

# Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosas

Primeira submissão em 20/07/10  
Última submissão em 01/09/10  
Aceito para publicação em 21/09/10  
Publicado em 20/12/10

## Possible effects of blood copper on hematological parameters in elderly

Marília Baierle<sup>1</sup>; Juliana Valentini<sup>2</sup>; Clóvis Paniz<sup>3</sup>; Angela Moro<sup>4</sup>; Fernando Barbosa Junior<sup>5</sup>; Solange Cristina Garcia<sup>6</sup>

unitermos	resumo
Idosos	<p><b>Introdução:</b> O cobre é um elemento traço essencial e sua homeostase é importante, principalmente em idosos, uma vez que seu metabolismo está associado a doenças neurodegenerativas e distúrbios na eritropoiese, entre outros. <b>Objetivo:</b> O presente estudo avaliou a associação entre cupremia, parâmetros hematológicos e estresse oxidativo. <b>Materiais e métodos:</b> Amostras de sangue de 39 mulheres idosas (grupo de estudo) e de 20 indivíduos adultos saudáveis (grupo-controle) foram coletadas. As concentrações de cobre sérico foram quantificadas por espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a atividade e o índice de reativação da enzima <math>\delta</math>-aminolevulinato desidratase (ALA-D) foram determinados por espectrofotometria e parâmetros sanguíneos foram analisados em sistema automatizado. Os resultados foram expressos em média <math>\pm</math> desvio padrão (DP). <b>Resultados:</b> As concentrações de cobre, parâmetros hematológicos e índice de reativação da ALA-D para ambos os grupos encontraram-se dentro dos valores de referência. Porém, a atividade da ALA-D (<math>11,47 \pm 2,81 \text{ U.L}^{-1}</math>) foi significativamente inferior no grupo de estudo em comparação com o grupo-controle. Correlações de Spearman (observadas somente nas mulheres idosas) entre as concentrações de cobre <i>versus</i> hemoglobina, hematócrito e atividade da ALA-D foram -0,384; -0,408 e -0,395, respectivamente (<math>p &lt; 0,05</math>). No entanto, o índice de reativação da ALA não apresentou correlação com a cupremia. <b>Discussão e conclusão:</b> Os resultados mostraram que o cobre, mesmo estando nos limites considerados valores de referência, pode estar envolvido na inibição da ALA-D, o que pode alterar parâmetros hematológicos, como a síntese de hemoglobina. Neste sentido, sugere-se que os níveis de referência para o cobre em idosos sejam reavaliados.</p>
Cobre	
Parâmetros hematológicos	
ICP-MS	
Estresse oxidativo	
ALA-D	

## abstract

## key words

**Introduction:** Copper is an essential trace element, and its homeostasis is important, mainly among the elderly, since their metabolism is associated with neurodegenerative diseases and erythropoiesis disorders, among others. **Objective:** This study evaluated the association among cupremia, hematological parameters and oxidative stress. **Material and methods:** Blood samples from 39 elderly women (study group) and 20 health individuals (control group) were collected. The concentrations of serum copper were quantified by ICP-MS. The activity and enzyme ALA-D reactivation index were determined by spectrophotometry and blood parameters were analyzed in the automated system. The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. **Results:** Concentrations of copper, hematological parameters and ALA-D reactivation were within the reference values in both groups. However, ALA-D activity ( $11.47 \pm 2.81 \text{ UL}^{-1}$ ) was significantly lower in the study group compared to the control group. Spearman correlations (observed only in elderly women) between copper concentration versus hemoglobin, hematocrit and ALA-D activity were -0.384, -0.408 and -0.395, respectively ( $p < 0.05$ ). Nonetheless, ALA reactivation index was not related to cupremia. **Discussion and conclusion:** The results showed that copper, although it is within accepted reference values, may be involved in ALA-D inhibition, which may affect hematological parameters such as hemoglobin synthesis. Thus, the reference levels for copper in the elderly should be reviewed.

Elderly  
Copper  
Hematological parameters  
ICP-MS  
Oxidative stress  
ALA-D activity

1. Farmacêutica; doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS.

2. Mestra em Ciências Farmacêuticas; doutoranda do Programa de Pós-graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto-SP.

3. Mestre em Bioquímica Toxicológica; farmacêutico-bioquímico do Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria-RS.

4. Mestra em Farmacologia; doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, Porto Alegre-RS.

5. Professor doutor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, Ribeirão Preto-SP.

6. Professora doutora da Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises da UFRGS, Porto Alegre-RS.

Suporte financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (402243/2005-6) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico (CAPES/DAAD) (23038.002607/2010-82). Bolsa de produtividade em pesquisa a S. C. Garcia.

## Introdução

O cobre (Cu) é amplamente distribuído na natureza e é considerado um elemento traço essencial<sup>(32)</sup>, o qual atua em diversas funções fisiológicas e bioquímicas<sup>(30)</sup>, sendo constituinte de muitas metaloproteínas e metaloenzimas<sup>(5)</sup>. Para a população em geral, a maior parte deste micronutriente é obtida da dieta, por legumes, carnes, frutos secos e bebidas, inclusive água<sup>(49)</sup>. O consumo diário de cobre em adultos varia entre 0,9 e 2,2 mg. Por outro lado, a exposição ocupacional se dá em trabalhadores de usinas, minas, e nos que realizam operações de soldagem, fundição de metais e atividades afins<sup>(21)</sup>.

É um metal redox fortemente ativo, predominantemente encontrado na forma de íon cúprico (Cu II), podendo também apresentar-se na forma de íon cuproso (Cu I) no interior das células<sup>(30)</sup>. Esta capacidade redox é o que o torna útil em diversas etapas da geração de energia. Mas é também o que lhe permite catalisar, quando em seu estado “livre”, a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são prejudiciais ao organismo<sup>(7)</sup>. Cerca de 85% a 95% do cobre estão ligados covalentemente a ceruloplasmina sérica<sup>(7)</sup>, por isso sua quantificação é realizada preferencialmente no soro na maioria dos estudos<sup>(30)</sup>.

Há diversos trabalhos demonstrando que o cobre é cofator de enzimas<sup>(20)</sup> como superóxido dismutase (SOD)<sup>(30)</sup>, lisil oxidase<sup>(11)</sup>, citocromo c oxidase e ceruloplasmina<sup>(40)</sup>. Estudos experimentais em animais têm mostrado que a deficiência de cobre pode reduzir significativamente a atividade da lisil oxidase nos ossos, prejudicando a formação de colágeno e elastina. Em humanos, há evidências sobre a deficiência de cobre estar relacionada com idade e osteoporose<sup>(11)</sup>.

A deficiência de cobre é rara em humanos<sup>(32, 49)</sup>, uma vez que esse nutriente é facilmente consumido e tem uma dose diária requerida muito baixa<sup>(49)</sup>. No entanto, quando há carência, a função de diferentes órgãos<sup>(5)</sup> e de vários sistemas de defesa do organismo fica comprometida, como no caso da SOD, uma enzima antioxidante que apresenta sua atividade diminuída nesta situação<sup>(41)</sup>. Entre as patologias associadas à deficiência de cobre destaca-se a doença de Menkes, uma patologia hereditária na qual a codificação genética errada na produção da proteína ATP7A provoca um defeito no transporte intracelular de cobre, fazendo que ocorra menor absorção do metal e inversão da distribuição do mesmo pelos órgãos, principalmente durante a infância, período crítico para o desenvolvimento do cérebro, provocando como consequência graves efeitos neurológicos<sup>(15)</sup>.

Pacientes com deficiência de cobre podem ainda desenvolver déficits hematopoiéticos, resultando em anemia hipocrômica microcítica<sup>(24, 47)</sup> associada a leucopenia<sup>(28, 32, 49)</sup> e neutropenia<sup>(19, 32)</sup>. Como já foi dito, o cobre atua como um cofator da ceruloplasmina, enzima que oxida o ferro, permitindo, assim, sua mobilização e seu transporte de estoques hepáticos para a medula óssea a fim de ser usado na eritropoiese<sup>(16, 21, 32, 49)</sup>. Dessa forma, a deficiência de cobre resulta em excesso de ferro no fígado e insuficiência de ferro na medula, impossibilitando uma eficaz eritropoiese<sup>(49)</sup>. Alterações hematológicas, causadas pela deficiência de cobre, também podem ser observadas em pacientes que, devido a alguma doença crônica, tornaram-se dependentes de nutrição enteral ou parenteral, fazendo uso das mesmas por um longo prazo, sem, no entanto, realizar concomitante suplementação de cobre<sup>(27, 32)</sup>.

Mais recentemente, tem sido demonstrado o papel da deficiência de cobre na patogênese de hipertensão arterial e doenças cardiovasculares (DCVs)<sup>(20, 28)</sup>, e o que se sabe é que a concentração plasmática desse metal modifica significativamente a atividade de sistemas de transporte de sódio na membrana de eritrócitos, fato que está diretamente associado à referida patologia<sup>(20)</sup>.

Embora seja um elemento traço essencial para o organismo, quando em excesso pode causar efeitos tóxicos. Um dos distúrbios associados à hipercupremia é a doença de Wilson, uma enfermidade causada por herança autossômica recessiva no cromossomo 13 e que pode surgir mesmo depois dos 50 anos de idade<sup>(4)</sup>. O mecanismo desta doença consiste basicamente no acúmulo de cobre nos hepatócitos, provocando alterações cerebrais e hepáticas irreversíveis já bem estabelecidas<sup>(4)</sup>. Outra característica dessa doença é a deposição de cobre na córnea, formando os anéis de Kayser-Fleischer<sup>(4)</sup>.

Atualmente, tem surgido certa preocupação com os limites da homeostase do cobre, uma vez que a autoadministração de microminerais e suplementos vitamínicos tornou-se uma prática comum mundialmente<sup>(2, 3)</sup>. Nessa linha, há relatos de que algumas pessoas, mesmo apresentando concentrações dentro dos valores de referência para o cobre no sangue, podem desenvolver toxicidade ao longo da vida<sup>(7)</sup> devido a sua relação com doenças crônico-degenerativas. Diversos estudos relatam a função do cobre em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e o mal de Parkinson, que geralmente acometem idosos, demonstrando que a ingestão elevada de cobre pode estar associada a um declínio cognitivo

acelerado, principalmente se, em conjunto, houver uma dieta rica em gordura saturada e gorduras trans<sup>(6, 7, 26, 31, 40)</sup>. Além disso, a maioria das doenças neurodegenerativas tem sua origem em reações com radicais livres ou espécies reativas<sup>(38, 46)</sup>. A elevação de cobre também causa toxicidade relacionada com a peroxidação lipídica de membranas, uma vez que, quando encontrado na forma monovalente (Cu I), o metal está disponível para transferir um elétron, gerando, assim, espécies reativas de oxigênio (EROS), como radicais hidroxila, peróxido de hidrogênio e íons superóxido, que estão intimamente ligados ao estresse oxidativo, provocando dano celular, oxidação proteica e danos ao DNA<sup>(30)</sup>.

Adicionalmente, estudos recentes<sup>(34, 44, 45)</sup> demonstram que em patologias associadas ao estresse oxidativo, a enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (ALA-D) tem sua atividade diminuída. Essa enzima é envolvida na biossíntese do grupo prostético heme, sendo, portanto, essencial na eritropoiese<sup>(39)</sup>.

Em suma, é sabido que o estresse oxidativo está associado a doenças crônico-degenerativas observadas com o envelhecimento<sup>(22, 25, 26, 37)</sup> e que o cobre pode estar implicado na etiologia dessas doenças. No entanto, existem poucos e contraditórios estudos sobre a homeostase desse metal em idosas<sup>(5, 26, 38)</sup>. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar as concentrações séricas de cobre, parâmetros hematológicos, atividade e reativação da ALA-D em idosas e verificar possíveis correlações.

## Materiais e métodos

### Seleção e coleta das amostras

O estudo foi realizado com amostras de 39 mulheres idosas (grupo de estudo) com idade média de 72 anos ( $\pm 6,7$  anos) e 20 indivíduos saudáveis (grupo-controle composto por 10 homens e 10 mulheres) com idade média de 42,5 anos ( $\pm 8,4$  anos), residentes em Santa Maria-RS.

Para ambos os grupos, os critérios de exclusão adotados foram: doenças metabólicas; doenças agudas ou crônicas graves; tabagismo; etilismo; uso de suplementação vitamínica e/ou antioxidantes. Em particular, entre as voluntárias idosas, foram excluídas do estudo as que tinham diagnóstico de doenças neurológicas ou psiquiátricas congênitas e adquiridas graves.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) (131/06)

e as participantes ou responsáveis preencheram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Para o estudo foram coletados 10 ml de sangue com e sem anticoagulante. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a 1.500 g por 10 minutos a 4°C, sendo que o soro utilizado para quantificação de cobre foi separado e acondicionado (-20°C) em *ependorfs* previamente descontaminados até o momento da análise. Para a atividade da ALA-D foi utilizado sangue total com heparina, o qual foi mantido a -80°C até o momento da análise. As análises hematológicas foram realizadas no mesmo dia da coleta, usando sangue com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

### Quantificação do cobre

A quantificação total de cobre sérico foi realizada por espectrometria de massas com fonte de plasma acoplado (ICP-MS), de acordo com o método publicado por Palmer *et al.*<sup>(33)</sup>.

### Atividade e reativação da ALA-D

A atividade e o índice de reativação da enzima ALA-D foram dosados em sangue total por espectrofotometria de acordo com o método de Sassa<sup>(36)</sup>, com algumas modificações. A atividade da enzima foi determinada pela taxa de formação de porfobilinogênio (PBG) na presença (concentração de 2 mM) e ausência do agente redutor ditioneitol (DTT). Assim, para a atividade da ALA-D houve uma pré-incubação de 10 min da amostra previamente hemolisada, e a reação enzimática foi iniciada pela adição de 4 mM de ácido  $\delta$ -aminolevulinico ( $\delta$ -ALA) em solução tampão fosfato de potássio (TFK) pH 6,8, perfazendo 1 h a 37°C. Para o índice de reativação da enzima, a única diferença foi a adição de DTT 2 mM aos tubos antes do período de pré-incubação. O produto de ambas as reações foi quantificado a 555 nm. O índice de reativação da ALA-D foi estimado pela equação:  $A - B / A \times 100$ , onde A = absorvância da ALA-D com DTT; B = absorvância da ALA-D sem DTT. A atividade da ALA-D foi expressa em U.L<sup>-1</sup> (nmol PBG/h/mg Hb) e o índice de reativação, em porcentagem (%).

### Análises hematológicas

Os hemogramas foram realizados por método automatizado por meio de contador de células Coulter T-890 (Coulter Co., EUA) e microscopia complementar (para contagem diferencial de leucócitos).

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa Statistica versão 6.0 e os resultados obtidos foram expressos na forma de média ± desvio padrão (DP). Devido à distribuição não normal das variáveis, foi utilizado teste de Mann Whitney para verificar diferenças estatísticas entre os grupos estudados e teste de Spearman para avaliar as correlações entre as variáveis. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

### Resultados

Para todos os parâmetros aqui analisados não houve diferença estatística relacionada com o sexo no grupo de controles (dados não mostrados). As médias das concentrações de cobre encontradas no soro das idosas e no grupo-controle participante foram de  $130,25 \pm 22,83 \mu\text{g}/\text{dl}^{-1}$  e  $96,3 \pm 11,9 \mu\text{g}/\text{dl}^{-1}$ , respectivamente, sendo significativamente mais elevada no primeiro grupo. Ambos os grupos apresentaram cupremia dentro dos valores de referência para adultos, os quais são de 80 a  $155 \mu\text{g}/\text{dl}^{-1}$  para mulheres e 70 a  $140 \mu\text{g}/\text{dl}^{-1}$  para homens<sup>(10)</sup>.

A **Tabela** mostra os resultados obtidos para os parâmetros hematológicos no grupo das mulheres idosas e no grupo-controle, respectivamente. Em ambos os grupos as médias dos parâmetros hematológicos encontraram-se dentro dos valores de referência<sup>(13)</sup>.

No entanto, na **Figura 1** é possível observar que três voluntárias idosas apresentaram índices hematimétricos abaixo de 30% para hematócrito e de  $10 \text{ g}/\text{dl}^{-1}$  para hemoglobina. Nessas mesmas voluntárias os valores de volume

### Resultados dos parâmetros hematológicos nos grupos estudados apresentados como média ± desvio padrão

Tabela

Parâmetros	Mulheres idosas (n = 39)	Grupo-controle (n = 20)
Eritrócitos ( $\text{M.}\mu\text{l}^{-1}$ )	$4,4 \pm 0,4$	$4,55 \pm 0,55$
Hemoglobina ( $\text{g}/\text{dl}^{-1}$ )	$13,3 \pm 1,5$	$13,78 \pm 1,05$
Hematócrito (%)	$39,9 \pm 4,4$	$43,15 \pm 2,6$
Volume corpuscular médio (fL)	$90,5 \pm 3,7$	$92 \pm 4,52$
Plaquetas (número de plaquetas/ $\text{mm}^3$ )	$230,157 \pm 55,361$	$262,152 \pm 60,36$
Leucócitos (número de leucócitos/ $\text{mm}^3$ )	$6,562 \pm 1,707$	$6,710 \pm 1,815$

corpuscular médio (VCM) das hemáceas encontraram-se dentro do valor de referência<sup>(13)</sup>.

Por meio da avaliação das correlações de Spearman foram observadas correlações negativas significativas ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações de cobre versus concentrações de hemoglobina e concentrações de cobre versus porcentagem do hematócrito nas voluntárias idosas (Figura 1). Para o grupo-controle não foram observadas tais correlações ( $p > 0,05$ ).

A atividade e a reativação da enzima ALA-D são mostradas na **Figura 2**. Comparações entre os grupos (teste de Mann Whitney) mostraram que a atividade enzimática quantificada nas idosas foi inferior àquela observada nas mulheres adultas ( $p < 0,05$ ). Também, o índice de reativação da ALA-D foi significativamente diferente entre os grupos aqui

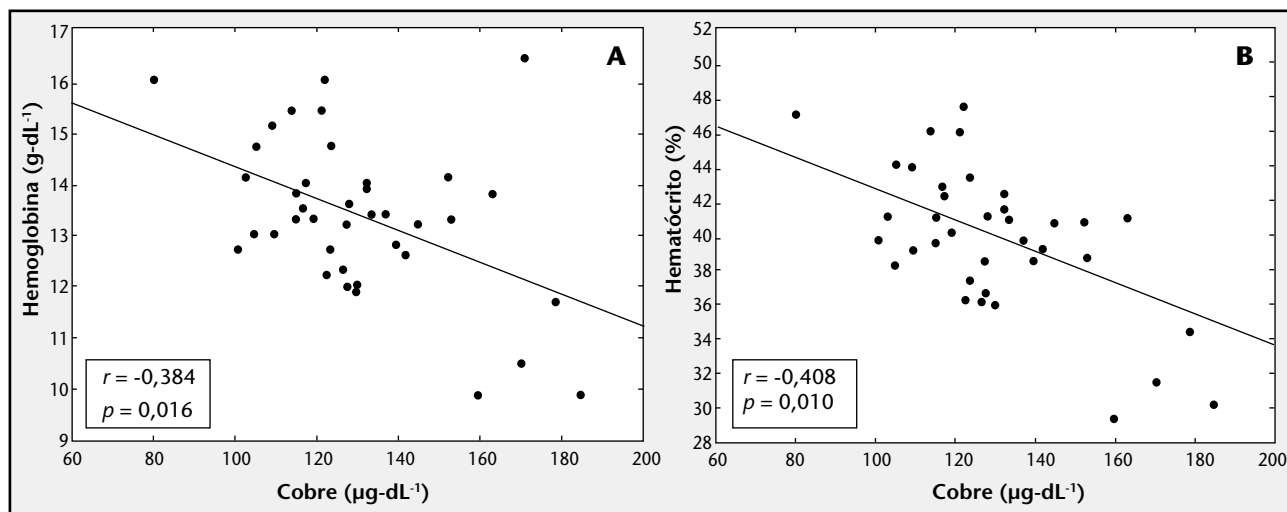
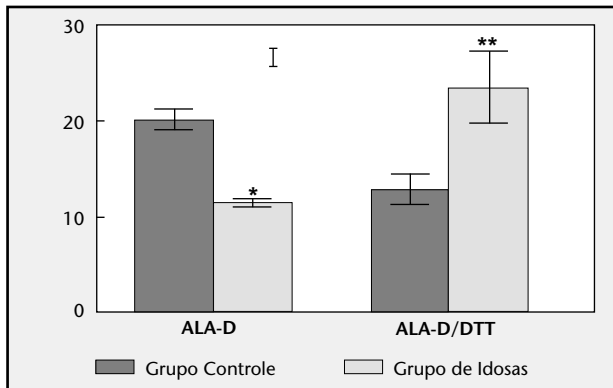


Figura 1 – Correlação entre níveis séricos de cobre versus concentrações de hemoglobina (A) e valores de hematócrito (B) no grupo das mulheres idosas (n = 39)

estudados ( $p < 0,05$ ). Com o índice de reativação da ALA-D encontrado para o grupo de idosas, a atividade enzimática calculada (atividade observada nas idosas + porcentagem reativada pelo DTT) seria de  $13,9 \pm 3,23 \text{ U.L}^{-1}$ , valor esse inferior ao observado no grupo-controle. Adicionalmente, foi observado que, em relação à ALA-D, apenas a atividade da enzima foi negativamente correlacionada com a concentração de cobre sérico (**Figura 3**), e essa correlação foi verificada somente no grupo de idosas, as quais tinham menor atividade enzimática.

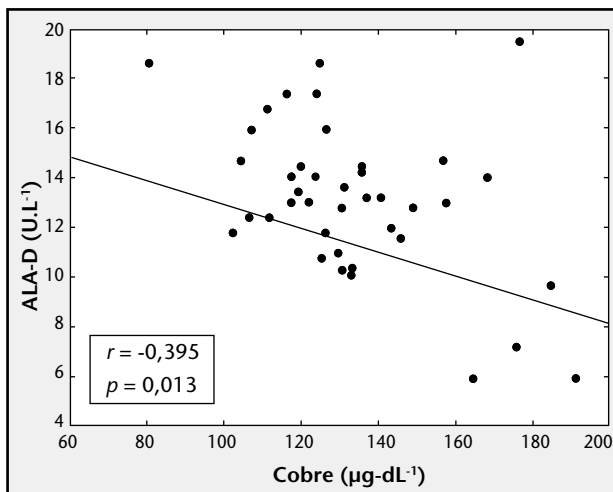


**Figura 2** – Atividade da ALA-D e índice de reativação enzimática na presença de DTT (ALA-D/DTT)

\*Atividade da ALA-D significativamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ );

\*\*Reativação da ALA-D significativamente diferente do grupo controle ( $p < 0,05$ ).

ALA-D:  $\delta$ -aminolevulinato desidratase; DTT: ditiotreitól.



**Figura 3** – Correlação entre concentração de cobre sérico versus enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase no grupo das mulheres idosas ( $n = 39$ )

## Discussão

Uma vez que a expectativa de vida populacional tem aumentado continuamente ao longo do tempo<sup>(48)</sup> e que o envelhecimento é uma preocupação mundial, o qual tem se tornado motivo de muita discussão na última década, são de extrema importância a investigação e o entendimento

das inevitáveis mudanças fisiológicas que acompanham o processo de envelhecimento humano. Nesse estudo a média dos valores de cobre sérico, hemoglobina e hematócrito das voluntárias avaliadas encontraram-se dentro dos valores de referência para indivíduos saudáveis. Para os índices hematimétricos, três voluntárias idosas apresentaram valores abaixo dos de referência. Nessas idosas, pelos resultados do VCM, descarta-se a hipótese de anemia carencial. Porém não é possível precisar qual a causa dessa anemia, uma vez que doenças crônicas ou perdas subclínicas, comuns nessa faixa etária, poderiam figurar entre as possíveis causas desse distúrbio.

Apesar disso, no grupo de idosas foram observadas correlações negativas entre concentração de cobre sérico com hemoglobina e hematócrito, respectivamente.

Sabe-se que o cobre atua na eritropoiese, sendo cofator da ceruloplasmina, a qual é responsável pela oxidação do ferro necessário para a produção de hemoglobina<sup>(32, 49)</sup>. Assim, a associação negativa entre concentração de cobre e os parâmetros hematológicos aqui analisados (Figura 1) parece ter relação com a reduzida atividade da ALA-D, como demonstrado na Figura 3. Na literatura científica, a atividade da ALA-D para indivíduos adultos saudáveis foi reportada por Valentini *et al.*<sup>(45)</sup> e Hernandez *et al.*<sup>(18)</sup>, os quais apresentaram valores similares aos achados neste estudo para o grupo-controle. No entanto, a atividade enzimática nas idosas foi significativamente inferior aos controles do presente estudo, bem como aos valores já reportados nos estudos prévios anteriormente citados.

A ALA-D faz parte da via biossintética do grupo prostético heme, sendo, portanto, essencial para a produção de hemoglobina. É, além disso, altamente sensível a elementos pró-oxidantes, os quais agem nos grupamentos sulfidríla (-SH) da mesma, resultando em redução da sua atividade e consequentemente, prejudicando a síntese da heme. Além disso, o acúmulo do substrato da enzima, o  $\delta$ -ALA, no sangue exacerba a produção de EROS, contribuindo para o estresse oxidativo<sup>(34, 39, 45)</sup>. Quando foi avaliado no grupo de idosas o envolvimento dos grupos -SH na inibição da enzima, por meio da reação com DTT, notou-se, pela porcentagem de reativação média, que a atividade da ALA-D não foi restaurada até sua provável normalidade, o que nos leva a sugerir que outros grupos essenciais da enzima e não reativáveis pelo DTT estão envolvidos na inibição da ALA-D. Esses achados corroboram a similaridade entre o índice de reativação observado no grupo das idosas e os valores reportados nos trabalhos de Valentini *et al.*<sup>(44)</sup> e Gonçalves *et al.*<sup>(14)</sup> para indivíduos adultos saudáveis. Embora o índice

de reativação da ALA-D tenha apresentado diferença significativa entre os grupos aqui estudados (idosas vs. controle), a ausência de correlação entre as concentrações séricas de cobre e a reativação enzimática reforça a hipótese de que outros grupos da enzima podem estar inibidos, uma vez que, se a inibição dos grupos -SH da enzima fosse o único alvo do cobre, a restauração da atividade enzimática pelo DTT (agente redutor) seria total.

A inibição da ALA-D por diferentes metais é bem descrita na literatura tanto *in vitro* quanto *in vivo*<sup>(1, 23, 35)</sup>. Particularmente para o cobre, desde 1977<sup>(42)</sup> já é reportada ação inibitória sobre a atividade da ALA-D *in vivo*. Além disso, estudos *in vitro* do grupo de Despaux *et al.*<sup>(12)</sup> equiparam o potencial inibidor sobre a ALA-D do cobre e do chumbo, um clássico inibidor da ALA-D. Outros estudos *in vitro* contribuem para esses achados, uma vez que Tomokuni<sup>(43)</sup> investigou o efeito de 15 metais sobre a atividade da ALA-D eritrocitária, e o cobre estava entre os quatro metais que ocasionaram um grau de inibição da atividade da enzima similar à inibição causada pelo chumbo. Porém, nenhum destes estudos reportou o índice de reativação da ALA-D e sua relação com o cobre sérico, sendo os achados dessa análise aqui discutidos um diferencial, ainda mais acrescidos do grupo de estudo formado por idosos.

A ligação de metais às proteínas já foi objeto de uma grande revisão sobre a biologia molecular e a toxicologia de metais<sup>(21)</sup>. Enzimas são os alvos de toxicidade mais bem documentados, entretanto elas também podem desempenhar um papel protetor, reduzindo a atividade (toxicidade) do metal, como é o caso das metalotioneínas. Diversos tipos de interação proteína-metal podem ser considerados, e isto é possível porque muitas dessas proteínas são, geralmente, não específicas, ou seja, aceitam substratos que diferem consideravelmente em sua estrutura química e não são capazes de discriminar entre os substratos, cuja única alteração é a colocação de um íon metálico<sup>(21)</sup>.

Dessa forma, sugere-se que o cobre pode possuir afinidade tanto pelos grupamentos -SH da ALA-D como por outros sítios de ligação não responsivos à ação redutora do DTT. Como essa enzima é necessária para a síntese da heme, sua inibição implica uma menor produção de hemoglobina, fato esse demonstrado pela correlação negativa entre o cobre e parâmetros hematológicos aqui analisados.

Sabe-se que o cobre em fluidos biológicos e tecidos pode manifestar-se sob formas físico-químicas variadas, como íons livres (Cu<sup>1+</sup>, Cu<sup>2+</sup>), complexos de baixo peso molecular e/ou macromoleculares<sup>(29)</sup>. Além disso, no organismo humano a farmacocinética do cobre orgânico e inorgânico é

também diferente. O cobre orgânico, presente nos alimentos, onde se encontra ligado às proteínas, é primeiramente processado pelo fígado e capturado em formas não tóxicas por moléculas como ceruloplasmina, metalotioneína e chaperonas<sup>(9)</sup>, o que não permite a liberação excessiva no total de cobre livre no sangue. Já o cobre inorgânico, consumido na água potável ou em suplementos minerais, em grande parte ignora o fígado e entra na circulação como cobre livre<sup>(9)</sup>, contribuindo imediatamente para o total de cobre livre no sangue<sup>(7)</sup>. Isso se torna importante quando discutimos os efeitos negativos do cobre na água potável e em suplementos de vitaminas e minerais sobre a cognição na doença de Alzheimer e outras patologias neurodegenerativas, como Parkinson<sup>(7)</sup>.

No que se refere à toxicidade do cobre durante o envelhecimento, Brewer<sup>(7)</sup> reafirma a hipótese de correlação positiva entre cobre livre com comprometimento cognitivo leve e doença de Alzheimer, respectivamente. Vale ressaltar que, nos últimos anos, a doença de Alzheimer tem se tornado uma epidemia, principalmente em países desenvolvidos que utilizam encanamentos de cobre<sup>(8)</sup>. Outros estudos em humanos, porém avaliando o cobre proveniente de suplementos alimentares, também associam a concentração de cobre livre à diminuição da capacidade cognitiva<sup>(31)</sup>.

Embora o conhecimento do conteúdo total do metal, numa dada amostra, seja insuficiente para a compreensão de sua farmacocinética e farmacodinâmica em humanos, uma vez que estes aspectos dependem da análise de especiação<sup>(29)</sup>, foi possível observar que essa quantificação é útil para apontar alterações que mereçam uma investigação mais abrangente. Além disso, com os resultados observados nesse trabalho pode-se sugerir que os valores de referência da concentração sérica de cobre para adultos podem não ser adequados para idosos.

## Conclusão

A investigação laboratorial tem papel crucial na avaliação de doenças hematológicas<sup>(17)</sup>. Assim, deve-se sempre procurar empregar parâmetros mais recentes de análise, além dos já bem estabelecidos, o que permitirá a detecção precoce de doenças e, conseqüentemente, a sua prevenção. Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o conhecimento do *status* de cobre em idosos aliado a biomarcadores do estresse oxidativo, como a ALA-D, fornece informações relevantes para profissionais da saúde, pois,

mesmo em concentrações consideradas normais, esse metal pode afetar o desempenho de rotas biológicas essenciais, como a síntese de hemoglobina. No entanto, estudos que avaliem os mecanismos envolvidos na inibição da referida enzima na presença de cobre são ainda necessários.

Além disso, é preciso um entendimento melhor da relação entre o cobre e suas espécies e os efeitos sobre a saúde humana, de modo que possa ocorrer uma avaliação de risco mais precisa. A análise de especiação do cobre no soro é essencial para identificar as espécies formadas, entender e estimar os mecanismos de interação entre o analito e seus alvos biológicos e, conseqüentemente, calcular mais

acuradamente os riscos à saúde em diferentes etapas da vida, como no processo de envelhecimento.

## Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (proc. 402243/2005-6) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Serviço Alemão de Intercâmbio Acadêmico (CAPES/DAAD) (proc. 23038.002607/2010-82). E, ainda, ao CNPq pela bolsa de produtividade à pesquisadora S. C. Garcia.

## Referências

1. ALLAIN, P.; PREMEL-CABIC, A. Influence of metals and non-steroid anti-inflammatory drugs on the activity of human red cell ALA dehydratase "in vitro". *Pathol Biol*, v. 25, n. 8, p. 535-40, 1977.
2. ALVES, C.; LIMA, R. V. B. Dietary supplement use by adolescents. *J Pediatr*, v. 85, n. 4, p. 287-94, 2009.
3. ARAYA, M. *et al.* Supplementing copper at the upper level of the adult dietary recommended intake induces detectable but transient changes in healthy adults. *J Nutr*, v. 135, p. 2367-71, 2005.
4. BALKEMA, S. *et al.* Haemolytic anaemia as a first sign of Wilson's disease. *J Med*, v. 66, n. 8, p. 344-7, 2008.
5. BELBRAOUE, S. *et al.* Serum zinc and copper status in hospitalized vs. healthy elderly subjects. *J Am Coll Nutr*, v. 26, n. 6, p. 650-4, 2007.
6. BHATTACHARYA, J. *et al.* Interaction of hemoglobin and copper nanoparticles: implications in hemoglobinopathy. *Nanomedicine*, v. 2, p. 191-9, 2006.
7. BREWER, G. J. Risks of Copper and iron toxicity during aging in humans. *Che Res Toxicol*, v. 23, p. 319-26, 2010.
8. BREWER, G. J. The risks of copper toxicity contributing to cognitive decline in the aging population and to Alzheimers disease. *J Am Coll Nutr*, v. 28, n. 3, p. 238-42, 2009.
9. BREWER, G. J. The risks of free copper in the body and the development of useful anticopper drugs. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 11, p. 727-32, 2008.
10. BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. *Fundamentos de química clínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
11. CASHMAN, K. D. *et al.* No effect of copper upplementation on biochemical markers of bone metabolism in healthy young adult females despite apparently improved copper status. *Eur J Clin Nutr*, v. 55, p. 525-31, 2001.
12. DESPAUX, N. *et al.* Postulated mode of action of metals on purified human ALA-dehydratase. *Biomedicine*, v. 27, p. 358-61, 1977.
13. FAILACE, R. *Hemograma*. Manual de interpretação. Porto Alegre: Artmed Editora, 2003.
14. GONÇALVES, T. L. *et al.* Involvement of oxidative stress in the pre-malignant and malignant states of cervical cancer in women. *Clin Biochem*, v. 38, p. 1071-5, 2005.
15. GYBINA, A. A.; TKAC, I.; PROHASKA, J. R. Copper deficiency alters the neurochemical profile of developingrat brain. *Nutr Neurosci*, v. 12, n. 3, p. 114-22, 2009.
16. HALFDANARSON, T. R. *et al.* Hematological manifestations of copper deficiency: a retrospective review. *Eur J Haematol*, v. 80, p. 523-31, 2008.
17. HERKLOTZ, R.; RISCH, L.; HUBER, A. R. Conventional and new laboratory parameters in the evaluation of hematologic disease. *Ther Umsch*, v. 61, n. 2, p. 93-102, 2004.
18. HERNANDEZ, A. F. *et al.* Changes in erythrocyte enzymes in humans long-term exposed to pesticides Influence of several markers of individual susceptibility. *Toxicol Lett*, v. 159, p. 13-21, 2005.
19. HIGUCHI, T. *et al.* Correction of copper deficiency improves erythropoietin unresponsiveness in hemodialysis patients with anemia. *Intern Med*, p. 271-3, 2006.
20. KEDZIERSKA, K. *et al.* Trace elements modify the activity of sodium transporting systems in erythrocyte membrane in patients with essential hypertension-preliminary study. *Nephrol Dial Transplant*, v. 20, p. 469-71, 2005.
21. KLAASSEN, C. D. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill, 2001.
22. MARIANI, E. *et al.* Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, v. 827, p. 65-75, 2005.
23. MELGAARD, B.; CLAUSEN, J.; RASTOGI, S. C. Heavy metal levels and delta-amino-levulinic acid dehydrase levels in peripheral polyneuropathy. *Acta Neurol Scand*, v. 53, n. 4, p. 291-307, 1976.
24. MENÉNDEZ, A. M. *et al.* Relación entre las cantidades de cobre y zinc administradas a pacientes graves con nutrición parenteral total y los niveles de cobre y zinc en plasma y eritrocitos. *Nutr Hosp*, v. 23, n. 4, p. 373-82, 2008.

25. MEYDANI, M. Antioxidants e cognitive function. *Nutr Rev*, v. 59, n. 8, 75S-80S, 2001.
26. MEZZETTI, A. *et al.* Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Radic Biol Med*, v. 25, n. 6, p. 676-81, 1998.
27. MILNE, D. B.; JOHNSON, P. E. Assessment of copper status: effect of age and gender on reference ranges in healthy adults. *Clin Chem*, v. 39, n. 5, p. 883-7, 1993.
28. MILNE, D. B.; NIELSEN, F. H. Effects of a diet low in copper on copper-status indicators in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, v. 63, p. 358-64, 1996.
29. MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. *Quim Nova*, v. 27, n. 2, p. 251-60, 2004.
30. MORO, A. M. *et al.* Quantificação laboratorial de cobre sérico por espectrofotometria Vis comparável à espectrometria de absorção atômica com chama. *J Bras Patol Med Lab*, v. 43, n. 4, p. 251-6, 2007.
31. MORRIS, M. C. *et al.* Dietary copper and high saturated and *trans* fat intakes associated with cognitive decline. *Arch Neurol*, v. 63, p. 1085-8, 2006.
32. NAGANO, T. *et al.* Clinical features of hematological disorders caused by copper deficiency during long-term enteral nutrition. *Intern Med*, v. 44, n. 6, p. 554-9, 2005.
33. PALMER, C. D. *et al.* Determination of lead, cadmium and mercury in blood for assessment of environmental exposure: a comparison between inductively coupled plasma-mass spectrometry and atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B At Spectrosc*, v. 61, p. 980-90, 2006.
34. PANIZ, C. *Avaliação do estado micronutricional e de estresse oxidativo em idosos*. Santa Maria, 2007. Dissertação de mestrado – Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria.
35. RODRIGUES, A. L.; BELLINASSO, M. L.; DICK, T. Effect of some metal ions on blood and liver delta-aminolevulinate dehydratase of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae). *Comp Biochem Physiol B*, v. 94, n. 1, p. 65-9, 1989.
36. SASSA, S.  $\delta$ -Aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme*, v. 28, p. 133-45, 1982.
37. SERRA, J. A. *et al.* Systemic oxidative stress associated with the neurological diseases of aging. *Neurochem Res*, v. 34, p. 2122-32, 2009.
38. SFAR, S. *et al.* Zinc, copper and antioxidant enzyme activities in healthy elderly Tunisian subjects. *Exp Gerontol*, v. 44, p. 812-17, 2009.
39. SOUZA, J. B. *et al.* Delta-aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. *Clin Biochem*, v. 40, p. 321-5, 2007.
40. SQUITTI, R. *et al.* Ceruloplasmin fragmentation is implicated in 'free' copper deregulation of Alzheimer's disease. *Prion*, v. 2, n. 1, p. 23-7, 2008.
41. SUKALSKI, K. A.; LABERGE, T. P.; JOHNSON, W. T. *In vivo* oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency. *Free Radic Biol Med*, v. 22, n. 5, p. 835-42, 1997.
42. THOMPSON, J.; JONES, D. D.; BEASLEY, W. H. The effect of metal ions on the activity of  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. *Br J Ind Med*, v. 34, p. 32-6, 1977.
43. TOMOKUNI, K. The *in vitro* effect of metal ions on the activity of erythrocyte delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Sangyo Igaku*, v. 21, n. 3, p. 240-5, 1979.
44. VALENTINI, J. *et al.* The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 62, p. 378-82, 2008.
45. VALENTINI, J. *et al.* Human erythrocyte  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. *Clinical Biochemistry*, v. 40, p. 591-4, 2007.
46. VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem*, v. 12, n. 10, p. 1161-208, 2005.
47. WILLIAMS, M. D. D. M. Racial differences of hemoglobin concentration: measurements of iron, copper, and zinc. *Am J Clin Nutr*, v. 34, p. 1694-700, 1981.
48. WORLD POPULATION PROSPECTS. *The 2008 Revision Population Database*. UN home. Disponível em: <<http://esa.un.org/unpp/index.asp?panel=2>>. Acesso em: 10 jun. 2010.
49. WU, J.; RICKER, M.; MUENCH, J. Copper deficiency as cause of unexplained hematologic and neurologic deficits in patient with prior gastrointestinal surgery. *J Am Board Fam Med*, v. 19, p. 191-4, 2006.

**Endereço para correspondência**

Solange Cristina Garcia  
Avenida Ipiranga, 2.752 – Santana  
CEP: 90610-000 – Porto Alegre-RS