ou de modelos experimentais destas, analisando de forma crítica os dados fornecidos pelos autores. Além disso, essa revisão faz a análise das evidências da relação do excesso de cobre com a DA e com a DP obtidas através de pesquisas realizadas em modelos experimentais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma revisão sistemática da literatura científica com artigos em língua inglesa sobre o envolvimento das alterações nas concentrações de cobre nas doenças neurodegenerativas de Alzheimer (DA) e de Parkinson (DP), analisando artigos que verificaram as concentrações deste metal em indivíduos e em modelos experimentais destas doenças; assim como analisar artigos que descrevem os efeitos do excesso de cobre em modelos animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Descrever por meio de revisão sistemática dos artigos publicados entre os anos de 2011 e 2020 se em indivíduos com DA ou com DP ocorrem alterações nas concentrações de cobre em biofluidos (como sangue, urina, líquido cefalorraquidiano) e tecidos *post-mortem*, além de observar se as concentrações de cobre em biofluidos podem ser utilizados para fins de diagnóstico dessas doenças;

2) Verificar se as concentrações alteradas de cobre podem estar relacionadas à gravidade da DA e da DP;

3) Analisar artigos publicados entre 2011 e 2020 que mensuraram as concentrações de cobre em modelos experimentais destas doenças;

4) Observar os efeitos do excesso de cobre e sua relação com a DA e com a DP em modelos experimentais através de uma revisão sistemática de artigos publicados entre 2011 e 2020.

3 JUSTIFICATIVA

As doenças neurodegenerativas são um grupo muito heterogêneo de doenças que acometem os humanos, mas todos apresentam sinais e sintomas que levam a pessoa a sofrer com seus danos (DAVIS; LEYNS; HOLTZMAN, 2018). Com a idade e a expectativa de vida aumentando, o risco de desenvolver doenças neurodegenerativas também aumenta resultando em grandes problemas à saúde humana. Para algumas dessas doenças, como DP e DA, as causas ainda não são totalmente conhecidas assim como seu possível tratamento, mas para outras

doenças relacionadas ao SNC, como DW e DM, temos melhor compreensão de seus mecanismos e seus tratamentos (GITLER; DHILLON; SHORTER, 2017). Para ambos os casos, se estuda a relação do cobre com o surgimento e progressão das doenças que afetam o SNC, seja por uma falta deste no organismo ou por seu excesso, pois seu papel no SNC ainda não é totalmente compreendido. Neste sentido, alguns estudos relatam um aumento nas concentrações de cobre em indivíduos com DA ou com DP, enquanto outros relatam uma diminuição nas concentrações do metal. Desta forma, existe uma necessidade de novos trabalhos, inclusive revisões sistemáticas, que investiguem a relação da homeostase do cobre com a DP e com a DA.

Ainda, existem evidências observadas em modelos animais que demonstram que o cobre pode promover a agregação de proteínas relacionadas à DA e à DP, e que o excesso do metal pode causar estresse oxidativo, além de causar danos cognitivos. É necessário que estas evidências sejam reunidas na forma de uma revisão sistemática, para desta forma direcionar novas pesquisas sobre o tema.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Neste trabalho realizou-se uma revisão sistemática de literatura, que consiste em uma revisão planejada que visa responder uma pergunta específica utilizando métodos explícitos e sistemáticos (ROTHER, 2007). É um método de pesquisa que busca localizar, avaliar e sintetizar evidências obtidas através de estudos publicados que sejam verídicos, apropriados e válidos (MARINHO; CELESTE, 2013). Através desta revisão, procurou-se responder as seguintes questões norteadoras:

- 1) Alterações nas concentrações do cobre estão relacionadas à DA e à DP?
- 2) Os níveis de cobre nos biofluidos (sangue, urina, líquido cefalorraquidiano) e tecidos *post-mortem* estão alterados em indivíduos diagnosticados com essas doenças?
- 3) As concentrações de cobre em biofluidos podem ser considerados com fins diagnósticos para essas doenças?

4) As concentrações alteradas do metal podem estar relacionadas com o estágio das doenças?

5) Quais são os efeitos de concentrações aumentadas de cobre relacionados à DA e à DP evidenciados em modelos experimentais?

6) Os modelos animais utilizados para mimetizar a DA ou a DP apresentam alterações nas concentrações de cobre em biofluidos ou no tecido cerebral?

4.2 REGISTRO E PROTOCOLO

O protocolo da revisão sistemática foi incluído no Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas (PROSPERO) sob o protocolo número CRD42021268819. Esta revisão foi realizada de acordo com os itens sugeridos pelo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis*) (PAGE *et al.*, 2021).

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO E INCLUSÃO

4.3.1 Estudos sobre alterações nas concentrações do cobre em biofluidos ou tecidos *post-mortem* de indivíduos com DA ou DP

Os critérios de inclusão dos artigos nesta revisão sistemática foram:

- Artigos originais publicados em inglês entre os anos de 2011 a 2020;
- Publicações que analisaram as concentrações de cobre no sangue, urina, líquido cefalorraquidiano e tecidos *post-mortem* de indivíduos com diagnóstico de DA e DP.

Ainda, para a inclusão dos artigos nesta revisão, os controles utilizados pelos pesquisadores deveriam ser idosos que não apresentavam doenças neurodegenerativas.

Em relação aos critérios de exclusão, foram excluídos os artigos com as seguintes características:

- 1) Meta-análises, revisões, resumos, hipóteses e pontos de vista;
- 2) Estudos em indivíduos com outras doenças neurodegenerativas;
- 3) Estudos em indivíduos com outros distúrbios metabólicos do cobre;

4) Estudos em indivíduos com a DA ou com DP onde os níveis de cobre não foram mensurados;

5) Estudos em seres humanos expostos ao excesso de cobre através da dieta ou por exposição ocupacional.

4.3.2 Estudos que relacionam o excesso de cobre com a DA e com a DP em modelos experimentais *in vivo*

Os critérios de inclusão utilizados estão listados abaixo:

- Artigos originais publicados em inglês entre os anos de 2011 a 2020;
- Estudos sobre os efeitos do aumento das concentrações de cobre em ratos, camundongos ou coelhos e que relacionam o excesso deste metal com a DA ou com a DP;
- Estudos que analisaram as concentrações de cobre em modelos experimentais de DA e DP (ratos, camundongos ou coelhos).

Além disso, para a inclusão das publicações nesta revisão, os controles utilizados pelos pesquisadores deveriam ser animais não expostos ao cobre. No caso dos artigos que analisaram as concentrações de cobre em modelos experimentais que mimetizam as doenças, foram incluídos os que comparavam os níveis do metal nestes animais com animais considerados controles destes modelos.

Já os critérios de exclusão pré-estabelecidos foram:

- 1) Meta-análises, revisões, resumos, hipóteses e pontos de vista;
- 2) Estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in silico*;
- 3) Estudos de avaliação dos efeitos de nanopartículas de cobre;
- 4) Estudos que analisaram os efeitos de quelantes de cobre ou de uma dieta deficiente em cobre em modelos experimentais;
- 5) Estudos que utilizaram outras espécies diferentes de ratos, camundongos ou coelhos;
- 6) Estudos que não relacionam um aumento de cobre em modelos experimentais (ratos, camundongos ou coelhos) com a DA ou com a DP.

4.4 ESTRATÉGIAS DE BUSCA

O início das buscas nas bases de dados ocorreu no primeiro semestre de 2021 e foi finalizada no segundo semestre do mesmo ano. As buscas foram realizadas nas bases de dados PubMed (MEDLINE), Embase, LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e SciELO (*Scientific Electronic Library Online*). Utilizou-se uma estratégia de busca que foi adaptada a cada banco de dados (Quadro 1). Foram selecionados artigos na língua inglesa, que foram publicados entre os anos de 2011 a 2020.

As palavras-chaves utilizadas nas buscas foram “copper” AND “Parkinson” e “copper” AND “Alzheimer”. O operador booleano “AND” foi utilizado para que somente os artigos que relacionem os dois termos fossem encontrados pelas bases de dados. A busca foi realizada por dois revisores (F.S.G. e V.G.), de forma independente.

Quadro 1- Protocolos de busca para as bases de dados pesquisadas

Banco de dados	Palavras chaves	Filtros
PubMed (MEDLINE)	“copper” AND “Parkinson” e “copper” AND “Alzheimer”	- Artigos em inglês - Artigos publicados entre os anos de 2011 até 2020
Embase	“copper” AND “Parkinson” e “copper” AND “Alzheimer”	- Artigos em inglês - Artigos publicados entre os anos de 2011 até 2020 - Fonte: Embase - Artigos e artigos em progresso
LILACS	“copper” AND “Parkinson” e “copper” AND “Alzheimer”	Não foram utilizados filtros
SciELO	“copper” AND “Parkinson” e “copper” AND “Alzheimer”	- Todas as coleções - Todas as áreas temáticas

Fonte: elaborado pela autora

4.5 SELEÇÃO DOS ARTIGOS E EXTRAÇÃO DOS DADOS

Após as buscas nas bases de dados primeiramente foram identificadas as duplicatas, as quais foram removidas manualmente pelos autores. A seleção dos artigos incluídos ocorreu por dois revisores independentes (F.S.G. e V.G.), realizando a leitura de títulos e dos resumos. Quando havia alguma dúvida se a publicação cumpria os critérios de inclusão pré-estabelecidos, foi realizada a leitura do texto completo. Os títulos dos artigos foram inseridos em planilhas do software Microsoft Office Excel 2010, a fim de separar os artigos que cumpriam os critérios de inclusão e os que não cumpriam estes critérios (artigos excluídos), para posterior leitura completa dos textos para extração dos dados. Nos casos em que não havia concordância entre os revisores, uma reunião por videoconferência foi agendada para debate, e se não fosse possível entrar em concordância um terceiro revisor seria acionado. Todos os artigos foram debatidos seguindo os critérios de exclusão e inclusão já estabelecidos.

Após, foi realizada a leitura completa dos artigos e os dados destes foram extraídos a partir do texto, tabelas e/ou gráficos. A tabulação destes dados foi feita utilizando o software Microsoft Word 2010. No caso de impedimento de acesso ao texto completo, os autores foram contatados uma vez ao mês, durante três vezes.

As informações coletadas das publicações foram diferentes dependendo se o estudo foi realizado em modelos experimentais ou em indivíduos diagnosticados com a DA e DP, como segue abaixo:

a) Estudos em humanos: para análise dos dados dos níveis de cobre em indivíduos diagnosticados com a DA e DP vs controles.

- Dados extraídos: título; autores; ano da publicação; país onde ocorreu o estudo; amostra coletada para a mensuração das concentrações de cobre (biofluidos ou tecidos *post-mortem*) e metodologia; número de indivíduos participantes da pesquisa; concentrações médias de cobre nos participantes diagnosticados com as doenças e em indivíduos saudáveis; e as conclusões dos autores.

b) Estudos em modelos experimentais: para análise dos 1) dados dos efeitos da exposição a altas concentrações de cobre vs controles e sua relação com as

doenças de Alzheimer ou de Parkinson; 2) dados dos níveis de cobre em modelos experimentais da doença de Alzheimer ou de Parkinson vs controles.

- Dados extraídos:

1) Título; autores; ano da publicação; país onde ocorreu o estudo; espécie utilizada; tecido analisado; concentrações de cobre usadas para simular o excesso de cobre; modo e duração dos tratamentos; resultados e a conclusão dos autores.

2) Título; autores; ano da publicação; país onde ocorreu o estudo; espécie utilizada; informações sobre o modelo experimental usado para mimetizar a doença de Alzheimer ou de Parkinson; metodologia utilizada para medir cobre e concentrações médias de cobre no modelo experimental da doença e em animais do grupo controle.

4.6 AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DOS ESTUDOS

Os revisores fizeram uma avaliação independente do risco de viés dos estudos em humanos que foram incluídos na revisão, usando a escala de Newcastle-Ottawa (Anexo A). Esta escala consiste em uma pontuação que varia de zero a nove estrelas. As maiores pontuações indicam estudos de alta qualidade e a baixa pontuação indica estudos de baixa qualidade metodológica. Já para os estudos que relacionam o excesso de cobre com a DA ou com a DP em modelos experimentais, ou para os estudos que analisaram os níveis de cobre em modelos animais que mimetizam estas doenças, os revisores avaliaram a qualidade das publicações através do *Nature Reporting Checklist* (Anexo B).

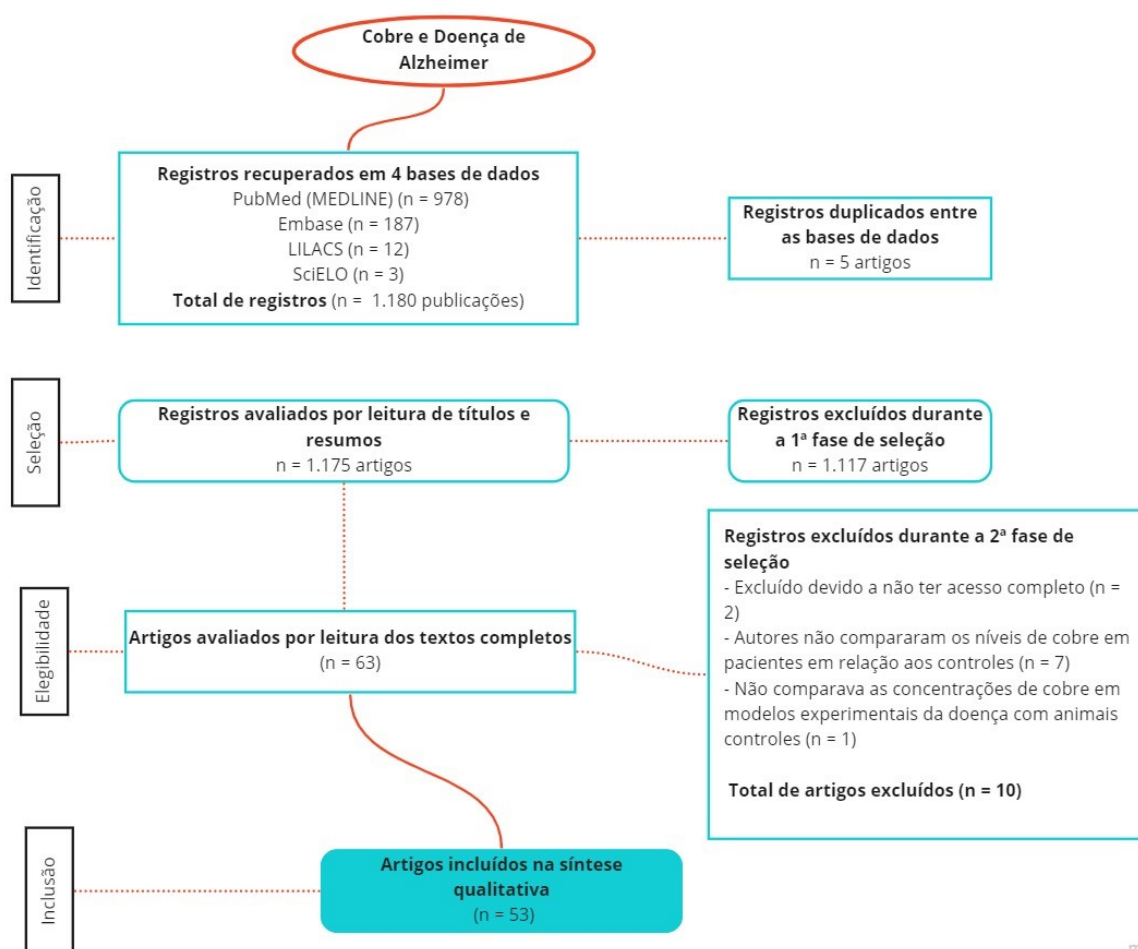
5 RESULTADOS

5.1 DOENÇA DE ALZHEIMER

Referente à DA, um total de 978 artigos foram encontrados na base de dados PubMed (MEDLINE), 187 na Embase, 12 artigos na base LILACS e três artigos no SciELO, totalizando 1.180 artigos que foram inicialmente identificados. Com a remoção das duplicatas e através da leitura dos títulos e resumos foram excluídos 1.117 artigos (917 no PubMed (MEDLINE), 185 na Embase, 12 na LILACS e três no SciELO) por não cumprirem os critérios de inclusão pré-estabelecidos,

permanecendo 63 artigos para análise. Porém, não foi possível fazer a leitura completa de dois artigos, pois estes não estavam disponíveis e o autor não nos enviou o manuscrito, sendo estes excluídos, totalizando 61 artigos incluídos (os dois excluídos foram da base PubMed). Após a leitura do texto completo, foram ainda excluídos oito artigos. Sete destes não comparavam os níveis de cobre em indivíduos com DA em relação às concentrações do metal em idosos sem doenças neurodegenerativas, e um não comparava as concentrações de cobre em modelos experimentais da doença com animais considerados controles, mas sim com o encontrado em placas amiloides de humanos. Desta forma, ao final 53 artigos cumpriam os critérios de inclusão pré-estabelecidos (Figura 5).

Figura 5 - Fluxograma indicando as diferentes fases de seleção dos estudos relacionados à DA

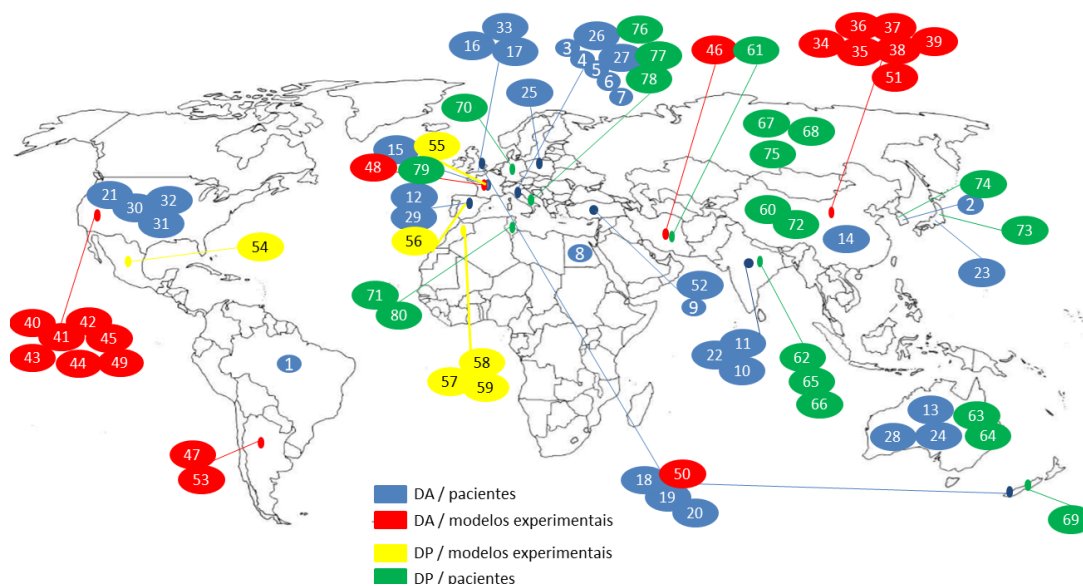


Fonte: elaborado pela autora em <https://miro.com/app/dashboard/> (2022).

Os estudos foram realizados em 15 países diferentes (Figura 6) (um no Brasil, um na Coréia, sete na Itália, um no Egito, oito na China, dois na Turquia, dois na

Espanha, três na Índia, três na Austrália, um no Japão, dois na França, três no Reino Unido, dois na Nova Zelândia e Reino Unido, onze nos Estados Unidos da América, um na Polônia, um na Inglaterra e Nova Zelândia, dois na Argentina e um no Irã).

Figura 6 - Países onde os estudos foram realizados



Doença de Alzheimer: estudos em participantes onde foram observados aumento nas concentrações de cobre em comparação aos idosos não diagnosticados com doenças neurodegenerativas - número 1 ao 14 (em azul):

1) VAZ *et al.*, 2017 2) PARK; LEE; PARK., 2014 3) ROZZINI *et al.*, 2018 4) SQUITTI, R *et al.*, 2013 5) SQUITTI *et al.*, 2017 6) SQUITTI *et al.*, 2013 7) SIOTTO *et al.*, 2016 8) ALSADANY *et al.*, 2012 9) KOÇ *et al.*, 2015 10) SINGH *et al.*, 2014 11) TALWAR *et al.*, 2017 12) GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ-ARIZA., 2014 13) JAMES *et al.*, 2012 14) PU *et al.*, 2017.

- Doença de Alzheimer: estudos em participantes onde foram observados diminuição nas concentrações de cobre em comparação aos idosos não diagnosticados com doenças neurodegenerativas - número 15 ao 25 (em azul):

15) MOYNIER *et al.*, 2020 16) GRAHAM *et al.*, 2014 17) ASHRAF *et al.*, 2019 18) XU *et al.*, 2017 19) XU *et al.*, 2016 20) SCHOLEFIELD *et al.*, 2020 21) SCHRAG *et al.*, 2011 22) SHERE *et al.*, 2018 23) AKATSU *et al.*, 2012 24) REMBACH *et al.*, 2013 25) NOWICKA *et al.*, 2011.

- Doença de Alzheimer: estudos em participantes onde os autores não observaram diferenças nas concentrações de cobre em comparação aos idosos não diagnosticados com doenças neurodegenerativas - número 26 ao 32 e 52 (em azul):

26) GIACCONI *et al.*, 2019 27) PAGLIA *et al.*, 2016 28) REMBACH *et al.*, 2013 29) GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ-ARIZA., 2014 30) MCINTOSH *et al.*, 2012 31) MUELLER *et al.*, 2012 32) SZABO *et al.*, 2016 33) XU *et al.*, 2017 52) ARSLAN *et al.*, 2016.

- Doença de Alzheimer: estudos *in vivo* com animais expostos ao excesso de cobre – número 34 ao 47 e 53 (em vermelho):

34) CHEN *et al.*, 2019 35) YAO *et al.*, 2018 36) YU *et al.*, 2018 37) YU *et al.*, 2015 38) MAO *et al.*, 2012 39) TAN *et al.*, 2019 40) HSU *et al.*, 2019 41) LIM *et al.*, 2020 42) DECI *et al.*, 2013 43) LUNG *et al.*, 2013 44) SINGH *et al.*, 2013 45) PILOZZI *et al.*, 2020 46) BEHZADFAR *et al.*, 2017 47) ARNAL *et al.*, 2013 53) ARNAL *et al.*, 2013.

- Doença de Alzheimer: estudos em modelos experimentais que mimetizam a doença em que os autores mensuraram as concentrações de cobre – número 48 ao 51 (em vermelho):

48) MOYNIER *et al.*, 2019 49) LESKOVJAN *et al.*, 2011 50) XU *et al.*, 2016 51) MA *et al.*, 2011.

- Doença de Parkinson: estudos em participantes onde foram observados aumento nas concentrações de cobre em comparação aos idosos não diagnosticados com doenças neurodegenerativas - número 60 ao 62 (em amarelo):

60) FUKUSHIMA *et al.*, 2011 61) FATTAH *et al.*, 2020 62) KUMUDINI *et al.*, 2014.

- Doença de Parkinson: estudos em participantes onde foram observados diminuição nas concentrações de cobre em comparação aos idosos não diagnosticados com doenças neurodegenerativas - número 63 ao 74 (em amarelo):

63) GENOUD *et al.*, 2017 64) DAVIES *et al.*, 2014 65) GANGANIA *et al.*, 2016 66) SANYAL *et al.*, 2019 67) KARPENKO *et al.*, 2017 68) ILYECHOVA *et al.*, 2018 69) GARDNER *et al.*, 2017 70)

JOPPE *et al.*, 2020 71) SAMIA *et al.*, 2013 72) ZHAO *et al.*, 2013 73) FUKUSHIMA *et al.*, 2013 74) KIM *et al.*, 2018.

- Doença de Parkinson: estudos em participantes onde não viram diferença nas concentrações de cobre em comparação aos idosos não diagnosticados com doenças neurodegenerativas – número 75 ao 80 (em amarelo):

75) AJSUVAKOVA *et al.*, 2020 76) MARIANI *et al.*, 2015 77) MARIANI *et al.*, 2013 78) SCHIRINZI *et al.*, 2016 79) WILLKOMMEN *et al.*, 2017 80) LING; BHIDAYASIRI., 2011.

- Doença de Parkinson: estudos em modelos experimentais expostos ao excesso de cobre – número 54 e 55 (em verde):

54) ROJAS *et al.*, 2012 55) CARMONA *et al.*, 2019.

Doença de Alzheimer: estudos em modelos experimentais expostos ao excesso de cobre - números 56 ao 59 (em verde):

56) CRUCES-SANDE *et al.*, 2019 57) ABBAOUI; GAMRANI., 2018 58) ABBAOUI; HIBA; GAMRANI., 2017 59) ABBAOUI *et al.*, 2017.

Fonte: elaborado pela autora Microsoft PowerPoint 2010.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos pelos autores que analisaram as concentrações de cobre em indivíduos com a DA. Observa-se que 14 artigos verificaram aumento nas concentrações de cobre, 11 artigos observaram diminuição e nove não observaram diferenças nas concentrações do metal. Destes, dois artigos mediram as concentrações do metal no sangue e dois em eritrócitos isolados, sete no plasma, 16 no soro, um em cabelo, nove no tecido cerebral *post-mortem*, um no líquido cefalorraquidiano e um na urina. Em quatro estudos a análise foi realizada em mais de um tipo de amostra, dessa maneira houve replicação da mesma publicação.

Tabela 1 – Valores de cobre em participantes com doença de Alzheimer em comparação com controles

	Amostra	Autores	Nº de indivíduos
Aumento das concentrações de cobre	Sangue	SINGH <i>et al.</i> , 2014	100 DA 100 controles
	Sangue (as análises foram feitas em eritrócitos isolados)	VAZ <i>et al.</i> , 2017	32 DA 32 controles
	Soro e cabelo	KOÇ, E.R <i>et al.</i> , 2015	45 DA 23 controles
	Soro	SQUITTI <i>et al.</i> , 2013a	93 DA 48 controles
	Soro	SQUITTI <i>et al.</i> , 2013b	399 DA 303 controles

	Soro	GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, GARCÍA-BARRERA, GÓMEZ-ARIZA, 2014b	25 DA 25 controles
	Soro	PARK, LEE, PARK., 2014	89 DA 118 controles
	Soro	SIOTTO <i>et al.</i> , 2016	84 DA 58 controles
	Soro	PU <i>et al.</i> , 2017	125 DA 40 controles
	Soro	SQUITTI <i>et al.</i> , 2017	89 DA 147 controles
	Soro	TALWAR <i>et al.</i> , 2017	108 DA 159 controles
	Soro	ROZZINI <i>et al.</i> , 2018	44 demência devido a DA 36 comprometimento cognitivo leve devido a DA 28 controles
	Plasma	ALSADANY <i>et al.</i> , 2012	25 DA 25 controles
	Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (lobo frontal e temporal, e cerebelo)	JAMES <i>et al.</i> , 2012	15 DA 15 controles
Diminuição das concentrações de cobre	Eritrócitos	REMBACH <i>et al.</i> , 2013b	30 DA (cérebro <i>post-mortem</i>)* 27 controles (cérebro <i>post-mortem</i>) 40 DA (eritrócitos) 40 controles (eritrócitos)

Soro	SHERE <i>et al.</i> , 2018	44 DA 52 controles
Plasma	NOWICKA <i>et al.</i> , 2011	20 DA 18 controles
Plasma	ASHRAF <i>et al.</i> , 2019	44 DA 44 controles
Plasma e tecido cerebral <i>post-mortem</i> (giro cingulado)	SCHOLEFIELD <i>et al.</i> , 2020	9 DA 9 controles
Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (giro do lobo temporal)	SCHRAG <i>et al.</i> , 2011	8 DA sem evidências de CAA (angiopatia amilóide cerebral) 8 DA com CAA grave 6 controles
Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (hipocampo e amígdala)	AKATSU <i>et al.</i> , 2012	15 DA (hipocampo) 12 controles (hipocampo) 18 DA (amígdala) 16 controles (amígdala)
Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (neocórtex)	GRAHAM <i>et al.</i> , 2014	14 DA moderada 28 DA grave 26 controles
Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (hipocampo, córtex cerebral, cerebelo, giro temporal médio e giro cingulado)	XU <i>et al.</i> , 2016	9 DA 9 controles
Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (hipocampo,	XU <i>et al.</i> , 2017	9 DA 13 controles

	córtex cerebral, cerebelo, giro temporal médio e giro cingulado)		
	Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (região pré- frontal)	MOYNIER <i>et al.</i> , 2020	10 DA 10 controles
Não há diferenças nas concentrações de cobre entre indivíduos com DA e controles	Sangue, plasma e urina	MCINTOSH <i>et al.</i> , 2012	19 DA 24 controles
	Soro	MUELLER <i>et al.</i> , 2012	14 DA 19 controles
	Soro	REMBACH <i>et al.</i> , 2013a	211 DA 768 controles
	Soro	GONZÁLEZ- DOMÍNGUEZ; GARCÍA- BARRERA; GÓMEZ-ARIZA., 2014a	30 DA 30 controles
	Soro	ARSLAN <i>et al.</i> , 2016	24 DA 15 controles
	Soro	XU <i>et al.</i> , 2018	42 DA 43 controles
	Plasma	PAGLIA <i>et al.</i> , 2016	34 DA 40 controles
	Plasma	GIACCONI <i>et al.</i> , 2019	95 DA 84 controles
	Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (córtex frontal) e líquido cefalorraquidiano	SZABO <i>et al.</i> , 2016	14 DA 15 controles

*Somente nestes pacientes houve diferenças em relação aos controles
CCA: angiopatia amilóide cerebral; DA: Doença de Alzheimer.
Fonte: elaborado pela autora

Na Tabela 2 são observados os resultados encontrados pelos autores em 15 artigos que relacionaram o excesso de cobre com a doença, utilizando modelos experimentais. Ainda, um artigo, apesar de incluído nesta revisão (SCHREURS; SMITH-BELL; LEMIEUX, 2013), não consta na tabela pois os autores não observaram diferenças nos parâmetros analisados nos animais expostos ao cobre em relação ao grupo controle. Destes, quatro publicações analisaram os efeitos do excesso de cobre no cérebro (de forma geral), nove no hipocampo, cinco no córtex cerebral, um no estriado e um isolou micróglia após exposição dos animais ao cobre, para analisar os efeitos do metal neste tipo celular específico. Em quatro estudos foram usadas diferentes regiões para a análise dos resultados, assim houve replicação da mesma publicação.

Tabela 2 - Principais características da relação entre exposição ao cobre e doença de Alzheimer em animais

Autores	Modelo Experimental	Amostra	Resultados
LIM <i>et al.</i>, 2020	Camundongos C57BL/6 J (WT) e J20 (transgênicos) machos e fêmeas expostos a 1,3 ppm de CuCl ₂ na água de beber por 3-5 meses	Micróglia isolada do cérebro Hipocampo e córtex cerebral	↑ Neuroinflamação e fenótipo degenerativo da micróglia ↓ Funções cognitivas (WT-Cu vs WT and J20-Cu vs WT)
PILOZZI <i>et al.</i>, 2020	Camundongos transgênicos APP/PS1 fêmeas expostos à dose diária de 300 mg Cu/Kg por 24 dias na alimentação	Estriado	↑ Neuroinflamação ↑ Aβ e APP
CHEN <i>et al.</i>, 2019	Camundongos B6129SF2/J (WT) e triplo transgênicos para AD (3xTg-AD) expostos a 0,13 ppm de CuCl ₂ na água de beber por 2 meses	Hipocampo	↓ Número de cópias do DNA mitocondrial, biogênese e fusão mitocondrial ↑ Fissão mitocondrial ↓ Função mitocondrial

			<p>↑ Estresse oxidativo (WT-Cu vs WT)</p> <p>↓ Proteínas de plasticidade sináptica (WT-Cu vs WT e 3xTg-AD-Cu vs 3xTg-AD)</p> <p>↑ Degeneração axonal (3xTg-AD-Cu vs 3xTg-AD)</p> <p>Alterações do perfil fosfoproteômico (WT-Cu e 3xTg-AD-Cu)</p> <p>Alterações na expressão de proteínas associadas a mitocôndrias (WT-Cu) e na expressão de proteínas associadas a sinapses (3xTg-AD-Cu)</p>
HSU et al., 2019	Camundongos C57BL/6J (WT) ou J20 (transgênicos) machos e fêmeas expostos a 1,3 ppm de CuCl ₂ na água de beber por 9 meses	Córtex cerebral	<p>↑ Aβ (cerebrovasculatura do córtex, J20-Cu vs J20)</p> <p>↓ LRP1 (envolvido na depuração de Aβ)</p> <p>↑ Neuroinflamação</p> <p>↓ Funções cognitivas (WT-Cu vs WT)</p>
TAN et al., 2019	Camundongos Kunming machos expostos a CuCl ₂	Hipocampo	<p>↓ Funções cognitivas</p> <p>↑ Dano dentríptico</p>

	(0,1, 0,25 ou 0,5 nmol) no hipocampo		<p>↑ Neuroinflamação</p> <p>↑ Estresse oxidativo</p>
YU et al., 2018	Camundongos machos triplo transgênicos para AD (3xTg-AD) expostos a 0,13 ppm de CuCl ₂ na água de beber por 2 ou 12 meses (para teste comportamental)	Hipocampo	<p>↓ Funções cognitivas</p> <p>↑ Aβ</p> <p>↓ Função mitocondrial e proteínas sinápticas</p> <p>↑ Estresse oxidativo e apoptose</p> <p>Alterações no proteoma mitocondrial e nuclear</p>
YAO et al., 2018	Camundongos Tg2567 machos expostos a 0,1mg/L de CuSO ₄ na água de beber	Cérebro	<p>↑ Neurônios imunorreativos para Aβ (Colesterol-Cu vs Colesterol)</p>
BEHZADFAR et al., 2017	Ratos Wistar (WT) machos e ratos injetados com Aβ (intrahipocampal) expostos a CuSO ₄ (50, 100 e 200 mg. kg ⁻¹ . dia) na água de beber por 21 dias	Hipocampo	<p>↓ Funções cognitivas</p> <p>↑ Estresse oxidativo e dano mitocondrial</p> <p>↓ Função mitocondrial (WT-Cu vs WT, Aβ-Cu vs WT e Aβ-Cu vs Aβ)</p>
YU et al., 2015	Camundongos triplo transgênicos para AD (3xTg-AD) expostos a 250 ppm de	Hipocampo	<p>↓ Funções cognitivas</p> <p>↓ CPLX-1/2</p>

	CuSO ₄ na água de beber por 6 meses		Alterações na expressão de proteínas
ARNAL <i>et al.</i>, 2013a	Ratos Wistar machos expostos a 3 mg/L de CuSO ₄ na água de beber por 8 semanas	Córtex cerebral e hipocampo	<p>↑ Estresse oxidativo</p> <p>↑ Aβ</p> <p>↑ Neuroinflamação (WT-Cu vs WT e WT-Cho-Cu vs WT-Cho)</p>
ARNAL <i>et al.</i>, 2013b	Ratos Wistar machos expostos a 3 mg/L de CuSO ₄ na água de beber por 2 meses	Córtex cerebral e hipocampo	<p>↑ Estresse oxidativo</p> <p>↑ Aβ no córtex cerebral (WT-Cu vs WT e WT-Cu-Cho vs WT-Cho)</p>
DECI <i>et al.</i>, 2012	Coelhos brancos machos da Nova Zelândia expostos a 0,24 ppm de CuSO ₄ na água de beber por 10 semanas	Cérebro	<p>↑ Células Aβ imunopositivas no córtex</p>
LUNG <i>et al.</i>, 2013	Camundongos B/6C3F1 machos expostos a 0,5 ppm de CuSO ₄ na água de beber por 3 meses	Cérebro	<p>↑ Ligação de AP-1 ao DNA</p>
SINGH <i>et al.</i>, 2013	Camundongos C57BL6 (WT) e camundongos APP sw/0 expostos a 0,13 mg/L de CuSO ₄ na água de beber por 90 dias	Cérebro	<p>↑ Aβ (cérebro, WT-Cu vs WT; córtex e hipocampo, APP sw/0 - Cu vs APP sw/0)</p> <p>↓ LRP1 (envolvido na depuração de Aβ) (capilares cerebrais; WT-Cu vs WT e APP sw / 0 - Cu vs APP sw / 0)</p> <p>↑ Estresse oxidativo</p>

			(córtex cerebral; WT-Cu vs WT e APP sw / 0 - Cu vs APP sw / 0)
			↑ Neuroinflamação
			↓ Funções cognitivas (APP sw/0 - Cu vs APP sw/0)
MAO et al., 2012	Ratos Sprague- Dawley com oclusão da artéria carótida (2VO) expostos a 250 ppm de CuCl ₂ na água de beber por 3 meses	Córtex cerebral e hipocampo	↑ Aβ e de proteínas relacionadas com a produção de Aβ

DA: Doença de Alzheimer; LRP1: proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade; BBB: barreira hematoencefálica; Aβ: beta amiloide; CuSO₄: sulfato de cobre; CuCl₂: cloreto de cobre; PPM: partes por milhão; AP-1: proteína ativadora-1; CPLX-1/2: Complexina; APP: proteína precursora amiloide; WT: do inglês *wild type* (selvagem); WT-Cu: animais WT expostos ao cobre; WT-Cho: animais WT alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica; WT-Cu-Cho: animais WT expostos ao cobre e alimentados com uma dieta hipercolesterolêmica; mg: miligramas; Cu/Kg: cobre por kg.

Fonte: elaborado pela autora

Na Tabela 3 observa-se que quatro artigos mediram as concentrações de cobre em modelos que mimetizam a DA, os quais não encontraram diferenças em relação aos controles. Em uma publicação, os autores mensuraram as concentrações de cobre no soro e no cérebro de camundongos APP_{swe}/PSEN1dE9 (ou APP/PS1) machos e fêmeas. Neste modelo, os animais duplo transgênicos co-expressam uma APP quimérica de camundongo/humano com a mutação sueca (APP_{swe}) e o gene da presenilina-1 (PS1) humana com a variante de deleção do exon 9 (PSEN1dE9), ambos os quais causam DA familiar de início precoce (FINNIE et al., 2017). Em outra publicação, os autores mediram as concentrações de cobre no córtex cerebral e no hipocampo no mesmo modelo experimental, mas somente utilizaram fêmeas no estudo. Um artigo utilizou camundongos triplo transgênico (3xTgAD) machos, e as mensurações foram realizadas no cérebro. Neste modelo, os animais possuem a mutação APP_{swe} humana, uma mutação no gene da PS1 (PS1_{M146V}) e ainda uma mutação no gene que codifica para uma proteína tau que tende a se agregar (tau_{P301L}) (ODDO et al., 2003). Por fim, um artigo foi realizado

com camundongos SAMP8 machos, onde os níveis de cobre foram medidos no hipocampo. Esses camundongos possuem uma senescência acelerada espontânea e são usados como modelo de DA por desenvolver precocemente *déficits* de aprendizado e memória, junto com outras características da DA. Esses camundongos exibem um aumento relacionado à idade em A β , fosforilação da tau e estresse oxidativo (BUTTERFIELD; POON, 2005, FARR *et al.*, 2019).

Tabela 3 – Valores de cobre em modelos animais de doenças de Alzheimer

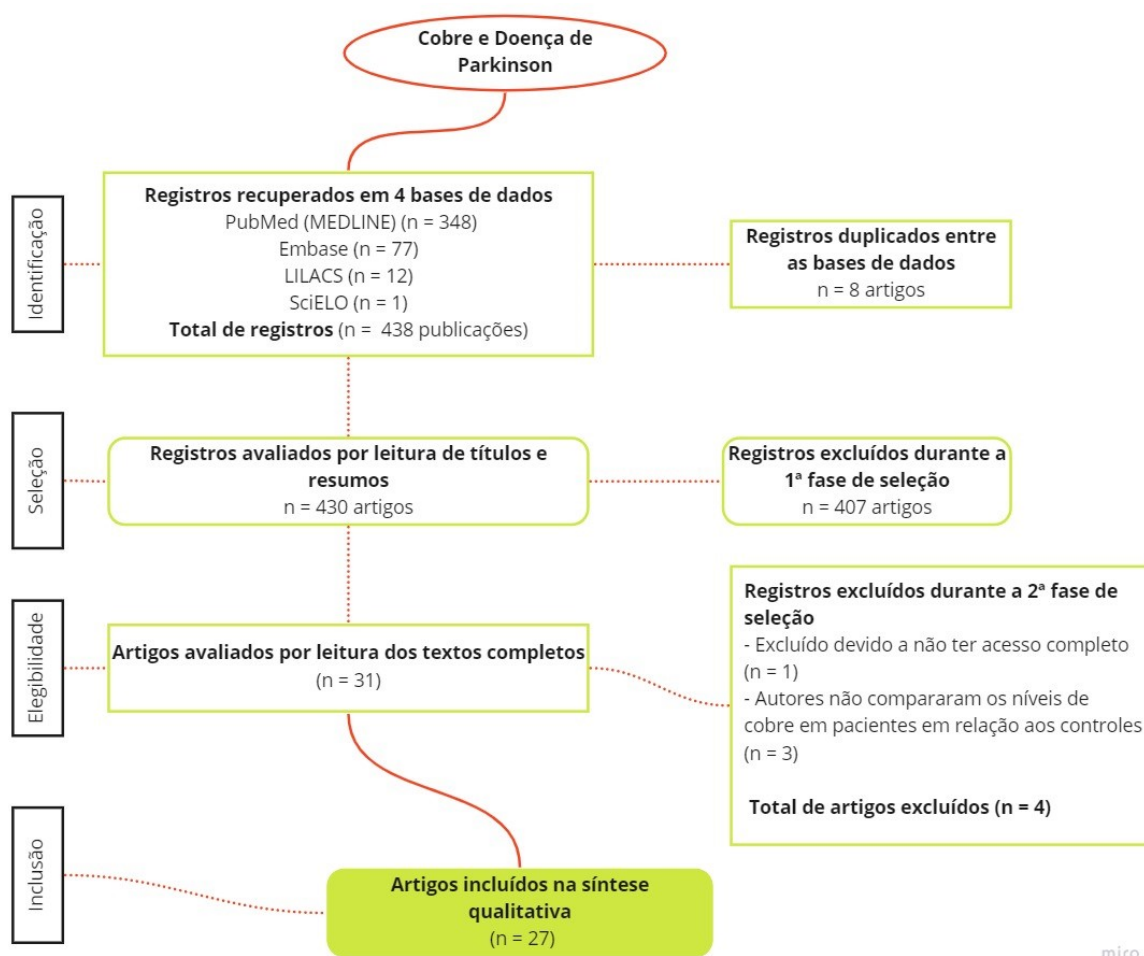
Autores	Modelo experimental	Amostra	Resultados
MOYNIER <i>et al.</i>, 2019	Controles: Camundongos C57BL/6 C3H Modelo DA: camundongos APP _{swe} /PSEN1dE9 machos e fêmeas	Soro e cérebro	Não há diferença nas concentrações de cobre entre o modelo de DA e os controles
XU <i>et al.</i>, 2016	Controles: Camundongos 129/C57BL6 machos Modelo AD: camundongos 3xTgAD machos	Cérebro	Não há diferença nas concentrações de cobre entre o modelo DA e os controles
LESKOVJAN <i>et al.</i>, 2011	Controles: Camundongos B6C3F1/J fêmeas Modelo DA: Camundongos camundongos APP _{swe} /PSEN1dE9 fêmeas	Córtex cerebral e Hipocampo	Não há diferença nas concentrações de cobre entre o modelo de DA e os controles
MA <i>et al.</i>, 2011	Controles: Camundongos SAMR1 machos Modelo AD: camundongos SAMP8 machos	Hipocampo	Não há diferença nas concentrações de cobre entre os camundongos SAMR1 e SAMP8

DA: doença de Alzheimer
Fonte: elaborado pela autora

5.2 DOENÇA DE PARKINSON

Utilizando os critérios de busca pré-definidos, 348 artigos foram encontrados na base de dados PubMed (MEDLINE), 77 na Embase, 12 na LILACS e 1 resultado foi encontrado na base de dados SciELO, totalizando 438 publicações. Após a remoção das duplicatas, foi realizada a leitura dos títulos e resumos, e foram excluídos 407 artigos (319 no PubMed (MEDLINE), 75 na Embase, 12 no LILACS e um no SciELO), permanecendo 31 artigos que cumpriam os critérios de inclusão. Ainda, um artigo do PubMed foi excluído devido a não termos conseguido o texto completo com o autor. Com isso, 30 artigos foram incluídos para análise. Após a leitura do texto completo, foram ainda excluídos três artigos, pois os autores não compararam os níveis de cobre em participantes com DP em relação às concentrações do metal em idosos sem doenças neurodegenerativas. Desta forma, ao final 27 artigos cumpriam os critérios de inclusão pré-estabelecidos (Figura 7).

Figura 7- Fluxograma indicando as diferentes fases de seleção dos estudos relacionados à DP



Fonte: elaborado pela autora em <https://miro.com/app/dashboard/> (2022).

Observou-se que os estudos foram realizados em 16 países diferentes (Figura 5) (dois na China, um no Irã, três na Índia, dois na Austrália, três na Rússia, um na Nova Zelândia, dois na Alemanha, um na Tunísia, um no Japão, um na Coreia do Sul, três na Itália, um na Tailândia, um na Espanha, três no Marrocos, um no México e um na França).

Na Tabela 4, são apresentados os resultados obtidos pelos autores que analisaram as concentrações de cobre em indivíduos com a DP. Observa-se que três dos artigos incluídos observaram aumento nas concentrações de cobre, 12 observam diminuição e seis não observaram diferenças nas concentrações do metal entre os participantes acometidos pela DP e indivíduos considerados controles. Destes, um artigo mensurou as concentrações do metal no sangue, três na urina, 12 no soro, três no plasma, quatro no tecido cerebral *post-mortem*, um no cabelo e um

no líquido cefalorraquidiano (em três estudos os autores mensuraram as concentrações de cobre em mais de uma amostra, desta maneira houve replicação da mesma publicação).

Tabela 4 – Valores de cobre em participantes com doença de Parkinson comparados aos controles

	Amostra	Autores	Nº de indivíduos
Aumento das concentrações de cobre	Sangue e urina*	FUKUSHIMA <i>et al.</i> , 2011	71 DP 71 controles
	Soro	FATTAH <i>et al.</i> , 2020	110 DP 110 controles
	Plasma	KUMUDINI <i>et al.</i> , 2014	150 DP 170 controles
Diminuição das concentrações de cobre	Soro e urina	FUKUSHIMA <i>et al.</i> , 2013	52 DP sem depressão 19 DP com depressão** 70 controles
	Soro	SAMIA <i>et al.</i> , 2013	48 DP 36 controles
	Soro	GANGANIA <i>et al.</i> , 2016	35 DP 33 controles
	Soro	KARPENKO <i>et al.</i> , 2017	50 DP 50 controles
	Soro	ILYECHOVA <i>et al.</i> , 2018	50 DP 50 controles
	Soro	KIM <i>et al.</i> , 2018	325 DP 304 controles
	Soro	SANYAL <i>et al.</i> , 2019	214 DP 213 controles

	Plasma	ZHAO <i>et al.</i> , 2013	238 DP 302 controles
	Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (substância negra, <i>locus coeruleus</i> e córtex)	DAVIES <i>et al.</i> , 2014	10 DP 10 controles
	Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (bulbo olfatório e tecido do trato)	GARDNER <i>et al.</i> , 2017	9 DP 8 controles
	Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (substância negra, giro fusiforme e córtex occipital)	GENOUD <i>et al.</i> , 2017	13 DP 11 controles
	Tecido cerebral <i>post-mortem</i> (mesencéfalo)	JOPPE <i>et al.</i> , 2020	5 DP 4 controles
Não há diferenças nas concentrações de cobre entre indivíduos com DP e controles	Soro, urina e cabelo	AJSUVAKOVA <i>et al.</i> , 2020	13 DP 14 controles
	Soro	LING; BHIDAYASIRI, 2011	41 DP 26 controles
	Soro	MARIANI <i>et al.</i> , 2013	22 DP 49 controles
	Soro	MARIANI <i>et al.</i> , 2015	92 DP 112 controles
	Plasma	SCHIRINZI <i>et al.</i> , 2016	35 DP 65 controles
	Líquido cefalorraquidiano	WILLKOMMEN <i>et al.</i> , 2017	33 DP 101 controles

* Somente na urina foi observada uma elevação dos níveis de cobre. No soro não foram observadas alterações

** Somente nestes participantes houve diferenças em relação aos controles

Fonte: elaborado pela autora

Quanto às publicações que utilizaram animais, os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 5 e na Tabela 6. Quatro artigos avaliaram os efeitos do excesso de cobre em modelos experimentais, já dois artigos mediram as concentrações de cobre em modelos que mimetizam a DP. Nos animais expostos a altas concentrações de cobre, cinco analisaram os efeitos do excesso do metal no estriado, cinco na substância negra, um no córtex pré-frontal, três na área tegmental ventral e um no feixe prosencefálico medial (as análises foram realizadas em diferentes regiões, dessa maneira houve replicação das mesmas publicações).

Tabela 5 - Principais características da relação entre exposição ao cobre e doença de Parkinson

Autores	Modelo experimental	Amostra	Resultados
CRUCES-SANDE <i>et al.</i>, 2019	Ratos Sprague-Dawley machos expostos ao CuCl ₂ (2 mg Cu ²⁺ /Kg), i.p., por 30 dias	Estriado, substância negra e córtex frontal	↑ Estresse oxidativo
	Administração intraestriatal de 6-OHDA em ratos Sprague-Dawley machos seguido da administração única de 0,88 mg de CuCl ₂	Estriado e substância negra	↓ Imunorreatividade para TH (6-OHDA e 6-OHDA + CuCl ₂ vs controles) ↑ Estresse oxidativo (CuCl ₂ , 6-OHDA e 6-OHDA + CuCl ₂ vs controles)
ABBAOUI; GAMRANI., 2018	Ratos Wistar machos expostos ao acetato de cobre na dose de 0,125% na água de beber por 6 semanas	Estriado, substância negra e área tegmental ventral	↓ Atividade locomotora ↓ Imunorreatividade para TH e GFAP
ABBAOUI; HIBA; GAMRANI., 2017	Ratos Wistar machos expostos ao acetato de cobre 10mg/Kg, i.p., por 3 dias	Estriado, substância negra, feixe prosencefálico medial e área tegmental ventral	↓ Atividade locomotora ↓ Imunorreatividade para TH

ABBAOUI et al., 2017	Ratos Wistar machos expostos ao acetato de cobre 10 mg/kg, i.p., por 3 dias	Estriado, substância negra e área tegmental ventral	↓ Atividade locomotora ↓ Imunorreatividade para TH
-----------------------------	---	---	---

i.p: injeção intraperitoneal; TH: tirosina hidroxilase; 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; GFAP: proteína ácida fibrilar glial.

Fonte: elaborado pela autora

Nos estudos realizados com animais que mimetizam a DP onde os níveis de cobre foram mensurados, um utilizou o modelo da administração de MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridina) e um o modelo da administração de 6-OHDA (6-hidroxidopamina). O MPP⁺ é uma neurotoxina usada para mimetizar a DP em camundongos, pois resulta em disfunção mitocondrial, danos neuronais (dopaminérgicos), diminuição do ATP e agregação de α -sinucleína, o que leva a morte celular (PINGALE; GUPTA, 2020). Já a 6-OHDA causa degeneração dos neurônios dopaminérgicos na região nigroestriado, causando diminuição nos níveis de dopamina (PINGALE; GUPTA, 2020). No artigo que utilizou MPP⁺, o cobre foi mensurado no estriado, mesencéfalo, cerebelo e córtex pré-frontal. Já na publicação onde o modelo da doença foi induzido pela administração de 6-OHDA, os autores mediram as concentrações de metal na substância negra e na área tegmental ventral.

Tabela 6 - Valores de cobre em modelos animais de doenças de Parkinson

Autores	Modelo experimental	Amostra	Resultados
CARMONA et al., 2019	Administração de 6-OHDA i.c.v. em ratos Wistar	Substância negra e área tegmental ventral	Não há diferenças nas concentrações de cobre entre o modelo de DP e os controles
ROJAS et al., 2012	Administração de MPP ⁺ i.c.v. em camundongos Swiss machos	Estriado, mesencéfalo, cerebelo e córtex pré-frontal	↓ Cobre no corpo estriado e mesencéfalo no modelo de DP Não há diferença nas concentrações de cobre em córtex pré-frontal e cerebelo entre o modelo de DP e os controles

i.c.v: intracerebroventricular; DP: Doença de Parkinson; MPP⁺: 1 -metil-4-fenilpiridina; 6-OHDA: 6-hidroxidopamina.

Fonte: elaborado pela autora

5.3 ANÁLISE DE QUALIDADE DOS ARTIGOS

Na tabela 7, são descritos os resultados que foram obtidos através da análise dos artigos relacionados à DA pela escala de Newcastle-Ottawa. Quatro artigos obtiveram nota máxima (9 estrelas) sendo considerados de boa qualidade metodológica, juntamente com 17 artigos também considerados de boa qualidade obtendo entre 6-8 estrelas; 13 artigos foram considerados de qualidade mediana (3-5 estrelas) e nenhum artigo foi considerado de baixa qualidade metodológica (inferior a 3 estrelas).

Tabela 7 - Escala Newcastle-Ottawa para estudos em humanos, referente aos artigos que analisaram os níveis de cobre em indivíduos com DA

Autores	
VAZ <i>et al.</i>, 2017	☆☆☆☆☆☆☆☆
PARK; LEE; PARK., 2014	☆☆☆☆☆☆☆☆
ROZZINI <i>et al.</i>, 2018	☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆
ALSADANY <i>et al.</i>, 2012	☆☆☆☆☆☆☆☆
KOÇ <i>et al.</i>, 2015	☆☆☆☆☆
SQUITTI <i>et al.</i>, 2013b	☆☆☆
SQUITTI <i>et al.</i>, 2017	☆☆☆☆☆
SINGH <i>et al.</i>, 2014	☆☆☆☆☆☆
GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ- ARIZA., 2014b	☆☆☆☆☆
SQUITTI <i>et al.</i>, 2013 a	☆☆☆☆☆
TALWAR <i>et al.</i>, 2017	☆☆☆☆☆☆☆☆
JAMES <i>et al.</i>, 2012	☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆
PU <i>et al.</i>, 2017	☆☆☆☆☆☆☆☆
SIOTTO <i>et al.</i>, 2016	☆☆☆☆☆
MOYNIER <i>et al.</i>, 2020	☆☆☆☆☆
GRAHAM <i>et al.</i>, 2014	☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆
XU <i>et al.</i>, 2017	☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆
ASHRAF <i>et al.</i>, 2019	☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆

XU <i>et al.</i>, 2016	☆☆☆☆☆☆☆☆
SCHRAG <i>et al.</i>, 2011	☆☆☆☆☆☆☆
SHERE <i>et al.</i>, 2018	☆☆☆☆☆☆
AKATSU <i>et al.</i>, 2012	☆☆☆☆☆
SCHOLEFIELD <i>et al.</i>, 2020	☆☆☆☆☆☆☆
REMBACH <i>et al.</i>, 2013b	☆☆☆
NOWICKA <i>et al.</i>, 2011	☆☆☆☆
GIACCONI <i>et al.</i>, 2019	☆☆☆☆☆☆☆
REMBACH <i>et al.</i>, 2013 a	☆☆☆☆☆☆
GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ- ARIZA, 2014 a	☆☆☆☆☆☆
MCINTOSH <i>et al.</i>, 2012	☆☆☆☆☆
XU, J <i>et al.</i>, 2018	☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆
PAGLIA <i>et al.</i>, 2016	☆☆☆☆☆☆☆
MUELLER <i>et al.</i>, 2012	☆☆☆☆☆☆☆
SZABO <i>et al.</i>, 2016	☆☆☆☆☆☆
ARSLAN <i>et al.</i>, 2016	☆☆☆☆☆☆

Fonte: elaborado pela autora

Na Tabela 8, são demonstrados os resultados da qualidade dos artigos relacionados à DP, onde 11 artigos obtiveram acima de 6 estrelas, significando que os artigos são considerados de boa qualidade metodológica. Nove artigos obtiveram entre 3-5 estrelas, demonstrando ter uma qualidade mediana e um artigo apresentou uma qualidade inferior (menor que 3 estrelas).

Tabela 8 - Escala Newcastle-Ottawa para estudos em humanos, referente aos artigos que analisaram os níveis de cobre em indivíduos com DP

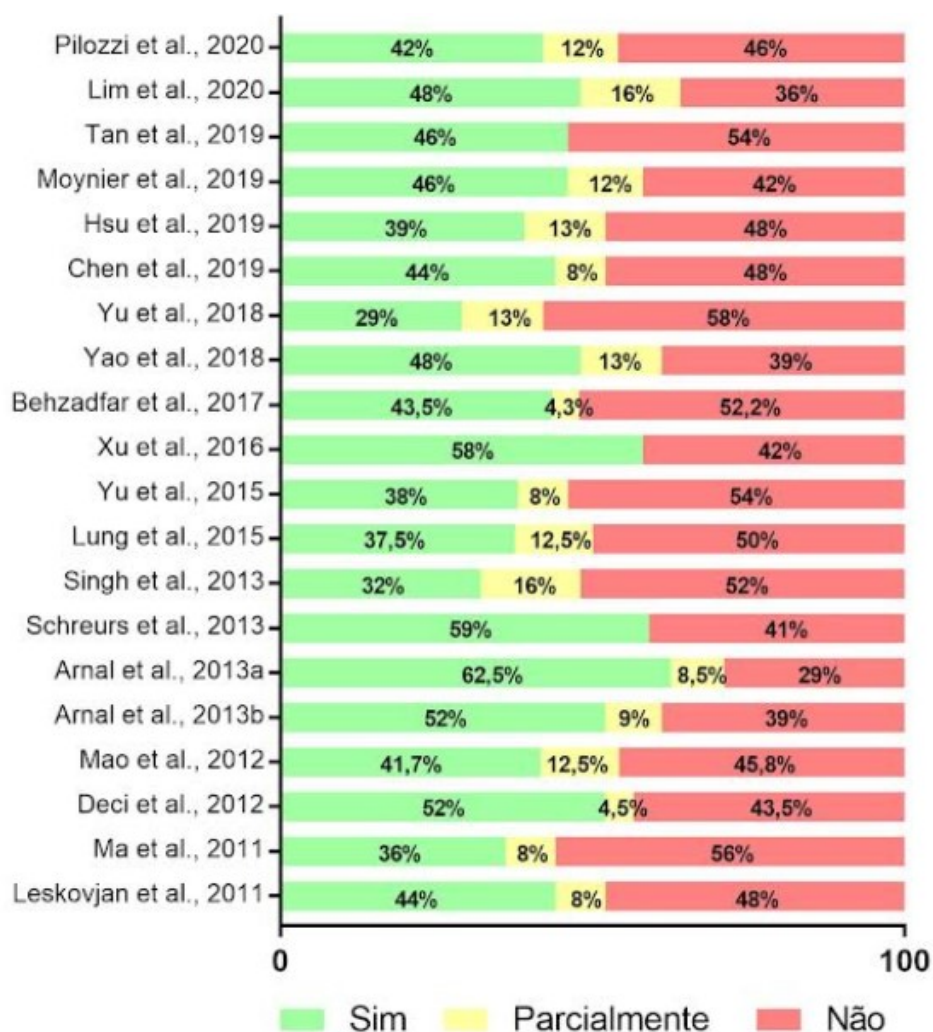
Autores	
FUKUSHIMA <i>et al.</i>, 2011	☆☆☆☆☆☆☆☆
FATTAH <i>et al.</i>, 2020	☆☆☆☆☆☆☆
KUMUDINI <i>et al.</i>, 2014	☆☆☆☆☆☆
GENOUD <i>et al.</i>, 2017	☆☆☆
GANGANIA <i>et al.</i>, 2016	☆☆☆☆☆☆

KARPENKO et al., 2017	☆☆☆☆☆☆☆☆
ILYECHOVA et al., 2018	☆☆☆☆
SANYAL et al., 2019	☆☆☆☆☆☆
GARDNER et al., 2017	☆☆☆☆☆☆
JOPPE et al., 2020	☆☆☆☆
SAMIA et al., 2013	☆☆☆☆☆☆
ZHAO et al., 2013	☆☆☆☆☆☆
DAVIES et al., 2014	☆☆☆☆
FUKUSHIMA et al., 2013	☆☆☆☆☆☆
KIM et al., 2018	☆☆☆☆☆☆
AJSUVAKOVA et al., 2020	☆☆
MARIANI et al., 2015	☆☆☆☆
MARIANI et al., 2013	☆☆☆☆
WILLKOMMEN et al., 2017	☆☆
SCHIRINZI et al., 2016	☆☆☆☆☆☆
LING; BHIDAYASIRI., 2011	☆☆☆☆☆☆

Fonte: elaborado pela autora

Nos estudos com animais e que relacionaram os efeitos do excesso de cobre com a DA, ou ainda que mensurassem os níveis de cobre em modelos experimentais da doença, em cinco artigos o percentual de respostas "sim" às perguntas do *Nature Reporting Checklist* (Anexo B) foi maior que 50%; em nove esse percentual foi de 40-49%, e em seis publicações esse percentual ficou abaixo de 40% (Figura 8). As respostas assinaladas como "sim" significam que os autores cumpriam os critérios determinados. Ainda não é comum avaliar a qualidade metodológica dos artigos envolvendo modelos experimentais, e os questionários acerca dessa avaliação não são conhecidos pelos pesquisadores ou mesmo pelos editores e revisores de publicações científicas, o que poderia explicar a falta de informações exigidas quando se aplica o questionário.

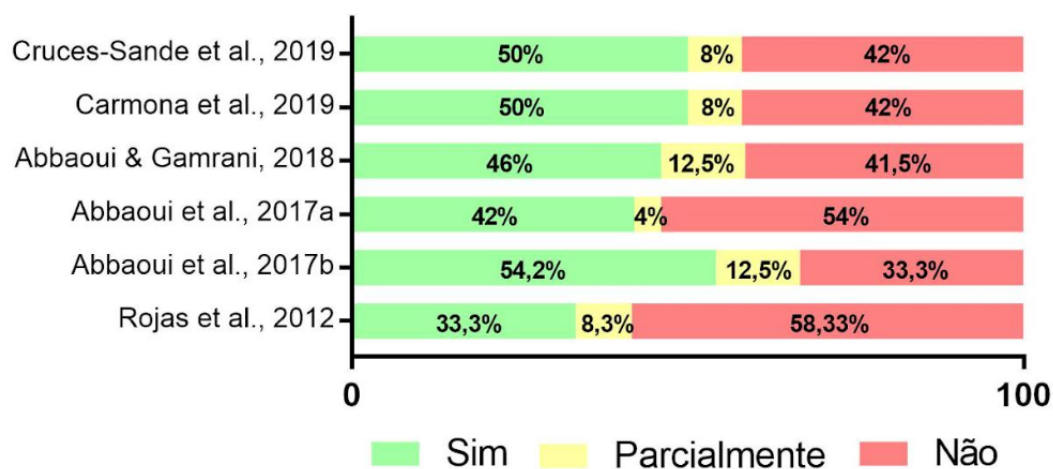
Figura 8 - Escala *Nature Reporting Checklist* para os estudos em modelos animais que relacionam o excesso de cobre com a DA ou que mensuraram os níveis de cobre em modelos experimentais da doença



Fonte: elaborado pela autora utilizando GraphPad Prism 7

Na Figura 9, pode-se perceber que três artigos que relacionam o excesso de cobre com a DP em modelos animais atingiram 50% dos critérios que correspondem a “sim” para as perguntas do Anexo B. Dois artigos ficaram em torno dos 40% e apenas um artigo ficou abaixo, correspondendo a 30% de respostas “sim”.

Figura 9 - Escala *Nature Reporting Checklist* para os estudos em modelos animais que relacionam o excesso de cobre com a DP ou que mensuraram os níveis de cobre em modelos experimentais da doença



6 DISCUSSÃO

6.1 ESTUDOS EM INDIVÍDUOS COM DA OU COM DP

Pesquisas realizadas nos últimos anos vêm relacionando alterações na homeostase de metais, como o cobre, com o início e progressão da DA e da DP. No entanto, observam-se divergências entre os autores sobre se as concentrações de cobre estão aumentadas ou diminuídas em indivíduos com essas patologias. Desta forma, essa revisão sistematizou os resultados disponíveis na literatura sobre o tema, publicados entre os anos de 2011 a 2020.

Como descrito nos resultados, 25 publicações observaram que ocorre uma alteração nas concentrações de cobre em indivíduos com DA, sendo que 11 verificaram que havia uma diminuição nas concentrações de cobre e 14 um aumento. No entanto, nove publicações citam que não há alterações na homeostase do cobre em indivíduos com DA. Para a DP, 15 artigos observaram que ocorreu uma alteração na homeostase do cobre, sendo que em três foi observado um aumento das concentrações deste metal e 12 observaram uma diminuição. Ainda, em seis publicações os autores mencionam que não observaram nenhuma diferença nas concentrações de cobre.

Existem alguns fatores que podem influenciar nos resultados observados pelos autores, os quais poderiam estar ocasionando essas diferenças observadas na literatura. Um desses fatores pode estar relacionado à qual amostra foi realizada

a análise. Para a doença de Alzheimer, 10 artigos que realizaram a análise em soro observaram aumento das concentrações do metal, uma publicação verificou diminuição, e cinco não observaram alterações. Já em relação aos autores que analisaram os níveis de cobre no plasma, verificou-se que uma publicação apresentou aumento das concentrações nesta amostra, três verificaram que houve diminuição das concentrações e três não observaram nenhuma alteração. Isso indica que as mensurações de cobre no soro ou no plasma não poderiam ser usadas para fins diagnósticos de DA, considerando as publicações analisadas. Em relação às demais amostras utilizadas pelos autores, somente dois artigos analisaram as concentrações do metal no sangue total, os quais uma publicação observou aumento das concentrações de cobre e uma publicação não observou nenhuma diferença entre os indivíduos com DA e sem a doença. Eritrócitos isolados também foram utilizados para a mensuração dos níveis de cobre, onde um estudo observou aumento dos níveis do metal, enquanto que outra verificou uma diminuição nos indivíduos com a DA. Os níveis de cobre na urina e no cabelo foram mensurados somente em dois estudos, os quais observaram aumento nas concentrações de cobre no cabelo dos participantes, e na urina não viram diferenças significativas. Assim, não é possível indicar se as mensurações de cobre no sangue, na urina e no cabelo poderiam ser utilizados para fins diagnósticos de DA, já que poucos estudos analisaram o metal nestas amostras.

Quanto aos estudos em indivíduos com a doença de Parkinson, um artigo que realizou análise em soro observou aumento das concentrações de cobre, sete publicações verificaram diminuição, e quatro não observaram alterações, também indicando que as mensurações de cobre no soro não poderiam ser usadas para fins diagnósticos de DP, considerando os artigos publicados entre 2011 e 2020. Nas publicações que analisaram os níveis de cobre no plasma, um estudo mostrou aumento nas concentrações, um diminuição dos níveis de cobre, e um não observou nenhuma alteração nessas concentrações nos indivíduos em comparação aos sem doenças neurodegenerativas. Referente às concentrações do metal no sangue total, apenas em um artigo foi realizada a análise neste biofluido, o qual apresentou aumento em indivíduos com DP. Para as análises do cobre em amostras de cabelo e urina, uma publicação verificou aumento dos níveis de cobre na urina, uma verificou diminuição nesta mesma amostra, e um observou que não houve diferenças nos níveis de cobre tanto no soro quanto na urina dos acometidos pela

doença. Novamente devido à baixa quantidade de estudos utilizando essas amostras não é possível afirmar que as mensurações dos níveis deste metal tanto no sangue, na urina e no cabelo poderiam ser usadas para fins de diagnóstico da DP.

Muitos autores utilizam o plasma assim como o soro para as avaliações, pois são amostras mais acessíveis para se obter e com a possibilidade de serem coletadas várias vezes, se necessário, para verificação dos níveis dos oligoelementos, como o cobre (ASHRAF *et al.*, 2019). Xu *et al.* (2018) mencionam que alguns autores consideram a mensuração dos metais no plasma um bom biomarcador para reunir informações acerca do diagnóstico referente aos distúrbios do SNC. No entanto, outros estudos apontam que o soro e o plasma não são adequados para as avaliações das concentrações dos metais, pois nestas amostras podem ser observadas alterações nas concentrações destes ao longo do dia, e também tem a influência da ingestão de certos alimentos que contém metais na sua composição (HAMMER *et al.*, 1971, KOÇ *et al.*, 2015). Akyol e colaboradores descrevem que o melhor material para análise seriam os cabelos e as unhas, pois suas taxas de renovação são mais lentas e menos susceptíveis a influências da dieta, permanecendo por mais tempo as concentrações de metais nessas amostras se comparado ao soro (AKYOL *et al.*, 1997). No entanto, para a coleta os cabelos devem ser limpos e todo material usado neste procedimento deve ser estéril para evitar contaminações externas; assim como para a coleta de urina, pois se não coletada e/ou armazenada adequadamente essas amostras são sujeitas a contaminações (AJSUVAKOVA *et al.*, 2020). O líquido cefalorraquidiano pode ser uma alternativa às pesquisas por ser um potencial substituto do tecido cerebral nas medições de oligoelementos no SNC por ser um material de fácil obtenção se comparado aos tecidos *post-mortem* (SZABO *et al.*, 2016). Entretanto, somente dois artigos analisaram os níveis de cobre no líquor em indivíduos com DA ou com DP, nos quais em ambos não foi observado que houve diferença nos níveis de cobre nessas amostras (SZABO *et al.*, 2016).

Alguns autores comentam que diferentes metodologias empregadas na análise das concentrações dos metais podem influenciar em resultados contraditórios; ou até mesmo o tipo de amostra utilizada no estudo pode causar diferenças as quais poderiam interferir nos resultados (VAZ *et al.*, 2017, SCHOLEFIELD *et al.*, 2021). Além disso, Zhao e colaboradores mencionam que

estudos com baixa quantidade de indivíduos participantes podem influenciar negativamente estudos de avaliação destes metais nos fluidos biológicos (ZHAO *et al.*, 2013). Xu e colaboradores também sugerem pesquisas com maior número de participantes e um monitoramento mais frequente para que os níveis plasmáticos dos metais sejam testados a fim de serem usados como biomarcadores para o diagnóstico de doenças relacionadas ao SNC (XU *et al.*, 2018). Mas, devido ainda existir um pequeno número de estudos que utilizem as mesmas amostras para as análises das concentrações de cobre, ou até mesmo diferentes metodologias utilizadas para medir os oligoelementos, os resultados encontrados pelos autores são divergentes. Desta forma, a comparação dos resultados entre os diferentes autores se torna difícil, não permitindo uma conclusão clara de que as amostras ou metodologias usadas para a mensuração do cobre poderiam ser validadas para fins diagnósticos (PAGLIA *et al.*, 2016).

Ainda, além de analisar os artigos que utilizaram amostras que poderiam vir a ser utilizadas para fins diagnósticos, também foi avaliado neste trabalho artigos que analisaram os níveis de cobre em tecidos *post-mortem* de indivíduos com DA ou com DP. Assim, poderíamos verificar se existem diferenças nas concentrações do metal dependendo da região do encéfalo analisada, o que poderia indicar se o cobre se depositaria em algum local específico, ou ainda se a carência do metal é encontrada somente nas regiões mais afetadas das doenças. Desta forma, verificou-se que apenas em uma publicação os resultados mostram um aumento do cobre lábil no lobo frontal e temporal de tecido *post-mortem* de indivíduos com DA (os quais os autores correlacionam com o aumento do estresse oxidativo observado nesta publicação), mas verificou-se a diminuição do cobre total nestas mesmas regiões (JAMES *et al.*, 2012).

Ainda, sete dos artigos mencionam que houve diminuição nas concentrações de cobre em diferentes regiões do cérebro de indivíduos com DA. O enriquecimento de A β com Cu⁺ nas placas senis explicaria essa diminuição de cobre observada no cérebro desses participantes (MOYNIER *et al.*, 2020). Outra hipótese é que a diminuição observada possa ser causada pela perda da massa cerebral e de células como neurônios e astrócitos, o que é frequente em idosos com estágios avançados da doença (GRAHAM *et al.*, 2014). Sendo assim, quanto maior o estágio de Braak e Braak (sistema que descreve os estágios da DA de acordo com a área cerebral onde os emaranhados neurofibrilares estão presentes), menor são os níveis de cobre,

como verificado na região pré-frontal do cérebro (MOYNIER *et al.*, 2020). Outro mecanismo para a diminuição de cobre no encéfalo pode ser devido ao fato de que as regiões afetadas em indivíduos com DA são alteradas pela formação de N(épsilon)carboximetilisina (CML) que coordena o cobre bivalente, pois atua como um quelante do metal, assim alterando a homeostase do cobre (SASAKI *et al.*, 1998, XU *et al.*, 2016). Ademais, é citado na literatura que a BHE pode estar comprometida na DA, causando alterações nos níveis de cobre e de outros metais no SNC (AKATSU *et al.*, 2012). Neste sentido, Rembach e colaboradores (2013b) observaram uma diminuição nos níveis de cobre no córtex frontal de indivíduos com DA, mas não verificaram diferenças nos eritrócitos isolados, sugerindo que essa alteração seja destinada apenas ao cérebro. A diminuição das concentrações do metal nessa região do cérebro pode ser explicada devido a ser uma área mais susceptível a apresentar uma carência de cobre do que os tecidos periféricos (REMBACH *et al.*, 2013b).

Em relação à análise das concentrações de cobre em tecidos *post-mortem* de indivíduos com DP, Genoud e colaboradores (2017) analisaram diferentes regiões do cérebro desses participantes, onde verificaram a diminuição dos níveis de cobre na substância negra, local onde ocorre a neurodegeneração primária que afeta os movimentos dos participantes, e no giro fusiforme, onde ocorre a sinucleinopatia e atrofia. Além disso, os autores realizaram a análise no córtex occipital como um controle para este estudo, pois não apresenta danos causados pela degeneração, onde não foram notadas alterações nas concentrações do metal (GENOUD *et al.*, 2017). Gardner e colaboradores (2017) analisaram os níveis do metal no bulbo olfatório, que é a primeira região onde há o acúmulo de agregados da proteína α -sinucleína durante a DP (DANIEL; HAWKES, 1992). Esses autores também encontraram uma diminuição nos níveis de cobre, sendo isso observado em locais do bulbo olfatório onde ocorre a deposição dos agregados (GARDNER *et al.*, 2017). Além desses autores, Davies e colaboradores (2014) já haviam observado que a diminuição dos níveis de cobre nos participantes é observada principalmente em locais onde há o acúmulo de α -sinucleína, como nos neurônios pigmentados da substância negra, onde o Cu interage com a neuromelanina (DAVIES *et al.*, 2014).

Assim como os materiais biológicos mencionados mais acima, há uma escassez de publicações que avaliaram os níveis de cobre em tecidos *post-mortem*. Um problema enfrentado pelos pesquisadores é a carência de material, pois não há

doações suficientes para responder certas questões. Assim, não se pode afirmar que um local específico do encéfalo possa ser observado acúmulo ou carência de íons cobre nessas amostras, pois as regiões utilizadas para os estudos geralmente são as que já se sabem que são as mais afetadas pelas doenças, existindo poucas publicações que analisem as diferenças entre regiões mais e menos suscetíveis à degeneração. Ainda, não é possível afirmar se as alterações da homeostase do cobre observada nestes locais sejam o fator desencadeante da degeneração, ou a consequência desta. Um fato que acaba chamando a atenção é que a maioria dos estudos realizados com tecidos *post-mortem* percebeu uma diminuição nos níveis de cobre, diferentemente do observado em soro e plasma onde os resultados apresentados na literatura foram mais heterogêneos, tanto em estudos com indivíduos com DA ou com DP. No entanto, esse fato não é debatido pelos autores, até porque isso só foi possível perceber a partir da revisão sistemática dos dados.

Por outro lado, não somente o tipo de amostra analisada (diferentes biofluidos ou tecidos *post-mortem*) poderia estar influenciando na discrepância encontrada na literatura. Outro fator que poderia influenciar seria a análise do cobre considerando o sexo dos participantes. Somente sete artigos verificaram se existiam diferenças nos níveis de cobre entre homens e mulheres com as doenças neurodegenerativas (cinco realizados em indivíduos com DA e dois em indivíduos com DP). Um artigo em indivíduos com DA e um em indivíduos com DP verificaram que há diferenças nas concentrações de cobre entre os sexos, e entre indivíduos saudáveis e os com as doenças, observando que mulheres possuem níveis de cobre mais altos que os homens (ROZZINI *et al.*, 2018). Rembach *et al.* (2013a) e KIM *et al.* (2018) também observaram que as mulheres apresentavam níveis de cobre mais altos que os homens, apesar de não verificarem diferenças nas concentrações do metal comparando os indivíduos saudáveis com os indivíduos com DA (REMBACH *et al.*, 2013a). Fato que os autores explicam pela presença do hormônio estradiol sendo um hormônio sexual feminino (ARREDONDO *et al.*, 2010, KIM *et al.*, 2018). Os estrogênios poderiam ter uma ligação com a gravidade do dano cerebral ou mesmo ser um fator de risco para a DA, pois esses hormônios assim como o cobre são responsáveis por modular muitos neurotransmissores, como serotonina, dopamina, glutamato, ácido gama-aminobutírico e acetilcolina (KIM *et al.*, 2018; ROZZINI *et al.*, 2018). O estudo de Davidoff e colaboradores (1978) observou que em indivíduos que faziam uso de estrogênio havia o aumento dos níveis de cobre e de Cp, o que

poderia sugerir uma relação entre o hormônio e o metal. Uma explicação para essa relação é que os estradióis modulam o conteúdo dos transportadores de cobre, aumentando assim a absorção do metal (DI DOMENICO *et al.*, 1996, ARREDONDO *et al.*, 2010). Desta forma, pode-se sugerir que os pesquisadores considerem que os níveis de cobre possam ser diferentes entre homens e mulheres, e que é importante realizar comparações somente dentro do mesmo sexo, apesar deste fato não ser consenso entre as publicações analisadas. Alguns autores podem não ter observado alterações neste parâmetro entre indivíduos saudáveis e indivíduos afetados por essas doenças pois não consideraram este fato, aumentando o erro / desvio padrão da média, mascarando um resultado real.

Da mesma forma, a maioria dos autores não realizou comparações entre os diferentes estágios das doenças, que também pode ser um fator que poderia influenciar nos níveis de cobre encontrados nos participantes acometidos, apesar de que alguns autores não verificaram diferenças (PARK; LEE; PARK, 2014, KARPENKO *et al.*, 2017). Já outros, que serão citados abaixo, descrevem que há alterações na homeostase do cobre nos estágios mais avançados das doenças neurodegenerativas. No entanto, deve-se considerar que nem sempre foram utilizados os mesmos critérios para a definição dos estágios, o que dificulta a comparação entre os diferentes artigos.

Para a DA, as comparações entre os estágios foram verificadas mais frequentemente do que nas publicações em indivíduos com DP. Em relação à DP, Zhao e colaboradores (2013) menciona que foi apenas nos participantes com tremor acinético-rígido e misto que as concentrações de cobre estavam diminuídas no plasma. Nesta patologia, os indivíduos podem ser classificados de acordo com tipos de tremores que os acometem (tremor-dominante, acinético-rígido e misto). O tremor tipo rígido acinético mostra uma maior perda neuronal na região ventrolateral da substância negra zona compacta, enquanto que no tremor dominante a perda mais severa ocorre na região medial mais do que na lateral, além de no campo retrorubral; já o misto apresenta as duas características (EGGERS *et al.*, 2011). Estes autores ainda mostram que esses indivíduos onde foi observado a diminuição das concentrações de cobre no plasma eram mais idosos, fato que pode ser devido à idade afetar diretamente a absorção dos oligoelementos provenientes de uma dieta nesses participantes. Assim, podemos também levar em conta a idade em que os sujeitos são acometidos por essas patologias e a alteração nos níveis de metais

por conta do envelhecimento, e não somente devido ao estágio mais avançado da doença.

Quanto aos resultados observados em indivíduos com DA relacionando os níveis de cobre com diferentes estágios da doença, Vaz e colaboradores (2017) separaram os sujeitos do estudo em indivíduos sem comprometimento cognitivo (CDR-0; controles), e de acordo com os estágios da doença em demência muito leve (CDR-0,5), demência leve (CDR-1), demência moderada (CDR-2), ou demência grave (CDR-3). Essa pesquisa mostra que principalmente nos estágios CDR-2 e CDR-3 da DA os níveis de cobre estão aumentados no sangue (VAZ *et al.*, 2017). Rozzini e colaboradores compararam os níveis de cobre no soro em controles, com comprometimento cognitivo leve e indivíduos com DA. Os resultados mostraram que nesses dois grupos (comprometimento cognitivo leve e paciente com DA) os níveis de cobre livre estavam aumentados quando comparados ao grupo controle, mas ainda foram maiores em sujeitos com DA (ROZZINI *et al.*, 2018).

Nos estudos de Alsadany e colaboradores (2012), e PU e colaboradores (2017), os autores dividiram os sujeitos com DA em indivíduos que apresentavam demência leve, moderada ou severa. Foi verificado que os níveis de cobre no plasma em indivíduos foram maiores do que nos controles nos grupos moderado e grave, porém não foram observadas diferenças entre os estágios moderado e severo (ALSADANY *et al.*, 2013). Esse padrão também ocorreu no estudo de Pu *et al.* (2017), onde o aumento das concentrações de cobre no soro ocorreu nos estágios severo e moderado da doença em comparação com os outros grupos (PU *et al.*, 2017). Ainda, um estudo de González-Domínguez; García-Barrera; Gómez-Ariza (2014a), os autores apenas realizaram comparações das concentrações de cobre em sujeitos com comprometimento cognitivo leve e participantes acometidos pela DA, observando que os níveis de cobre estão aumentados no soro conforme o avanço da idade. Os autores sugerem que com o passar da idade o comprometimento da memória se torna mais prejudicado e concomitantemente os níveis de cobre tendem a aumentar, levando às doenças neurodegenerativas (GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ; GARCÍA-BARRERA; GÓMEZ-ARIZA, 2014b).

No entanto, como já citado anteriormente, Moynier *et al.* (2020) observou em córtex cerebral *post-mortem* que quanto maior o estágio de Braak e Braak, menor são os níveis de cobre, pelo menos no SNC (MOYNIER *et al.*, 2020). Essa relação também foi observada na publicação de Graham e colaboradores, onde as

comparações foram realizadas entre indivíduos com DA moderada e com DA grave (GRAHAM *et al.*, 2014). No entanto, os níveis de cobre podem sofrer influência com o avanço da idade sofrendo um declínio gradual; desta forma, essa diferença pode estar relacionada com a idade e não com o estágio avançado da doença (GRAHAM *et al.*, 2014), como também citado anteriormente para os indivíduos com DP.

Além do estágio das doenças, outro fator que poderia ser levado em conta pelos autores seria a de distinguir nas publicações os indivíduos com DA e DP esporádica e familiar, para verificar se há alguma diferença nas concentrações de cobre entre elas. No entanto, nos artigos analisados nesta revisão, não há essa distinção ou ainda a informação de quanto tempo os indivíduos haviam sido diagnosticados com as doenças. Compreende-se que há dificuldades em recrutar voluntários para este tipo de estudo, mas essa distinção poderia vir a esclarecer algumas lacunas que existem sobre o tema.

Neste sentido, alguns autores têm observado que as concentrações de cobre podem variar de acordo com polimorfismos genéticos, o que torna a comparação entre os indivíduos, sejam eles saudáveis ou apresentando alguma patologia, ainda mais complexa. Por exemplo, Singh *et al.* (2014) notaram que os níveis de cobre foram maiores em participantes com DA que apresentavam um alelo específico no gene para a citocromo P450 e para glutathione-S-transferase, quando comparado aos participantes que possuíam a presença de outro alelo nestes genes (SINGH *et al.*, 2014). Ainda, outro estudo em sujeitos com DA concluiu que há uma relação entre maiores níveis de cobre e uma variante presente no gene da ATP7B (SQUITTI *et al.*, 2013). A presença de polimorfismos no gene que codifica para a proteína parkina também pode estar relacionado com a homeostase do cobre, como observado em indivíduos com DP (SANYAL *et al.*, 2019).

Ainda, os autores poderiam ter levado em conta a medicação utilizada pelos indivíduos para atenuar os danos causados pelas patologias, pois dependendo da composição, o medicamento também poderia causar alterações nas concentrações de cobre. Na doença de Parkinson poucas publicações mencionam os medicamentos usados pelos participantes do estudo, trazendo a levodopa como principal medicamento utilizado no tratamento da DP, mas não fazem comparações mais profundas comparando os que utilizavam a medicação com os que não faziam o seu uso para melhor compreensão dos níveis de cobre nestes sujeitos. Apenas um artigo menciona que não houve diferenças significativas nos níveis dos

oligolementos quando os participantes faziam uso deste medicamento (YOUNES-MHENNI *et al.*, 2013). Em relação à doença de Alzheimer, um artigo de Giacconi e colaboradores (2019) comparou o grupo que usava como medicação inibidores da Acetilcolinesterase (AChEI) com os que não faziam o uso desta, observando que estes últimos apresentaram níveis de oligoelementos mais altos. No entanto, é possível compreender que este é um fator de difícil análise, pois como os participantes são idosos, provavelmente fazem uso de outras medicações para as distintas comorbidades que possam apresentar.

O número de sujeitos onde foi realizada a análise ou a qualidade metodológica dos estudos também poderia estar afetando os resultados. Porém, quando realizamos comparações entre os artigos que utilizaram um maior número de indivíduos com os que utilizaram um número limitado, percebeu-se que mesmo os primeiros apresentam resultados variáveis. Além disso, mesmo nos estudos com maior número de participantes, os autores mencionam que há limitações em suas pesquisas, e que não é possível afirmar com certeza qual é o fator que leva ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, e se a desregulação da homeostase do cobre está envolvida em todos os casos (FATTAH *et al.*, 2020). Ainda, analisando a qualidade metodológica dos estudos pela escala de Newcastle-Ottawa, percebe-se esta não influenciou os resultados obtidos, pois de toda forma os resultados são divergentes dentro da mesma classificação da escala.

É importante também citar que os estudos foram realizados em diferentes países, e os níveis de cobre podem ser influenciados pela dieta e por fatores ambientais. Os autores comentam que tanto a poluição ambiental quanto a alimentação influenciam os níveis dos metais no organismo, inclusive no SNC (SCHIRINZI *et al.*, 2016). Um estudo realizado no sul da Índia mostrou que os participantes que apresentavam alguma ligação com o meio rural possuíam níveis maiores de cobre no plasma do que os indivíduos que moravam nas áreas urbanas, fato que pode ser relacionado com uma exposição ocupacional nessas áreas, já que muitos produtos químicos usados na agricultura têm cobre na sua formulação (KUMUDINI *et al.*, 2014). No estudo de Singh e colaboradores (2014), foi realizada uma comparação se uma dieta alimentar vegetariana e não vegetariana poderia influenciar quanto às concentrações de cobre no sangue dos participantes, mas não foi verificada diferença significativa (SINGH *et al.*, 2014). Ainda, no estudo de Moynier *et al.* (2020) também é mencionado que a dieta, além da idade e do sexo

não influenciam nas concentrações dos metais (MOYNIER *et al.*, 2020). Para Paglia e colaboradores (2016), não se pode fazer uma discussão mais elaborada sobre esse tema, devido ao assunto ser ainda desconhecido no meio científico sem poder afirmar que hábitos alimentares contribuem para o surgimento dessas doenças. Por isso, devemos dar ênfase na importância de se realizar revisões sistemáticas e detectar os problemas para que assim os autores possam se aprofundar em pesquisas futuras.

Apesar da falta de consenso na literatura sobre o tema, Sparks e Schreurs (2003) e Morris *et al.* (2006) mencionam que tanto em modelos animais quanto em estudos feito com humanos uma dieta suplementada com cobre acelera o declínio cognitivo e o surgimento das placas amiloides (MCINTOSH *et al.*, 2012), sendo um processo inicial ao surgimento da doença de Alzheimer (VAZ *et al.*, 2017). Já outros autores afirmam que os indivíduos que possuem uma diminuição nos níveis de cobre nos biofluidos tem maior risco de desenvolver DP; enquanto que os que apresentam maiores concentrações do metal apresentam menor risco (ILYECHOVA *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2018). No entanto, estudos também concluem que há uma fraca associação dos níveis alterados do metal com o surgimento das doenças neurodegenerativas (ZHAO *et al.*, 2013).

Ainda que nem todos os indivíduos acometidos com DA ou DP apresentem uma alteração nos níveis de cobre, como descrito até o momento, vários estudos que utilizaram modelos experimentais nos levam a crer que um excesso de cobre no organismo pode estar relacionado com o início e progressão de doenças neurodegenerativas, podendo agir como um fator causal das formas esporádicas de DA e DP. Vale ressaltar que essas patologias são de origem multifatorial, podendo estar envolvidos não somente fatores ambientais, mas também genéticos. A seguir, será descrita a associação encontrada na literatura entre o excesso de cobre e a DA e DP evidenciada em modelos experimentais.

6.2 ESTUDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS: EFEITOS DO EXCESSO DE COBRE EM ANIMAIS

Os modelos animais podem servir para auxiliar os pesquisadores a entender o papel dos metais nas doenças neurodegenerativas. Desta forma, além de analisar as publicações envolvendo estudos sobre os níveis de cobre em biofluidos e tecidos

post-mortem de sujeitos com a DA ou DP, a presente revisão de literatura também possuiu o intuito de analisar os artigos publicados entre os anos de 2011 a 2020 que utilizaram animais que foram expostos a altas concentrações de cobre, onde os autores correlacionaram essa exposição ao metal com a DA ou com a DP.

A exposição dos animais ao cobre ocorreu de maneiras distintas, tanto por injeção intraperitoneal (i.p.) quanto na água de beber dos animais, ou ainda através da dieta (adicionado na ração). O metal foi administrado na forma de acetato de cobre ((CH₃COO)₂Cu), cloreto de cobre (CuCl₂) ou sulfato de cobre (CuSO₄). As concentrações e o período que os animais eram sujeitos variava de acordo com o estudo, sendo esse último por dias ou meses. As áreas do cérebro analisadas pelos pesquisadores também foram distintas, sendo as principais o estriado, a substância negra, o córtex frontal, o feixe prosencefálico medial e a área tegmental ventral, para estudos relacionando o excesso de cobre com a DP (Tabela 5); e hipocampo, córtex cerebral, cérebro e estriado, para os estudos que correlacionaram os efeitos de altas concentrações do metal à DA (Tabela 2).

Muitas das publicações analisadas, como pode ser verificado nas Tabelas 2 e 5, concluem que os efeitos causados pela exposição ao cobre estão relacionados ao estresse oxidativo, devido ao metal estar envolvido na reação de Fenton e de Haber-Weiss, que geram radicais instáveis, como as ERO (por exemplo, radicais hidroxila) (SINGH *et al.*, 2013, CRUCES-SANDE *et al.*, 2019). Além disso, o cobre afeta o sistema antioxidante por alterar a atividade de enzimas como a glutathiona peroxidase (GPx) e SOD, e causar a diminuição de GSH; além da sobrecarga desse metal aumentar a peroxidação lipídica cerebral, levar à oxidação do DNA e à nitrotirosinação de proteínas (ARNAL *et al.*, 2013a,b, SINGH *et al.*, 2013, YU *et al.*, 2018, TAN *et al.*, 2019).

Desta forma, o excesso de cobre induz um ambiente pró-oxidativo, o que pode contribuir para os estágios iniciais da DA e da DP (ARNAL *et al.*, 2013b), já que o envolvimento do estresse oxidativo em doenças neurodegenerativas, e até mesmo outras patologias, é amplamente descrito na literatura estar relacionado à fisiopatologia dessas doenças (TAN *et al.*, 2019). Sabe-se que tanto na DA como na DP ocorre o aumento da geração de ERO e de ERN (espécies reativas de nitrogênio), alterações no sistema antioxidante, peroxidação lipídica, e oxidação/nitrotirosinação de proteínas ou do DNA, resultando em estresse oxidativo que compromete a saúde e sobrevivência celular (SINGH *et al.*, 2013, SMEYNE;

SMEYNE, 2013, TÖNNIES; TRUSHINA, 2017, HEMMATI-DINARVAND *et al.*, 2019, BUTTERFIELD; BOYD-KIMBALL, 2020). Assim, através das alterações encontradas em seus estudos, alguns autores acreditam que uma sobrecarga de cobre poderia acelerar o surgimento das doenças neurodegenerativas (CHEN *et al.*, 2019).

Alterações relacionadas à mitocôndria também podem estar envolvidas em uma maior geração de radicais livres, resultando em estresse oxidativo. No estudo de Behzadfar e colaboradores (2017) a exposição ao cobre por três semanas foi responsável por gerar estresse oxidativo nas mitocôndrias hipocâmpais, já que essas organelas são os principais alvos de uma sobrecarga de cobre, pois realizam o armazenamento do metal intracelularmente (KIM; NEVITT; THIELE, 2008, DODANI *et al.*, 2011). Neste sentido, já foi verificado que a exposição ao cobre causa uma inibição da função destas organelas e um aumento da produção de ERO mitocondriais (YU *et al.*, 2018, CHEN *et al.*, 2019). Estudos também apontam uma redução de proteínas relacionadas ao metabolismo energético, incluindo CcO e acil-coenzima A tioesterase 2, sugerindo que a exposição ao cobre afeta o metabolismo energético (CHEN *et al.*, 2019). A disfunção mitocondrial causada pelo excesso do metal leva à perda do potencial de membrana, o que resulta no *déficit* na síntese de ATP, podendo levar à morte celular por apoptose, já que as mitocôndrias tem papel fundamental na sobrevivência celular atuando como moderadores deste processo (BEHZADFAR *et al.*, 2017).

Análises proteômicas também demonstraram que a exposição ao cobre causa aumento de proteínas antioxidantes mitocondriais, como NAD(P)⁺ transidrogenase mitocondrial (NNT), provavelmente para tentar remover as ERO produzidas no interior desta organela. Ainda, foi observada uma diminuição na expressão de proteínas envolvidas na biogênese e fusão mitocondrial, como PGC1- α , Nrf1, Nrf2, Tfam, OPA1, Mfn1 e Mfn2, e a diminuição do número de cópias do DNA mitocondrial. Por outro lado, foi verificado um aumento nas proteínas Drp1 e Fis1, responsáveis pela fissão mitocondrial (YU *et al.*, 2018, CHEN *et al.*, 2019). A alteração na expressão dessas proteínas pode ocorrer devido à geração de estresse oxidativo causada pelo excesso de cobre, o que induz o processo de fissão para eliminar mitocôndrias disfuncionais por mitofagia, além de estar relacionada com a apoptose (LIU *et al.*, 2020, WANG *et al.*, 2020).

Atualmente se sabe que para ambas as doenças (DA e DP) a presença de mitocôndrias disfuncionais estão relacionadas ao surgimento destas, além da

desregulação na dinâmica mitocondrial (fissão e fusão), mitofagia defeituosa e mutações no mtDNA (SUBRAMANIAM; CHESSELET, 2013, YAN; WANG; ZHU, 2013). Ainda, mutações em genes como parkina e PINK1 (relacionada à mitofagia), e DJ-1 (localizada nas mitocôndrias), são observadas em algumas formas de DP. Todo esse conjunto leva a problemas na geração de energia, produção de ERO e apoptose (SUBRAMANIAM; CHESSELET, 2013, YAN; WANG; ZHU, 2013). Desta forma, acredita-se que o excesso do cobre acelera processos que levam ao surgimento das doenças neurodegenerativas, pois, além do estresse oxidativo comentado anteriormente, também causa disfunção mitocondrial, e alterações na dinâmica e biogênese desta organela (CHEN et al., 2019; BEHZADFAR et al., 2017). Apesar de alterações mitocondriais serem descritas tanto na DA como na DP, nos estudos incluídos na presente revisão somente autores que relacionaram o excesso de cobre com a DA analisaram estes parâmetros. Mas, como a disfunção mitocondrial também ocorre na DP, podemos hipotetizar que o excesso de cobre, por causar alterações nesta organela, pode estar relacionado ao surgimento desta doença.

Como comentado anteriormente, alterações mitocondriais podem desencadear a morte celular por apoptose. Neste sentido, Yu e colaboradores observaram que o cobre acima das concentrações fisiológicas resulta em apoptose de células hipocâmpais (YU *et al.*, 2018), o que pode relacionar a exposição ao metal com a morte neuronal observada em indivíduos com DA. Ainda, as altas concentrações de cobre aos quais os animais foram expostos nos estudos incluídos nesta revisão tem a capacidade de torná-lo neurotóxico, levando a morte dos neurônios dopaminérgicos através de um dano oxidativo, observada através de uma diminuição da imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH) (YU *et al.*, 2018, ABBAOUI; GAMRANI, *et al.*, 2018, CRUCES-SANDE *et al.*, 2019). Neste sentido, recorda-se que a morte dos neurônios dopaminérgicos é uma característica da DP, relacionando o excesso do metal com a neurodegeneração observada nos indivíduos (SOUZA *et al.*, 2011). O cobre também é responsável por gerar lesões oxidativas em astrócitos, verificado através da diminuição da imunorreatividade para GFAP, levando a morte celular. Assim, essas células não desempenham seu papel de proteção aos neurônios no SNC, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (ABBAOUI; GAMRANI, *et al.*, 2018).

A morte dos neurônios observada na DA ainda está relacionada à deposição das placas amiloides, formadas pela oligomerização de A β , as quais têm um papel crucial no surgimento desta patologia. Neste contexto, observou-se que esse processo pode ser causado pela associação do cobre juntamente com o H₂O₂ (PILOZZI *et al.*, 2020). Além do mais, com o aumento do estresse oxidativo causado pela exposição ao cobre, observou-se que ocorre o aumento de ligação de AP-1 ao DNA - já que o AP-1 é regulado pelo *status* redox das células; assim, o aumento da ativação deste fator de transcrição pelo cobre pode contribuir para a formação de A β , pois resulta no aumento da expressão de BACE1 (que cliva a APP) (LUNG *et al.*, 2013). Observou-se ainda que o cobre em excesso aumentou o número de células A β imunopositivas no encéfalo (DECI *et al.*, 2012, MAO *et al.*, 2012, ARNAL *et al.*, 2013b) e causou um aumento da expressão do gene da APP (proteína precursora amiloide) que, por consequência, pode aumentar a deposição de A β (PILOZZI *et al.*, 2020).

Esse aumento de A β também pode ocorrer devido a problemas na sua eliminação através da BHE, causando o acúmulo deste peptídeo e resultando na formação das placas senis, podendo ser uma causa do surgimento da DA relacionado ao excesso de cobre (DECI *et al.*, 2012, MAO *et al.*, 2012, SINGH *et al.*, 2013, HSU *et al.*, 2019, PILOZZI *et al.*, 2020). A LRP1 (proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade), envolvida na depuração de A β , já é conhecida por diminuir com a idade e nos estágios iniciais da DA (HSU *et al.*, 2019). Estudos verificaram que, quando ocorre uma exposição ao cobre, os níveis de LRP1 são reduzidos, causando um grande aumento de A β no parênquima cerebral (SINGH *et al.*, 2013, HSU *et al.*, 2019, STORCK *et al.*, 2016). Além disso, o metal é responsável pela nitrotirosinação de LRP1 dos capilares, causando sua degradação pelo proteossomo (SINGH *et al.*, 2013).

É amplamente reconhecido que os agregados de A β são neurotóxicos, resultando em comprometimento cognitivo nos sujeitos com DA, o que leva à demência (BEHZADFAR *et al.*, 2017, HSU *et al.*, 2019). Neste sentido, foi observado que os animais possuem um comprometimento da memória quando expostos ao excesso de cobre (SINGH *et al.*, 2013, YU *et al.*, 2015, YU *et al.*, 2018, HSU *et al.*, 2019, LIM *et al.*, 2020), pois as altas concentrações do metal afetam o hipocampo, sendo esta uma das regiões responsáveis pela memória (TAN *et al.*, 2019). Ainda, estudos indicam que a CPLX tem um papel ativo nas funções cognitivas, assim

quando CPLX-1 e CPLX-2 estão diminuídas há maior comprometimento da memória, como observado em camundongos expostos ao cobre (YU *et al.*, 2015).

O comprometimento cognitivo causado pela exposição ao metal observado na literatura ainda pode estar relacionado à degeneração axonal e dendrítica, verificado por Chen e colaboradores e Tan *et al.*, respectivamente (CHEN *et al.*, 2019, TAN *et al.*, 2019). Além disso, autores têm verificado que a exposição ao cobre resultou em redução na fosforilação de Camk2 α , que é crítica para indução da plasticidade sináptica (YU *et al.*, 2018, CHEN *et al.*, 2019). Além do mais, análises relacionadas à expressão de proteínas associadas a sinapses revelaram alterações nos receptores de glutamato do tipo NMDA, que são os responsáveis pela regulação da plasticidade sináptica; além de observarem a diminuição de proteínas relacionadas à plasticidade sináptica de curto e longo prazo (sinaptofisina e GluR-2, respectivamente) (YU *et al.*, 2018, CHEN *et al.*, 2019). Essa diminuição na sinaptofisina resulta em danos na liberação de neurotransmissores, causando disfunção sináptica e acarretando no comprometimento da memória (YU *et al.*, 2018).

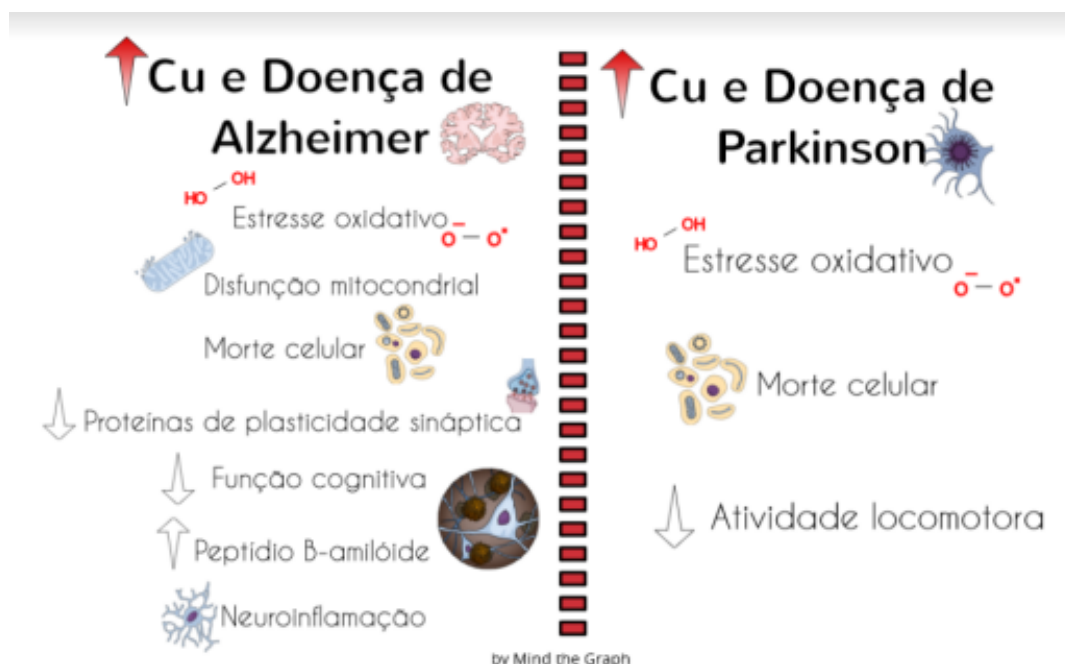
Enquanto que a DA é caracterizada pelo comprometimento cognitivo, a principal característica da DP são os sintomas motores, como tremor no repouso, bradicinesia, rigidez, marcha arrastada e instabilidade postural (BEITZ, 2014). Neste sentido, os artigos incluídos nesta revisão observaram que a atividade locomotora é reduzida nos animais expostos ao cobre (ABBAOUI; HIBA; GAMRANI, 2017, ABBAOUI *et al.*, 2017, ABBAOUI; GAMRANI, 2018). A atividade locomotora está relacionada ao sistema dopaminérgico, pois se sabe que a dopamina é um modulador neuroquímico atuando no comportamento locomotor nas áreas nigro-córtico-estriatais, áreas afetadas pela DP (ABBAOUI; HIBA; GAMRANI., 2017, ABBAOUI *et al.*, 2017). No estudo de Cruces-Sande e colaboradores (2019), onde os animais foram expostos ao cobre e à 6-OHDA (via intraestriatal), foi observado um grave dano nos neurônios dopaminérgicos devido ao estresse oxidativo, pois o cobre é capaz de catalisar a auto-oxidação de 6-OHDA, causando danos muito maiores do que apenas a ação dos dois compostos isoladamente (CRUCES-SANDE *et al.*, 2019).

Por fim, a neuroinflamação observada por alguns autores após a exposição ao cobre é um evento também observado em doenças neurodegenerativas, como revisado em Kwo e Koh (2020). Arnal e colaboradores (2013b) observaram que o ambiente pró-inflamatório e pró-oxidativo desencadeado pelo excesso de cobre

resulta na ativação de calpaínas, o que já foi descrito em indivíduos com DA, o que pode contribuir com a morte neuronal (SAITO *et al.*, 1993, ARNAL *et al.*, 2013a). Lim e colaboradores (2020) mostraram que o metal causa a degeneração da micróglia, e que esse processo degenerativo leva ao excesso de sinapses, perda neuronal, secreção de citocinas pró-inflamatórias, aumento de A β e declínio cognitivo (LIM *et al.*, 2020). A secreção de citocinas pró-inflamatórias e de prostaglandinas após a exposição ao metal também foi observada por outros autores, confirmando que o excesso de cobre pode resultar em neuroinflamação, e isso pode ocorrer por uma via mediada por TNF- α (fator de necrose tumoral α), que é induzida pela deposição de placas amiloides (LU *et al.*, 2009, ARNAL *et al.*, 2013b, SINGH *et al.*, 2013, TAN *et al.*, 2019, PILOZZI *et al.*, 2020). Ainda, a secreção de fatores pró-inflamatórios ocorre devido à ativação da micróglia, o que é fundamental em processos neuroinflamatórios, e tem sido relacionado ao desenvolvimento de DA (GALASKO; MONTINE, 2010, HSU *et al.*, 2019, PILOZZI *et al.*, 2020). Por outro lado, também é mencionado na literatura que o estado iônico que o cobre se apresenta pode influenciar na maneira como ele modula as respostas inflamatórias nessas células: na sua forma divalente (Cu²⁺) o metal leva a uma fagocitose defeituosa pela micróglia, aumentando a liberação de citocinas pró-inflamatórias; no entanto, na sua forma monovalente (Cu⁺), este elemento está relacionado à ação anti-inflamatória, inibindo a produção de óxido nítrico (LIM *et al.*, 2020).

Percebe-se através da análise dos artigos incluídos que existem várias vias onde o cobre pode exercer seus efeitos neurotóxicos que estão relacionadas com a DA e com a DP, as quais incluem estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, agregação proteica, alterações comportamentais (*déficit* cognitivo e locomotor), e neuroinflamação (Figura 10). Desta forma, apesar de os artigos que avaliaram as concentrações de cobre em indivíduos com DA ou DP apresentarem resultados divergentes, pode-se inferir através das evidências obtidas em modelos experimentais que o excesso desse metal no organismo pode desencadear efeitos que estão relacionados ao início e progressão destas doenças.

Figura 10 - Principais alterações observadas após a exposição ao excesso de cobre e a sua relação com a DA e/ou com a DP



Fonte: elaborado pela autora em <https://mindthegraph.com/> (2022).

6.3. ESTUDOS EM MODELOS EXPERIMENTAIS: MENSURAÇÃO DOS NÍVEIS DE COBRE EM MODELOS ANIMAIS DAS DOENÇAS DE ALZHEIMER E DE PARKINSON

A DP e a DA podem ser mimetizadas em modelos animais, para que desta forma possam auxiliar os pesquisadores a compreender a fisiopatologia destas doenças e contribuir em estudos pré-clínicos visando o seu tratamento. Neste sentido, em complemento à análise da avaliação de artigos que mensuraram as concentrações de cobre em indivíduos com DA ou DP e àqueles que observaram que o excesso do metal está relacionado a estas doenças, objetivou-se analisar se a alteração na homeostase do cobre pode ser verificada também nos modelos experimentais comumente usados para mimetizá-las.

Tanto para a DP quanto para a DA existem poucos estudos através dos anos de 2011 a 2020 que mensuram os níveis de cobre em modelos experimentais destas doenças. Pesquisas como de Carmona e colaboradores (2019), e de Moynier e colaboradores (2019), observaram que não houve diferenças estatísticas no teor de cobre entre o modelo de DP e os controles. Da mesma forma, nas pesquisas de Leskovjan e colaboradores (2011), Xu e colaboradores (2016), e Ma e colaboradores

(2011), os autores não verificaram diferenças nas concentrações de cobre entre o modelo utilizado para mimetizar a DA e seus respectivos controles. Apenas Rojas e colaboradores (2012) observaram que ocorreu uma diminuição das concentrações do metal no corpo estriado e mesencéfalo no modelo experimental de DP utilizado, que foi a administração de MPP⁺. Isso pode ter ocorrido devido a esse composto ser capaz de redistribuir o cobre dentro do encéfalo, principalmente nas regiões afetadas pela DP. A diminuição dos níveis de cobre neste modelo afeta principalmente a atividade da CcO (enzima dependente de cobre) no estriado, que por consequência leva à geração de ERO e à apoptose, características comuns às doenças neurodegenerativas.

O objetivo desta revisão em reunir os artigos que mensuraram as concentrações de cobre nestes modelos foi a de verificar se estes poderiam apresentar alguma alteração na homeostase do metal, para tentar correlacionar com o que foi encontrado nas publicações que mensuraram as concentrações de cobre em sujeitos com DA ou DP. Os resultados encontrados pelos autores nos indivíduos não foram homogêneos, apresentado variedade de resultados acerca do tema. Nos estudos com os modelos animais, a maioria das publicações demonstrou que não há alteração nos níveis do cobre. Os modelos apresentados nos estudos incluídos nesta revisão não foram satisfatórios para mimetizar todas as características dessas doenças, como alterações nas concentrações do cobre, sendo assim um desafio para os pesquisadores encontrar um bom modelo que acabe se assemelhando com os indivíduos que apresentam doenças neurodegenerativas.

7 CONCLUSÕES

Considerando as questões norteadoras desta revisão, conclui-se que, alterações na homeostase do cobre podem ser encontradas em indivíduos com as DA e DP, mas não são todos os autores que observaram modificações nas concentrações deste metal nas amostras analisadas. Assim, considerando as evidências analisadas na presente revisão, as amostras de soro, sangue, líquido cefalorraquidiano, plasma, urina e cabelo indicam que as concentrações de cobre em diferentes amostras não podem ser consideradas para diagnóstico das doenças, pelo menos até o momento. Devido à carência de estudos em relação ao tema, não se pode afirmar que as concentrações alteradas do cobre podem estar relacionadas

com os diferentes estágios das doenças, ou com o sexo dos indivíduos analisados; desta forma, sugere-se que os próximos estudos considerem estes dois fatores ao se realizar as comparações entre os grupos de indivíduos que não apresentam e os que apresentam alguma doença neurodegenerativa.

Através da análise dos estudos realizados em animais, conclui-se que quando estes foram expostos a altas concentrações de cobre são observadas várias alterações comuns ao já descrito tanto para a DA como para a DP, como alterações mitocondriais, estresse oxidativo, acúmulo de peptídeo A β (no caso da DA), neuroinflamação, morte celular e diminuição das funções cognitivas ou da atividade locomotora. Apesar destas alterações, na maioria dos modelos experimentais utilizados para mimetizar a DA ou a DP não foram observadas modificações nas concentrações de cobre, exceto no estudo que utilizou MPP⁺ para indução do modelo de DP, onde foi observada uma diminuição deste oligoelemento no estriado e mesencéfalo.

Diante do exposto, o cobre em excesso no organismo pode ser um fator de risco para o desenvolvimento destas doenças neurodegenerativas, apesar das concentrações do metal não estarem alterados em todos os sujeitos diagnosticados com DA ou com DP.

REFERÊNCIAS

- AASETH, J.; DUSEK, P.; ROOS, P.M. Prevention of progression in Parkinson's disease. **BioMetals**, 31(5), 737–747, 2018.
- ABBAOUI, A. et al., Neuroprotective effect of curcumin-I in copper-induced dopaminergic neurotoxicity in rats: A possible link with Parkinson's disease. **Neurosci Lett.**, 660, 103-108, 2017.
- ABBAOUI, A; HIBA, O.E; GAMRANI, H. Neuroprotective potential of Aloe arborescens against copper induced neurobehavioral features of Parkinson's disease in rat. **Acta Histochem.**, 119(5), 592-601, 2017.
- ABBAOUI, A; GAMRANI, H. Neuronal, astroglial and locomotor injuries in subchronic copper intoxicated rats are repaired by curcumin: A possible link with Parkinson's disease. **Acta Histochem.**, 120(6), 542-550, 2018.
- ACEVEDO, K. M. et al., Copper promotes the trafficking of the amyloid precursor protein. **J Biol Chem.**, 286, 8252-8262, 2011.
- ACKERMAN C. M; CHANG C.J. Copper signaling in the brain and beyond. **J Biol Chem.**, 293(13), 4628-4635, 2018.
- AGUIAR, F. C. et al., Menkes disease: report of two cases in siblings. **Arq. Catarin. Med**, 41(4), 80-82, 2012.
- AJSUVAKOVA, O. P. et al., Assessment of copper, iron, zinc and manganese status and speciation in patients with Parkinson's disease: a pilot study. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 126423, 2020.
- AKAGAWA M.; SUYAMA K. Characterization of a model compound for the lysine tyrosylquinone cofactor of lysyl oxidase. **Biochem Biophys Res Commun**, 281(1), 193-199, 2001.
- AKATSU, H. et al., Transition metal abnormalities in progressive dementias. **BioMetals**, 25(2), 337–350, 2012.
- AKYOL, O, et al., Hair, nail, serum, and urine copper levels in users of copper intrauterine devices and interactions between copper and some other trace elements. **Trace Elem Electroly**, 14, 124–129, 1997.
- ALA, A., et al. Wilson's disease. **Lancet**, 369, 397–408, 2007.
- ALSADANY, M. A. et al., Histone deacetylases enzyme, copper, and IL-8 levels in patients with Alzheimer's disease. **Am J Alzheimers Dis Other Demen.**, 28(1), 54-61, 2012.
- ALTARELLI, M. et al. Copper Deficiency: Causes, Manifestations, and Treatment. **Nutrition in Clinical Practice**, 34(4), 504–513, 2019.

ANGELETTI, B. et al. BACE1 cytoplasmic domain interacts with the copper chaperone for superoxide dismutase-1 and binds copper. **J Biol Chem.**, 280, 17930-17937, 2005.

ARNAL N, et al., Effects of Copper and/or Cholesterol Overload on Mitochondrial Function in a Rat Model of Incipient Neurodegeneration. **Int J Alzheimers Dis.**, 2013:645379, 2013a.

ARNAL, N. et al., Role of copper and cholesterol association in the neurodegenerative process. **Int J Alzheimers Dis.**, 2013:414817, 2013b.

ARNAOUTOGLU, N. A.; O'BRIEN, J. T.; UNDERWOOD, B. R. (2018). Dementia with Lewy bodies — from scientific knowledge to clinical insights. **Nature Reviews Neurology**, 2018.

ARREDONDO, M. et al., Influence of estrogens on copper indicators: in vivo and in vitro studies, **Biol Trace Elem. Res.**, 134(3), 252-64, 2010.

ARSLAN, A. et al., Change of antioxidant enzyme activities, some metals and lipid peroxidation in alzheimer's disease. **Acta Medica Mediterranea**, 32,1643, 2016.

ASH, D. E. et al., Kinetic and spectroscopic studies of the interaction of copper with dopamine beta-hydroxylase. **J. Biol. Chem.**, 259, 3395–3398, 1984.

ASHRAF, A. et al., Pattern of Altered Plasma Elemental Phosphorus, Calcium, Selenium, Iron and Copper in Alzheimer's Disease. **Scientific Reports**, 9(1), 2019.

ASHRAF, A. et al. Regional Distributions of Iron, Copper and Zinc and Their Relationships With Glia in a Normal Aging Mouse Model. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 11,1–15, 2019.

ATWOOD, C. S. et al., Copper mediates dityrosine crosslinking of Alzheimer's amyloid-beta. **Biochemistry**, 43, 560-568, 2004.

BACCHELLA, C. et al., Binding and Reactivity of Copper to R1 and R3 Fragments of tau Protein. Inorganic Chemistry. **Inorg. Chem**, 2019.

BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H. V. Parkinson disease. **European Journal of Neurology**, 27, 27–42, 2019.

BANDMANN, O.; WEISS, K. H.; KALER, S. G. Wilson's disease and other neurological copper disorders. **The Lancet Neurology**, 14(1), 103–113, 2015.

BARROS, M. H.; JOHNSON, A.; TZAGOLOFF, A. COX23, a homologue of COX17, is required for cytochrome oxidase assembly. **Journal of Biological Chemistry**, 279(30), 31943–31947, 2004.

BEHARI, M.; PARDASANI, V. Genetics of Wilsons disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, 16(10), 639–644, 2010.

BEHZADFAR, L. et al Potentiating role of copper on spatial memory deficit induced by beta amyloid and evaluation of mitochondrial function markers in the hippocampus of rats. **Metallomic**, 9(7), 969-980, 2017.

BEITZ, J. M. Parkinson's disease: a review. **Front Biosci (Schol Ed)**., 6(1), 65-74, 2014.

BELAIDI, A. A.; BUSH, A. I. Iron neurochemistry in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: targets for therapeutics. **Journal of Neurochemistry**, 139, 179–197, 2016.

BHADHPRASIT, W et al., Effect of copper and disulfiram combination therapy on the macular mouse, a model of Menkes disease. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 26(2-3), 105–108, 2012.

BINOLFI, A. et al., Interaction of α -synuclein with divalent metal ions reveals key differences: A link between structure, binding specificity and fibrillation enhancement. **Journal of the American Chemical Society**, 128(30), 9893–9901, 2006.

BISAGLIA, M.; BUBACCO, L. Copper ions and Parkinson's disease: Why is homeostasis so relevant?. **Biomolecules**, 10(2), 2020.

BJORKLUND, G. et al., Metals and Parkinson's Disease: Mechanisms and Biochemical Processes. **Current Medicinal Chemistry**, 25(19), 2198–2214, 2018.

BODE, M. et al., Redox-regulated dynamic interplay between Cox19 and the copper-binding protein Cox11 in the intermembrane space of mitochondria facilitates biogenesis of cytochrome c oxidase. **Molecular Biology of the Cell**, 26(13), 2385–2401, 2015.

BOST, M, et al., Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 35, 107–115, 2016.

BOUSQUET-MOORE, D.; MAINS, R. E.; EIPPER, B. A. Peptidylglycine α -amidating monooxygenase and copper: A gene-nutrient interaction critical to nervous system function. **Journal of Neuroscience Research**, 88(12), 2535–2545, 2010.

BREWER GJ. The risks of free copper in the body and the development of useful anticopper drugs. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, 11(6), 727-32, 2008.

BRISCHIGLIARO, M; ZEVIANI, M. Cytochrome c oxidase deficiency. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, 148335, 2020.

BRYCE, G.F.; GURD, F.R. Visible spectra and optical rotatory properties of cupric ion complexes of L-histidine-containing peptides. **The Journal of biological chemistry**, 241, 122-129, 1996.

BULCKE, F; DRINGEN, R; SCHEIBER, I. F. Neurotoxicity of copper. **Neurotoxicity of Metals**, 313–343, 2017.

BUSH, A. I. The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 26(4), 207–214, 2003.

BUTTERFIELD, D; POON, H. The senescence-accelerated prone mouse (SAMP8): A model of age-related cognitive decline with relevance to alterations of the gene expression and protein abnormalities in Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, 40(10), 774–783, 2005.

BUTTERFIELD, D. A; BOYD-KIMBALL, D. Mitochondrial oxidative and nitrosative stress and Alzheimer disease. *Antioxidants*, 9(9), 818, 2020.

CANKORUR-CETINKAYA, A.; ERASLAN, S.; KIRDAR, B., Transcriptional remodelling in response to changing copper levels in the Wilson and Menkes disease model of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular BioSystems*, 9(11):2889, 2013.

CARMONA, A. et al., Mapping chemical elements and iron oxidation states in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine lesioned rats using correlative immunohistochemistry with proton and synchrotron micro-analysis. *Front Neurosci.*, 26(13):1014, 2019.

CATER, M. A. et al., ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: Insight into biliary copper excretion. *Gastroenterology*, 130(2), 493–506, 2006.

CERRI, S.; MUS, L.; BLANDINI, F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *Journal of Parkinson's Disease*. 9(3), 501-515, 2019.

CHAMI, L; CHECLER, F; BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and beta-amyloid production in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.*, 7, 52, 2012.

CHEN, F et al., Effects of waterborne Cu exposure on intestinal copper transport and lipid metabolism of *Synechogobius hasta*. *Aquatic Toxicology*, 178, 171-181, 2016.

CHEN, G.F. et al., Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*, 38, 1205–1235, 2017.

CHEN, C. et al., Low-dose oral copper treatment changes the hippocampal phosphoproteomic profile and perturbs mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med.*, 135, 144-156, 2019.

CHEIGNON, C et al., Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14, 450–464, 2018.

COBINE P.A. et al, Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix, *J Biol Chem*, 279(14), 14447–14455, 2004.

COBINE P.A. et al., Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase, *J Biol Chem*, 281(48), 36552–9, 2006.

COBINE, P. A.; MOORE, S. A.; LEARY, S. C. Getting out what you put in: Copper in mitochondria and its impacts on human disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, 1868(1), 118867, 2021.

CROUCH, P. J. et al., Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid- β 1-42. **Journal of Neuroscience**, 25(3), 672–679, 2005.

CRUCES-SANDE A. et al., Copper Increases Brain Oxidative Stress and Enhances the Ability of 6-Hydroxydopamine to Cause Dopaminergic Degeneration in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Mol Neurobiol.**, 56(4), 2845-2854, 2019.

CZŁONKOWSKA, A. et al. Wilson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, 4(1), 2018.

D'Ambrosi, N., and Rossi, L. Copper at synapse: Release, binding and modulation of neurotransmission. *Neurochemistry international* 90, 36-45, 2015.

DADALTO V. E.; CAVALCANTE G. F, The place of family caregivers for older adults with Alzheimer's disease: a literature review in Brazil and the United States. **Ciência & Saúde Coletiva**, 26(1), 147-157, 2021.

DANIEL S. E; HAWKES C. H. Preliminary diagnosis of Parkinson's disease by olfactory bulb pathology. **Lancet**, 18;340(8812), 186, 1992.

DAVIDOFF, G. N. et al., Elevations in serum copper, erythrocytic copper, and ceruloplasmin concentrations in smokers. **Am. J. Clin. Pathol.**, 70(5), 790-2, 1978.

DAVIES K. M. et al., Copper pathology in vulnerable brain regions in Parkinson's disease. **Neurobiol Aging.**, 35(4), 858-866, 2014.

DAVIS, A. A.; LEYNS, C. E. G.; HOLTZMAN, D. M. Intercellular Spread of Protein Aggregates in Neurodegenerative Disease. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, 1–24, 2018.

DECI, S, et al., Cholesterol increases ventricular volume in a rabbit model of Alzheimer's disease. **J. Alzheimers Dis.**, 29(2), 283-292, 2012.

DEIBEL M. A.; EHMANN W. D.; MARKESBERY W. D. Copper, iron, and zinc imbalances in severely degenerated brain regions in Alzheimer's disease: possible relation to oxidative stress. **J. Neurol. Sci.**, 137–142, 1996.

DÍAZ, T. et al., Metabolismo do cobre na nutrição animal: Revisão. **PubVet**, 9(6), 279–286, 2015.

DI DOMENICO, M. et al., Estradiol activation of human colon carcinoma-derived Caco-2 cell growth. **Cancer Res.**, 56, 4516–4521, 1996.

DODANI S.C. et al., A targetable fluorescent sensor reveals that copper-deficient

SCO1 and SCO2 patient cells prioritize mitochondrial copper homeostasis. **J. Am. Chem. Soc.**, 133 (22), 8606– 8616, 2011.

DOGUER, C.; HA, J. H.; COLLINS, J. F. Intersection of Iron and Copper Metabolism in the Mammalian Intestine and Liver. **Comprehensive Physiology**, 8(4), 1433–1461, 2018.

DONG, Y et al., Role for Biochemical Assays and Kayser-Fleischer Rings in Diagnosis of Wilson's Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 2020.

DRINGEN, R. et al. The pivotal role of astrocytes in the metabolism of iron in the brain. **Neurochemical Research**, 32(11), 1884–1890, 2007.

EGGERS, C. et al., Akinetic-rigid and tremor-dominant Parkinson's disease patients show different patterns of FP-CIT Single photon emission computed tomography. **Movement Disorders**, 26(3), 416–423, 2011.

EKICI S. et al., Intracytoplasmic copper homeostasis controls cytochrome c oxidase production. **mBio**. 5(1), e01055-13, 2014.

ENGELHARDT, E. Lafora and Trétiakoff: the naming of the inclusion bodies discovered by Lewy. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 75(10), 751–753, 2017.

ESKICI, G.; AXELSEN, P. H. Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochemistry**, 51(32), 6289–6311, 2012.

FAN. T-S.; LIU. S.; C-H .; WU. R-M. Alpha-Synuclein and Cognitive Decline in Parkinson Disease. **Life**, 11(11), 1239, 2021.

FARR, S. A. et al., Metformin Improves Learning and Memory in the SAMP8 Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 1–12, 2019.

FATTAH A. et al., Dysregulation of body antioxidant content is related to initiation and progression of Parkinson's disease. **Neurosci Lett.**, 25,736, 135297, 2020.

FETHEROLF, M. et al., Oxygen-dependent activation of Cu,Zn-superoxide dismutase-1. **Metallomics**, 9(8), 1047–1059, 2017.

FINNIE, G.S et al., Characterization of an 'Amyloid Only' Transgenic (B6C3-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/Mmjax) Mouse Model of Alzheimer's Disease, **Journal of Comparative Pathology**, 156(4), 389–399, 2017.

FRANCO, R.; NAVARRO, G.; MARTÍNEZ-PINILLA, E. Lessons on Differential Neuronal-Death-Vulnerability from Familial Cases of Parkinson's and Alzheimer's Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 20(13), 3297, 2019.

- FU, P.; GAO, M.; YUNG, K. K. L. Association of intestinal disorders with Parkinson's disease and Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. **ACS Chemical Neuroscience**, 11(3), 395-405, 2019.
- FUKUSHIMA, T. et al., Serum vitamins and heavy metals in blood and urine, and the correlations among them in Parkinson's disease patients in China. **Neuroepidemiology**. 36(4), 240-244, 2011.
- FUKUSHIMA, T. et al., Heavy metals in blood and urine and its relation to depressive symptoms in Parkinson's disease patients. **Fukushima J Med Sci**. 59(2), 76-80, 2013.
- GAIER E. D; EIPPER B. A; MAINS R.E. Copper signaling in the mammalian nervous system: synaptic effects. **J Neurosci Res**. 91(1), 2-19, 2013.
- GALASKO, D.; MONTINE, T. J. "Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease," **Biomarkers in Medicine**, 4(1), 27–36, 2010.
- GANGANIA, M.K. et al., Role of Iron and Copper in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 32(3), 353–356, 2016.
- GAO, Y. et al., Heme-copper terminal oxidase using both cytochrome c and ubiquinol as electron donors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 109(9), 3275–3280, 2012.
- GARDNER B. et al., Metal concentrations and distributions in the human olfactory bulb in Parkinson's disease. **Sci Rep**. 5;7(1), 10454, 2017.
- GENOUD, S. et al., Subcellular compartmentalisation of copper, iron, manganese, and zinc in the Parkinson's disease brain. **Metallomics**, 9(10), 1447-1455, 2017.
- GHOSH, C.; DEY, S. G. Ligand-Field and Ligand-Binding Analysis of the Active Site of Copper-Bound A β Associated with Alzheimer's Disease. **Inorganic Chemistry**, 52(3), 1318–1327, 2013.
- GIACCONI, R. et al., Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease influence Zinc and Copper homeostasis. **J Trace Elem Med Biol.**, 55, 58-63, 2019.
- GITLER, A. D.; DHILLON, P.; SHORTER, J. Neurodegenerative disease: Models, mechanisms, and a new hope. **DMM Disease Models and Mechanisms**, 10(5), 499–502, 2017.
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R; GARCÍA-BARRERA, T; GÓMEZ-ARIZA, J. L. Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. **Metallomics**. 6(2), 292-300, 2014a.
- GONZÁLEZ-DOMÍNGUEZ, R; GARCÍA-BARRERA, T; GÓMEZ-ARIZA, J. L. Homeostasis of metals in the progression of Alzheimer's disease. **Biometals**. 27(3), 539-549, 2014b.

GONZALEZ-LOPEZ, E; VRANA K. E. Dopamine beta-hydroxylase and its genetic variants in human health and disease. **J. Neurochem.** 152, 157—181, 2020.

GOTO, N. et al., Hydrogen sulfide increases copper-dependent neurotoxicity via intracellular copper accumulation . **Metallomics**, 12(6), 868-875, 2020.

GRAHAM, S. F. et al., Age-Associated Changes of Brain Copper, Iron, and Zinc in Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies. **Journal of Alzheimer's Disease**, 42(4), 2014.

GREIG, J. A et al., A Gene Therapy Approach to Improve Copper Metabolism and Prevent Liver Damage in a Mouse Model of Wilson Disease. **Human Gene Therapy Clinical Development**, 30(1), 29-39, 2019.

GROMADZKA G. et al., Copper Dyshomeostasis in Neurodegenerative Diseases- Therapeutic Implications. **Int J Mol Sci.** 4;21(23), 9259, 2020.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, 30(1), 206–213, 2007.

HAMMER, D. I. et al., Hair trace metal levels and environmental exposure. **Am J Epidemiol.** 93, 84–92, 1971.

HARIRI, R.; SAEEDI, M.; AKBARZADEH, T. Naturally occurring and synthetic peptides: Efficient tyrosinase inhibitors. **Journal of Peptide Science**, 27(7), 2021.

HEMMATI-DINARVAND, M. et al., Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of oxidant-antioxidant systems. **Neuroscience Letters**, 134296, 2019.

HESSE, L, et al., The beta A4 amyloid precursor protein binding to copper. **FEBS Lett.** 349, 109-116, 1994.

HSU, H. W. et al., Copper-Induced Upregulation of MicroRNAs Directs the Suppression of Endothelial LRP1 in Alzheimer's Disease Model. **Toxicol Sci.** 1;170(1), 144-156, 2019.

ILYECHOVA, E. Y. et al., A low blood copper concentration is a co-morbidity burden factor in Parkinson's disease development. **Neurosci Res.** 135, 54-62, 2018.

ILYECHOVA, E. et al., CRISP-R/Cas9 Mediated Deletion of Copper Transport Genes CTR1 and DMT1 in NSCLC Cell Line H1299. Biological and Pharmacological Consequences. **Cells**, 8(4), 322, 1-16, 2019.

IWATA, N. et al., Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. **Nat Med**, 6, 143–50, 2000.

IWATA, N.; HIGUCHI M.; SAIDO T.C. Metabolism of amyloid-beta peptide and Alzheimer's disease. **Pharmacol Ther**, 108, 129–48, 2005.

JAMES, S. A. et al., Elevated labile Cu is associated with oxidative pathology in Alzheimer disease. **Free Radical Biology and Medicine**, 52(2), 298–302, 2012.

JIANG, W.D. et al., Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: protective effects of myo-inositol. **Aquat. Toxicol.** 155, 301-313, 2014.

JOPPE, K. et al., Elemental quantification and analysis of structural abnormalities in neurons from Parkinson's-diseased brains by X-ray fluorescence microscopy and diffraction. **Biomed Opt Express.** 2;11(7), 3423-3443, 2020.

KAPLAN, J. H.; MARYON, E. B. How Mammalian Cells Acquire Copper: An Essential but Potentially Toxic Metal. **Biophysical Journal**, 110(1), 7–13, 2016.

KARPENKO, M. N. et al., Role of Copper Dyshomeostasis in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Bull Exp Biol Med.**, 164(5), 596-600, 2017.

KEHRER, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, 149(1), 43–50, 2000.

KHALFAOUI-HASSANI, B. et al., Widespread Distribution and Functional Specificity of the Copper Importer CcoA: Distinct Cu Uptake Routes for Bacterial Cytochrome c Oxidases. **mBio**, 9(1), 2018.

KIM, B.E; NEVITT, T; THIELE, D. J. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. **Nature Chemical Biology**, 4(3), 176–185, 2008.

KIM S. et al., Enhancement of potency and stability of human extracellular superoxide dismutase. **BMB Rep.**, 48(2), 91-96, 2015.

KIM, M. J. et al., Association of metals with the risk and clinical characteristics of Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, 55, 117-121, 2018.

KITAZAWA, M., CHENG, D., LAFERLA, F.M. Chronic copper exposure exacerbates both amyloid and tau pathology and selectively dysregulates cdk5 in a mouse model of AD. **J. Neurochem.**, 108, 1550-1560, 2009.

KOÇ, E. R. et al., A comparison of hair and serum trace elements in patients with Alzheimer disease and healthy participants. **Turkish journal of medical sciences**, 45, 1034–1039, 2015.

KUMAR, V et al., Relationship of antioxidant and oxidative stress markers in different organs following copper toxicity in a rat model. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 293, 37–43, 2016.

KUMUDINI, N. et al., Association of Parkinson's disease with altered serum levels of lead and transition metals among South Indian subjects. **Indian J Biochem Biophys.**, 51(2), 121-126, 2014.

KWON, H.S, KOH S.H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Transl Neurodegener.**, 26;9(1), 2020.

LEITÃO, E. F. V. et al., Spin-Forbidden Branching in the Mechanism of the Intrinsic Haber-Weiss Reaction. **ChemistryOpen**, 6(3), 360–363, 2017.

LESKOVJAN, A. C. et al., Increased brain iron coincides with early plaque formation in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuroimage**, 1;55(1), 32-38, 2011

LETELIER, M. E. et al., Mechanisms underlying the inhibition of the cytochrome P450 system by copper ions. **Journal of Applied Toxicology**, 29(8), 695–702, 2009.

LI, M. et al., Copper downregulates neprilysin activity through modulation of neprilysin degradation. **J Alzheimers Dis.**, 19, 161-169, 2010.

LI, Y. et al., Copper and iron ions accelerate the prion-like propagation of α -synuclein: A vicious cycle in Parkinson's disease. **International Journal of Biological Macromolecules**, 163, 562-573 2020.

LI, Z. et al., Dopamine beta-hydroxylase and its role in regulating the growth and larval metamorphosis in *Sinonovacula constricta*. **Gene**, 737, 144418, 2020.

LIM, S. L. et al., Chronic copper exposure directs microglia towards degenerative expression signatures in wild-type and J20 mouse model of Alzheimer's disease. **J Trace Elem Med Biol.**, 62, 126578, 2020.

LIMON-PACHECO, J; GONSEBATT, M.E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutat Res.**, 674, 137-147, 2009.

LIN, C. et al., Copper uptake by DMT1: a compensatory mechanism for CTR1 deficiency in human umbilical vein endothelial cells. **Metallomics**, 7(8), 1285–1289, 2015.

LING, H; BHIDAYASIRI, R. Reduced serum caeruloplasmin levels in non-wilsonian movement disorders. **Eur Neurol.**, 66(3),123-127, 2011.

LIU, Y. et al., Metal Ions in Alzheimer's Disease: A Key Role or Not? **Accounts of Chemical Research**, 52(7), 2026–2035, 2019.

LIU, Y. et al., Arsenic (III) and/or copper (II) induces oxidative stress in chicken brain and subsequent effects on mitochondrial homeostasis and autophagy. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 211, 111201, 2020.

LU, J. et al., Trace amounts of copper exacerbate beta amyloid-induced neurotoxicity in the cholesterol-fed mice through TNF-mediated inflammatory pathway. **Brain Behav Immun.**, 23(2), 193-203, 2009.

LU, H.-F. et al., Computational study of the Fenton reaction at different pH ranges. **Physical Chemistry Chemical Physics**, 20, 22890—2290, 2018.

LUNG, S. et al., Low concentrations of copper in drinking water increase AP-1 binding in the brain. **Toxicology and Industrial Health**, 31(12), 1178–1184, 2013.

MA, F. et al., Metallothionein 3 attenuated the apoptosis of neurons in the CA1 region of the hippocampus in the senescence-accelerated mouse/PRONE8 (SAMP8). **Arq Neuropsiquiatr.**, 69(1), 105-111, 2011.

MAO, X. et al., The effects of chronic copper exposure on the amyloid protein metabolism associated genes' expression in chronic cerebral hypoperfused rats. **Neurosci Lett.**, 518(1), 14-18, 2012.

MARIANI, S. et al., Fe and Cu do not differ in Parkinson's disease: A replication study plus meta-analysis. **Neurobiology of Aging**, 34(2), 632–633, 2013.

MARIANI, S. et al., Association between sex, systemic iron variation and probability of Parkinson's disease. **Int J Neurosci.**, 126(4), 354-60, 2015.

MARINHO, V.C.C.; CELESTE R.K. Revisões sistemáticas da literatura e meta-análise. 2013.

MARTELLI, A.; MARTELLI, P. F. Brain Changes and Histopathological Analysis of Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease. **Uniciências**, 18(1), 45-50, 2014.

MARUYAMA, M. et al. Cerebrospinal fluid neprilysin is reduced in prodromal Alzheimer's disease. **Ann Neurol.**, 57, 832-842, 2005.

MATHYS, Z.K.; WHITE, A.R. Copper and Alzheimer's Disease. **Neurotoxicity of Metals**, 199-216, 2017.

MCINTOSH K.G. et al., Evaluation of a prototype point-of-care instrument based on monochromatic x-ray fluorescence spectrometry: potential for monitoring trace element status of subjects with neurodegenerative disease. **J Toxicol Environ Health A.**, 75(21), 1253-1268, 2012.

MISRANI, A.; TABASSUM, S.; YANG, L. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. **Front Aging Neurosci.**, 13, 2021.

MONTES, S. et al., Copper and Copper Proteins in Parkinson's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2014.

MORRIS, M. C. et al., Dietary copper and high saturated and trans fat Intakes associated with cognitive decline. **Arch. Neurol.**, 63, 1085–1088, 2006.

MOYNIER, F. et al., Serum and brain natural copper stable isotopes in a mouse model of Alzheimer's disease. **Sci Rep.**, 9(1), 11894, 2019.

- MOYNIER F. et al., Copper and zinc isotopic excursions in the human brain affected by Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement (Amst)**, 12(1), 2020.
- MUELLER, C. Altered serum iron and copper homeostasis predicts cognitive decline in mild cognitive impairment. **J Alzheimers Dis.**, 29(2), 341-350, 2012.
- MULLIGAN, C.; BRONSTEIN, J. M. Wilson Disease. **Neurologic Clinics**, 2020.
- MULTHAUP, G. et al., The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper(II) to copper(I). **Science**, 271, 1406-1409, 1996.
- NAVARRO, J.A, SCHNEUWLY S. Copper and zinc homeostasis: Lessons from drosophila melanogaster. **Front. Genet.**, 8:223, 2017.
- NOWICKA, A. et al., Ultrafiltrate of blood plasma modulates amyloid- β aggregation. **J Alzheimers Dis.**, 23(1), 1-5, 2011.
- ODDO, S. et al., Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. **Neuron**, 39(3), 409–421, 2003.
- OKITA, Y. et al. Metallothionein, Copper and Alpha-Synuclein in Alpha-synucleinopathies. **Frontiers in Neuroscience**, 11, 1-9, 2017.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Relatório Mundial de Envelhecimento e Saúde. Resumo. Geneva: OMS; 2015.
- OURY T.D et al., Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: A simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. **J. Biochem.**, 317, 51-57, 1996.
- OZCELIK, D; UZUN, H. Copper Intoxication; Antioxidant Defenses and Oxidative Damage in Rat Brain. **Biological Trace Element Research**, 127(1), 45–52, 2008.
- PAGE, M.J. et al., The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **BMJ**, 71, 2021.
- PAGLIA, G. et al., Distinctive Pattern of Serum Elements During the Progression of Alzheimer's Disease. **Scientific Reports**, 6(1), 2016.
- PAIK, S. R. et al., Copper(II)-induced self-oligomerization of α -synuclein. **Biochemical Journal**, 340(3), 821–828, 1999.
- PAL, A.; PRASAD, R. An overview of various mammalian models to study chronic copper intoxication associated Alzheimer's disease like pathology. **BioMetals**, 28(1), 1–9, 2015.
- PALUMBO, A. et al., Effect of metal ions on the rearrangement of dopachrome. **BBA - General Subjects**, 925(2), 203–209, 1987.

PARK, J. H; LEE, D. W; PARK, K. S. Elevated serum copper and ceruloplasmin levels in Alzheimer's disease. **Asia Pac Psychiatry**, 6(1), 38-45, 2014

PARKINSON'S FOUNDATION. Parkinson's Foundation: Better Lives. Together. Disponível em: <http://parkinson.org/Understanding-Parkinsons/Causesand-Statistics/Statistics>, acesso em janeiro 2022.

PATEL, R.; ASCHNER, M. Commonalities between Copper Neurotoxicity and Alzheimer's Disease. **Toxics**, 9(1), 1-11, 2021.

PAULA, V. J. R. DE.; GUIMARÃES, F. M.; FORLENZA, O. V. Papel da proteína Tau na fisiopatologia da demência frontotemporal. **Archives of Clinical Psychiatry**, 36(5), 197–202, 2009.

PERRY J. J et al., The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochim. Biophys. Acta**, 1804, 245–262, 2010.

PFEIFFER, R. F. Wilson's disease. **Seminars in Neurology**, 27(2), 123–132, 2007.

PHAM, A. N.; WAITE, T. D. Cu(II)-catalyzed oxidation of dopamine in aqueous solutions: Mechanism and kinetics. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 137, 74–84, 2014.

PILOZZI, A. et al., A Preliminary Study of Cu Exposure Effects upon Alzheimer's Amyloid Pathology. **Biomolecules**, 10(3), 408, 2020.

PINGALE, T.; GUPTA, G. L. Classic and evolving animal models in Parkinson's disease. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 199, 173060, 2020.

POMILIO, A. B; CIPRIAN-OLLIVIER, J. O; VITALE, A. A. Función e importancia clínica de la enzima lisil-oxidasa. **Acta bioquím. clín. Latinoam.**, 50(4), 753-772, 2016.

PROHASKA, J. R. et al., Peptidylglycine- α -amidating monooxygenase activity and protein are lower in copper-deficient rats and suckling copper-deficient mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 434(1), 212–220, 2005.

PROHASKA, J. R.; BRODERIUS, M. Plasma peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase (PAM) and ceruloplasmin are affected by age and copper status in rats and mice. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, 143(3), 360–366, 2006.

PU, Z. et al., Oxidative stress markers and metal ions are correlated with cognitive function in Alzheimer's disease. **Am J Alzheimers Dis Other Demen.**, 32(6), 353-359, 2017.

PULKIT R; NEERA K. Neuroimaging findings in Menkes disease: a rare neurodegenerative disorder. **BMJ Case Reports**, 2018.

RAHMAN M. K. et al., Dopamine- β -Hydroxylase Activity and Levels of Its Cofactors and Other Biochemical Parameters in the Serum of Arsenicosis Patients of Bangladesh. **Int J Biomed Sci.**, 10(1), 52–60, 2014.

RAMSDEN, C. A.; RILEY, P. A. Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 22(8), 2388–2395, 2014.

REMBACH, A. et al., Longitudinal Analysis of Serum Copper and Ceruloplasmin in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, 34(1), 171–182, 2013a.

REMBACH, A. et al., Decreased copper in Alzheimer's disease brain is predominantly in the soluble extractable fraction. **Int J Alzheimers Dis.**, 2013b.

RIVERA-MANCÍA, S. et al. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. **Chemico-Biological Interactions**, 186(2), 184–199, 2010.

ROBERTS, B. R. et al., The role of metallobiology and amyloid- β peptides in Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, 120, 149–166, 2012.

ROJAS, P. et al., Copper reduction is related to impairment of cytochrome c oxidase activity in striatum in an animal model of parkinson's disease. **Current Topics in Nutraceutical Research**, 10(2), 87-94, 2012.

ROTHER E.T, Systematic literature review X narrative review. **Acta Paul. Enferm.**, 20(2), 2007.

ROUDEAU S. et al., Reduced net charge and heterogeneity of pi isoforms in familial amyotrophic lateral sclerosis mutants of copper/zinc superoxide dismutase. **Electrophoresis**, 36, 2482–2488, 2015.

ROZZINI, L. et al., Serum Non-Ceruloplasmin Non-Albumin Copper Elevation in Mild Cognitive Impairment and Dementia due to Alzheimer's Disease: A Case Control Study. **Journal of Alzheimer's Disease**, 61(3), 907-912, 2018.

SAITO, K. I. et al., Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 90(7), 2628–2632, 1993.

SAMIA, et al., Serum copper, zinc and selenium levels in Tunisian patients with Parkinson's disease. **Tunis Med.**, 91(6), 402-405, 2013.

SANTOS F.G. et al., Parkinson's Disease: Epidemiological pattern of hospital admission. Research, **Society and Development**, 11(1), 2022.

- SANYAL, J. et al., PARK2 and PARK7 Gene Polymorphisms as Risk Factors Associated with Serum Element Concentrations and Clinical Symptoms of Parkinson's Disease. **Cell Mol Neurobiol.**, 40(3), 357-367., 2019.
- SASAKI N. et al., Advanced glycation end products in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. **Am J Pathol.**, 153(4), 1149-1155, 1998.
- SCHEIBER, I. F.; SCHMIDT, M. M.; DRINGEN, R. Copper export from cultured astrocytes. **Neurochemistry International**, 60(3), 292–300, 2012.
- SCHEIBER, I. F.; DRINGEN, R. Astrocyte functions in the copper homeostasis of the brain. **Neurochemistry International**, 62(5), 556–565, 2013.
- SCHIRINZI T. et al., Outlining a Population "at Risk" of Parkinson's Disease: Evidence from a Case-Control Study. **Parkinsons Dis.**, 2016.
- SCHOLEFIELD M. et al., Widespread Decreases in Cerebral Copper Are Common to Parkinson's Disease Dementia and Alzheimer's Disease Dementia. **Front Aging Neurosci.**, 2020.
- SCHRAG M. et al., Effect of cerebral amyloid angiopathy on brain iron, copper, and zinc in Alzheimer's disease. **J Alzheimers Dis.**, 24(1), 137-149, 2011.
- SCHREURS, B. G.; SMITH-BELL, C. A.; LEMIEUX, S. K. Dietary cholesterol increases ventricular volume and narrows cerebrovascular diameter in a rabbit model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, 254, 61–69, 2013.
- SCHWARZ, G.; A.A, B. Cobalt in human health and disease. **Metal ions in life sciences**, 13, 295–320, 2013.
- SEO, G. H et al., Biochemical and molecular characterisation of neurological Wilson disease. **Journal of Medical Genetics**, 55(9), 587–593, 2018.
- SERPA, R. F. B. et al., Topographic trace-elemental analysis in the brain of wistar rats by X-ray microfluorescence with synchrotron radiation. **Analytical Sciences**, 24(7), 839–842, 2008.
- SHERE, S. et al., Lower levels of serum copper in patients with Alzheimer's dementia: A controlled study from India. **Asian J Psychiatr.**, 32, 73-74, 2018.
- SHI, J. et al., Mutation screening and association study of the neprilysin gene in sporadic Alzheimer's disease in Chinese persons. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci.**, 60, 301-306, 2005.
- SHIROTANI, K. et al., Neprilysin degrades both amyloid beta peptides 1-40 and 1-42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. **J Biol Chem.**, 276, 21895-21901, 2001.

SIEGEL, R.C, et al., Collagen cross-linking: lysyl oxidase dependent synthesis of pyridinoline *in vitro*: confirmation that pyridinoline is derived from collagen. **Biochem Biophys Res Commun.**, 108(4), 1546-1550, 1982.

SIMUNKOVA, M. et al., Management of oxidative stress and other pathologies in Alzheimer's disease. **Archives of Toxicology**, 2019.

SINGH, I. et al., Low levels of copper disrupt brain amyloid- β homeostasis by altering its production and clearance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110(36),14771-14776, 2013.

SINGH, N. K. et al., Polymorphism in Cytochrome P450 2D6, Glutathione S-Transferases Pi 1 Genes, and Organochlorine Pesticides in Alzheimer Disease. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, 27(2), 119–127, 2014.

SKOPP, A. et al., Copper–zinc superoxide dismutase (Sod1) activation terminates interaction between its copper chaperone (Ccs) and the cytosolic metal-binding domain of the copper importer Ctr1. **BioMetals**, 32(4), 695–705, 2019.

SMEYNE, M; SMEYNE R. J. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med.** 62, 13-25, 2013.

SMOLINSKI, L. et al., Brain volume is related to neurological impairment and to copper overload in Wilson's disease. **Neurological Sciences**, 40(10), 2089–2095, 2019.

SONG, M.O. et al., The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of copper-responsive transcription. **Exp. Cell Res.**, 322, 39-50, 2014.

SOUZA, C. F. M. et al., Parkinson's disease and the Process of Aging Motor: Literature Review. **Rev Neurocienc.**, 19(4), 718-723, 2011.

SPARKS, D. L; SCHREURS, B. G. Trace amounts of copper in water induce beta-amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. **Proc. Natl. Acad.**, 100, 11065–11069, 2003.

SPENCER, W. A. et al., Oxidatively generated DNA damage after Cu(II) catalysis of dopamine and related catecholamine neurotransmitters and neurotoxins: Role of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, 50(1), 139–147, 2011.

SQUITTI, R. et al., ATP7B variants as modulators of copper dyshomeostasis in Alzheimer's disease. **Neuromolecular Med.**, 15(3), 515-522, 2013.

SQUITTI, R, et al., Measurements of serum non-ceruloplasmin copper by a direct fluorescent method specific to Cu(II). **Clin Chem Lab Med.**, 55(9), 1360-1367, 2017.

SQUITTI, R. et al., Copper Imbalance in Alzheimer's Disease and Its Link with the Amyloid Hypothesis: Towards a Combined Clinical, Chemical, and Genetic Etiology. **Journal of Alzheimer's Disease**, 83(1), 23–41, 2021.

STORCK, S. E. et al., Endothelial LRP1 transports amyloid- β (1-42) across the blood-brain barrier. **J Clin Invest.**, 126(1), 123-136, 2016.

SUBRAMANIAM, S. R; CHESSELET M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.**, 17-32, 2013.

SUZUKI, K.T.; KARASAWA, A.; AND YAMANAKA, K. Binding of copper to albumin and participation of cysteine in vivo and in vitro. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 273, 572-577, 1989.

SZABO S. T. et al., Comparison of Metal Levels between Postmortem Brain and Ventricular Fluid in Alzheimer's Disease and Nondemented Elderly Controls. **Toxicol Sci.**, 150(2), 292-300, 2016.

TALWAR, P. et al., Multifactorial Analysis of a Biomarker Pool for Alzheimer Disease Risk in a North Indian Population. **Dement Geriatr Cogn Disord.**, 44(1-2), 25-34, 2017.

TAN, X. et al., A multifunctional bis(-)-nor-meptazinol-oxalamide hybrid with metal-chelating property ameliorates Cu(II)-induced spatial learning and memory deficits via preventing neuroinflammation and oxido-nitrosative stress in mice. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 52, 199–208, 2019.

TANG, Z. et al., Chemodynamic Therapy: Tumour Microenvironment-Mediated Fenton and Fenton-like Reaction. **Angewandte Chemie International Edition**, 2018.

TAPIERO H.; TOWNSEND D.M.; TEW K.D. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. **Biomed Pharmacother**, 57(9), 386-398, 2003.

TIFFANY-CASTIGLIONI, E.; HONG, S.; QIAN, Y. Copper handling by astrocytes: Insights into neurodegenerative diseases. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 29(8), 811–818, 2011.

TIWARI, M. K. et al., Copper ion / H₂O₂ oxidation of Cu/Zn-Superoxide dismutase: Implications for enzymatic activity and antioxidant action. **Redox Biology**, 26, 101262, 2019.

TÖNNIES E; TRUSHINA E. Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease. **J Alzheimers Dis.**, 57(4), 1105-1121, 2017.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Ageing Cell**, 2019.

TROCELLO, J.M, et al., Anomalies du métabolisme du cuivre chez l'adulte. **La Revue de Médecine Interne**, 31(11), 750-756, 2010.

URIU-ADAMS, J. Y.; KEEN, C. L. Copper, oxidative stress, and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, 26(4- 5), 268–298, 2005.

- UVERSKY, V. N.; LI, J.; FINK, A. L. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human α -synuclein: A possible molecular link between parkinson's disease and heavy metal exposure. **Journal of Biological Chemistry**, 276(47), 44284–44296, 2001.
- VACCARI, A. et al., Disulfiram and diethyldithiocarbamate intoxication affects the storage and release of striatal dopamine. **Toxicol Appl Pharmacol.**, 139, 102–108, 1996.
- VAIRO F. P. et al., A systematic review and evidence-based guideline for diagnosis and treatment of Menkes disease. **Molecular Genetics and Metabolism**, 2018.
- VAZ, P. D et al., Lewy Bodies Disease: a case report. **Rev. Equilíbrio Corporal e Saúde**, 2(1), 60-75, 2010.
- VAZ, F. N.C. et al., The Relationship Between Copper, Iron, and Selenium Levels and Alzheimer Disease. **Biol Trace Elem Res**, 181(2), 185-191, 2017.
- VERWILST, P.; SUNWOO, K.; KIM, J. S. The role of copper ions in pathophysiology and fluorescent sensors for the detection thereof. **Chemical Communications**, 51(26), 5556–5571, 2015.
- WANG, L.M. et al., Bioimaging of copper alterations in the aging mouse brain by autoradiography, laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and immunohistochemistry. **Metallomics**, 2, 348–353, 2010.
- WANG, X. et al., Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, 1842(8), 1240–1247, 2014.
- WANG, Y. et al., Excessive $\text{Cu}^{(2+)}$ deteriorates arsenite-induced apoptosis in chicken brain and resulting in immunosuppression, not in homeostasis. **Chemosphere**, 239, 124758, 2020b.
- WEE, N.K.Y et al., The mammalian copper transporters CTR1 and CTR2 and their roles in development and disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 45(5), 960–963, 2013.
- WILLKOMMEN, D. et al., Species fractionation in a case-control study concerning Parkinson's disease: Cu-amino acids discriminate CSF of PD from controls. **J Trace Elem Med Biol.**, 49, 164-170, 2018.
- WITT, B.; SCHAUMLÖFFEL, D.; SCHWERDTLE, T. Subcellular Localization of Copper—Cellular Bioimaging with Focus on Neurological Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, 21(7), 2341. 2020.
- XU J. et al., Elevation of brain glucose and polyol-pathway intermediates with accompanying brain-copper deficiency in patients with Alzheimer's disease: metabolic basis for dementia. **Sci Rep.**, 6:27524, 2016.

- XU, J. et al., Unwin RD, Cooper GJS. Evidence for widespread, severe brain copper deficiency in Alzheimer's dementia. **Metallomics**, 9(8), 1106-1119, 2017.
- XU, J. et al., Plasma metals as potential biomarkers in dementia: a case-control study in patients with sporadic Alzheimer's disease. **BioMetals**, 31(2), 267-276, 2018.
- YAN, M. H; WANG, X; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radic Biol Med.**, 62, 90-101, 2013.
- YANO, K. et al., 500 Aggregations of amyloid beta-proteins in the presence of metal ions. **Toxicology Letters**, 2003.
- YAO, D. et al., Amyloidogenesis induced by diet cholesterol and copper in a model mouse for Alzheimer's disease and protection effects of zinc and fluvastatin. **Brain Res Bull.**, 143, 1-8, 2018.
- YASOJIMA, K. et al., Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer brain: a possible relationship to deficient degradation of beta-amyloid peptide. **Neurosci Lett.**, 297, 97-100, 2001.
- YOUNES-MHENNI, S. et al., Serum copper, zinc and selenium levels in Tunisian patients with Parkinson's disease. **Tunis Med.**, 91(6), 402-405, 2013.
- YU, F. et al., Cu(II) enhances the effect of Alzheimer's amyloid- β peptide on microglial activation. **Journal of Neuroinflammation**, 12(1), 1-11, 2015.
- YU, J. et al., Identification of the key molecules involved in chronic copper exposure-aggravated memory impairment in transgenic mice of Alzheimer's disease using proteomic analysis. **J Alzheimers Dis.**, 44(2), 455-469, 2015.
- YU, H. et al., Proteomic alterations of brain subcellular organelles caused by low-dose copper exposure: implication for Alzheimer's disease. **Archives of Toxicology**, 92(4), 1363-1382, 2018.
- ZHAO, H.-W. et al., Assessing Plasma Levels of Selenium, Copper, Iron and Zinc in Patients of Parkinson's Disease. **PLoS ONE**, 8(12), 2013.
- ZHOU, G. et al., Association between serum copper status and working memory in schoolchildren. **Nutrients**, 7(9), 7185-7196, 2015.
- ZISCHKA, H.; EINER, C. Mitochondrial copper homeostasis and its derailment in Wilson disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 102, 71-75, 2018.

ANEXO A – Escala Newcastle-Ottawa para estudos em humanos

<p style="text-align: center;">Seleção</p>	<p>1) A definição de caso é adequada? *a) sim, com validação independente b) sim, por registro ou com base em auto-relatos c) sem descrição</p> <p>2) Representatividade dos casos *a) série consecutiva ou obviamente representativa de casos. b) potencial para vieses de seleção ou não declarado.</p> <p>3) Seleção de controles *a) controles da comunidade. b) controles hospitalares. c) sem descrição.</p> <p>4) Definição de controles *a) sem história de doença (desfecho) b) nenhuma descrição da fonte.</p>
<p style="text-align: center;">Comparabilidade</p>	<p>1) Comparabilidade de casos e controles com base no projeto ou análise *a) controles de estudo para _____ (Selecione o fator mais importante (neste estudo foi considerado a idade) *b) estudar controles para qualquer fator adicional (Este critério pode ser modificado para indicar controle específico para um segundo fator importante – neste estudo foi considerado o sexo)</p>
<p style="text-align: center;">Exposição</p>	<p>1) Verificação da exposição *a) registro seguro (registros médicos detalhados, com histórico clínico). *b) entrevista estruturada e cega para a definição de caso / controle. c) entrevista não estruturada e não cega para a definição de caso / controle. d) auto-relato ou registros médicos pouco detalhados. e) sem descrição</p> <p>2) Mesmo método de apuração para casos e controles *a) sim</p>

	<p>b) não</p> <p>3) Taxa de não resposta</p> <p>*a) mesma taxa para ambos os grupos</p> <p>b) taxa diferente, com a descrição dos não respondentes</p> <p>c) taxa diferente e sem descrição dos não respondentes</p>
--	--

* Refere-se às respostas que ganham pontuação.

ANEXO B – Tabela *Nature Reporting Checklist* para os estudos em modelos animais

<p>1 - Para estudos <i>in vivo</i>: figuras e representação estatística de dados: para cada figura (ou tabela), descrição na legenda ou relatado no texto</p>	<p>A) A legenda ou o texto principal relatam o tamanho exato da amostra (n) para cada grupo/condição experimental, dado como um número exato, não um intervalo? B) Há uma descrição da quantidade de amostras permitindo ao leitor entender se as amostras representam réplicas biológicas ou das técnicas (incluindo quantos animais, ninhadas, culturas, etc)? C) Há uma declaração de quantas vezes cada um dos experimentos foi replicado no laboratório? D) Se um teste estatístico não comum foi usado, é feita a descrição do por que na seção de métodos? (Obs: os testes comuns incluem testes t, teste do qui-quadrado, Wilcoxon e Mann-Whitney, e ANOVA) E) Quando apropriado, o teste é relatado como unilateral ou bilateral? F) Existem ajustes para múltiplas comparações? G) Os resultados dos testes estatísticos são apresentados? H) Definem se usaram os dados médios dos gráficos (ou tabelas) como mediana ou média? I) A barra de erros nos gráficos ou tabelas é definida como desvio padrão ou erro padrão da média ou ainda intervalos de confiança? J) Os autores mostram que os dados atendem às premissas dos testes estatísticos usados? K) Existe uma estimativa de variação dentro de cada grupo experimental de dados (por exemplo, grupo Controle vs Intervenção)? L) A variância é semelhante (diferença menor que duas vezes) entre os grupos que estão sendo comparados estatisticamente?</p>
<p>2. Tamanho da amostra</p>	<p>A) O manuscrito descreve como o tamanho da amostra (número de animais por grupo) foi determinado? B) O manuscrito inclui uma declaração sobre a estimativa do tamanho da amostra, no caso onde métodos não estatísticos foram usados?</p>
<p>3. Para estudos <i>in vivo</i>: Exclusões</p>	<p>A) O manuscrito descreve se amostras ou animais foram excluídos da análise? B) Os critérios de inclusão e exclusão de animais/amostras estão definidos?</p>

	C) Está claro que esses critérios foram pré-estabelecidos?
4. Para estudos <i>in vivo</i> : Randomização	A) O manuscrito descreve qual método de randomização foi usado para determinar como as amostras/animais foram alocados nos grupos experimentais? B) O manuscrito inclui uma declaração sobre randomização, mesmo que a randomização não foi usada?
5. Para estudos <i>in vivo</i> : Cegamento	A) O manuscrito descreve se o investigador estava “cego” para alocação dos grupos durante o experimento e/ou na hora de avaliar o resultado? B) O manuscrito inclui uma declaração sobre não ter feito o cegamento, caso este não tenha sido feito?
6. Para estudos <i>in vivo</i> : Reagentes	A) Foi citada informações sobre os anticorpos usados no manuscrito, como número de catálogo, número do clone ou perfil de validação?
7. Para estudos <i>in vivo</i> com animais não- humanos	A) O estudo relata a espécie usada? B) O estudo relata a linhagem usada (ratos Wistar, camundongos Swiss, etc)? C) O estudo relata o sexo dos animais (e quantos indivíduos de cada sexo por grupo)? D) O estudo relata a idade ou peso dos animais (números exatos, não intervalos)? E) O estudo inclui uma declaração de conformidade com os regulamentos éticos? F) O estudo inclui o(s) comitê(s) que aprovou os experimentos?