

# DOENÇA DE

# ALZHEIMER

RESULTADO DE UMA  
FORTE AFINIDADE  
ENTRE COBRE E  
MOLIBDÊNIO?



FÁBIO CUNHA COELHO  
ROSANNA SQUITTI  
GISELLE CERCHIARO  
SHEILA E. SANTO ARAÚJO  
MARIA CARLA VENTRIGLIA  
JOÃO PAULO LIMA DAHER  
ANNA-CAMILLA MOONEN  
GUSTAVO FIALHO COELHO  
SILVIA ALMEIDA CARDOSO  
ARTHUR GIRALDI GUIMARÃES  
SALIM KANAAN  
MARINETE PINHEIRO CARRERA  
LUIZA B. MAIA

# **Doença de Alzheimer**

Resultado de uma forte  
afinidade entre cobre  
e molibdênio?

Fábio Cunha Coelho  
Rosanna Squitti  
Giselle Cerchiaro  
Sheila Espírito Santo Araújo  
Mariacarla Ventriglia  
João Paulo Lima Daher  
Anna-Camilla Moonen  
Gustavo Fialho Coelho  
Silvia Almeida Cardoso  
Arthur Giraldi Guimarães  
Salim Kanaan  
Marinete Pinheiro Carrera  
Luisa B. Maia

# **Doença de Alzheimer**

## **Resultado de uma forte afinidade entre cobre e molibdênio?**

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

**EDUENF- AgroEcoRIO**  
**2024**

© Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro  
**\*Os capítulos são de inteira responsabilidade dos autores.**

**EdUENF:**

Editora da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

**Conselho Editorial:**

Ana Bianca Rocha Miranda

Cláudia Lopes Prins

Leonardo Rogério Miguel

Mauro Cunha

Roberto Trindade F. Junior

Sérgio Arruda de Moura

**Editora-chefe**

Kátia Valevski Sales Fernandes

**Revisão:**

Ana Paula Almeida Moreira

**Capa, projeto gráfico e diagramação:**

Maria Tereza da Silva Soares Azeredo

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)**

Doença de Alzheimer [livro eletrônico] : resultado de uma forte afinidade entre o cobre e o molibdênio?. -- 1. ed. -- Campos dos Goytacazes, RJ : Editora da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro / EdUENF, 2024.  
PDF

Vários autores.  
Bibliografia.  
ISBN 978-65-87726-41-0

1. Cobre - Metabolismo 2. Demência 3. Doença de Alzheimer 4. Doença de Alzheimer - Cuidados e tratamento 5. Doença de Alzheimer - Diagnóstico 6. Neurociências cognitivas.

24-194221

CDD-616.831

**Índices para catálogo sistemático:**

1. Doença de Alzheimer : Transtorno : Tratamento :  
Medicina 616.831

Aline Grazielle Benitez - Bibliotecária - CRB-1/3129

# AUTORES



## **Fábio Cunha Coelho**

Agrônomo- UFV, Engenheiro de Segurança do Trabalho - UFF, Mestre em Microbiologia Agrícola e Doutor em Fitotecnia - UFV. Professor Associado da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Foi Professor Visitante na University of California Santa Cruz, EUA e na Scuola Superiore Sant'Anna, Itália. Tem experiência em Agroecologia.



## **Rosanna Squitti**

Researcher at Fatebenefratelli Hospital, Rome – Italy. Dr. R. Squitti's research focuses on metal (essential and toxicant metals) involvement in dementia (i.e. Alzheimer's disease and frontotemporal dementia) and other disorders, including diabetes. She spanned from biochemical studies to molecular genetics and meta-analysis using classical neurobiology methods.



## **Giselle Cerchiaro**

Professora Titular da Universidade Federal do ABC. Química com atribuições tecnológicas UNICAMP, Doutora em Química USP e doutorado-sanduiche em Bioquímica e Biologia cellulare e molecolare - Università di Roma Tor Vergata. Professora Associada da Universidade Federal do ABC, e em 2019 foi pesquisadora visitante no Department of Laboratory Medicine, Ospedale Fatebenefratelli San Giovanni Calibita, Rome, Italy. Tem experiência na área de Bioquímica.



## **Sheila Espírito Santo Araújo**

Biomédica e Mestre em Neuroimunologia UFF, e Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica) UFRJ com período sanduíche na Virginia Commonwealth University, EUA e Pós-doc pelo programa PAPD-RJ no Laboratório de Neurobiologia Celular do ICB, UFRJ. Foi professora efetiva de Biologia Celular e Tecidual da UEMG (2017-2020). Professora Associada da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Tem experiência na área de Neurociências.



### **Mariacarla Ventriglia**

Degree in Pharmacy at the University of Napoli, PhD in Pharmac. and Toxicol. Chemistry and Specialization in Hosp. Pharmacy, PhD post-doc National health Institute, Rome: analysis of pesticides; Specialization, University of Naples: analysis of pesticides; PhD post-doc, University of Milan: analysis of pesticides. Fellowship, IRCCS San Giovanni di Dio-Fatebenefratelli of Brescia: determination of genetic and biochemical markers in psychiatric diseases 2002 Research contract, IRCCS San Giovanni di Dio-Fatebenefratelli of Brescia



### **João Paulo Lima Daher**

Médico, Mestre e Doutor pela Universidade Federal Fluminense. Pós doutorados na University of Tennessee System, University of New South Wales e na University of Alabama at Birmingham. Professor do Departamento de Patologia, Hospital Universitário Antônio Pedro, Universidade Federal Fluminense.



### **Anna-Camilla Moonen**

Graduated from the Wageningen University and obtained her PhD at the University of Pisa, Italy. She works on vegetation management of field margins, the use of cover crops to manage weed communities, the management of functional agrobiodiversity in arable and horticultural cropping systems, and (co)designs innovative strategies for sustainable weed and pest management.



### **Gustavo Fialho Coelho**

Médico, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Foi bolsista PIBIC-UFRJ em “Epidemiologia e o Cuidado em saúde”. Foi monitor de “Embriologia e Histologia de Aparelhos e Sistemas” e de “Saúde da Criança I”. Residente em Clínica Médica no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.



### **Silvia Almeida Cardoso**

Farmácia e Bioquímica pela Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto (FCFRP-USP). Mestra em Imunologia Básica e Aplicada FMRP-USP, Doutora em Imunologia Básica e Aplicada FMRP-USP. Pós-doutorado no Departamento de Biologia Geral - UFV e na Universidade de Cambridge/Inglaterra. Professora adjunta da Universidade Federal de Viçosa. Pesquisadora na área de Imunologia e Bioquímica clínica, no laboratório de Bioquímica e Imunoglicobiologia.



### **Arthur Giraldi Guimarães**

Ciências Biológicas (Bacharelado em Genética) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Mestre em Química Biológica UFRJ e Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica) UFRJ. É Professor Associado da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Sempre atuou na área de neurobiologia, realizando pesquisas na área de neuroplasticidade.



### **Salim Kanaan**

Medicina (1984) e Mestrado em Ciências Biológicas (Biofísica) (1988) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Professor adjunto da Universidade Federal Fluminense. Tem experiência na área de Patologia Clínica, atuando principalmente em bioquímica clínica.



### **Marinete Pinheiro Carrera**

Graduação em Farmácia Comercial pela Universidade Federal do Pará, Mestrado em Psicobiologia pela Universidade de São Paulo e doutorado em Psicobiologia pela Universidade de São Paulo. Professora associada da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Tem experiência na área de Farmacologia, com ênfase em Psicofarmacologia.



### **Luisa B. Maia**

LAQV, REQUIMTE, NOVA School of Science and Technology-NOVA FCT, Lisboa, Portugal. Doutorada em Bioquímica Clínica e Farmacêutica, LBM é Investigadora Auxiliar na NOVA FCT, onde desenvolve trabalho com vista à caracterização espectroscópica e cinética de metaloenzimas. Os seus interesses científicos centram-se no estudo de molibdoenzimas envolvidos na saúde e doença em humanos, mas também em processos relevantes para o ambiente e produção de bioenergia.

# SUMÁRIO

<b>Prefácio</b> .....	9
<b>Introdução</b> .....	13
<b>Tópico 1-</b> Cobre na agricultura e sua relação com a doença de Alzheimer.....	19
<b>Capítulo 1.</b> Uso do cobre na agricultura.....	20
<b>Capítulo 2.</b> Cobre em alimentos e água.....	28
<b>Capítulo 3.</b> O cobre na saúde humana.....	33
<b>Capítulo 4.</b> Dishomeostase do Cu nas doenças de Wilson e de Alzheimer.....	50
<b>Capítulo 5.</b> Avaliação do risco à saúde humana relacionado ao uso de Cu na agricultura.....	55
<b>Capítulo 6.</b> Estratégias agroecológicas para reduzir o uso de Cu na agricultura.....	60
<b>Capítulo 7.</b> Conclusões do Tópico 1.....	67
<b>Tópico 2-</b> Conexões entre o metabolismo de Cu, S e Mo na doença de Alzheimer.....	69
<b>Capítulo 8.</b> Relações entre múltiplos fatores com a DA e a relação desses fatores com o metabolismo do Cu e do S.....	70
<b>Capítulo 9.</b> Relação entre o metabolismo do Cu com a DA ou com múltiplos fatores associados à DA.....	77
<b>Capítulo 10.</b> Relação entre o metabolismo do S com a DA ou com múltiplos fatores associados à DA.....	83
<b>Capítulo 11.</b> Relação hipotética entre Mo e a patologia da DA ou a múltiplos fatores associados à DA.....	91
<b>Capítulo 12.</b> Relação entre interação metabólica de Cu, Mo e S com DA ou com múltiplos fatores associados à DA.....	104
<b>Capítulo 13.</b> Conexões entre a interação metabólica de Cu, Mo e S e a patologia da DA ou múltiplos fatores associados à DA.....	110
<b>Capítulo 14.</b> Aumento de Cu e Mo no sangue e evidências sustentando uma diminuição do transporte de Cu e Mo no cérebro com o envelhecimento.....	115
<b>Capítulo 15.</b> Tentando colocar mais peças neste “quebra-cabeça”.....	120
<b>Capítulo 16.</b> A deficiência de Mo e as atividades baixas de SUOX e Citocromo c estão possivelmente ligadas à DA.....	124
<b>Capítulo 17.</b> Uma das formas para evitar a DA será o uso de suplementação com Mo para pessoas na idade adulta e para idosos?.....	128
<b>Capítulo 18.</b> Perspectiva clínica para DA e o “Cu-Mo-S circuitos”.....	132
<b>Agradecimentos</b> .....	136
<b>Abreviaturas</b> .....	137
<b>Referências</b> .....	138
<b>Hunting Words</b> .....	165

# Prefácio

Este livro tem como objetivo examinar as relações entre o cobre (Cu), o molibdênio (Mo) e a doença de Alzheimer (DA). Por isso, o título vem com a pergunta:

**“ Doença de Alzheimer – Resultado de uma forte afinidade entre cobre e molibdênio? ”**

Esta questão é baseada no antagonismo entre Cu e Mo na nutrição, devido à existência de uma forte afinidade química entre esses elementos. Esse antagonismo já foi constatado pela pesqui-

sa, confirmado muitos anos na nutrição animal e humana. Essa oposição, possivelmente, é devido à formação de um composto químico pouco solúvel a partir da combinação entre os dois elementos. Além disso, a relação entre o aumento no teor de cobre não ligado à proteína ceruloplasmina (nCp-Cu) no sangue e à doença de Alzheimer também já é muito pesquisada, sendo divulgada em excelentes artigos científicos.

O que este livro traz de novo são as discussões sobre as possíveis relações entre a utilização do cobre na agricultura e a doença de Alzheimer (Tópico 1), além de uma possível relação entre o aumento do teor de Cu no decurso do envelhecimento do organismo

humano e a diminuição da atividade de enzimas que dependem de Mo e, por consequência, a desregulação do metabolismo de substâncias que contêm o enxofre (S), com consequente aumento de beta-amiloide e seus danos ao sistema nervoso central, inclusive podendo causar a DA (Tópico 2).

O texto do livro se baseia em duas revisões de literatura já publicadas originalmente em inglês pelos mesmos autores: "*Agricultural Use of Copper and Its Link to Alzheimer's Disease*" [1] e "*Is There a Connection between the Metabolism of Copper, Sulfur, and Molybdenum in Alzheimer's Disease? New Insights on Disease Etiology*" [2]. Entretanto, o livro traz uma discussão bem mais ampliada e atualizada, com acréscimos feitos para maior compreensão do assunto.

O livro é dividido em dois grandes tópicos que se subdividem em seus capítulos. O primeiro tópico, "Cobre na agricultura e sua relação com a doença de Alzheimer" tem como capítulos os seguintes assuntos: uso do cobre na agricultura, que se comenta sobre o Cu utilizado no manejo de doenças de plantas e seu acúmulo no solo e na água. Os capítulos seguintes consideram sobre a presença do Cu nos alimentos e na água e, também, sobre sua importância na saúde humana. Discute-se sobre seu acúmulo no corpo humano e suas relações com o desenvolvimento da DA, fazendo-se uma discussão aprofundada sobre suas conexões, sendo essas verificadas nas literaturas relacionadas à bioquímica, à medicina e a neurociências. Os capítulos seguintes são:

Dishomeostase do cobre nas doenças de Wilson e de Alzheimer; avaliação do risco à saúde humana relacionada ao uso de Cu na agricultura; estratégias agroecológicas para reduzir o uso de Cu na agricultura e; Conclusões do tópico 1.

O segundo tópico deste livro aborda as conexões entre o metabolismo de Cu, S e Mo na doença de Alzheimer. Esse tópico apresenta discussão aprofundada sobre uma hipótese muito plausível, fundamentada por vasta revisão bibliográfica. Os assuntos discorridos são: relações entre múltiplos fatores com a DA e a relação desses fatores com o metabolismo do Cu e do S; relação entre o metabolismo do cobre e a doença de Alzheimer ou os múltiplos fatores associados à DA e; relação entre o metabolismo do enxofre e a DA ou com múltiplos fatores associados à DA.

A partir do próximo capítulo começa-se a discorrer sobre o metabolismo do molibdênio alterado e a doença de Alzheimer. Assim, são discutidos os temas: relação hipotética entre o molibdênio e a patologia da DA ou múltiplos fatores associados à doença; relação entre a interação metabólica de Cu, Mo e S com DA ou com múltiplos fatores associados à doença de Alzheimer e; aumento dos teores de cobre e molibdênio no sangue, com o envelhecimento, e evidências indicando uma possível diminuição do transporte de Cu e Mo no cérebro.

Os capítulos subsequentes, a partir da análise de resultados de pesquisas, tentam juntar mais peças ao

quebra-cabeça e apontam a possibilidade da deficiência de Mo e as baixas atividades da sulfito oxidase (SUOX) e do Citocromo c estarem, possivelmente, ligadas ao desenvolvimento da doença de Alzheimer e; levanta-se a pergunta: “será que a suplementação com Mo para pessoas na idade adulta e para idosos pode ser uma das formas para evitar a DA?” O livro finaliza apresentando uma discussão sobre a perspectiva clínica para doença de Alzheimer e o “circuito Cu–Mo–S”.

Para a confecção deste livro foram consultadas e citadas mais de 300 referências bibliográficas. Além disto, os autores desenvolveram raciocínios críticos-reflexivos multi e transdisciplinares de alto nível, fruto do trabalho em diferentes áreas e instituições de pesquisa.

# Intro- dução

A doença de Alzheimer (DA) e outras formas de demência foram classificadas em 3º lugar nas Américas e na Europa, em 2019, em uma publicação da Organização Mundial da Saúde (OMS), listando as principais causas de morte e incapacitação, em todo o mundo [3]. O desequilíbrio na concentração de cobre (Cu) foi relatado na DA e evidências crescentes indicam ocorrer desequilíbrio de outros metais, incluindo molibdênio (Mo), como uma possível interação com a ocorrência de DA. Mais precisamente, fo-

ram relatados que na DA os níveis de Cu, enxofre (S) e Mo estão fora da faixa considerada normal.

A DA é a forma mais comum de demência globalmente em adultos idosos [4]. Essa doença é altamente hereditária, sendo que a dieta e o estilo de vida também podem resultar em aumento no risco de acometimento da doença [5]. Histopatologicamente, a DA é caracterizada por placas  $\beta$  amilóides ( $A\beta$ ) e emaranhados neurofibrilares tau no cérebro [6]. A comunidade científica mundial estuda a DA há décadas, com algumas linhas de pesquisa investigando os metabolismos do Cu e do S e, mais recentemente, do Mo.

Em uma revisão recente, Cordone *et al.* [7]

comentam que a DA é causada por múltiplos fatores. “Esses fatores incluem inflamação, acúmulo neurotóxico de proteínas no cérebro que podem estar associadas em parte à privação do sono, disfunção do sistema glífico e da barreira hematoencefálica, estresse oxidativo e disfunção microglial e suas interações podem desempenhar um papel na facilitação de sua ocorrência.” Infelizmente, ainda não temos uma solução ou uma causa clara (ou causas) para a DA.

O Cu é um nutriente essencial para plantas, animais e humanos por ser componente indispensável de várias proteínas essenciais. Estudos recentes, que são apresentados no primeiro tópico deste livro, revelaram que tanto sua falta como o seu excesso podem estar associados à DA. Assim, por meio da revisão bibliográfica contida neste livro, confirma-se que o acúmulo de Cu ocorre no envelhecimento humano e que há desequilíbrio no metabolismo do Cu na DA.

Uma das principais causas do acúmulo de Cu no meio ambiente e na cadeia alimentar humana é o seu uso na agricultura como produto fitoprotetor contra inúmeras doenças que acometem as plantas. Nas últimas duas décadas, alguns países, com predomínio dos da União Européia, investiram em pesquisas para reduzir a dependência do Cu na agricultura, principalmente na agricultura orgânica. No entanto, nenhuma alternativa capaz de substituir o Cu foi identificada. Sugerimos, neste livro, que abordagens agroecológicas são urgentemente necessárias para auxiliar no planejamento de

estratégias de proteção das culturas agrícolas, com base em ações complementares com ampla variedade de ferramentas de proteção das plantas no manejo de doenças na agricultura.

Desde muitos anos, a comunidade científica mundial pesquisa sobre a DA. As pesquisas avançaram muito e demonstraram parte do que acontece no metabolismo de pessoas acometidas pela doença de Alzheimer. Existem várias linhas de pesquisa relacionadas à DA e, entre elas, estão as que têm investigado o metabolismo do Cu e do S e, recentemente, relacionadas ao metabolismo do Mo.

Realizamos uma consulta bibliográfica sobre as publicações relacionadas à DA nas últimas seis décadas. Para este levantamento utilizamos as bases de dados do Scopus, Google Acadêmico e do PubMed. Bramer *et al.* [8] relatam que, embora sua abrangência e precisão sejam aceitáveis, o Google Acadêmico não deve ser utilizado como fonte única para busca de revisões sistemáticas biomédicas; por isso recomendam o uso de um banco de dados médico especializado, como o PubMed, para otimizar a precisão. Nosso passo inicial foi realizar uma revisão bibliográfica com a palavra “Alzheimer” utilizada em associação com beta-amilóide, tau, hipertensão, diabetes, depressão, insônia e inflamação. Na segunda etapa desta revisão, realizamos a pesquisa para tentar esclarecer a interação entre o metabolismo do Cu, S e Mo e sua relação com a DA. Na terceira etapa, relacionamos

a interação metabólica Cu/S/Mo e DA.

O que nos motivou a fazer esse levantamento bibliográfico e estudar as possíveis interações entre os metabolismos de Cu, S e Mo e sua relação com a DA foi o grande número de trabalhos que indicam a relação entre o excesso de Cu livre no organismo e a maior probabilidade de ocorrência da DA [9,10]. Além disso, a interação do metabolismo do Cu, S e Mo em alguns animais é bem relatada. Desequilíbrios nutricionais entre esses três nutrientes minerais têm impacto negativo na saúde. O excesso de Cu pode resultar em deficiência de Mo, uma vez que são antagonistas em termos de nutrição. Além disso, o desequilíbrio da relação Cu/Mo pode afetar o metabolismo do S [11].

Nos sintomas iniciais da doença de Alzheimer, muitas pessoas costumam fazer palavras cruzadas, caça palavras e quebra-cabeças como forma de exercitar a mente. A busca pelas causas da DA é semelhante aos jogos utilizados para exercícios de memória. Os autores desse livro não pretendem resolver esta “palavra cruzada” ou “caça palavras” ou completar totalmente esse “quebra-cabeça”, que é tão complexo. No entanto, o objetivo é encontrar algumas palavras ou juntar algumas peças e formular uma hipótese plausível sobre as causas da DA. Assim, a partir de nossa revisão aprofundada sobre o assunto, formulamos que: *pode ocorrer deficiência crônica de Mo, que se acentua ao longo dos anos com o envelhecimento, devido ao acúmulo de Cu*

*livre no sangue, sendo essa deficiência de Mo uma possível causa da doença de Alzheimer.*

O Cu é um elemento essencial para o funcionamento de enzimas ligadas à eliminação do estresse oxidativo. A alteração de sua homeostase está associada à produção de radicais livres e dano celular [12]. O S encontra-se em moléculas orgânicas, como vitaminas, coenzimas e S-aminoácidos, mas também em formas inorgânicas, como, por exemplo, sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) ou sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) [13]. Já a forma de sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) é fortemente regulada, devido à elevada toxicidade deste composto [14, 15]. O Mo é outro elemento essencial para os animais (incluindo os humanos) [16]. Nele encontra-se, no centro ativo das enzimas sulfito oxidase (SUOX), xantina oxidoreductase (XOR), aldeído oxidase (AO) e componente redutor de amidoxima mitocondrial (mARC) [17, 18]. Estas molibdoenzimas catalisam reações de oxidação-redução envolvidas no metabolismo de purinas e aldeídos, na destoxificação do sulfito e xenobióticos, entre outras vias. A deficiência de molibdênio é particularmente relevante para a atividade da SUOX e o metabolismo do sulfito e do S em geral [14, 15, 19, 20]. O efeito na atividade XOR é também digno de nota, pois leva a uma diminuição da concentração de ácido úrico, o qual é considerado um antioxidante endógeno e à acumulação de xantina [21, 22, 23].

A relação entre a dishomeostase do Cu e DA está há muito tempo bem relatada na literatura científica [24],

assim como a alteração do metabolismo dos aminoácidos que contém S na DA [25]. Além disso, existem muitas semelhanças entre algumas consequências metabólicas da deficiência de Mo [26, 27] e doença de Alzheimer. Estas associações levaram-nos a analisar as interações entre o metabolismo destes dois antagonistas biológicos, Cu e Mo. Encontramos evidências significativas na literatura, que são apresentadas de forma pormenorizada no segundo tópico deste livro, de interações ligando o desequilíbrio de Cu a anormalidades no metabolismo do Mo e do S na etiologia da DA. Daí, lançamos uma hipótese bem plausível: *possivelmente, em certas circunstâncias, o acúmulo de Cu não ligado à ceruloplasmina (nCp-Cu) pode diminuir o transporte de Mo para fora dos vasos sanguíneos, causando uma leve deficiência de Mo que pode diminuir a atividade das enzimas dependentes de Mo, que são essenciais para a atividade neuronal.* Assim, este livro contém uma revisão de literatura atual que fornece discussão atualizada sobre interações que combinam alterações metabólicas de Cu, S e Mo na DA.

# TÓ PI CO

# 1

Utilização do cobre na  
agricultura e sua relação  
com a doença de Alzheimer

# Uso do cobre na agricultura



## **CAPÍTULO 1**

## *Cu utilizado no manejo de doenças de plantas*

O Cu tem sido utilizado na agricultura como fertilizante e no manejo de doenças de plantas. A agricultura orgânica é muito dependente do Cu como fungicida. Vários fungicidas possuem Cu em sua formulação. O primeiro fungicida a ser utilizado em todos os sistemas de cultivo no mundo e o mais famoso é a calda bordalesa (25%  $\text{CuSO}_4$ ). A calda bordalesa e, conseqüentemente, o Cu são utilizados na agricultura há mais de 160 anos no manejo de doenças de plantas [28]. Fishel [29] afirmou que, durante a década de 1850 na região de Bordeaux, na França, um viticultor estava tendo problemas com pessoas que roubavam uvas de suas vinhas. Ele aplicou uma mistura de Cu e cal em parte de seus vinhedos para tornar as uvas pouco atraentes. Conseqüentemente, o resultado foi que nas plantas onde foi aplicada a mistura cúprica-cal, não houve incidência de doenças nas plantas.

Atualmente, o Cu é utilizado principalmente para controlar doenças de plantas como, por exemplo: míldio da uva, causado pelo *Plasmopara viticola*, que reduz bastante a produtividade de uvas, principalmente em climas oceânicos; sarna da maçã, causada pelo *Venturia inaequalis*; requeima da batata, causada pelo *Phytophthora infestans* entre outras. Em regiões tropicais, o Cu é utilizado no manejo da ferrugem do café, causada por *Hemileia*

*vastatri*, e da vassoura-de-bruxa do cacau, causada por *Crinipellis pernicioso* [30-32].

A calda bordalesa é amplamente utilizada na agricultura orgânica em todo o mundo, pois é considerada de baixa toxicidade para o homem e o meio ambiente. Além disso, outros fungicidas contendo Cu nas formas de hidróxido, oxicloreto, óxido e octanoato, podem ser utilizados na Agricultura Orgânica. No entanto, eles precisam de autorização dos certificadores de produtos orgânicos para minimizar o acúmulo de Cu no solo [33]. No Brasil, a recomendação segue legislação específica semelhante à proposta pela FAO [34-36].

Na Europa, durante a década de 1950, o Cu era aplicado nas lavouras para proteger as plantas em quantidades de 20 a 30 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, e às vezes até mais de 80 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Na Alemanha, entre 2010 e 2015, em média, na agricultura orgânica de lúpulo, uvas, batatas, maçãs, abóboras e peras, a utilização de Cu foi de 3,1; 2,2; 1,5; 1,5; 1,4 e 1,3 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, respectivamente. Nesse país, a aplicação de Cu é restrita a 3 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (4 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> para lúpulo) [37]. Em 2013, uma pesquisa investigando o uso de Cu na agricultura da Alemanha [38] revelou que as quantidades aplicadas nas culturas com manejo convencional de uva (0,8 kg ha<sup>-1</sup>), lúpulo (1,7 kg ha<sup>-1</sup>) e na batata (0,8 kg ha<sup>-1</sup>) ficaram bem abaixo dos utilizados na agricultura orgânica para as mesmas culturas (2,3; 2,6 e 1,4 kg ha<sup>-1</sup>, respectivamente).

O USDA [39] incluiu várias substâncias à base de cobre na “Lista Nacional de Substâncias Permitidas e Proibidas” na agricultura orgânica, dos Estados Unidos da América (EUA). Por exemplo, o sulfato de cobre é um algicida em sistemas aquáticos de arroz e utilizado como controle de camarão girino na produção de arroz irrigado por inundação. Sua aplicação é limitada a apenas uma por campo, em cada intervalo de 24 meses e as taxas de aplicabilidade são limitadas àquelas que não aumentem os valores de referência da análise do solo para Cu, durante um período acordado pelo produtor e o agente certificador credenciado. A legislação dos EUA indica que os materiais à base de cobre têm seu uso limitado de forma a minimizar seu acúmulo no solo, sendo que não é permitido utilizá-lo como herbicida.

De acordo com a legislação brasileira [34-36] e recomendação da FAO [33], a quantidade máxima de Cu a ser aplicada na agricultura orgânica é de 6 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Segundo Motta [40], no Brasil, alguns certificadores limitam o uso do elemento a 3 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Por outro lado, na África Oriental, 8 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> é o máximo permitido para a aplicação de Cu em áreas com agricultura orgânica [41, 42].

A formulação da calda bordalesa, para uso em frutíferas, contém 2 - 10 g L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre e a mesma quantidade de cal (Ca(OH)<sub>2</sub>) diluída em água. A aplicação é feita desde a fase vegetativa até a maturação dos frutos, com intervalos de 10 a 15 dias entre as aplicações [43].

Espalhantes e adesivos naturais, como açúcar (10 - 15 g) ou leite desnatado (200 mL), podem ser utilizados para melhor aderência às folhas das plantas [40].

Para a videira, por exemplo, não há um volume fixo de calda bordalesa a ser utilizada por hectare, que pode variar entre 150 - 700 L ha<sup>-1</sup>. Esse volume varia de acordo com diversos fatores, como o tipo de pulverizador, o tamanho das plantas, a distância entre fileiras de plantas, as condições climáticas, a doença a ser controlada e o estágio vegetativo da planta [44]. Assim, considerando que o menor volume de aplicação (150 L ha<sup>-1</sup>) apresenta o maior teor de cobre (10 g L<sup>-1</sup>), o maior volume (700 L ha<sup>-1</sup>) e o menor teor (2 g L<sup>-1</sup>), no Brasil, podem ser realizadas no máximo 16 aplicações por ano, de modo que não se ultrapasse a dose máxima anual de cobre de 6 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, recomendada pela FAO [33].

### *Acúmulo de Cu no solo e na água*

Em geral, o Cu é pouco móvel no solo, não se movimentando em profundidade quando é aplicado na superfície do solo. Portanto, a pulverização contínua de Cu resulta em acúmulo desse elemento na camada superficial do solo, atingindo níveis tóxicos, podendo causar estresse nas plantas, diminuindo a biodiversidade da microbiota do solo e reduzindo a fertilidade do

solo [45-47]. Essas são as principais razões pelas quais os agricultores orgânicos tentam minimizar o uso de Cu [37].

Sacristán e Carbó [48] avaliaram solos agrícolas espanhóis e australianos cultivados com alface. Eles constataram que solos com pH mais alto e níveis mais altos de matéria orgânica e argila resultam em menor mobilidade do cobre em profundidade e, consequentemente, em seu acúmulo nas camadas superficiais do solo. Assim, em geral, o efeito tóxico do Cu nas plantas aumenta à medida que os valores de pH diminuem, devido ao aumento da sua biodisponibilidade. Por outro lado, em estudo realizado em uma região agrícola do condado de Haining, no sudeste da China, Wu *et al.* [49] verificaram que a taxa de disponibilidade de Cu e sua concentração disponível diminuíram em função da diminuição do pH em solos ácidos ( $\text{pH} < 6,5$ ) e aumentaram com o aumento do pH em solos alcalinos ( $\text{pH} > 7,5$ ). Já, no Chile, Ávila *et al.* [50] constataram que a toxicidade do cobre para as minhocas era menor em solos com teor de matéria orgânica (MO) superior a 3,5%, sendo que, esse efeito atenuante da MO ocorreu para solos com até  $500 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cu.

O cobre existe nos solos principalmente (60%) nas formas solúveis em água e trocável, adsorvido na parte superior dos perfis do solo, sendo que a porcentagem de Cu total no solo diminui com o aumento da profundidade, como já comentado [51]. Na Austrália, o teor total de cobre no solo dos vinhedos é cinco a cinquenta vezes

maior do que o encontrado em solos naturais. Além disso, foi observado que o teor de Cu no solo diminui com o aumento da distância das videiras [51]. Isto ocorre porque as videiras costumam receber anualmente aplicações foliares de Cu para controle de doenças nas plantas.

Foi também verificado que uma concentração de cobre no solo de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  influencia negativamente o crescimento do arroz, ocorrendo queda de 10% ou mais na produtividade de grãos, peso da palha e peso da raiz [52]. Além do efeito negativo do excesso de cobre sobre as culturas agrícolas, foi constatado por Shen *et al.* [53] que a incidência da doença de Alzheimer é 2,6 vezes maior nas populações das regiões da China continental, onde ocorrem maiores teores de cobre no solo ( $60\text{-}80 \text{ mg kg}^{-1}$ ), em comparação com outras regiões chinesas com solos que apresentam menores teores ( $20\text{-}40 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Além do Cu ser utilizado para proteção de plantas na agricultura, o uso de dejetos de suínos na adubação das culturas pode contribuir para o acúmulo de Cu no solo. O sistema de preparo do solo via aração e gradagem pode melhorar a distribuição de Cu nas camadas do solo e pode ser utilizado como uma ferramenta para evitar o acúmulo na camada superficial do solo [54].

A liberação de cobre na água pode ocorrer por meio da erosão do solo, descarga industrial, tratamento

de esgoto e tintas anti-incrustantes. Assim, a erosão de solos que contêm partículas de solo com Cu adsorvido pode resultar em concentrações aumentadas de cobre em rios e lagos [55]. Certamente, não há contaminação da água do lençol freático devido a aplicações de cobre na agricultura. Isto porque, assim como já comentado, o Cu tem baixa mobilidade no solo [48].

Atualmente, a principal preocupação é o grande aumento do teor de cobre durante a distribuição de água potável, porque muitos canos e conexões hidráulicas contêm Cu. Esse elemento pode ser liberado para a água potável, contaminando-a [55].

# Cobre em alimentos e água



## **CAPÍTULO 2**

Existe um velho ditado que diz:

“

*Solo saudável - Planta saudável - Homem saudável.*

*Não há planta saudável sem solo saudável.*

*Em solos decadentes, apenas crescem plantas doentes.*

*Plantas doentes fornecem apenas alimentos biologicamente incompletos e de valor inferior e as pessoas que consomem esses alimentos não conseguem manter sua saúde [56].*

”

Em humanos, estima-se que a ingestão dietética diária adequada de Cu varie de 0,5 a 0,7 mg dia<sup>-1</sup> para lactentes de 6 meses de vida ou menos, e para adultos a ingestão máxima tolerável equivale a 0,5 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal por dia [57]. No entanto, nos Estados Unidos, a Ingestão Dietética Recomendada (RDA) para homens e mulheres adultos é de 0,9 mg dia<sup>-1</sup>. Entretanto, a ingestão média de Cu dos alimentos nos EUA é de aproximadamente 1,0 a 1,6 mg dia<sup>-1</sup> para homens e mulheres adultos. O nível máximo de ingestão tolerável (UL) para adultos é de 10 mg<sup>-1</sup> dia [58]. É fundamental considerar que a indicação da RDA da OMS [57] e dos EUA [58] independe da idade do adulto. A nosso ver, mais pesquisas devem ser realizadas para determinar a quantidade necessária e os limites máximos por faixas etárias em adultos. Possivelmente, em idades mais avançadas, os limites de ingestão de Cu devem ser menores do que em idades mais jovens, porque o Cu pode se acumular no corpo com o envelhecimento e causar doenças.

Morris *et al.* [54] avaliaram 3.718 residentes de Chicago com 65 anos ou mais. Eles verificaram que a alta ingestão de Cu em conjunto com uma dieta rica em gorduras saturadas e trans pode estar associada ao declínio cognitivo acelerado. Brewer [59] propôs que a ingestão de Cu bivalente ( $\text{Cu}^{2+}$ ) é um importante novo fator de risco ambiental para DA. Este autor comentou que o  $\text{Cu}^{2+}$  é abundante principalmente em pílulas e suplementos alimentares e é muito prejudicial à cognição.

A questão permanece: quanto e por quais caminhos, o cobre utilizado na agricultura acaba na dieta humana? O Cu é aplicado sobre a vegetação e apenas uma pequena parte é absorvida pelas folhas e frutos, e translocada na planta. Esse elemento chega ao solo onde é adsorvido principalmente pela matéria orgânica do solo e partículas de argila. Na sequência, as raízes das plantas podem absorvê-lo.

O relatório da European Food Safety Authority (EFSA) [55] faz referência a estudos que afirmam que as plantas nunca absorvem mais cobre do que a quantidade nutricional necessária. No entanto, isso está em forte contradição com outros estudos realizados no campo da fitorremediação, mostrando que as culturas arbóreas e hortaliças podem absorver muito mais Cu do que o necessário e alocá-lo nas raízes, brotos e frutos. Na fitorremediação de solos contaminados, pela remoção da biomassa, os locais podem ser limpos da poluição por metais pesados, assim como o cobre [60]. Ao utilizar culturas, é relevante saber em quais tecidos vegetais o

Cu se acumula. Frutos e raízes de tomate acumulam Cu, neste caso, os frutos não devem ser utilizados para consumo [60], se os tomateiros forem cultivados em solo com alta concentração de cobre. Outro estudo mostrou que os brotos de amaranto, mostarda indiana e girassol foram capazes de absorver quantidades de cobre 2 a 4 vezes maiores do que as raízes, especialmente em solos fertilizados [61]. Os especialistas da EFSA [55] concluem ainda que há estudos científicos insuficientes disponíveis para concluir sobre a quantidade de resíduos de Cu em algumas culturas importantes, como uvas, tomates e cucurbitáceas cultivadas de acordo com as diretrizes de Boas Práticas Agrícolas. Portanto, mais pesquisas são necessárias para esclarecer quais são os teores de Cu nos diferentes alimentos.

Hummes *et al.* [62] avaliaram um vinhedo centenário no município de Pinto Bandeira, região nordeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. As videiras avaliadas foram pulverizadas com Cu por mais de 100 anos. Os teores de cobre nos tecidos radicular e foliar atingiram 12.300 mg kg<sup>-1</sup> e 6.800 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. No suco de uva e no vinho, o teor de Cu foi de 9,08 mg L<sup>-1</sup> e 0,78 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Assim, o teor de cobre no suco de uva ultrapassou em, 908% o limite estabelecido por normas brasileiras e internacionais. Por outro lado, Santos *et al.* [63] verificaram que a redução do teor de Cu durante as últimas etapas do ciclo de produção do vinho está relacionada com a sua precipitação nos tanques de armazenamento. O teor de cobre nos solos da

vinha e, conseqüentemente, no mosto e nos vinhos está relacionado com diversos fatores como a quantidade total de fungicida cúprico aplicado durante o período de produção, o número de dias entre a última aplicação e a colheita, a especificidade biológica das cultivares durante o crescimento e as características varietais [64].

Diferente da planta de tomate, em algumas espécies, o Cu tem propensão para acúmulo nos tecidos radiculares, com pouco movimento ascendente em direção a brotos, frutos e sementes [65]. Além disto, podem ocorrer diferenças quanto a acúmulo de cobre entre cultivares de uma mesma espécie. Alexandre *et al.* [66] verificaram que cultivares de cenoura e ervilha apresentaram diferenças significativas no acúmulo desse elemento. Isso demonstra que a utilização de cultivares que acumulam menos Cu pode resultar em alimento de melhor qualidade.

Garrido e Botton [67] recomendaram período de carência de sete dias (período entre a última aplicação e a colheita) para pulverizações com cobre em plantas de uva. Esse período também é de sete dias para batata, berinjela, cenoura, mamão, melancia, pimentão e tomate e de quatorze dias para feijão, quando é utilizado oxicloreto de Cu na aplicação [68]. Sugerimos que o período de carência seja mais pesquisado, pois a contaminação residual de cobre é dependente do seu teor na calda do fungicida de pulverização. De fato, novos limites superiores e recomendações de Cu (menores que os atuais) devem ser indicados no futuro, devido ao seu alto impacto no solo, ecossistema e saúde humana.

# O Cobre na saúde humana



## **CAPÍTULO 3**

A concentração de metais e elementos nas células varia de acordo com o tipo de tecido do qual é derivado, a correta absorção, distribuição por nitração e ingestão alimentar. Geralmente, os organismos/células possuem mecanismos altamente regulados para controlar a homeostase desses elementos. Porém, quando esta homeostase é alterada, de alguma forma o mecanismo de reparo é ineficiente, o organismo/célula pode estar mais sujeito a diversas doenças. Estudos indicam que alterações nas concentrações de alguns elementos juntamente com o estresse oxidativo podem ser o principal fator indutor de estados neurodegenerativos [69-72]. Assim, a homeostase de alguns metais é alterada no cérebro e no sangue de pessoas com doenças neurodegenerativas [73-75]. A homeostase de elementos metálicos é fator metabólico que garante que as reações químicas no interior das células continuem funcionando corretamente. Além disso, a agregação  $\beta$ -amilóide (presente na DA) pode ser mediada pela interação com metais de transição, especialmente Cu, ferro e zinco, [76-77], que estão concentrados na região em que as placas amilóides se formam na DA. A alta concentração de zinco e Cu pode favorecer a formação dessas placas.

### *Acúmulo de Cu no corpo humano*

Estima-se que o Cu corporal total em humanos adultos varie de 70 a 150 mg, com as maiores concentrações no

fígado, cérebro, coração e rins [57]. O Cu é um nutriente para os seres humanos além de participar da composição de proteínas essenciais: ceruloplasmina, Cu-Zn superóxido dismutase, redutase nítrica, amina oxidase, tirosinase, bilirrubina oxidase, citocromo C oxidase e plastocianina, por exemplo [78]. No entanto, quando em excesso, o Cu pode levar ao estresse oxidativo e efeitos nocivos. O Cu parece mediar a progressão da DA devido ao papel que desempenha na via da presenilina. A presenilina desempenha um papel essencial na geração de beta-amilóide (A $\beta$ ) a partir da proteína precursora de amilóide na DA [79].

Masaldana *et al.* [80] comentaram que a senescência celular é caracterizada pela parada irreversível do crescimento causada pela exaustão replicativa ou por estressores celulares pró-oncogênicos (radioatividade, estresse oxidativo, ativação oncogênica). Além disso, os mesmos autores relataram que o enriquecimento com metais, incluindo Cu, de células senescentes em tecidos com o envelhecimento, foi associado à dishomeostase tecidual e patologias relacionadas à idade, incluindo câncer, distúrbios neurodegenerativos (DA, doença de Parkinson) e distúrbios metabólicos (por exemplo, diabetes tipo 2 - DM2). É interessante notar que Masaldana *et al.* [80] identificaram o acúmulo de Cu como uma característica universal de células senescentes (fibroblastos de camundongos embrionários, células epiteliais da próstata humana e fibroblastos diploides humanos) *in vitro*. Este fato indica uma associação específica entre o acúmulo de Cu e as anomalias mencionadas.

Há também evidências de dishomeostase de cobre na diabetes tipo 2, o que pode contribuir para a deterioração cognitiva associada a esta doença [81]. Chen *et al.* [82] verificaram que o excesso de Cu acelera alguns eventos precoces da doença de Alzheimer. Eles constataram em suas pesquisas que o excesso de Cu circulante tem o potencial de perturbar a função cerebral de camundongos selvagens e exacerbar alterações neurodegenerativas em um modelo de camundongo com DA [82].

Baixos níveis de Zn, assim como altos níveis de Cu, Mn e Fe, participam da ativação de vias de sinalização do estresse inflamatório, oxidativo e nitrosativo. Níveis elevados de Cu, Mn e Fe participam da formação de agregados de  $\alpha$ -sinucleína em inclusões intracelulares, denominados Corpos de Lewy. Isso resulta em disfunção sináptica e interrupção do transporte axonal [83]. Acevedo *et al.* [84] mostraram que o tratamento com Cu de células neuronais resultou em aumento da proteína precursora A $\beta$  (sinal de DA) na superfície celular, promovendo sua exocitose do Golgi e reduzindo sua taxa de endocitose.

Estudos mostraram que o cobre induz a agregação de Amilóide  $\beta$ , enquanto sua quelação previne a agregação do A $\beta$  [77]. Os íons de Cu são liberados das vesículas dos neurônios durante a sinapse, atingindo concentrações tão altas quanto  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  [85]. Em condições que a homeostase deste metal não seja regulada, pode ocorrer

a formação de Cu-A $\beta$ . A razão de ligação Cu-A $\beta$  dependerá das constantes de estabilidade de cada íon metálico, da concentração desses íons e do pH, já que a liberação de cobre das metaloproteínas ocorre em meio ácido. Dessa forma, a acidez encontrada no cérebro de pacientes com a doença de Alzheimer pode ser um fator essencial que leva à interação de Cu com A $\beta$ , levando à formação de agregados insolúveis [86]. Assim, a disponibilização de íons Cu no meio extracelular pode induzir o estresse oxidativo pela geração de espécies reativas ou induzir a agregação do peptídeo A $\beta$ , ambos fatores observados na DA. Além disso, no nível celular, estudos indicam que o cobre promove a redistribuição da proteína precursora de A $\beta$  (APP) de uma localização perinuclear para uma distribuição mais ampla, incluindo neurite [87]. Essa redistribuição não induz a expressão de APP, mas aumenta a clivagem da proteína para o meio extracelular.

### *Doença de Alzheimer e Cobre*

A Organização Mundial da Saúde (OMS) [88] estimou o ranking dos cinco primeiros países em número de mortes causadas pela DA em 2008. Em números absolutos, o ranking foi dos EUA; China; França; Reino Unido; e Espanha com 172,8; 40,5; 31,4; 29,1; e 23,6 mil óbitos em 2008, respectivamente. Além disso, o total de

óbitos naquele ano no mundo causados pela DA foi de 538.947 mil. A classificação do percentual de óbitos com DA em relação ao total de óbitos no país foi de 10,3; 6,8; 6,3; 6,0; e 5,2% na Finlândia; EUA; Espanha; França; e Canadá, respectivamente.

A Alzheimer Europe [89] estima que o número de pessoas com demência na Itália, Alemanha, França, Suécia, Espanha e Portugal em 2012 representava 2,09; 1,92; 1,85; 1,82; 1,75; e 1,71% da população total. Esses valores foram equivalentes a 1,27; 1,57; 1,74; 0,17; 0,81 e 0,18 milhões de pessoas, respectivamente. No entanto, em Chipre, Irlanda, Eslováquia e Turquia, a incidência tem as taxas mais baixas da Europa, com 1,07; 1,08; 1,07; e 0,44% da população total, respectivamente.

Levantamos o número de artigos na base de dados Scopus sobre a conexão biológica entre DA e Cu. A busca no 'Scopus' com os termos "Alzheimer disease e Copper" forneceu 3009 resultados de documentos (Figura 1). A estratificação por 'área temática' das Revistas Científicas de publicação revela que 26% dos artigos publicados são da área de bioquímica, 17% da medicina, 16% da neurociência, 13% da química e 9,2% da farmacologia. Essa classificação básica pode ajudar a retratar as grandes áreas de artigos científicos publicados sobre esse tema que incluem:

## *Conexão entre o Cobre e a DA: literatura de bioquímica*

Esta literatura inclui Química Inorgânica e de Coordenação e é principalmente focada na interação de  $A\beta$  – o peptídeo que forma placas no cérebro com DA – e a APP com Cu. APP é uma proteína de Cu [90]. O conhecimento consolidado indica que o sistema APP/ $A\beta$  é central para a patogênese da DA, e uma visão recente propõe que o sistema APP/ $A\beta$  está centralmente envolvido no transporte neuronal de Cu nas sinapses e nos processos de aprendizado e memória (revisado em [91-93]). O Cu fracamente ligado, como um metal de transição, facilita ativamente o estresse oxidativo por meio de reações do tipo Fenton e Haber Weiss. Foi demonstrado que essas reações resultam em formações de oligômeros  $A\beta$  e sua precipitação dentro das placas com a peroxidação lipídica [84, 94-96]. Evidências estabelecidas demonstraram que: APP é uma proteína de Cu que se liga e reduz o Cu de Cu(II) para Cu(I) [90], facilitando a toxicidade induzida por Cu em culturas de células e o estresse oxidativo por meio da produção de  $H_2O_2$  [97]; que  $A\beta$  e metais estão agrupados nas placas cerebrais  $A\beta$  [90, 98, 99]; que as placas  $A\beta$  podem ser dissolvidas por agentes quelantes que sequestram o Cu [98]. A sobrecarga de moléculas de Cu(II)- $A\beta$  também é provável, particularmente nas sinapses onde ambas estão disponíveis em concentrações muito mais altas do que a média (revisado em [91]). Concomitantemente, o

Cu no interior dos neurônios pode ser diminuído [100].

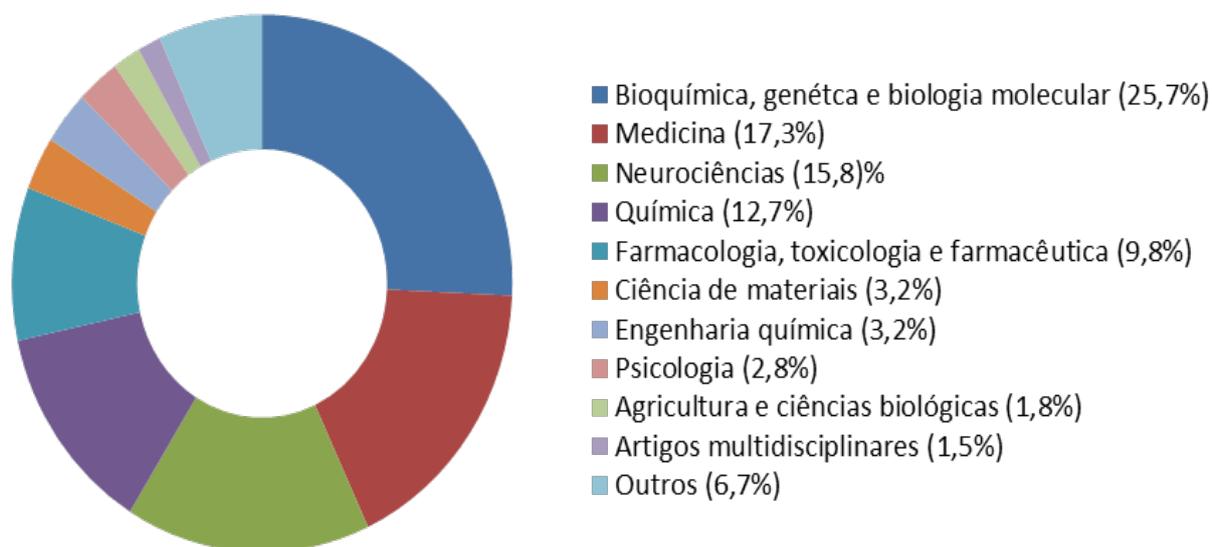


Figura 1. Áreas do conhecimento da literatura publicada sobre o tema "Copper" e "Alzheimer disease". Adaptado de Coelho et al. [1]

### *Conexão entre o Cu e a DA: literatura médica*

Na literatura médica, a maioria dos estudos se concentrou na comparação dos níveis de Cu em diversos tecidos de órgãos ou matrizes biológicas (por exemplo, soro, plasma, líquido cefalorraquidiano, cérebro, cabelo, unhas).

A maioria dos artigos científicos utilizou meta-análises que relataram excesso de cobre na circulação geral [101 - 103] e deficiência de cobre no cérebro [104] (Tabela 1). Como resultados de consenso, verificou-se que pacientes com DA falham em manter um equilíbrio metabólico correto da distribuição de Cu no corpo, consistindo principalmente em aumentos séricos de Cu não

ligado à ceruloplasmina (nCp-Cu) (um pool de baixo peso molecular de Cu não ligado a proteínas no soro facilmente trocado entre albumina,  $\alpha$ 2 macroglobulina, peptídeos e aminoácidos) [102] e outras anormalidades [105]. Mais precisamente, meta-análises forneceram resultados de diminuição dos níveis de Cu no cérebro [104], juntamente com um aumento geral de nCp-Cu no soro/plasma [101-103, 106, 107] (Tabela 1), que explica o excesso de cobre na corrente sanguínea [108] (Tabela 1). Alguns estudos indicaram que o nCp-Cu pode atravessar a barreira hematoencefálica na DA [109], como exemplificado na doença de Wilson, a doença paradigmática da toxicose ou acúmulo de nCp-Cu [110]. Alguns autores argumentaram que: “Existem duas doenças neurodegenerativas com anormalidades no metabolismo do cobre: (a) a forma juvenil com degeneração nos gânglios da base (doença de Wilson) e (b) a forma relacionada à idade com neurodegeneração cortical (doença de Alzheimer)” [111].

Estudos clínicos também forneceram evidências da associação do Cu com a gravidade da doença em termos de desempenho em testes neuropsicológicos [109, 110], estágio da doença [112 - 115] em exames de eletroencefalografia (EEG) e em alterações dos ritmos cerebrais, atroficos e cerebrovasculares [116, 117].

Evidências substanciais mostram que alterações

nos níveis de nCp-Cu no soro, plasma, líquido cefalorraquidiano (LCR) e cérebro de pacientes com DA estão associadas à ocorrência de déficits cognitivos e à transição de diferentes estádios do espectro relacionado à DA [93]. No cérebro com DA, o aumento progressivo do pool de nCp-Cu é consistente com a presença paralela de um pool expandido de nCp-Cu no sangue [109, 118]. O distúrbio do Cu na DA pode ser descrito por uma perda de Cu funcional de pools ligados a proteínas que reduz a produção de energia e o controle do estresse oxidativo, e um ganho de função redox-tóxica descrita por um pool maior de Cu fracamente ligado a proteínas (revisado em [91]). Em pacientes com DA, o nCp-Cu correlaciona-se com o aparecimento de alterações na atividade cerebral do EEG [119, 120], sinais de atrofia cerebral [117, 121], níveis patológicos de A $\beta$  e proteína tau no líquido cefalorraquidiano (LCR) [109] e um pior prognóstico [122]. Ele aumenta a suscetibilidade à DA em aproximadamente três vezes [9, 10]. O nCp-Cu também está associado a uma maior frequência de variantes específicas do gene ATP7B que aumenta o risco de DA [123, 124] (Tabela 1). As variantes do gene rs1061472 e rs732774 de ATP7B são polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que modificam as propriedades da proteína ATPase7B e estão associados a um maior risco de DA e a uma maior fração de nCp-Cu no soro [109, 125, 126] (Tabela 1).

Tabela 1. Estudos clínicos que analisam a ligação do Cu e do ATP7B com o risco de doença de Alzheimer e a associação com o estado clínico dos indivíduos. Adaptado de Coelho et al. [1]

	Indivíduos	Risco (OR <sup>1</sup> , RR <sup>2</sup> , HR <sup>3</sup> )	CI <sup>4</sup> 95%	valor P
<i>Cu sérico e risco de DA</i>				
O nível de Cu foi maior em indivíduos com DA do que em indivíduos controle e correlacionou-se com desempenho neuropsicológico ruim e com a atrofia do lobo temporal medial [112]	76 DA vs 79 indivíduos saudáveis	1.80	1,36 -2,43	p<0,05
O nível de Cu foi maior em indivíduos com DA do que em pacientes com demência vascular (VaD) [127]	48 DA vs 20 VaD	2.06	1.28 - 3.31	p<0,003
nCp-Cu foi maior na DA do que nos controles saudáveis e na DV e correlacionou-se com o desempenho neuropsicológico ruim [121]	47 DA vs 44 indivíduos saudáveis e 24 indivíduos VaD	1.80	1,36 -2,43	p<0,001
nCp-Cu foi maior na DA do que nos controles saudáveis; Cerebrospinal (LCR) $\beta$ -amilóide e H-Tau correlacionados com nCp-Cu sérico; o Cu no LCR era parcialmente dependente do nCp-Cu sérico (t = 2,2, p = 0,04). O Mini-Exame do Estado Mental (MEEM) e os escores de memória verbal correlacionaram-se positivamente com $A\beta$ (r = 0,46, p = 0,002) e inversamente com nCp-Cu (= 0,45, p = 0,003) [109]	28 DA vs 25 indivíduos saudáveis			p<0,001
nCp-Cu previu a mudança anual no MMSE; quando a mudança anual no MMSE foi dividida em <3 ou $\geq$ 3 pontos, o nCp-Cu foi o único preditor de um declínio mais grave [122]	81 indivíduos com DA, estudo longitudinal de 1 ano	1.23	1.03- 1.47	p<0,022
nCp-Cu foi maior no CCL do que em indivíduos saudáveis [113]	83 indivíduos CCL, 100 indivíduos saudáveis	1.22	1.05- 1.41	p<0,01

	Indivíduos	Risco (OR <sup>1</sup> , RR <sup>2</sup> , HR <sup>3</sup> )	CI <sup>4</sup> 95%	valor P
<i>Cu sérico e risco de DA</i>				
O nível de Cu mostrou aumento significativo no soro de DA e CCL em comparação com o controle (p = 0,038) [128]	36 DA, 18 CCL vs 25 indivíduos saudáveis			p<0,05
nCp-Cu aumentou o risco de DA; quando combinado em um algoritmo com sexo, APOE, Cp/Tf, TAS, a capacidade de discriminar pacientes com DA versus controles foi alta (ROC 5, AUC 6 =0,9) [9]	93 DA, 45 VaD, 48 indivíduos saudáveis	3.21	1,53-6,71	p<0,002
nCp-Cu foi um preditor de conversão para DA: indivíduos CCL com níveis nCp-Cu >1,6 μ mol /L tiveram uma taxa de conversão de risco (conversão de 50% em 4 anos) que foi ~3 x maior do que aqueles com valores ≤1,6 μmol /L (<20% em 4 anos) [10]	131 indivíduos CCL, 6 anos de estudo longitudinal	3.3	1.21-9.24	p=0,02
nCp-Cu mais altos em CCL e DA em relação ao controle (p<0,0001) [115]	44 DA e 36 CCL vs 28 indivíduos saudáveis			p<0,001
nCp-Cu e Cu:Cp resultaram mais elevados na DA e na doença de Wilson (WD) do que em controles saudáveis; enquanto nCp -Cu foi semelhante entre DA e WD, Cu:Cp foi maior em WD. A excreção urinária de Cu em 24 horas em pacientes com DA (12,05 μg /dia) foi maior do que em controles saudáveis (4,82 μg /dia); 77,8% dos pacientes com DA em tratamento com D- penicilamina tiveram uma excreção urinária de 24 h superior a 200 μg /dia, sugestiva de falha no controle do Cu [81]	385 DA, 9 WD, 336 indivíduos saudáveis			p<0,0001
nCp-Cu não se altera na degeneração lobar frontotemporal (DLFT) [127]	85 DLFT, 55 indivíduos saudáveis			p<0,001

	Indivíduos	Risco (OR <sup>1</sup> , RR <sup>2</sup> , HR <sup>3</sup> )	CI <sup>4</sup> 95%	valor P
<i>Variantes do gene ATP7B e risco para doença de Alzheimer</i>				
Variantes genéticas específicas no gene ATP7B, ou seja, rs1801243 (OR = 1,52, 95% CI = 1,10–2,09), rs2147363 (OR= 1,58, 95% CI = 1,11–2,25), rs1061472 (OR= 1,73, 95% CI = 1,23–2,43) e rs732774 (OR= 2,31, 95% CI = 1,41–3,77) aumentou o risco de ter DA [129]	285 DA vs 230 indivíduos saudáveis	2.3	1,41-3,77	p<0,001
A variante rs7334118 causadora da doença de Wilson em desequilíbrio de ligação com o rs2147363 intrônico (associado ao risco de DA) foi detectada em dois pacientes com DA, mas em nenhum indivíduo saudável. No entanto, esta mutação da doença de Wilson não explica a associação genética observada de rs2147363. Por outro lado, análises in silico da funcionalidade rs2147363 destacaram que esta variante está localizada em um sítio de ligação de um fator de transcrição e está associada a funções regulatórias [130]	286 DA vs 283 indivíduos saudáveis	1.3	1.06-1.69	p=0,015
O haplótipo TGC em variantes genéticas específicas no gene ATP7B, ou seja, rs1801243, rs1801249, rs1801244 e rs1800-1243 foi associado a um risco aumentado de ter DA [131]	120 DA vs 111 indivíduos saudáveis	5.16	2,54-10,5	p<0,001

<sup>1</sup>OU, razão de probabilidade;

<sup>2</sup>RR, risco relativo ;

<sup>3</sup>HR, taxa de risco;

<sup>4</sup>IC, Intervalo de confiança;

<sup>5</sup>ROC, as curvas características de operação do receptor descrevem a probabilidade de um determinado teste ser excelente, bom ou sem valor. A precisão do teste depende, neste caso, da probabilidade de que um indivíduo selecionado aleatoriamente do grupo DA tenha um valor de nCp-Cu maior do que o de um indivíduo selecionado aleatoriamente do grupo controle saudável. A precisão é medida por <sup>6</sup>AUC (área sob a curva) da curva ROC. Uma AUC = 1 representa um teste perfeito, um valor de 0,5 representa um teste sem valor e valores na faixa de 0,7 a 0,8 são considerados com valor

## Conexão entre o Cobre e a DA: neurociência

Vários artigos científicos avaliando medições de atividades elétricas em modelos de cultura de células foram incluídos nesta categoria (revisado em [132] e em [92]). Uma grande quantidade de evidências nesta categoria vem de estudos em modelos experimentais focados na investigação da correlação causal de Cu e nCp-Cu no desenvolvimento e progressão da DA (revisado em [133] e [134]; Tabela 2).

Tabela 2. Modelos experimentais focados na investigação da correlação causal de Cu e Cu não- ceruloplasmina no desenvolvimento e progressão da DA. Adaptado de Coelho *et al.* [1]

Autores, ano	Modelo animal	Dose e via	Duração	Efeitos
<i>Modelos animais de neurotoxicidade de Cu induzida por dieta alterada</i>				
Sparks e Schreurs, 2003 [135]	Coelhos brancos da Nova Zelândia	12 mg/L de Cu em DW 1 + 2% de colesterol - oral	10 semanas	Acúmulo de A $\beta$ no cérebro; déficit na aquisição de memória complexa
Sparks <i>et al.</i> , 2006 [136]	Cachorros beagle	200 mg/L CuSO <sub>4</sub> em DW + dieta rica em gordura - oral	4 meses	Depósitos A $\beta$ extracelulares
Lu <i>et al.</i> , 2006 [137]	Ratos da estirpe Kuming	0,21 mg/L de Cu em DW + 2% de colesterol - oral	8 semanas	Déficits cognitivos; apoptose neuronal

Autores, ano	Modelo animal	Dose e via	Duração	Efeitos
<i>Modelos animais de neurotoxicidade de Cu induzida por dieta alterada</i>				
Arnal <i>et al.</i> , 2013 [138]	Rato Wistar	3 mg/L de Cu em água da torneira + 2% de colesterol – oral	2 meses	Aumento do estresse oxidativo no cérebro; aumento do nCp-Cu no hipocampo; aumento de A $\beta$ (1-42)/A $\beta$ (1-40) no córtex e hipocampo
Arnal <i>et al.</i> , 2013 [138]	Rato Wistar	3 mg/L de Cu em água da torneira + 2% de colesterol – oral	8 semanas	Ligeira mudança perceptível na memória visuo-espacial
Yao <i>et al.</i> , 2018 [139]	Rato Tg2567	0,1 mg/L de Cu na água potável e 2% de colesterol nos alimentos	3 meses	Significativo de A $\beta$ e formação de placa senil no hipocampo e nas regiões do córtex temporal
Abolaji <i>et al.</i> , 2020 [140]	D. melanogaster moscas	Cu <sup>2+</sup> (1 mM)	7 dias	Reduzida sobrevivência
Lamtai <i>et al.</i> , 2020 [141]	Rato	CuCl <sub>2</sub> (0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg e 1 mg/kg) injetado por via intraperitoneal	8 semanas	Memória de trabalho, aprendizado espacial e memória foram significativamente prejudicados em ratos tratados com Cu na dose de 1 mg/kg
<i>Modelos de neurotoxicidade do Cu em animais geneticamente comprometidos</i>				
Sparks <i>et al.</i> , 2006 [136]	Coelhos brancos da Nova Zelândia	0,13 mg/L de Cu em DW – oral	10 semanas	Acúmulo de A $\beta$ no córtex temporal superior e hipocampo

Autores, ano	Modelo animal	Dose e via	Duração	Efeitos
<i>Modelos de neurotoxicidade do Cu em animais geneticamente comprometidos</i>				
Sparks <i>et al.</i> , 2006 [136]	Camundongos transgênicos PS1/APP	0,12 mg/L Cu em DW-oral	6 semanas	Deposição de A $\beta$
Singh <i>et al.</i> , 2013 [142]	APP sw /0 ratos	0,13 mg/L de Cu em DW-oral	90 dias	Aumentar a produção cerebral de A $\beta$ ; aumento da neuroinflamação; comprometimento da memória; aumento dos níveis de Cu nos capilares cerebrais e parênquima
Yu <i>et al.</i> , 2014 [143]	3xTg -DA	250 mg/L CuSO 4 em água potável	6 meses	Memória imparidade

<sup>1</sup>DW, água desionizada.

Em um estudo publicado em 2003, Sparks e Schreurs demonstraram que, em um modelo de DA de coelho alimentado com colesterol, a adição de 0,12 mg L<sup>-1</sup> de Cu à água potável destilada resultou em declínio cognitivo. Também exacerbou a deposição de placa amilóide em relação aos animais de controle [135]. Esta descoberta foi de alguma forma provocativa, pois levou a preocupações sobre o teor

de Cu na água potável lixiviada dos encanamentos ou conexões de Cu.

O estudo de Singh *et al.* forneceu uma ênfase específica no papel causador que o nCp-Cu pode desempenhar no início e na progressão da DA [142]. Singh *et al.* [142] avaliaram camundongos normais (tipo selvagem) e um modelo de camundongo com DA (camundongos transgênicos A $\beta$ PP) expostos a 0,13 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de cobre via água potável, por 90 dias. Essa exposição ao Cu dobrou as concentrações plasmáticas de nCp-Cu. Este fato causou uma redução da depuração de A $\beta$  no líquido cefalorraquidiano através da barreira hematoencefálica em camundongos selvagens ou um efeito idêntico, juntamente com um aumento na produção de A $\beta$  em camundongos transgênicos. Assim, propondo o conceito de que o nCp-Cu é um fator de risco causador da DA.

# Dishomeostase do Cu nas doenças de Wilson e de Alzheimer



## **CAPÍTULO 4**

A doença de Wilson (degeneração hepatolenticular) é um defeito metabólico autossômico recessivo na excreção hepática de Cu na bile, resultando em uma distribuição alterada de Cu no corpo. A função defeituosa da bomba de Cu ATPase7B após mutações do gene ATP7B dificulta a carga de Cu na ceruloplasmina no nível do fígado [112, 143 - 146]. Nesse distúrbio, por defeitos genéticos de ambas as cópias do gene ATP7B, o nCp-Cu torna-se aumentado no soro, acumulando-se no fígado, em algumas regiões do cérebro, na córnea do olho (anéis de Kayser-Fleischer) e em outros órgãos, produzindo estresse oxidativo e dano tecidual. O nCp-Cu é um pool de Cu trocável no soro (trocado entre albumina,  $\alpha 2$  macroglobulina, peptídeos e aminoácidos) com baixo peso molecular. Quando excede o limite superior dos valores normais em uma população geral de  $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$  no sangue [147 - 150], é neurotóxico porque atravessa a barreira hematoencefálica e causa estresse oxidativo e dano tecidual (revisado em [95]) via Fenton como as reações de Haber Weiss [72, 104].

A doença de Wilson e a DA compartilham semelhanças que foram avaliadas recentemente em um estudo comparando Cu sérico, ceruloplasmina, nCp-Cu e Cu:Cp em 385 pacientes com DA, 336 controles saudáveis em 9 pacientes com doença de Wilson recém-diagnosticada [83]. Os dados da excreção urinária de Cu, em 24 horas, em 24 pacientes, com doença de Wilson sob tratamento com D-penicilamina (D-pen) e, em 35 controles saudáveis, foram comparados com os

resultados de pacientes com DA que participaram de um ensaio clínico de fase II com D-pen publicado anteriormente. Após ajuste para sexo e idade, constatou-se que a concentração de nCp-Cu sérico e a relação Cu:Cp são maiores na DA e na doença de Wilson do que em controles saudáveis (ambos  $p < 0,001$ ). Enquanto o nCp-Cu foi semelhante entre a DA e a doença de Wilson, o Cu:Cp foi maior na DW ( $p < 0,016$ ). A excreção urinária de Cu, em 24h, em pacientes com DA ( $12,05 \mu\text{g dia}^{-1}$ ), foi maior do que em controles saudáveis ( $4,82 \mu\text{g dia}^{-1}$ ;  $p < 0,001$ ). 77,8% dos pacientes com DA em tratamento com D-pen apresentaram excreção urinária de 24 h superior a  $200 \mu\text{g dia}^{-1}$ , sugerindo falha no controle do Cu.

### *Dishomeostase de Cobre e declínio cognitivo*

Os níveis séricos de nCp-Cu são aumentados em indivíduos com DA e os níveis séricos elevados de nCp-Cu aumentam o risco de desenvolver DA [106, 117, 118]. Foi demonstrado que o nCp-Cu sérico prediz o declínio cognitivo em indivíduos com Comprometimento Cognitivo Leve (CCL) [114, 117, 118, 151 - 153], bem como na normalidade [59]. Em um estudo prospectivo de 141 indivíduos (idade média de 70,8 anos) com CCL acompanhados por seis anos, o único fator significativo que prediz o desenvolvimento de DA foram os níveis de

nCp-Cu. Utilizando-se um corte de nCp-Cu de 1,6  $\mu\text{M}$  (limite superior do normal na população geral [147 - 150]), a taxa de risco para o desenvolvimento de DA foi de 1,23 [(95% IC: 1,03-1,47);  $p=0,022$ ]. O modelo previu que, para cada  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de aumento de unidade de nCp-Cu, o risco aumentava em cerca de 20%. O nCp-Cu também foi associado à função cognitiva em um grupo homogêneo de 64 mulheres saudáveis. Todos os indivíduos do estudo foram submetidos a testes neuropsicológicos em uma bateria que incluía o “Mini-Mental State Examination” (MMSE), uma ferramenta de triagem amplamente utilizada para detectar a deterioração cognitiva [59]. Escores MMSE mais baixos associados a níveis aumentados de nCp-Cu sérico. Além disso, a função executiva reduzida foi associada a níveis mais elevados de nCp-Cu sérico [154].

Assim, a relação entre Cu e DA tem sido amplamente pesquisada nos últimos anos.

A exposição crônica ao Cu e sua dishomeostase tem sido associada a acelerar o declínio cognitivo e potencialmente aumentar o risco de DA [155, 83, 85]. No entanto, os íons de Cu, devido à sua capacidade redox, têm sido considerados os principais alvos terapêuticos potenciais na DA, e um número considerável de ligantes foi desenvolvido para modular a toxicidade associada ao Cu nesse contexto, via interrupção da interação  $\text{A}\beta\text{-Cu}$  [156].

James *et al.* [118] avaliaram os níveis de espécies de Cu redox-competentes ( $\text{Cu}^{+2}$  e  $\text{Cu}^{+1}$ ) na DA. Eles quantificaram a carga de Cu lábil redox-ativo no tecido cerebral pós-morte de indivíduos com DA e controles cognitivamente saudáveis da mesma idade. Huat *et al.* [155], em uma revisão recente, afirmaram que “considerando a evidência robusta para os papéis essenciais do Cu no cérebro, não é surpreendente que muitos estudos proponham que um desequilíbrio em sua homeostase esteja associado a distúrbios neurodegenerativos”. Hsu *et al.* [156] em um experimento de laboratório, observaram que camundongos após nove meses de exposição a  $1,3 \text{ mg L}^{-1}$  de Cu na água potável correlacionaram-se com o aumento do acúmulo vascular de  $\text{A}\beta$  e comprometimento da memória espacial, indicando que a exposição ao Cu tem papel fundamental no dano e desenvolvimento de declínio cognitivo.

Avaliação  
do risco à  
saúde humana  
relacionado ao  
uso de Cu na  
agricultura



**CAPÍTULO 5**

A EFSA realizou uma revisão sobre a avaliação de risco de pesticidas da substância ativa de compostos de Cu [55]. Esse relatório aponta as dificuldades em substituir o Cu no manejo de doenças de plantas na agricultura orgânica. Ao mesmo tempo, aborda a relação entre Cu e DA afirmando que não há comprovação científica para isso, sem citar nenhuma referência. No entanto, há evidências em numerosos trabalhos sugerindo a existência de uma relação entre o acúmulo de Cu no corpo humano no envelhecimento, naqueles indivíduos com predisposição a anormalidades metabólicas de Cu, que podem ser identificadas por terem níveis de nCp-Cu acima do normal e a relação com o desenvolvimento da DA.

Massie *et al.* [68], Zatta *et al.* [157] e Vasudevaraju *et al.* [158] indicaram que esse acúmulo de cobre é real em animais idosos e no corpo humano. No entanto o que pode causar a toxicidade, mais do que o acúmulo, é o deslocamento do cobre para Cu frouxamente ligado também no cérebro [106]. Quando ligado a proteínas, o cobre não é tóxico, embora aumente com o envelhecimento. Por outro lado, quando o nCp-Cu excede o intervalo de referência normal, ele passa a ser tóxico [68, 157]. Além disso, estudos recentes mostraram que as frequências dos SNPs funcionais rs1061472 A > G e rs 732774 G > A, bem como a frequência do haplótipo contendo os alelos de risco GA derivados estão associados a níveis aumentados de nCp-Cu e com o risco aumentado de ocorrência da doença de Alzheimer

[125] (Tabela 1). Esta evidência está de acordo com a declaração da EFSA e sugere que portadores humanos de SNPs funcionais ATP7B [55] exibem valores mais altos do que o normal de nCp-Cu, portanto, são propensos a uma suscetibilidade ao Cu que pode aumentar o risco de desenvolver DA.

Além disso, Zatta *et al.* [157] avaliaram os teores de Cu em cérebros de bovinos jovens (8 meses) e adultos (9 a 12 anos), verificando que os teores de Cu variaram de 1,67 a 15,7 mg g<sup>-1</sup> de tecido fresco, respectivamente, indicando que, com o envelhecimento, há um acúmulo de Cu no cérebro. O acúmulo de Cu com o envelhecimento também foi demonstrado em humanos. Vasudevaraju *et al.* [158] categorizaram os cérebros humanos em três grupos. Grupo I: abaixo de 40 anos, Grupo II: entre 41 e 60 anos e Grupo III: acima de 60 anos. Eles descobriram que os conteúdos de Cu e Fe são significativamente elevados, enquanto o Zn é significativamente reduzido, à medida que se avança do Grupo I para o Grupo III, indicando mudanças em Cu e Fe com o envelhecimento no córtex frontal e no hipocampo. Além disso, esses autores constataram que a elevação de metais era maior na região cortical frontal em comparação com a região hipocampal.

Na verdade, Vanacore *et al.* [159] confirmaram relações entre um alto teor de Cu e uma maior incidência de DA. Como explicado anteriormente, o Cu é um nutriente para os seres humanos e participa da composição de

proteínas importantes [78]. No entanto, quando o excesso de nCp-Cu é gerado, pode levar ao estresse oxidativo e também causar efeitos nocivos à saúde [79].

Para confirmar essa afirmação, além dos dados relatados na Tabela 1-2, Hsu *et al.* [156] mostraram a exposição ambiental, dietética ao Cu e seus mecanismos celulares ligados à DA. Além disso, Pal *et al.* [133] relataram que a autópsia de cérebros de pacientes afetados por DA mostra a presença de teores anormalmente altos de Cu nas placas A $\beta$  depositadas, enquanto um nível significativamente mais alto de Cu foi encontrado no soro de pacientes que sofrem de diabetes tipo 2 (DM2).

Com base nas evidências produzidas por meta-análises, grandes estudos populacionais, estudos clínicos e genéticos, bem como estudos experimentais *in vitro* e em animais que relatamos, neste livro, sugerimos que os órgãos mundiais de controle da saúde, realizem maiores esforços para fornecer um diagnóstico atualizado, dando a visão geral sobre a possível ligação causal entre a homeostase do cobre perturbada e a patologia da doença de Alzheimer em humanos.

É claro que o uso de cobre na agricultura não é a única fonte de absorção excessiva desse elemento em humanos, mas as evidências existentes sobre a conexão biológica do desequilíbrio do Cu com a DA, juntamente

com o seu efeito tóxico nos organismos do solo mencionados anteriormente, devem ser suficientes para estimular os governos de todo o mundo a investir mais em pesquisas para reduzir o seu uso na agricultura, com o objetivo de reduzir o risco de se desenvolver a doença de Alzheimer entre os indivíduos com predisposição a anormalidades metabólicas do Cu, além de proteger a diversidade biológica do solo e seus serviços ecossistêmicos.

# Estratégias agroecológicas para reduzir o uso de Cu na agricultura



## **CAPÍTULO 6**

Na seção anterior deste livro, apresentamos uma visão geral das evidências científicas que sustentam que o uso excessivo de Cu na agricultura pode levar à poluição severa do solo. Via cadeia alimentar, o Cu pode se acumular no corpo humano, causando problemas de saúde em pessoas com predisposição ao desequilíbrio de Cu, como os portadores dos SNPs funcionais ATP7B rs1061472 A > G e rs 732774 G > A [160].

Desde 2001, a União Europeia e seus estados-membros financiaram uma ampla variedade de projetos destinados a diminuir a dependência do uso de cobre especialmente na agricultura orgânica [161]. Na Alemanha, o Programa Federal de Agricultura Orgânica e Outras Formas de Agricultura Sustentável (BOLN) forneceu um financiamento substancial para projetos de pesquisa. Os esforços de pesquisa se concentraram no desenvolvimento de variedades resistentes e modelos de previsão, técnicas de cultivo aprimoradas e técnicas de pulverização, introdução de novos produtos com baixo teor de Cu, melhoria da avaliação do impacto de pesticidas que contêm cobre, desenvolvimento e introdução de alternativas e otimização de estratégias gerais de proteção de plantas [38].

Na viticultura orgânica no norte e no sul da Itália, dosagens reduzidas e convencionais de soluções cúpricas foram comparadas com peptidase de Cu, uma nova solução, que tem menos cobre do que o controle padrão, graças à sua maior capacidade de penetrar na célula do

patógeno [162]. Infelizmente, também a fitotoxicidade contra a cultura foi alta. Um estudo do Reino Unido [163] concluiu, com base em dados de um ano, que a produção de maçã foi maior, enquanto a infestação de sarna (*Venturia inaequalis*) foi menor em macieiras em um sistema agroflorestal em comparação com sistemas tradicionais. Este resultado pode ter implicações para dosagens reduzidas de cobre em sistemas agroflorestais. No tomate, a dependência do Cu na proteção da cultura contra *Phytophthora infestans* pode ser reduzida usando baixas dosagens de cobre. Outros esforços de pesquisa têm se concentrado em testes sistemáticos de produtos naturais, entre os quais a quitosana, contra uma ampla variedade de doenças, conforme mostrado em uma revisão abrangente de La Torre *et al.* [161]. Alguns desses produtos naturais, como extrato de folha de alcaçuz, extrato de *Yucca schidigera*, ou hidrogenocarbonato de potássio [164], foram eficazes contra doenças do tomateiro graças à atividade preventiva e efeito direto no crescimento micelial e germinação de esporângios.

Além da simples substituição do cobre por outros produtos naturais ou sintéticos [162, 164], ou novos produtos fitoprotetores com eficácia semelhante, mas com concentrações mais baixas de Cu, deve-se ter em mente abordagens agroecológicas para projetos de sistemas de cultivos sustentáveis. Em primeiro lugar, as abordagens agroecológicas garantiriam análise detalhada dos siste-

mas de cultivo que dependem do cobre e levariam em consideração a situação socioeconômica específica do contexto regional. Isso exigiria abordagem participativa envolvendo agricultores, partes interessadas locais e todo o sistema alimentar para determinar possíveis soluções para reduzir ou abandonar as aplicações com pesticidas cúpricos. Soluções agroecológicas serão buscadas principalmente em termos de prevenção dos principais problemas de doenças no sistema de cultivo específico. Estas soluções podem ser agronômicas, mas também a implantação de soluções baseadas na biodiversidade deve ser explorada com mais detalhes. O estudo de caso de agrofloresta de maçã mencionado anteriormente é um bom exemplo de tal abordagem. A melhoria da biodiversidade funcional nos sistemas de cultivo visando a prevenção e controle dessas doenças-chave pode seguir a abordagem proposta por Moonen e Bàrberi [165]. Esta abordagem prevê, em primeiro lugar, uma análise, preferencialmente, em um contexto de pesquisa de ação participativa, dos pontos fortes e fracos do sistema de cultivo e seu contexto socioeconômico em relação ao problema específico (neste caso, a necessidade de reduzir a dependência do Cu). Esta primeira análise resultará na definição de serviços ecossistêmicos priorizados e compensações a serem evitadas (neste caso, os serviços agroecossistêmicos necessários são o controle de doenças sem Cu). Especialistas (neste caso, principalmente fitopatologistas e

agrônomos) precisam identificar um ou mais grupos funcionais, definidos como “...grupos de elementos (ao nível de gene, espécie ou habitat) que fornecem o mesmo serviço agroecossistêmico” [165] que podem fornecer os serviços de agroecossistema desejados, mantendo a produção agrícola. Com base nesse conhecimento, o sistema de cultivo pode ser redesenhado por meio da pesquisa-ação participativa.

Em apoio a esse redesenho baseado na biodiversidade do sistema de cultivo voltado para o controle de doenças, os agricultores precisam considerar soluções agronômicas para reduzir a dependência de produtos fitoprotetores por meio da otimização e aumento do uso de medidas preventivas, como medidas culturais e proteção de plantas não química, conforme sugerido pelo IFOAM EU GROUP [37]. Por exemplo, em sistemas de culturas anuais e hortícolas, a rotação de culturas é eficaz no controle de doenças, conforme demonstrado por Bankina *et al.* [166]. Eles relataram uma diminuição significativa na doença da podridão do caule do trigo em rotações de culturas diversificadas. Além disso, o uso de culturas de cobertura pode ser considerado para diversificar a rotação de culturas e prevenir doenças. No entanto, o controle de doenças é eficaz no estágio inicial da cultura, mas nem sempre é eficaz até a colheita, como mostrado por Runno-Paurson *et al.* [167] para o controle da ferrugem da batata na agricultura orgânica.

As rotações de culturas diversificadas são especialmente relevantes para o controle de doenças na agricultura de conservação ou sistemas de preparo reduzido, uma vez que esses sistemas são mais suscetíveis ao desenvolvimento de doenças, como a fusariose em cereais de inverno [168]. Outras intervenções agronômicas que podem afetar muito o desenvolvimento da doença são a otimização dos sistemas de irrigação, conforme demonstrado por Lage *et al.* [169] no controle do oídio na produção orgânica de tomate por meio de seleção e desenvolvimento de variedades resistentes ou robustas [161]. Poucas pesquisas foram feitas sobre manejo de vegetação herbácea para controle de doenças em pomares e vinhedos, mas alguns estudos mostraram que a escolha do tipo de vegetação é relevante. Por exemplo, alguns tipos de vegetação foram capazes de reduzir a infecção de *Phytophthora* ou podridão radicular em pomares de maçã [170]. Ao mesmo tempo, algumas gramíneas alteram as comunidades fúngicas associadas às raízes nos vinhedos e diminuem a incidência dos patógenos do pé preto, como *Ilyonectria liriodendri* nesses vinhedos [171]. Além disso, a otimização do movimento do ar no dossel da cultura por meio de estratégias de poda corretas é eficaz [172] ou em culturas de alto valor, a cobertura com mantas plásticas especiais pode ser utilizada para otimizar o microclima, proteger a cultura de geadas tardias e danos causados por granizo e, portanto, reduzir os tratamentos à base de Cu na agricultura orgânica [161].

Apesar das evidências de que o Cu causa graves danos aos agroecossistemas e à saúde humana e apesar do esforço já feito para mostrar alternativas para o uso do Cu na agricultura orgânica, na Europa, onde a Autorização Atual de Compostos Antimicrobianos à Base de Cu [173] expirou em 31 de janeiro 2019, nenhuma decisão foi tomada ainda [174].

Lamichhane *et al.* [28] comentaram que a formulação de políticas apropriadas voltadas para a redução dos riscos associados ao Cu representa um desafio fundamental para pesquisadores, para formuladores de políticas e para agricultores.

# Conclusões do Tópico 1



## **CAPÍTULO 7**

O cobre é utilizado principalmente para controlar doenças de plantas. A calda bordalesa (sulfato de cobre) é amplamente utilizada na agricultura orgânica em todo o mundo, pois é considerada de baixa toxicidade para o homem e o meio ambiente. No entanto, quando em excesso, o Cu pode levar ao estresse oxidativo e efeitos nocivos em humanos com predisposição ao desequilíbrio desse elemento no metabolismo. A exposição crônica ao cobre em pessoas suscetíveis à dishomeostase de Cu, conforme revelado por níveis acima do normal de nCp-Cu, tem sido associada ao declínio cognitivo acelerado e a um risco aumentado de doença de Alzheimer.

Além da adoção de estratégias para a minimização do uso do Cu na agricultura orgânica, precisa ser levado em consideração a aplicação de abordagens agroecológicas para o desenho de sistemas de cultivo sustentáveis. Nestas abordagens são considerados o uso de alternativas naturais, menores taxas de aplicação e redução da dependência de agrotóxicos, otimização e aumento do uso de medidas preventivas como medidas culturais e plantas companheiras.

# TÓ PI CO 2

Conexões entre o metabolismo  
de Cu, S e Mo na doença de  
Alzheimer

Relações entre  
múltiplos fato  
res com a DA e  
a relação desses  
fatores com o  
metabolismo do  
Cu e do S



## **CAPÍTULO 8**

Em nosso levantamento bibliográfico, a palavra “Alzheimer” foi utilizada associada a outras palavras como beta-amilóide, Tau, hipertensão, diabetes, depressão, insônia e inflamação (Tabela 3). Foi verificado que no século 21, o número de trabalhos científicos relacionando os múltiplos fatores mencionados e DA aumentou muito.

Entre 2010 e 2019, os artigos relacionados à DA e hipertensão, diabetes, depressão, insônia e inflamação aumentaram 1,7; 2,8; 1,2; 1,4 e 2,9 vezes, respectivamente, em relação à soma dos artigos publicados entre 1960 e 2009. Em 2020, o número de artigos foi de 19; 20; 18; 27 e 22% do total de artigos publicados de 2010 a 2019. Isso mostra a intensa produção científica e que esse feito tem aumentado a cada ano.

É possível que a produção de beta-amilóide (A $\beta$ ) e Tau sejam consequências de eventos anteriores. Esses eventos anteriores possivelmente são as verdadeiras causas da DA. Dentro desta linha de raciocínio, a produção de A $\beta$  e Tau pode ser considerada um sintoma metabólico da DA.

Patologias ou sintomas relacionados à DA geralmente ocorrem antes e/ou concomitantemente com o início dos sintomas, como perda de memória. Múltiplos fatores estão associados à DA, incluindo hipertensão, diabetes, hipercolesterolemia, obesidade e depressão [4], bem como hormônios sexuais [175] e hiper-homocisteinemia [176], todos eles ligados de alguma forma a distúrbios de Cu e S.

Tabela 3. Quantidade de sites ou artigos científicos no Google Scholar ou PubMed, respectivamente, que mencionaram Alzheimer e múltiplos fatores geralmente associados à doença de Alzheimer, nos últimos 60 anos

Google Scholar							
Alzheimer e...	Beta-amilóide	Tau	Hipertensão	Diabetes	Depressão	Insônia	Inflamação
1960-69	3	23	157	176	257	44	82
1970-79	17	55	476	423	750	90	220
1980-89	287	1080	3520	3630	8960	917	1050
1990-99	6020	10500	13400	16400	29700	4530	9250
2000-09	29400	58500	52200	77000	116000	14500	66800
2010-19	80700	120000	68600	167000	347000	21800	142000
<b>Total</b>	<b>116427</b>	<b>190158</b>	<b>138353</b>	<b>264629</b>	<b>502667</b>	<b>41881</b>	<b>219402</b>
<i>2020</i>	<i>10200</i>	<i>23800</i>	<i>23500</i>	<i>39600</i>	<i>35800</i>	<i>5870</i>	<i>35200</i>
PubMed							
Alzheimer e...	Beta-amilóide	Tau	Hipertensão	Diabetes	Depressão	Insônia	Inflamação
1960-69	0	0	1	0	4	0	0
1970-79	0	0	12	2	12	0	0
1980-89	270	147	48	29	364	6	5
1990-99	4330	1402	202	243	1108	48	268
2000-09	12076	3771	734	1448	2485	113	1661
2010-19	26679	11442	1653	4748	4904	229	5640
<b>Total</b>	<b>46682</b>	<b>16640</b>	<b>2631</b>	<b>6436</b>	<b>8827</b>	<b>394</b>	<b>7522</b>
<i>2020</i>	<i>4077</i>	<i>2385</i>	<i>321</i>	<i>931</i>	<i>890</i>	<i>62</i>	<i>1221</i>

Consistentemente, pessoas com baixo desempenho no Teste Cognitivo de Substituição de Símbolos e Dígitos tendem a ter maior prevalência de hipertensão e diabetes, entre outras doenças, do que pessoas com desempenho cognitivo médio. É de particular interesse que o desempenho cognitivo no mesmo teste diminua com o aumento da ingestão total de Cu, indicando que os fatores de risco ligados à DA podem estar correlacionados com os níveis alterados de Cu [177], assim como comentado no tópico 1 deste livro.

O cobre pode influenciar a regulação da pressão arterial por meio da atividade da tirosinase, uma enzima chave na síntese de norepinefrina, um importante fator vasoconstritor [178]. Portanto, a hipertensão pode ser afetada por mudanças na concentração de Cu [178]. Além disso, um modelo logístico multinomial revelou que um aumento de nCp-Cu em uma unidade de desvio padrão aumentou em 9,6 vezes o risco relativo de se ter diabetes tipo 2 [179]. Aliás, os níveis séricos de  $\text{Cu}^{2+}$  são significativamente maiores em modelos de ratos com depressão [180] e pacientes com depressão significativa [181] em comparação com controles saudáveis [182]. Curiosamente, a exposição ao cobre exacerba o comportamento semelhante à depressão dos camundongos ApoE4. Os mecanismos podem envolver a desregulação da função sináptica e da resposta imune e a superativação da neuroinflamação [183].

Um padrão alimentar não saudável tem sido associado a um risco aumentado de depressão por meio da diminuição do conteúdo sérico de folato [184]. O folato é um cofator necessário para o metabolismo de aminoácidos contendo enxofre (S), particularmente importante para a produção de metionina (Met), a partir da homocisteína (Hcy), evitando a hiper-homocisteinemia. Os altos níveis de Hcy estão envolvidos na diminuição da síntese de catecolaminas e depressão [184] e predisposição à DA [185]. Namekawa *et al.* [186] avaliaram a depressão em idosos e encontraram um risco aumentado de DA e metabolismo da proteína A $\beta$ . Alterações no metabolismo do S parecem implicar nos fatores de risco de DA, depressão e hiper-homocisteinemia.

Em um trabalho feito com ratos em laboratório, constatou-se que aqueles que eram privados de repouso (impedidos de dormir), apresentavam sintomas semelhantes aos da DA, com aumento de A $\beta$ . Aqueles que foram privados de sono, mas conseguiram dormir posteriormente, não apresentaram sintomas de DA, da mesma forma que aqueles que dormiram normalmente [187].

Atualmente, a relação da DA com o metabolismo do Cu e do S, bem como com outras doenças associadas à DA, ainda não permite uma explicação clara sobre as causas da DA. Até o momento, o conhecimento acumulado nas últimas décadas tem proporcionado grandes

avanços no entendimento de como o metabolismo é alterado pela DA. No entanto, ainda existem dúvidas ou lacunas, como em um quebra-cabeça incompleto (Figura 2).

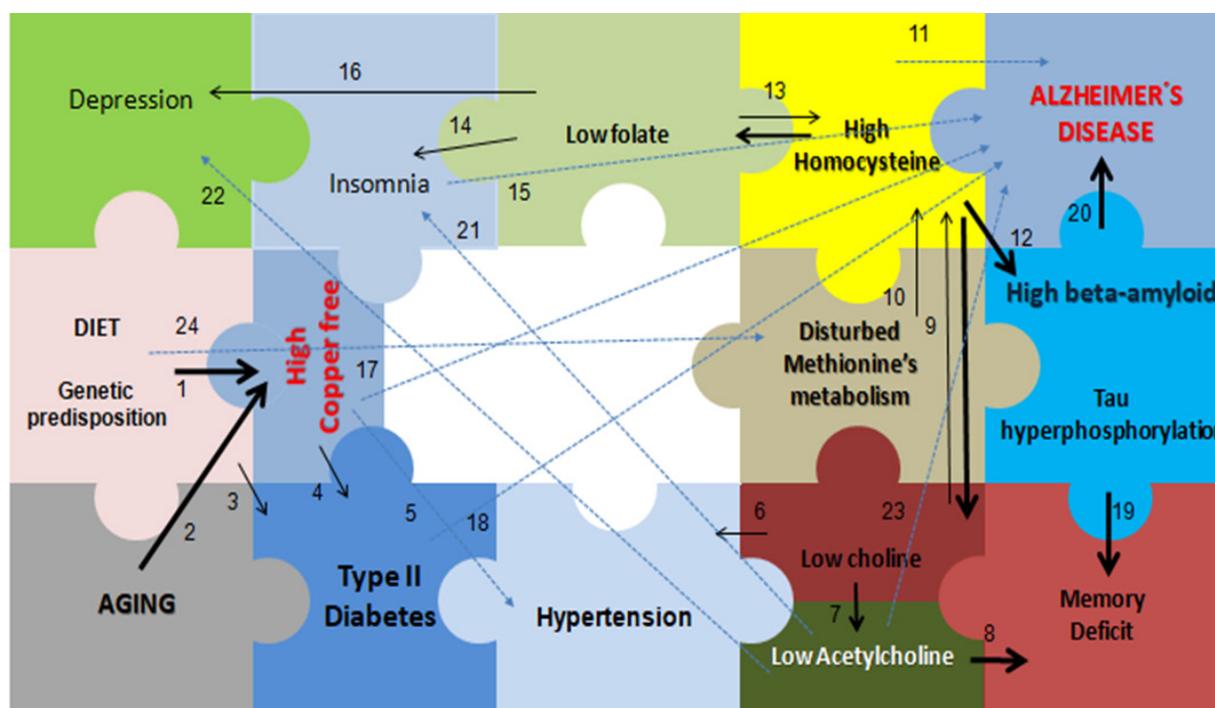


Figura 2 - Quebra-cabeça incompleto ilustrando os vários sintomas e interações metabólicas que ocorrem na doença de Alzheimer. 1. Squitti et al. [188]; 2. Vasudevaraju et al. [158]; 3. Sandouk e Lansang [189]; 4. Squitti et al. [179]; 5. Gouaref et al. [178]; 6. Sesso et al. [190]; Roe et al.. [191]; 7. Cohen e Wurtman [192]; 8. Rasch et al. [193]; 9. Varela-Moreiras et al. [194]; 10. Hooshmand et al. [195]; 11. Hooshmand et al. [196]; 12. Montecinos-Oliva et al. [197]; 13. Pietrzik e Brönstrup [198]; 14. Zhang et al. [199]; 15. Hita-Yañez et al. [200]; 16. Khosravi et al. [184]; 17. Squitti et al. [179]; 18. Prince et al. [201]; 19. Tremblay et al. [202]; 20. Solis Jr et al. [203]; 21, 22 e 23. Xu et al. [204]; 24. Tapia-Rojas et al. [205].

O conhecimento acumulado nas últimas décadas proporcionou avanços significativos na compreensão da DA. Além disso, a relação da DA com o metabolismo de Cu e S e outras doenças associadas à DA tem avançado muito, mas ainda não permite uma explicação clara das

causas da DA. Squitti *et al.* [206], em revisão recente, comentaram em profundidade sobre o desequilíbrio de Cu na DA e sua ligação com a hipótese A $\beta$ . No entanto, eles não mencionaram o metabolismo do S.

Artigos e revisões sobre as interações entre doenças associadas à DA são abundantes. Portanto, não serão todos apresentados aqui, pois este não é o foco deste livro. Além disso, optamos por não apresentar todas as citações de cada tema, pois o número seria enorme e impossibilitaria a realização e publicação deste livro.

Relação entre  
o metabolismo  
do Cu com a DA  
ou com múlti-  
plos fatores  
associados  
à DA



**CAPÍTULO 9**

No levantamento bibliográfico, a palavra “Alzheimer” tem sido utilizada associada a outras palavras como Cobre, Ceruloplasmina e ATP7B, relacionadas ao metabolismo do Cu (Tabela 4). No século 21, o número de trabalhos científicos relacionando o Cu com a doença de Alzheimer aumentou muito.

Tabela 4. Sites ou artigos no Google Scholar ou PubMed, respectivamente, que mencionaram Alzheimer e compostos relacionados ao metabolismo do Cu, nos últimos 60 anos

Google Scholar				PubMed			
Alzheimer e...	Cobre	Ceruloplasmina	ATP7B	Alzheimer e...	Cobre	Ceruloplasmina	ATP7B
1960-69	144	37	0	1960-69	1	1	0
1970-79	273	45	0	1970-79	3	0	0
1980-89	1180	138	2	1980-89	25	2	0
1990-99	7010	569	29	1990-99	84	15	0
2000-09	34500	2740	610	2000-09	512	38	3
2010-19	37400	8050	1920	2010-19	951	87	22
<b>Total</b>	<b>140000</b>	<b>11579</b>	<b>25</b>	<b>Total</b>	<b>1576</b>	<b>143</b>	<b>25</b>
<i>2020</i>	<i>11900</i>	<i>721</i>	<i>230</i>	<i>2020</i>	<i>102</i>	<i>6</i>	<i>0</i>

Assim como já comentado no capítulo 3 deste livro, estima-se que o cobre corporal total em humanos adultos varie de 70 a 150 mg, com os maiores conteúdos no fígado, cérebro, coração e rins [57]. O Cu é um nutriente para o ser humano, que participa da composição de proteínas essenciais: ceruloplasmina, Cu-Zn superóxido dismutase, redutase nítrica, amina oxidase, tirosinase,

bilirrubina oxidase, Citocromo c oxidase (COX) e plastocianina, por exemplo [78]. A principal via de excreção de cobre do organismo é a bile [207]. No entanto, pode levar ao estresse oxidativo e efeitos nocivos quando em excesso. As faixas séricas totais saudáveis de Cu são  $700 \mu\text{g L}^{-1}$  -  $1300 \mu\text{g L}^{-1}$  [208].

Conforme a referência utilizada mundialmente, do Institute of Medicine (EUA) [58], a partir de 19 anos, as recomendações nutricionais diárias e os níveis máximos toleráveis de ingestão de Cu não variam com o envelhecimento, permanecendo os mesmos valores para pessoas jovens e para pessoas idosas [57, 58] (Tabela 5).

Tabela 5. Recomendações nutricionais diárias e níveis toleráveis de ingestão de Cu ( $\mu\text{g dia}^{-1}$ )

Grupo de estágio de vida	Recomendação nutricional diária	Nível Superior Tolerável Ingestão	Grupo de estágio de vida	Recomendação nutricional diária	Nível Superior Tolerável Ingestão
<b>Bebês</b>			<b>Crianças</b>		
0–6 meses	200	ND	1–3 anos	<b>340</b>	1.000
7–12 meses	220	ND	4–8 anos	<b>440</b>	3.000
<b>Homens</b>			<b>Mulheres</b>		
9–13 anos	700	5.000	9–13 anos	700	5.000
14–18 anos	890	8.000	14–18 anos	890	8.000
19–30 anos	900	10.000	19–30 anos	900	10.000
31–50 anos	900	10.000	31–50 anos	900	10.000
51–70 anos	900	10.000	51–70 anos	900	10.000
> 70 anos	900	10.000	> 70 anos	900	10.000

Grupo de estágio de vida	Recomendação nutricional diária	Nível Superior Tolerável Ingestão	Grupo de estágio de vida	Recomendação nutricional diária	Nível Superior Tolerável Ingestão
Gravidez			Lactação		
14–18 anos	1.000	8.000	14–18 anos	1.300	8.000
19–30 anos	1.000	10.000	19–30 anos	1.300	10.000
31–50 anos	1.000	10.000	31–50 anos	1.300	10.000

\*Fonte: Institute of Medicine (EUA) [58]. ND = Não determinável devido à falta de dados de efeito adverso toxicológico específico

Em nosso ponto de vista, mais estudos devem ser realizados para determinar a quantidade necessária de Cu e os limites máximos por faixas etárias acima de 19 anos. É possível que em idades mais avançadas os limites de ingestão de Cu sejam menores do que nas gerações mais jovens porque o Cu pode se acumular no corpo com o envelhecimento [68, 157, 209]. No entanto, mais do que o acúmulo de Cu, é a maior concentração sérica de Cu frouxamente ligado (nCp-Cu) que pode causar toxicidade [91, 210].

Três proteínas transmembrana foram classificadas como transportadoras de Cu de membrana: ATP7A, ATP7B e CTR1 [211, 212]. O transportador de Cu ATP7A limita a inflamação vascular em parte por meio da supressão do miR-125b pró-inflamatório [213]. Além disso, Cu livre no soro, nCp-Cu, caracteriza pacientes com DA e possíveis defeitos genéticos do gene ATP7B em pacientes com DA foram identificados [214].

Sparks [215] verificou que o número de neurônios afetados e a intensidade da imunorreatividade A $\beta$  neu-

ronal aumentam consistentemente em coelhos com 0,12 mg L<sup>-1</sup> de íon Cu (na forma de sulfato de cobre) administrado na água de beber.

Assim como comentado no tópico 1, a exposição crônica ao Cu e sua dishomeostase tem sido associada ao declínio cognitivo acelerado e risco potencialmente aumentado de DA [59, 108, 216]. Além disso, os íons Cu, devido à sua capacidade redox, têm sido considerados potenciais alvos terapêuticos na DA, e um número considerável de ligantes foi desenvolvido para modular a toxicidade associada ao Cu neste contexto via interrupção da interação A $\beta$ -Cu [154]. Hsu *et al.* [217] relataram que evidências indicam que a dishomeostase do Cu e sua valência no corpo são os principais determinantes de seus efeitos benéficos como um metal essencial ou sua contraparte neurotóxica. Seguindo essa linha, James *et al.* [118] avaliaram os níveis de espécies Cu redox-competentes (Cu<sup>2+</sup> e Cu<sup>1+</sup>) na DA. Este estudo encontrou altos teores de Cu<sup>2+</sup> trocável e aumento da capacidade das amostras de tecido cortical cerebral pós-morte de indivíduos com DA de se ligarem ao Cu<sup>2+</sup>.

Chen *et al.* [82] verificaram que o excesso de cobre acelera alguns eventos iniciais da doença de Alzheimer. Assim, o excesso de Cu circulante tem o potencial de perturbar a função cerebral de camundongos selvagens e exacerbar alterações neurodegenerativas em um modelo de camundongo com DA. Também há evidências de dishomeostase desse elemento na diabetes tipo 2, o que

pode contribuir para a deterioração cognitiva associada a essa doença [153]. Por exemplo, em um experimento de laboratório com camundongos, a exposição a 1,3 mg L<sup>-1</sup> de Cu na água potável por 9 meses correlacionou-se com aumento do acúmulo vascular de A $\beta$  e comprometimento da memória espacial, indicando que a exposição ao cobre tem papel fundamental no dano vascular e desenvolvimento de declínio cognitivo [156].

Em pessoas saudáveis, 90-95% da circulação de cobre está ligada à ceruloplasmina, proteína de ligação ao Cu [218]. Aos teores de cobre não ligado à ceruloplasmina (nCp-Cu) caracteriza pacientes com DA, em que foram encontrados defeitos genéticos do gene ATP7B, que codifica para uma proteína ATPase do tipo P envolvida no transporte de Cu [214]. Na doença de Alzheimer, o teor de cobre diminui no cérebro, mas aumenta no soro devido ao aumento do componente nCp-Cu [210, 219]. Assim, excesso de Cu acelera eventos iniciais da DA, como a indução da agregação de peptídeos A $\beta$  por meio do aumento da clivagem amiloidogênica da proteína precursora de amilóide (APP) e a hiperfosforilação de Tau estimulando a GSK3  $\beta$  quinase, perturbando a função cerebral de camundongos selvagens e exacerbando alterações neurodegenerativas em um modelo de camundongo de DA [82]. Portanto, estudos recentemente testaram quelantes de Cu como abordagens terapêuticas em modelos animais de DA, ou até mesmo utilizaram o cobre para induzir modelos animais de doença de Alzheimer [220].

Relação entre o  
metabolismo do  
S com a DA ou  
com múltiplos  
fatores asso-  
ciados à DA



**CAPÍTULO 10**

No levantamento bibliográfico, a palavra “Alzheimer” foi utilizada associada a outras palavras relacionadas ao metabolismo do enxofre como: sulfato, sulfito, metionina, cisteína, homocisteína e heparan sulfato. Já é bem conhecido que o metabolismo do S no organismo é afetado pela DA. No século 21, o número de trabalhos científicos relacionando o S com a DA aumentou muito. Por outro lado, são poucos os trabalhos que relacionam o sulfito com a DA (Tabela 6).

Em humanos, compostos contendo S, como  $\text{SO}_4^{2-}$ , e biomoléculas contendo S, incluindo aminoácidos contendo S, seus derivados, vitaminas, biotina ou coenzimas e cofatores, como coenzima A e  $\alpha$ -ácido lipóide, são obtidos a partir de dieta regular e equilibrada [13]. Met é um aminoácido essencial que contém S que funciona como um precursor para a síntese de Hcy e cisteína (Cys) (Figura 3).

Tabela 6. Quantidade de sites ou artigos no Google Scholar ou PubMed, respectivamente, que mencionaram Alzheimer e compostos orgânicos relacionados ao metabolismo do S, nos últimos 60 anos

Google Scholar						
Alzheimer e...	Sulfato	Sulfito	Metionina	Cisteína	Homocisteína	Heparan Sulfato
1960-69	126	7	48	36	9	4
1970-79	315	16	150	95	18	9

Google Scholar						
Alzheimer e...	Sulfato	Sulfito	Metionina	Cisteína	Homocisteína	Heparan Sulfato
1980-89	2380	88	1180	759	91	215
1990-99	15060	698	6270	8770	851	1610
2000-09	42300	3770	21700	41300	11400	7390
2010-19	36300	7660	24900	32300	16800	8810
<b>Total</b>	<b>96481</b>	<b>12239</b>	<b>54248</b>	<b>83260</b>	<b>29169</b>	<b>18038</b>
<i>2020</i>	<i>2720</i>	<i>94</i>	<i>4770</i>	<i>10100</i>	<i>3730</i>	<i>1100</i>
PubMed						
Alzheimer e...	Sulfato	Sulfito	Metionina	Cisteína	Homocisteína	Heparan Sulfato
1960-69	1	0	0	0	0	0
1970-79	6	0	2	0	0	0
1980-89	68	0	13	4	0	6
1990-99	343	3	110	189	18	104
2000-09	533	2	255	528	423	70
2010-19	803	7	253	622	473	103
<b>Total</b>	<b>1754</b>	<b>12</b>	<b>633</b>	<b>1343</b>	<b>914</b>	<b>283</b>
<i>2020</i>	<i>51</i>	<i>2</i>	<i>30</i>	<i>83</i>	<i>39</i>	<i>13</i>

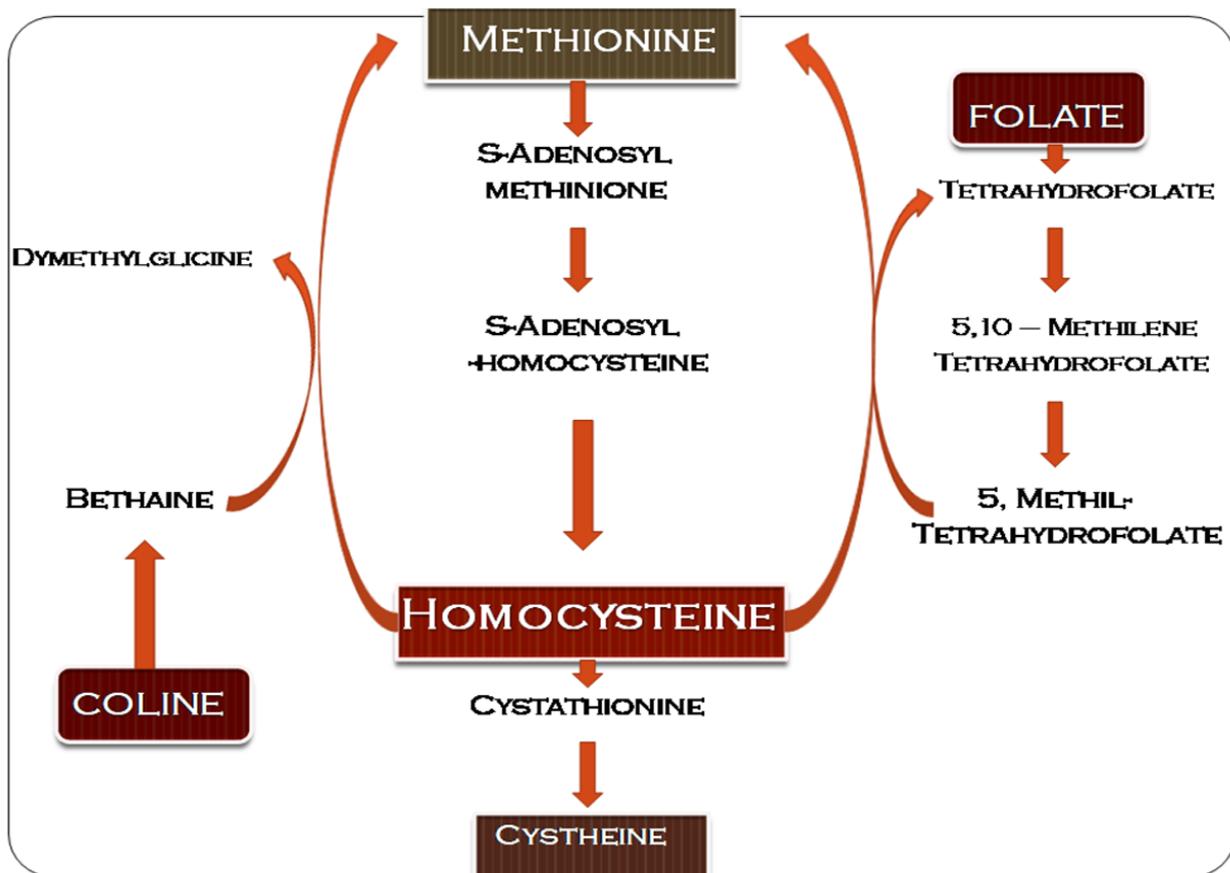


Figura 3. Papel da colina e do folato no metabolismo da homocisteína. Adaptado de Olthof *et al.* [221] e Bourke [222].

Varadarajan *et al.* [223] comentaram que  $A\beta$  é uma fonte de estresse oxidativo de radicais livres que podem levar à neurodegeneração na DA. No estudo, o  $A\beta$  (1-40), encontrado no cérebro de pacientes com DA, e o fragmento  $A\beta$  (25-35) foram analisados por ressonância paramagnética para verificar se esses peptídeos são mediadores da produção de radicais livres. A substituição de Met por norleucina em  $A\beta$  (1-40) e  $A\beta$  (25-35), a substituição de Met por valina e a remoção da Met em  $A\beta$  (25-35) diminuíram a produ-

ção de radicais livres e a oxidação de proteínas, consequentemente diminuindo a toxicidade aos neurônios. Esses resultados são discutidos pelos autores que defendem a hipótese de que a neurodegeneração na DA pode ser devida em parte ao estresse oxidativo associado aos radicais livres da A $\beta$ , que envolve a Met. Assim, acredita-se que o resíduo de Met nesses peptídeos desempenhe um papel importante em sua neurotoxicidade. Met-SO (metionina-sulfóxido), uma forma oxidada de Met, que é um indicador de estresse oxidativo sistêmico. Weng *et al.* [224] encontraram níveis séricos de Met-SO significativamente maiores em pacientes com DA em estágio inicial que em pacientes com comprometimento cognitivo leve (CCL).

Em pacientes humanos com DA, uma alta relação cisteína/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> foi observada no plasma sanguíneo. A relação média Cys / SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ( $\times 103$ ) no plasma de pacientes com DA em jejum foi de 477. No entanto, essa relação foi de 96 para controles normais ( $P < 0,001$ ). Os autores comentam que o excesso de grupos tiol da Cys pode interferir na função das proteínas neurais. Eles comentaram que a deficiência de íons sulfato pode levar à redução da desintoxicação de xenobióticos [25]. Assim, na DA há um aumento no nível de Cys e uma diminuição nos níveis de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> e folato [25, 225] e também baixo nível de colina [226].

Moss e Waring [227] avaliaram que a razão plasmática Cys/  $\text{SO}_4^{2-}$  é um possível biomarcador clínico para investigar distúrbios crônicos de saúde, incluindo DA, doença de Parkinson, esclerose múltipla, encefalomielite miálgica, síndrome do intestino irritável, autismo, depressão, doença do neurônio motor e anemia hemolítica. É interessante notar que, embora o conteúdo de Cys seja elevado no plasma na DA [25], ainda não há consenso sobre seu nível dentro das células cerebrais. Enquanto Luo *et al.* [228] encontraram 3 vezes menos Cys em um modelo animal de DA, Mandal *et al.* [229] encontraram valores mais altos usando outro método de detecção.

Indivíduos com baixo teor de folato e alto teor de Hcy têm maior risco de DA [225, 230 – 233]. O aumento de Hcy acompanha a diminuição dos teores de folato, porque o folato é um cofator necessário para a enzima 5,10-metilenotetrahidrofolato redutase que media a conversão de Hcy em Met [198].

Irizarry *et al.* [234] investigaram uma ligação entre alta concentração de Hcy e DA. Eles descobriram que a Hcy plasmática total elevada estava positivamente correlacionada com os níveis plasmáticos de  $\text{A}\beta$  40 e  $\text{A}\beta$  42. Além disso, a hiper-homocisteinemia prolongada pode levar ao aparecimento de doenças cardiovasculares, aterosclerose, acidente vascular cerebral, síndromes inflamatórias como osteoporose e reumatismo e patologias neuronais, incluindo

DA e doença de Parkinson [235].

A relação entre as deficiências de folato e colina com a DA tem sido extensivamente estudada [236 - 239]. A deficiência de colina, por exemplo, além de causar menor síntese de acetilcolina, contribui para a disfunção mitocondrial e, portanto, para a taxa de deficiências de oxidação de ácidos graxos e também tem sido associada ao aumento da absorção de ácidos graxos [239].

A colina é um precursor da acetilcolina e pode, portanto, influenciar os resultados cardiovasculares e cognitivos [226]. Uma das tentativas de tratamento utilizadas no passado foi o uso de inibidores da colinesterase [240]; no entanto, não foi eficaz em interromper a DA [241]. Além disso, já foi observado que altos níveis de colina diminuem os níveis de Hcy. Olthof *et al.* [221] verificaram em experimento com humanos do sexo masculino que a suplementação com fosfatidilcolina, correspondente a 2,6 g de colina dia-1, reduziu a Hcy total em jejum em 18% após 2 semanas. Além disso, em um estudo de Velazquez *et al.* [242] foi demonstrado que a suplementação da dieta materna com colina adicional melhorou a memória espacial e reduziu a patologia devido a A $\beta$  em camundongos APP/PS1, sendo que, a redução na patologia DA foi associada à diminuição dos níveis cerebrais de Hcy.

Pessoas com baixos níveis de folato e altos níveis de Hcy correm maior risco de DA [225, 230, 233]. Com um nível plasmático de Hcy superior a  $14 \mu\text{mol L}^{-1}$ , o risco de DA quase dobra [243]. McCaddon *et al.* [244] concluíram que a transsulfuração da Hcy para Cys estava intacta, mas a remetilação da Hcy para Met foi perturbada nos pacientes com DA. No entanto, Berry *et al.* [245] comentaram que altos níveis de Hcy na DA resultam da baixa atividade da via de transsulfuração, sendo que, a síntese da coenzima A (CoA) requer L-cisteína, sintetizada pela via de trans-sulfuração. A CoA é necessária para a síntese de acetilcolina e neurotransmissão colinérgica apropriada.

Relação hipotética entre o Mo e a patologia da DA ou múltiplos fatores associados à DA



## **CAPÍTULO 11**

No levantamento bibliográfico, a palavra Alzheimer foi utilizada associada a molibdênio, sulfito oxidase (SUOX), xantina oxidoreductase (XOR), aldeído oxidase (AO), componente redutor de amidoxima mitocondrial (mARC), ácido úrico, xantina, hipoxantina e adenilil ciclase (Tabela 7).

Tabela 7. Quantidade de sites ou artigos no Google Scholar, ou PubMed, respectivamente, que mencionaram Alzheimer e enzimas ou compostos orgânicos ligados ao metabolismo do Mo, nos últimos 60 anos

Google Scholar									
Alzheimer e...	Mo	Sulfito oxidase	Xantina oxidase	Aldeído oxidase	mARC	Ácido úrico	Xantina	Hipoxantina	Adenilil ciclase
1960-69	13	2	8	1	0	0	12	2	1
1970-79	19	2	16	1	0	1	34	23	31
1980-89	153	20	115	25	0	3	318	195	169
1990-99	571	81	1240	75	0	40	2310	1400	1720
2000-09	3450	254	5660	339	2	435	10100	7800	5680
2010-19	8180	505	12500	860	47	977	16800	10400	10300
<b>Total</b>	<b>12386</b>	<b>864</b>	<b>19539</b>	<b>1301</b>	<b>49</b>	<b>1456</b>	<b>29574</b>	<b>19820</b>	<b>17901</b>
2020	1180	53	1460	87	15	2900	2240	788	1250
PubMed									
Alzheimer e...	Mo	Sulfito oxidase	Xantina oxidase	Aldeído oxidase	mARC	Ácido úrico	Xantina	Hipoxantina	Adenilil ciclase
1960-69	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1970-79	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1980-89	0	0	0	0	0	2	6	1	8
1990-99	2	1	8	0	0	12	64	16	39
2000-09	7	1	23	1	0	27	90	26	47
2010-19	23	2	21	2	0	68	184	38	37
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>4</b>	<b>52</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>109</b>	<b>344</b>	<b>81</b>	<b>131</b>
2020	7	0	1	0	0	10	14	9	2

O Mo é essencial para a grande maioria dos organismos vivos, das bactérias aos mamíferos e plantas superiores [17, 18, 246, 247]. Nos animais, este elemento encontra-se presente no centro ativo das enzimas XOR, AO, SUOX e mARC [17, 18]. Além destas quatro, as plantas possuem uma quinta molibdoenzima,

a nitrato redutase, essencial para a assimilação do nitrato. É de salientar que o molibdênio é também essencial para a nitrogenase que se encontra nas bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que vivem em simbiose com as leguminosas, plantas da família Fabaceae [247, 248, 249].

Com exceção da nitrogenase, que possui um centro heterometálico de molibdênio e ferro [249], todas as molibdoenzimas possuem no seu centro ativo um íon de molibdênio coordenado por um cofactor único, denominado recorrentemente na literatura de cofator de molibdênio (Moco). Este consiste numa piranopterina modificada com um grupo cis-ditioleno ( $-S-CR=CR-S-$ ) (Figura 4A) [250-253]. O íon de molibdênio encontra-se coordenado pelos dois átomos de enxofre do ditioleno, sendo a sua esfera de coordenação completada por átomos de oxigênio e/ou enxofre e/ou selênio. As diferentes combinações destes elementos servem de base à classificação das molibdoenzimas em três famílias, como esquematizado na Figura 4B. Todas as molibdoenzimas dos animais e plantas pertencem às famílias da XOR e SUOX (a terceira família encontra-se presente exclusivamente em procariontes). É ainda digno de nota que o S necessário para a biossíntese do Moco é obtido a partir da Cys, assim como o S terminal existente na XOR.

Para os humanos, o Mo é necessário em pequenas quantidades, entretanto, vale considerar que os estudos que avaliam as necessidades diárias de nutrientes são realizados em indivíduos saudáveis e não levam em consideração o envelhecimento (Tabela 8). O nível de ingestão superior tolerável para os Estados Unidos e Canadá foi estabelecido em 2 mg dia<sup>-1</sup> [254]. A Comissão Europeia sugeriu o limite superior de

0,6 mg dia<sup>-1</sup> [255]. A faixa de concentrações séricas de Mo considerada adequada é 0,28 – 1,17 µg L<sup>-1</sup> [256]. Giussani *et al.* [257] verificaram que o Mo é absorvido rápida e eficientemente na circulação sistêmica. Quando administrado dissolvido em chá-preto e refeições compostas, a taxa de absorção é menor e retardada do que quando é dissolvido em água pura.

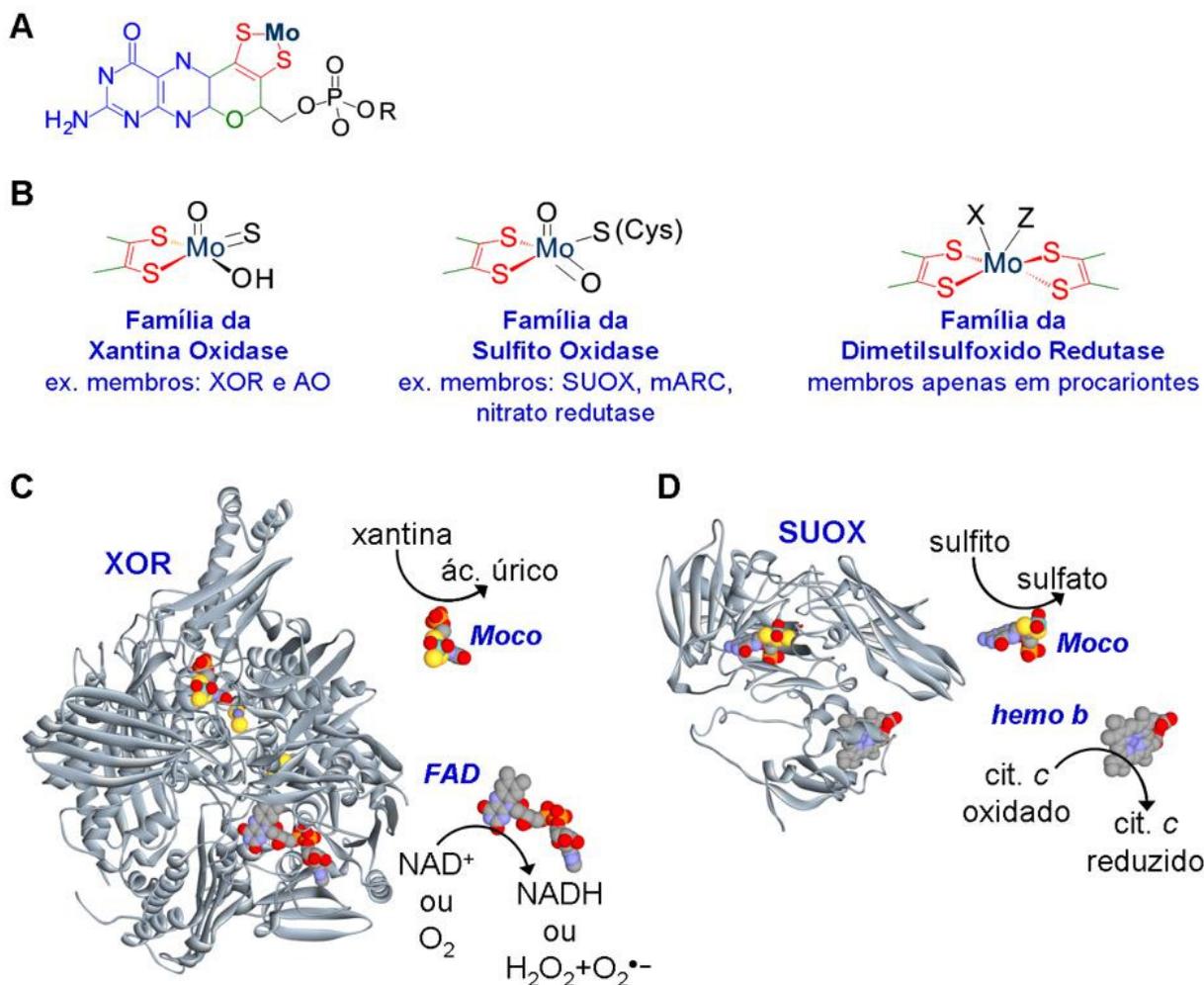


Figura 4. Famílias de molibdoenzimas. **Painel A-** Estrutura do Moco, uma piranopterina modificada (pirano (verde), pterina (azul), ditioleno (vermelho), metilfosfato (preto)) que coordena o metal através do grupo ditioleno. Nesta, R representa um átomo de hidrogênio, nos eucariontes, ou monofosfato de citidina, de guanosina ou de adenosina nos procariontes. **Painel B-** Estruturas dos centros ativos das enzimas das três famílias de molibdoenzimas, na forma oxidada. Nestas, para simplificar, apenas o pseudo-anel de ditionelo do Moco está representado. Na família da dimetilsulfoxido redutase, X e Z representam O, S, Se, Asp, Ser, Cys ou SeCys em coordenações variáveis. **Painel C-** Estrutura tridimensional da XOR. Ao lado da estrutura, estão representados os centros envolvidos na reação, o Moco, onde ocorre a redução da xantina a ácido úrico, e o centro flavínico, FAD, onde ocorre a redução de NAD<sup>+</sup> (no caso da XD) ou de O<sub>2</sub> (no caso da XO). **Painel D-** Estrutura tridimensional da SUOX. Ao lado da estrutura, estão representados os centros envolvidos na reação, o Moco e o hemo b. As estruturas mostradas em C e D são baseadas nos ficheiros pdb 1F04 e 1SOX.

Tabela 8. Recomendações nutricionais diárias e níveis toleráveis de ingestão de Mo em humanos ( $\mu\text{g dia}^{-1}$ )

Grupo de estágio de vida	Recomendação nutricional diária	Níveis Superiores Toleráveis de Ingestão	Grupo de estágio de vida	Recomendações nutricionais diárias	Níveis Superiores Toleráveis de Ingestão
<b>Bebês</b>			<b>Crianças</b>		
0–6 meses	2	ND	1–3 anos	17	300
7–12 meses	3	ND	4–8 anos	22	600
<b>Homens</b>			<b>Mulheres</b>		
9–13 anos	34	1.100	9–13 anos	34	1.100
14–18 anos	43	1.700	14–18 anos	43	1.700
<b>Homens</b>			<b>Mulheres</b>		
19–30 anos	45	2.000	19–30 anos	45	2.000
31–50 anos	45	2.000	31–50 anos	45	2.000
51–70 anos	45	2.000	51–70 anos	45	2.000
> 70 anos	45	2.000	> 70 anos	45	2.000
<b>Gravidez</b>			<b>Lactação</b>		
14–18 anos	50	1.700	14–18 anos	50	1.700
19–30 anos	50	2.000	19–30 anos	50	2.000
31–50 anos	50	2.000	31–50 anos	50	2.000

\***Fonte:** Institute of Medicine (EUA) [58]. ND= Não determinável devido à falta de dados de um efeito adverso toxicológico específico

Paglia *et al.* [258] avaliaram quatro grupos de 118 pessoas com idade entre 54 e 87 anos (HS, indivíduos saudáveis - n=34; SMC, queixa subjetiva de memória - n=20; CCL, comprometimento cognitivo leve - n=24; DA, doença de Alzheimer - n=40). O único elemento essencial que apresentou concentração diferente entre esses grupos avaliados

foi o Mo. Seu nível aumentou progressivamente no soro, passando de HS por SMC, CCL, até DA, e a diferença entre HS e DA foi estatisticamente significativa ( $0,83 \pm 0,26$ ;  $0,99 \pm 0,24$ ;  $1,09 \pm 0,36$  e  $1,20 \pm 0,52$  concentrações de Mo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) em HS, SMC, CCL e DA, respectivamente). Sugerimos aqui que pesquisas futuras determinem o quanto do Mo está na forma livre e quanto está ligado ao cofator Moco em pacientes com DA e doenças ou sintomas associados à DA.

A deficiência de Mo resulta em altos níveis de sulfito e xantina e baixos níveis de  $\text{SO}_4^{2-}$  e ácido úrico no sangue e na urina devido ao comprometimento da atividade das enzimas SUOX e XOR, respectivamente [259].

### *Xantina oxidoreductase*

A XOR (Figura 4C) é responsável pelos dois últimos passos do catabolismo das purinas nos humanos (Figura 5), catalisando, no seu centro ativo de molibdênio (Figura 4B) a oxidação de hipoxantina e xantina ao metabolito terminal, o ácido úrico [17, 18, 21, 253, 260, 261]. *In vivo*, esta enzima citoplasmática existe majoritariamente na forma de desidrogenase, denominada xantina desidrogenase (XD), a qual usa o  $\text{NAD}^+$  como receptor dos equivalentes redutores, reduzindo-o no centro flavínico (FAD) a NADH [262 - 265]. Porém, em condições de estresse oxidativo, a XOR pode ser convertida na forma de oxidase, denominada xantina oxidase (XO). Esta forma catalisa igualmente

a oxidação da xantina a ácido úrico, mas em vez de usar o  $\text{NAD}^+$ , usa o oxigénio molecular como aceitador de electrons, reduzindo-o no centro flavínico a radical anião superóxido e peróxido de oxigénio, duas espécies reactivas de oxigénio que, quando produzidas em excesso, são lesivas para a célula e exacerbam os efeitos do estresse oxidativo.

A diminuição da atividade da XOR (XD ou XO) resulta na diminuição de ácido úrico e no aumento de xantina no organismo [21 - 23] e pode ser devida a diferentes causas: (i) deficiência em Mo; (ii) deficiência na síntese do Moco (uma condição rara, mas muito grave, pois afeta todas as molibdoenzimas, incluindo a SUOX ver abaixo); (iii) certas alterações (mutações genéticas) na própria proteína (condição denominada xantinúria clássica tipo I); (iv) alterações (mutações genéticas) na enzima responsável por introduzir o S terminal no centro ativo da XOR (Figura 4) (denominada xantinúria tipo II, condição que envolve também uma diminuição da atividade da AO [22, 23]). A xantinúria clássica é frequentemente assintomática e pode nunca ser diagnosticada, mas alguns pacientes desenvolvem problemas renais (em alguns casos fatais) [266]. No pólo oposto, o aumento da atividade da XOR, devido a alterações metabólicas no metabolismo das purinas, leva ao aumento do ácido úrico, o qual pode culminar com o desenvolvimento de gota.



modular a função cognitiva, indicando que o ácido úrico pode exercer ações neuroprotetoras na DA. Além disso, Latourte *et al.* [271] comentaram que pacientes com gota (uma forma de artrite inflamatória caracterizada por conteúdo persistentemente elevado de ácido úrico no sangue) podem ter risco reduzido de DA.

### *Sulfito oxidase*

Nos humanos, a SUOX encontra-se no espaço intermembranar mitocondrial, em que participa na etapa terminal do catabolismo dos aminoácidos contendo S, Met e Cys [20, 272 - 274]. Para tal, a SUOX catalisa a oxidação do sulfito a sulfato no seu centro ativo de molibdênio (Figura 4D), com a concomitante redução de citocromo *c*, que ocorre no hemo tipo-b. Esta enzima participa igualmente na destoxificação do sulfito proveniente de outras fontes, como no metabolismo endógeno do H<sub>2</sub>S e de compostos sulfurados provenientes da dieta e de xenobióticos presentes no meio ambiente (Figura 4).

A SUOX é absolutamente essencial para os humanos e a sua deficiência constitui um risco de vida real, pois é a enzima que controla a concentração de sulfito, um composto muito tóxico para as células [14, 15]. Este papel vital é bem demonstrado pelos problemas neurológicos neonatais severos causados por deficiências na SUOX, os quais incluem crescimento cerebral atenuado, altera-

ções cognitivas severas, convulsões e morte prematura [19, 275 - 281]. Tal como na XOR, a deficiência na SUOX pode ser causada por deficiência em Mo, na síntese do Moco e por certas alterações (mutações genéticas) na própria proteína. No caso de incapacidade de sintetizar o Moco, a deficiência em SUOX só pode ser tratada com a administração contínua do cofactor produzido sinteticamente, o que constitui a única esperança de vida para os indivíduos que nascem com esta condição.

Uma atividade insuficiente da SUOX conduz a anormalidades bioquímicas que incluem alta excreção urinária de sulfito, tiosulfato e S-sulfocisteína, que são produtos metabólicos anormais da degradação de aminoácidos que contém S, e baixo teor de  $\text{SO}_4^{2-}$  [26, 27].

O papel da SUOX no metabolismo do  $\text{H}_2\text{S}$  é igualmente digno de nota, pois o metabolismo desta molécula sinalizadora [282] conduz á formação de quantidades significativas de sulfito que deverão ser oxidadas pela SUOX [283]. No sistema nervoso, o  $\text{H}_2\text{S}$  atua como um neuromodulador influenciando a atividade sináptica sob a regulação de hormônios esteróides e neurotransmissores e pode estar envolvido na aprendizagem associativa [284]. Uma ocorrência interessante é que o  $\text{H}_2\text{S}$  no cérebro é severamente reduzido na DA [285]. Assim, a redução dos teores de  $\text{H}_2\text{S}$  pode estar envolvida em alguns aspectos do declínio cognitivo associado à DA.

Igualmente digna de nota é a citocromo c oxidase (COX), cuja atividade SUOX pode contribuir, uma vez

que reduz o citocromo c necessário à atividade da COX (Figura 4D). Bosetti *et al.* [286] avaliaram a atividade da COX de mitocôndrias isoladas de plaquetas e córtex motor pós-morte e hipocampo de pacientes com DA e controles pareados por idade. Em comparação com os controles, a atividade da COX da DA diminuiu significativamente nas plaquetas (-30%,  $p < 0,01$ ,  $n = 20$ ) e no hipocampo (-35 a -40%,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). Da mesma forma, Maurer *et al.* [287] também trabalharam com tecidos cerebrais pós-morte e encontraram um defeito seletivo na COX no tecido cerebral com DA versus o cérebro humano normal.

Cada substância química, com concentração em desequilíbrio no organismo, que contribui para a DA, como, possivelmente, teores mais baixos de Mo, é causado por outros desequilíbrios metabólicos, fisiológicos ou dietéticos. Dado que as deficiências de Mo são muito raras, há necessidade de mais estudos antes de concluir que são a causa da DA. A única ligação entre os níveis de Mo e a DA observada é que a SUOX, uma proteína contendo Mo, pode estar desregulada na DA. Altos níveis de sulfitos devido a baixos níveis de SUOX podem desregular a neurotransmissão glutaminérgica, contribuindo com um dos principais aspectos da DA [245].

Sugerimos que sejam mais bem investigadas relações entre as ações do Mo como cofator ou estimulador enzimático, ou metabólitos aos quais está relacionado e a DA. Existem muitas semelhanças entre a deficiência de Mo e os sintomas metabólicos da DA (Tabela 9).

Além disso, Xia e Storm [288] relataram que as adenilil ciclases, tipo 1 e tipo 8, são essenciais durante a formação da memória. É importante enfatizar que pacientes/modelos com DA demonstram reduções na atividade da adenilil ciclase [289, 290]. Nonaka *et al.* [291] revisaram recentemente as interações entre adenilil ciclase e demência.

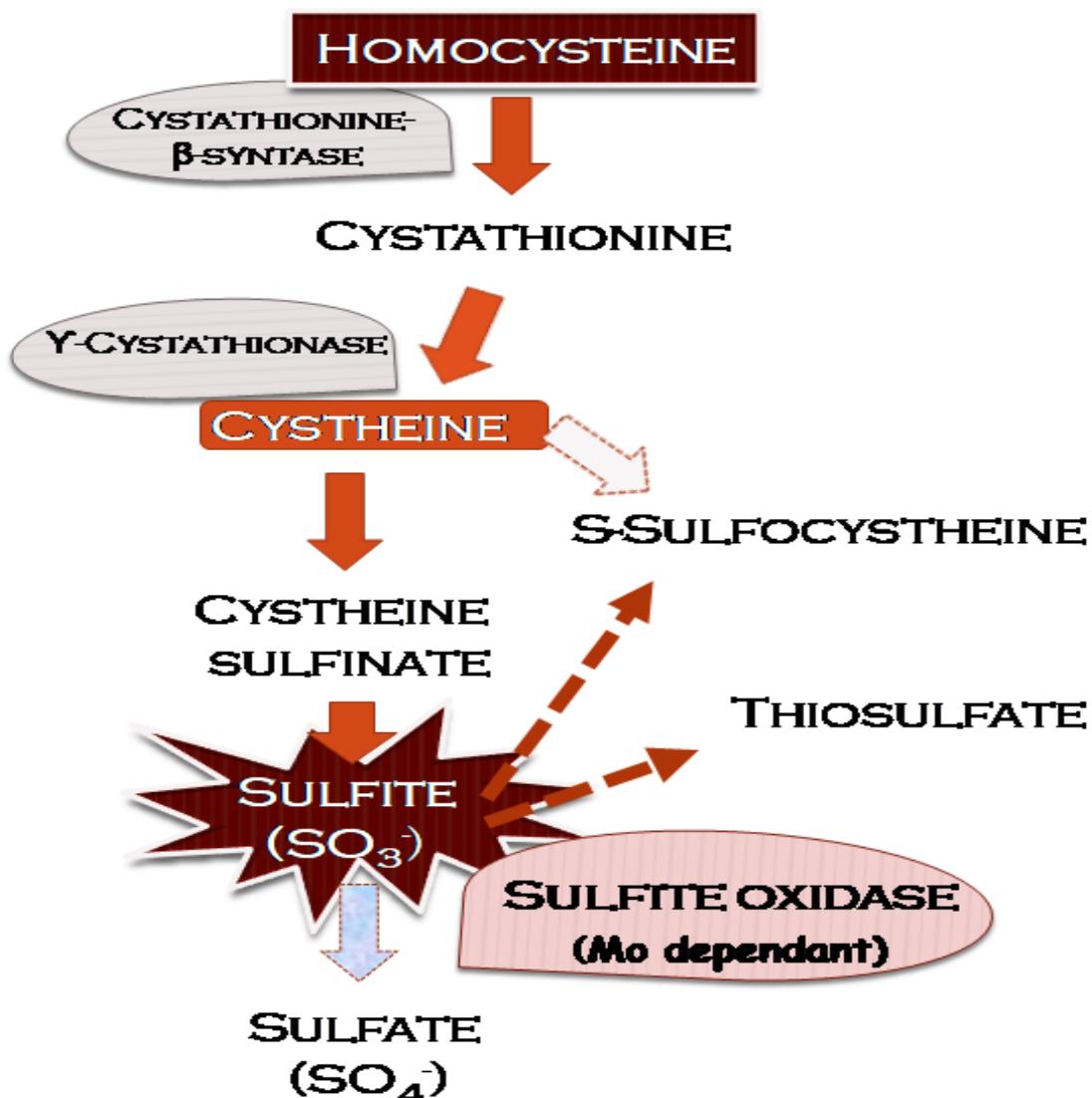


Figura 6- Via metabólica dos aminoácidos sulfurados. As setas tracejadas indicam vias metabólicas quando a sulfite oxidase tem baixa atividade. Adaptado de Tan *et al.* [267].

Tabela 9. Semelhanças entre menor atividade ou síntese de XO, AO, SUOX e Moco ou deficiência de Mo e sintomas da doença de Alzheimer.

Baixa Atividade ou Síntese de XO, AO, SUOX ou Moco, ou Deficiência de Mo		Doença de Alzheimer
Semelhanças		
Sulfato	Baixo teor urinário de $\text{SO}_4^{2-}$ [26,27].	Alta Cys / $\text{SO}_4^{2-}$ no plasma sanguíneo [25]; O plasma de DA tinha apenas 22% $\text{SO}_4^{2-}$ do que o controle padrão [25].
Metionina	Alto teor no plasma [292].	Alterações nas vias relacionadas ao metabolismo da Met [293]; Os níveis séricos de Met-SO são mais elevados na fase inicial da DA em comparação com pacientes CCL [224].
Cisteína	O carregamento de sulfito interrompe a conversão de Met em Cys, e isso faz com que os níveis de Cys caiam [292].	O conteúdo de Cys diminuiu dentro das células cerebrais [231]; Cys é alta na DA cerebral [229].
Ácido úrico	Concentração reduzida no soro e na urina [294].	Conteúdos mais baixos de ácido úrico em pacientes com DA do que em controles saudáveis [269]; Pacientes com gota com conteúdo elevado de ácido úrico no sangue podem ter risco reduzido de DA [271].

Adaptado de Coelho *et al.* [2]

A hipótese de que exista alguma interação metabólica entre a deficiência de Mo e o acúmulo de  $\text{A}\beta$  é indireta, pois o Mo não está diretamente envolvido na formação de  $\text{A}\beta$  da mesma forma que o Cu. No entanto, Kong *et al.* [295] descobriram que, semelhante às nanopartículas de  $\text{MoS}_2$ , as nanofolhas de  $\text{MoS}_2$  possuíam efeitos terapêuticos na DA, inibindo agregações de  $\text{A}\beta$  e degradando as fibrilas de  $\text{A}\beta$  previamente formadas. Da mesma forma, Manna *et al.* [296] verificaram desaparecimento de estruturas fibrilares e a recuperação de distúrbios neurodegenerativos em moscas *Drosophila* mutantes  $\text{A}\beta$  42 tratadas com molibdato em comparação com as não tratadas, corroborando a capacidade terapêutica de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  para o tratamento da DA. Assim, é possível que, em condições normais, o Mo possa ter um efeito desestabilizador na formação de fibrilas  $\text{A}\beta$  e que sua deficiência possa prejudicar esse processo natural, facilitando a formação de  $\text{A}\beta$ .

Relação entre  
interação meta-  
bólica de Cu, Mo  
e S com DA ou  
com múltiplos  
fatores asso-  
ciados à DA



**CAPÍTULO 12**

Na nutrição de ruminantes sabe-se, há muitos anos, que o cobre (Cu) é um antagonista do molibdênio (Mo) e do enxofre (S). Em uma revisão de Vasquez *et al.* [11], comenta-se que o aumento da ingestão de Mo diminui o depósito de Cu nos órgãos e a síntese de ceruloplasmina, com diminuição da excreção de Cu pela bile e aumento da excreção urinária. Por outro lado, o aumento do Cu dietético reduz os depósitos de Mo no fígado. Quando o nível de S aumenta, a excreção urinária de Mo aumenta substancialmente, enquanto o depósito nos tecidos diminui proporcionalmente. Os autores comentaram que os efeitos da interação entre Cu e Mo dependem da relação Cu/Mo, sendo secundárias as concentrações excessivas de Cu ou Mo na dieta.

Muitos pesquisadores avaliaram a interação entre Cu-Mo-S na nutrição de não ruminantes. A maioria dos estudos é sobre o excesso de molibdênio na dieta causando depleção nos conteúdos de cobre em ratos, suínos, etc. [297, 298]. Por outro lado, estudos demonstraram que o excesso de Cu causa deficiência de Mo. Em ratos com suprimento excessivo de cobre, a formação de um complexo não absorvível de cobre e molibdênio no trato gastrointestinal pode reduzir a absorção de Mo [299]. Suttle [300] comentou que é possível que, em baixas concentrações de molibdênio, o principal local da interação Cu-Mo seja no intestino, resultando em uma diminuição da absorção de cobre. Em contraste, em condição de altos teores de molibdênio, altos níveis de Mo na corrente sanguínea

e nos tecidos favorecem a formação de complexos inorgânicos e orgânicos de Cu-Mo, que se acumulam nos tecidos, mas, possivelmente, estão indisponíveis.

Flores *et al.* [208] avaliaram o possível papel da interação entre Mo e Cu no progresso de complicações típicas em diabetes tipo 2 (DM2). No grupo de diabéticos com complicações graves, menores concentrações de Mo na urina foram encontradas em comparação ao grupo com complicações leves a moderadas ( $55,0 + 52,9 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $68,8 + 60,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $p = 0,008$ , respectivamente). Quando se comparou os teores de Mo no soro, verificou-se que o Mo estava aumentado no grupo de diabéticos com complicações graves em comparação ao grupo com complicações leves a moderadas ( $2,48 + 2,01 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $0,74 + 0,46 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $p = 0,072$ , respectivamente). A maior quantidade de relações estatisticamente significativas foi encontrada para o Mo; seus níveis séricos correlacionaram-se diretamente com HDL sérico ( $b = 0,3484$ ,  $p = 0,040$ ), ureia ( $b = 0,6505$ ,  $p = 0,000$ ), proteínas totais na urina ( $b = 0,6085$ ,  $p = 0,000$ ), enquanto o Mo na urina se correlacionou inversamente com neuropatia ( $b = -0,3098$ ,  $p = 0,080$ ), colesterol sérico ( $b = -0,4208$ ,  $p = 0,009$ ) e ureia ( $b = -0,3071$ ,  $p = 0,064$ ). Finalmente, valores crescentes da relação Cu/Mo na urina foram associados ao maior grau de nefropatia na DM2.

Por outro lado, na DA, o Cu diminui no cérebro, mas aumenta no soro, assim como já comentado, devido ao aumento do componente nCp-Cu [81], sendo que o nCp-Cu aumenta a suscetibilidade à DA [9, 10]. Certamente, pessoas mais susceptíveis à DA precisam de uma relação Cu/Mo menor na idade adulta. Possivelmente, neste caso o Mo deve ser suplementado na dieta diária. Propomos uma reformulação na tabela de necessidades diárias de Cu e Mo, incluindo a relação Cu/Mo (Tabela 10).

Tabela 10 - Adaptação das recomendações nutricionais diárias, níveis máximos toleráveis de ingestão de Cu e Mo com proposta de reformulação incluindo relação Cu/Mo hipotética

Recomendação nutricional diária				Nível Superior Toleráveis de Ingestão			
Grupo de estágio de vida	Cu* -- (µg/d) --	Mo* -- (µg/d) --	Cu/Mo hipotético Razão**	Cu* -- (µg/d) --	Mo* -- (µg/d) --	Hipotético Cu/Mo Razão (Alto Cu)**	Hipotético Cu/Mo Razão (Mo alto)**
<b>Bebês</b>							
0-6 meses	200	2	100	ND	ND	-	-
7-12 meses	220	3	73,3	ND	ND	-	-
<b>Crianças</b>							
1-3 anos	340	17	20	1.300	300	59	1,13
4-8 anos	440	22	20	3.000	600	136	0,73
<b>Machos</b>							
9-13 anos	700	34	20,6	5.000	1.100	147	0,64
14-18 anos	890	43	20,7	8.000	1.100	186	0,52
19-30 anos	900	45	20	10.000	2.000	222	0,45
31-50 anos	900	45	20	10.000	2.000	222	0,45

Recomendação nutricional diária				Nível Superior Toleráveis de Ingestão			
Grupo de estágio de vida	Cu* -- (µg/d) --	Mo* -- (µg/d) --	Cu/Mo hipotético Razão**	Cu* -- (µg/d) --	Mo* -- (µg/d) --	Hipotético Cu/Mo Razão (Alto Cu)**	Hipotético Cu/Mo Razão (Mo alto)**
<b>Machos</b>							
51–70 anos	900	45	20	10.000	2.000	222	0,45
> 70 anos	900	45	20	10.000	2.000	222	0,45
<b>Fêmeas</b>							
9–13 anos	700	34	20,6	5.000	1.100	147	0,64
14–18 anos	890	43	20,7	8.000	1.100	186	0,52
19–30 anos	900	45	20	10.000	2.000	222	0,45
31–50 anos	900	45	20	10.000	2.000	222	0,45
51–70 anos	900	45	20	10.000	2.000	222	0,45
> 70 anos	900	45	20	10.000	2.000	222	0,45
<b>Gravidez</b>							
14–18 anos	1.000	50	20	8.000	1.700	160	0,59
19–30 anos	1.000	50	20	10.000	2.000	200	0,50
31–50 anos	1.000	50	20	10.000	2.000	200	0,50
<b>Lactação</b>							
14–18 anos	1.300	50	26	8.000	1.700	160	0,76
19–30 anos	1.300	50	26	10.000	2.000	200	0,65
31–50 anos	1.300	50	26	10.000	2.000	200	0,65

\*Fonte: Institute of Medicine (EUA) [58]. ND = Não determinável devido à falta de dados de um efeito adverso toxicológico específico

\*\* Nossa hipótese.

Em nossa opinião, o possível elo principal na interação metabólica de Cu-Mo-S é a enzima SUOX e que as possíveis causas de danos neurológicos são causadas pela baixa atividade desta enzima devido à deficiência de Mo [247].

Qualquer desequilíbrio metabólico que afete negativamente a atividade da SUOX também afetará a atividade do Citocromo c. Isso ocorre porque o sulfito induz a liberação de Citocromo c das mitocôndrias cerebrais na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  [301]. Além disso, faz sentido pensar que o que afeta negativamente a atividade do Citocromo c também afetará negativamente a atividade da SUOX. Assim, certamente, o complexo SUOX - Citocromo c tem que estar funcionando bem para que as funções neurológicas ocorram satisfatoriamente.

É importante considerarmos que a baixa atividade da SUOX, que ocorre em recém-nascidos, resulta em baixos níveis plasmáticos de Hcy [267]. Por outro lado, um sintoma típico da DA são os níveis elevados de Hcy no plasma, sendo que, níveis aumentados de Hcy no plasma são fator de risco conhecido para a DA [225, 230, 233]. No entanto, na DA há uma diminuição no nível de sulfato [25, 225] e esse baixo nível de sulfato pode ser um indicador de baixa atividade da SUOX devido a possível deficiência de Mo. Este é um enigma que pesquisas futuras terão que desvendar.

Conexões entre  
a interação me-  
tabólica de Cu,  
Mo e S e a pa-  
tologia da DA  
ou múltiplos  
fatores asso-  
ciados à DA



## **CAPÍTULO 13**

Estudos experimentais indicam que o Cu do complexo Cu-Mo não está disponível para a síntese da ceruloplasmina. Dowdy e Matrone [302] constataram nível mais baixo de atividade de ceruloplasmina no soro de porcos que receberam o complexo Cu-Mo (em um valor muito próximo daqueles que não receberam Cu) do que com controles alimentados com sulfato de cobre. Dowdy *et al.* [303] sugeriram que este complexo Cu-Mo pode ser o mineral lindgrenita ( $2\text{CuMoO}_4\text{-Cu(OH)}_2$ ). Arthur [304] relatou menor teor de Mo no fígado de cobaias suplementadas com Cu. Eles encontraram  $3,4 \pm 0,4$  e  $6,2 \pm 1,0$  mg kg<sup>-1</sup> de Mo no fígado de animais alimentados com dieta suplementada com 10 mg kg<sup>-1</sup> de Cu ou sem Cu, respectivamente.

Estudos *in vitro* indicaram uma competição entre altos níveis de Cu e Mo durante a formação do Moco [305, 306]. A inibição da síntese de Moco por Cu poderia ser explicada pela inibição da reação de inserção de Mo dependente de Mg [305]. Hadizadeh *et al.* [306] encontraram estimulação e inibição da atividade XO por Cu<sup>2+</sup>. Menos de 5 μM de Cu<sup>2+</sup> resultou em estimulação da atividade enzimática de XO, enquanto de maneira dependente da concentração, 5 a 700 μM, 700 a 2000 μM e >2000 μM resultaram em inibições moderada, drástica e total, respectivamente. Mendel e Kruse [307] comentaram que a deficiência de Moco não pode ser vista como um defeito isolado, mas em um contexto com o metabolismo celular de Cu, uma vez que o aumento do conteúdo celular de Cu pode ser a causa de uma diminuição na taxa de síntese de Moco [305].

Suzuki *et al.* [308] investigaram a interação do metabolismo Cu-S. Eles concluíram que os íons nCp-Cu na corrente sanguínea se ligam principalmente à albumina para formar o complexo mercaptalbumina-Cu. Este último sequestra Cys para formar o complexo albumina-Cu-Cys. Apenas Cu no complexo albumina-Cu-Cys deve ser transferido para o fígado com a albumina, permanecendo no soro sanguíneo como um complexo albumina-Cys.

Uma alta relação Cu/Mo está presente em crianças com doença de Wilson. Mahoney *et al.* [309] demonstraram diminuição da produção de ácido úrico, sugerindo redução da atividade de XO e possível deficiência de Mo. O efeito deletério da alta relação Cu/Mo com impacto na baixa atividade de XO tem sido comentado na nutrição humana há muitos anos [310]. Seelig [310] destacou os níveis excessivos de Cu no sangue e no fígado, associados à diminuição dos níveis de Mo e/ou baixa atividade de XO.

Bar-Or *et al.* [311] demonstraram que a relação entre o metabolismo de Cu e S tem um efeito direto na DA. Eles verificaram que nCp-Cu alto causa acúmulo de Hcy devido a uma diminuição na atividade da cistationina b-sintase (CBS): 10  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$  de Cu diminuíram a atividade da CBS em 50% e 70%, respectivamente. Além disso, a baixa atividade de CBS resulta em baixa síntese de Cys e, conseqüentemente, baixa síntese de glutathiona (GSH), uma vez que Cys é o aminoácido limitante da

taxa de sua produção. A concentração de GSH é reduzida em pacientes com comprometimento cognitivo leve (CCL) e DA em regiões cerebrais (hipocampus e córtices frontais) afetadas pela patologia DA [229]. Outro efeito é uma baixa síntese de H<sub>2</sub>S produzida endogenamente no cérebro a partir da Cys pela CBS. O H<sub>2</sub>S no cérebro é severamente reduzido na DA e, como já mencionado, sua redução pode estar envolvida no declínio cognitivo porque funciona como neuromodulador [285].

Tabela 11. Possíveis relações entre doença de Alzheimer (DA) e deficiência de Mo e/ou metabolismo alterado de Cu-Mo-S.

Evento	Resultados da pesquisa
Acúmulo de nCp-Cu no soro ou plasma.	<p>A exposição crônica ao Cu e sua dishomeostase foram associadas ao declínio cognitivo acelerado, potencialmente aumentou o risco de DA [59, 108, 216]; nCp-Cu alto no soro caracteriza pacientes com DA [210];</p> <p>O Cu sérico foi inversamente associado à testosterona [312] e Rosario <i>et al.</i> [313] verificaram que os níveis cerebrais de testosterona são significativamente mais baixos na DA.</p>
Cu e Mo são antagonistas, portanto, excessivo Cu causa deficiência de Mo e vice-versa.	<p>A formação de um complexo Cu-Mo pode ser o motivo da forte interação nutricional entre os dois íons metálicos [304];</p> <p>O complexo Cu-Mo não estava disponível para a síntese de ceruloplasmina [306];</p> <p>O excesso de suprimento de Cu e um complexo não absorvível de Cu e Mo no trato gastrointestinal podem reduzir a absorção de Mo [302];</p> <p>A redução da captação ou retenção de Mo em deficientes de Cu induz o excesso de Cu em ratos [302];</p> <p>O aumento do conteúdo celular de Cu pode ser a causa de uma diminuição na taxa de síntese de Moco [305];</p> <p>A competição entre Cu, em alto nível, e Mo ocorrem durante a formação do Moco [308];</p> <p>O desequilíbrio da relação Cu/Mo afeta o metabolismo do S [11].</p>

Evento	Resultados da pesquisa
Produtos da atividade de enzimas que possuem Mo como um co-fator está em menor conteúdo na DA do que em pessoas saudáveis	<p>Uma alta relação Cu/Mo afeta a atividade da xantina oxidase [310];</p> <p>Conteúdos diminuídos de adenosina, guanosina, hipoxantina e xantina no córtex frontal da DA inicial [268];</p> <p>Altos conteúdos séricos de ácido úrico foram significativamente associados com diminuição do risco de DA, então pacientes com gota podem ter risco reduzido de DA [268, 271];</p> <p>Pacientes/modelos com DA demonstram reduções na atividade da adenilil ciclase [289, 290].</p>
Metabolismo alterado de aminoácidos que contém S ocorre na DA	<p>Mo é o cofator da sulfito oxidase (SUOX): sua baixa atividade prejudica o metabolismo do S [26, 27];</p> <p>DA tem uma alta relação Cys/SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> no plasma [25];</p> <p>Na DA, há uma diminuição plasmática do nível de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> [25] (o baixo teor de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> indica baixa atividade de SUOX devido a possível deficiência de Mo ou Moco);</p> <p>Os níveis de Cys são elevados no plasma da DA [25];</p> <p>Cys diminuiu em ca. 3 vezes no cérebro de um modelo de rato com DA [228];</p> <p>O Citocromo c é o acceptor de elétrons para o SUOX. A atividade COX da DA diminuiu significativamente nas plaquetas e no hipocampo [277];</p> <p>nCp-Cu alto causa um acúmulo de Hcy devido a uma diminuição na atividade da cistationina b-sintase [311].</p>
Conteúdo Mo	<p>DA: o nível sérico de Mo aumentou progressivamente, passando de indivíduos saudáveis (HS) por queixa subjetiva de memória, comprometimento cognitivo leve até DA [258];</p> <p>Diabético (DM2) com complicações graves: teores séricos de Mo aumentados [208];</p> <p>DM2 com complicações graves: teores mais baixos de Mo na urina [208].</p>

Adaptado de Coelho *et al.* [2]

Aumento de Cu  
e Mo no sangue  
e evidências  
sustentando  
uma diminuição  
do transporte  
de Cu e Mo  
no cérebro  
com o enve-  
lhecimento



## **CAPÍTULO 14**

Como já comentado no capítulo 11, Paglia *et al.* [258] constataram que o teor de Mo aumentou progressivamente no soro, sendo menor em indivíduos saudáveis e aumentando progressivamente em pessoas com queixa subjetiva de memória, assim como naquelas com comprometimento cognitivo leve e sendo ainda maior em pessoas com a DA. Além disso, esses autores verificaram que a concentração sérica de Cu foi maior nas pessoas com queixa subjetiva de memória comparadas a pessoas saudáveis.

Os resultados relacionados ao teor de Mo [258] indicam que há um acúmulo progressivo de Mo no soro ao longo das fases de piora dos sintomas da DA. Por outro lado, o aumento do teor de Cu no soro, possivelmente, está associado ao aumento do componente nCp-Cu [216] e, como já constatado, maior teor de nCp-Cu no soro aumenta a suscetibilidade à DA [9, 114]. Além disso, a concentração de Cu diminui no cérebro na DA [210] e, possivelmente, o conteúdo de Mo diminui nos tecidos na DA, como indicam os níveis reduzidos de produtos de molibdoenzimas [25, 269].

Existem algumas semelhanças entre o metabolismo de Cu e o do Mo na DA, de modo que seus conteúdos séricos e teciduais têm um padrão semelhante, conforme mostrado na Tabela 12.

Tabela 12. Semelhanças entre os teores de Cu e Mo na doença de Alzheimer (DA).

Níveis séricos	Níveis de Tecido Cerebral
<b>Semelhanças</b>	
<b>Cu</b> Alto teor de nCp-Cu no soro [210].	Nos tecidos cerebrais, o teor de Cu é geralmente baixo [210, 238].
<b>Mo</b> O conteúdo sérico de Mo aumentou progressivamente, passando de indivíduos saudáveis (HS) por queixa subjetiva de memória, leve comprometimento até DA, e a diferença entre HS e DA foi estatisticamente significativa [258].	Evidências sugerindo baixo nível de Mo em tecidos cerebrais da DA: Altos teores de ácido úrico sérico foram significativamente associados à diminuição do risco de DA, portanto, pacientes com gota podem ter risco reduzido de DA [269, 271]; Tecidos cerebrais de pacientes/modelos com DA demonstram reduções na atividade da adenilil ciclase [289, 290].

Adaptado de Coelho *et al.* [2]

Com base nas evidências relatadas (Tabela 12), verificam-se níveis mais altos de Mo no soro [254] e mais baixos na urina [208], possivelmente, também mais baixos no cérebro. Nossa hipótese postula que na juventude há pouca formação do complexo Cu-Mo dentro dos vasos sanguíneos, quando há uma relação nCp-Cu /Mo adequada. Conseqüentemente, Cu e Mo são eficientemente transportados para fora dos vasos, alcançando as células dos tecidos conforme descrito por Smith e Wright [314] para ovinos com dieta balanceada Cu-Mo.

Com o envelhecimento, pessoas com predisposição genética para DA podem ter acúmulo progressivo de nCp-Cu, o que, possivelmente, aumenta a formação de complexos Cu-Mo dentro dos vasos sanguíneos. Nessas condições, o transporte de Mo para fora dos vasos pode ser diminuído, causando uma leve deficiência de Mo nos tecidos. Postulamos que em idades mais avançadas, na DA,

o acúmulo de nCp-Cu é aumentado e, conseqüentemente, a formação do complexo Cu-Mo é significativamente aumentada no interior dos vasos, levando a um aumento no conteúdo sérico de Mo e uma grande diminuição no transporte de Mo para fora dos vasos (Figura 7), mecanismo observado por Smith e Wright [314]. Isso leva a um aumento dos sintomas de deficiência de Mo, com queda significativa na atividade de enzimas que contêm Mo como cofator, conforme relatado por Alonso-Andrés *et al.* [268], Du *et al.* [269], Latourte *et al.* [271], Yamamoto *et al.* [289] e Kelly [290].

Propomos que pessoas susceptíveis à DA têm relação nCp-Cu/Mo mais alta no soro sanguíneo. Neste caso, postula-se que o Mo deve ser suplementado na dieta diária. Propomos reformulações nas necessidades humanas diárias de cobre e molibdênio, incluindo a relação Cu/Mo para diferentes idades. Por exemplo, para ruminantes, a faixa de relação Cu/Mo ideal é entre 6:1 até 10:1 na alimentação final [315]. Assim, neste grupo de animais, se a relação Cu/Mo for <6:1 ou >10:1 na ração, ocorrerão problemas metabólicos. Além disso, nossa discussão se concentra na relação nCp-Cu/Mo no sangue (soro ou plasma), pois na DA, o nCp-Cu sérico é maior do que em pessoas saudáveis [179]. Assim, no soro de pessoas com doença de Alzheimer a relação nCp-Cu/Mo, possivelmente, é maior do que em indivíduos saudáveis. Pois, certamente, o Mo é progressivamente capturado pelo nCp-Cu e acumulado no soro, diminuindo a biodisponibilidade do molibdênio para as enzimas dependentes do Mo (Figura 7).

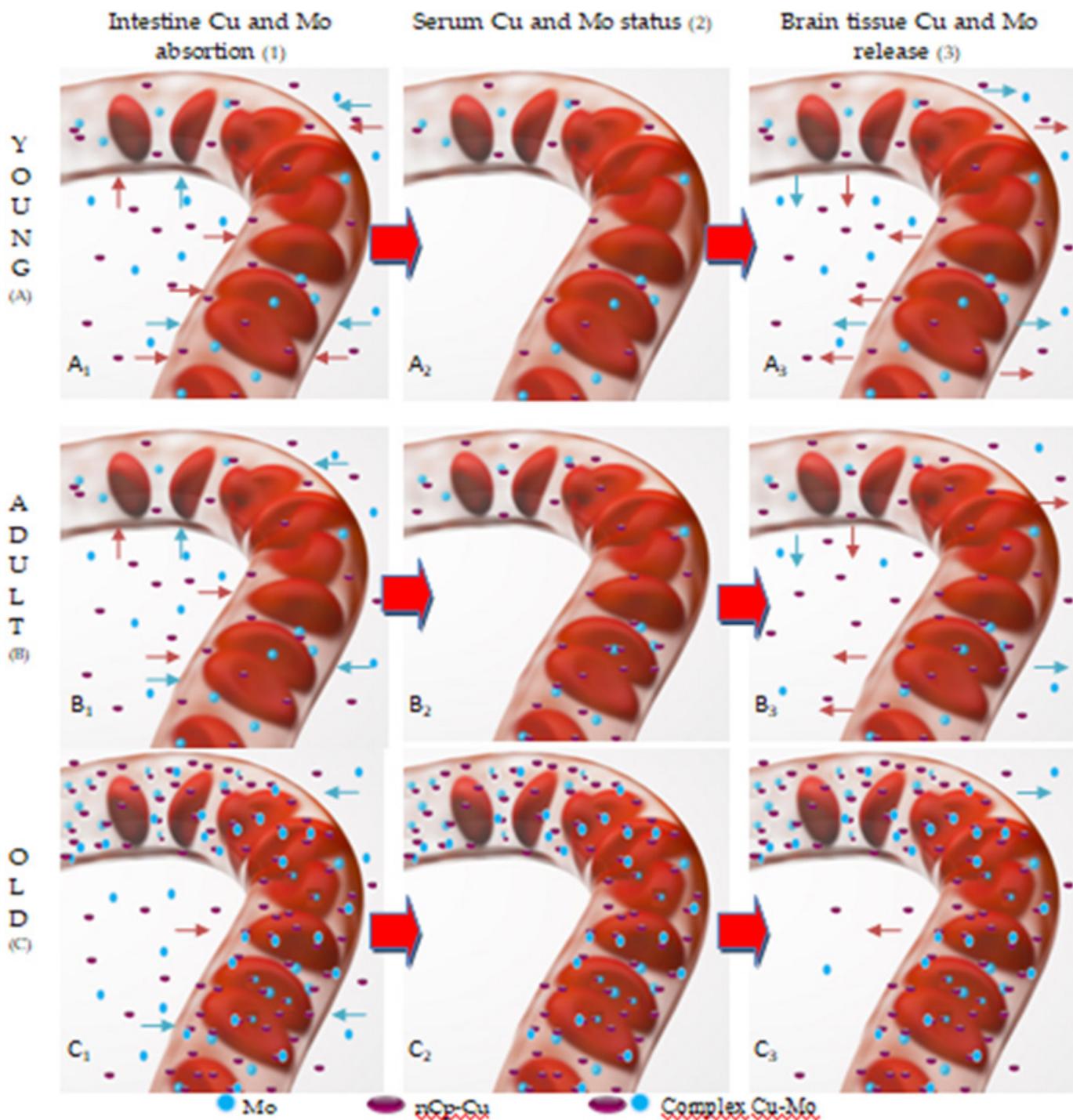


Figura 7. O acúmulo de nCp-Cu e Mo nos vasos sanguíneos diminui o transporte de Mo e Cu com o envelhecimento. A. Idades jovens com relação média nCp-Cu /Mo: A1 - a absorção no intestino é normal e depende da relação Cu/Mo nos alimentos; A2 - há pouca formação do complexo Cu-Mo no interior dos vasos; A3 - Cu e Mo são transportados com eficiência para fora dos vasos, atingindo o interior das células dos tecidos; B. Início da alta relação nCp-Cu /Mo no sangue: B1 - enriquecimento de nCp-Cu no soro e maior ligação de Mo ao Cu; B2 - O transporte de Mo para os tecidos começa a ser diminuído, já causando uma pequena deficiência de Mo; B3 - grande diminuição no transporte de Mo para fora dos vasos sanguíneos e uma diminuição significativa na disponibilidade de Mo para os tecidos das células cerebrais; C. Maior relação nCp-Cu/Mo no sangue com o envelhecimento: C1 - Baixa absorção de Cu alimentar e formação do complexo Cu-Mo muito aumentada dentro dos vasos; C2 - Acúmulo do complexo Cu-Mo dentro dos vasos, levando ao aumento no conteúdo sérico de Mo; C3 - diminuição significativa no transporte de Mo e Cu para fora dos vasos sanguíneos e grande diminuição na disponibilidade de Mo e Cu para os tecidos cerebrais.

Tentando colocar  
mais peças neste  
“quebra-cabeça”



**CAPÍTULO 15**

Na tentativa de completar o quebra-cabeça (Figura 2), avaliamos, por meio da análise da literatura científica, a possibilidade do Mo ser uma das peças que faltam.

Assim, colocamos mais peças ao quebra-cabeça da figura 2. Com o passar dos anos (envelhecimento), aumenta a concentração de nCp-Cu no sangue, o que, possivelmente, causa maiores demandas de Mo ou sua deficiência (nossa hipótese). Sob deficiência de Mo, a atividade da SUOX diminui, o que leva a um aumento nos níveis de sulfito (que é tóxico) [247] e distúrbio do metabolismo do S endógeno [25, 225, 293] com diminuição dos níveis de Cys intracelular [228] e diminuição dos níveis de folato, colina e sulfato (Figura 5). Assim, nossa principal hipótese para a causa da DA é a baixa atividade da SUOX devido à deficiência de Mo, causadas pelo acúmulo de nCp-Cu devido ao envelhecimento e pela predisposição genética (Figura 8). Dessa maneira, como já comentado, quando a SUOX está com baixa atividade, o aumento da concentração de sulfito bloqueia a conversão normal de Met em Cys, e isso faz com que os valores de Cys caiam, possivelmente, como resultado do sulfito acumulado [292]. Comentamos que os níveis de Cys são elevados no plasma na DA [25], mas podem estar diminuídos dentro das células cerebrais [228].

Vale a pena lembrar que a etapa terminal do metabolismo de Met e da Cys precisa da SUOX (Figuras 2 e

4). Se a SUOX tem baixa atividade, o teor de sulfito tóxico aumenta e a via para a síntese de Cys diminui [292], o que é confirmado pela menor concentração de Cys intracelular no cérebro com DA [228]. Como a Cys é necessária para as sínteses de CoA, colina e folato, conseqüentemente, a produção de acetilcolina é menor. Outro distúrbio é o excesso de Met, que pode resultar em aumento da neurotoxicidade da A $\beta$  [223]. Níveis elevados de Hcy na DA resultam da baixa atividade da via de trans-sulfuração [316].

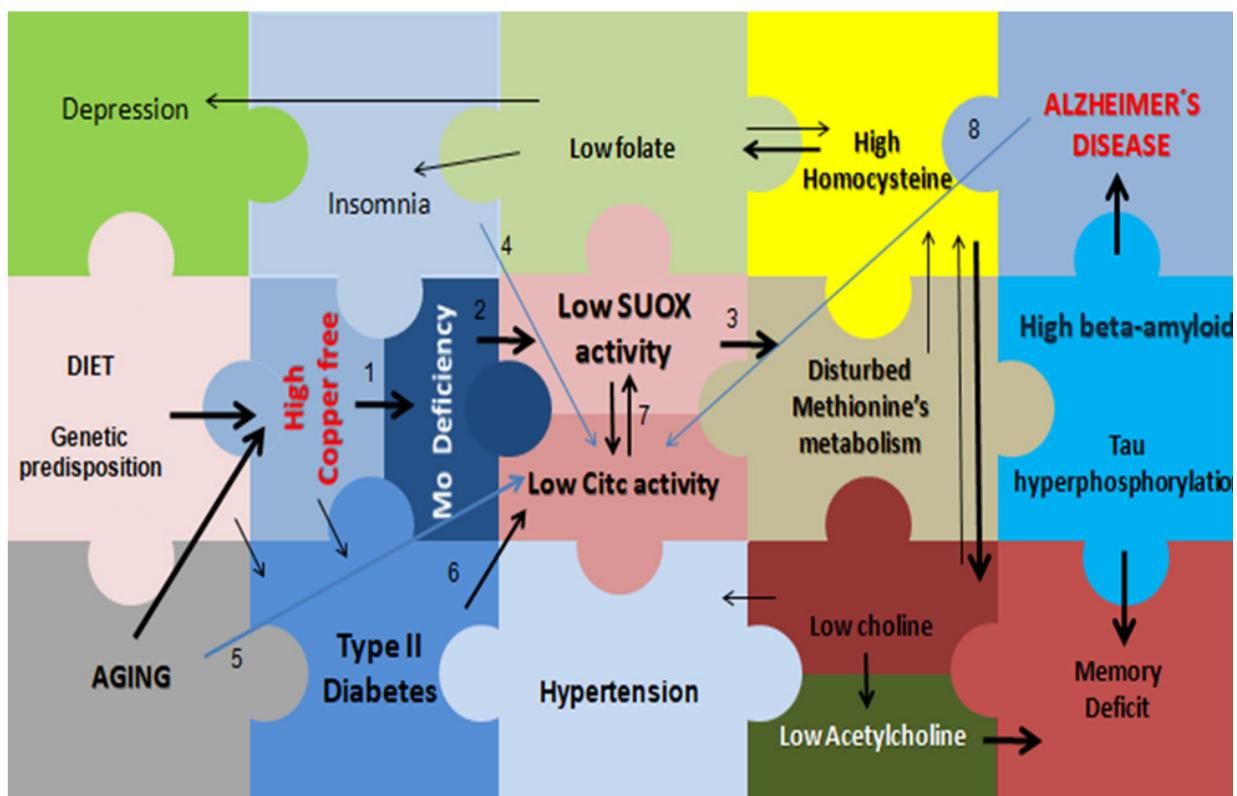


Figura 8. Quebra-cabeça ilustrando os vários sintomas e interações metabólicas que ocorrem na doença de Alzheimer. Detalhe do ajuste das peças que faltavam para completar o quebra-cabeça (deficiência de Mo; baixa atividade da SUOX e sua ligação ao Citocromo c nas mitocôndrias). 1. Nederbragt [317]; 2. Mendel e Kruse [307]; 3. Abumrad *et al.* [292]; 4. O'Neal-Moffitt *et al.* [318]; 5. Xiyang *et al.* [319]; 6. Zhang *et al.* [320]; 7. Grings *et al.* [301]; 8. Bosetti *et al.* [286], Holper *et al.* [321].

Além dessa possível interação de deficiência de Mo com metabolismo de S perturbado na DA [292, 228], outra indicação de que a deficiência de Mo pode estar relacionada à DA é o teor de ácido úrico mais baixo em pacientes com DA do que controles saudáveis [269].

Em conclusão, nossa hipótese é que o excesso de nCp-Cu no corpo pode resultar em uma maior exigência de Mo, que se torna deficiente. Conseqüentemente, isso resulta em baixa atividade da SUOX e teor de sulfito tóxico, com seus efeitos deletérios no metabolismo, que desencadeiam os demais sintomas das doenças relacionadas à DA e, posteriormente, os sintomas da DA. Essa hipótese está conforme os achados da revisão atual (Figura 9).

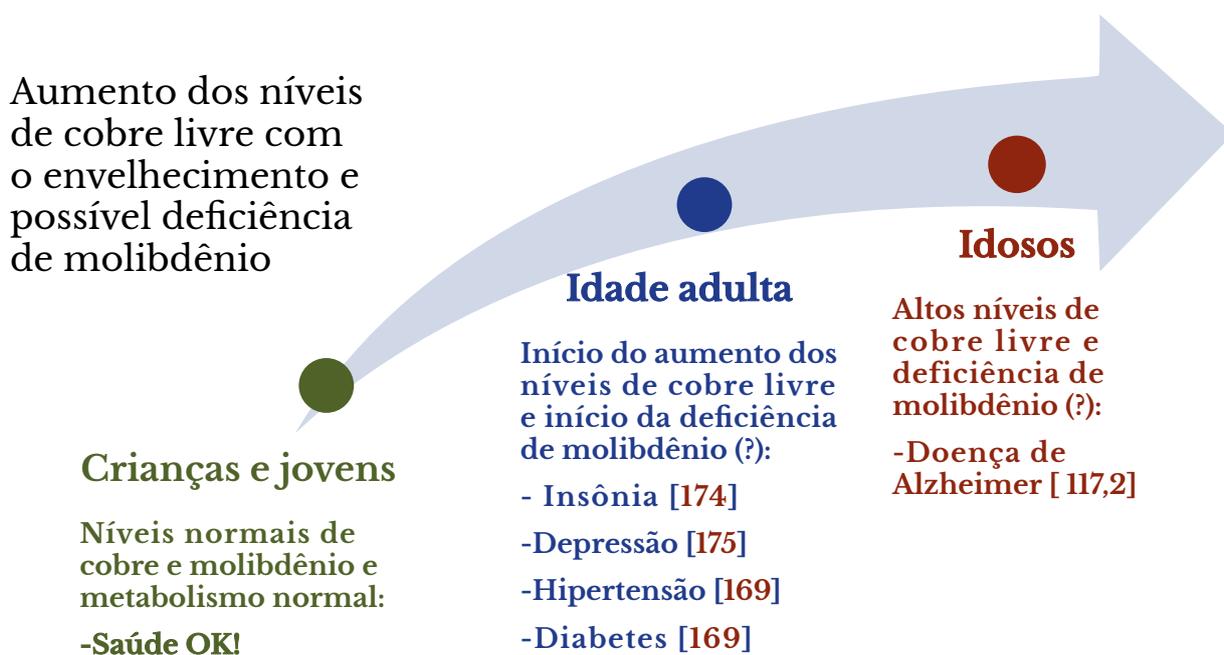


Figura 9- Acúmulo de Cu no corpo em diferentes fases da vida humana e suas possíveis conseqüências

A deficiência de Mo  
e as atividades  
baixas de SUOX e  
Citocromo c estão  
possivelmente  
ligadas à DA



**CAPÍTULO 16**

Como mencionado anteriormente, em indivíduos com predisposição à DA, o conteúdo de nCp-Cu no soro aumenta devido ao envelhecimento [210], o que, possivelmente, causa maiores demandas de Mo ou sua deficiência. Uma forte indicação para isso é o baixo teor de produtos de molibdoenzimas na DA [25, 227, 268 - 271]. Além disso, há interação entre a deficiência de Mo com o metabolismo de S perturbado na DA [228, 292].

Assim como comentado, sob deficiência de Mo, a atividade da SUOX diminui, o que leva a aumento no conteúdo de sulfito (que é tóxico) [247] e distúrbio do metabolismo endógeno do S [25, 225, 293] com diminuição do conteúdo de Cys intracelular [228] e diminuição do conteúdo de  $\text{SO}_4^{-2}$ , folato, colina e  $\text{H}_2\text{S}$ . A etapa terminal no metabolismo excretor de Met e Cys precisa da enzima SUOX. Se a SUOX não funcionar bem, o sulfito tóxico aumenta e a via para a síntese de Cys diminui [292]. Isto pode explicar os achados de Cys intracelulares mais baixos no cérebro com DA [228]. Como a Cys é necessária na síntese de CoA [322] e na síntese de colina, a produção de acetilcolina também é menor, o que é consistente com a neurotransmissão colinérgica perturbada observada na DA. Outro distúrbio é o excesso de Met, que pode aumentar a neurotoxicidade da  $\text{A}\beta$  [223]. Altos teores de Hcy na DA resultam da baixa atividade da via de trans-sulfuração [316]. Quando em baixa atividade de SUOX, o carregamento de sulfito bloqueia a conversão padrão de Met para Cys, e isso faz com que os valores de

Cys caíam, possivelmente devido ao sulfito aumentado [292]. Comentamos que o conteúdo de Cys é elevado no plasma na DA [25], mas pode estar diminuído dentro das células cerebrais [228].

Como comentado no capítulo 12, a ligação primária entre a interação metabólica de S e Mo na DA pode ser a baixa atividade da SUOX causando danos neurológicos [247]. Qualquer fator que afete negativamente a atividade da SUOX também afetará a atividade do Citocromo c [301]. Assim, o complexo SUOX-Citocromo c tem que estar funcionando bem para que as funções neurológicas ocorram satisfatoriamente. Além disso, na DA, outra indicação de que a SUOX está em baixa atividade é a diminuição do teor de  $\text{SO}_4^{2-}$  [25].

Devemos considerar que a baixa atividade da SUOX aguda dos recém-nascidos resulta em baixos conteúdos plasmáticos de Hcy [141]. Por outro lado, o aumento do conteúdo plasmático de Hcy é um fator de risco para DA, sendo que um sintoma típico de DA é o alto conteúdo plasmático de Hcy [225, 235, 238]. O alto conteúdo de Hcy na DA pode ser devido ao efeito direto do maior teor de nCp-Cu demonstrado por Bar-Or *et al.* [311] que verificaram que níveis elevados de nCp-Cu causam acúmulo de Hcy devido a uma diminuição na atividade da CBS.

Em conclusão, levantamos a hipótese de que o excesso de nCp-Cu no corpo pode resultar em uma maior



Uma das formas para evitar a DA será o uso de suplementação com Mo para pessoas na idade adulta e para idosos?



## **CAPÍTULO 17**

Novotny e Turnlund [323] determinaram as adaptações fisiológicas que ocorrem quando os seres humanos são expostos a uma ampla gama de níveis de ingestão de Mo. Quatro jovens saudáveis consumiram cada uma das cinco doses diárias de Mo: 22, 72, 121, 467 e 1490  $\mu\text{g dia}^{-1}$  (0,23; 0,75; 1,3; 4,9 e 15,5  $\mu\text{mol dia}^{-1}$ ) por 24 dias. A modelagem foi usada para determinar as taxas de distribuição e eliminação em cada nível de ingestão. Os autores observaram que com o aumento da ingestão de Mo, a absorção e excreção urinária desse elemento também aumentaram, enquanto a fração depositada nos tecidos diminuiu.

Panneerselvam e Govindasamy [324] avaliaram o efeito da administração oral de molibdato de sódio (100  $\text{mg kg}^{-1}$  peso corporal  $\text{dia}^{-1}$  por 30 dias) em ratos diabéticos induzidos por loxan. Eles verificaram que o molibdato reduziu os níveis de colesterol, triglicérides, fosfolipídios e peroxidação lipídica. Da mesma forma, camundongos alimentados com uma dieta deficiente em metionina e colina foram suplementados com molibdato de sódio desidratado (50  $\text{mg kg}^{-1}$   $\text{dia}^{-1}$  de Mo, por 4 semanas), verificando-se que o acúmulo de lipídios no fígado foi atenuado pelo molibdato [325].

O aumento da ingestão de Mo para diminuir os níveis internos de Cu, foi observado em animais e humanos. Antonelli *et al.* [326] avaliaram a capa-

cidade de um sal mineral rico em Mo ( $300 \text{ mg kg}^{-1}$  de Mo) na prevenção do Cu cumulativo em ovinos que receberam suplementação diária de 150 mg de sulfato de cobre. A maior ingestão de Mo na dieta resultou em menor concentração hepática de Cu ao final do experimento ( $r=-0,72$ ).

A quelação de Cu com tetratiomolibdato  $[(\text{NH}_4)_2\text{MoS}_4]$  inibiu as respostas inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeos em camundongos. Assim, a quelação do excesso de Cu pode ser uma nova estratégia para prevenir ou tratar a aterosclerose e outras condições inflamatórias [327]. Em humanos, por exemplo, o tetratiomolibdato de amônio é um quelante de Cu utilizado na clínica para o tratamento da doença de Wilson [59].

Como já mencionado, as pesquisas científicas relacionadas ao Mo e DA ainda são limitadas. Há muitas perguntas a serem respondidas pela pesquisa nos próximos anos. Algumas dessas perguntas são, por exemplo: Qual é a dose diária de suplementação de Mo e com que idade deve ser iniciada a suplementação? Quais sintomas metabólicos indicarão a necessidade de suplementação de Mo? Quais são as melhores fontes de Mo para suplementação? etc. (Figura 11).



Figura 11. Sequência de eventos relacionados ao acúmulo de Cu e possível deficiência de Mo, ao longo da vida daqueles com predisposição genética ao acometimento da doença de Alzheimer e sugestões de pesquisa.

Perspectiva  
clínica para  
DA e o “circuito  
Cu-Mo-S”



**CAPÍTULO 18**

Apesar do grande interesse social e econômico pela DA, que faz dessa doença uma das mais estudadas na neurociência, desenvolver um protocolo terapêutico eficiente é muito difícil. A pesquisa básica tem aprimorado o conhecimento sobre a fisiopatologia e as vias metabólicas envolvidas na DA. No entanto, esse conhecimento ainda não foi capaz de chegar a uma terapia efetiva. Tem sido proposto como uma possível estratégia de abordagem terapêutica para o desenvolvimento de terapias modificadoras da doença (DMT), que visam promover mudança significativa no curso da DA, prevenindo, retardando seu aparecimento ou retardando sua progressão [328]. No entanto, Liu *et al.* [329] confirmaram a eficácia do rastreamento ocular no diagnóstico de um distúrbio cognitivo e concluíram que é um marcador viável para reconhecê-lo.

Até 2021, havia pouquíssimos medicamentos aprovados para a DA, e todos atuavam apenas na melhora dos sintomas. Nenhum foi desenvolvido para tratar as causas da DA. Isso ocorre principalmente porque a verdadeira causa, ou causas, dessa doença está longe de ser descoberta. A alta taxa de falha em ensaios clínicos demonstra isso claramente. De 2002 a 2012, a taxa de falha foi de 99,6% [328, 330].

No entanto, o FDA aprovou um novo tratamento em 2021. O aducanumabe é um anticorpo monoclonal direcionado ao amilóide aplicado por infusões intravenosas e atua no acúmulo extracelular da proteína

A $\beta$  [331]. Embora possa ser considerado o primeiro medicamento modificador da doença aprovado para DA, sua aprovação é altamente controversa. Vários pesquisadores e sociedades científicas da área afirmaram que há poucas evidências de sua absoluta segurança e eficácia com um alto custo financeiro [332-334]. Portanto, apesar do esforço para encontrar um tratamento eficaz para a DA, isso não foi alcançado até o momento.

Em relação ao ponto principal proposto na revisão deste livro, poucos ensaios clínicos envolvendo o “circuito Cu–Mo–S” foram realizados. Agentes quelantes de Cu foram testados, mas nenhum resultado satisfatório foi obtido [335].

Tendo em vista que a busca por um tratamento farmacológico tem sido ineficaz, novas propostas têm sido feitas. A suplementação dietética foi recentemente proposta para tratar a DA, especificamente aquelas relacionadas ao “circuito Cu-Mo-S”, explorando as vias metabólicas conhecidas envolvidas na DA [245]. Esta proposta concorda com nossas hipóteses da conexão entre Mo e DA. Pode-se esperar que uma doença multifatorial certamente necessitará de tratamento também multifatorial, incluindo medicamentos e suplementação dietética.

Outro ponto crítico a ser considerado é o fato de que existe profunda sobreposição nos mecanismos moleculares envolvidos em todas as doenças neurodege-

nerativas. Por exemplo, o mesmo “circuito Cu–Mo–S” descrito aqui para DA também está envolvido na DP [83, 150, 336]. A terapia com agentes quelantes de Cu também foi realizada para DP, sem resultado positivo [337]. Portanto, embora as doenças neurodegenerativas tenham causas e características fisiopatológicas diferentes, seus cursos envolvem várias vias metabólicas comuns, o que pode significar que a intervenção terapêutica focada no “circuito Cu–Mo–S” não atuaria no início do desenvolvimento de todas as doenças neurodegenerativas. Pelo mesmo raciocínio, esse circuito pode não ser a origem, mas um circuito convergente durante a neurodegeneração. Pesquisas futuras neste campo são necessárias para esclarecer essas questões.

Outro ponto diz respeito aos efeitos da suplementação de colina, folato e Mo na DA. A suplementação de colina reduziu significativamente a carga de A $\beta$  e melhorou a memória espacial em camundongos APP/PS1 [237]. Em relação ao folato, as conclusões são inconsistentes ao suplementar os idosos com diferentes doses de ácido fólico [338]. Até o momento, nenhuma pesquisa relacionada à suplementação de Mo foi realizada em humanos e isso seria um assunto interessante para pesquisas futuras.

# Agra deci mentos

**Esta pesquisa não recebeu financiamento externo, mas a revisão do tópico 1 foi realizada durante o período de visitas de F.C.C. no Land Lab da Scuola Superiore Sant'Anna, Pisa, Itália. Agradecemos à FAPERJ pelo financiamento da SESA e do FCC por meio do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia e do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, respectivamente. Os autores também agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant número 2020/14175-0 pelo financiamento.**

# Abre via turas

-**DA**, doença de Alzheimer;

-**AO**, aldeído oxidase;

-**APP**, Proteína Precursora de Amilóide;

-**A $\beta$** , placas  $\beta$  amilóides;

-**CBS**, cistationina b-sintase;

-**COX**, Citocromo c oxidase;

-**Cu**, cobre;

-**Cys**, cisteína;

-**DMT**, terapias modificadoras da doença;

-**GSH**, glutathiona;

-**Hcy**, homocisteína;

-**HS**, indivíduos saudáveis;

-**mARC**, componente redutor de amidoxima mitocondrial;

-**CCL**, comprometimento cognitivo leve;

-**Met**, metionina;

-**Met-SO**, sulfóxido de metionina;

-**MNC**, alterações neurológicas leves;

-**Mo**, molibdênio;

-**Moco**, cofator de Mo;

-**nCp-Cu**, cobre não ligado a ceruloplasmina;

-**DP**, doença de Parkinson;

-**S**, enxofre;

-**SMC**, preocupação significativa com a memória;

-**SUOX**, sulfito oxidase;

-**DM2**, diabetes tipo 2;

-**XD**, xantina desidrogenase;

-**XO**, xantina oxidase;

-**XOR**, xantina oxidorreductase (diz respeito às duas formas, XD e XO).

# Referências



1. Coelho, F.C.; Squitti, R.; Ventriglia, M.; Cerchiaro, G.; Daher, J.P.; Rocha, J.G.; Rongioletti, M.C.A.; Moonen, A.C. Agricultural Use of Copper and Its Link to Alzheimer's Disease. *Biomolecules* 2020, 10, 897. [CrossRef]
2. Coelho, F.C.; Cerchiaro, G.; Araújo, S. E. S.; Daher, J. P. L.; Cardoso, S. A.; Coelho, G. F.; Guimarães, A. G. Is There a Connection between the Metabolism of Copper, Sulfur, and Molybdenum in Alzheimer's Disease? New Insights on Disease Etiology. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 7935. <https://doi.org/10.3390/ijms23147935>.
3. WHO | Disease Burden and Mortality Estimates. Available online: [http://origin.who.int/healthinfo/global\\_urden\\_disease/estimates/en/](http://origin.who.int/healthinfo/global_urden_disease/estimates/en/) (accessed on 6 May 2020).
4. WHO. Risk Reduction of Cognitive Decline and Dementia: WHO Guidelines; Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2019; ISBN 978-92-4-155054-3
5. Socha, K.; Klimiuk, K.; Naliwajko, S.K.; Soroczyńska, J.; Puścion-Jakubik, A.; Markiewicz-Zukowska, R.; Kochanowicz, J. Dietary Habits, Selenium, Copper, Zinc and Total Antioxidant Status in Serum in Relation to Cognitive Functions of Patients with Alzheimer's Disease. *Nutrients* 2021, 13, 287. [CrossRef]
6. Stocker, H.; Nabers, A.; Perna, L.; Möllers, T.; Rujescu, D.; Hartmann, A.; Holleczer, B.; Schöttker, B.; Stockmann, J.; Gerwert, K.; et al. Genetic predisposition, A $\beta$  misfolding in blood plasma, and Alzheimer's disease. *Transl. Psychiatry* 2021, 11, 261. [CrossRef]
7. Cordone, S.; Annarumma, L.; Rossini, P. M.; De Gennaro, L. Sleep and  $\beta$ -Amyloid Deposition in Alzheimer's Disease: Insights on Mechanisms and Possible Innovative Treatments. *Front. Pharmacol.* (2019) 10:695. doi: 10.3389/fphar.2019.00695.
8. Bramer W. M.; Giustini D.; Kramer B. M. R.; Anderson P. F. The comparative recall of Google Scholar versus PubMed in identical searches for biomedical systematic reviews: a review of searches used in systematic reviews. *Systematic Reviews* 2013, 2: 115. <http://www.systematicreviewsjournal.com/content/2/1/115>.
9. Squitti, R.; Pasqualetti, P.; Polimanti, R.; Salustri, C.; Moffa, F.; Cassetta, E.; Lupoi, D.; Ventriglia, M.; Cortesi, M.; Siotto, M.; Vernieri, F.; Rossini, P.M. Metal-score as a potential non-invasive diagnostic test for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2013, 10, 191-198, doi: 10.2174/1567205011310020009.
10. Squitti, R.; Ghidoni, R.; Siotto, M.; Ventriglia, M.; Benussi, L.; Paterlini, A.; Magri, M.; Binetti, G.; Cassetta, E.; Caprara, D.; Vernieri, F.; Rossini, P.M.; Pasqualetti, P. Value of serum nonceruloplasmin copper for prediction of mild cognitive impairment conversion to Alzheimer disease. *Ann Neurol* 2014, 75, 574-580, doi: 10.1002/ana.24136.
11. Vasquez, E.F.A.; Herrera, A.P.N.; Santiago, G.S. Interação cobre, molibdênio e enxofre em ruminantes. *Cienc. Rural* 2001, 31, 1101-1106. [CrossRef]
12. Lalioti, V.; Muruais, G.; Tsuchiya, Y.; Pulido, D.; Sandoval, I.V. Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Front. Biosci.* 2009, 14, 4878-4903. [CrossRef].
13. Palego, L.; Betti, L.; Giannaccini, G. Sulfur Metabolism and Sulfur-Containing Amino Acids: I-Molecular Effectors. *Biochem. Pharmacol.* 2015, 4, 1. [CrossRef]

14. Olney, J.W.; Misra, C.H.; Gubareff, T. Cysteine-S-sulfate: brain damaging metabolite in sulfite oxidase deficiency. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1975 **34**, 167-177. DOI: 10.1097/00005072-197503000-00005.
15. Zhang, X.; Vincent, A.S.; Halliwell, B.; Wong, K.P. A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**, 43035-43045. DOI: 10.1074/jbc.M402759200.
16. World Health Organization (WHO). Trace Elements in Human Nutrition and Health; Prepared in Collaboration with the FAO of the UN and the IAEA; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1996.
17. Hille, R.; Hall, J.; Basu, P. The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem. Rev.* 2014, **114**, 3963-4038. DOI: 10.1021/cr400443z
18. Maia, L.; Moura, J.J.G. Molybdenum and tungsten-containing enzymes: an overview. In Hille, R.; Schulzke, C.; Kirk M. Eds., "Molybdenum and tungsten enzymes: Biochemistry", RSC Metallobiology Series No. 5, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2017, Chapter 1, 1-80.
19. Schwarz, G.; Belaidi, A. Molybdenum in human health and disease. *Met. Ions Life Sci.* 2013, **13** 415–450. DOI: 10.1007/978-94-007-7500-8\_13.
20. Kappler, U.; Enemark, J.H. Sulfite-oxidizing enzymes. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2015, **20**, 253–264. DOI: 10.1007/s00775-014-1197-3.
21. Okamoto, K.; Kusano, T.; Nishino, T. Chemical Nature and Reaction Mechanisms of the Molybdenum Cofactor of Xanthine Oxidoreductase. *Curr. Pharm. Des.* 2013, **19**, 2606-2614. DOI: 10.2174/1381612811319140010.
22. Simmonds, H.A.; Reiter, S.; Nishino, T. Hereditary xanthinuria. In Beudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D. Eds., "The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease", McGraw-Hill, New York, 7th edition, 1995, Chapter 54, 1781-1797.
23. Reiter, S.; Simmonds, H.A.; Zöllner, N.; Braun, S.L.; Knedel, M. Demonstration of a combined deficiency of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in xanthinuric patients not forming oxipurinol. *Clin. Chim. Acta* 1990, **187**, 221-234. DOI: 10.1016/0009-8981(90)90107-4.
24. Squitti, R.; Faller, P.; Hureau, C.; Granzotto, A.; White, A.R.; Kepp, K.P. Copper Imbalance in Alzheimer's Disease and Its Link with the Amyloid Hypothesis: Towards a Combined Clinical, Chemical, and Genetic Etiology. *J. Alzheimers Dis.* 2021, **83**, 23–41.[CrossRef]
25. Heafield, M.T.; Fearn, S.; Steventon, G.B.; Waring, R.H.; Williams, A.C. Plasma cysteine and sulphate levels in patients with motor neurone, Parkinson's and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1990, **110**, 216–220. [CrossRef]
26. Irreverre, F.; Mudd, H.; Heizer, W.D.; Laster, L. Sulfite oxidase deficiency: Studies of a patient with mental retardation, dislocated ocular lenses, and abnormal urinary excretion of S-sulfo-l-cysteine, sulfite, and thiosulfate. *Biochem. Med.* 1967, **1**, 187–217. [CrossRef]

27. Brown, O.K.; Scholem, R.D.; Croll, H.B.; Wraith, J.E.; McGill, J.J. Sulfite oxidase deficiency. Clinical, neuroradiologic, and biochemical features in two new patients. *Neurology* 1989, *39*, 252. [CrossRef]
28. Lamichhane, J.R.; Osdaghi, E.; Behlau, F.; Köhl, J.; Jones, J.B.; Aubertot, J.N. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 2018, *38*, 1–18. [CrossRef]
29. Fishel, F.M. Pest Management and Pesticides: A Historical Perspective. Available online: [http://moodle.toxoer.com/pluginfile.php/8421/mod\\_imsdp/content/1/Pest\\_Management\\_and\\_Pesticides.pdf](http://moodle.toxoer.com/pluginfile.php/8421/mod_imsdp/content/1/Pest_Management_and_Pesticides.pdf) (accessed on 24 April 2020).
30. Lara, W.H.; Toledo, M.; Takahashi, M.Y. Teores de cobre em café torrado e moído e em café bebida. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 1975, *35*, 17–22.
31. Almeida, O.C.; Almeida, L.C.C.; Bezerra, J.L. Estudo de fungicidas à base de cobre no controle da vassourade-bruxa do cacauero no sudeste da Bahia. *Agrotropica* 2002, *14*, 97–100.
32. Can Organic Agriculture Give Up Copper As a Crop Protection Product? Available online: <https://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/444379-9fb-c6-resource-expertise-cuivre-en-ab-8-pages-anglais.pdf> (accessed on 24 April 2020).
33. FAO—Guidelines for the Production, Processing, Labelling and Marketing of Organically Produced Foods1. Available online: [http://www.fao.org/docs/eims/upload/230124/CXG\\_032e.pdf](http://www.fao.org/docs/eims/upload/230124/CXG_032e.pdf) (accessed on 24 April 2020).
34. Instrução Normativa Interministerial N° 28 de 08 de Junho de 2011 (Produção de Organismos Aquáticos).pdf—Português (Brasil). Available online: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-interministerial-no-28-de-08-de-junho-de-2011-producao-de-organismos-aquaticos.pdf/view> (accessed on 27 April 2020).
35. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available online: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-46-de-06-de-outubro-de-2011-producao-vegetal-e-animal-regulada-pela-in-17-2014.pdf/view> (accessed on 24 January 2020).
36. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available online: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/legislacao/portugues/instrucao-normativa-no-17-de-18-de-junho-de-2014.pdf/view> (accessed on 24 January 2020).
37. Ifoam\_eu\_copper\_minimisation\_in\_organic\_farming\_may2018\_0.pdf. Available online: [https://www.ifoam\\_eu.org/sites/default/files/ifoam\\_eu\\_copper\\_minimisation\\_in\\_organic\\_farming\\_may2018\\_0.pdf](https://www.ifoam_eu.org/sites/default/files/ifoam_eu_copper_minimisation_in_organic_farming_may2018_0.pdf) (accessed on 30 January 2020).
38. Kuhne, S.; Roßberg, D.; Rohrig, P.; Mering, F.; Weihrauch, F.; Kanthak, S.; Kienzle, J.; Patzwahl, W.; Reiners, E.; Gitzel, J. The Use of Copper Pesticides in Germany and the Search for Minimization and Replacement Strategies. *Org. Farming* 2017, *3*, 66–75. [CrossRef]
39. USDA—United States Department of Agriculture. Available online: <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfreSID=9874504b6f1025eb0e6b67cadf9d3b40ergn=div6view=textenode=7:3.1.1.9.32.7eidno=7> (accessed on 30 January 2020).

40. Motta, I. S. *Calda Bordalesa: Utilidades e Preparo*. Ministério da Agricultura. Available online: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/38833/1/FOL200837.pdf> (accessed on 20 January 2020).
41. EAOPS—East African Organic Products Standard. Available online: <https://law.resource.org/pub/eac/ibr/eas.456.2007.html> (accessed on 20 January 2020).
42. EAC. *Aid for Trade Case Story: The East African Organic Products Standard Submission by the United Nations Environment Programme*. Available online: <https://www.oecd.org/aidfortrade/47719232.pdf>. (accessed on 24 January 2020).
43. *Aplicação de calda bordalesa em frutíferas*. Available online: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/fichas-agroecologicas/arquivos-sa-nidade-vegetal/2-aplicacao-de-calda-bordalesa-em-frutiferas.pdf> (accessed on 24 January 2020).
44. *Sistema de produção de uva de mesa do norte de Minas Gerais*. Available online: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/MesaNorteMinas/tecnologia.htm> (accessed on 12 January 2020).
45. Rusjan, D.; Strlič, M.; Pucko, D.; Korošec-Koruza, Z. Copper accumulation regarding the soil characteristics in Sub-Mediterranean vineyards of Slovenia. *Geoderma* 2007, 141, 111–118. [CrossRef]
46. Calviño, D.F.; Nóvoa-Muñoz, J.C.; Díaz-Raviña, M.; Arias-Estévez, M. Copper accumulation and fractionation in vineyard soils from temperate humid zone (NW Iberian Peninsula). *Geoderma* 2009, 153, 119–129. [CrossRef]
47. Tóth, G.; Hermann, T.; Silva, M.R. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environ. Int.* 2016, 88, 299–309. [CrossRef]
48. Sacristán, D.; Carbó, E. Copper Contamination in Mediterranean Agricultural Soils: Soil Quality Standards and Adequate Soil Management Practices for Horticultural Crops. In *Soil Contamination—Current Consequences and Further Solutions*; Larramendy, M.L., Soloneski, S., Eds.; InTech: London, UK, 2016; Volume 4. [CrossRef]
49. Wu, C.; Luo, Y.; Zhang, L. Variability of copper availability in paddy fields in relation to selected soil properties in southeast China. *Geoderma* 2010, 156, 200–206. [CrossRef]
50. Ávila, G.; Gaete, H.; Sauvé, S.; Neaman, A. Organic matter reduces copper toxicity for the earthworm *Eisenia fetida* in soils from mining areas in Central Chile. *Chil. J. Agric. Res.* 2009, 69, 252–259. [CrossRef]
51. Mallmann, F.J.K.; Rheinheimer, D.S.; Ceretta, C.A.; Cella, C.; Minella, J.P.G.; Guma, R.L.; Filipovi, V.; Oort, F.; Šimunek, J. Soil tillage to reduce surface metal contamination—Model development and simulations of zinc and copper content profiles in a pig slurry-amended soil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2014, 196, 59–68. [CrossRef]
52. National Research Council (US) Committee on Copper in Drinking Water. *Copper in Drinking Water*. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK225402/> (accessed on 12 January 2020).

53. Shen, X.L.; Yu, J.H.; Zhang, D.F.; Xie, J.X.; Jiang, H. Positive relationship between mortality from Alzheimer's disease and soil metal concentration in mainland China. *J. Alzheimer's Dis.* 2014, 42, 893–900. [CrossRef] [PubMed]
54. Morris, M.C.; Evans, D.A.; Tangney, C.C.; Bienias, J.L.; Schneider, J.A.; Wilson, R.S.; Scherr, P.A. Dietary Copper and High Saturated and trans Fat Intakes Associated With Cognitive Decline. *Arch. Neurol.* 2006, 63, 1085–1088. [CrossRef]
55. EFSA (European Food Safety Authority) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance copper compounds. *EFSA J.* 2018, 16, 5152.
56. Primavesi, A. M. O solo: a base da vida em nosso globo. São Paulo: UNESP, pp. 13, 2012.
57. WHO. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Copper. CAS number: 7440-50-8. Tox Monograph: FAS 17-JECFA 26/265. 1982; <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je31.htm>. (accessed on 12 January 2020).
58. Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes –. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. National Academies Press, 2002, ISBN 0-309-51199-2.
59. Brewer, G.J. Copper-2 Hypothesis for Causation of the Current Alzheimer's Disease Epidemic Together With Dietary Changes That Enhance the Epidemic. *Chem. Res. Toxicol.* 2017, 30, 763–768. [CrossRef].
60. Napoli, M.; Cecchi, S.; Grassi, C.; Baldi, A.; Zanchi, C.A.; Orlandini, S. Phytoextraction of copper from a contaminated soil using arable and vegetable crops. *Chemosphere* 2019, 219, 122–129. [CrossRef]
61. Rahman, M.M.; Azirun, S.M.; Boyce, A.N. Enhanced Accumulation of Copper and Lead in Amaranth (*Amaranthus paniculatus*), Indian Mustard (*Brassica juncea*) and Sunflower (*Helianthus annuus*). *PLoS ONE* 2013, 8, e62941. [CrossRef]
62. Hummes, A.P.; Bortoluzzi, E.C.; Tonini, V.; Silva, L.; Petry, C. Transfer of Copper and Zinc from Soil to Grapevine-Derived Products in Young and Centenarian Vineyards. *Water Air Soil Pollut.* 2019, 230, 150–161. [CrossRef]
63. Santos, C.E.; Debastiani, R.; Souza, V.S.; Peretti, D.E.; Jobim, P.F.; Yoneama, M.L.; Amaral, L.; Dias, J.F. The influence of the winemaking process on the elemental composition of the Marselan red wine. *J. Sci. Food Agric.* 2019, 99, 4642–4650. [CrossRef]
64. Donici, A.C.; Bunea, I.; Călugăr, A.; Harsan, E.; Bora, F.D. Investigation of the Copper Content in Vineyard Soil, Grape, Must and Wine in the Main Vineyards of Romania: A Preliminary Study. *Bull. UASVM Hort.* 2019, 76, 31–46. [CrossRef]
65. Rehman, M.; Liu, L.; Wang, Q.; Saleem, M.H.; Bashir, S.; Ullah, S.; Peng, D. Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019, 26, 18003–18016. [CrossRef] [PubMed]
66. Alexander, P.D.; Alloway, B.J.; Dourado, A.M. Genotypic variations in the accumulation of Cd, Cu, Pb and Zn exhibited by six commonly grown vegetables. *Environ. Pollut.* 2006, 144, 736–745. [CrossRef] [PubMed]

67. Garrido, L.R.; Botton, M. Recomendações Técnicas para o Manejo das Pragas e Doenças Fúngicas da Videira na Região Sul do Brasil. In *Circula Técnica*; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Bento Gonçalves, RS, Brasil, 2015; Volume 117, pp. 3–23. 1516729946. Available online: <http://www.ihara.com.br/upload/produtos/fispq/1516729946.pdf> (accessed on 24 January 2020).
68. Massie, H.R.; Aiello, V.R.; Iodice, A.A. Changes with age in copper and superoxide dismutase levels in brains of C57BL/6J mice. *Mech. Ageing Dev.* 1979, 10, 93–99. [CrossRef]
69. Zheng, W.; Monnot, A.D. Regulation of brain iron and copper homeostasis by brain barrier systems: Implication in neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Therap.* 2012, 133, 177–188, doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.10.006.
70. Ke, Y.; Qian, Z.M. Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2003, 2, 246–253, doi: 10.1016/s1474-4422(03)00353-3.
71. Hare, D.J.; Arora, M.; Jenkins, N.L.; Finkelstein, D.I.; Doble, P.A.; Bush, A.I. Is early-life iron exposure critical in neurodegeneration? *Nat. Rev. Neurol.* 2015, 11, 536–544, doi: <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.100>.
72. Berridge, M.J. Michael J. Berridge (2010). Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 2010, 459, 441–449, doi: <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0736-1>.
73. González-Domínguez, R.; García-Barrera, T.; Gómez-Ariza. Homeostasis of metals in the progression of Alzheimer's disease. *Biometals* 2014, 27, 539–549, doi: 10.1007/s10534-014-9728-5.
74. Litwin, T.; Gromadzka, G.; Szpak, G.M.; Jabłonna-Salach, K.; Bulska E.; Członkowska A. Brain metal accumulation in Wilson's disease. *J. Neurol. Sci.* 2013, 329, 55–58, doi: 10.1016/j.jns.2013.03.021.
75. Rivera-Mancía, S.; Pérez-Neri, I.; Ríos, C.; Tristán-López, L.; Rivera-Espinosa, L.; Montes, S. The transition metals copper and iron in neurodegenerative diseases. *Chem. Biol. Interactions* 2010, 186, 184–99, doi: 10.1016/j.cbi.2010.04.010.
76. Lovell, M.; Robertson, J.; Teesdale, W.; Campbell, J.; Markesbery, W. M.A Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *J. Neurol. Sci.* 1998, 158, 47–52, doi: 10.1016/s0022-510x(98)00092-6.
77. Conte-Daban, A.; Boff, B.; Cândido, A.; Montes Aparicio, C.; Gateau, C.; Lebrun, C.; Cerchiaro, G.; Kieffer, I.; Sayen, S.; Guillon, E.; Delangle, P.; Hureau, C. A Trishistidine Pseudopeptide with Ability to Remove Both Cu<sup>I</sup> and Cu<sup>II</sup> from the Amyloid- $\beta$  Peptide and to Stop the Associated ROS Formation Chemistry: *European Journal* 2017, 23, 17078-17088, doi: 10.1002/chem.201703429.
78. Pohanka, M. Copper and copper nanoparticles toxicity and their impact on basic functions in the body. *Bratisl. Med. J.* 2019, 120, 397–409. [CrossRef]
79. Lavado, L.K.; Zhang, M.H.; Patel, K.; Khan, S.; Patel, U.K. Biometals as Potential Predictors of the Neurodegenerative Decline in Alzheimer's Disease. *Cureus* 2019, 5, 1–11. [CrossRef].

80. Masaldana, S.; Sharnel, A.S.; Clatworthy, C.G.; Smith, Z.M.; Francis, P.S.; Denoyera, D.; Meggyesya, P.M.; Fontaine, S.L.; Cater, M.A. Copper accumulation in senescent cells: Interplay between copper transporters and impaired autophagy. *Redox Biol.* 2018, 16, 322–333. [CrossRef]
81. Squitti, R.; Ghidoni, R.; Simonelli, I.; Ivanova, I.D.; Colabufo, N.A.; Zuin, M.; Benussi, L.; Binetti, G.; Cassetta, E.; Rongioletti, M.; et al. Copper dyshomeostasis in Wilson disease and Alzheimer's disease as shown by serum and urine copper indicators. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2018, 45, 181–188. [CrossRef] [PubMed]
82. Chen, C.; Jiang, X.; Li, Y.; Yu, H.; Li, S.; Zhang, Z.; Xu, H.; Yang, Y.; Liu, G.; Zhu, F.; et al. Low-dose oral copper treatment changes the hippocampal phosphoproteomic profile and perturbs mitochondrial function in a rat model of Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2019, 135, 144–156. [CrossRef]
83. Mezzaroba, L.; Alfieri, D.F.; Simão, A.N.C.; Reiche, E.M.V. The role of zinc, copper, manganese and iron in neurodegenerative diseases. *Neuro Toxicol.* 2019, 74, 230–241. [CrossRef]
84. Acevedo, K.M.; Hung, Y.H.; Dalziel, A.H.; Li, Q.X.; Laughton, K.; Wikke, K.; Rembach, A.; Roberts, B.; Masters, C.L.; Bush, A.I.; et al. Copper promotes the trafficking of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 8252–8262. [CrossRef]
85. Atwood, C.S.; Moir, R.D.; Huang, X.; Scarpa, R.C.; Bacarra, N.M.; Romano, D.M.; Hartshorn, M.A.; Tanzi, R.E.; Bush, A.I. Dramatic aggregation of Alzheimer  $\beta$  by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 12817–12826. [CrossRef] [PubMed] doi: 10.1074/jbc.273.21.12817 .
86. Hartter, DE; Barnea, A. Evidence for release of copper in the brain: Depolarization-induced release of newly taken-up  $^{67}\text{Cu}$ . *Sinapse* 1988 , 2 , 412–415, doi: 10.1002/syn.890020408.
87. Yates, CM; Butterworth, J.; Tennant, MC; Gordon, A. Enzyme Activities in Relation to pH and Lactate in Post-mortem Brain in Alzheimer - Type and Other Dementias. *J. Neurochem.* 1990 , 55 , 1624–1630, doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb04948.x.
88. OMS (Organização Mundial da Saúde), 2020. <https://www.who.int/gho/countries/deu/en/> . (acessado em 24 de janeiro de 2020).
89. Alzheimer Europe. The prevalence of dementia in Europe. 2014; <https://www.alzheimer-europe.org/Policy-in-Practice2/Country-comparisons/2013-The-prevalence-of-dementia-in-Europe> . (acessado em 24 de janeiro de 2020).
90. Multhaup, G.; Schlicksupp, A.; Hesse, L.; Beher, D.; Ruppert, T.; Masters, C.L.; Beyreuther, K. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease in the reduction of copper (II) to copper (I). *Science* 1996, 271, 1406–1409. [CrossRef] [PubMed]
91. Kepp, K.P.; Squitti, R. Copper imbalance in Alzheimer's disease: Convergence of the chemistry and the clinic. *Coord. Chem. Rev.* 2019, 397, 168–187. [CrossRef]
92. Squitti, R.; Malosio, M.L.; Rongioletti, M.C.A.; Tecchio, F. Copper involvement in glutamatergic transmission in physiology and disease as revealed by magnetoencephalography/electroencephalography (MEG/EEG) studies. *Aging Clin. Exp. Res.* 2019, 9. [CrossRef] [PubMed]

93. Sensi, S.L.; Granzotto, A.; Siotto, M.; Squitti, R. Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 2018, *39*, 1049–1063. [CrossRef] [PubMed]
94. Acevedo, K.M.; Hung, Y.H.; Dalziel, A.H.; Li, Q.X.; Laughton, K.; Wikhe, K.; Rembach, A.; Roberts, B.; Masters, C.L.; Bush, A.I.; et al. Copper promotes the trafficking of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* 2011, *286*, 8252–8262. [CrossRef]
95. Atwood, C.S.; Scarpa, R.C.; Huang, X.; Moir, R.D.; Jones, W.D.; Fairlie, D.P.; Tanzi, R.E.; Ashley, I. Bush Characterization of copper interactions with alzheimer amyloid beta peptides: Identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1-42. *J. Neurochem.* 2000, *75*, 1219–1233. [CrossRef]
96. Huang, X.; Atwood, C.S.; Hartshorn, M.A.; Multhaup, G.; Goldstein, L.E.; Scarpa, R.C.; Cuajungco, M.P.; Gray, D.N.; Lim, J.; Moir, R.D.; et al. The A beta peptide of Alzheimer's disease directly produces hydrogen peroxide through metal ion reduction. *Biochemistry* 1999, *38*, 7609–7616. [CrossRef]
97. Huang, X.; Cuajungco, M.P.; Atwood, C.S.; Hartshorn, M.A.; Tyndall, J.D.A.; Hanson, G.R.; Stokes, K.C.; Leopold, M.; Multhaup, G.; Goldstein, L.E.; et al. Cu(II) potentiation of Alzheimer abeta neurotoxicity. Correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. *J. Biol. Chem.* 1999, *274*, 37111–37116. [CrossRef]
98. Palmer, C.; Menzies, S.L.; Roberts, R.L.; Pavlick, G.; Connor, J.R. Changes in iron histochemistry after hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal rat. *J. Neurosci. Res.* 1999, *56*, 60–71. [CrossRef]
99. Cherny, R.A.; Legg, J.T.; McLean, C.A.; Fairlie, D.P.; Huang, X.; Atwood, C.S.; Beyreuther, K.; Tanzi, R.E.; Masters, C.L.; Bush, A.I. Aqueous dissolution of Alzheimer's disease Abeta amyloid deposits by biometal depletion. *J. Biol. Chem.* 1999, *274*, 23223–23228. [CrossRef] [PubMed]
100. Cherny, R.A.; Atwood, C.S.; Xilinas, M.E.; Gray, D.N.; Jones, W.D.; McLean, C.A.; Barnham, K.J.; Volitakis, I.; Fraser, F.W.; Kim, Y.; et al. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits beta-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 2001, *30*, 665–676. [CrossRef]
101. Bucossi, S.; Ventriglia, M.; Panetta, V.; Salustri, C.; Pasqualetti, P.; Mariani, S.; Siotto, M.; Rossini, P.M.; Squitti, R. Copper in Alzheimer's disease: A meta-analysis of serum, plasma, and cerebrospinal fluid studies. *J. Alzheimer's Dis.* 2011, *24*, 175–185. [CrossRef]
102. Squitti, R.; Simonelli, I.; Ventriglia, M.; Siotto, M.; Pasqualetti, P.; Rembach, A.; Doecke, J.; Bush, A.I. Meta-analysis of serum non-ceruloplasmin copper in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2014, *38*, 809–822. [CrossRef]
103. Li, D.D.; Zhang, W.; Wang, Z.Y.; Zhao, P. Serum Copper, Zinc, and Iron Levels in Patients with Alzheimer's Disease: A Meta-Analysis of Case-Control Studies. *Front. Aging Neurosci.* 2017, *9*, 300. [CrossRef] [PubMed]
104. Schrag, M.; Mueller, C.; Oyoyo, U.; Smith, M.A.; Kirsch, W.M. Iron, zinc and copper in the Alzheimer's disease brain: A quantitative meta-analysis. Some insight on the influence of citation bias on scientific opinion. *Prog. Neurobiol.* 2011, *94*, 296–306. [CrossRef]
105. Sensi, S.L.; Granzotto, A.; Siotto, M.; Squitti, R. Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 2018, *39*, 1049–1063. [CrossRef] [PubMed]

106. Ventriglia, M.; Bucossi, S.; Panetta, V.; Squitti, R. Copper in Alzheimer's disease: A meta-analysis of serum, plasma, and cerebrospinal fluid studies. *J. Alzheimer's Dis.* 2012, 30, 981–984. [CrossRef]
107. Wang, Z.X.; Tan, L.; Wang, H.F.; Ma, J.; Liu, J.; Tan, M.S.; Sun, J.H.; Zhu, X.C.; Jiang, T.; Yu, J.T. Serum Iron, Zinc, and Copper Levels in Patients with Alzheimer's Disease: A Replication Study and Meta-Analyses. *J. Alzheimer's Dis.* 2015, 47, 565–581. [Cross-Ref] [PubMed]
108. Squitti, R.; Ghidoni, R.; Simonelli, I.; Ivanova, I.D.; Colabufo, N.A.; Zuin, M.; Benussi, L.; Binetti, G.; Cassetta, E.; Rongioletti, M.; et al. Copper dyshomeostasis in Wilson disease and Alzheimer's disease as shown by serum and urine copper indicators. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2018, 45, 181–188. [CrossRef] [PubMed]
109. Squitti, R.; Barbati, G.; Rossi, L.; Ventriglia, M.; Dal Forno, G.; Cesaretti, S.; Moffa, F.; Caridi, I.; Cassetta, E.; Pasqualetti, P.; et al. Excess of nonceruloplasmin serum copper in DA correlates with MMSE, CSF [beta]-amyloid, and h-tau. *Neurology* 2006, 67, 76–82. [CrossRef]
110. Hoogenraad, T., *Wilson's disease*. Amsterdam/Rotterdam: Intermed Medical Publishers. 2001.
111. Hoogenraad, T.U., Paradigm shift in treatment of Alzheimer's disease: zinc therapy now a conscientious choice for care of individual patients. *Int J Alzheimers Dis* 2011, 492686, doi:10.4061/2011/492686.
112. Squitti, R.; Lupoi, D.; Pasqualetti, P.; Dal Forno, G.; Vernieri, F.; Chiovenda, P.; Rossi, L.; Cortesi, M.; Cassetta, E.; Rossini, P.M. Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology* 2002, 59, 1153–1161. [CrossRef] [PubMed]
113. Squitti, R.; Ghidoni, R.; Scrascia, F.; Benussi, L.; Panetta, V.; Pasqualetti, P.; Moffa, F.; Bernardini, S.; Ventriglia, M.; Binetti, G.; et al. Free copper distinguishes mild cognitive impairment subjects from healthy elderly individuals. *J. Alzheimer's Dis.* 2011, 23, 239–248. [CrossRef] [PubMed]
114. Squitti, R.; Ghidoni, R.; Siotto, M.; Ventriglia, M.; Benussi, L.; Paterlini, A.; Magri, M.; Binetti, G.; Cassetta, E.; Caprara, D.; et al. Value of serum nonceruloplasmin copper for prediction of mild cognitive impairment conversion to Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* 2014, 75, 574–580. [CrossRef] [PubMed]
115. Rozzini, L.; Lanfranchi, F.; Pilotto, A.; Catalani, S.; Gilberti, M.E.; Paganelli, M.; Apostoli, P.; Padovani, A. Serum Non-Ceruloplasmin Non-Albumin Copper Elevation in Mild Cognitive Impairment and Dementia due to Alzheimer's Disease: A Case Control Study. *J. Alzheimer's Dis.* 2018, 61, 907–912. [CrossRef] [PubMed]
116. Kepp, K.P.; Squitti, R. Copper imbalance in Alzheimer's disease: Convergence of the chemistry and the clinic. *Coord. Chem. Rev.* 2019, 397, 168–187. [CrossRef]
117. Squitti, R.; Simonelli, I.; Cassetta, E.; Lupoi, D.; Rongioletti, M.; Ventriglia, M.; Siotto, M. Patients with Increased Non-Ceruloplasmin Copper Appear a Distinct Sub-Group of Alzheimer's Disease: A Neuroimaging Study. *Curr. Alzheimer Res.* 2017, 14, 1318–1326. [CrossRef]

118. James, S.A.; Volitakis, I.; Adlard, P.A.; Duce, J.A.; Masters, C.L.; Cherny, R.A.; Bush, A.I. Elevated labile Cu is associated with oxidative pathology in Alzheimer's Disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2012, *52*, 298–302. [CrossRef]
119. Babiloni, C.; Squitti, R.; Del Percio, C.; Cassetta, E.; Ventrighia, M.; Ferreri, F.; Tomбини, M.; Frisoni, G.; Binetti, G.; Gurzi, M.; Salinari, S.; Zappasodi, F.; Rossini, P.M. Free copper and resting temporal EEG rhythms correlate across healthy, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease subjects. *Clin Neurophysiol* 2007, *118*, 1244–60, doi: 10.1016/j.clinph.2007.03.016.
120. Zappasodi, F.; Salustri, C.; Babiloni, C.; Cassetta, E.; Del Percio, C.; Ercolani, M.; Rossini, P.M.; Squitti, R. An observational study on the influence of the APOE-epsilon4 allele on the correlation between 'free' copper toxicosis and EEG activity in Alzheimer disease. *Brain Res* 2008, *1215*, 183–189, doi: 10.1016/j.brainres.2008.03.066.
121. Squitti, R.; Pasqualetti, P.; Dal Forno, G.; Moffa, F.; Cassetta, E.; Lupoi, D.; Vernieri, F.; Rossi, L.; Baldassini, M.; Rossini, P.M. Excess of serum copper not related to ceruloplasmin in Alzheimer disease. *Neurology* 2005, *64*, 1040–1046. [CrossRef] [PubMed]
122. Squitti, R.; Bressi, F.; Pasqualetti, P.; Bonomini, C.; Ghidoni, R.; Binetti, G.; Cassetta, E.; Moffa, F.; Ventrighia, M.; Vernieri, F.; et al. Longitudinal prognostic value of serum "free" copper in patients with Alzheimer disease. *Neurology* 2009, *72*, 50–55. [CrossRef] [PubMed]
123. Bucossi, S.; Mariani, S.; Ventrighia, M.; Polimanti, R.; Gennarelli, M.; Bonvicini, C.; Pasqualetti, P.; Scrascia, F.; Migliore, S.; Vernieri, F.; et al. Association between the c. 2495 A>G ATP7B Polymorphism and Sporadic Alzheimer's Disease. *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2011, 2011, 973692. [CrossRef]
124. Squitti, R.; Ventrighia, M.; Gennarelli, M.; Colabufo, N.A.; El Idrissi, I.G.; Bucossi, S.; Mariani, S.; Rongioletti, M.; Zanetti, O.; Congiu, C.; et al. Non-Ceruloplasmin Copper Distincts Subtypes in Alzheimer's Disease: A Genetic Study of ATP7B Frequency. *Mol. Neurobiol.* 2017, *54*, 671–681. [CrossRef]
125. Salustri, C.; Siotto, M.; Bucossi, S.; Squitti, R. Metals Involvement in Alzheimer's Disease—A Patho-Genetic View. In *Alzheimer's Disease—Challenges for the Future*; Zerr, P.I., Ed.; InTech: London, UK, 2015; Volume 4. [CrossRef]
126. Squitti, R.; Polimanti, R.; Siotto, M.; Bucossi, S.; Ventrighia, M.; Mariani, S.; Vernieri, F.; Scrascia, F.; Trotta, L.; Rossini, P.M. ATP7B variants as modulators of copper dyshomeostasis in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med.* 2013, *15*, 515–522. [CrossRef]
127. Squitti, R.; Fostinelli, S.; Siotto, M.; Ferrari, C.; Binetti, G.; Benussi, L.; Rongioletti, M.; Ghidoni, R. Serum Copper is not Altered in Frontotemporal Lobar Degeneration. *J. Alzheimer's Dis.* 2018, *63*, 1427–1432. [CrossRef] [PubMed]
128. Lopez, N.; Tormo, C.; De Blas, I.; Llinares, I.; Alom, J. Oxidative stress in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with high sensitivity and specificity. *J. Alzheimer's Dis.* 2013, *33*, 823–829. [CrossRef]
129. Squitti, R.; Polimanti, R.; Bucossi, S.; Ventrighia, M.; Mariani, S.; Manfellotto, D.; Vernieri, F.; Cassetta, E.; Ursini, F.; Rossini, P.M. Linkage disequilibrium and haplotype analysis of the ATP7B gene in Alzheimer's disease. *Rejuvenation Res.* 2013, *16*, 3–10. [CrossRef] [PubMed]

130. Bucossi, S.; Polimanti, R.; Ventriglia, M.; Mariani, S.; Siotto, M.; Ursini, F.; Trotta, L.; Scrascia, F.; Callea, A.; Vernieri, F.; et al. Intronic rs2147363 variant in ATP7B transcription factor-binding site associated with Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2013, 37, 453–459. [CrossRef] [PubMed]
131. Liu, H.P.; Lin, W.Y.; Wang, W.F.; Tsai, C.H.; Wu, W.C.; Chiou, M.T.; Shen, C.P.; Wu, B.T.; Tsai, F.J. Genetic variability in copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with Alzheimer's disease in a Chinese population. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 2013, 27, 319–327. [PubMed]
132. Telianidis, J.; Hung, Y.H.; Materia, S.; Fontaine, S.L. Role of the P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis. *Front. Aging Neurosci.* 2013, 5, 44. [CrossRef]
133. Pal, A.; Siotto, M.; Prasad, R.; Squitti, R. Towards a unified vision of copper involvement in Alzheimer's disease: A review connecting basic, experimental, and clinical research. *J. Alzheimer's Dis.* 2015, 44, 343–354. [CrossRef]
134. Squitti, R.; Tecchio, F.; Ventriglia, M. The Role of Copper in Human Diet and Risk of Dementia. *Current Nutritional Reports* 2015, 4, 114–125.
135. Sparks, D.L.; Schreurs, B.G. Trace amounts of copper in water induce amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 11065–11069. [CrossRef]
136. Sparks, D.L.; Friedland, R.; Petanceska, S.; Schreurs, B.G.; Shi, J.; Perry, G.; Smith, M.A.; Sharma, A.; Derosa, S.; Ziolkowski, C.; et al. Trace copper levels in the drinking water, but not zinc or aluminum influence CNS Alzheimer-like pathology. *J. Nutr. Health Aging.* 2006, 10, 247–254. [PubMed]
137. Lu, J.; Zheng, Y.L.; Wu, D.M.; Sun, D.X.; Shan, Q.; Fan, S.H. Trace amounts of copper induce neurotoxicity in the cholesterol-fed mice through apoptosis. *FEBS Lett.* 2006, 580, 6730–6740. [CrossRef] [PubMed]
138. Arnal, N.; Castillo, O.; de Alaniz, M.J.; Marra, C.A. Effects of Copper and/or Cholesterol Overload on Mitochondrial Function in a Rat Model of Incipient Neurodegeneration. *Int. J. Alzheimer's Dis.* 2013, 2013, 645379. [CrossRef] [PubMed]
139. Yao, D.; Jing, T.; Niu, L.; Huang, X.; Wang, Y.; Deng, X.; Wang, M. Amyloidogenesis induced by diet cholesterol and copper in a model mouse for Alzheimer's disease and protection effects of zinc and fluvastatin. *Brain Res. Bull.* 2018, 143, 1–8. [CrossRef]
140. Abolaji, A.O.; Fasae, K.D.; Iwezor, C.E.; Aschner, M.; Farombi, E.O. Curcumin attenuates copper-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Rep.* 2020, 7, 261–268. [CrossRef] [PubMed]
141. Lamtai, M.; Zghari, O.; Ouakki, S.; Marmouzi, I.; Mesfioui, A.; El Hessni, A.; Ouirchou, A. Chronic copper exposure leads to hippocampus oxidative stress and impaired learning and memory in male and female rats. *Toxicol. Res.* 2020. [CrossRef]
142. Singh, I.; Sagare, A.P.; Coma, M.; Perlmutter, D.; Gelein, R.; Bell, R.D.; Deane, R.J.; Zhong, E.; Parisi, M.; Ciszewski, J.; et al. Low levels of copper disrupt brain amyloid-beta homeostasis by altering its production and clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 14771–14776. [CrossRef] [PubMed]

143. Yu, J.; Luo, X.; Xu, H.; Ma, Q.; Yuan, J.; Li, X.; Chang, R.C.; Qu, Z.; Huang, X.; Zhuang, Z.; et al. Identification of the Key Molecules Involved in Chronic Copper Exposure-Aggravated Memory Impairment in Transgenic Mice of Alzheimer's Disease Using Proteomic Analysis. *J. Alzheimer's Dis.* 2015, 44, 455–469. [CrossRef]
144. Brewer, G.J.; Dick, R.D.; Johnson, V.D.; Brunberg, J.A.; Kluin, K.J.; Fink, J.K. Treatment of Wilson's disease with zinc: XV long-term follow-up studies. *J Lab Clin Med* 1998, 132, 264-278, doi:10.1016/s0022-2143(98)90039-7.
145. Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem Rev* 2006, 106, 1995-2044, doi:10.1021/cr040410w.
146. European Association for Study of, L., EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol* 2012, 56, 671-85, doi:10.1016/j.jhep.2011.11.007.
147. Roberts, E.A.; Schilsky, M.L.; American Association for Study of Liver Diseases (AASLD). Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology* 2008, 47, 2089-2111, doi:10.1002/hep.22261.
148. Walshe, J.M.; Clinical Investigations Standing Committee of the Association of Clinical Biochemists. Wilson's disease: the importance of measuring serum caeruloplasmin non-immunologically. *Ann Clin Biochem* 2003, 40, 115-121, doi:10.1258/000456303763046021.
149. López, N.; Tormo, C.; De Blas, I.; Llinares, I.; Alom J. Oxidative stress in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment with high sensitivity and specificity. *J Alzheimers Dis* 2013, 33, 823-9, doi:10.3233/JAD-2012-121528.
150. Pu, Z.; Xu, W.; Lin, Y.; He, J.; Huang, M. Oxidative Stress Markers and Metal Ions are Correlated With Cognitive Function in Alzheimer's Disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2017, 32, 353-359, doi:10.1177/1533317517709549.
151. Squitti, R.; Siotto, M.; Cassetta, E.; El Idrissi, I.G.; Colabufo, N.A. Measurements of serum non-ceruloplasmin copper by a direct fluorescent method specific to Cu(II). *Clin Chem Lab Med* 2017, 55, 1360 -1367, doi:10.1515/cclm-2016-0843.
152. Salustri, C.; Barbati, G.; Ghidoni, R.; Quintiliani, L.; Ciappina, S.; Binetti, G.; Squitti, R. Is cognitive function linked to serum free copper levels? A cohort study in a normal population. *Clin Neurophysiol* 2010, 121, 502-507, doi:10.1016/j.clinph.2009.11.090.
153. Squitti, R.; Mendez, A.; Ricordi, C.; Siotto, M.; Goldberg, R. Copper in Glucose Intolerance, Cognitive Decline, and Alzheimer's Disease. *Alzheimer's Disease e Alzheimer's Disease e Associated Disorders*, 2019, 33, 77-85, doi:10.1097/WAD.0000000000000280.
154. Esmieu, C.; Guettas, D.; Conte-Daban, A.; Sabater, L.; Faller, P.; Hureau, C. Copper-Targeting Approaches in Alzheimer's Disease: How To Improve the Fallouts Obtained From *in vitro* Studies. *Inorg Chem* 2019, 58, 13509-13527, doi:10.1021/acs.inorgchem.9b00995.
155. Huat, T.J.; Camats-Perna, J.E.; Newcombe, A.; Valmas, N.; Kitazawa, M.; Medeiros, R. Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. *Journal of Molecular Biology* 2019, 431, 1843-1868, doi:10.1016/j.jmb.2019.01.018.

156. Hsu, H.W.; Rodriguez-Ortiz, C.J.; Lim, S.L.; Zumkehr, J.; Kilian, J.G.; Vidal, J.; Kitazawa, M. Copper-Induced Up regulation of Micro RNAs Directs the Suppression of Endothelial LRP1 in Alzheimer's Disease Model. *Toxicol Sci* 2019, 170, 144-156, doi:10.1093/toxsci/kfz084.
157. Zatta, P.; Drago, D.; Zambenedetti, P.; Bolognin, S.; Nogara, E.; Peruffo, A.; Cozzi, B. Accumulation of copper and other metal ions, and metallothionein I/II expression in the bovine brain as a function of aging. *J. Chem. Neuroanat.* 2008, 36, 1–5. [Cross-Ref] [PubMed]
158. Vasudevaraju, P.; Bharathi, T.J.; Shamasundar, N.M.; Subba Rao, K.; Balaraj, B.M.; Rao, K.S.J.; Sathyanarayana Rao, T.S. New evidence on Iron, Copper accumulation and Zinc depletion and its correlation with DNA integrity in aging human brain regions. *Indian J. Psychiatry* 2010, 52, 104–144.
159. Vanacore, R.; Eskew, J.D.; Sung, L.; Davis, T.; Smith, A. Safe Coordinated Trafficking of Heme and Iron With Copper Maintain Cell Homeostasis: Modules From the Hemopexin System. *Biometals* 2019, 32, 355–367. [CrossRef]
160. McCann, C.J.; Jayakanthan, S.; Siotto, M.; Yang, N.; Osipova, M.; Squitti, R.; Lutsenko, S. Single nucleotide polymorphisms in the human ATP7B gene modify the properties of the ATP7B protein. *Metallomics* 2019, 11, 1128–1139. [CrossRef] [PubMed]
161. La Torre, A.; Iovino, V.; Caradonia, F. Copper in plant protection: Current situation and prospects. *Phytopathol. Mediterr.* 2018, 57, 201–236.
162. Pertot, I.; Bilali, H.E.; Simeone, V.; Vecchione, A.; Zulini, L. Efficacy evaluation and phytotoxicity assessment of traditional and new copper compounds used in copper reduction strategies in organic viticulture in northern and southern Italy environments. *Integr. Prot. Vitic. IOBC/wprs Bull.* 2006, 29, 61–65.
163. Smith J. et al. SRUC. Available online: <http://www.sruc.ac.uk/downloads/file/2022/278-284> (acesso em 24 de março de 2020).
164. Torre, A.L.; Righi, L.; Iovino, V.; Battaglia, V. Control of late blight in organic farming with low copper dosages or natural products as alternatives to copper. *Eur. J. Plant Pathol.* 2019, 155, 769–778. [CrossRef]
165. Moonen, A.C.; Bàrberi, P. Functional biodiversity: An agroecosystem approach. *Agric. Ecosyst. Environ.* 2008, 127, 7–21. [CrossRef]
166. Bankina, B.; Bimsteine, G.; Paulovska, L.; Paura, L.; Pavlovica, O.; Kaneps, J.; Neusa-Luca, I.; Roga, A.; Fridmanis, D. Effects of soil tillage and crop rotation on the development of wheat stem base diseases. *Can. J. Plant Pathol.* 2019, 41, 435–442. [CrossRef]
167. Runno-Paurson, E.; Laaniste, P.; Eremeev, V.; Tahtjarv, T.; Kaurilind, E.; Tosens, T.; Niinemets, U.; Williams, I.H. Does winter oilseed rape as a winter cover crop influence potato late blight development in an organic crop rotation? *Biol. Agric. Hortic.* 2019, 36, 71–83. [CrossRef]
168. Page, K.; Dang, Y.; Dalal, R. Impacts of conservation tillage on soil quality, including soil-borne crop diseases, with a focus on semi-arid grain cropping systems. *Australas. Plant Pathol.* 2013, 42, 363–377. [CrossRef]

169. Lage, D.A.C.; Marouelli, W.A.; Cafe, A.C. Management of powdery mildew and behaviour of late blight under different irrigation configurations in organic tomato. *Crop Prot.* 2019, 125, 104886. [CrossRef]
170. Merwin, I.A.; Wilcox, W.F.; Stiles, W.C. Influence of orchard ground cover management on the development of *Phytophthora* crown and root rots of apple. *Plant Dis.* 1992, 76, 199–205. [CrossRef]
171. Vukicevich, E.; Lowery, D.T.; Urbez-Torres, J.R.; Bowen, P.; Hart, M. Groundcover management changes grapevine root fungal communities and plant-soil feedback. *Plant Soil* 2018, 424, 419–433. [CrossRef]
172. Holb, I.J. Effect of pruning on apple scab in organic apple production. *Plant Dis.* 2005, 89, 611–618. [CrossRef] [PubMed]
173. Commission Implementing Regulation (EU) 2015/232 of 13 February 2015. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R0232efrom=EN> (accessed on 24 April 2020).
174. Farming without plant protection products Can we grow without using herbicides, fungicides and insecticides? Available online: [http://www.europarl.europa.eu/cmsdata/185760/EPRS\\_IDA\(2019\)634416\\_EN.df](http://www.europarl.europa.eu/cmsdata/185760/EPRS_IDA(2019)634416_EN.df) (accessed on 24 April 2020).
175. Bianchi, V.E. Impact of Testosterone on Alzheimer’s Disease. *World J. Mens Health* 2022, 40, 243–256. [CrossRef]
176. Ingenbleek, Y. Implications of protein malnutrition and inflammatory disorders in the pathophysiology of Alzheimer’s disease. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2020, 29, 450–461. [CrossRef]
177. Li, S.; Sun, W.; Zhang, D. Association of Zinc, Iron, Copper, and Selenium Intakes with Low Cognitive Performance in Older Adults: A Cross-Sectional Study from National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *J. Alzheimers Dis.* 2019, 72, 1145–1157. [CrossRef]
178. Gouaref, I.; Bellahsene, Z.; Zekri, S.; Alamir, B.; Koceir, E.A. The link between trace elements and metabolic syndrome/oxidative stress in essential hypertension with or without type 2 diabetes. *Ann. Biol. Clin.* 2016, 74, 233–243. [CrossRef]
179. Squitti, R.; Mendez, A.J.; Simonelli, I.; Ricordi, C. Diabetes and Alzheimer’s Disease: Can Elevated Free Copper Predict the Risk of the Disease? *J. Alzheimers Dis.* 2017, 56, 1055–1064. [CrossRef]
180. Zhou, H.H.; Lu, F.; Chen, S.D.; Zhou, Z.H.; Han, Y.Z.; Hu, J.Y. Effect of electroacupuncture on serum copper, zinc, calcium and magnesium levels in the depression rats. *J. Tradit. Chin. Med.* 2011, 31, 112–114. [CrossRef]
181. Salustri, C.; Squitti, R.; Zappasodi, F.; Ventriglia, M.; Bevacqua, M.G.; Fontana, M.; Tecchio, F. Oxidative stress and brain glutamate-mediated excitability in depressed patients. *J. Affect. Disord.* 2010, 127, 321–325. [CrossRef]
182. Ni, M.; You, Y.; Chen, J.; Zhang, L. Copper in depressive disorder: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Psychiatry Res.* 2018, 267, 506–515. [CrossRef]

183. Xu, J.; He, K.; Zhang, K.; Yang, C.; Nie, L.; Dan, D.; Liu, J.; Zhang, C.; Yang, X. Low-Dose Copper Exposure Exacerbates Depression-Like Behavior in ApoE4 Transgenic Mice. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2021, *25*, 6634181. [CrossRef]
184. Khosravi, M.; Sotoudeh, G.; Amini, M.; Raisi, F.; Mansoori, A.; Hosseinzadeh, M. The relationship between dietary patterns and depression mediated by serum levels of Folate and vitamin B12. *Psychiatry* 2020, *20*, 63. [CrossRef]
185. Bhatia, P.; Singh, N. Homocysteine excess: Delineating the possible mechanism of neurotoxicity and depression. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2015, *29*, 522–528. [CrossRef]
186. Namekawa, Y.; Baba, H.; Maeshima, H.; Nakano, Y.; Satomur, E.; Takebayashi, N.; Nomoto, H.; Suzuki, T.; Arai, H. Heterogeneity of elderly depression: Increased risk of Alzheimer's disease and A $\beta$  protein metabolism. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2013, *43*, 203–208. [CrossRef]
187. Hu L.; Li, P.; You, Z.; Zhang, Z.; Jin, H.; Huang, L. Effects of cellular prion protein on rapid eye movement sleep deprivation-induced spatial memory impairment. *J IntegrNeurosci.* 2019 Dec 30;18(4):439-444. [https://doi: 10.31083/j.jin.2019.04.1163](https://doi.org/10.31083/j.jin.2019.04.1163).
188. Squitti, R.; Siotto, M.; Polimanti, R. Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 35, 2014 S40eS50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.031>.
189. Sandouk, Z.; Lansang, M. C. Diabetes with obesity—Is there an ideal diet? *Cleveland Clinic Journal of Medicine* Volume 84 • Supplement 1 July 2017. doi:10.3949/ccjm.84.s1.02.
190. Sesso, H. D.; Buring, J. E.; Chown, M. J. Ridker, P. M.; Gaziano, J. M. A Prospective Study of Plasma Lipid Levels and Hypertension in Women. *Arch Intern Med.* 2005;165:2420-2427. doi:10.1001/archinte.165.20.2420.
191. Roe, A. J.; Zhang, S. Bhadelia, R. A.; Johnson, E. J.; Lichtenstein, A. H.; Rogers, G. T.; Rosenberg, I. H.; Smith, C. E.; Zeisel, S. H.; Scott, T. M. Choline and its metabolites are differently associated with cardiometabolic risk factors, history of cardiovascular disease, and MRI-documented cerebrovascular disease in older adults. *Am J Clin Nutr* 2017;105:1283–90. doi: 10.3945/ajcn.116.137158.
192. Cohen, L. E.; Wurtman, R. J. Brain acetylcholine: control by dietary choline. *Science* 13 Feb 1976: Vol. 191, Issue 4227, pp. 561-562. DOI: 10.1126/science.1251187.
193. Rasch, B. H.; Born, J.; Gais, S. Combined Blockade of Cholinergic Receptors Shifts the Brain from Stimulus Encoding to Memory Consolidation. *Journal of Cognitive Neuroscience.* 2006. 18:5, pp. 793–802.
194. Varela-Moreiras, G.; Ragel, C.; Miguelsanz, P. Choline deficiency and methotrexate treatment induces marked but reversible changes in hepatic folate concentrations, serum homocysteine and DNA methylation rates in rats. *Journal of the American College of Nutrition*, 2013. 14:5, 480-485. <https://doi.org/10.1080/07315724.1995.10718539>.
195. Hooshmand, B.; Refsum, H.; Smith, D.; Kalpouzos, G.; Mangialasche, F.; von Armin, C. A. F.; Kåreholt, I.; Kivipelto, M.; Fratiglioni, L.; Association of Methionine to Homocysteine Status With Brain Magnetic Resonance Imaging Measures and Risk of Dementia. *JAMA Psychiatry* Published online July 24, 2019. doi:10.1001/jamapsychiatry.2019.1694.

196. Hooshmand, B.; Polvikoski, T.; Kivipelto, M.; Tanskanen, M.; Myllykangas, L.; Erkinjuntti, T.; Mäkelä, M.; Oinas, M.; Paetau, A.; Scheltens, P. Plasma homocysteine, Alzheimer and cerebrovascular pathology: a population-based autopsy study. *Brain*, Volume 136, Issue 9, September 2013, Pages 2707–2716, <https://doi.org/10.1093/brain/awt206>.
197. Montecinos-Oliva, C.; Arrázola, M. S.; Jara, C.; Tapia-Rojas, C.; Inestrosa, N. C. Hormetic-Like Effects of L-Homocysteine on Synaptic Structure, Function, and A $\beta$  Aggregation. *Pharmaceuticals* 2020, 13, 24; doi:10.3390/ph13020024.
198. Pietrzik, K.; Brönstrup, A. Vitamins B12, B6 and folate as determinants of homocysteine concentration in the healthy population. *Eur J Pediatr* (1998) 157 [Suppl 2]: S135–S138.
199. Zhang, X.; Wang, Y.; Zhao, R.; Hu, X.; Zhang, B.; Lv, X.; Guo, Z.; Zhang, Z.; Yuan, J.; Chu, X.; Wang, F.; Li, G.; Geng, X.; Liu, Y.; Sui, L.; Wang, F. Folic Acid Supplementation Suppresses Sleep Deprivation Induced Telomere Dysfunction and Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP). *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 4569614. Published online 2019 Dec 14. doi: 10.1155/2019/4569614. PMID: 31949878.
200. Hita-Yañez, E.; Atienza, M.; Gil-Neciga, E.; Cantero, J. L. Disturbed sleep patterns in elders with mild cognitive impairment: the role of memory decline and ApoE  $\epsilon$ 4 genotype. *Curr Alzheimer Res.* 2012 Mar;9(3):290-7. doi: 10.2174/156720512800107609.
201. Prince, M.; Ali, G.; Guerchet, M.; Prina, A. M.; Albanese, E.; Wu, Y. Recent global trends in the prevalence and incidence of dementia, and survival with Dementia. *Alzheimer's Research e Therapy* (2016) 8:23 DOI 10.1186/s13195-016-0188-8.
202. Tremblay, C.; François, A.; Delay, C.; Freland, L.; Vandal, M.; Bennett, D. A.; Calon, F. Association of Neuropathological Markers in the Parietal Cortex With Antemortem Cognitive Function in Persons With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* Vol. 76, No. 2, February 2017, pp. 70–88. doi: 10.1093/jnen/nlw109.
203. Solis Jr, E.; Hascup, K. N.; Hascup, E. R. Alzheimer's Disease: The Link Between Amyloid- $\beta$  and Neurovascular Dysfunction. *J Alzheimers Dis.* 2020; 76(4): 1179–1198. doi:10.3233/JAD-200473.
204. Xu, H.; Wang, Z.; Zhu, L.; Sui, Z.; Bi, W.; Liu, R.; Bi, K.; Li, Q. Targeted Neurotransmitters Profiling Identifies Metabolic Signatures in Rat Brain by LC-MS/MS: Application in Insomnia, Depression and Alzheimer's Disease. *Molecules* 2018, 23, 2375; doi:10.3390/molecules23092375.
205. Tapia-Rojas, C.; Lindsay, C. B.; Montecinos-Oliva, C.; Arrazola, M. S.; Retamales, R. M.; Bunout, D.; Hirsch, S.; Inestrosa, N. C. Is L-methionine a trigger factor for Alzheimer's-like neurodegeneration?: Changes in A $\beta$  oligomers, tau phosphorylation, synaptic proteins, Wnt signaling and behavioral impairment in wild-type mice. *Mol Neurodegener* 2015 Nov 21;10:62. doi: 10.1186/s13024-015-0057-0.
206. Squitti, R.; Faller, P.; Hureau, C.; Granzotto, A.; White, A.R.; Kepp, K.P. Copper Imbalance in Alzheimer's Disease and Its Link with the Amyloid Hypothesis: Towards a Combined Clinical, Chemical, and Genetic Etiology. *J. Alzheimers Dis.* 2021, 83, 23–41. [CrossRef]

207. Di Donato, M.; Sarkar, B. Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1360, 3–16. [CrossRef]
208. Flores, C.R.; Puga, M.P.; Wrobel, K.; Sevilla, M.E.G.; Wrobel, K. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: Possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2011, 91, 333–341. [CrossRef]
209. Vasudevaraju, P.; Bharathi; Jyothsna, T.; Shamasundar, N.M.; Rao, K.S.; Balaraj, B.M.; Rao, K.S.J.; Sathyanarayana, R.T.S. New evidence on iron, copper accumulation and zinc depletion and its correlation with DNA integrity in aging human brain regions. *Indian J. Psychiatry* 2010, 52, 140–144. [CrossRef]
210. Squitti, R.; Ventriglia, M.; Simonelli, I.; Bonvicini, C.; Costa, A.; Perini, G.; Binetti, G.; Benussi, L.; Ghidoni, R.; Koch, G.; et al. Copper Imbalance in Alzheimer's Disease: Meta-Analysis of Serum, Plasma, and Brain Specimens, and Replication Study Evaluating ATP7B Gene Variants. *Biomolecules* 2021, 11, 960. [CrossRef]
211. Kaler SG. ATP7A-related copper transport diseases-emerging concepts and future trends. *Nat Rev Neurol* 2011; 7: 15-29.
212. Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY and Dmitriev OY. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev* 2007; 87: 1011-1046.
213. Sudhakar, V.; Das, A.; Horimatsu, T.; Ash, D.; Leanhart, S.; Antipova, O.; Vogt, S.; Singla, B.; Csanyi, G.; White, J.; Kaplan, J. H.; Fulton, D.; Weintraub, N. L.; Kim, H. W.; Ushio-Fukai, M.; Fukui, T. Copper Transporter ATP7A Limits Vascular Inflammation and Aortic Aneurysm Development: Role of miR-125b. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 November; 39(11): 2320–2337. doi:10.1161/ATVBAHA.119.313374
214. Squitti, R.; Siotto, M.; Arciello, M.; Rossi, L. Non-ceruloplasmin bound copper and ATP7B gene variants in Alzheimer's disease. *Metallomics* 2016, 8, 863–873. [CrossRef]
215. Sparks, D. L. Cholesterol and accumulation of thioflavine s-reactive Alzheimer's-live amyloid b in rabbit brain. *J. Mol. Neurosci* 2004, 24:97-104. ISSN0895-8696.
216. Hsu, H.; Rodriguez-Ortiz, C.J.; Lam Lim, S.; Zumkehr, J.; Kilian, J.G.; Vidal, J.; Kitazawa, M. Copper-Induced Upregulation of MicroRNAs Directs the Suppression of Endothelial LRP1 in Alzheimer's Disease Model. *Toxicol. Sci.* 2019, 170, 144–156. [CrossRef]
217. Hsu, H.-W.; Stephen, C.B.; Masashi, K. Environmental and Dietary Exposure to Copper and Its Cellular Mechanisms Linking to Alzheimer's Disease. *Toxicol. Sci.* 2018, 163, 338–345. [CrossRef]
218. Pérez-Aguilar, F.; Burguera, J.A.; Benlloch, S.; Berenguer, M.; Rayón, J.M. Aceruloplasminemia in an asymptomatic patient with a new mutation. *Diagn. Fam. Genet. Anal.* 2005, 42, 947–949. [CrossRef]
219. Bagheri, S.; Squitti, R.; Haertlé, T.; Siotto, M.C.; Saboury, A.A. Role of Copper in the Onset of Alzheimer's Disease Compared to Other Metals. *Front. Aging Neurosci.* 2018, 9, 446. [CrossRef]

220. Zhao, J.; Shi, Q.; Tian, H.; Li, Y.; Liu, Y.; Xu, Z.; Robert, A.; Liu, Q.; Meunier, B. TDMQ20, a Specific Copper Chelator, Reduces Memory Impairments in Alzheimer's Disease Rato Models. *ACS Chem. Neurosci.* 2021, 12, 140–149. [CrossRef]
221. Olthof, M. R.; Brink, E. J.; Katan, M. B.; Verhoef, P. Choline supplemented as phosphatidylcholine decreases fasting and postmethionine-loading plasma homocysteine concentrations in healthy men. *Am J Clin Nutr* 2005;82:111. DOI: 10.1093/ajcn.82.1.111.
222. Bourke, C. A. Astrocyte dysfunction following molybdenum-associated purine loading could initiate Parkinson's disease with dementia. *npj Parkinson's Disease* (2018) 7: 1-4.
223. Varadarajan, S.; Yatin, S.; Kanski, J.; Jahanshahi, F.; Butterfield, D.A. Methionine residue 35 is important in amyloid b peptide associated free radical oxidative stress. *Brain Res. Bull.* 1999, 50, 133–141. [CrossRef]
224. Weng, W.; Huang, W.; Tang, H.; Cheng, M.; Chen, K. The Differences of Serum Metabolites between Patients with Early-Stage Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *Front. Neurol.* 2019, 10, 1223. [CrossRef]
225. Kruman, I.I.; Kumaravel, T.S.; Lohani, A.; Pedersen, W.A.; Cutler, R.G.; Kruman, Y.; Haughey, N.; Lee, J.; Evans, M.; Mattson, M.P. Folic Acid Deficiency and Homocysteine Impair DNA Repair in Hippocampal Neurons and Sensitize Them to Amyloid Toxicity in Experimental Models of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 2002, 22, 1752–1762. [CrossRef]
226. Leermakers, E.T.M.; Moreira, E.M.; Kiefte-de Jong, J.C.; Darweesh, S.K.L.; Visser, T.; Voortman, T.; Bautista, P.K.; Chowdhury, R.; Gorman, D.; Bramer, W.M.; et al. Effects of choline on health across the life course: A systematic review. *Nutr. Rev.* 2015, 73, 500–522. [CrossRef] [PubMed]
227. Moss, M.; Waring, R.H. The Plasma Cysteine/Sulphate Ratio: A Possible Clinical Biomarker. *J. Nutr. Environ. Med.* 2003, 13, 215–229. [CrossRef]
228. Luo, Y.; Zhang, L.; Liu, W.; Yu, Y.; Tian, Y. A Single Biosensor for Evaluating the Levels of Copper Ion and L-Cysteine in a Live Rat Brain with Alzheimer's Disease. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2015, 54, 14053–14056. [CrossRef] [PubMed]
229. Mandal, P.K.; Saharan, S.; Tripathi, M.; Murari, G. Brain Glutathione Levels—A Novel Biomarker for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Biol. Psychiatry* 2015, 79, 71. [CrossRef]
230. Quadri, P.; Fragiaco, C.; Pezzati, R.; Zanda, E.; Forloni, G.; Tettamanti, M.; Lucca, U. Homocysteine, folate, and vitamin B-12 in mild cognitive impairment, Alzheimer disease, and vascular dementia. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80, 114–122. [CrossRef]
231. Babiloni, C.; Bosco, P.; Ghidoni, R.; Del Percio, C.; Squitti, R.; Binetti, G.; Benussi, L.; Ferri, R.; Frisoni, G.; Lanuzza, B.; et al. Homocysteine and electroencephalographic rhythms in Alzheimer disease: A multicentric study. *Neuroscience* 2007, 145, 942–954. [CrossRef]
232. Gorgone, G.; Ursini, F.; Altamura, C.; Bressi, F.; Tombini, M.; Curcio, G.; Chioven- da, P.; Squitti, R.; Silvestrini, M.; Ientile, R.; et al. Hyperhomocysteinemia, intima-media thickness and C677T MTHFR gene polymorphism: A correlation study in patients with cognitive impairment. *Atherosclerosis* 2009, 206, 309–313. [CrossRef]

233. Ma, F.; Wu, T.; Zhao, J.; Ji, L.; Song, A.; Zhang, M.; Huang, G. Plasma Homocysteine and Serum Folate and Vitamin B12 Levels in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Case-Control Study. *Nutrients* 2017, 9, 725. [CrossRef]
234. Irizarry, M.C.; Gurol, M.E.; Raju, S.; Diaz-Arrastia, R.; Locascio, J.J.; Tennis, M.; Hyman, B.T.; Growdon, J.H.; Greenberg, S.M.; Bottiglieri, T. Association of homocysteine with plasma amyloid protein in aging and neurodegenerative disease. *Neurology* 2005, 65, 1402–1408. [CrossRef]
235. Tinelli, C.; Di Pino, A.; Ficulle, E.; Marcelli, S.; Feligioni, M. Hyperhomocysteinemia as a Risk Factor and Potential Nutraceutical Target for Certain Pathologies. *Front. Nutr.* 2019, 6, 49. [CrossRef] [PubMed]
236. Robinson, N.; Grabowski, P.; Rehman, I. Alzheimer's disease pathogenesis: Is there a role for folate? *Mech. Ageing Dev.* 2018, 174, 86–94. [CrossRef] [PubMed]
237. Mellott, T.J.; Huleatt, O.M.; Shade, B.N.; Pender, S.M.; Liu, Y.B.; Slack, B.E.; Blusztajn, J.K. Perinatal Choline Supplementation Reduces Amyloidosis and Increases Choline Acetyltransferase Expression in the Hippocampus of the APPswePS1dE9 Alzheimer's Disease Model Mice. *PLoS ONE* 2017, 12, e0170450. [CrossRef]
238. Wilde, M.C.; Vellas, B.; Giraulta, E.; Yavuza, A.C.; Sijbena, J.W. Lower brain and blood nutrient status in Alzheimer's disease: Results from meta-analyses. *Alzheimers Dement.* 2017, 3, 416–431. [CrossRef]
239. Caballero, F.; Fernandez, A.; Matias, N.; Martínez, L.; Fucho, R.; Elena, M.; Caballero, J.; Morales, A.; Fernández-Checa, J.C.; García-Ruiz, C. Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: Impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 18528–18536. [CrossRef]
240. Moraes, F. S.; Souza, M. L. C.; Lucchetti, G.; Lamas, A.; Lucchetti, G. Trends and disparities in the use of cholinesterase inhibitors to treat Alzheimer's disease dispensed by the Brazilian public health system – 2008 to 2014: a nation-wide analysis. *Arq Neuropsiquiatr* 2018; 76 (7): 444-451. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20180064>.
241. Sharma, K. Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review). *Molecular Medicine REPORTS* 20: 1479-1487, 2019. <https://doi:10.3892/mmr.2019.10374>.
242. Velazquez, R.; Ferreira, E.; Winslow, W.; Dave, N.; Piras, I. S.; Naymik, M.; Huentelman, M.; Tran A.; Caccamo, A.; Oddo, S. Maternal choline supplementation ameliorates Alzheimer's disease pathology by reducing brain homocysteine levels across multiple generations. *Mol Psychiatry*. 2020 October ; 25(10): 2620–2629. <https://doi:10.1038/s41380-018-0322-z>.
243. Seshadri, S.; Beiser, A.; Selhub, J.; Jacques, P. F.; Rosenberg, I. H.; D'agostino, R. B.; Wilson, P. W.F.; Wolf, P. A. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, Vol. 346, No. 7 February 14, 2002 [www.nejm.org](http://www.nejm.org).
244. McCaddon, A.; Hudson, P.; Hill, D.; Lloyd, A.; Davies, G.; Regland, B. Alzheimer's disease and total plasma aminothiols. *Biol Psychiatry* 2003;53:254–260. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(02\)01451-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(02)01451-8).

245. Berry, T.; Abohamza, E.; Moustafa, A.A. A disease-modifying treatment for Alzheimer's disease: Focus on the trans-sulfuration pathway. *Rev. Neurosci.* 2020, 31, 319–334. [CrossRef]
246. Novotny, J.A. Molybdenum Nutrition in Humans. *J. Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2011, 16, 164–168. [CrossRef]
247. Rajagopalan, K.V. Molybdenum: An essential trace element in human nutrition. *Ann. Rev. Nutr.* 1988, 8, 401–427. [CrossRef]
248. Coelho, F.C.; Vieira, C.; Mosquim, P.R.; Cassini, S.T.A. Nitrogênio e molibdênio nas culturas do milho e do feijão em monocultivos e em consórcios: Efeitos sobre o feijão. *Rev. Ceres* 1998, 45, 393–407.
249. Einsle, O.; Rees, D. C. Structural Enzymology of Nitrogenase Enzymes. *Chem. Rev.* 2020, 120, 4969–5004. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00067.
250. Khadanand, K.; Kirk, M.L. Mo and W Cofactors and the Reactions they Catalyze. *Met. Ions Life Sci.* 2020, 23, 20. [CrossRef]
251. Schwarz, G.; Mendel, R.R. Molybdenum co-factor biosynthesis and molybdenum enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006, 57, 623–647. [CrossRef]
252. Magalon, A.; Mendel, R.R. Biosynthesis and Insertion of the Molybdenum Cofactor. *EcoSal. Plus* 2015, 0006-2013. DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2013.
253. Hille, R.; Nishino, T.; Bittner, F. Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coord. Chem. Rev.* 2011, 255, 1179–1205. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.11.034.
254. Institute of Medicine—US. Panel on Micronutrients. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc; National Academy Press: Washington, DC, USA, 2002; 773p.
255. Scientific Committee on Food, European Commission. Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Molybdenum; SCF/SC/NUT/UPPERLEV/22; Scientific Committee on Food, European Commission: Brussels, Belgium, 2000; pp. 1–15. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 7935 16 of 18
256. Baj, J.; Forma, A.; Sitarz, E.; Karakula, K.; Flieger, W.; Sitarz, M.; Grochowski, C.; Maciejewski, R.; Karakula-Juchnowicz, H. Beyond the Mind-Serum Trace Element Levels in Schizophrenic Patients: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 9566. [CrossRef]
257. Giussani, A.; Arogunjo, A.M.; Claire Cantone, M.; Tavola, F.; Veronese, I. Rates of intestinal absorption of molybdenum in humans. *Appl. Radiat. Isot.* 2006, 64, 639–644. [CrossRef]
258. Paglia, G.; Miedico, O.; Cristofano, A.; Vitale, M.; Angiolillo, A.; Chiaravalle, A.E.; Corso, G.; Costanzo, A.D. Distinctive Pattern of Serum Elements during the Progression of Alzheimer's. *Dis. Sci. Rep.* 2016, 9, 22769. [CrossRef]

259. Johnson, L.E. Molybdenum Deficiency. Merck Manual Professional Version. Available online: <https://www.merckmanuals.com/professional/nutritional-disorders/mineral-deficiency-and-toxicity/molybdenum-deficiency#> (acesso em 20 novembro 2021).
260. Hille, R. Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch. Biochem. Biophys.* 2005, 433, 107–116. [CrossRef]
261. Harrison, R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radic. Biol. Med.* 2002, 33, 774–797. [CrossRef]
262. Ardan, T.; Kovaceva, J.; Cejková, J. Comparative histochemical and immunohistochemical study on xanthine oxidoreduc tase/xanthine oxidase in mammalian corneal epithelium. *Acta Histochem.* 2004, 106, 69–75. [CrossRef]
263. Nishino, T.; Okamoto, K.; Eger, B.T.; Pai, E.F.; Nishino, T. Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS J.* 2008, 275, 3278–3289. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06489.x.
264. Ishikita, H.; Eger, B.T.; Okamoto, K.; Nishino, T.; Pai, E.F. Protein Conformational Gating of Enzymatic Activity in Xanthine Oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 999–1009. DOI: 10.1021/ja207173p.
265. Nishino, T.; Okamoto, K.; Kawaguchi, Y.; Matsumura, T.; Eger, B.T.; Pai, E.F.; Nishino, T. The C-terminal peptide plays a role in the formation of an intermediate form during the transition between xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase. *FEBS J.* 2015, 282, 3075–3090. DOI: 10.1111/febs.13277.
266. Sebesta, I.; Stiburkova, B.; Krijt, J. Hereditary xanthinuria is not so rare disorder of purine metabolism. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2018, 37, 324–328. [CrossRef]
267. Tan, W.; Eichler, F.S.; Hoda, S.; Lee, M.S.; Baris, H.; Hanley, C.A.P.; Grant, E.; Krishnamoorthy, K.S.; Shih, V.E. Isolated Sulfite Oxidase Deficiency: A Case Report with a Novel Mutation and Review of the Literature. *Pediatrics* 2005, 116, 757. [CrossRef]
268. Alonso-Andrés, P.; Albasanz, J.L.; Ferrer, I.; Martín, M. Purine-related metabolites and their converting enzymes are altered in frontal, parietal and temporal cortex at early stages of Alzheimer’s disease pathology. *Brain Pathol.* 2018, 28, 933–946. [CrossRef]
269. Du, N.; Xu, D.; Hou, X.; Song, X.; Liu, C.; Chen, Y.; Wang, Y.; Li, X. Inverse Association between Serum Uric Acid Levels and Alzheimer’s Disease Risk. *Mol. Neurobiol.* 2016, 53, 2594–2599. [CrossRef]
270. Tana, C.; Ticinesi, A.; Prati, B.; Nouvenne, A.; Meschi, T. Uric Acid and Cognitive Function in Older Individuals. *Nutrients* 2018, 10, 975. [CrossRef]
271. Latourte, A.; Bardin, T.; Richette, P. Uric acid and cognitive decline: A double-edged sword? *Curr. Opin. Rheumatol.* 2018, 30, 183–187. [CrossRef]
272. Griffith, O.W. Mammalian sulfur amino acid metabolism: An overview. *Methods Enzymol.* 1987, 143, 366–376. [CrossRef]

273. Kisker, C.; Schindelin, H.; Pacheco, A.; Wehbi, W.A.; Garrett, R.M.; Rajagopalan, K.V.; Enemark, J.H.; Rees, D.C. Molecular Basis of Sulfite Oxidase Deficiency from the Structure of Sulfite Oxidase. *Cell*, 1997, 91, 973-983. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80488-2.
274. Cohen, H.J.; Betcher-Lange, S.; Kessler, D.L.; Rajagopalan, K.V. Hepatic Sulfite Oxidase: congruency in mitochondria of prosthetic groups and activity. *J. Biol. Chem.* 1972, 247, 7759-7766. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)44588-2.
275. Kuper, J.; Llamas, A.; Hecht, H.; Mendel, R.R.; Schwarz, G. Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* 2004, 430, 803–806. [CrossRef] [PubMed]
276. Alonzo-Martínez, M.C.; Cazorla, E.; Cánovas, E.; Anniuk, K.; Cores, A.E.; Serrano, A.M. Molybdenum Cofactor Deficiency: Mega Cisterna Magna in Two Consecutive Pregnancies and Review of the Literature. *Appl. Clin. Genet.* 2020, 13, 49–55. [Cross-Ref] [PubMed]
277. Misko, A.L.; Liang, Y.; Kohl, J.B.; Eichler, F. Delineating the phenotypic spectrum of sulfite oxidase and molybdenum co-factor deficiency. *Neurol. Genet.* 2020, 6, e486. [CrossRef] [PubMed]
278. Vijayakumar, K.; Gunny, R.; Grunewald, S.; Carr, L.; Chong, K.W.; DeVile, C.; Robinson, R.; McSweeney, N.; Prabhakar, P. Clinical Neuroimaging Features and Outcome in Molybdenum Cofactor Deficiency. *Pediatr. Neurol.* 2001, 45, 246-252. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2011.06.006.
279. Johnson, J.L. Prenatal diagnosis of molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency. *Prenat. Diagn.* 2003, 23, 6-8. DOI: 10.1002/pd.505.
280. Sass, J.O.; Gunduz, A.; Funayama, C.A.R.; Korkmaz, B.; Pinto, K.G.D.; Tuysuz, B.; Santos, L.Y.; Taskiran, E.; Turcato, M-F.; Lam, C.W.; Reiss, J.; Walter, M.; Yalcinkaya, C.; Camelo, J.S. Functional deficiencies of sulfite oxidase: Differential diagnoses in neonates presenting with intractable seizures and cystic encephalomalacia. *Brain Dev.* 2010, 32, 544-549. DOI: 10.1016/j.braindev.2009.09.005.
281. Carmi-Nawi, N.; Malinger, G.; Mandel, H.; Ichida, K.; Lerman-Sagie, T.; Lev, D. Prenatal brain disruption in molybdenum cofactor deficiency. *J. Child Neurol.* 2011, 26, 460-464. DOI: 10.1177/0883073810383017.
282. Paul, B.D.; Snyder, S.H. H<sub>2</sub>S: A Novel Gasotransmitter that Signals by Sulfhydrylation. *Trends Biochem. Sci.* 2015, 40, 687-700. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.08.007.
283. Mellis, A.; Misko, A.L.; Arjune, S.; Liang, Y.; Erdélyi, K.; Ditrói, T.; Kaczmarek, A.T.; Nagy, P.; Schwarz, G. The role of glutamate oxaloacetate transaminases in sulfite biosynthesis and H<sub>2</sub>S metabolism. *Redox Biol.* 2021, 38, 101800. [CrossRef]
284. Abe, K.; Kimura, H. The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Neuromodulator. *J. Neurosci.* 1996, 16, 1066–1071. [CrossRef]
285. Eto, K.; Asada, T.; Arima, K.; Makifuchi, T.; Kimura, H. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 293, 1485–1488. [CrossRef]

286. Bosetti, F.; Brizzi, F.; Barogi, S.; Mancuso, M.; Siciliano, G.; Tendi, E.A.; Murri, L.; Rapoport, S.L.; Solaini, G. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2002, 23, 371–376. [CrossRef]
287. Maurer, I.; Zierz, S.; Möller, H. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol. Aging* 2000, 21, 455–462. [CrossRef]
288. Xia, Z.; Storm, D. Role of Circadian Rhythm and REM sleep for memory consolidation. *Neurosci. Res.* 2017, 118, 13–20. [CrossRef]
289. Yamamoto, M.; Gotz, M.E.; Ozawa, H.; Luckhaus, C.; Saito, T.; Rosler, M.; Riederer, P. Hippocampal level of neural specific adenylyl cyclase type I is decreased in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1535, 60–68. [CrossRef]
290. Kelly, M.P. Cyclic nucleotide signaling changes associated with normal aging and age-related diseases of the brain. *Cell. Signal.* 2018, 42, 281–291. [CrossRef]
291. Nonaka, N.; Banks, A.W.; Shioda, S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: Protective effects in stroke and dementia. *Peptides* 2020, 130, 17033. [CrossRef]
292. Abumrad, N.N.; Schneider, A.J.; Steel, D.; Rogers, L.S. Amino acid intolerance during prolonged total parenteral nutrition reversed by molybdate therapy. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981, 34, 2551–2559. [CrossRef]
293. Hajjar, I.; Liu, C.; Jones, D.P.; Uppal, K. Untargeted metabolomics reveal dysregulations in sugar, methionine, and tyrosine pathways in the prodromal state of DA. *Alzheimers Dement.* 2020, 12, e12064. [CrossRef]
294. Atwal, P.S.; Scaglia, F. Molybdenum co-factor deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 2016, 117, 1–4. [CrossRef] [PubMed]
295. Kong, L.; Zhou, X.; Shi, G.; Yu, Y. Molybdenum disulfide nanosheets based fluorescent “off-to-on” probe for targeted monitoring and inhibition of A $\beta$ 2 -amyloid oligomers. *Analyst* 2020, 145, 6369–6377. [CrossRef] [PubMed]
296. Manna, S.; Karmakar, P.; Kisan, B.; Mishra, M.; Barooah, N.; Bhasikuttan, A.C.; Mohant, J. Fibril-induced neurodegenerative disorders in an Ab-mutant *Drosophila* model: Therapeutic targeting using ammonium molybdate. *Chem. Commun.* 2021, 57, 8488. [CrossRef]
297. Kulwich, R.; Hansard, S.L.; Comar, C.L.; Davis, G.K. Copper, Molybdenum and Zinc Interrelationships in Rats and Swine. *Exp. Biol. Med.* 1953, 84, 2. [CrossRef]
298. Halverson, A.W.; Phifer, J.H.; Monty, K.J. A mechanism for the copper-molybdenum interrelationship. *J. Nutr.* 1960, 71, 95–100. [CrossRef] [PubMed]
299. Gray, L.F.; Daniel, L.J. Effect of the Copper Status of the Rat on the Copper-Molybdenum-Sulfate Interaction. *J. Nutr.* 1964, 84, 31–37. [CrossRef]
300. Suttle, N.F. Copper Imbalances in Ruminants and Humans: Unexpected Common Ground. *Adv. Nutr.* 2012, 3, 666–674. [CrossRef]

301. Grings, M.; Moura, A.P.; Amaral, A.U.; Parmeggiani, B.; Gasparotto, J.; Moreira, J.C.F.; Gelain, D.P.; Wyse, A.T.S.; Wajner, M.; Leipnitz, G. Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1842, 1413–1422. [CrossRef] [PubMed]
302. Dowdy, R.P.; Matrone, G. A Copper-Molybdenum Complex: Its effects and movement in the piglet and sheep. *J. Nutr.* 1968, 95, 197–201. [CrossRef]
303. Dowdy, R.P.; Kunz, G.A.; Sauberlich, H.E. Effect of a Copper-Molybdenum Compound upon Copper Metabolism in the Rat. *J. Nutr.* 1969, 99, 491–496. [CrossRef]
304. Arthur, D. Interrelationships of Molybdenum and Copper in the Diet of the Guinea Pig. *J. Nutr.* 1965, 87, 69–76. [CrossRef]
305. Kuper, J.; Llamas, A.; Hecht, H.; Mendel, R.R.; Schwarz, G. Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* 2004, 430, 803–806. [CrossRef] [PubMed]
306. Hadizadeh, M.; Keyhani, E.; Keyhani, J.; Khodadadi, C. Functional and structural alterations induced by copper in xanthine oxidase. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2009, 41, 603–617. [CrossRef] [PubMed]
307. Mendel, R.R.; Kruse, T. Cell biology of molybdenum in plants and humans. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.* 2012, 1823, 1568–1579. [CrossRef] [PubMed]
308. Suzuki, K.T.; Karasawa, A.; Yamanaka, K. Binding of copper to albumin and participation of cysteine in vivo and *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1989, 273, 572–577. [CrossRef]
309. Mahoney, J.P.; Sandberg, A.A.; Gubler, C.J.; Cartwright, G.E.; Wintrobe, M.M. Uric Acid Metabolism in Hepatolenticular Degeneration. *Exp. Biol. Med.* 1955, 88, 427–430. [CrossRef]
310. Seelig, M.S. Proposed role of copper—Molybdenum interaction in iron-deficiency and iron-storage diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 1973, 26, 657–672. [CrossRef] [PubMed]
311. Bar-Or, D.; Rael, L.; Thomas, G.; Kraus, J. Inhibitory Effect of Copper on Cystathionine  $\beta$ -Synthase Activity: Protective Effect of an Analog of the Human Albumin N-Terminus. *Protein Pept. Lett.* 2005, 12, 271–273. [CrossRef]
312. Lewis, R.C.; Meeker, J.D. Biomarkers of Exposure to Molybdenum and Other Metals in Relation to Testosterone among Men from NHANES 2011–2012. *Fertil. Steril.* 2015, 103, 172–178. [CrossRef]
313. Rosario, E.R.; Stanczyk, F.Z.; Pike, C.J. Age-Related Testosterone Depletion and the Development of Alzheimer Disease. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 2004, 292, 1431–1432. [CrossRef]
314. Smith, B.S.W.; Wright, H. Copper: Molybdenum interaction: Effect of dietary molybdenum on the binding of copper to plasma proteins in sheep. *J. Comp. Pathol.* 1975, 85, 299–305. [CrossRef]

315. Post, L.O.; Bailey, E.M., Jr.; Williams, S.; Applegate, C.; Jones, B.; Herrman, T.J. Risk Assessment of Copper and Molybdenum and Other Minerals in Feed Ingredients and Finished Feeds. *J. Regul. Sci.* 2019, 7, 1–9. [CrossRef]
316. Paul, B.D. Neuroprotective Roles of the Reverse Transsulfuration Pathway in Alzheimer’s Disease. *Front. Aging Neurosci.* 2021, 13, 659402. [CrossRef]
317. Nederbragt, H. The influence of molybdenum on the copper metabolism of the rat at different Cu levels of the diet. *Br J Nutr.* 1980 Mar;43(2):329-38. doi: 10.1079/bjn19800095. PMID: 7378340.
318. O’Neal-Moffitt, G.; Delic, V.; Bradshaw, P. C.; Olcese, J. Prophylactic melatonin significantly reduces Alzheimer’s neuropathology and associated cognitive deficits independent of antioxidant pathways in A $\beta$ PPswe/PS1 mice. *Mol Neurodegener.* 2015; 10: 27. Published online 2015 Jul 11. doi: 10.1186/s13024-015-0027-6. PMCID: PMC4702331 PMID: 26159703.
319. Xiyang, Y. B.; Liu, R.; Wang, X. Y.; Li, S.; Zhao, Y.; Lu, B. T.; Xiao, Z. C.; Zhang, L. F.; Wang, T. H.; Zhang, J. COX5A Plays a Vital Role in Memory Impairment Associated With Brain Aging via the BDNF/ERK1/2 Signaling Pathway. *Front Aging Neurosci.* 2020 Jul 10;12:215. doi: 10.3389/fnagi.2020.00215. eCollection 2020
320. Zhang, Z., Wang, J.; Zhu, Y.; Zhang, H.; Wang, H. Astragaloside IV alleviates myocardial damage induced by type 2 diabetes via improving energy metabolism. *Mol Med Rep.* 2019 Nov;20(5):4612-4622. doi: 10.3892/mmr.2019.10716.
321. Holper, L.; Ben-Shachar, D.; Mann, J. J. Multivariate meta-analyses of mitochondrial complex I and IV in major depressive disorder, bipolar disorder, schizophrenia, Alzheimer disease, and Parkinson disease. *Neuropsychopharmacology* (2019) 44:837–849; <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0090-0>.
322. Badgley, M.A.; Kremer, D.M.; Maurer, H.C.; DelGiorno, K.E.; Lee, H.; Purohit, V.; Sagalovskiy, I.R.; Ma, A.; Kapilian, J.; Firl, C.E.M.; et al. Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice. *Science* 2020, 368, 85–89. [CrossRef]
323. Novotny, J. A.; Turnlund, J. R. Molybdenum Intake Influences Molybdenum Kinetics in Men. *The Journal of Nutrition*, 137: 37–42, 2007.
324. Panneerselvam, S. R.; Govindasamy, S. Effect of sodium molybdate on the status of lipids, lipid peroxidation and antioxidant systems in alloxan-induced diabetic rats. *Clinica Chimica Acta* 345 (2004) 93 – 98. doi:10.1016/j.cccn.2004.03.005.
325. Lee, S.; Nam, K.; Seong, J. K.; Ryu, D. Y. Molybdate Attenuates Lipid Accumulation in the Livers of Mice Fed a Diet Deficient in Methionine and Choline. *Biol. Pharm. Bull.* 41, 1203–1210 (2018). <https://doi.org/10.1248/bpb.b18-00020>.
326. Antonelli, A.C.; Barrêto Júnior, R.A.; Mori, C.S.; Minervino, A.H.H.; Schalch, U.M.; Pacheco, J.C.G.; Ortolani, E.L.; Utilização de sal mineral rico em molibdênio na prevenção da intoxicação cúprica acumulativa em ovinos – microminerais hepáticos. [Use of molybdenum rich mineral mix in the prevention of cumulative copper poisoning in sheep – hepatic microminerals] *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, n.3, p.629-635, 2016. <https://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8738>.

327. Wei, H.; Frei, B.; Beckman, J. S.; Zhang, W. J. Copper chelation by tetrathiomolybdate inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in vivo *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H712–H720, 2011. doi:10.1152/ajpheart.01299.2010.
328. Cummings, J.; Ritter, A.; Zhong, K. Clinical Trials for Disease-Modifying Therapies in Alzheimer’s Disease: A Primer, Lessons Learned, and a Blueprint for the Future. *J. Alzheimers Dis.* 2018, 64, S3–S22. [CrossRef]
329. Liu, Z.; Yang, Z.; Gu, Y.; Liu, H.; Wang, P. The effectiveness of eye tracking in the diagnosis of cognitive disorders: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 2021, 16, e0254059. [CrossRef]
330. Cummings, J.L.; Morstorf, T.; Zhong, K. Alzheimer’s disease drug-development pipeline: Few candidates, frequent failures. *Alzheimers Res. Ther.* 2014, 6, 37. [CrossRef]
331. Yang, P.; Sun, F. Aducanumab: The first targeted Alzheimer’s therapy. *Drug Discov. Ther.* 2021, 15, 166–168. [CrossRef]
332. Cummings, J.; Aisen, P.; Apostolova, L.G.; Atri, A.; Salloway, S.; Weiner, M.J. Aducanumab: Appropriate Use Recommendations. *Prev. Alzheimers Dis.* 2021, 8, 398–410. [CrossRef]
333. Fillit, H.; Green, A. Aducanumab and the FDA—Where are we now? *Nat. Rev. Neurol.* 2021, 17, 129–130. [CrossRef] [PubMed]
334. Rabinovici, G.D. Controversy and Progress in Alzheimer’s Disease—FDA Approval of Aducanumab. *N. Engl. J. Med.* 2021, 385, 771–774. [CrossRef] [PubMed]
335. Baldari, S.; Di Rocco, G.; Toietta, G. Current Biomedical Use of Copper Chelation Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 1069. [CrossRef]
336. Pal, A.; Kumar, A.; Prasad, R. Predictive association of copper metabolism proteins with Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease: A preliminary perspective. *BioMetals* 2014, 27, 25–31. [CrossRef] [PubMed]
337. Tosato, M.; Marco, V.D. Metal Chelation Therapy and Parkinson’s Disease: A Critical Review on the Thermodynamics of Complex Formation between Relevant Metal Ions and Promising or Established Drugs. *Biomolecules* 2019, 9, 269. [CrossRef]
338. Huang, L.; Zhao, J.; Chen, Y.; Ma, F.; Huang, G.; Li, W. Baseline folic acid status affects the effectiveness of folic acid supplements in cognitively relevant outcomes in older adults: A systematic review. *Aging Ment. Health* 2021, 26, 457–463. [CrossRef]

A L Z H E I M E R A I T N E M E D R E M I E H Z L A  
L W C U M M I N G S H Y M A N B E Y R E U T H E R L  
Z I A L T E R N B H S U L P H A T E E J I M O 7 H Z  
H N G A D E N Y L Y L 7 E I M S A L O B 7 V O H A H  
E B U L G I R A S C O N S N A B H P M H A A E Y R E  
I L L D S E P U H Y D Z A O R E E O A T B N J P D I  
M A E E K A N K A C R U D M I T B L S O H T I E Y M  
E D 7 Y E N K E L L U M I A A A H U O M U O N R T E  
R P H D H D I A G A N U X L 7 H G R M A R N G T R R  
P E E E S I R E E S B H O B Y P O E A A I I U E O 7  
A R P O U Q O M A E 7 F E H E L M C N 7 C O O N J S  
R R A X L Y U E N I H T N A X U A O C O A B M S A E  
I Y R I P I C T B H O I I L U S S B H 7 C H A I N S  
T S A D H S B O T B E I H O S L I S U S I I 7 O O U  
E M N A I U H B O I D S T I O A T P 7 B D N D N W T  
R I S S T U Z E E P I U N B T F R A N C I S U A S R  
R T U E E Y J I N G E S A A E C A M P O S O L G K E  
E H L T S A N T O M A R X F I 7 E 7 C R A M P I I S  
V M F E A N N A B M O L Y B D E N U M B H N H N M I  
E O A B R A A O H F R A T T E L I T U T T I I G A M  
R R T A S H A Y K H U K H A P O L O A N E A T E S T  
T R E I K H O G S H R O L T R J O M M E N E E N L E  
E I 7 D I O L Y M A O M A C E O C A O M V N O I I S  
T S V I C O S A H O M O C Y S T E I N E E V X H A U  
U M P E N U A A N G E K I T S O S M S S L E I T H S  
R A U K U G U G A N T E M O I R U A T S H J D N B E  
7 S T A U O M A I I H K B C O E L K A I E E A A L I  
R T O U M A 7 E 7 R I S A H N G A A R L C C S X E R  
E E 7 L A O H U A D O A T R J D O H E L I I E O N E  
M R O M A T O M A L N Y R O O E H I N I M M B P N M  
I S Y A S L A N M A I I A M S S O K I E E E A Y O I  
E T 7 Y 7 L D L B H N S N E E 7 A I Y I N N B H W E  
H H C B I R A D H A E H I C P L A K E V T T K B L H  
Z A I N V E C C H I A M E N T O A N N A O O A H E Z  
L L S O I N I N E N S E L K O E S T E R N Y O U E L  
A L Z H E I M E R D E M E N T I A R E M I E H Z L A

# HUNTING WORDS