

Bases biológicas y patobiológicas humanas del metabolismo del cobre

*Omar Ramón Mejía, MD**

*Miguel Ruiz, MD***

*Dianney Clavijo Grimaldi, MD****

*Grégory Alfonso García M, MD*****

*Astrid Lorena Ruiz, MD******

*Ananías García Cardona, MD******

*Ciro Alfonso Casadiego, MD******

Resumen

El cobre es un nutriente dietario esencial para reacciones de transferencia electrónica, cuando es incorporado dentro de cuproenzimas que regulan diversos procesos tales como respiración mitocondrial, metabolismo de neurotransmisores y melaninas, homeostasis del hierro, protección antioxidante, amidación de glicinil-péptidos para biosíntesis de neuropéptidos, y formación de tejidos conectivos. Este artículo de revisión, elucidará las bases moleculares y celulares de la biología y la patobiología (enfermedades) humana de este metal.

Palabras clave: angiogénesis, ceruloplasmina, cobre, cutis laxa, demencia, enfermedad de Ehlers-Danlos IX, enfermedad de Menkes, enfermedad de Wilson, methallotioneínas.

Abstract

Copper is dietary nutrient essential for electron transfer reactions, when is incorporated into cuproenzymes that regulated, diverse processes such as mitochondrial respiration, melanin and

* Docente. Área Bioclínica. Facultad de Medicina. Escuela Colombiana de Medicina. Universidad El Bosque. Docente. Facultad de Medicina, y Facultad de Rehabilitación, Terapia y Desarrollo Humano. Instituto de Ciencias Básicas. Universidad del Rosario.

** Decano. Facultad de Medicina. Escuela Colombiana de Medicina. Universidad El Bosque.

*** Docente. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Docente. Facultad de Medicina y Facultad de Rehabilitación, Terapia y Desarrollo Humano. Instituto de Ciencias Básicas. Universidad del Rosario.

**** Docente. Área Bioclínica. Facultad de Medicina. Escuela Colombiana de Medicina. Universidad El Bosque.

***** Residente II. Especialización Ciencias Básicas. Facultad de Medicina. Instituto de Ciencias Básicas. Universidad del Rosario.

***** Docente. Facultad de Medicina y Facultad de Rehabilitación, Terapia y Desarrollo Humano. Instituto de Ciencias Básicas. Universidad del Rosario.

***** Docente. Vicedecano. Facultad de Medicina. Unisanitas.

neurotransmitter metabolism, iron homeostasis, antioxidant protection, glycinyl-peptide amidation for neuropeptide biosynthesis, and connective tissue formation. This article review, elucidate of the molecular and cellular basis, of human biology and pathobiology (diseases) of this metal.

Key words: angiogenesis, ceruloplasmin, copper, cutis laxa, dementia, Ehlers-Danlos IX disease's, Menkes' disease, methallotioneins, Wilson' disease.

Introducción

La vida, como fenómeno, en algunos de sus modelos de producción de energía, utiliza un amplio número de estrategias para la producción, dentro las cuales existe una vasta gama, de posibilidades, como las catálisis óxido-reductivas, y ha sacado partido para ello, de las propiedades químicas de metales esenciales como el cobre, el hierro, el manganeso, el molibdeno y el cobalto, en asocio con cofactores enzimáticos, como las flavinas y las quinonas, ya sean como componentes prostéticos, o como coenzimas.

Para llevar a cabo, nuestra revisión sobre la temática del cobre, decidimos revisar la literatura, haciendo una búsqueda electrónica en PUBMEDLINE (National Library of Medicine database)[1], y algunos bancos de genética humana, tales como el Banco de Genética Médica, de la Universidad de Alberta en Canadá[2] y el Banco Enciclopedia de Genes y Genomas Kyoto[3]. En nuestra revisión utilizaremos, para designar genes, proteínas y enfermedades, su codificación MIM (Mendelian Inheritance McKusick), para que el lector, si lo desea, soporte una profundización del tema. MIM es tal vez, el mayor banco de información existente, en biología y patobiología humana, actualizado día a día, y es de obligatorio conocimiento y consulta en estas áreas[4]. Asimismo, como fuente adicional, consul-

tamos, lo que se considera la biblia de las enfermedades del metabolismo, la enciclopedia de las enfermedades metabólicas humanas, editado por Scriver[5].

La importancia biológica del cobre[6]

El cobre es un cofactor para múltiples enzimas, denominadas por esta cualidad, como "Cuproenzimas", en las cuales el metal está unido a residuos aminoácidos específicos, en el sitio proteico catalíticamente, activo. El cobre es un nutriente esencial de la dieta humana, y está vinculado a la respiración mitocondrial, biosíntesis de melanina, metabolismo de la dopamina, homeostasis del hierro, defensa antioxidante, angiogénesis, formación de matriz extracelular y amidación peptídica.

Patología clínica y valores normales[7-10]

Su requerimiento mínimo es de 1-2,6 mg/día, y la RDA (Recommended dietary allowances) que pertenece a la FDA (Food Drug Administration) ha estimado, que sus valores límites aceptables son de 1,5-3 mg/día. La dieta norteamericana diaria, en promedio aporta 1 mg en 2.000 calorías/día, lo cual sugiere, un problema de salud pública, de trascendencia no estimable aún.

Para su medición, en los laboratorios de patología clínica, de acuerdo a los parámetros recomendados por la Academia Americana de Patología Clínica, su análisis se hace suero, se necesitan 15 mL de sangre en tubo seco, con tapa roja, y su análisis debe hacerse en 24 horas, o de lo contrario, se debe congelar. Sus valores de referencia son 14-24 umol/L en mujeres, 11-12 umol/L en hombres, 1,9-10,5 umol/L en recién nacidos; y 4,2-23,9 umol/L en edades entre 3-10 años. En gestación hay hipercupremia fisiológica, y es así que en el momento del parto,

pueden encontrarse valores que son el doble de los normales.

Hipercupremia, se encuentra en la enfermedad de Wilson, de la cual se discutirá después, y aún, sin una explicación clara, en los linfomas Hodgkin y en la pelagra.

Biodinámica humana del cobre[6, 10, 11]

Existen numerosas fuentes alimentarias ricas en cobre, de ahí que su deficiencia es rara, a no ser que se presente, en el contexto de síndromes de malabsorción, síndromes de malnutrición, dietas especiales con suplementos vitamínicos ricos en zinc, o síndromes nefróticos. No hay evidencia clínica del uso de cobre como profiláctico o terapéutico, salvo en las situaciones mencionadas. En países industrializados, la dieta del adulto, contiene en promedio 5 mg.

Su absorción se hace fundamentalmente en estómago y duodeno, posteriormente siendo tomado a partir de la circulación venosa portal por el hígado, que se considera el principal órgano en la homeostasis de éste. Su absorción gastrointestinal, está bajo el control de las proteínas denominadas como metallothioneínas, las cuales se expresan en los enterocitos, y juegan un rol tanto en el transporte del cobre como del zinc, en una forma tal que cuando hay alta ingesta de zinc se inhibe la absorción del cobre, y viceversa.

En estudios de medicina nuclear, con isótopo[64] Cu, dentro de las 4 horas posteriores a la inyección del trazador, más del 95% es removido por el hígado, y dentro de 24 horas, el 6-8% reaparece incorporado dentro de una proteína, denominada ceruloplasmina, la cual contiene el 95% del total del cobre plasmático. La ceruloplasmina, se considera que no es una proteína transportadora como tal, y se postula que en general el cobre que se une a residuos aminoácidos preferencialmente

de histidina, en las proteínas plasmáticas, es el que se libera, hacia los tejidos. La excreción de cobre, se hace por la bilis en un 99%, en una forma tal que la cantidad de cobre excretado, es directamente proporcional a la reserva hepática hepatocitaria, del metal. En la bilis, el cobre aparece como un complejo no absorbible, y por ende, no posee circulación enterohepática. Es así, que en conclusión, una cantidad de cobre equivalente a la eliminada, se absorbe, a partir de la dieta. En relación con esto, se ha hallado, que durante el desarrollo *in utero*, hay un decremento en la excreción biliar fisiológicamente, y como resultado, el contenido hepático de cobre al nacimiento, es proporcionalmente, mucho más alto, al encontrado normalmente, durante el resto de la vida. Asimismo, el recién nacido, tiene el marcador ceruloplasmina plasmático, en bajo rango, lo cual hace que se descarte, como una prueba de tamizaje, para el diagnóstico de cupropatías, como la enfermedad de Wilson, de la cual hablaremos posteriormente. En el riñón, se filtra glomerularmente y se reabsorbe tubularmente, la casi totalidad del cobre, y sólo se excreta un 1%, excepto en el síndrome nefrótico, donde la pérdida de proteínas plasmáticas, favorece su eliminación.

El rol metabólico del cobre[6,10, 12]

Dentro de las enzimas conocidas como cuproproteínas están:

- Citocromo C oxidasa: corresponde al complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial). Está compuesto de 13 proteínas, que generan un andamiaje estructural para el cobre, que son los citocromos a y a₃. Diez de las 13 proteínas son codificadas por el genoma nuclear, y 3 por el genoma mitocondrial.
- La catalasa: enzima antioxidante peroxisomal, que degrada el peróxido de hidrógeno.

- La dopamina beta-hidroxilasa: enzima dependiente de vitamina C, que cataliza la conversión de dopamina hacia norepinefrina (noradrenalina).
- Las tirosinasas: enzimas que catalizan la degradación de la tirosina hacia el precursor melanínico, dopaquinona (dihidrofénilalanina), a través de la generación del intermediario DOPA. En la especie humana existen 4 isoenzimas: Tirosinasa (MIM606933, gen localizado en 11q14-21), TYRL (MIM191270, gen localizado en 11p11.2), TYRP1 (MIM115501, gen localizado en 9p23) y TYRP2, también denominada como Dopacromo-Tautomerasa (MIM191275, gen localizado en 13q31-32).
- Las superóxido-dismutasa isoenzimas 1 y 3 (SOD1 y SOD3): enzimas antioxidantes bifuncionales, con actividad reductora dismutasa y actividad peroxidasa, que degrada el radical libre conocido como superóxido. SOD1 es intracelular y SOD3 es extracelular. SOD3 es secretada por el hígado, como una proteína de fase aguda de estrés inflamatorio agudo, lo cual va de la mano de la neutralización de radicales libres, liberados, durante respuesta inflamatoria, a partir de diversas óxido-reductasas de respuesta inmune.
- Las lisil-oxidasas (LOX): enzimas extracelulares con actividad amino-oxidasa desaminativas, sobre residuos aminoacídicos de lisina (protein-lisina-6-oxidasa) y 5-hidroxi-lisina (protein-5-hidroxi-lisina-6-oxidasa), actuando sobre sus grupos amino épsilon, produciendo intermediarios altamente reactivos tipo alfa-aminoaldefido-delta-semialdehído, respectivamente allisina e hidroxil-allisina. Estos intermediarios, cuando están ubicados en cadenas proteicas aledañas, forman anaenzimáticas, puentes entrecruzantes tales

como lisino-5-oxo-nor-leucina, de-hidroxi-lisino-nor-leucina y piridinium, encargados de entrecruzar el colágeno y la elastina.

En la especie humana existen 5 isoenzimas, que son LOX (MIM153455-gen localizado en 5q23.3-31.2), LOXL1 (MIM153456-gen localizado en 15q22), LOXL2 (MIM606663-gen localizado en 8p21.3-21.2), LOXL3 (MIM607163-gen localizado en 2p13.3) y LOXL4/LOXC (MIM607318, gen localizado en 10q24). Se ha identificado un polimorfismo génico normo-funcional (Arg158Gln) de LOX, en la población humana.

Estas enzimas, han mostrado contribuir a múltiples procesos, tales como la regulación del desarrollo, senescencia, supresión neoplásica, control del crecimiento celular y quimiotaxis[13-17].

- Las ferroxidasas: enzimas encargadas de oxidar el hierro de Fe (2+) hacia Fe (3+), forma en la cual es transportado por la transferrina.
- La delta-9-desaturasa de ácidos grasos: enzima encargada de catalizar la conversión del ácido C18 saturado “ácido esteárico”, hacia el ácido C18 monoinsaturado “ácido oleico”.
- La PAM (peptidil-glicina-alfa-amidante-mono-oxigenasa): es una enzima bifuncional, con necesidad de cobre y zinc, que tiene actividad PHM (peptidil-glicina-alfa-hidroxilante-mono-oxigenasa) y PAL (peptidil-alfa-hidroxi-glicina-alfa-amidante-liasa), que actúa secuencialmente, para catalizar la alfa-amidación de neuropéptidos como la Ngr. (hormona liberadora de gonadotropinas) y la oxitocina, en una forma dependiente de vitamina C. Presenta por corte y empalme alternativo del mRNA, 2 variantes. Puede también ac-

tuar en el clivaje amidativo de acilglicinas, generando glioxilato. Su gen codificante (MIM170270) se localiza genómicamente en 5q14-q21. PAM, se encuentra formando un complejo con la proteína HAPIP (Huntingtin-associated protein-interacting protein), también denominada proteína DUO, P-CIP10, o Kalirin, y con las proteínas HAP1 (Huntingtin-associated protein1) y la huntingtonina. HAPIP tiene actividad reguladora activante sobre la proteína G monoméricas Rac, que están relacionadas con funcionalidad citoesquelética[18-20].

- Amino-oxidasas cobre-dependiente (AOCs): catalizan la conversión oxidativa de aminas hacia aldehído y amonio, en la presencia cobre y cofactores de tipo quinona. Se cree que es un modulador crítico de transmisión de señales, posiblemente por degradar aminas biógenas como la dopamina, la histamina y la putrescina. Se conocen en la especie humana dos isoenzimas: AOC2 (MIM602263, gen localizado en 17q21), de alta expresión retiniana, y AOC3 (MIM603735, gen localizado en 17q21), también denominada como VAP1 (vascular adhesion protein 1), de alta expresión placentaria, que se expresa en la membrana celular endotelial, reclutando linfocitos. La cercanía de los genes sugiere duplicación génica ancestral[21-23].

Asimismo, como en la deficiencia de cobre, como se mencionará cuando hablemos de la enfermedad de Menkes, existen rasgos similares al escorbuto, se ha sugerido la existencia de una enzima con actividad ácido ascórtico-oxidasa, al parecer enzima clave en la activación de la vitamina C, que se obtiene de la dieta; es importante para su destino en los tejidos conjuntivos, aunque es más evidente, el rol de las lisil-oxidasas, en este contexto.

Interrelaciones entre el metabolismo del cobre y el hierro: el sistema ferritina-transferrina-ceruloplasmina[24-31]

El hierro que prima en la dieta, es férrico, y su captación depende de su reducción, por un complejo reductasa denominado “complejo paraferritina” formado por proteoglicanos tipo mucina, las moléculas de adhesión celular integrinas, la ectocalrreticulina (también denominada mobilferrina, proteína Alabama o mobil), que corresponde a una versión membranal de la proteína calcio-almacenadora calrreticulina del retículo endoplásmico liso, una flavin-mono-oxigenasa (una isoenzima aún no catalogada), y la beta-2-microglobulina. La actividad del complejo paraferritina es dependiente, aún en forma no muy clara de vitamina C. Posterior a ello, se capta por el enterocito como hierro ferroso, y se oxida por acción de la cuproenzima con acción ferroxidasa, denominada hephaestina, produciéndose hierro férrico, y éste es transportado intraenterocíticamente y momentáneamente almacenado así, por la ferritina tisular.

Posterior a ello, para poder ser transferido a la circulación sanguínea, se necesita reducir el hierro en el citosol enterocitario, reacción catalizada por medio de la enzima ferritina-reductasa, la cual utiliza como coenzimas el NAD (ácido nicotinamida-dinucleótido), y el FAD (flavina-adenina-dinucleótido) o el FMN (flavina-mononucleótido), dando como productos finales, la apoferritina y las coenzimas oxidadas. Ya en el plasma, el hierro ferroso, se oxida, por las cuproenzimas ferroxidasas I ó II, para que pueda, así ser transferido a la transferrina, o a la ferritina sérica.

Las ferroxidasas, como ya mencionamos, son cuproenzimas, que se encargan de oxidar el hierro ferroso, para que pueda ser transportado por la transferrina o la ferritina sérica, a nivel plasmático. Las ferroxidasas, oxidan

el hierro, cuando éste está dentro de la transferrina, facultando así, el transporte. De acuerdo a lo mencionado, existen 3 ferroxidasas: la tipo I también denominada como ceruloplasmina, la tipo II que parece ser de mayor importancia sérica que la tipo I, y la proteína denominada como hephaestina (en honor al dios griego herrero Hefestos), que corresponde a una proteína transmembranal, a diferencia de sus hermanas, expresada en el intestino. La ceruloplasmina (MIM117700, gen localizado en 3q23-24), es una alfa2-glicoproteína plasmática, con múltiples isoenzimas tisulares, producidas por corte y empalme alternativo de su mRNA, que pertenece junto con el factor V y factor VIII de la coagulación, a una misma familia génica que evolucionó, por duplicación génica ancestral.

Es una proteína de fase aguda de estrés inflamatorio agudo sistémico, y esto garantiza, una optimización en el manejo del hierro, durante fases de infección por ejemplo.

En la población humana, existen diversas variables electroforéticas de ella, a causa de diversos polimorfismos génicos, considerándose como uno de los genes más polimórficos, en nuestra especie.

Estas proteínas pues, son un importante entrecruzamiento, entre el metabolismo del hierro y el cobre en los mamíferos.

Angiogénesis[32]

Existe un factor angiogénico denominado angiotropina, es una ribonucleoproteína (RNP) extracelular, una "Ribokina". Angiotropina-CuRNP-Ribokina está formado por ARNA (small eRNA bioaptámeros) que se acompleja junto con el cobre y un componente proteico dado por ARP (metalloregulated angiotropin related protein), que corresponde a una proteína previamente conocida de la familia de las pro-

teínas intracelulares unidoras de calcio S100, que utilizan dominios EF-mano, para interactuar con el calcio, correspondiendo esta proteína ARP a S100A12, o conocida también como calgranulina\calcitermin, calgranulina C o HNDF (Hippocampal neurite differentiation factor), con actividades adicionalmente antimicrobianas.

Estos RNA extracelulares (eRNA), son un tema novedoso en biología, son pequeños, endógenos al genoma, altamente modificados y editados, a partir de intermediarios de más de 500 pares de bases, regulados por estrés óxido-reductivo, unidores de metales, 5'-fosforilados de aproximadamente 2-200 pares de bases.

Angiotropina, los AGEs (productos de la glicosilación avanzada), y una proteína de la matriz extracelular del sistema nervioso denominada como amphoterina, son ligados para los RAGEs [(receptores para los AGEs (productos de glicosilación avanzada)]. Los RAGE son proteínas críticas, en la mecánica angiogénica, tanto en síndromes hiperglicemiantes y en angiogénesis neoplásica. Se han encontrado dos RAGEs que se ubican en la superficie del linaje morfofuncional monocito\macrófago, en células musculares lisas, sobre las células endoteliales y en neuronas, siendo la mayor expresión tisular específica a nivel del pulmón. La expresión de RAGE es altamente elevada en forma patológica en pacientes con síndromes hiperglicemiantes en tejidos que normalmente no lo expresan, lo cual hace pensar el papel de los RAGE en la proliferación vascular anómala retiniana y mesangiocapilar renal. Uno de los receptores es un polipéptido de 35KDa miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y el otro un receptor de 46KDa, cuya naturaleza proteica está por estudiarse. En el receptor RAGE35KDa la secuencia aminoterminal es idéntica a la lactoferrina, mientras que dicha secuencia en el RAGE46KDa es novel, puesto que no se ha

identificado en otras proteínas. Hay evidencias de que estas dos proteínas heterodimerizan.

Biodinámica molecular de los metales[33]

Las células poseen mecanismos de reconocimiento y alocaación metálica, tanto intracelular como membranalmente. Estos mecanismos son finos detectores que permiten mantener una homeostasis, y éstos tienen propiedades alostéricas y de afinidad, muy especiales, que han abierto un nuevo capítulo en la bioquímica. Esto, va de la mano, de que toda metalo-proteína, debe de alguna forma adquirir, su metal correcto, y no equivocarse, fenómeno, que se ha denominado en la jerga especializada, como “Especiación de metales”.

Inicialmente, con el concepto “llave-cerradura”, se estimaba, que toda unión entre moléculas, e igualmente, de éstas con átomos, era supremamente específica. Sin embargo, la información que hoy se posee, con respecto a este tópico, está a favor del modelo del “ajuste inducido”, y parte de estos hallazgos, deviene de cómo la química proteína-ligando y las geometrías de coordinación, están lejanas, de los preceptos que se tenían en “biotopología molecular”, y en especial, cuando se habla de dinámica de iones, incluyendo obviamente los iones metálicos. Es así que si se considera, a la célula como un sistema, ellas disciernen y evalúan, circunstancias, como la necesidad de iones metálicos, y así modulan positivamente, mecanismos de absorción y transporte de aquellos iones, para los cuales hay necesidad, y pueden asimismo secuestrar o excretar, aquellos iones metálicos, que están en exceso. Para tales efectos, existen transportadores tanto plasmalémicos como en compartimentos organelares, sensores plasmalémicos e intracelulares, proteínas de almacenamiento y metalo-chaperones.

Captación plasmalémica del cobre[34-36]

Una proteínas, denominada como Ctr/COPT (Copper transporter), son las encargadas de la captación hepatocitaria de este metal. Éstas son proteínas transmembranales politópicas, identificadas inicialmente en el hongo *Saccharomyces cerevisiae*. En la especie humana existen Ctr1 (MIM603085, gen localizado en 9q31-32) y Ctr2 (MIM603088, gen localizado en 9q31-32), correspondiendo, respectivamente a las permeasas SCL31A1 y SCL31A2.

El mecanismo a nivel molecular de transporte, no está totalmente dilucidado, pero se ha encontrado que son fundamentales, los residuos de metionina, localizados en las regiones extracelulares de las asas proteica, y es necesario la multimerización y la endocitosis de Ctr1. El transporte es independiente de energía, y es estimulado por el pH ácido a nivel extracelular, y altas concentraciones de potasio. La localización celular de Ctr1 varía, desde el compartimento perinuclear, hasta su localización en la plasmalema, sin que la concentración de cobre lo influncie, y sin tener aún claridad de tal evento. Ctr1 se produce como un precursor de 29KDa, que es procesado por glicosilación n-ligada, hacia una proteína madura de 35KDa. El mecanismo de la reducción del ión cúprico que antecede la captación por Ctr1, está aún por entenderse.

En mamíferos, hay evidencia contundente de otros transportadores membranales, de baja afinidad. Un descubrimiento de importancia inusitada, es que Ctr1, es el transportador de captación del fármaco antineoplásico cisplatino.

Metalochaperones para cobre (cupro-metalochaperones)[33, 37]

El cobre captado por Ctr1, es transferido a las futuras cupro-enzimas, por medio de

un sistema de metalo-chaperonas citoplasmáticas, tales como Atox1, CCS (copper chaperone for cu, zn superoxide dismutase) y Cox17, al igual que otras proteínas con posible igual función, como Murr1, metallothioneínas y la APP (amyloid precursor protein).

A. Atox1[38-40]

Atox1 (MIM602270, gen localizado en 5q32), también denominada HAH1, es una pequeña proteína antioxidante de 68 aminoácidos, inicialmente descubierta en hongos, encargada de transferir el cobre a cuproproteínas, que son sintetizadas por la vía secretoria, y para ello, libera el cobre en la red transgolgi. Ejemplo a lo anterior es, el precursor de la ceruloplasmina, es decir, la apoceruloplasmina, que tras recibir 6-7 átomos de cobre, puede madurarse hacia holoceruloplasmina, y salir a plasma sanguíneo. También, libera el cobre a dos cuproproteínas maduras, de las que hablaremos posteriormente, que son las bombas ATP-dependientes ATP7A y ATP7B. Atox1, en la especie humana, posee 68 aminoácidos, con un motivo proteico, unidor de cobre, que corresponde a MXCXXC (metionina-X-cisteína-XX-cisteína), el cual también es encontrado en ATP7B. La transferencia es por interacción cuerpo a cuerpo de Atox1 con las bombas transportadoras. Atox1, tiene funciones accesorias como ser un protector antioxidante para poblaciones neuronales.

B. CCS[41-43]

CCS (MIM603864, gen localizado en 11q13) es una metalo-chaperonina de 274 aminoácidos y 70Kda, que es requerida para la liberación del cobre a las cuproenzimas SOD1 y SOD3. Se descubrió inicialmente, su homólogo en hongos, que corresponde a la proteína Lys7. Es un homodímero con subunidades de 35Kda y 3 dominios fun-

cionales. El dominio I es donde radica la actividad unidora de cobre, el dominio II de muestra homología aminoacídica con las SOD y le permite heterodimerizar con las SOD, y el dominio III, posee residuos aminoacídicos de cisteína, que son claves para la transferencia del cobre. CCS también se puede localizar en el espacio intermembranal mitocondrial, donde probablemente juega roles antioxidantes. Su región cromosómica entre las posiciones 86-234 es 47% idéntica a SOD1.

C. Cox17 y proteínas Sco[44-52]

Cox17 (MIM604813, gen localizado en 3q), fue descubierta en levaduras, como una proteína pequeña de 8Kda, que es requerida, para el funcionamiento de la citocromo oxidasa (Complejo IV de la cadena respiratoria mitocondrial), complejo que está compuesto por 13 subunidades, y donde las subunidades Cox1 y Cox2, encierran respectivamente los centros catalíticos óxido-reductivos CuA y CuB. Cox17 tiene 62 aminoácidos, y se ubica tanto en el espacio intermembranal mitocondrial, como el citoplasma. Tres proteínas familiares a Cox17, son Cox11, que es necesaria para la transferencia de cobre a Cox1, y las proteínas Sco (Synthesis Cytochrome Oxidase) Sco1 (MIM603644, gen localizado en 17p13-12) y Sco2 (MIM604272, gen localizado en 22q13), son necesarias para la transferencia de cobre a Cox2.

D. Metallothioneínas[53-59]

Dentro de los mecanismos evolutivos más finos, para regular el metabolismo de la toxicidad por metales pesados, es el de las proteínas ricas en tioles denominadas como metallothioneínas. Las metallothioneínas son reguladas a nivel genómico por el factor de transcripción con dedos de zinc MTF1 (Metal-Transcription-Factor)(MIM600172, gen localizado en 1p33), el cual es un sensor

citoplasmático de metales pesados, pero en especial de altas concentraciones de cadmio, cobre y zinc. En el genoma humano, existen 15 genes codificantes y 2 pseudogenes de metallothioneínas, codificadas por un loci génico en el cromosoma 16 (16q13), excepto un gen, que es codificante de la MT5 (también denominada Tesmin), que se localiza en 11q13.2-13.3. Los genes del loci del cromosoma 16 se clasifican, basados en su estructura, en los grupos MTI, MTII, MTIII y MTIV, donde la expresión de las MT de los grupos I y II es ubicua, la de MTIII es preferencialmente cerebral y de órganos reproductivos, y la de MTIV es preferencialmente en epitelios estratificados. El grupo V, hasta ahora, sólo tiene un gen identificado que es MT5/Tesmin, que se expresa en células germinales masculinas en los testículos.

El grupo MTI está formado por los genes codificantes de MT1A, MT1B, MT1E, MT1F, MT1G, MT1H, MT1I, MT1J, MT1K, MT1L y MT1X, y dos pseudogenes que son MT1C y MT1D. El grupo MTII, posee sólo el gen codificante de MT2A, y el grupo MTIII igualmente, sólo posee el gen codificante de MT3.

El 50% del total de proteína, es debido a la expresión del gen que codifica la isoforma MTIIA. Se habla de ApoMetallothioneína, cuando no está uniendo metales. En el período perinatal, las metallothioneínas, son asociadas con el almacenamiento hepático de cobre, quizás a causa de un sistema secretorio biliar inmaduro, con una limitada biosíntesis de ceruloplasmina.

Las funciones de las metallothioneínas aún es elusivo, y por experimentación se ha podido postular que es:

- una proteína barredora de radicales libres;
- antitóxico específico contra el cadmio;
- en el núcleo es un protector frente al daño electrófilo generado por radiación;
- MT3 también se le ha denominado GIFB/GRIF (Growth inhibitory factor Brain), muestra roles inhibitorios sobre el crecimiento y proliferación de poblaciones neuronales, por mecanismos aún no definidos totalmente;
- rol en involución tímica relacionada con la edad.

Esto último es importante, por cuanto se ha demostrado que el 7% de los síndromes de insuficiencia renal en humanos son causados por exposición al cadmio. Las metallothioneínas, también ofrecen protección frente a toxicidad por cisplatino, tetracloruro de carbono (CCl₄), acetaminofén, estreptozocina, alloxan, caerulein, adriamicina y paraquat.

E. Murr1/COMMD1[60-63]

Murr1 (MIM607238, gen localizado en 2p16-13), también denominada como COMMD1 (Copper metabolism MURR1 domain containing protein 1), es una proteína que se descubrió, a partir de que su gen, está mutado, en un cuadro genético autosómico recesivo, en perros de raza Bedlington Terrier, caracterizado por cuprotoxicosis. Esta proteína es citoplasmática, y es requerida para el proceso de movimiento vesicular del cobre y su excreción en el sistema canalicular hepático. Se ha detectado en hígado humano, pero no se conoce aún su funcionalidad. Fuera de ello, tiene la capacidad de inhibir la replicación del HIV1 en linfocitos no estimulados, al inhibir la vía transcripcional KB, y también probablemente, regula el metabolismo del sodio.

- una proteína de almacenamiento para el zinc;

F-APP[64, 65]

APP (proteína amiloide A) y la PrP (proteína priónica) son proteínas plasmalémicas, que contiene un sitio de unión para el cobre. Se sugiere, a partir de modelos experimentales animales, que sirven como una barrera para la importación excesiva del cobre en el cerebro.

Bombas ATP dependientes, y metabolismo del cobre[66-69, 79]

Existen 2 bombas ATP dependientes, del tipo P (las cuales se caracterizan porque forman un intermediario aspartil-fosfato), relacionadas al metabolismo del cobre: ATP7A (MIM 300011, gen localizado en Xq12-13) de expresión no hepática y alta expresión neural, y ATP7B (MIM606882, gen localizado en 13q14.3-21.1) de expresión hepática.

Las ATP7 son proteínas politópicas, con 8 regiones transmembrana, con un motivo dileucínico, que las localiza en la vía endocítica, de ahí que su principal expresión, se dé en la vía secretoria tardía de la biosíntesis de proteínas, en la red trans-golgi, siendo la tercera región transmembrana, la implicada.

Cuando hay incremento del cobre intracelular, estas bombas, se mobilizan, desde la red trans-golgi hacia la plasmalema, y facultan el secuestro vesicular de cobre, y su posterior excreción, por el sistema canalicular biliar hepático, o si es otro tipo celular, hacia fuera de la célula. Cuando cesa, la hipercupremia citosólica, se endocita, en una forma independiente de la clatrina y las caveolas. Atox1 es la metalo-chaperonina que transfiere, el cobre a las ATP7. Fuera de lo anterior, hay evidencias de que la actividad de estas bombas, depende de bombas de hidrogeniones ATP dependientes-vacuolares y canales de cloro, que generan un medio ácido y electrogénico neural, dentro de las

vesículas, para mantener, así el transporte excretivo de cobre. ATP7A parece ser fundamental para la homeostasis del cobre, y ambas bombas, muestran una actividad acopladora del cobre a la ruta sintética secretora de proteínas, es así que en las enfermedades, que analizaremos posteriormente, cuando hay daño de ATP7B hay daño en la producción hepática de cupro-proteínas como la ceruloplasmina, y cuando hay daño en ATP7A, hay daño en la producción de enzimas neurales.

Patobiología

A. Anormalidades en la dieta

La deficiencia de cobre en la dieta, puede ser por baja ingesta del elemento traza o por alta ingesta de zinc, pero al parecer, es extremadamente rara, y es uno de los elementos más solapantes, en cuadros de malnutrición. Sin embargo, cuando ha sido detectada, la deficiencia de cobre clínicamente se caracteriza por síndrome dislipidémico del tipo hipercolesterolémico, desmineralización ósea, leucopenia, síndrome anémico refractario, fragilidad arterial, despigmentación secundaria, y desmienilización secundaria, caracterizada por retardo psicomotor, ataxia pseudoparalítica, hipotonía y síndrome convulsivo. El exceso de cobre en la dieta es también bastante raro, y cuando ha sido detectado, se caracteriza por cirrosis hepática, gastritis y anemia hemolítica.

B. Enfermedades genéticas

B.1. Enfermedad de Wilson (MIM277900)[71, 72]

Es una entidad, mendeliana autosómica recesiva, descrita en 1912 por el doctor S.A. Kinnier Wilson, llamada también Degeneración hepato-lenticular, cuya causa es la genopatía del gen codificante de ATP7B,

donde se han encontrado más de 200 mutaciones, donde la mitad de éstas, son mutaciones de sentido erróneo (missense), que se ubican en particular, en la región transmembrana y en los motivos proteicos unidores de cobre. Las mutaciones tienen, amplia variación fenotípica, y sugiere, la existencia de genes de susceptibilidad y riesgo accesorios, y factores ambientales aditivos. Una de las mutaciones más frecuentes es H1069Q, la cual produce una proteína termo-sensible, que favorece, una localización anómala, en el retículo endoplásmico.

Es estima su incidencia en 30/1 millón de personas, con una frecuencia génica estimada del 0,56%, y una frecuencia de portador de 1/90, con una muy alta prevalencia en el Mediterráneo, en especial en la región de Sardinia, donde 10-12 nuevos casos, son identificados por año.

En general se estima que la presentación inicial en la niñez y en la adolescencia, un 40% con falla hepática, otro 40% con compromiso neurológico, y un 20% con enfermedad psiquiátrica. La entidad se caracteriza por acúmulo del cobre en el hígado, e imposibilidad de eliminarlo, con desarrollo de cirrosis hepática, y algunos casos, de éstos, progresan hacia hepatocarcinoma. Llega un momento, en que se supera la capacidad hepática, y se comienza a almacenar anormalmente, a nivel renal, cerebral y corneal. Las consecuencias de tales almacenamientos patológicos son el daño tisular, mediado entre otros mecanismos por un estado oxidativo, ocasionado por reacciones metalo-oxidativos tipo Fenton.

Hay daño en especial, del tipo degeneración cerebral lenticular, que se caracteriza clínicamente por disartria, dispraxia ataxia y parkinsonismo; cirrosis hepática; y falla renal, que se manifiesta por hiperglucosuria, hiperaminoaciduria, hiperfosfaturia, hiper calciuria y hiperuricosuria. Muchos de

estos hechos, ocasionan nefrocalcinosis y nefrolitiasis. El aumento del cobre a nivel plasmático induce homeostásicamente su quelamiento por aminoácidos, y estos complejos son eliminados por vía renal, con hipercupruria consecuente. Al diagnóstico clínico, se encuentra invariablemente, el signo de Kayser-Fleischer, que es producto del depósito peri-corneal del cobre, y también se puede ubicar un signo similar en lúnulas de las uñas. Hay evidencias consistentes de daño dopaminérgico y motoneuronal, lo que concuerda, con la manifestación clínica neurológica.

Otro rasgo clínico importante es la ceruloplasmina baja o nula, hasta en un 50% de los pacientes. Esta anormalidad con la ceruloplasmina, conlleva a que exista baja actividad ferroxidasa plasmática, y decanta en una hemosiderosis colateral, empeorando aún más el cuadro.

Cirrosis hepática[73-77]

Dado que la cirrosis, es uno de los rasgos fenotípicos variables, tanto en expresión como en penetrancia, éstos han llevado, a investigar, modelos animales, para encontrar las claves patogénicas. En animales existen 3 modelos genéticos de esta enfermedad. El modelo en ratas "Long Evans Cinnamon", en el cual se explica, por una mutación espontánea del gen codificante de ATP7B, con el desarrollo consecuente de hepatitis y falla hepática secundaria, a daño en la excreción biliar de cobre. A pesar, del mismo gen afectado, a diferencia de los humanos, se desarrolla, invariablemente hepatocarcinoma, y ferropatías asociada. Otro modelo, es el modelo en ratones "Toxic milk", que también contiene mutación espontánea en el gen codificante de ATP7B, y muestra ser fundamental en el transporte perinatal de cobre a través de la placenta y la glándula mamaria. A pesar, de la cuprosis hepática en

los ratones adultos, no se desarrolla cirrosis hepática. Finalmente, un modelo experimental, donde se anula (targeted deletion, knockout), el gen de ATP7B en murinos, en laboratorio, donde tampoco se desarrolla cirrosis hepática. En conclusión, en estos modelos animales, no hay pistas claras, lo que reitera, la multifactorialidad y la presencia de genes de susceptibilidad o riesgo, en humanos. Posibles genes de susceptibilidad o riesgo asociados, son aquellos que se relacionan con procesos inmunes, aclimatación al daño y fibrogénesis. Se han identificado genes de susceptibilidad, que presentan polimorfismos génicos, que generan versiones proteicas en unos casos hiperfuncionantes, y en otros hipofuncionantes, favoreciendo la cirrosis hepática, disparada por procesos como la enfermedad alcohólica, la hepatitis autoinmune, la hepatitis viral crónica c, la cirrosis biliar primaria, y la esteatohepatitis no alcohólica.

Polimorfismo génicos que generan proteínas hiperfuncionantes promotoras de cirrosis, han sido identificados en los genes codificantes de TGB1 (factor transformante de crecimiento Beta 1), IL1B (interleukina Beta 1), IL1R (IL1 receptor), angiotensinógeno, TNFA (factor de necrosis tumoral Alfa), epóxido-hidroxilasa peroxisomal, CD14, CTLA4, TAP2 y ApoE (apolipoproteína E); polimorfismos génicos que generan proteínas hipofuncionantes, de proteínas que normalmente, son de naturaleza anticirrosis, se han encontrado en los genes de IL10 (interleukina 10), CTLA4, y SOD2 (superóxido dismutasa mitocondrial manganeso-dependiente); genes que muestran polimorfismos con resultados discrepantes en la patogenia, se han encontrado en los genes codificantes de ADH (alcohol-deshidrogenasa), ALDH (aldehído-deshidrogenasa), citocromo P450 CYP2E1, y HFE (Gen de la hemocromatosis); y genes con polimorfismos génicos que generan un variable efecto en la patogenia de

la cirrosis, se han encontrado en los genes codificantes del complejo mayor de histocompatibilidad HLAII. Como se puede razonar, en el futuro, se tratará de evidenciar, como estos polimorfismos génicos, en estos genes, colaboran en la historia natural de la cirrosis hepática en la enfermedad de Wilson. Asimismo, polimorfismos génicos, en los genes codificantes de las citoqueratinas K8 y K18, que son los principales componentes monoméricos del citoesqueleto de filamentos intermedios en los hepatocitos, están ligados probablemente a susceptibilidad o riesgo.

Hasta ahora sólo se han identificado, el gen codificante de la ApoE, al igual que posibles genotipos en los genes codificantes de la maquinaria de apoptosis hepática, que es dependiente del receptor plasmalémico de muerte Fas (también denominado APO1 y CD95).

Su manejo farmacológico, se hace con quelantes de metales y antioxidantes:

- Queladores de metales y metaloides, como el Desferroxiamina, Clioquinol, D-Penicilamina, Edetato cálcico disódico (EDTA) y su derivado Desrazoxane (ECRF-187), Trientina (TETA-tri-etil-ene-tetramina di-hidrocloreto), Demercaprol y Succímero. Aquí, también es importante, mencionar el posible uso de altas dosis de zinc (acetato de zinc), que han demostrado, interferir, con la absorción del cobre.
- Antioxidantes como el 21-amino-esteroide no glucocorticoide Tirizalad, Probucof, el complejo vitamínico E, vitamina C, coenzima Q10 (ubiquinona) y su derivado Idebenone, NAC (N-acetilcisteína), Pergogoteina, Azelastine y el barredor de radicales libres Ebselen, diversos polifenoles flavonoides, entre otros.

B.2. Enfermedad de Menkes o Menkea (MIM309400), y las variantes alélicas enfermedad del Cuerno Occipital/Cutis Laxa(304150)[79- 86]

El gen afectado corresponde al gen codificante de ATP7A, ubicado en Xq13.3, con un patrón de herencia ligado a X recesivo. Fue descrita inicialmente por el Dr. Menkes en 1962, en una familia inglés-iraní en Nueva York. Su frecuencia poblacional, varía en el mundo, por ejemplo en Australia se ha estimado que 1/40.000 recién nacidos vivos, y en Europa 1/298.000 recién nacidos vivos, y se han detectado más de 150 mutaciones. Se manifiesta al nacimiento, y su promedio de vida, es máximo hasta los 3 años, excepto las variantes, donde se puede aumentar esta expectativa ligeramente.

Existe un modelo animal de esta enfermedad, que es el modelo "mottled" en hámsters.

Clínicamente es llamativo al examen clínico el cabello ensortijado ("kinky hair") de color claro, incluso color plata a blanco, por lo que se les ha denominado "enfermedad del Cabello Ensotijado), y un examen exhaustivo muestra rasgos de Moniletrix, Pili Torti y Tricorexis Nodosa. Presentan retardo en el crecimiento, micrognatia con paladar hendido alto, síndrome convulsivo focal o generalizado, síndrome extrapiramidal, osteopatía semiescorbútica, hiperextensibilidad articular, y síndrome de fragilidad arterial con elevada tortuosidad, y tendencia aneurismática. Esto último es importante por cuanto, se sugiere, que ciertas entidades, con predisposición y desarrollo de aneurismas, podrían estar ligadas a este gen, y son variantes fenotípicas, tales como el síndrome de la Viuda Negra, donde hijos de madres aneurismáticas heredan el trastorno y la necrosis quística de la capa media, el

cual es un trastorno ligado al sexo, donde también se afectan los hijos varones.

También se presenta hipercolesterolemia, ya que la cupro-enzima Delta-9-Desaturasa de ácidos grasos, que se encarga como ya lo habíamos mencionado, de la conversión del ácido graso C18 saturado "ácido esteárico", hacia el ácido C18 monoinsaturado "ácido oleico", y si no funciona por la ausencia de cobre, el ácido esteárico, entra en la ruta biosintética del colesterol.

Variantes fenotípicas, son el síndrome del Cuerno Occipital y el síndrome de Ehlers-Danlos tipo IX, también denominado síndrome de Cutis Laxa ligado al cromosoma X. La variante cutis laxa es fenotípicamente en su clínica cutánea y articular, caracterizada por hiperextensibilidad. El síndrome del Cuerpo Occipital, su nombre deriva del hallazgo patonogmónico de la calcificación en forma de cuña simétrica, a lado y lado del foramen magnun que se encuentra entre los músculos trapecio y esternocleido-mastoideo, al insertarse éstos, sobre el músculo occipital.

No hay aún claridad sobre la fisiopatología de esta entidad, pero hay una deficiencia celular de cobre, que lleva a su pérdida, porque ATP7A, no puede favorecer el acoplamiento del cobre, en las enzimas que lo necesitan, durante la biosíntesis de ellas, en la vía secretora. Como no se utiliza, se pierde, y se excreta biliarmente, puesto que el defecto no tiene nada que ver con el hígado.

La terapia con cobre, no siempre muestra beneficios, sólo en algunos casos, y se utiliza histidinato de cobre en forma subcutánea, para el manejo, y los pacientes que muestran beneficio, son aquellos que tienen ciertos defectos moleculares, como la delección del exón 8 del gen codificante. También se ha manejado la osteopatía semiescorbútica con dronatos/bisfosfonatos.

**B.3. Déficit de ceruloplasmina
(MIM604290):
aceruloplasminemia e
hipoceruloplasminemia[87-91]**

Se considera una metabolopatía del hierro, por cuanto, en esta entidad, se afecta la actividad oxidasa de la ceruloplasmina, lo que produce una hemosiderosis generalizada en el organismo humano. Su presentación puede ser esporádico o familiar autosómica recesiva, y su variabilidad y penetrancia genéticas, son amplias, por cuanto hay sujetos normales, o sujetos con cuadros neurológicos con presentación presente o no de, diabetes mellitus tipo I, enfermedad hepática, o degeneración retiniana pigmentaria. El compromiso neurológico puede caracterizarse por blefarospasmo, torticolis y desórdenes extrapiramidales (corea y ataxia). Su manejo, se hace con ceruloplasmina por vía sanguínea, y quelantes de metales.

**B.4. Deficiencia de cobre familiar
benigna (MIM121270)[92, 93]**

Se caracteriza por ser un cuadro ligado a X predominantemente, con hipocupremia y ceruloplasmina normal, con posible defecto en la absorción del cobre. El gen no ha sido identificado. Su presentación clínica se caracteriza por síndrome convulsivo, cabello ensortijado, anemia moderada y defectos óseos en miembros inferiores. Cede a terapia con cobre.

**B.5. Deficiencia de citocromo-oxidasa
(MIM220110)[45-52]**

A nivel genético, existen mutaciones tanto en genes nucleares, como en genes mitocondriales, que causan la deficiencia de este complejo enzimático, pero en relación al cobre, se han identificado mutaciones en los genes codificantes de los metalo-chaperones Sco, manifestándose tal deficien-

cia como falla hepática con desorden neurológico de presentación temprana, al parecer un cuadro esporádico, por genopatía de Sco1, y la cardiomiopatación fatal progresiva infantil (MIM604377), esporádica o familiar, por genopatía de Sco2. En algunos casos, la genopatía de Sco2, se manifiesta como la atrofia espinal muscular tipo I (MIM253300).

C. Cirrosis idiopática infantil[94, 95]

Existe descrito, un tipo especial de cirrosis hepática, que se caracteriza por marcada elevación del cobre hepático, con ceruloplasmina normal o elevada. Este cuadro es muy similar a la cuprotoxicosis de la raza de perros Bedlington Terrier, donde el gen dañado codifica la metalo-chaperona Murr1. Investigaciones epidemiológicas, han descartado en ciertas poblaciones una genopatía humana de este gen, pero aún falta un mayor tamizaje.

**D. El factor cupro-pático en la
neurodegeneración[96, 97]**

Hay una explosión de información, vinculando metales y metaloides, como disparadores de enfermedades neurodegenerativas. El cobre, no escapa a este campo, y es así que en la enfermedad de Alzheimer y las encefalopatías espongiiformes priónicas, a partir de hallazgos, de la presencia de motivos proteicos, unidores de cobre tanto en la proteína amiloide A (APP) y la proteína priónica. Todo indica, que estas proteínas, son neutralizadoras del cobre, a nivel cerebral. En la esclerosis lateral amiotrófica, la inadecuada coordinación dentro de la SOD1, parece ser uno de los elementos causantes, que hace que se active desafortunadamente la actividad peroxidasa de esta enzima. De lo anterior, se deriva el uso experimental y en un futuro, en la farmacología y terapéutica humana, de quelantes y antioxidantes.

Conclusión

El cobre es un metal que da su naturaleza óxido-reductiva, es fundamental para procesos de transferencia electrónica, amplia-

mente diversificada en el metabolismo humano, y el conocimiento de su biodinámica, permite la mejor conceptualización de ciertas entidades nosológicas humanas.

BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.nih.pubmed.gov.co>
2. <http://www.medgen.med.ualberta.ca>
3. <http://genoma.ad.jp/kegg/pqtway/map/map011100.html>
4. <http://www.nih.OMIM.gov.co>
5. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7a. ed., McGraw-Hill 2001.
6. Symposium on metal metabolism and disease. *Clin Physiol Biochem* 1986; 4: 1-111.
7. Pao EM, Mickle SJ. *Problem nutrients in the United States*. *Food Technol* 1981; 35: 58-67.
8. Block G. *Dietary guidelines and results of food consumption surveys*. *Am J Clin Nutr* 1991; 53: 3565-72.
9. Kritchevsky D. *Dietary guidelines. The rationale for intervention*. *Cancer* 1993; 72: 1011-8.
10. Olivares M, Uauy R. *Copper as an essential nutrient*. *Am J Clin Nutr* 1996; 63(Supl): 846S-52S.
11. Trumbo P, Yates AA, Schlicker S *et al*. *Dietary reference intakes: vitamina A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenium, nickel, silicon, vanadium and zinc*. *J Am Diet Assoc* 2001; 101: 294-301.
12. Pena MM, Lee J, Thiele DJ. *A delicate balance: homeostasis control of copper uptake and distribution*. *J Nutr* 1999; 129: 1251-60.
13. Csiszar K, Mariani TJ, Gosin JS *et al*. *A restriction fragment length polymorphism results in a nonconservative amino acid substitution encoded within the first exon of the human lysyl oxidase gene*. *Genomics* 1993; 16: 401-6.
14. Hamalainen ER, Kempainen R, Pihlajaniemi T *et al*. *Structure of the human lysyl oxidase gene*. *Genomics* 1993; 17: 544-8.
15. Jourdan-Le Saux C, Tronecker H, Bogic L, *et al*. *The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues*. *J Biol Chem* 1999; 274: 12939-44.
16. Jourdan-Le Saux C, Tomsche A, Ujfalusi A, *et al*. *Central nervous system, uterus, heart, and leukocyte expression of the LOXL3 gene, encoding a novel lysyl oxidase-like protein*. *Genomics* 2001; 74: 211-8.
17. Maki JM, Tikkanen H, Kivirikko KI. *Cloning and characterization of a fifth human lysyl oxidase isoenzyme: the third member of the lysyl oxidase-related subfamily with four scavenger receptor cysteine-rich domains*. *Matrix Biol* 2001; 20: 493-6.
18. Lossie AC, Eipper BA, Hand TA, *et al*. *Localization of the peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase gene (Pam) introduces a region of homology between human chromosome 5q and mouse chromosome 1*. *Mammalian Genome* 1994; 5: 738-9.
19. Alam MR, Johnson RC, Darlington DN *et al*. *Kalirin, a cytosolic protein with spectrin-like and GDP/GTP exchange factor-like domains that interacts with peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase, an integral membrane peptide-processing enzyme*. *J Biol Chem* 1997; 272: 12667-75.
20. Colomer V, Engelder S, Sharp AH *et al*. *Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) binds to a Trio-like polypeptide, with a rac1 guanine nucleotide exchange factor domain*. *Hum Molec Genet* 1997; 6: 1519-1525.
21. Imamura Y, Kubota R, Wang Y *et al*. *Human retina-specific amine oxidase (RAO): cDNA cloning, tissue expression, and chromosomal mapping*. *Genomics* 1997; 40: 277-83.
22. Imamura Y, Noda S, Mashima Y *et al*. *Human retina-specific amine oxidase: genomic structure of the gene (AOC2), alternatively spliced variant, and mRNA expression in retina*. *Genomics* 1998; 51: 293-8.
23. Smith, DJ, Salmi M, Bono P *et al*. *Cloning of vascular adhesion protein 1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule*. *J Exp Med* 1998; 188: 17-27.
24. Takahashi N, Bauman RA, Ortel TL *et al*. *Internal triplication in the structure of human ceruloplasmin*. *Proc Nat Acad Sci USA* 1983; 80: 115-9.
25. Church WR, Jernigan RL, Toole J *et al*. *Coagulation factors V and VIII and*

- ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins.* Proc Nat Acad Sci USA 1984; 81: 6934-7.
26. Roychoudhury AK, Nei M. *Human polymorphic genes: world distribution.* Editorial Oxford Univ Press 1988.
 27. Yang, F, Friedrichs WE, Cupples RL *et al.* *Human ceruloplasmin: tissue-specific expression of transcripts produced by alternative splicing.* J Biol Chem 1990; 265: 10780-5.
 28. Baumann H, Gaudie J. *The acute phase response.* Imm Today 1994; 15: 74-80.
 29. Mukhopadhyay CK, Attieh ZK, Fox PL. *Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake.* Science 1998; 279: 714-7.
 30. Harris ZL, Durlley AP, Man TK *et al.* *Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux.* Proc Nat Acad Sci USA 1999; 96: 10812-7.
 31. Fox PL. *The copper-iron chronicles: the story of an intimate relationship.* Biometals 2003; 16: 9-40.
 32. Wissler JH. *Extracellular and circulating redox- and metalloregulated eRNA and eRNP: copper ion-structured RNA cytokines (angiotropin ribokines) and bioaptamer targets imparting RNA chaperone and novel biofunctions to S100-EF-hand and disease-associated proteins.* Ann NY Acad Sci 2004;1022: 163-84.
 33. Tottey S, Harvie DR, Robinson NJ. *Understanding how cells allocate metals using metal sensors and metallochaperones.* Acc Chem Res 2005; 38: 775-83.
 34. Eisses JF, Kaplan JH. *Molecular characterization of hCTR1, the human copper uptake protein.* J Biol Chem 2002; 277: 29162-71.
 35. Klomp AEM, Tops BBJ, van den Berg IET *et al.* *Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1).* Biochem J 2002; 364: 497-505.
 36. Lee J, Pena MMO, Nose Y *et al.* *Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1.* J Biol Chem 2002; 277: 4380-7.
 37. Prohaska JR, Gybina AA. *Intracellular copper transport in mammals.* J Nutr 2004; 134: 1003-6.
 38. Andrews NC. *Mining copper transport genes.* Proc Nat Acad Sci 2001; 98: 6543-5.
 39. Hamza I, Faisst A, Prohaska J *et al.* *The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis.* Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 6848-52.
 40. Moore SDP, Helmle KE, Prat LM *et al.* *Tissue localization of the copper chaperone ATOX1 and its potential role in disease.* Mammalian Genome 2002; 13: 563-8.
 41. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA *et al.* *Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase.* Science 1999; 284: 805-8.
 42. Wong PC, Waggoner D, Subramaniam, JR *et al.* *Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase.* Proc Nat Acad Sci USA 2000; 97: 2886-91.
 43. Subramaniam JR, Lyons WE, Liu J, *et al.* *Mutant SOD1 causes motor neuron disease independent of copper chaperone-mediated copper loading.* Nature Neurosci 2002; 5: 301-7.
 44. Amaravadi R, Glerum DM, Tzagoloff A. *Isolation of a cDNA encoding the human homolog of COX17, a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment.* Hum Genet 1997; 99: 329-33.
 45. Horvath R, Lochmuller H, Stucka R, *et al.* *Characterization of human SCO1 and COX17 genes in mitochondrial cytochrome-c-oxidase deficiency.* Biochem Biophys Res Commun 2000; 276: 530-3.
 46. Punter FA, Adams DL, Glerum DM. *Characterization and localization of human COX17, a gene involved in mitochondrial copper transport.* Hum Genet 2000; 107: 69-74.
 47. Jaksch M, Ogilvie I, Yao J, *et al.* *Mutations in SCO2 are associated with a distinct form of hypertrophic cardiomyopathy and cytochrome c oxidase deficiency.* Hum Molec Genet 2000; 9: 795-801.
 48. Horvath R, Lochmuller H, Stucka R, *et al.* *Characterization of human SCO1 and COX17 genes in mitochondrial cytochrome-c-oxidase deficiency.* Biochem Biophys Res Commun 2000; 276: 530-533.
 49. Valnot I, Osmond S, Gigarel N, *et al.* *Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy.* Am J Hum Genet 2000; 67: 1104-9.
 50. Jaksch M, Horvath R, Horn N, *et al.* *Homozygosity (E140K) in SCO2 causes delayed infantile onset of cardiomyopathy and neuropathy.* Neurology 2001; 57: 1440-1446.
 51. Salviati L, Sacconi S, Rasalan MM, *et al.* *Cytochrome c oxidase deficiency due to a novel SCO2 mutation mimics Werdnig-Hoffmann disease.* Arch Neurol 2002; 59: 862-865.
 52. Tarnopolsky MA, Bourgeois JM, Fu MH, *et al.* *Novel SCO2 mutation (G1521A) presenting as*

- a spinal muscular atrophy type I phenotype.* Am J Med Genet 2004; 125A: 310-314.
53. Karin M, Eddy RL, Henry WM, *et al.* *Human metallothionein genes are clustered on chromosome 16.* Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 5494-8.
 54. Tsuji S, Kobayashi H, Uchida Y, *et al.* *Molecular cloning of human growth inhibitory factor cDNA and its down-regulation in Alzheimer's disease.* EMBO J 1992; 11: 4843-50.
 55. West AK, Stallings R, Hildebrand CE, *et al.* *Human metallothionein genes: structure of the functional locus at 16q13.* Genomics 1990; 8: 513-8.
 56. Quaipe CJ, Findley SD, Erickson JC, *et al.* *Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia.* Biochemistry 1994; 33: 7250-9.
 57. Klaassen CD, Liu J, Chudhuri S. *Metallothionein: a intracellular protein to protect against cadmium toxicity.* Ann Rev Pharmacol Toxicol 1999; 39: 267-94.
 58. Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, *et al.* *Are zinc-bound metallothionein isoforms (I+II and III) involved in impaired thymulin production and thymic involution during ageing?* Immunity & Ageing 2004; 1: 6-11.
 59. Selvaraj A, Balamurugan K, Yepiskoposyan H, *et al.* *Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes.* Genes Dev 2005; 19: 891-6.
 60. van de Sluis BJA, Breen M, Nanji M, *et al.* *Genetic mapping of the copper toxicosis locus in Bedlington terriers to dog chromosome 10, in a region syntenic to human chromosome region 2p13-p16.* Hum Molec Genet 1999; 8: 501-7.
 61. van de Sluis B, Rothuizen J, Pearson, PL *et al.* *Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population.* Hum Molec Genet 2002; 11: 165-73.
 62. Ganesh L, Burstein E, Guha-Niyogi A, *et al.* *The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD(4+) lymphocytes.* Nature 2003; 426: 853-7.
 63. de Bie P, van de Sluis B, Klomp L *et al.* *The many faces of the copper metabolism protein MURR1/COMMD1.* J Hered 2005; 96: 803-11.
 64. Millhauser GL. *Copper-binding in the prion protein.* Acc Chem Res 2004; 37: 79-85.
 65. Inestrosa NC, Cerpa W, Varela-Nallar L. *Copper brain homeostasis: role of amyloid precursor protein and prion protein.* IUBMB Life 2005; 57: 645-50.
 66. Chelly J, Tumer Z, Tonnesen T *et al.* *Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein.* Nature Genet 1993; 3: 14-9.
 67. Petris MJ, Camakaris J, Greenough M, *et al.* *A C-terminal di-leucine is required for localization of the Menkes protein in the trans-Golgi network.* Hum Molec Genet 1998; 7: 2063-2071.
 68. Petris MJ, Strausak D, Mercer JFB. *The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase.* Hum Molec Genet 2000; 9: 2845-51.
 69. Cobbold C, Ponnambalam S, Francis MJ *et al.* *Novel membrane traffic steps regulate the exocytosis of the Menkes disease ATPase.* Hum Molec Genet 2002; 11: 2855-66.
 70. Cobbold C, Coventry J, Ponnambalam S, *et al.* *The Menkes disease ATPase (ATP7A) is internalized via a Rac1-regulated, clathrin- and caveolae-independent pathway.* Hum Molec Genet 2003; 12: 1523-1533.
 71. Tao TY, Gitlin JD. *Hepatic Copper Metabolism: insights from genetic disease.* Hepatology 2003; 37: 1241-7.
 72. Kitzberger R, Madl C, Ferenci P. *Wilson disease.* Metab Brain Dis. 2005; 20: 295-302.
 73. Strand S, Hofmann WJ, Grambihler A, *et al.* *Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95(APO-1/Fas) mediated apoptosis.* Nat Med 1998; 4: 588-93.
 74. Schiefermeier M, Kollegger H, Madl C, *et al.* *The impact of apolipoprotein E genotypes on age at onset of symptoms and phenotypic expression in Wilson's disease.* Brain 2000; 123: 585-90.
 75. Hussain SP, Raja K, Amstad PA *et al.* *Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of Wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases.* Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 12770-5.
 76. Bishr Omary M, Ku Nam-On, Toivola DM. *Keratins: guardians of liver.* Hepatology 2002; 35: 251-7.
 77. Bataller R, Norrh KE, Brenner DA. *Genetic polymorphism and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal.* Hepatology 2003; 37: 493-503.
 78. Herman TE, McAlister WH, Boniface A, *et al.* *Occipital horn syndrome: additional radiographic findings in two new cases.* Pediatr Radiol 1992; 22: 363-5.
 79. Levinson B, Gitschier J, Vulpe C, *et al.* *Are X-linked cutis laxa and Menkes disease allelic?* Nature Genet 1993; 3: 6.
 80. Kaler SG, Gallo LK, Proud VK, *et al.* *Occipital horn syndrome and a mild Menkes phenotype*

- associated with splice site mutations at the MNK locus. *Nature Genet* 1994; 8: 195-202.
81. Proud VK, Mussell HG, Kaler SG, *et al.* Distinctive Menkes disease variant with occipital horns: delineation of natural history and clinical phenotype. *Am J Med Genet* 1996; 65: 44-51.
 82. Levinson B, Conant R, Schnur R *et al.* A repeated element in the regulatory region of the MNK gene and its deletion in a patient with occipital horn syndrome. *Hum. Molec. Genet* 1996; 5: 1737-42.
 83. Masson W, Hughes H, Papworth D, *et al.* Abnormalities of copper accumulation in cell lines established from nine different alleles of mottled are the same as those found in Menkes disease. *J Med Genet* 1997; 34: 729-32.
 84. Tumer Z, Horn N. *Menkes disease: recent advances and new aspects.* *J Med Genet* 1997; 34: 265-274.
 85. Christodoulou J, Danks DM, Sarkar B, *et al.* Early treatment of Menkes disease with parenteral copper (sic)-histidine: long-term follow-up of four treated patients. *Am J Med Genet* 1998; 76: 154-64.
 86. Kanumakala S, Boneh A, Zacharin M. Pamidronate treatment improves bone mineral density in children with Menkes disease. *J Inherit Metab Dis* 2002; 25: 391-8.
 87. Logan JI, Harveyson KB, Wisdom GB, *et al.* Hereditary caeruloplasmin deficiency, dementia and diabetes mellitus. *Quart J Med* 1994; 87: 663-70.
 88. Harris ZL, Takahashi Y, Miyajima H, *et al.* Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism. *Proc Nat Acad Sci USA* 1995; 92: 2539-43.
 89. Miyajima H, Nishimura Y, Mizoguchi K, *et al.* Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration. *Neurology* 1987; 37: 761-7.
 90. Roy CN, Andrews NC. *Recent advances in disorders of iron metabolism: mutations, mechanisms and modifiers.* *Hum Molec Genet* 2001; 10: 2181-6.
 91. Vassiliev V, Harris ZL, Zatta P. *Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases.* *Brain Res Rev* 2005; 49: 633-40.
 92. Mehes K, Petrovicz E. *Familial benign copper deficiency.* *Arch Dis Child* 1982; 57: 716-8.
 93. Mehes K, Petrovicz E. *Familial benign copper deficiency: an old case re-examined.* *Acta Paediat Hung* 1988; 29: 313-315.
 94. Muller T, Muller W, Feichtinge H. *Idiopathic copper toxicosis.* *Am J Clin Nutr* 1998; 67(Suppl): 1082-6S.
 95. Muller T, van de Sluis B, Zhernakova A *et al.* The canine copper toxicosis gene *Murr1* does not cause non-Wilsonian hepatic copper toxicosis. *J Hepatol* 2003; 38: 164-8.
 96. Bush AI. *The metallobiology of Alzheimer's disease.* *Trens Neurosci* 2003; 26: 207-14.
 97. Cerpa W, Varela-Nallar L, Reyes AE *et al.* *Is there a role for copper in neurodegenerative diseases?* *Mol Aspects Med.* 2005; 26: 405-20.