JAKELINY VIEIRA WARDE

**Cuprúria em pais de pacientes com doença de Wilson
antes e depois da administração oral de
d-penicilamina**

Dissertação apresentada à faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências

Área de concentração: Gastroenterologia clínica
Orientador: Eduardo Luiz Rachid Cançado

SÃO PAULO

2007

Pela fé, entendemos que foi o universo formado pela palavra de Deus, de maneira que o visível veio a existir das coisas que não aparecem.

(autoria desconhecida - destinada aos Hebreus)

Dedico a Jesus Cristo,
meus pais e
ao meu esposo

O presente volume trouxe-me um período de aprendizado extremamente gratificante que inclui o meu amadurecimento como clínica, adequação da linguagem científica e didática e aprimoramento dos meus conhecimentos. Como também realizações pessoais e no trabalho. Muitas foram as pessoas importantes nesse processo, e a cada um delas dedico a minha mais sincera e cordial gratidão.

Obrigada:

-aos **pais** participantes, sempre tão colaborativos, pela confiança que têm depositado em nosso trabalho.

-ao **Prof. Dr. Eduardo Luis Rachid Cançado**, meu orientador, um exemplo de dedicação integral à vida universitária como clínico e pesquisador talentoso. Por ter reunido a casuística de portadores de doença de Wilson nas últimas duas décadas; por tudo que tem me ensinado no dia-a-dia, por ser meu crítico, pelo apoio e dedicação que me assiste;

-ao **Prof. Pedro Vitoriano de Oliveira**, bioquímico da faculdade de química da Universidade de São Paulo. Como responsável pela parte principal que é a realização das dosagens de cuprúria e lutou por mim incessantemente e no qual sou imensamente grata;

-ao **Prof. Flair José Carrilho**, professor titular da disciplina de gastroenterologista, incentivou-me a crescer;

-ao **Prof. Dr. Egberto Reis Barbosa**, pela importante contribuição ao estudo da doença de Wilson pela disciplina de neurologia, pelo incentivo ao demonstrar tanta alegria ao vivenciar estudos com a doença;

-ao **Dr. Nairo Massakasu Sumita**, diretor técnico do serviço de saúde que me acolheu cedendo um local para extração de alíquotas de material biológico;

à **Profa. Yara Justino**, bioestatística que realizou os cálculos para análise dos dados da dissertação;

-à **Profa. Rejane Mattar**, pela amizade e incentivo à pesquisa;

-ao **Prof. Dr. Luiz Caetano da Silva**, mestre da hepatologia de todos nós, porque soube criar em torno de si ambiente fértil à pesquisa;

-à **Dra. Marta Mitiko Deguti** pela amizade, por ter me acolhido nas dificuldades, pela leitura minuciosa, crítica das versões que antecedem o presente volume, com a minha admiração pela sua inteligência, dedicação à pesquisa e caráter íntegro;

-a **enfermeira Sylvia Ferreira Assumpção**, que me auxiliou na obtenção de materiais para coleta de materiais biológicos;

-aos **funcionários do ambulatório do ambulatório de gastroenterologia**,
que me auxiliou na marcação de exames nos dias que eram necessários;

-aos **funcionários do laboratório do HC-lab**, pela paciência e apoio;

-à **Dra Wanda Maria Caly** pela amizade, carinho e incentivo que me
dispensou durante a elaboração deste trabalho;

-à **Sra. Fabiana Bispo**, secretária da pós-graduação, que colaborou para
que cumpríssemos as normas e prazos de modo inequívoco;

-aos **colegas e amigos pós-graduando** que estão vivenciando suas
experiências na área acadêmica.

ao **Dr. Karim Repsold Jorge Warde**, meu esposo que me ajudou na
elaboração das redações em inglês, na correção da gramática, pelo apoio
incondicional, pela cumplicidade e pelo esposo maravilhoso e dedicado que
lhe dou meu muito obrigada!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1 Introdução.....	01
1.1 Conceito.....	01
1.2 Metabolismo do cobre.....	01
1.3 Proteína ATP7B.....	04
1.4 Genética.....	08
1.5 Manifestações clínicas.....	09
1.6 Métodos diagnósticos.....	12
1.7 Cuprúria.....	15
1.8 Abordagem diagnóstica prática.....	17
1.9 Justificativa do estudo.....	18
1.10 Objetivo.....	18
3 Método.....	19
2.1 Critérios de seleção.....	19
2.2 Critérios de inclusão.....	20
2.3 Critérios de exclusão.....	20
2.4 Metodologia.....	20
2.4.1 Obtenção dos dados epidemiológicos e clínicos.....	20
2.4.2 Obtenção de dados laboratoriais.....	20
2.4.2.1 Dosagens bioquímicas gerais.....	20
2.4.2.2 Cuprúria.....	21
2.4.2.2.1 Equipamento.....	22
2.4.2.2.2 Noções de espectrometria de absorção atômica.....	22
2.4.2.2.3 Cuidados com a contaminação dos materiais.....	25
2.4.2.2.4 Amostras, reagentes e soluções.....	26

2.4.2.2.5	Preparação das amostra para análise do cobre.....	26
2.5	Aspectos éticos.....	28
2.6	Análise estatística.....	28
3	Resultados.....	30
3.1	Aspectos epidemiológicos e clínicos.....	30
3.2	Aspectos laboratoriais.....	30
3.2.1	Dosagens bioquímicas gerais.....	30
3.2.2	Cuprúria.....	35
4	Discussão	43
5	Conclusões.....	51
6	Anexos.....	52
C	Termo de consentimento livre esclarecido.....	54
D	Orientações para coleta de urina de 24h.....	59
E	Orientações para coleta de 24h após o teste de DPA.....	60
F	Aprovação do projeto pela Comissão de Ética do HC-FMUSP.....	61
7	Referências.....	70

Apêndice: Glossário dos termos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

HCL	das iniciais em inglês de <i>Hollow cathode lamp</i>
ETAAS	das iniciais em inglês de <i>Eletrothermal Atomic Absorption spectrometry</i>
FAAS	das iniciais em inglês de <i>Flame Atomic Absorption spectrometry</i>
µg	microgramas
I	intensidade de luz final
I ₀	intensidade de luz inicial
Cu	cobre
µg/24h	micro gramas por 24 horas
µg/L	micro gramas por litro
µL	microlitros
log	logaritmo
ml	mililitros
UI	unidades
UI/L	unidades por litro
v/v	limites de concentração aplicáveis às preparações espessos em percentagem volumétrica
%	porcentagem

LISTA DE TABELAS

1	Programa de temperatura para determinação do cobre em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica.....	27
2	Alterações das enzimas hepáticas dos pais de pacientes com DW, em número de vezes o valor máximo da normalidade.....	31
3	Valores de tendência central e de dispersão das enzimas hepáticas, ceruloplasmina e cobre sérico (n=50).....	32
4	Valores da média e mediana referente à ceruloplasmina e ao cobre sérico no sexo masculino e feminino.....	34
5	Valores de tendência central e de dispersão para a cuprúria de 24 horas antes e depois de 1,0g de DPA em pais (sexo masculino) de pacientes com DW.....	37
6	Valores de tendência central e de dispersão para a cuprúria de 24 horas antes e depois de 1,0g de DPA em mães de pacientes com DW.....	37
7	Correlação dos níveis de cobre e ceruloplasmina com a cuprúria antes DPA.....	38
8	Valores de delta percentual para cuprúria antes e após DPA	39
9	(Anexo A) Dados clínicos, história familiar e bioquímicos dos casos dos portadores de DW.....	52
10	(Anexo B) Mutação dos pacientes de DW e seus respectivos pais.....	53
11	(Anexo G) Dados demográficos e epidemiológicos dos pais (masculino) de pacientes com DW.....	62

12	(Anexo H) Dados demográficos e epidemiológicos dos pais (masculino) e pacientes com DW.....	63
13	(Anexo I) Dados demográficos e epidemiológicos das mães pais de pacientes com DW.....	64
14	(Anexo J) Dados demográficos e epidemiológicos dos pais de pacientes com DW.....	65
15	(Anexo L) Parâmetros bioquímicos séricos dos pais (sexo masculino) de pacientes com DW.....	66
16	(Anexo M) Parâmetros bioquímicos séricos das mães de pacientes com DW.....	67
17	(Anexo N) Cuprúria dos pais (sexo masculino) de portadores para DW para o antes e depois da administração de DPA Orientações para coleta de urina de 24h.....	68
18	(Anexo O) Cuprúria das mães portadores para DW para o sexo feminino antes e depois da administração de DPA.....	69

LISTA DE FIGURAS

1	Representação da principal via do metabolismo do cobre no interior de um hepatócito.....	04
2	Representação esquemática da proteína de DW (ATP7B).....	06
3	Representação esquemática do movimento da proteína de DW (ATP7B) no citoplasma do hepatócito.....	07
4	Representação esquemática da diferença entre a intensidade de luz inicial e final.....	23
5	Representação esquemática do funcionamento do atomizador atômico.....	25
6	Distribuição dos níveis séricos médios de alanina e aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e gama glutamil transpeptidase (UI/L) em pais de portadores de DW, segundo o sexo (n=50).....	33
7	Distribuição dos níveis médios de ceruloplasmina sérica (mg%) em pais de portadores de DW, segundo o sexo (n=50).....	33
8	Distribuição dos níveis médios de cobre sérico (μg%) em pais de portadores de DW, segundo o sexo (n=50).....	34
9	Distribuição da cuprúria basal (μg/volume urinário de 24 horas) em pais de portadores de DW, segundo o sexo (n=50).....	36
10	Distribuição da cuprúria pós DPA (μg/volume urinário de 24h).....	36
11	Cuprúria basal em pais (sexo masculino).....	39
12	Cuprúria basal em mães.....	40
13	Cuprúria após DPA dos pais (sexo masculino).....	41
14	Cuprúria após DPA em mães.....	42

RESUMO

Warde-Vieira J. Cuprúria de pais de portadores de doença de Wilson antes e depois da administração oral de d-penicilamina [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2007. 84 p.

A doença de Wilson (DW) é distúrbio da excreção biliar de cobre, de herança autossômica recessiva, devido a mutações no gene *ATP7B*. O cobre que não se liga à apoceruloplasmina circula no organismo ligado a aminoácidos, deposita-se principalmente no fígado e no cérebro e é excretado pelos rins. A cuprúria maior que 100µg/24h pode auxiliar no diagnóstico, embora cerca 20% dos pacientes com DW apresentem níveis anormais de cuprúria basal. A administração da d-penicilamina (DPA) pode promover, em crianças, valores maiores que 1.600µg/24h. A fim de se conhecer os níveis de cuprúria de possíveis indivíduos heterozigotos adultos, foram avaliados 25 pais e 25 mães de pacientes (média 61 anos em homens; 57 anos em mulheres) com diagnóstico de DW. Foram obtidos os níveis séricos de enzimas hepáticas, cobre e ceruloplasmina, e quantificada a cuprúria de 24h. A seguir, os indivíduos receberam DPA 1,0g por via oral dividido em duas tomadas, durante nova coleta de urina para dosagem de cuprúria de 24h. Esta análise foi realizada pelo método de espectrometria de absorção atômica eletrotérmica. Os níveis de enzimas hepáticas foram semelhantes nos dois grupos, exceto o nível médio de fosfatase alcalina que foi maior nas mulheres (H= 68,72 UI/L; M=81,68 UI/L). Os níveis de ceruloplasmina (H=21,72mg/dL; M=27,78mg/dL) e de cobre sérico (H=71,38 µg/dl; M=88,0 µg/dl) foram maiores em mulheres do que em homens ($p<0,001$). Os níveis

de cuprúria basal foram 22,43µg/24h (média) e 21,40µg/24h (mediana); e, após a DPA, de 523,54 µg/24h (média) e 511,5 µg/24h (mediana). A cuprúria média basal masculina foi de 26,19. µg/24h, enquanto a feminina foi de 18,28. µg/24h (p=0,005). Com o presente estudo, ficou definida possível faixa de variação da cuprúria antes e depois da administração de D-penicilamina em pais de portadores com doença de Wilson; que os pais apresentaram cupremia e níveis de ceruloplasmina menores e cuprúria basal maior do que as mães; que as faixas de variação de normalidade para os parâmetros ceruloplasmina, cobre sérico e urinário deveriam ser diferenciadas de acordo com o sexo.

Descritores: 1. COBRE/urina 2. PENICILAMINA/urina 3.QUELANTES 4. DEGENERAÇÃO HEPATOLENTICULAR 5.CERULOPLASMINA.

SUMMARY

Warde-Vieira J. Cupriuresis in parents of patients with Wilson disease before and after oral intake of d-penicillamine [disertation]. University of Sao Paulo School of Medicine (Brazil); 2007. 84 p.

Wilson disease is a biliary copper excretion disturbance, of recessive autosomic heritage, due to *ATP7B* gene mutations. The copper not bound to apoceruloplasmin circulates in the organism bound to amino acids and accumulates mainly in the liver and brain being excreted by the kidneys. Urinary copper higher than 100µg/24h can be useful in the diagnosis, but only about 20% of Wilson disease patients have abnormal basal levels. In this case, d-penicillamine (DPA) administration can lead, in children, to levels higher than 1.600µg/24h. Twenty five fathers and twenty five mothers of wilson disease patients (mean 61 years for male, and 57 years for female) were assessed in order to obtain urinary copper levels of probable heterozygote adults. Fasting liver enzymes, copper and ceruloplasmin serum levels were obtained along with 24h urinary copper excretion. After, patients got DPA 1.0g by oral route, twice a day, while collecting urine for 24h urinary copper excretion dosage. These analyses were performed by elethrotermic atomic absortion spectrometry method. Liver enzyme levels were similar in men and women but those of alkaline phosphatase were higher in women (M= 68.72 UI/L; F=81.68 UI/L). Serum ceruloplasmin (F=21.72mg/dl; F=27.78mg/dl) and copper (M=71.38 µg/dl; F=88.0 µg/dl) levels were higher in women than in men (p<0.001). Urinary copper levels before DPA were,

43µg/24h (mean) and 21.40 µg/24h (median); and, after DPA, 523.54 µg/24h (mean) and 511.5 µg/24h (median). Basal urinary copper levels in men were 26.9 µg/24h, and in women were 18.67 µg/24h ($p=0.005$). With the results of this study, we defined a possible range for urinary copper before and after oral intake of DPA in parents of Wilson disease patients. Furthermore, fathers had lower levels of serum copper and of ceruloplasmin, and greater levels of baseline cupriuresis than mothers; and finally the normal range for serum copper and ceruloplasmin, and urinary copper should be differentiated according to the gender.

Descriptors: 1. COPPER/urine; 2. PENICILLAMINE/urine; 3. CHELATING AGENTS; 4. HEPTOLENTICULAR DEGENERATION; 5. CERULOPLASMIN.

ENERATION; 5. CERULOPLASMIN.

1. Introdução

1.1 Conceito

A degeneração hepatolenticular, doença de Wilson (DW), é uma doença autossômica recessiva com distúrbio na excreção biliar do cobre que se acumula primeiramente no fígado e posteriormente no cérebro, córneas, rins. Em 1912, o neurologista Samuel Alexander Kinnier Wilson descreveu sete pacientes com doença familiar e degeneração progressiva do núcleo lenticular e cirrose hepática em autópsia (Wilson, 1912). Em 1948, Cumings demonstrou a presença de aumento de cobre no fígado e cérebro de pacientes. No início do século XX, Kayser (1902) e Fleischer (1903) descreveram coloração esverdeada na região límbica da córnea causada pela deposição de cobre na membrana de Descemet (apud Zucler, 1996). Bearn, em 1953, observou caráter autossômico recessivo da doença em análise genética de 30 famílias.

1.2 Metabolismo do cobre

O cobre é metal essencial no funcionamento de várias reações enzimáticas que envolvem a lisil oxidase (tecido conectivo), a superóxido dismutase (eliminadora de radicais livres), a tirosinase (produção de pigmentos), a monoaminoxidase (neurotransmissão), e o citocromo-c oxidase (transferência de elétrons na mitocôndria) que também está envolvido na homeostase do ferro (Linder *et al.*, 1996; Shim *et al.*, 2003). O cobre é absorvido no estômago e no duodeno e a quantidade total ingerida

varia de 1,5 a 5mg por dia.

Seu excesso induz a produção nos enterócitos de metalotioneínas, que pertencem a grupo de proteínas intracelulares ricas em cisteínas capazes de se ligar a íons de metal (Cousins, 1985).

O armazenamento do cobre nas metalotioneínas constitui dispositivo de segurança em casos de ingestão elevada. Observa-se que, em curto período de tempo, ocorre transporte do cobre do enterócito pela proteína ATP7A para o sistema porta e posteriormente ele é transportado, em complexo com a albumina, para o fígado. O cobre também se liga a aminoácidos, como a histidina que o libera para outros tecidos. Uma pequena parcela é excretada e reabsorvida pelos rins. Após o clareamento hepático, ele retorna à circulação ligado a holoceruloplasmina, uma ferroxidase produzida e excretada pelo fígado, que carrega seis átomos de cobre. Cerca de 95% do cobre plasmático circula ligado à ceruloplasmina. Por sua vez, a apoceruloplasmina (ceruloplasmina não ligada ao cobre) é destituída de atividade enzimática e é rapidamente degradada com uma meia-vida de 5 horas (Hellman e Gitlin, 2002). Esse fato explica os baixos níveis séricos dessa proteína na DW.

O receptor de transporte de cobre (RTCu-1) é uma proteína encontrada na membrana de todas as células e transporta esse elemento por mecanismos ainda não elucidados, dependentes de metioninas agrupadas no domínio extracelular (Klomp *et al.*, 2003; Petris *et al.*, 2002).

Em seguida, o cobre é incorporado às metalotioneínas (tipo I e II) e às seguintes chaperonas: à chaperona do cobre para superóxido dismutase

(CCS) (Culotta *et al.*, 1997), à COX17 (chaperona que o conduz ao espaço intermembrânico da mitocôndria) (Beers *et al.*, 1997) e à ATOX1 (chaperona que se liga à ATP7B e que contém o domínio semelhante ao amino terminal da proteína de DW) (Hamza *et al.*, 1999). Nessa situação particular, as chaperonas transportam o cobre para enzimas específicas (O'Halloran e Culotta, 2000) de forma a direcioná-lo no interior da célula, enquanto o mesmo é protegido da oxidação (Rosenzweig, 2001) (figura 1).

O cobre em excesso gera radicais livres e age como potente toxina celular via reação de Fenton e Haber–Weiss, que acarreta a produção do radical hidroxil, que, por sua vez, leva a peroxidação lipídica e perda de função da mitocôndria devido à baixa atividade da citocromo oxidase, quebra do DNA e danificação das proteínas. Portanto, os mecanismos de homeostase são necessários para a sobrevivência do organismo (Bremner, 1998; Cox *et al.*, 2002).

Existem duas vias principais de transporte de cobre que se encontram no hepatócito: a liberação para o plasma com a sua incorporação à ceruloplasmina e o transporte para a bile. A excreção de cobre biliar é o mecanismo primário para a manutenção de seu balanço em humanos. Há duas vias de excreção biliar de cobre; uma principal em vesículas e dependente da ATP7B e outra não vesicular, que transporta o elemento traço em complexo com a glutatona e requer transporte multiespecífico anion-orgânico canalicular (cMOAT) (Houwen *et al.*, 1990).

Figura 1. Representação da principal via do metabolismo do cobre no interior de um hepatócito. Os átomos de cobre entram na célula por meio do receptor CTR1, ligando-se à chaperona ATOX1, que os direciona até a proteína ATP7B. A porção N-aminoterminal da ATP7B permite que até seis átomos de cobre sejam transportados pelo canal da ATPase. No complexo de Golgi, ocorre a ativação da apoceruloplasmina em holoceruloplasmina, que é, então, transportada para a circulação.

1.3 Proteína ATP7B

A ATP7B é a proteína de transporte de cobre que se localiza no complexo de Golgi e é expressa no fígado e em outros órgãos como cérebro, rins, baço e estômago. É produto do gene *ATP7B*, localizado no braço longo do cromossomo 13 (Petrukhin *et al.*, 1993). Mutações nesse gene causam a

DW, decorrente de defeitos no transporte de cobre para dentro do retículo endoplasmático e vesículas, diminuindo sua excreção para a bile.

O gene *ATP7B* contém 21 éxons e sua transcrição tem o tamanho de aproximadamente 7,5 kilobases. Codifica a proteína de 1464 aminoácidos, uma ATPase transportadora tipo-P, homóloga a *ATP7A* (proteína de Menkes) (Bull *et al.*, 1993; Tanzi *et al.*, 1993). A *ATP7B* apresenta uma porção amino terminal que contém 06 domínios (GMTCXXC) que se ligam à forma reduzida do Cu (I) por dois resíduos de cisteína (DiDonato *et al.*, 2000). Existem também oito segmentos transmembrânicos e duas alças citosólicas onde se encontram os domínios de ligação do ATP, sendo eles, o domínio de fosfatase (seqüência TGEA), o de fosforilação (DKTGT), o de ligação do ATP (TGDN) e a seqüência que liga o domínio do ATP ao segmento transmembrânico (MXGDGXNDXP). As seqüências CPC e a YN estão localizadas no sexto e no sétimo segmento transmembrânicos respectivamente. Essas são comumente encontradas nas ATPases tipo P transportadoras de metais. Podem ser importantes na definição específica da função de transporte de cobre. O SEPHL é uma região altamente conservada que termina logo após numa porção carboxiterminal (Lutsenko e Kaplan, 1995; Solioz e Vulpe, 1996; Petrukhin *et al.* 1994) (Figura 2).

A proteína de DW age formando no seu ciclo de reação um intermediário fosforilado covalente que transfere a porção gamafosfatase do ATP para o resíduo aspartato da proteína e é inibido pelo ácido vanídico, que transloca uma variedade de cátions através da membrana celular (Voskoboinik *et al.*, 2001). Estudo recente sugere que a regulação e o

tráfego da proteína de DW sejam dependentes do cobre ao se ligar à sequência antigênica (motif) aminoterminal da proteína DW que leva a mudanças conformacionais da mesma (DiDonato *et al.*, 2000).

Figura 2. Representação esquemática da proteína ATP7B.

Em baixas concentrações de cobre, a proteína de DW se encontra primariamente na região pericanalicular do complexo de golgi (Hung *et al.*, 1997) onde há incorporação do metal à ceruloplasmina. Quando o elemento traço se encontra elevado induz o aparecimento de fosforilação do ATP7B (Vanderwerf *et al.*, 2001), ocorrendo seu movimento para o compartimento vesicular e vacúolos apicais remanescentes dos canalículos biliares que o transportam para a bile (Schaefer *et al.*, 1999; Roelofsen *et al.*, 2000). Subseqüentemente há diminuição da concentração de cobre levando a desfosforilação e o retorno ao complexo de Golgi (figura 3).

Figura 3. Representação esquemática do movimento da proteína de DW (ATP7B) no citoplasma do hepatócito. O cobre em grandes quantidades no citoplasma leva a proteína DW a se fosforilar indo à direção do compartimento vesicular onde o metal é introduzido em seu interior. A proteína de DW após diminuir a concentração de cobre se desfosforila e retorna ao compartimento de Golgi.

Estudos recentes sugerem que o cobre ligado ao domínio amino terminal do ATP7B aumenta a afinidade dessa região pelo elemento traço ativando-a. A chaperona ATOX1 também participa dessa regulação, pois não somente traz o cobre para a proteína de DW estimulando sua atividade como também o remove da porção amino terminal diminuindo sua atividade de fosforilação catalítica. (Walker *et al.*, 2002)

Em 2003, identificou-se o gene que codifica a pequena proteína terminal MURR1 requerida para o processo final de movimento do cobre vesicular e excreção para a membrana canalicular do hepatócito, e responsável pela toxicidade hepática do cobre no modelo animal em cães

Bedlington Terrier. O excesso de cobre intracelular resulta em necrose celular e escape do mesmo para o plasma (Tao e Gitlin, 2003).

1.4 Genética

A DW tem sido detectada em todos os grupos étnicos, apresenta frequência de um em 30.000 habitantes e está aumentada em populações com alta taxa de casamentos consanguíneos. A presença do heterozigoto gira em torno de um em 90 (Scheinberg e Sternlieb, 1984).

Foram descritas mais de 250 mutações no gene *ATP7B*, sendo a H1069Q observada em 40% das populações do norte da Europa. A mutação H1069Q é encontrada no *motif* conservado Ser-Glu-His-Pro-Leu (SEHPL) da alça citoplasmática localizada entre o quinto e o sexto domínio transmembrânico e resulta em defeito dependente de temperatura na dobra da *ATP7B* e no transporte dependente de cobre (Payne *et al.*, 1998; Gitlin, 2003).

Na população asiática a mutação *A778L* ocorre em aproximadamente 30% dos indivíduos afetados. Na população norte-americana não há uma mutação dominante. A maioria dos pacientes é composta, portanto, de heterozigotos com mutações diferentes para *ATP7B* em cada alelo do cromossomo 13 (Schilsky, 2005). Na Índia tem se identificado um grupo de sete mutações que ocorrem em cerca de 58% dos alelos (Gupta *et al.*, 2005). Uma mutação na região promotora, caracterizada pela deleção de 15 pares de bases, ocorre com frequência na Sardenha (Cullen *et al.*, 2003). No entanto, alterações nessa região não codificadora raramente são descritas

(Loudianos *et al.*, 1999). No Brasil, em estudo de 60 indivíduos, em parceria com a Universidade de Humboldt em Berlim, Alemanha, foi realizado o seqüenciamento dos 21 éxons e das respectivas bordas intrônicas do gene ATP7B. Detectaram-se 25 mutações distintas, 12 das quais foram relatadas pela primeira vez na literatura: N41S, 1434delC, 2296insA, 2438-2440delTAAinsAT, S932X, V949G, L1088X, F1094L, T1232P, K1258X, L1373R e IVS3+1 G/C. As mutações mais encontradas foram a 3402delC (34,8%), presente em famílias oriundas de São Paulo (58,3%) e a L708P (14,1%), observada em família provenientes de Minas Gerais (44,4%) e da Bahia (50%). A mutação H1069Q, até o presente momento, foi identificada infreqüentemente (Deguti *et al.*, 2004). O banco de dados de identificações de mutações é mantido pela Universidade de Alberta <http://ufoa-medical-genetics.org/wilson/index.php> e também pela Escola de Medicina Sackler <http://life2.tau.ac.il/GeneDis/Tables/wilson.html>.

1.5 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas iniciam-se na adolescência (entre 8 e 16 anos) e raramente após os 40 anos de idade. As manifestações hepáticas são as mais freqüentes e estão presentes em cerca de 45% dos indivíduos afetados, enquanto, em 35% deles, há sinais neurológicos e em 10%, distúrbios psiquiátricos.(Gollan e Gollan, 1998).

Uzman *et al.* (1956) confirmaram a hipótese de Bramwell que a doença pode apresentar-se com anormalidades hepáticas antes do início dos sintomas neurológicos. Em 1962, Washe relatou que, antes da

puberdade, a doença assume quase invariavelmente a forma hepática e, após, são mais comuns os sinais neurológicos.

O envolvimento hepático é extremamente variável, desde casos assintomáticos com elevação das aminotransferases, geralmente discretas, passando por esteatose hepática com ou sem hepatite, hepatite crônica ativa, ocorrendo até formas graves como a cirrose com ou sem suas complicações ou insuficiência hepática fulminante (Walshe, 1989).

A falência hepática fulminante aparece com a frequência de 6 a 12% em pacientes com DW, é indicação emergente de transplante hepático e predomina em indivíduos jovens e do sexo feminino numa relação de 3:1. Grandes quantidades de cobre de depósito são liberadas dos hepatócitos necrosados e induzem anemia hemolítica grave complicando a doença hepática aguda. Os marcadores bioquímicos indicativos de DW mostram elevação pouco pronunciada das aminotransferases séricas, hiperbilirrubinemia, níveis baixos de fosfatase alcalina e aumento na concentração de cobre sérico. O nível sérico da aspartato aminotransferase (AST) é tipicamente maior do que o da alanina aminotransferase (ALT). A coagulopatia grave e a hipercuprúria não diferenciam a DW de outras causas de insuficiência hepática. As anormalidades neurológicas e oftalmológicas podem estar ausentes, dificultando o diagnóstico (McCullough *et al.*, 1983; Berman *et al.*, 1991).

As manifestações neurológicas têm início a partir da segunda década de vida. Os sintomas iniciais mais comuns são disartria, desordens motoras como tremor, parkinsonismo, distonia, hipertonia. A coreoatetose e a disfagia

podem também ser observadas. O tremor da doença é descrito como bater de asas (*wing beating*). Os pacientes podem ter distonia facial que causa retração labial e conseqüente riso sardônico. Manifestações cerebelares incluem dismetria, tremor intencional, marcha atáxica e fala arrastada (*scanning*), que podem ser proeminentes (Oder *et al.*, 1991). Crises convulsivas têm sido relatadas na frequência de 6% e podem ocorrer em qualquer estágio da doença (Dening *et al.*, 1988).

As manifestações psiquiátricas são menos freqüentes que as manifestações hepáticas e neurológicas e têm a possibilidade de se expressar das mais variadas formas: mudanças de personalidade, queda no rendimento escolar ou do trabalho, ansiedade, depressão e até quadros psicóticos, semelhantes aos observados na esquizofrenia.

As manifestações oftalmológicas incluem catarata em girassol, oftalmoplegia, sacadas lentas (*slow saccades*) e anel de Kayser-Fleischer (KF). O anel representa a deposição corneana de cobre na membrana de Descemet (Wiebers *et al.*, 1977). Ele está presente em 95 a 98% dos pacientes com doença neurológica, em 50 a 60% dos pacientes sem doença neurológica e em somente 10% dos irmãos assintomáticos (Ferenci, 1998). Excepcionalmente pode ser observado em pacientes que apresentam colestase de longa duração (Fleming *et al.*, 1977), podendo ser considerado, na ausência de patologia biliar, como patognomônico da enfermidade.

Outras manifestações clínicas são a síndrome de Fanconi com aminoacidúria e a nefrolitíase, artrite, rabdomiólise, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo, amenorréia secundária e arritmia cardíaca que são

revertidos com a terapia quelante (Subramanian *et al.*, 2002).

1.6 Métodos diagnósticos

A ceruloplasmina é uma alfa-2 glicoproteína sintetizada principalmente pelo fígado e também é proteína de fase aguda. Seu valor sérico normal varia de 20 a 40 mg/dL. Tem meia vida estimada de cinco dias (Hellman e Gitlin, 2002). É encontrada em concentrações elevadas como consequência de inflamação (Scott *et al.*, 1978), colestase, gravidez, uso de estrógenos (German e Bearn, 1961), hipertireoidismo, infarto do miocárdio e doenças malignas. Valores baixos podem ser encontrados na síndrome nefrótica, enteropatia perdedora de proteínas, desnutrição (Lockey *et al.*, 1958), doença hepática de qualquer etiologia em estágio final ou de grave insuficiência (McCullough *et al.*, 1983) e na doença de Menkes (Riordan e Williams, 2001; Pfeil e Lynn, 1999). São encontrados níveis baixos também na hipoceruloplasminemia hereditária (Edward *et al.*, 1979), recém nascidos e na infância durante os primeiros seis meses de vida (Scheinberg *et al.*, 1954).

Em pacientes com DW, os níveis de ceruloplasmina podem estar normais, geralmente no limite inferior da normalidade, em torno de 5 a 15% dos pacientes (Pfeil e Lynn, 1999). Como regra geral, os níveis estão diminuídos nos pacientes sintomáticos e em 10 a 20% dos heterozigotos para a doença (Cauza *et al.*, 1997).

Os níveis de cobre sérico também são utilizados para auxiliar o diagnóstico da DW e sua fração livre encontra-se normalmente elevada em

pacientes sintomáticos. Os valores normais do cobre livre variam de 5 a 15 μ g/dL e, em pacientes não tratados, as cifras estão acima de 25 μ g/dL. O cobre total encontra-se diminuído devido aos baixos níveis de ceruloplasmina sérica. O cobre associado à ceruloplasmina corresponde a aproximadamente 0,3 μ g por mg de ceruloplasmina. A dosagem de cobre livre não é normalmente realizada e pode ser grosseiramente determinada pela diferença entre o cobre total e três vezes a ceruloplasmina.

O cobre hepático apresenta concentração normal que raramente excede 50 μ g/g de tecido seco de fígado (15-55 μ g/g) (Scheinberg e Sternlieb, 1984) A concentração hepática em heterozigotos encontra-se freqüentemente acima do normal, entretanto não excede 250 μ g/g de tecido seco. Está presente em maior concentração em 82% dos pacientes sintomáticos. Em longo prazo, em desordens colestáticas, a concentração de cobre no tecido pode estar elevada atingindo níveis encontrados na DW (Ala e Schilsky, 2004). Níveis elevados de cobre hepático podem ser encontrados na toxicose idiopática por cobre e também na cirrose infantil da Índia (Evans *et al.*, 1978; Ramakrishna *et al.*, 2000).

A distribuição hepática de cobre em estádios avançados da doença não é homogênea no fígado e uma amostra hepática pode subestimá-la. A acurácia da mensuração é mais bem efetuada em espécime de no mínimo um centímetro submetido à análise (Song e Chen, 2000).

A detecção de estoques de cobre focal pela rodanina é característica muito típica da doença, porém podemos não encontra-la. Isso decorre do fato do cobre estar ligado, principalmente, às metalotioneínas citoplasmáticas e,

portanto, não ser detectável histologicamente (Ludwig *et al.*, 1994), ao passo que, mais tardiamente, quando acumulado nos lisossomos, passa a ser detectável pelos métodos específicos de coloração (Goldfischer *et al.*, 1968). Não tem valor diagnóstico na presença de doenças colestáticas.

Os achados histológicos da biópsia hepática não são específicos e podem não ajudar no diagnóstico da doença, entretanto, pode ser necessária sua realização para exclusão de outras etiologias. As alterações precoces incluem acúmulo de gordura intracelular e infiltração glicogênica nuclear, e, mais tardiamente, observam-se infiltrado linfocítico portal e periportal, necrose e/ou fibrose às vezes indistinguíveis de outras formas de hepatite crônica (Pfeil e Lynn, 1999).

As anormalidades ultra-estruturais das células hepáticas podem coexistir com as observadas pela microscopia óptica, porém podem precedê-las. A mitocôndria do hepatócito tipicamente exhibe heterogeneidade na forma e tamanho com aumento de densidade matricial, separação das membranas mitocondriais interna e externa, espaços intercristais alargados e uma camada de inclusões cristalinas e vacuolizadas dentro da matriz. As alterações mitocondriais geralmente se tornam menos pronunciadas ou desaparecem após vários anos de terapia com d-penicilamina (DPA) mostrando que provavelmente tais anormalidades são uma consequência da toxicidade pelo cobre (Sternlieb, 1992).

A classificação fenotípica da doença, ainda não validada por consenso, baseia-se na formas de apresentação hepática (H) e neurológica (N) com ou sem sintomas psiquiátricos. Na forma hepática H1, ocorre lesão

hepática aguda com icterícia devido ao quadro de hepatite associado ou não à doença hemolítica Coombs negativo, em indivíduo previamente hígido. Pode ser observada evolução para insuficiência hepática fulminante e necessidade de transplante emergencial. Na forma hepática H2, observa-se hepatopatia crônica com manifestações de doença hepática, com ou sem manifestações de cirrose descompensada. O diagnóstico é obtido por meio de exames bioquímicos, ultrassonográfico e histológico do fígado. Na forma N1, as manifestações neurológicas estão associadas às da doença hepática. Na forma N2, não há evidência de doença hepática. A forma Nx refere-se à não investigação de hepatopatia (Ferenci *et al.*, 2003).

1.7 Cuprúria

A excreção urinária de cobre também é utilizada como teste de rastreamento para DW. Reflete a quantidade de cobre circulante não ligada à ceruloplasmina, uma vez que é exatamente o cobre livre que é excretado pelos rins. Níveis maiores que 100 µg/24h ou 1,6 µmol/24h são considerados sugestivos da doença (Steindl *et al.*, 1997). Seu valor normal é cerca de até 40 µg/24h (0,6µmol/24h) (Gow *et al.*, 2000; Roberts e Schilsky, 2003).

A interpretação dos resultados do cobre urinário pode ser dificultada pelo fato de outras doenças hepáticas também apresentarem valores elevados de cuprúria. A excreção urinária basal de cobre pode ser menor que 100µg em 16 a 23% dos pacientes com a doença. La Russo *et al.*, em 1976, ao investigar pacientes com doença hepática crônica ativa, constataram que cinco de 54 pacientes que exibiam excreção urinária acima

de 100 µg/24h tinham diagnóstico de hepatite auto-imune.

A DPA, droga mais utilizada para tratamento da DW, pode ser utilizada para melhor caracterizar a sobrecarga de cobre que ocorre nessa enfermidade, constituindo-se em teste auxiliar no diagnóstico. Consiste na administração de duas doses de 500mg da medicação com intervalo de 12h antes e durante a coleta da urina de 24 horas. Comparados com portadores de outras doenças, os pacientes com doença de Wilson tiveram, caracteristicamente, níveis acima de 1.600 µg/24h após o teste de DPA (Da Costa *et al.*, 1981). Nesse estudo foram analisadas crianças com diferentes doenças hepáticas (valores médios em torno de 800 µg/24h) e crianças com DW. Foram estudadas as seguintes variáveis: ceruloplasmina, cobre hepático, cobre sérico livre, cobre total e cobre urinário basal e após DPA. Observaram maior acurácia na dosagem de cobre urinário após 1,0g de DPA, com especificidade maior em relação aos outros parâmetros.

Não existem muitos trabalhos referentes ao comportamento da excreção urinária de cobre antes e após administração de DPA em heterozigotos e pacientes pré-sintomáticos. Gibbs *et al.*, em 1978, averiguaram o dado supracitado usando cobre radioativo e constataram que após o teste de DPA os pacientes pré-sintomáticos excretaram menos cobre que os heterozigotos. Esse trabalho demonstrou a excreção de cobre radioativo administrado e não o acumulado no indivíduo.

Frommer, em 1981, verificou que o comportamento da cuprúria basal e após a DPA em pacientes com doença hepática crônica, heterozigotos para DW e indivíduos normais. Os resultados da cuprúria basal em

indivíduos normais foram de 45,7 $\mu\text{g}/\text{dia}$ ($\pm 19 \mu\text{g}/\text{dia}$) e nos heterozigotos para DW de 57,3 $\mu\text{g}/\text{dia}$ ($\pm 32,1 \mu\text{g}/\text{dia}$). Pacientes com hepatite auto-imune e colestase apresentaram excreção basal de cobre de 24 horas que variou de 100 a 200 $\mu\text{g}/\text{dia}$, valores que se sobrepõem aos encontrados na DW. Após o teste da DPA os valores de excreção não diferiram entre os heterozigotos e indivíduos controles.

Tu e Blackwell realizaram investigação em 1967, em que compararam indivíduos normais ($n=29$), doentes com DW ($n=10$) e heterozigotos para DW ($n=10$). O valor médio de cuprúria basal nos três grupos diferiu significativamente. Heterozigotos com 59 $\mu\text{g}/\text{dia}$ ($\pm 53 \mu\text{g}/\text{dia}$), indivíduos normais 24 ($\pm 16 \mu\text{g}/\text{dia}$) e homozigotos para DW 290 ($\pm 160 \mu\text{g}/\text{dia}$). Os valores médios após o uso de DPA em heterozigotos foram de 1000 $\mu\text{g}/\text{dia}$ ($\pm 210 \mu\text{g}/\text{dia}$), em indivíduos normais 640 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (± 230) e em pacientes com DW 2330 $\mu\text{g}/\text{dia}$ ($\pm 360 \mu\text{g}/\text{dia}$).

1.8 Abordagem diagnóstica prática

O diagnóstico é estabelecido em pacientes com manifestações neurológicas com o anel de Kayser-Fleischer e ceruloplasmina baixa ou normal. Existem também poucos casos neurológicos documentados sem o anel KF e com ceruloplasmina baixa. O exame clínico neurológico é mais sensível que outros métodos de detecção de anormalidade neurológica. Em paciente com doença não neurológica o diagnóstico é obtido com a presença do anel e com a ceruloplasmina diminuída. Se um dos dois estiver normal ou ausente procede-se à investigação com o cobre urinário. Se a cuprúria

estiver elevada poder-se-á escolher entre realizar a mutação ou a biópsia com a quantificação do cobre hepático (Ferenci, 2004).

1.9 Justificativa do estudo

A dosagem do cobre urinário após teste de DPA, em indivíduos com suspeita da DW, pode ser útil, mas não tem utilização sistemática para seu diagnóstico. Temos tido dificuldade na interpretação dos resultados, após a realização desse procedimento, em pacientes com tal suspeita, em razão de não haver padronização, em nosso meio, dos níveis do cobre urinário em heterozigotos da mutação do gene *ATP7B*. Ademais, nos poucos trabalhos encontrados na literatura que trataram desse tema, o número de heterozigotos foi de no máximo 10. Como os pais dos doentes de Wilson são, teoricamente, os heterozigotos em que se têm os melhores parâmetros de acompanhamento, acreditamos que eles possam ser referência para dosagem de cobre urinário antes e depois da administração da DPA.

Objetivo:

Quantificar a cuprúria de 24 horas em pais de portadores de DW antes e depois da administração de d-penicilamina.

2 Método

2.1 Critérios de Seleção

Foram convidados a participar do trabalho os pais, de ambos os sexos, de pacientes com diagnóstico definitivo de DW em tratamento na disciplina de Gastroenterologia Clínica e Neurologia clínica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dos mais de 200 pacientes cadastrados na instituição, o primeiro registrado em 1946 (Barbosa *et al.*, 1985), foram contatadas 60 famílias, das quais 57 indivíduos aceitaram.

O diagnóstico foi estabelecido, em pacientes com manifestações neurológicas, pela detecção de anel de Kayser-Fleischer e de níveis baixos ou normais de ceruloplasmina. Em paciente sem doença neurológica, o diagnóstico foi definido pela presença de anel e de níveis de ceruloplasmina diminuídos. Se um dos dois ou estava normal ou ausente, procederam-se as investigações com o cobre urinário, biópsia hepática para pesquisa de cobre no tecido pela técnica de rodanina e avaliação de características histológicas sugestivas da DW. A quantificação do cobre no tecido hepático foi realizada em apenas um paciente. Os dados clínicos, história familiar, exames laboratoriais e mutações do gene ATP7B dos pacientes estão no anexo A e B.

2.2 Critérios de inclusão

Foram considerados critérios de inclusão ser declaradamente pai ou mãe biológicos de pacientes com diagnóstico de DW, e assinatura do termo de consentimento, após esclarecimento verbal, por escrito do protocolo proposto (Anexo C).

2.3 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram a não concordância em participar da pesquisa antes ou durante a coleta dos exames bioquímicos e urinários, bem como a impossibilidade de participar de todas as etapas.

2.4 Metodologia

2.4.1 Obtenção dos dados epidemiológicos e clínicos

Os indivíduos foram entrevistados por um único médico (a pesquisadora executante), buscando-se informações a respeito de dados demográficos e epidemiológicos e clínicos pessoais e familiares mais relevantes.

2.4.2 Determinação dos dados laboratoriais

2.4.2.1 Dosagens bioquímicas gerais

Os níveis de ALT, AST, gamaglutamil transpeptidase (GGT), fosfatase alcalina (FA), ceruloplasmina e cobre sérico foram analisados pelos exames de rotina do Laboratório Central do HC-FMUSP. Essa coleta foi realizada

nas 24 horas antes ou após a conclusão da coleta da cuprúria basal. Os valores foram obtidos em apenas uma dosagem.

2.4.2.2 Cuprúria

A urina de 24h foi coletada em frascos de 2L preparados exclusivamente para esse procedimento, contendo 26 ml de ácido clorídrico 6N para preservação da urina. Esse procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar com proteção dos olhos e das mãos, no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo.

Obtiveram-se amostras de urina de 24 horas, antes e após uso de 1,0 g de d-penicilamina, dividido em duas tomadas de 500mg cada. Antes das coletas os indivíduos foram orientados verbalmente e por escrito como colher corretamente o material (Anexo D e E). As amostras foram mantidas em refrigeradores a 4°C. Após a coleta da urina de forma correta, a mesma foi homogeneizada dentro do recipiente de coleta e uma quantidade 10 ml foi retirada com seringa estéril e distribuída, de forma igual, em dois tubos de ensaio isento de cobre, sendo levado para a análise das amostras. Um dos tubos foi mantido, como reserva, a -20°C.

A dosagem foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Emissão e Absorção Atômica do Instituto de Química da Universidade São Paulo. Todas as mensurações foram realizadas em triplicatas. O limite da quantificação foi de 5µg/L para o cobre urinário.

2.4.2.2.1 Equipamento

Para a determinação da concentração de cobre nas amostras de urina utilizou-se espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica ZEE nit® 60 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha), no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Esse equipamento é dotado de lâmpadas de catodo oco, tubo de grafite com aquecimento transversal, corretor de fundo baseado no efeito Zeeman com campo variável e amostrador automático AS73 do mesmo fabricante. Utiliza uma fonte contínua combinada com sistemas óticos de alta resolução, tendo-se utilizado a lâmpada de catodo oco (HCL), considerada a ideal, pois emite seletivamente as radiações de comprimento de onda específico do elemento a ser determinado (Sneddon *et al.*, 1993). A configuração do atomizador envolvendo aquecimento transversal é opção preferível à de aquecimento longitudinal, visto que os elementos mais voláteis podem migrar para as extremidades mais frias levando uma dispersão atômica e eventuais processos de recombinação (Harnly e Radziuk; 1995).

2.4.2.2.2 Noções de espectrometria de absorção atômica

O átomo é formado de núcleo e elétrons que normalmente sua configuração orbital normal se encontra no estado fundamental. O átomo após receber uma fonte luminosa absorve essa luz e o elétron mais externo passa da forma basal para o estado excitatório, que é uma forma instável. Não conseguindo permanecer nesse estado, ele emite luz retornando assim

para a forma estável. Para cada elemento químico ocorre a absorção e a emissão de determinado comprimento luminoso de onda característico diferente, podendo-se assim identificar o tipo de elemento.

A mensuração da energia absorvida e ou emitida é analisada por técnicas analíticas na espectroscopia atômica como emissão atômica, absorção atômica e a fluorescência atômica (incorpora ambos os aspectos da absorção e emissão).

Em técnicas de emissão para a quantificação do elemento a mensuração é feita pela intensidade da luz emitida para determinado comprimento de onda luminoso do elemento a ser determinado.

Na espectrometria de absorção atômica, a mensuração da quantificação é obtida com a seleção cuidadosa de determinado comprimento de onda específico numa fonte de luz especial, para quantificar um elemento individual na presença de outros. A quantidade de luz absorvida é determinada pela comparação entre a intensidade de luz inicial (I_0) e final (I) sendo mensurada por um detector. Existe, portanto, uma relação inversamente proporcional entre concentração de átomos em relação à diminuição da intensidade de luz inicial (Figura 4).

Figura 4. Representação esquemática da diferença entre a intensidade de luz inicial e a final.

A porcentagem de absorção (%A) é a diferença entre 100 e a porcentagem de transmitância (%T) e a absorbância é a relação entre o logaritmo da intensidade de luz inicial e a final. Essas fórmulas estão descritas abaixo:

$$T = I/I_0$$

$$\%T = 100 \times I/I_0$$

$$\%A = 100 - \%T$$

$$A = \log I_0/I$$

A lei de Berr define uma relação linear da absorbância com a concentração atômica do elemento, calculada pela fórmula $A = abc$, onde A é a absorbância, “a” é o coeficiente de absortividade (para um dado comprimento de onda, característica da espécie), “b” é a distância do percurso da luz interceptada pela espécie de absorção na célula de absorção e “c” é a concentração da espécie absorvente. Com concentrações previamente conhecidas de soluções padronizadas pode-se calibrar o aparelho e posteriormente verificar a concentração de um analito específico. (Welz e Sperling, 1999).

A Figura 5 ilustra o funcionamento do espectrômetro de absorção atômica.

Figura 5. Representação esquemática do funcionamento do atomizador atômico. O programa de temperatura realizado no forno de grafite transforma o analito em uma nuvem atômica e uma fonte de radiação simples passa por esta. O detector e amplificador identificam a absorbância do analito e a traduz em dados para medição de sua quantidade (ciarte.no.sapo.pt/exame/metodos/quimica/aas.htm).

2.4.2.2.3 Cuidados com a contaminação dos materiais

A fim de evitar contaminações, toda a vidraria e recipientes para armazenagem de soluções foram lavados com detergente, posteriormente imersos, durante 24 horas, em solução 10% v/v de ácido nítrico, enxaguados com água deionizada e guardados em recipiente isento de contaminação. A água utilizada nos experimentos foi destilada e deionizada em sistema de purificação Milli-Q. O ácido nítrico utilizado na preparação das soluções de referência e das soluções das amostras foi purificado em sistema de destilação abaixo do ponto de ebulição.

2.4.2.2.4 Amostras, reagentes e soluções

A preparação das soluções analíticas de referência e amostras foi realizada no interior de capela de fluxo laminar, com baixo teor de sólidos particulados, evitando assim contaminação pela poeira do laboratório.

As soluções de referência foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque de cobre, contendo 1000 mg/L de cobre (II) em solução de ácido nítrico a 1% v/v, qualidade Tritisol (Merck, Saint Louis, USA).

As soluções analíticas foram preparadas em meio de urina certificada (Urine Blank – Seronorm™ Trace Elements, Sero, Noruega), contendo baixo teor de cobre. Esta amostra de urina certificada foi diluída em 1:1 com ácido nítrico a 1% v/v, acrescentando-se concentrações crescentes de cobre para a calibração do equipamento. Esse procedimento, conhecido como compatibilização de matriz, permitiu realizar determinações isentas de interferências químicas.

2.4.2.2.5 Preparação das amostras para análise do cobre

As amostras de urina foram diluídas em 1:1 em solução de ácido nítrico a 1% v/v e uma alíquota de 10 µL dessas soluções foi inserida no interior do tubo de grafite, juntamente com um modificador químico contendo 20 µg de nitrato de paládio [Pd(NO₃)₂]. Utilizou-se essa substância de acordo com Welz *et al.* (1992), que considera a mistura de Pd/Mg o melhor modificador químico para 21 elementos químicos, inclusive o cobre.

Após a injeção da solução no tubo de grafite, um programa de aquecimento foi iniciado para a obtenção do sinal analítico de absorbância. O programa de aquecimento apropriado, para controlar as etapas de secagem, pirólise e atomização, foi estabelecido para o analito (cobre) na matriz (urina), com temperaturas de pirólise e atomização específicas, já que o comportamento eletrotérmico é dependente da natureza e concentração do modificador químico como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Programa de temperatura para determinação do cobre em amostras de urina por espectrometria de absorção atômica eletrotérmica

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Fluxo de Ar (ml min ⁻¹)	Leitura
Secagem 1	100	5	10	250	Não
Secagem 2	140	5	10	250	Não
Pirólise	1100	10	30	250	Não
Atomização	2200	0	5	0	Sim
Limpeza	2400	1	3	250	Não

Para a validação do método foi feita a determinação de cobre de duas amostras de materiais de referência certificados (urine blank – Lot FE1113 e urine Lot FE1114), ambos da firma SeronormTM Trace Elements (Sero, Noruega) e foram utilizados materiais de referência certificados assim como a adição e a recuperação do analito.

2.5 Aspectos éticos

O trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão ético-científica do Departamento de Gastroenterologia e pela Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa da FMUSP (Anexo F).

2.6 Análise estatística

As medidas descritivas são apresentadas em média, mediana, mínimo e máximo. O valor n refere-se ao tamanho da amostra avaliada. O DP refere-se ao desvio padrão. A medição de amplitude é a diferença entre os valores máximo e mínimo. Os cálculos foram executados pelo programa estatístico SPSS 12.0.

Utilizou-se o teste T de Student não pareado para comparação dos exames bioquímicos entre pais e mães de portadores de DW.

Nas dosagens de cuprúria de 24h antes e após DPA para o mesmo sexo foi utilizado teste não paramétrico de Wilcoxon para comparar os resultados do sexo masculino e feminino separadamente. E para comparação entre os dos dois sexos foi realizado o de Mann-Whitney. Este mesmo teste foi aplicado para valores de delta percentual ($\Delta\%$), para as várias dosagens efetuadas. A fórmula do $\Delta\%$ é descrita abaixo.

$$\Delta\% = \frac{\text{cuprúria após d-penicilamina} - \text{cuprúria antes da d-penicilamina}}{\text{cuprúria antes da d-penicilamina}} \times 100$$

Aplicou-se também o teste de correlação entre níveis de ceruloplasmina e cupremia versus cuprúria de 24h antes e depois da DPA.

Fixou-se em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade assinalando-se com um asterisco os valores significantes (Siegel e Castellan, 2006).

3.1 Resultados

3.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos

Foram estudados inicialmente 57 indivíduos considerados pais de portadores de DW. Sete deles foram excluídos do estudo por não completar todos os exames. Dessa forma, foram estudados 50 pais, sendo 25 masculinos e 25 femininos. Tais indivíduos apresentaram idade média de 59,8 e mediana de 58 anos. Os dados demográficos e epidemiológicos obtidos por meio de entrevista com os indivíduos incluídos constam no anexos de G a J.

3.2 Aspectos laboratoriais

3.2.1 Dosagens bioquímicas gerais

A maioria dos indivíduos apresentou níveis de ALT dentro dos limites de referência. Três homens apresentaram níveis 1,2 vezes o valor normal (caso 3, 26 e 32) e um (caso 44), 1,4 vezes o normal. No grupo feminino, quatro apresentaram alterações sendo que duas, 1,2 vezes o valor normal (casos 37 e 41), uma (caso 5), 3,4 vezes o normal e a última (caso 39) 1,9 vezes o normal. Nos níveis de AST, encontrou-se apenas um indivíduo do sexo masculino com 1,1 vezes o valor normal (caso 44) e em relação ao sexo feminino, os casos 5 e 39 apresentaram 1,8 vezes, e o caso 37, 1,3 vezes o normal. Nos valores de fosfatase alcalina, os casos 18 e 29, que são do sexo feminino, apresentaram respectivamente os valores de 1,2 e 1,5 vezes o normal. Alterações na gamaglutamil transpeptidase (γ GT) foram encontradas apenas em indivíduos do sexo feminino, nos casos 5, 7, 29 e 41

e corresponderam à 2,0; 1,8; 4,9 e 1,8 vezes o normal respectivamente. Esses resultados estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Alterações das enzimas hepáticas dos pais de pacientes com DW, em número de vezes o valor máximo da normalidade.

Casos	Parâmetros			
	ALT	AST	γ GT	FA
Caso 3 (masculino)	1,2	VN	VN	VN
Caso 5 (feminino)	3,4	1,8	2,0	VN
Caso 7 (feminino)	VN	VN	1,8	VN
Caso 18 (feminino)	VN	VN	VN	1,2
Caso 26 (masculino)	1,2	VN	VN	VN
Caso 29 (feminino)	VN	VN	4,9	1,5
Caso 32 (masculino)	1,2	VN	VN	VN
Caso 37 (feminino)	1,2	1,3	VN	VN
Caso 39 (feminino)	1,9	1,8	VN	VN
Caso 41 (feminino)	1,2	VN	1,8	VN
Caso 44 (masculino)	1,4	1,1	VN	VN

VN= valores dentro da normalidade

Quanto aos resultados da ceruloplasmina, verificou-se que os casos 10, 13, 20, 24, 25, do sexo masculino, exibiram níveis respectivamente de 18 mg/dL, 19 mg/dL, 19 mg/dL, 5 mg/dL, e 16 mg/dL. No sexo feminino, apenas uma participante apresentou nível de ceruloplasmina abaixo de 20 mg/dL, o caso 18, com 16 mg/dL, enquanto valores de cobre sérico abaixo de 70

$\mu\text{g/dL}$ também foram observados apenas no caso 34, $65 \mu\text{g/dL}$. Treze indivíduos do sexo masculino apresentou cobre abaixo de $70 \mu\text{g/dL}$. O valor de $22 \mu\text{g/dL}$ é referente ao caso 24 que foi o menor encontrado na nossa casuística. Os valores de tendência central e de dispersão da ALT, AST, FA, γGT , ceruloplasmina e cobre sérico da casuística estudada, estão na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de tendência central e de dispersão das enzimas hepáticas, ceruloplasmina e cobre sérico (n = 50)

		VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO	AMPLITUDE	MÉDIA	MEDIANA	DP	VR
ALT	Masc (UI/L)	59	13	46	28,24	24	13,43	<41
	Fem (UI/L)	105	12	93	25,8	20	19,47	<31
FA	Masc (UI/L)	99	48	51	68,72	65	15,96	<129
	Fem (UI/L)	159	45	114	81,68	78	26,53	<104
AST	Masc (UI/L)	41	12	29	23,84	24	6,09	<37
	Fem (UI/L)	57	13	44	24,16	21	11,8	<31
γGT	Masc (UI/L)	57	12	45	27,88	26	12,22	<61
	Fem (UI/L)	178	11	167	33,48	24	34,6	<36
Cobre sérico	Masc ($\mu\text{g/dL}$)	150	22	128	71,38	66	27,87	70-160
	Fem ($\mu\text{g/dL}$)	134	65	69	88,01	81	15,73	70-160
Ceruloplasmina	Masc (UI/dL)	34	5	29	21,72	22	5,04	20-60
	Fem (UI/dL)	38	16	22	27,78	27	5,47	20-60

Masc= masculino; Fem= feminino

DP= desvio padrão

VR= valor de referência

Os níveis médios de enzimas hepáticas, do cobre sérico e da ceruloplasmina segundo o sexo do indivíduo estão apresentados em gráficos nas Figuras 6 a 8. Os valores individualizados da AST, ALT, γ GT, fosfatase alcalina, cobre sérico e ceruloplasmina estão dispostos nos anexo L e M.

Figura 6. Distribuição dos níveis séricos médios de alanina e aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e gamaglutamil transpeptidase (UI/L) em pais de portadores de DW, segundo o sexo (n = 50).

Figura 7. Distribuição dos níveis médios de ceruloplasmina sérica (mg%) em pais de portadores de DW, segundo o sexo (n=50).

Figura 8. Distribuição dos níveis médios de cobre sérico ($\mu\text{g}\%$) em pais de portadores de DW, segundo o sexo ($n = 50$).

Na tabela 4 observa-se que os níveis de média e mediana para o cobre e ceruloplasmina são maiores no sexo feminino do que no masculino com uma diferença estatisticamente significativa.

Tabela 4. Valores da média e mediana referentes à ceruloplasmina e ao cobre sérico nos sexos masculino e feminino

Sexo	CERULOPLASMINA			COBRE		
	Masc	VR (mg/dL)	Fem	Masc	VR ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	Fem
Média	21,72	20-60	27,78	71,38	70-160	88,01
Mediana	22		27	66		81

Teste de Mann-Whitney
 Ceruloplasmina com $z=3,82^*$; $p < 0,001$
 Cobre com $z=3,34^*$; $p < 0,001$
 Valor de referência = VR

3.2.2 Cuprúria

A distribuição dos valores médios da cuprúria, de acordo com o sexo, antes e depois da administração de DPA estão nas Figuras 9 e 10. Os valores mais importantes de medidas de tendência central e de dispersão representativos estão distribuídos de acordo com o sexo, estão exibidos na Tabela 5 e 6. Observa-se que o valor mínimo feminino antes e após DPA é 5,88 µg/L e 74,21 µg/L respectivamente. No masculino é de 7,33 µg/L e 31,59 µg/L respectivamente. Nos diagrama de caixas (Figuras 11 a 14), visualizam-se valores discrepantes apenas nos resultados de cuprúria basal, nos homens, nos casos 26 (50,50 µ/24h) e e 47 (59,30 µ/24h). O maior valor de cuprúria após DPA foi do sexo masculino (caso 24) com 1085,09 µg/L que concomitantemente apresentou os níveis de cobre sérico e ceruloplasmina mais baixos. Os valores do cobre urinário, antes e depois de DPA, de todos os participantes estão nos anexo N e O.

Figura 9. Distribuição da cuprúria basal ($\mu\text{g}/\text{volume}$ urinário de 24 horas) em pais de portadores de DW, segundo o sexo (n=50)

Figura 10. Distribuição da cuprúria pós DPA ($\mu\text{g}/\text{volume}$ urinário de 24h)

Tabela 5. Valores de tendência central e de dispersão para a cuprúria de 24 horas antes e depois de 1,0g de DPA em pais (sexo masculino) de pacientes com DW.

PARÂMETROS DAS AMOSTRAS	Cuprúria antes da DPA	Cuprúria depois da DPA
Média ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	26,19	521,74
Erro padrão da media ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	2,37	60,00
Desvio padrão ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	11,86	299,99
Variância $\mu\text{g}^2/24\text{h}^2$	140,56	89995,32
Valor mínimo ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	7,33	31,59
Valor máximo ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	59,30	1085,09
Amplitude ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	51,97	1053,00
Quartil 1 (25)	18,14	270,27
Quartil 2 (50) ou mediana	24,99	498,96
Quartil 3 (75)	31,67	748,24

Tabela 6. Valores de tendência central e de dispersão para a cuprúria de 24 horas antes e depois de 1,0g de DPA em mães de pacientes com DW.

PARÂMETROS DAS AMOSTRAS	Cuprúria antes da DPA	Cuprúria depois da DPA
Média ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	18,67	525,34
Erro padrão da media ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	1,38	43,30
Desvio padrão ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	6,90	216,51
Variância $\mu\text{g}^2/24\text{h}^2$	47,66	46875,63
Valor mínimo ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	5,88	74,21
Valor máximo ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	32,50	838,98
Amplitude ($\mu\text{g}/24\text{h}$)	26,62	764,77
Quartil 1 (25)	15,16	386,18
Quartil 2 (50) ou mediana	18,73	524,04
Quartil 3 (75)	22,30	708,88

Na Tabela 7 está demonstrada a correlação negativa, com significância estatística, entre o cobre e a ceruloplasmina em relação com a cuprúria basal. Não foi detectada tal correlação após DPA. Os valores de delta percentual estão expressos na Tabela 8, onde se observa uma clara diferença da cuprúria basal em relação após DPA para ambos os sexos com significância estatística. Em relação ao sexo masculino e feminino, as diferenças percentuais na cuprúria basal foram estatisticamente significantes, enquanto após DPA não o foi.

Tabela 7. Correlação dos níveis de cobre e ceruloplasmina e com a cuprúria antes DPA.

		CUPRÚRIA ANTES DPA	CERULOPLASMINA	COBRE SÉRICO
CUPRÚRIA ANTES DPA	CC	1,000	-0,281*	-0,074
	sig. 2 vezes	,	0,048	0,611
	N	50	50	50
CERULOPLASMINA	CC	-0,281*	1,000	0,701**
	sig 2 vezes	0,048	,	0,000
	N	50	50	50
COBRE SÉRICO	CC	-0,074	0,701**	1,000
	sig 2 vezes	0,611	0,000	,
	N	50	50	50

CC= coeficiente de correlação

Tabela 8. Valores de delta percentual para cuprúria antes e após DPA

	MASC			FEM		
	Antes DPA	Após DPA	Δ%	Antes DPA	Após DPA	Δ%
média						
(μg/24h)	26,19	521,74	2114,7	18,28	525,34	3066,4
mediana						
(μg/24h)	24,99	498,96	1632,7	17,99	524,04	2539,9
Teste de Wilcoxon antes x após Zcrit=1,96				Teste de Mann-Whitney – Masc x Fem		
Masculino Zcalc=4,37 (p<0,0001)				antes DPA Z=2,58 (p=0,005)		
Feminino Zcalc=4,37 (p<0,0001)				após DPA Z= 0,26 NS(p=0,024)

Figura 11 – Cuprúria basal em pais (sexo masculino)

Figura 12 – Cuprúria basal em mães

Figura 13 – Cuprúria após DPA dos pais (sexo masculino)

Figura 14 – Cuprúria após DPA em mães

Discussão

Os resultados obtidos da cuprúria basal, na maioria de indivíduos de ambos os sexos, mostraram os valores encontrados habitualmente em normais, de acordo com os valores de referência do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da USP. Os valores significativamente mais elevados do cobre urinário nos homens pré-DPA poderiam ser consequência dos níveis significativamente mais baixos de ceruloplasmina e conseqüentemente níveis mais baixos de cobre sérico no sexo masculino e, paradoxalmente, níveis mais altos de cobre livre. Como o cobre sérico está principalmente ligado à ceruloplasmina e esse cobre não é o eliminado na urina, pode-se extrapolar que os valores mais baixos da proteína transportadora do metal no homem refletiriam em níveis mais elevados de cobre livre. É por esse motivo que os coeficientes de correlação entre a ceruloplasmina versus cuprúria basal e entre cobre sérico versus cuprúria basal foram negativos, isto é, quanto maiores os níveis de ceruloplasmina e cupremia (correlação positiva) menores foram os níveis de cuprúria (Tabela 7).

Tal fato é o observado nos doentes de Wilson, que têm níveis muito reduzidos de ceruloplasmina, cobre livre aumentado e níveis elevados de cobre urinário. No entanto, os dois valores discrepantes encontrados na cuprúria basal, acima dos valores máximos esperados, foram exatamente detectados no sexo masculino e essa poderia ser a explicação da média ter sido maior nesse grupo. Valores discrepantes não devem ser habitualmente descartados de análise estatística, mas devem ser analisados com cuidado

e, eventualmente, deveriam ser repetidos para evitar conclusões precipitadas.

Nível de ceruloplasmina mais elevado no sexo feminino não é exclusividade dos participantes do presente estudo. Méndez *et al.* (2004) estudaram 82 chilenos para avaliar a modulação dos valores de ceruloplasmina pelo sexo, em resposta à exposição de quantia pré-definida de 10mg de cobre/dia por dois meses, supervisionados e respeitando a tolerabilidade de ingestão diária. Foram dosados os níveis de ceruloplasmina, antes e após a suplementação de cobre como também realizado teste a dosagem urinária de cobre após 300mg do quelante 2,3 dimercaptoprano-1-sulfonado (DMS). Os valores de ceruloplasmina e de cobre foram maiores no sexo feminino do que no masculino.

German e Bearn (1960) realizaram ensaio clínico em que foi administrado estrógeno em seis homens e em nove mulheres com DW. Foram medidos os níveis de cuprúria basal, cobre sérico e ceruloplasmina, sendo constatado aumento dos níveis de ceruloplasmina e do cobre sérico. Quanto ao papel dos contraceptivos de elevar os níveis de ceruloplasmina é fato descrito em diversos estudos, como, por exemplo, o de Hinks *et al.* (1983). Entretanto, esse fato é de pequena relevância, pois a dosagem urinária de cobre, sem estímulo com DPA, considerando valores acima de 100 µg/24h, é capaz de selecionar cerca de 20% dos reais portadores de DW.

Nenhum indivíduo, de ambos os sexos, exibiu valores de cuprúria basal acima de 100 µg/24h, que são os referidos como índices sugestivos de

DW. Mesmo aqueles com valores discrepantes, mencionados no parágrafo anterior, não apresentaram aquelas cifras.

Por outro lado, os valores encontrados do cobre urinário após DPA foram iguais nos homens e nas mulheres. Como o cobre eliminado na urina, quelado com a DPA, é teoricamente o cobre livre, isso nos faz inferir que, possivelmente, os valores totais de cobre livre em ambos os sexos sejam, na verdade, semelhantes, se assim pudermos extrapolar pela cuprúria de 24 horas após 1,0g de DPA.

Era de se esperar que os homens apresentassem cifras urinárias de cobre mais elevadas do que as mulheres, de acordo com o raciocínio previamente discutido (menores níveis de ceruloplasmina e cupremia, cobre livre e cuprúria basal mais elevados). Três valores muito reduzidos de cuprúria após DPA, dois no sexo masculino, poderiam talvez, ter trazido os valores para níveis inferiores de forma inadvertida. Tais níveis não chegaram a ser discrepantes, porém um deles quase atingiu o valor do mínimo esperado que seria de 31,28 $\mu\text{g}/24\text{h}$ para o sexo masculino. Talvez esse fato explique os valores médios discretamente mais baixos, sem significância estatística, encontrados no sexo masculino. Valores discrepantes poderiam ser explicados por uso incorreto da medicação ou por coleta inadequada da urina. Se houver perda de uma micção, os resultados seriam diferentes, pois faria diferença na diurese de 24 horas e, conseqüentemente, no valor da cuprúria final.

Comparando com outros poucos resultados de medida urinária de cobre de 24 horas em heterozigotos encontrados na literatura, os valores

médios obtidos no presente estudo foram intermediários (1000 $\mu\text{g}/24\text{h}$ no estudo de Tu e Blackwell 1966 e cerca de 250 $\mu\text{g}/24\text{h}$ no estudo de Frommer 1981). A técnica de mensuração do cobre nesses dois estudos não foi a mesma (método colorimétrico de Eden e Green 1940 no estudo de Tu e Blackwell e a espectrofotometria de absorção atômica de Spector *et al.*, 1971 no Frommer), o que pode explicar parcialmente a expressiva diferença observada entre eles. Talvez o fator mais importante, que explique a diferença entre os valores, seja a dose menor de 10mg/kg de DPA utilizada no trabalho de Fromer. Em relação ao nosso estudo, a técnica utilizada foi diferente de ambos os estudos anteriores, o que poderia justificar, em parte, os resultados obtidos. Explicação adicional seria a constituição da dieta em cobre, preocupação que foi expressa no estudo no estudo de Tu e Blackwell, no qual alimentos contendo altos teores de cobre foram evitados durante as medidas bioquímicas. Não há uma padronização de dieta para a coleta do cobre urinário e, talvez, esse fato tenha alguma importância, a depender dos hábitos alimentares em diferentes países. A dieta do brasileiro normal contém alimentos que, sabidamente, contêm alto teor de cobre, como as leguminosas, especialmente o feijão. Por outro lado, produtos que não são consumidos, em nosso meio, em quantidades como as que se consomem em outros centros, poderiam ter peso na composição total de cobre, como é o caso do chocolate e mariscos. Como as influências da dieta na cupremia e nos níveis de ceruloplasmina já foram documentadas (Araya *et al.*, 2005), com aumento proporcional dos mesmos com o incremento do cobre na dieta, devem-se considerar também possíveis influências na cuprúria de 24 horas.

Não necessariamente os indivíduos que tiveram os maiores níveis de cuprúria após DPA apresentavam níveis mais elevados de cobre basal e vice-versa. Assim, o caso nº 47, com maior cuprúria basal teve aumento de seis vezes após a medicação, enquanto o caso nº 24, que teve a maior cuprúria após DPA, teve um incremento de 47 vezes em relação à cuprúria basal. Da Costa *et al.* (1992) relaram fato semelhante, em que o aumento proporcional da cuprúria de 24h, após teste de DPA, foi menor nos pacientes com DW, com cuprúria basal significativamente maior, quando comparados com outros portadores de outras enfermidades hepáticas.

Esses resultados, em possíveis heterozigotos para o gene *ATP7B*, levam-nos a questionar se os valores mencionados na literatura para o teste da DPA em homozigotos doentes possam ser simplesmente incorporados na interpretação resultados de candidatos a DW em investigação na prática clínica, em nosso meio. De acordo com as diretrizes diagnósticas para a DW, valores de cobre urinário, após teste com DPA, acima de 1600 µg/24h seriam indicadores do diagnóstico da DW (Roberts e Schilsky, 2003). No Brasil, com hábitos alimentares diferentes de outros países em que se procedeu a padronização desse teste, talvez o nível indicativo de doença devesse ser investigado em estudos posteriores. Além do mais, a técnica da determinação do cobre urinário realizada por Da Costa *et al* (espectrofotometria de absorção atômica em chamas – FAAS) também não é exatamente a mesma utilizada na presente investigação (espectrometria de absorção atômica em atomizador eletrotérmico - ETAAS).

Atualmente existem várias técnicas disponíveis para determinação do cobre urinário, como, por exemplo, a espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado indutivo (ICP-MS), espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma de acoplamento indutivo (ICP-AES), espectrometria de fluorescência atômica (AFS), fluorescência de raio X (XRF), polarografia, voltametria, espectrometria de absorção atômica seja em chama (FAAS) ou em atomizador eletrotérmico (ETAAS), sendo a última, atualmente, a mais utilizada em análises de rotina, em função de vários fatores prós: alta especificidade, sensibilidade, robustez, baixos limites de detecção para vários elementos em diferentes amostras e baixo custo relativo (Welz e Sperling; 1999). Estudos comparativos entre essas técnicas, para validação de interpretações comparativas, são necessários para se evitar conclusões indevidas.

Não nos surpreendeu que os valores de cobre sérico e de ceruloplasmina nos pais de doentes de Wilson apresentassem valores mais baixos que as referências de normalidade do HC-FMUSP (Tabela 3). De acordo com o que já foi publicado a respeito, 10 a 20% dos heterozigotos apresentam níveis baixos de ceruloplasmina (Cauza *et al.*, 1997). Até mesmo os valores encontrados no caso 24, de 5 mg/dL e 22 µg/dL para a ceruloplasmina e cobre sérico, são perfeitamente aceitáveis para um heterozigoto. Como se sabe, os níveis de ceruloplasmina não se relacionam com a patogênese da DW. Como o cobre não é incorporado à apoceruloplasmina, essa proteína tem vida média muito curta e é metabolizada rapidamente (Hellman e Gitlin, 2002). Nesses casos com níveis

muito reduzidos de ceruloplasmina, certamente há transtorno da incorporação do cobre na apoceruloplasmina, mas a excreção biliar do cobre não está prejudicada, não ocorrendo deposição de cobre em excesso no fígado e em outros órgãos.

As alterações das enzimas hepáticas foram discretas em onze indivíduos (três enzimas alteradas em um, duas alteradas em quatro, e uma alterada em seis). Como o presente estudo não se propôs a investigar as causas das alterações dessas enzimas, não foram realizados exames específicos para tal propedêutica. Esses exames deveriam ser repetidos para certificarmos da persistência dessas alterações. Não acreditamos que haja comprometimento secundário à deposição de cobre nesses indivíduos, pois, como já foi discutido anteriormente, os heterozigotos, conceitualmente, não desenvolvem a doença. Digno de nota foram as características do caso 24, que apresentava alterações mais pronunciadas dos níveis de cobre sérico e de ceruloplasmina e apresentava enzimas hepáticas dentro da normalidade. Todavia, a participante com a maior cuprúria no grupo feminino (caso nº 41) exibiu alterações na ALT e FA.

Esse é o estudo com o maior número de possíveis heterozigotos participantes, para avaliar a cuprúria basal e após a administração de dose padronizada de DPA. Em que pese as limitações de estudo do gênero como dieta não padronizada, erro na coleta da urina de 24 horas e falta de controle na administração da medicação, os resultados são bastantes expressivos e certamente nos orientarão na abordagem de pacientes com alterações de enzimas hepáticas de causa indefinida. Valores de cuprúria que se

superpuserem aos encontrados no presente estudo, definitivamente não poderão ser rotulados de serem característicos de portadores de DW, assim como o fato de ter ocorrido aumento desproporcional da cuprúria após a DPA (aumento superior a 10, 20 vezes ou mais os valores basais).

A falta de grupo controle de indivíduos potencialmente homozigotos normais não limita a importância dos dados apresentados. Com base nos resultados dos poucos outros estudos do gênero (Tu e Blackwell 1966; Frommer, 1981), os valores no máximo se superporiam aos encontrados nos possíveis heterozigotos e a presença desses valores não seria favorável ao diagnóstico de DW. Ademais, suspeitar que um homozigoto normal possa ser, na verdade, um heterozigoto teria muito pouca importância prática. A realização de estudo nesse grupo de pacientes, a nosso ver, não acrescentaria dados na propedêutica diagnóstica da DW e seria um gasto desnecessário de tempo e de material. Por outro lado, como os resultados da cuprúria podem ter variações decorrentes de hábitos alimentares de determinado país, a definição de padrões no grupo controle de doentes, ainda sem tratamento, com dieta padronizada, pode ser benéfica para interpretação dos resultados e deveria ser considerada em futuros trabalhos do gênero.

Conclusões

Diante dos resultados apresentados e de acordo com o objetivo inicialmente proposto pode-se concluir que:

- 1) Ficou definida uma possível faixa de variação da cuprúria antes e depois da administração de d-penicilamina em pais de portadores com doença de Wilson.
- 2) Os pais apresentaram cupremia e níveis de ceruloplasmina menores e cuprúria basal maior do que as mães.
- 3) As faixas de variação de normalidade para os parâmetros ceruloplasmina, cobre sérico e urinário deveriam ser diferenciadas de acordo com o sexo.

Anexo A - Tabela 9. Dados clínicos, história familiar e bioquímicos dos casos dos portadores de DW.

NOME	SEXO	CASO-ÍNDICE	PARENTES	QUADRO INICIAL	CERUL (mg/d/L)	CU SÉRICO $\mu\text{g/dL}$
A da S	masc	NÃO	irmão falecido DW	assintom	<6,4	SD
A P S	femin	SIM	não	hepático	12,0	67
A de L	femin	NÃO	rastreamento familiar	assintom	<2	18,3
C L C B	masc	SIM	SIM	neuroológico	2	23
D S F	masc	SIM	prima faleceu por hepatite fulminante aos 15 anos	assintom	12	24,0
D M	femin	SIM	não	neuroológico	2	<15
E S de F	femin	SIM	irmão falecido DW	hepático	<6	33,0
ESY	Fem	SIM	não	hepático	22	108
E M da S	femin	SIM	tem um irmão não afetado	hepático	2	28,0
F de SB	Masc	Não	irmão	hepático	<2	19
J G S F	masc	SIM	não	hepático	2	39,3
J L B B	masc	SIM	não	hepático	3	32,0
JO de J	Masc	SIM	Não	Psiquiátrico	3	34
L P dos S	femin	SIM	não	neuroológico	3	19,0
M L da S S	femin	SIM	irmã faleceu com CH	hepático	2	8,0
R S	femin	SIM	não	psiquiátrico	7	30,7
S Z	femin	SIM	não	neuroológico	4	15,0
V da C V	femin	SIM	irmã faleceu por LES	hepático	3	24,0
V C dos S	femin	SIM	não	hepático	3	49,0
AAM	Masc	SIM	Não	hepática	4	21
B M da S	Masc	SIM	não	neuroológico	4,0	37
B S F	Masc	SIM	não	psiquiátrico	2,0	32
R N	Masc	Sim	Não	hepático	SD	SD
M dos S	Masc	SIM	Não	neuroológico	5	25
M de F L	Fem	SIM	não	Hepático	<2	<20
M L da S	Fem	SIM	irmã	Hepático	2,0	<20
NM C M	Fem	NÃO	Tio	hepático	14	69
S O F	Masc	SIM	Irmã	Cardiológico por biópsia	<2	20
V C dos S	Fem	SIM	não	hepático	3,0	49
W B P	Masc	SIM	não	hepático	5,2	30

SD= sem dados

Anexo B – Tabela 10. Mutação dos pacientes de DW e seus respectivos pais.

CASOS	NOME DO FILHO	MUTAÇÃO
23	A A M	3402delC/M645R
18 e 32	A da S	3447 Del A / T 1232 P
7 e 45	A S	3402 (1134)Del C / 3402 (1134)Del C
2	B M da S	3402 Del C / 2438-2440delAA insAT
37 e 21	B S F	3402 Del C / L1088 Amb
38 e 47	C L C B	- / -
9 e 30	D S F	S 921 N / -
15 e 49	D M	R1319X/ IVS 14-12T/A
26 e 43	É S F	3402 Del C / L708 P
11 e 42	É SY	NR
12 e 22	E Mda S	P1273L/S932OCH
14 e 39	F A de S B / F S B	3402 (1134)Del C / 3402 (1134)Del C
46 e 48	J G S F	L708P/3402delC
6 e 28	J L B B	NR
5	J O de J	3402 (1134)Del C / 3402 (1134)Del C
13	L S S	3402(1134)DelC/
10 e 36	L M da S	G1061E / T1232P
8 e 25	L P dos S	NR
41 e 44	M dos S	NR
40	M de F L	3402 (1134)Del C / 3402 (1134)Del C
24 e 27	M L da S	NR
19	N M C M	H1069Q/H1069Q
16	R N	NR
1 e 34	R S	3402 (1134)Del C / R1041W
29	S O F	NR
33 e 3	S Z	L1373 R / -
4 e 31	V da C V	- / -
17 e 50	V C dos S	3402 Del C / 1434 Del C
20 e 35	W B P	3402Del C / 3402 Del C

NR=não realizado; -/-= sem mutação

Anexo C – Termo de consentimento livre esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :
SEXO : .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO
Nº APTO:
BAIRRO:
CIDADE.....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
.....
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO:
..... Nº APTO:
BAIRRO:
CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD
(.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Dosagem urinária de cobre em heterozigotos para doença de Wilson antes e depois da administração de d-penicilamina
.....
2. PESQUISADOR: Jakeliny Vieira Warde
CARGO/FUNÇÃO: pósgraduada - mestrado
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 92481
UNIDADE DO HCFMUSP: Instituto Central da Disciplina de Gastroenterologia do HCFMUSP

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

	SEM RISCO	<u>X</u> RISCO MÍNIMO	RISCO
MÉDIO			
	RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 1 ano.

**III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE
OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA
CONSIGNANDO:****1. justificativa e os objetivos da pesquisa**

Você está sendo convidado a participar de um estudo onde será dosado o cobre na urina de 24 horas.

O objetivo deste estudo é padronizar a excreção urinária do cobre de pais de pacientes com doença de Wilson antes e depois da administração de quatro comprimidos de d-penicilamina (1,0g). A partir do momento que tivermos os valores normais para esse grupo de indivíduos, poderemos comparar com aqueles obtidos em pacientes com doença hepática de causa desconhecida, mas que o diagnóstico de doença de Wilson poderia ser mais bem investigado a partir dessa técnica diagnóstica.

2.procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais

Se você concordar em participar do trabalho, será necessário retornar ao hospital para uma ou duas visitas para avaliar se preenche os critérios do estudo. Durante uma das visitas responderá perguntas sobre sua saúde e será submetido a exame físico. Amostras de sangue serão retiradas de suas veias para avaliar a função do fígado. Também será efetuada a coleta de urina de 24 horas para dosar o cobre na urina. Pode ser que parte das amostras seja guardada em freezer, para realização de futuros exames não previstos neste momento.

3.Desconfortos e riscos esperados

Os riscos da retirada de sangue incluem desconforto no local da inserção da agulha, possibilidade de o local ficar roxo ou vermelho.

Desconforto de coletar urina durante 24 horas.

Existe possibilidade de reações alérgicas ao uso de d-penicilamina, mas como serão utilizados apenas quatro comprimidos, essa chance é muito pequena e com certeza, se houver algum efeito indesejável, ele é reversível.

4. benefícios que poderão ser obtidos

Facilitar o diagnóstico da doença de Wilson em parentes de portadores dessa enfermidade ou em doentes cujo diagnóstico da doença hepática não foi possível, pois as alterações típicas da doença não foram encontradas. Realizar dos exames do fígado gratuitamente e caso seja encontrada alguma alteração, será pesquisada a possível causa.

5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo

Nenhum. Na verdade, na grande maioria das vezes, os pais dos doentes de Wilson só têm um gene da doença, isto é, são heterozigotos, e nunca desenvolverão a doença. Portanto, não necessitariam realizar essa investigação, a não ser que tenham alterações dos exames do fígado.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Toda a equipe de pesquisa estará a sua inteira disposição, a qualquer tempo, para esclarecer qualquer dúvida sobre riscos ou benefícios relacionados à pesquisa.

O indivíduo que participar da pesquisa terá acesso a formulário padrão onde constam os telefones dos médicos da pesquisa no centro de Hospital das clínicas da FMUSP, podendo ligar-nos a qualquer momento.

2. O paciente tem toda a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento.

Não haverá qualquer discriminação no seguimento do paciente, caso parentes não queiram participar da pesquisa.

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Serão mantidos os arquivos por cinco anos após o término da pesquisa. A consulta e a relação médico-paciente pautam-se no respeito mútuo, sendo o sigilo já previsto e obrigatório, conforme o Código de Ética Médica, que é seguido pelos pesquisadores.

4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Os pacientes pertencem ao ambulatório de gastroenterologia clínica – Fígado, e serão seguidos durante e após a pesquisa, como já o eram antes. Os pais que participarem da pesquisa serão liberados após realização dos exames previstos. Caso sejam identificadas alterações nos exames do fígado elas serão investigadas como se faz normalmente no Serviço. Em caso de efeitos colaterais da d-penicilamina, os pacientes serão atendidos pelo pesquisador e pela equipe da disciplina de Gastroenterologia.

5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

O acesso ao projeto é de forma voluntária e não estão previstas indenizações nos custos do projeto, uma vez que os efeitos colaterais são completamente reversíveis.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Previsto no formulário de informação que ficará em poder do paciente, conforme anexo.

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 2006.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

Anexo D – Orientações para coleta de urina de 24h

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo
Estudo em pais dos pacientes com doença de Wilson no ambulatório de
Gastroenterologia Clínica
Avaliação de cobre urinário

COLETA DE URINA DE 24H COM CONSERVANTE ÁCIDO

Orientações ao indivíduo:

Favor identificar adequadamente o frasco com urina , colocando : nome completo e data da coleta, em letra legível.

Estes frascos contêm conservante tóxico, cuidado.

Manter o frasco longe do alcance das crianças.

Ao iniciar o período da coleta esvazie a bexiga completamente e a partir de então, até o dia seguinte, colher toda a urina, inclusive aquela emitida durante a madrugada (se acordar para urinar) e a primeira da manhã do dia seguinte, que **será no mesmo horário em que desprezou a primeira urina do dia anterior.**

Conservar a urina em geladeira durante a coleta até entregar ao laboratório, sempre em frasco devidamente tampado.

Enviar o frasco assim que acabar a coleta.

Não terá pedido do exame de urina, pois será entregue para médica que levará o material para campus Universitário da USP.

Local de entrega:

Laboratório Central
Prédios do ambulatórios
Segundo andar – Bloco nove
Médica: Jakeliny Vieira
Horário das entregas: 07h30min às 10:00h

Anexo E – orientações para coleta de 24 h após o teste de penicilamina

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo
Estudo em pais dos pacientes com doença de Wilson no ambulatório de
Gastroenterologia Clínica
Avaliação de cobre urinário Após teste de Penicilamina

COLETA DE URINA DE 24H COM CONSERVANTE ÁCIDO

Orientações ao indivíduo:

Favor identificar adequadamente o frasco com urina , colocando : nome completo e data da coleta, em letra legível.

Estes frascos contêm conservante tóxico, cuidado.

Manter o frasco longe do alcance das crianças.

Ao iniciar o período da coleta esvazie a bexiga completamente e a partir de então, tome 02 (500 mg) comprimidos de Penicilamina (cuprimine) e após 12 horas tome 02 (500 mg) comprimidos.

A coleta ocorre até o dia seguinte, colha toda a urina, inclusive aquela emitida durante a madrugada (se acordar para urinar) e a primeira da manhã do dia seguinte, que **será no mesmo horário em que desprezou a primeira urina do dia anterior.**

Conservar a urina em geladeira durante a coleta até entregar ao laboratório, sempre em frasco devidamente tampado.

Enviar o frasco assim que acabar a coleta.

Não terá pedido do exame de urina, pois será entregue para médica que levará o material para campus Universitário da USP.

Local de entrega:

Laboratório Central
Prédios do ambulatórios
Segundo andar – Bloco nove
Médica: Jakeliny Vieira
Horário das entregas: 07h30min às 10:00h

Anexo F – Aprovação do projeto pela Comissão de Ética do HC-FMUSP

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27.04.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **302/06**, intitulado: "Dosagem urinária de cobre em heterozigotos para doença de Wilson antes e depois da administração de d-penicilamina" apresentado pelo Departamento de **GASTROENTEROLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado

Pesquisador (a) Executante: Dra. Jakeliny Vieira Warde

CAPPesq, 27 de Abril de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo G – Tabela 11. Dados demográficos e epidemiológicos dos pais (masculino) de pacientes com DW.

CASOS	SEXO	RAÇA	PROFISSÃO	NATURALIDADE	PROCEDÊNCIA
1	M	Branco	escriturário	Campinas -SP	São Paulo -SP
3	M	Branco	Motorista	Presidente Venceslau - SP	Salto -SP
4	M	Branco	Porteiro	Esperança -PB	São Paulo -SP
6	M	Branco	Comerciante	Ilha da Madeira - Portugal	São Paulo -SP
10	M	Branco	vidraceiro	Juanézia- MG	São Paulo-SP
13	M	Negra	vigia	Bom Jesus da Lapa - BA	São Paulo -SP
14	M	Branco	lavrador	Picos - Piauí	Paeslandim - Piauí
15	M	Branco	Encarregado de pátio	Tambaú - SP	São Paulo -SP
16	M	Branco	Comerciante	Itápolis - SP	São Paulo-SP
19	M	Branco	Ajudante geral	Piracicaba - SP	Piracicaba - SP
20	M	Branco	agricultor	Olho de agua das Flores- Al	Juquiá - São Paulo
21	M	Branco	dentista	Uberaba - MG	São Paulo
22	M	Branco	Vendedor	Manaus - AM	São Paulo -SP
23	M	Branco	lavrador	São José -BA	São Paulo
24	M	Negra	Agricultor	União dos Palmares - AL	São Paulo -SP
25	M	Branco	Pedreiro	Jeremoabo - BA	São Paulo -SP
26	M	Branco	Motorista	Piracicaba - MG	São Paulo -SP
30	M	Branco	Professor	São Paulo - SP	São Paulo -SP
32	M	Branco	metalúrgico	Bananeira- Paraíba	São Paulo -SP
42	M	Amarela	Bancário	Marília -SP	São Paulo -SP
44	M	Branco	mecânico	Piracicaba - SP	Indaiatuba - SP
45	M	Negra	Radiador	Santo Hipólito - MG	Francisco Morato - SP
46	M	Branco	Bancário	São Paulo -SP	São Paulo -SP
47	M	Branco	Empreiteiro de obras	Pernambuco- Altinho	São Paulo -SP
50	M	Branco	Comerciante	São Paulo - SP	São Paulo -SP

Anexo H – Tabela 12. Dados demográficos e epidemiológicos dos pais (sexo masculino) de pacientes com DW.

CASOS	IMC	GRAU DE INSTRUÇÃO	ÁLCOOL (USO)	COMORBIDADES
1	30,67	2 grau completo	etilismo	HAS, DM, dislipidêmico, exérese de nódulo pulmonar
3	30,32	1. grau incompleto	Parou há 25 anos	HAS
4	22,41	1. grau incompleto	Parou há 17 anos	Nenhuma
6	26,18	1. grau incompleto	Etilismo social	Nenhuma
10	23,88	1 grau incompleto	Nega	DM,
13	27,43	1 grau incompleto	Nega	HAS,DM, prostatectomia transureteral, hérnia inguinal
14	22,22	1 grau incompleto	Nega	sem comorbidades
15	25,26	1. grau incompleto	Etilismo social	HAS e nefrectomia
16	19,83	curso superior	Nega	hérnia inguinal,
19	29,76	1 grau incompleto	etilismo social	angioplastia(2004), cirurgia da próstata, colicictomia, HAS
20	25,40	semi-analfabeto	ex-etilismo	sem comorbidades
21	24,77	superior completo	Nega	Sem comorbidades
22	23,88	1. grau completo	Nega	Hiperplasia prostática benigna
23	28,55	semi-analfabeto	Nega	HAS
24	27,82	1. grau incompleto	Parou há 21 anos	HAS
25	26,17	semi-analfabeto	Etilismo social	Nenhuma
26	28,69	1. grau incompleto	Etilismo social	bronquite, nefrolitíase
30	26,03	Superior completo	Etilismo social	HAS
32	30,48	1grau incompleto	social	prostatismo
42	27,34	Superior incompleto	Nega	HAS
44	32,65	2 grau completo	Nega	apendicectomia
45	30,12	1. grau incompleto	Nega	Vasectomia
46	29,39	Superior completo	Nega	Nenhuma
47	37,40	1grau incompleto	Nega	HAS, DM, marcapasso
50	29,38	1 grau completo	Nega	HAS e revascularização do miocárdio em 2004

Anexo I – Tabela 13. Dados demográficos e epidemiológicos das mães de pacientes com DW.

CASOS	RAÇA	PROFISSÃO	NATURALIDADE	PROCEDÊNCIA
2	Branco	Do lar	Itapetinga - Bahia	Vale do Ribeira -SP
5	Branco	merendeira	Januário - Minas Gerais	Santana do Parnaíba
7	Negra	Doméstica	Santo Hipólito - MG	São Paulo -SP
8	Branco	Do lar	Jeremoabo - BA	São Paulo
9	Branco	Professora	Presidente Venceslau - SP	São Paulo -SP
11	Amarela	Fisioterapeuta	São Paulo - SP	São Paulo -SP
12	Branco	Do lar	São Paulo - SP	São Paulo -SP
17	Branco	Comerciante	Oricó Mirim - Bahia	Diadema -SP
18	Branco	Do lar	Paraíba	São Paulo -SP
27	Negra	Ajudante geral	União dos Palmares - AL	São Paulo -SP
28	Branco	Do lar	Ilha da Madeira - Portugal	São Paulo -SP
29	Branco	funcionária pública	Alterosa- MG	São Paulo
31	Branco	Do lar	Esperança -PB	São Paulo -SP
33	Branco	Do lar	Santa Catarina	Salto -SP
34	Branco	Do lar	Poços de Caldas - MG	São Paulo -SP
35	Branco	Do lar	olho de agua das flores - Al	juquiá - São Paulo
36	Branco	Do lar	Rio de Janeiro- RJ	São Paulo
37	Branco	Do lar	Uberaba - MG	São Paulo
38	Branco	Do lar	Pernambuco- Belo Jardim	São Paulo -SP
39	Branco	Do lar	Paeslandim - Piauí	Paeslandim Piauí
40	Branco	Do lar	Sergipe - Frei Paulo	São Vicente -SP
41	Branco	Do lar	Piracicaba - SP	Indaiatuba - SP
43	Branco	Do lar	São Domingos da Prata -MG	São Paulo -SP
48	Branco	Do lar	São Paulo - SP	São Paulo -SP
49	Branco	Do lar	São Paulo - SP	São Paulo -SP

Anexo J – Tabela 14. Dados demográficos e epidemiológicos das mães de pacientes com DW.

CASOS	IMC	GRAU DE INSTRUÇÃO	ÁLCOOL (USO)	COMORBIDADES
2	24,88	1 grau incompleto	Nega	sem comorbidades
5	24,91	2 grau completo	Nega	HAS, ICC
7	28,30	1. grau incompleto	Nega	HAS há 3 anos
8	25,14	1 grau incompleto	Nega	HAS, DLP
9	31,08	Superior completo	Nega	Nefrectomia de rim acessório
11	22,89	Superior completo	Nega	Nenhuma
12	22,49	1. grau completo	Nega	Dislipidêmica
17	23,42	1. grau completo	Nega	HAS e dislipidêmica
18	29,78	1. grau incompleto	Nega	HAS, DM e dislipidêmica
27	28,91	1 grau incompleto	Nega	HAS
28	29,05	1. grau incompleto	Etilismo social	HAS há 17 anos
29	31,53	1 grau incompleto	Nega	DLP, HAS, apendicetomizada, nódulo benigna mama, problemas de coluna
31	32,05	1. grau incompleto	Nega	Nenhuma
33	28,65	1. grau incompleto	Nega	HAS e DM
34	24,01	1 grau incompleto	Nega	HAS, DRGE, osteoporose, dislipidêmica
35	27,89	semi-analfabeto	Nega	Osteoporose, artrose
36	23,14	1 grau completo	Nega	sem comorbidades
37	27,56	1 grau completo	Nega	sem comorbidades
38	30,45	1 grau incompleto	Nega	HAS
39	24,8	2 grau incompleto	Nega	sem comorbidades
40	26,67	1 grau incompleto	Nega	colicistectomia, hipotireoidismo, labirintopatia, HAS
41	30,47	1 grau incompleto	Nega	DLP, HAS, diabetes, hipoacusia visual
43	21,26	1. grau incompleto	Nega	HAS há 36 anos
48	26,78	Superior completo	Nega	Nenhuma
49	25,71	1 grau incompleto	Nega	HAS e valvuloplastia mitral

Anexo L – Tabela 15. Parâmetros bioquímicos séricos dos pais (sexo masculino) de pacientes com DW.

CASOS	IDADE	SEXO	ALT (UI/L)	FA (UI/L)	AST (UI/L)	CERULOL (mg/dL)	CU (µg/dL)	GGT (UI/L)
1	69	M	13	98	25	30	88	34
3	64	M	52	54	25	21	62	30
4	53	M	21	77	25	21	57	34
6	54	M	33	85	24	25	84	31
10	52	M	16	58	16	18	66	20
13	57	M	42	80	26	19	62	49
14	60	M	19	65	24	23	71	12
15	79	M	19	62	24	25	82	15
16	67	M	16	51	24	20	56	17
19	64	M	29	82	28	24	66	46
20	74	M	13	61	20	19	50	12
21	53	M	37	59	30	22	62	16
22	67	M	28	97	22	24	70	24
23	80	M	20	49	24	22	73	22
24	72	M	14	91	20	5	22	22
25	55	M	26	48	20	16	44	46
26	60	M	52	65	27	21	40	57
30	60	M	18	65	19	25	83	26
32	75	M	50	99	31	22	47	18
42	54	M	26	52	20	20	144	14
44	52	M	59	68	41	22	74	29
45	50	M	22	49	24	21	64	29
46	59	M	34	62	35	22	150,7	25
47	57	M	23	69	12	34	87	42
50	59	M	24	73	18	23	81	28

Anexo M – Tabela 16. Parâmetros bioquímicos séricos das mães de pacientes com DW.

CASOS	IDADE	SEXO	ALT (UI/L)	FA (UI/L)	AST (UI/L)	CERULOL (mg/dL)	CU (µg/dL)	GGT (UI/L)
2	45	F	24	70	22	24	80	31
5	55	F	105	78	56	31	80	74
7	44	F	23	67	18	34	97	65
8	52	F	21	72	19	24	79	29
9	57	F	16	60	21	23	81	35
11	46	F	15	100	16	31,5	103	13
12	66	F	17	86	30	31	89	24
17	54	F	20	66	22	38	99	21
18	65	F	18	121	21	16	78	20
27	74	F	18	114	15	34	134	30
28	54	F	17	105	19	25	86	12
29	69	F	25	159	30	24	72	178
31	53	F	17	108	16	26	91	21
33	64	F	23	65	18	31	99	16
34	70	F	13	45	16	23	65	37
35	66	F	16	86	22	23	89	13
36	53	F	14	91	19	20	77	24
37	48	F	38	78	41	22	70	11
38	51	F	25	69	19	26	79	16
39	58	F	59	89	57	32	81	15
40	71	F	12	89	19	31	75	17
41	51	F	40	46	22	37,1	102,8	63
43	58	F	14	82	13	27	75	25
48	54	F	28	46	40	32	115,6	11
49	69	F	27	50	24	29	103	36

Anexo N – Tabela 17. Cuprúria dos pais (sexo masculino) de portadores para DW antes e depois da administração de DPA.

CASOS	CUPRÚRIA ANTES DPA	CUPRÚRIA PÓS DPA
1	31,23	976,09
3	30,89	535,18
4	34,81	190,92
6	32,06	739,00
10	34,05	430,54
13	24,99	562,32
14	17,30	757,49
15	29,51	588,97
16	7,33	92,35
19	12,49	148,90
20	12,53	191,59
21	29,82	471,25
22	26,04	238,85
23	10,28	31,59
24	23,10	1085,09
25	22,40	301,69
26	50,50	567,60
30	24,30	1032,02
32	12,90	983,81
42	22,10	816,23
44	18,97	436,65
45	31,28	562,87
46	34,34	449,69
47	59,30	353,78
50	22,31	498,96

Anexo O – Tabela 18. Cuprúria das mães de portadores para DW antes e depois da administração de DPA

CASOS	CUPRÚRIA ANTES DPA	CUPRÚRIA PÓS DPA
5	31,46	641,27
6	13,68	265,78
7	22,30	823,44
8	19,92	524,04
9	18,00	186,59
11	20,31	624,76
12	15,47	490,36
16	23,85	433,87
17	16,30	430,35
19	20,00	157,87
20	17,96	458,27
21	28,82	378,20
23	20,71	394,15
26	20,29	731,40
27	26,00	668,16
3	17,54	832,13
6	5,88	74,21
33	7,97	637,54
39	7,11	562,84
41	32,50	436,54
42	15,05	732,00
44	15,28	686,37
45	9,35	360,19
46	18,73	838,98
43	22,31	764,16

Referências

1. Ala A, Schilsky ML. Wilson's disease: pathophysiology, diagnosis, treatment, and screening. *Clin Liver Dis*. 2004;8:787-805.
2. Araya M, Olivares M, Pizarro F, Méndez MA, Gonzalez M, Uauy R. Supplementing copper at the upper level of the adult dietary recommended intake induces detectable but transient changes in healthy adults. *J Nutr*. 2005;135:2367-71.
3. Barbosa ER, Comerlatti LR, Scaff M, Canelas HM. Degeneração Hepatolenticular: aspectos em 95 casos. *Arq Neuropsiquiat*. 1985;43:234-42.
4. Bearn AG. Genetic and biochemical aspects of Wilson's disease. *Am J Med Sci*. 1953;15:442-9.
5. Beers J, Glerum DM, Tzagoloff A. Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *J Biol Chem*. 1997;272:33191-6.
6. Berman DH, Leventhal RL, Gavalier JS, Cadoff EM, Van Thiel DH. Clinical differentiation of fulminant Wilsonian hepatitis from other causes of hepatic failure. *Gastroenterology*. 1991;100:1129-34.
7. Bremner I. Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr*. 1998;67:1069S-1073S.
8. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson's disease gene is a putative copper transporting P-ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet*. 1993;5:327-37.
9. Buxaderas SC, Farre-Rovira R. Whole blood and serum copper levels in relation to sex and age. *Rev Esp Fisiol*. 1986;42:213-7.

10. Cauza E, Maier-Dosberger T, Polli C, kaserer K, Kramer L, Ferenci P. Screening for Wilson's disease in patients with liver diseases by serum ceruloplasmin. *J Hepatol.* 1997;27:358-62.
11. Cousins RJ. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev.* 1985;65:238-309.
12. Cox DW, Moore SD. Copper transporting P-type ATPases and human disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2002;34:333-8.
13. Cullen LM, Prat L, Cox DW. Genetic variation in the promoter and 5' UTR of the copper transporter, ATP7B, in patients with Wilson's disease. *Clin Genet.* 2003;64:429-32.
14. Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Kems B, Gitlin JD. The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1997;272:23469-72.
15. Cumings JN. The cooper and Iron content of brain and liver in the normal and in hepatolenticular degeneration. *Brain.* 1948;71:410-15.
16. Cumings JN. The effects of BAL in hepatolenticular degeneration. *Brain.* 1951;74:10-22.
17. Da Costa CM, Baldwin D, Portmann B, Lolin Y, Mowat AP, Mieli-Vergani G. Value of urinary copper excretion after penicillamine challenge in the diagnosis of Wilson's disease. *Hepatology.* 1992;15:609-15.
18. Da Cunha S, Filho FM, Antelo DS, de Souza MM. Serum sample levels of selenium and copper in healthy volunteers living in Rio de Janeiro city. *Sci Total Environ.* 2003;301:51-4.

19. Deguti MM, Genschel J, Cançado EL, Barbosa ER, Bochow B, Mucenic M, Porta G, Lochs H, Carrilho FJ, Schmidt HH. Wilson's disease: novel mutations in the ATP7B gene and clinical correlation in Brazilian patients. *Hum Mutat.* 2004;23:398-406.
20. Denning TR, Berrios GE, Washe JM. Wilson's disease and epilepsy. *Brain.* 1988;111:1139-55.
21. Diaz Romero C, Sanchez HP, Blanco FL, Rodriguez RE, Majem SL. Serum copper and zinc concentrations in a representative sample of the Canarian population. *J Trace Elem Med Biol.* 2002;16:75-81.
22. DiDonato M, Hsu HF, Narindrasorasak S, Que L Jr, Sarkar B. Copper-induced conformational changes in the N-terminal domain of the Wilson's disease copper-transporting ATPase. *Biochemistry.* 2000;39:1890-6.
23. Eden A, Green HH. Micro-determination of copper in biological material. *Biochem J.* 1940;34:1202-8.
24. Edward CQ, Williams DM, Cartwright GE. Hereditary hypoceruloplasminemia. *Clin Gen.* 1979;15:311-6.
25. EL-Youssef M. Wilson's disease. *Mayo Clinic Proc.* 2003;78:1126-36.
26. Evans J, Newman S, Sherlock S. Liver copper levels in intrahepatic cholestasis of childhood. *Gastroenterology.* 1978;75:875-8.
27. Ferenci P. Wilson's disease. *Clin Liver Dis.* 1998; 2:31-49.
28. Ferenci P, Caca K, Loudianos G, Mieli-Vergani G, Tanner S, Sternlieb SI, Schilsky M, Cox D, Berr F. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson's disease. *Liver Int.* 2003;23:139-42.

29. Ferenci P. Review article: diagnosis and current therapy of Wilson's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;19:157-65.
30. Fleming CR, Dickson ER, Wahner HW, Hollenhorst RW, McCall JT. Pigmented corneal rings in non-Wilsonian liver disease. *Ann Intern Med.* 1977;86:255-8.
31. Frommer DJ. Urinary copper excretion and hepatic copper concentrations in liver disease. *Digestion.* 1981;21:169-78.
32. Gheorghe L, Popescu I, Jacob S, Gheorghe C, Vaidan R, Constantinescu A, Jacob R, Becheanu G, Angelescu C, Dixulescu M. Wilson's disease: a challenge of diagnosis. The 5-year experience of a tertiary centre. *Rom J Gastroenterol.* 2004;13:179-85.
33. German JL, Bearn AG. Effect of estrogens on copper metabolism in Wilson's disease. *J Clin Invest.* 1961;40:445-53.
34. Gibbs K, Hanka R, Walshe M. The urinary excretion of radiocopper in presymptomatic and symptomatic Wilson's disease, heterozygotes and controls: its significance in diagnosis and management. *Q J Med.* 1978;47:349-64.
35. Gitlin JD. Wilson's disease. *Gastroenterology.* 2003;125:1868-77.
36. Goldfischer S, Sternlieb I. Changes in the distribution of hepatic copper in relation to the progression of Wilson's disease (hepatic lenticular degeneration). *Am J Pathol.* 1968;53:883-901.
37. Gollan JL, Gollan TJ. Wilson's disease in 1998: genetic, diagnostic and therapeutic aspects. *J Hepatol.* 1998;28:28-36.

38. Gow PJ, Smallwood RA, Agnus PW, Smith AL, Sewell RB. Diagnosis of Wilson's disease: an experience over three decades. *Gut*. 2000;46:415-9.
39. Gupta A, Aikath D, Neogi R, Datta S, Basu K, Maity B, Trivedi R, Rav J, Das SK, Gangopadhyay PK, Ray K. Molecular pathogenesis of Wilson's disease: haplotype analysis, detection of prevalent mutations and genotype-phenotype correlation in Indian patients. *Hum Genet*. 2005;118:49-57.
40. Hamza I, Schaefer M, Klomp LW, Gitlin JD. Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson's disease protein is essential for copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:13363-8.
41. Harnly JM, Radziuk B. Effect of furnace atomization temperatures on simultaneous multielement atomic absorption measurement using a transversely - heated graphite atomizer. *J Anal At Spectrom*. 1995;10:197-206.
42. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:439-58.
43. Hinks L, Clayton BE, Lloyd RS. Zinc and copper concentrations in leucocytes and erythrocytes in healthy adults and the effect of oral contraceptives. *J Clin Pathol*. 1983;36:1016-21.
44. Houwen R, Dijkstra M, Kuipers F, Smit EP, Havinga R, Vonk RJ. Two pathways for biliary copper excretion in the rat. The role of glutathione. *Biochem Pharmacol*. 1990 Mar 15;39:1039-44.
45. Hung IH, Suzuki M, Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD, Gitlin JD. Biochemical characterization of the Wilson's disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*.

1997;272:21461-6.

46. Klomp AE, Juijn JA, Van Der Gun LT, Van Der Berg IE, Berger R, Klomp LW. The N-terminus of the human copper transporter 1 (hCTR1) is localized extracellularly, and interacts with itself. *Biochem J.* 2003;370:881-9.
47. La Russo NF, Summerskill WH, McCall JT. Abnormalities of chemical tests for copper metabolism in chronic active liver disease: differentiation from Wilson's disease. *Gastroenterology.* 1976;70:653-65.
48. Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr.* 1996;63:797S-811S.
49. Lockey ME, Behar M, Viteri F, Scrimshaw NS. Value for copper, iron and iron binding capacity in the serum in kwashiorkor. *Pediatrics.* 1958;22:72-9.
50. Ludwig J, Moyer TP, Rakela J. The liver biopsy diagnosis of Wilson's disease. *Am J Clin Pathol.* 1994;102:443-6.
51. Lutsenko S, Kaplan JH. Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry.* 1995;34:15607-13.
52. L'vov BV. The analytical use of atomic absorption spectra. *Spectrochim Acta.* 1961;B17:761-70.
53. Machado A, Chien FH, Deguti MM, Cançado E, Azevedo RS, Scaff M, Barbosa ER. Neurological manifestations in Wilson's disease: Report of 119 cases. *Mov Disord.* 2006;21:2192-6.
54. Maier-Dobersberger T, Mannalte C, Rack S, Granditsch G, Kasereber K, korninger L, Steindl P, Gang A, Ferenci P. Diagnosis of Wilson's disease in an asymptomatic sibling by DNA linkage analysis.

Gastroenterology. 1995;109:2015-8.

55. McCullough AJ, Fleming CR, Thistle JL, Baldus WP, Ludwig J, McCall JT, et al. Diagnosis of Wilson's disease presenting as fulminant hepatic failure. *Gastroenterology*. 1983;84:161-7.

56. McDonald JA, Snitch P, Painter D, Hensley W, Gallagher ND, McCaughan GW. Striking variability of hepatic copper levels in fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol*. 1992;7:396-8.

57. Mucenic M, Cançado ELR, Barbosa ER, Deguti MM, Carrilho FJ, Laudanna AA. Casuística de DW dos serviços de gastroenterologia e neurologia do HC-FMUSP [abstract]. In: Temas livres da V Semana do Aparelho Digestivo, Temas livres, Rio de Janeiro, Brasil, 18-23 agosto; 2002, p.46.

58. O'Halloran TV, Culotta VC. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem*. 2000;275:25057-60.

59. Oder W, Grimm G, Kollegger H, Ferenci P, Schneider B, Deeck L. Neurological and neuropsychiatric spectrum of Wilson's disease: a prospective study of 45 cases. *J Neurol*. 1991;238:281-7.

60. Payne AS, Glitin JD. Functional expression of the Wilson's disease protein reveals mislocalization and impaired copper-dependent trafficking of the common H1069Q mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:10854-9.

61. Petris MJ, Voskoboinik I, Cater M, Smith K, Kim BE, Llanos RM, Strausak D, Camakaris J, Mercer JF. Copper-regulated trafficking of the Menkes disease copper ATPase is associated with formation of a phosphorylated catalytic intermediate. *J Biol Chem*. 2002;277:46736-42.

62. Petrukhin K, Fischer SG, Piratsu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M, Brzustowicz LM, Cayanis E, Vitale E, Russo JJ *et al.* Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson's disease gene. *Nat Genet.* 1993 Dec;5:338-43.
63. Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov T, Ross BM, Kaplan JW, Gilliam TC. Characterization of the Wilson's disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predicting. *Hum Mol Genet.* 1994;3:1647-56.
64. Pfeil SA, Lynn DJ. Wilson's disease: Copper unfettered. *J Clin Gastroenterol.* 1999;29:22-31.
65. Riordan SM, Williams R. The Wilson's disease gene and phenotypic diversity. *J Hepatol.* 2001;34:165-71.
66. Ramakrishna B, Date A, Kirubakaran C, Raghupathy P. Atypical copper cirrhosis in Indian children. *Ann Trop Paediatr.* 1995;15:237-42.
67. Roberts EA, Schilsky ML. A practice guideline on Wilson's disease. *Hepatology.* 2003;37:1475-592.
68. Rosenzweig AC. Copper delivery by metallochaperone proteins. *Acc Chem Res.* 2001;34:119-28.
69. Rukgauer M, Klein J, Kruse-Jarres JD. Reference values for the trace elements copper, manganese, selenium, and zinc in the serum/plasma of children, adolescents, and adults. *J Trace Elem Med Biol.* 1997;11:92-8.
70. Scheinberg IH, Cook CD, Murphy JA. The concentration of copper and ceruloplasmin in maternal and infant plasma at delivery. *J Clin Invest.* 1954; 33:963.

71. Scheinberg IH, Sternlieb I: Wilson's disease. Philadelphia, WB Saunders Co, 1984.
72. Scott J, Gollan JL, Samourian S, Sherlock S. Wilson's disease presenting as chronic active hepatitis. *Gastroenterology*. 1978;74:645-51.
73. Schilsky ML. Wilson's disease: genetic basis of copper toxicity and natural history. *Semin Liver Dis*. 1996;16:83-95.
74. Schilsky ML. Wilson's disease: new insights into pathogenesis, diagnosis, and future therapy. *Curr Gastroenterol Rep*. 2005;7:26-31.
75. Shim H, Harris ZL. Genetic defects in copper metabolism. *J Nutr*. 2003;133 (Suppl 1):1527S-31S.
76. Siegel S, Castellan JR NJ. Estatística não paramétrica para ciências do comportamento. Segunda edição – Artemed – Porto Alegre 2006.
77. Sneddon J, Farah BD, Farah KS. Multielement atomic absorption spectrometry. A historical perspective. *Microchem J*. 1993;48:318-25.
78. Solioz M, Vulpe C. CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci*. 1996;21:237-41.
79. Song YM, Chen MD. A single determination of liver copper concentration may misdiagnose Wilson's disease. *Clin Biochem*. 2000;33:589-90.
80. Songchitsomboon S, Komindr S. Serum zinc and copper in healthy adults living in Bangkok and surrounding districts. *J Med Assoc Thai*. 1996;79:550-7.
81. Spector H, Glusman S, Jatlow P, Seligson D. Direct determination of copper in urine by atomic absorption spectrophotometry. *Clinica Chim Acta*.

1971;31:5-11.

82. Sternlieb I. Fraternal concordance of types of abnormal hepatocellular mitochondria in Wilson's disease. *Hepatology*. 1992;16:728-32.

83. Steindl P, Ferenci P, Dienes HP, Grimm G, Pabinger I, Madl C, Maier-Dobersberger T, Herneth A, Dragosics B, Meryn S, Knoflach P, Granditsch G, Gang AI. Wilson's disease in patients presenting with liver disease: A diagnostic challenge. *Gastroenterology*. 1997;113:212-8.

84. Subramanian I, Vanek ZF, Bronstein JM, Bronstein JM. Diagnosis and treatment of Wilson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2002;2:317-23.

85. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM, Devoto M, Peoercon J, Bush AL, Sternlieb I, Piratsu M, Gusella JF, Evgrafov D, Penchaszageh GK, Honig B, Edelman IS, Soares MB, Sheinberg IH, Gilliam TC. The Wilson's disease gene in copper transporting ATPase with homology to the Menkes's disease gene. *Nat Genet*. 1993;5:344-350.

86. Tao TY, Gitlin JD. Hepatic copper metabolism: insights from genetic disease. *Hepatology*. 2003;37:1241-7.

87. Terres-Martos C, Navarro-Alarcon M, Martin-Lagos F, Lopez-G de la Serrana H, Lopez-Martinez MC. Determination of copper levels in serum of healthy subjects by atomic absorption spectrometry. *Sci Total Environ*. 1997;198:97-103.

88. Tu JB, Blackwell RQ. Studies on levels of penicillamine-induced cupriuresis in heterozygotes of Wilson's disease. *Metabolism*. 1967;16:507-13.
89. Turnlund JR, Keyes WR, Kim SK, Domek JM. Long-term high copper intake: effects on copper absorption, retention, and homeostasis in men. *Am J Clin Nutr*. 2005;81:822-8.
90. Uzman LL, Iber FL, Chalmers TC, Knowlton M. The mechanism of copper deposition in the liver in hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Am J Med Sci*. 1956;231:511-18.
91. Vanderwerf SM, Cooper MJ, Stetsenko IV, Lutsenko S. Copper specifically regulates intracellular phosphorylation of the Wilson's disease protein, a human copper-transporting ATPase. *J Biol Chem*. 2001;276:36289-94.
92. Voskoboinik I, Greenough m, La Fontaine S, Mercer JF, Camakaris J. Functional studies on the Wilson copper P-type ATPase and toxic milk mouse mutant. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;281:966-70.
93. Washe A. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. *Spectrochim Acta*. 1955;B7:108-17.
94. Walshe JM. Penicillamine, a new oral therapy for Wilson's disease. *Am J Med*. 1956;21:487-495.
95. Walshe JM. Wilson's disease. The presenting symptoms. *Arch Dis Child*. 1962;37:253-6.
96. Walshe JM. Wilson's disease presenting with features of hepatic dysfunction: a clinical analysis of eighty-seven patients. *Q J Med*.

1989;70:253-63.

97. Welz B, Schlemmer G, Mudakavi JR. Palladium nitrate-magnesium nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry, performance for the determination of 21 elements. *J Anal AT Spectrom.* 1992;7:1257-71.

98. Welz B, Sperling M. Atomic absorption spectrometry, 3rd edition, Weinheim, New York: Wiley-VCH, 1999.

99. Wiebers DO, Hollenhorst RW, Goldstein NP. The ophthalmologic manifestations of Wilson's disease. *Mayo Clinic Proc.* 1977;52:409-16.

100. Wilson SAK. Progressive lenticular degeneration: a familial nervous disease associated with cirrhosis of the liver. *Brain* 1912;34:295-507.

101. Zuccler SD, Gollan JL. Wilson's disease and hepatic copper toxicosis. In: Zakim D, Boyer TD. Hepatology: a textbook of liver disease. Philadelphia: WB Saunders Co.; 1996.v.2; 1405-28.

Glossário dos termos

Absorbância: é o termo mais conveniente para caracterizar a absorção de luz na espectrofotometria de absorção; sendo o logaritmo da transmitância. Apresenta uma relação linear com a concentração.

Absorção: transformação de energia radiante pela interação com a matéria.

Análises colorimétricas: São técnicas de determinações quantitativas, que comparam a intensidade de cor da amostra com um padrão. A amostra colorida tem características especiais de absorção e desta forma sua cor complementar é absorvida na região visível. A quantidade ou concentração de uma substância pode ser determinada pela medição do quantum de cor complementar absorvido.

Analito: o constituinte a ser detectado e/ou determinado.

Atomização: conversão do analito em átomos livres no estado fundamental, usualmente precedida da volatilização da amostra.

Efeito Zeeman: quando um átomo ou molécula é submetido a um campo magnético os níveis de energia de emissão ou absorção sofrem um deslocamento que é proporcional à intensidade do campo elétrico aplicado.

Correcção de fundo baseado no efeito Zeeman: é usado para corrigir a absorção provocada por radiação não específica, oriunda de partículas sólidas ou moléculas, que são vaporizadas durante a atomização.

Comprimento de onda: É a distância entre duas cristas de onda, medida direção à progressão de onda, usualmente expressa pelo símbolo λ . A unidade é usada no infravermelho e no visível é o nanômetro (nm) equivalente a 10^{-9} metro.

Concentração característica: é uma convenção para definir a magnitude do sinal de absorbância que será produzido pela concentração do analito dada. Na absorção atômica este termo é expresso como a concentração de um elemento, em mg/L ou $\mu\text{g/L}$, requerido para absorver 1% da radiação proveniente da lâmpada de catodo oco, gerando um sinal de absorbância de 0,0044.

$$\text{conc característica(mg/L)} = \frac{\text{Concentração padrão} \times 0,0044}{\text{absorbância mensurada}}$$

Detector: é um elemento sensível à radiação e que pode nos dar a medida da intensidade da mesma; varia desde fotomoléculas até o próprio olho. Um indicador no aparelho converte o sinal do elemento em número.

Limite de detecção: é a menor concentração do analito a ser determinado. É expresso como sendo três vezes a magnitude da linha de base do sinal do branco ou ruído.

Matriz: o principal constituinte da amostra ou outros constituintes diferentes do analito.

Modificador químico: substância que converte o analito em uma forma menos volátil, permitindo maiores temperaturas de pirólise e/ ou converte os concomitantes em uma forma mais volátil, promovendo a separação analito - matriz.

Plataforma de L'vov: dispositivo de grafite que é inserido no interior do tubo que permite o retardamento da atomização até condições de temperatura estável serem alcançadas.

Pirólise: processo de decomposição térmica de componentes químicos resultando na formação de produtos de baixa massa molecular.

Radiação e luz: É uma forma de onda eletromagnética que atravessa no vácuo a uma velocidade 3×10^{10} cm/seg. Ela é classificada em raios infravermelho, visível e ultravioleta, de acordo com o comprimento de onda.

Ressonância: é a condição que o estado de energia de radiação incidente é idêntica com a absorção de átomos, moléculas e outras entidades químicas.

Secagem: remoção de líquido de um precipitado por evaporação através do calor ou agentes secantes.

Sinal analítico: sinal reconhecido que pode estar separado do nível de ruído que é usado para detecção e ou determinação do componente.

Sinal de variabilidade ou ruído: menor sinal detectado indicando a menor concentração de um elemento pode ser mensurado.

Ilustração do efeito de ruído da linha de base na qualificação de pequenos sinais de absorbância.

Soluções de referência: solução com os mesmos solventes como na amostra que contém o analito e possivelmente uma concomitância em concentração conhecida.

Tubo de grafite: é um dispositivo em que se colocada um volume de 5 a 50 uL de amostra para a análise.

Forno de grafite: é um dispositivo onde se coloca o tubo de grafite. É formado por sistema de eletrodos para contato elétrico, sistema de refrigeração com água, sistema de purga com gás inerte (Argônio).

Transmitância: é a razão entre a intensidade incidente e transmitida.

Volatilidade: capacidade de conversão de uma substância química do estado líquido ou sólido para o estado de vapor.