
METABOLISMO DO COBRE NAS EPILEPSIAS**LUÍS MARQUES DE ASSIS ***

Os conhecimentos sobre epilepsia tiveram impulso com os trabalhos de Jackson ³⁵, no século passado. Nos últimos anos investigações de ordem bioquímica adquiriram tal importância que já está consagrada a expressão "neuroquímica das epilepsias", alusiva aos processos postos em jôgo antes, durante e após a descarga epiléptica. A leitura de tratados sobre epilepsia ^{39,48} e de compêndios sobre neuroquímica⁶⁵ mostra que as pesquisas nesse sentido têm-se concentrado principalmente sobre os mecanismos despolarizantes em que entram em jôgo certos íons (potássio, cloro, sódio) e sobre os sistemas excitadores e inibidores, com referências a processos metabólicos oxidativos e ao metabolismo de glucídios e aminácidos. Existem poucos trabalhos sobre outros elementos químicos, como o cobre, nas epilepsias.

Para situar as possibilidades da neuroquímica no tocante ao estudo das epilepsias, cabe mencionar as seguintes palavras de Gibbs (cit. por Lennox e Lennox³⁹, pág. 768): À medida que os epileptólogos trocarem os níveis morfológicos estáticos de estudo, nos quais as epilepsias não são bem compreendidas, por níveis submicroscópicos e dinâmicos da química neuronal, verifica-se-há aumento de facilidades no sentido de predizer, de controlar e de compreender os fenômenos epilépticos".

No sentido de desenvolver pesquisas bioquímicas em diversas afecções neurológicas, a Clínica Neurológica e a 1.ª Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, representadas, respectivamente, pelo Prof. Horácio Martins Canelas (Chefe de Clínica) e pelo Dr. Francisco Bastos de Jorge (Chefe de Laboratório) vêm realizando pesquisas, em esforço conjugado, de alguns anos a esta parte. Coube ao primeiro a idéia de estudar o comportamento do cobre nas epilepsias, sendo as investigações iniciadas em 1962. Em 1964⁷ foram apresentados os primeiros resultados, ressaltando o aumento da cupremia e diminuição da cuprorraquia nos pacientes epilépticos, mantendo-se a ceruloplasmina do sangue em níveis normais. Além disso foi verificado que as convulsões epilépti-

Tese de Doutorado elaborada na Clínica Neurológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Prof. Adherbal Tolosa): * Médico assistente.

Nota do autor: Agradecemos aos colegas e técnicos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a feitura deste trabalho.

cas ou as provocadas pelo eletrochoque determinavam quedas significativas do teor de cobre total do soro e dos níveis de ceruloplasmina do sangue.

Esta tese complementa aquele trabalho inicial, sendo visados dois itens fundamentais que não tinham sido explorados convenientemente naquela publicação: a forma sob a qual o teor de cobre se apresenta alterado e, com utilização do curare, a influência que exerce a hiperatividade muscular própria da crise convulsiva sobre o metabolismo do cobre. Além disso foram estudadas as correlações entre sexo e idade dos pacientes epiléticos e cupremia e cuprorraquia, sendo feita, também, a correlação entre os níveis de cobre no soro e no líquido cefalorraqueano (LCR) desses pacientes.

Metabolismo do cobre em condições normais — O cobre é universalmente distribuído nos animais e na plantas. A despeito dos estudos realizados até agora, o exato significado biológico desse elemento ainda é desconhecido.

Na espécie humana, o cobre se apresenta no soro sob duas formas^{2, 8, 27, 41}: a menor parte (cerca de 7%) reage diretamente com o dietildition-carbamato sódico e está unida lâbilmente à albumina sérica (cobre de reação direta); a maior fração (93%) está unida a uma alfa-globulina e não reage diretamente com o carbomato, constituindo a ceruloplasmina. O valor médio do cobre total do soro varia um pouco, segundo diferentes pesquisadores; Cartwright e Wintrobe⁸ dão como valor médio 114 $\mu\text{g}/100$ ml. Os mesmos autores dão como 7 $\mu\text{g}/100$ ml o valor médio do cobre de reação direta e 33 mg/100 ml o valor médio da ceruloplasmina. O conteúdo de cobre da ceruloplasmina é de 3,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína. Os valores médios do cobre e da ceruloplasmina são significativamente mais elevados nas mulheres. Quando considerado um mesmo indivíduo, as variações no decorrer de dias ou de semanas não são significativas³⁶.

Embora Sarata⁵⁸ assinala elevação do cobre no sangue no período menstrual de mulheres jovens, parece que o ciclo menstrual não exerce influência significativa nesse sentido². Gubler e col.²⁸ atribuíram a hipercupremia fisiológica da gravidez a aumento da fração ceruloplasmínica; Cartwright e Wintrobe⁸, em recente revisão sobre o assunto, referem elevação do cobre total à custa do cobre de reação direta e da ceruloplasmina, no terceiro trimestre da gravidez. A esse propósito De Jorge e col.¹⁵ fizeram estudo mais completo, concluindo haver aumento progressivo do cobre total e da ceruloplasmina séricos na gravidez normal.

Os eritrócitos contém, em média, 98 μg de cobre por 100 ml de células centrifugadas. A eritrocupreína, que é uma cuproproteína, foi isolada de eritrócitos normais, sendo sua concentração média de 16 mg por 100 ml de células centrifugadas. Nas hemácias existe outra fração de cobre, não eritrocupreínica, ainda não bem avaliada⁸.

Na urina o cobre existe em quantidade muito pequena (cerca de 15 $\mu\text{g}/\text{dia}$ ⁸). Segundo de Jorge¹¹, a excreção renal do cobre depende do tipo de dieta. Nesse material a ceruloplasmina não é dosável.

No líquido cefalorraqueano a concentração do cobre é da mesma magnitude que a do cobre de reação direta do soro. Portanto, aparentemente, o

cobre de reação direita do sôro está em equilíbrio com o do líquido cefalorraqueano. A ceruloplasmina não é dosável nesse material⁸.

Além da ceruloplasmina e da eritrocupreína, existem outras proteínas cúpricas: hepatocupreína, citrocromo-oxidase, hemocupreína e tirosinase⁵⁹. Finalmente, ainda dentro das proteínas cúpricas, devemos mencionar a cerebropcupreína I, isolada por Porter e Folch⁵⁵, que contém 0,29% de cobre em sua molécula⁵⁹.

No que se refere à quantidade de cobre existente nos tecidos, Cartwright e Wintrobe⁸ encontraram maior concentração desse elemento no fígado e no cérebro; no sistema nervoso, o cobre se concentra mais no cerebelo e nos gânglios da base. Resultados semelhantes foram referidos por Tingey⁶³. Grashchenkov e Gekht²⁵ encontraram cobre em maior quantidade no globo pálido e núcleo caudado, seguindo-se o córtex, o tálamo óptico e as estruturas subtalâmicas; na substância branca dos hemisférios cerebrais o cobre foi encontrado em quantidade menor. Warren e col.⁶⁷ encontraram concentrações duas a três vezes maiores na substância cinzenta, particularmente na substância negra e locus ceruleus. Earl¹⁷ confirmou esses achados, na proporção de 29,1 $\mu\text{g/g}$ na substância cinzenta para 11,4 $\mu\text{g/g}$ na substância branca.

O cobre é absorvido nas porções superiores do trato digestivo por mecanismos ainda não perfeitamente esclarecidos. O cobre absorvido une-se fracamente à albumina sérica, sendo, então, rapidamente transportado para o fígado, medula óssea e outros órgãos, onde é armazenado e incorporado às cuproproteínas. É a partir do cobre da albumina sérica que, provavelmente em nível hepático, é sintetizada a ceruloplasmina. Esta é, em parte, armazenada no fígado, sendo o restante excretado pela bile, que é a maior via de excreção desse metal. O cobre da ceruloplasmina é fixo, sendo improvável que seja trocado ou liberado quando sob essa forma. Estudos com cobre radioativo demonstraram que o ritmo de excreção desse elemento está relacionado à concentração sérica do cobre não cerulopláminico².

Metabolismo do cobre em condições patológicas — Várias têm sido as entidades em que foi assinalado aumento da cupremia^{2, 37, 57, 66}, podendo ser citadas infecções agudas e crônicas, leucemia, doença de Hodgkin, diversas formas de anemia, policitemia vera, púrpuras, síndrome de Banti, várias afecções hepáticas, doença de Addison, diabetes, collagenoses, câncer, hipertireoidismo, hemocromatose, reações alérgicas, intoxicações, malária. Doenças neurológicas, especialmente processos desmielinizantes, têm sido estudadas no que se refere ao cobre; enquanto que em meningites³⁴ e em "certas afecções cerebrais"²³ o cobre foi encontrado em níveis superiores ao normal, nas doenças desmielinizantes nada foi concluído de maneira definitiva^{40, 51}. Sob esse aspecto, também as esquizofrenias têm sido estudadas de modo particular, sendo referida hipercupremia, embora alguns autores considerem normais os valores encontrados nessa doença^{3, 4, 5, 6, 18, 22, 30, 45, 60}.

Hipocupremia, por outro lado, é encontrada em número muito restrito de doenças, entre as quais sobressaem a moléstia de Wilson e as síndromes nefróticas.

Em intoxicações agudas e crônicas pelo cobre não têm sido descritas convulsões^{24, 38, 50, 61}. Peters e Walshe⁴⁹ injetaram ions cuprosos no espaço subaracnóideo de pombos anestesiados provocando convulsões imediatas e óbito.

Bennets e Beck (cit. por Wintrobe e col.⁶⁸) verificaram, em pombos de certas regiões da Austrália, onde o solo é pobre em cobre, o aparecimento de ataxia, que era evitada com terapêutica contendo êsse elemento; nos casos em que essa deficiência não era corrigida, ocorria desmielinização cerebral difusa e simétrica, especialmente do corpo caloso e cápsula interna.

No que se refere ao estudo do cobre nas epilepsias, até o trabalho de Plum e Hansen (1960)⁵¹ poucas investigações haviam sido desenvolvidas. As raras referências da literatura se relacionavam a pesquisas sobre o cobre em diversas afecções, entre as quais, incidentalmente, eram incluídos casos de epilepsia. Heilmeyer e col.³⁰ (1941) estudaram pacientes esquizofrênicos; no seu material incluíram três pacientes epiléticos nos quais dosaram o cobre do sangue, tendo encontrado valores acima do normal. Axtrup (cit. por Munch-Petersen⁴⁴) dosou o cobre no LCR em três grupos de pacientes, um dos quais constituído por pacientes epiléticos e doentes portadores de enxaqueca, não tendo encontrado diferenças em relação aos normais. Munch-Petersen⁴⁴ (1950) estudou um grupo de pacientes epiléticos, um grupo com afecções neurológicas diversas e um grupo de pacientes neuróticos e psicóticos, que considerou como normais do ponto de vista do metabolismo do cobre. Êste autor separou os pacientes de cada grupo em dois subgrupos: com LCR normal e anormal (no que se refere à citologia, dosagem de albumina, pesquisa de globulina e reação de Wassermann). Nessas condições o autor dosou o cobre no LCR normal de 10 pacientes com epilepsia criptogênica e um com epilepsia sintomática, e em 6 casos de epilepsia criptogênica e um de epilepsia sintomática com LCR alterado; tendo encontrado níveis de cobre variando entre 5 e 23 $\mu\text{g}/100$ ml nos doentes epiléticos, concluiu não haver diferenças significativas em relação aos demais casos estudados.

Abood e col.¹ (1957) estudaram a atividade da ceruloplasmina no sôro de, entre outros, 150 pacientes epiléticos, dos quais 119 com epilepsia psicomotora e 31 com outros tipos de epilepsia, dividindo os resultados em 4 grupos: grupo 0, sem atividade oxidásica; grupo I, com densidade óptica de 0,100 a 0,150; grupo II, com densidade óptica de 0,151 a 0,250; grupo III, com densidade óptica de 0,251 a 0,350; grupo IV, com densidade óptica maior que 0,351. Os autores consideraram, como resultados positivos, os valores dos grupos II, III e IV. Assim considerados, 22 casos de epilepsia psicomotora estavam incluídos nos grupos II e III (23% de positividade) enquanto que, das outras formas de epilepsia, 7 casos faziam parte do grupo II (7% de positividade).

Escobar e Nieto²⁰ (1957) estudaram 19 casos de epilepsia, tendo encontrado níveis séricos de cobre variando entre 90 e 200 $\mu\text{g}/100$ ml para 76 a 143 $\mu\text{g}/100$ ml no grupo considerado normal, o que dá a média de 132 para os pacientes epiléticos e 106 para os normais. O'Reilly⁴⁷ (1961), em 19 casos de epilepsia, encontrou concentrações sanguíneas de cobre variando entre 120 e

240 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ (para valores normais de 90 a 250 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$) e valores de ceruloplasmina (em densidade óptica) variando entre 0,200 e 1,200 (para valores normais de 0,250 a 0,650). Em recém-nascidos o autor encontrou níveis normais apesar do elevado teor sanguíneo materno durante a gravidez, exceto em um caso que apresentou convulsões, no qual o teor de ceruloplasmina era elevado, aproximando-se do de adultos normais. Nessas investigações, alguns dos níveis mais elevados foram obtidos em pacientes com convulsões severas.

Plum e Hansen (1960)⁵¹ foram, na verdade, os primeiros a estudar por menorizadamente o problema, investigando em três grupos de pacientes — um constituído por indivíduos normais, um de casos de esclerose múltipla e um de 109 pacientes epiléticos — tendo sido dosados o cobre e a ceruloplasmina no sangue e o cobre no LCR. A média da cupremia em 94 indivíduos normais foi de $116,81 \pm 16,40$; em 109 pacientes epiléticos a média foi de $132,89 \pm 26,62$. Esses dados nos permitiram fazer estudo estatístico, sendo encontrada uma diferença significativa ($t = 5,134$ e $P < 0,001$). A média de ceruloplasmina nos 94 indivíduos normais foi de $0,281 \pm 0,053$ ao passo que, nos 109 pacientes epiléticos, foi de $0,311 \pm 0,096$, sendo a diferença também significativa ($t = 2,699$ e $P < 0,01$). A média da cuprorraquia não estava significativamente alterada.

Canelas e col. (1964)⁷ determinaram o valor do cobre total e da ceruloplasmina do sangue e o valor do cobre total do LCR de 53 pacientes epiléticos e de 29 doentes mentais, antes e após convulsão determinada pelo eletrochoque. No grupo de pacientes epiléticos as investigações foram feitas também em relação à frequência das crises, ao tempo decorrido desde a última crise e ao tipo de anormalidade eletrencefalográfica. O cobre foi estudado também em relação à fase pós-crítica imediata. Mediante análise estatística dos resultados os autores chegaram à conclusão de que o cobre estava significativamente elevado no sôro e diminuído no LCR dos pacientes epiléticos; tanto no sôro como no LCR havia queda dos seus níveis após convulsão epilética ou provocada pelo eletrochoque. Em pacientes nos quais a crise havia ocorrido menos de 5 dias antes da colheita do material o nível de cobre do LCR era significativamente mais baixo que nos que haviam apresentado a última crise há mais de 5 dias. Concluíram os autores que, provavelmente, as alterações metabólicas do cobre nas epilepsias dependem principalmente do componente não ceruloplasmínico e tentaram correlacionar tais alterações à libertação do cobre da cerebrocupreína I e ao papel desempenhado pela citocromo-oxidase, uma cuproenzima, na gênese da energia celular.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 84 pacientes epiléticos e 32 doentes mentais, esquizofrênicos em sua maioria. Foram excluídos os casos de diagnóstico duvidoso e, nesse sentido, embora predominando o critério clínico, somente foram incluídos: a) os casos que apresentavam disritmia ao eletrencefalograma; b) aqueles que, com eletrencefalograma normal, apresentaram remissão total da sintomatologia com tratamento anticonvulsivo em período que variou entre 10 e 27 meses a partir do início do tratamento até o levantamento do material; c) aqueles que apresentaram crises epiléticas típicas presenciadas por médico. Em nenhum dos casos estudados havia

alterações neurológicas focais, nem sinais ou sintomas de hipertensão intracraniana. Em nenhum caso havia processo infeccioso febril. Exame de LCR (medida de pressão, contagem de células, dosagem de proteínas, pesquisa de globulinas, reações de fixação do complemento para sífilis e cisticercose) obtido mediante punção suboccipital foi feito em 83 casos, sendo normal em todos.

A idade dos pacientes epiléticos variou entre 10 e 59 anos; 47 eram do sexo masculino e 37 do sexo feminino; 72 eram brancos, três eram pretos e 9 eram pardos. Setenta e dois pacientes apresentaram manifestações convulsivas; desse total, 13 exibiram convulsões puras e, os demais, aura de tipo variável. Em 13 casos havia também manifestações psicomotoras. Sete pacientes apresentavam crises de ausência, em dois casos associadas a convulsões de tipo grande mal e, em 5, isoladas. Em um caso (83) apenas ocorriam crises mioclônicas. Crises atípicas ou mal caracterizadas ocorreram em 5 pacientes. O eletrencefalograma foi normal em 18 casos, tendo sido encontradas anormalidades focais em 42 casos e difusas em 24 casos.

Os doentes mentais pertenciam, em sua maioria, a sanatório particular (casos 1 a 24); os restantes (casos 25 a 32) estavam internados na Clínica Psiquiátrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A idade desses pacientes variou entre 18 e 42 anos; 28 eram do sexo masculino e 4 do sexo feminino; 25 eram brancos, 6 eram pardos e, um, amarelo. Em 26 casos foi feito o diagnóstico de esquizofrenia, em dois de neurose, em dois de debilidade mental, em um de síndrome depressiva e, em um, de psicose reativa.

Nos pacientes epiléticos foram colhidas amostras de sangue (81 casos) e de LCR (66 casos) em período intercrítico. Nos doentes mentais foram colhidas amostras de sangue antes e imediatamente após crise convulsiva determinada pelo eletrochoque simples, na fase comatosa (casos 1 a 22) e imediatamente após eletrochoque sob ação do cloridrato de succilcolina, dose de 50 ou 100 mg (casos 23 a 32).

O material foi colhido de pacientes com, pelo menos, três horas de jejum, com seringas e agulhas secas. O sangue dos pacientes epiléticos foi centrifugado logo a seguir; o dos doentes mentais foi centrifugado em tempo que oscilou entre 3 e 4 horas após a colheita do material. As dosagens eram feitas no mesmo dia ou o soro, após centrifugação, era conservado em temperatura de -10°C.

Nos casos de epilepsia foi dosado o cobre total. Em 22 casos de pacientes mentais (casos 1 a 22) foi dosada a ceruloplasmina. Nos 10 casos restantes (casos 23 a 32) foi dosado o cobre total.

O método de determinação do cobre no soro e no LCR baseou-se na reação do dietilditiocarbamato de sódio com o íon cúprico, em meio amoniacal contendo citrato e pirofosfato. A cor do dietilditiocarbamato cúprico foi estabilizada com álcool polivinílico grau 52-22¹³. A atividade da ceruloplasmina foi determinada pelo método de Houchin¹², tendo sido subtraída a leitura da coloração própria do soro. Com esses métodos foram obtidos os seguintes valores normais: cupremia 108 µg/100 ml¹⁴; cuprorraquia 43 µg/00 ml¹⁴; ceruloplasma 33,4 mg/100 ml¹². Todas as dosagens foram feitas em duplicata*.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística**. Assim é que foram comparadas as médias da cupremia e da cuprorraquia com o sexo dos pacientes, através do teste "t" de Student para comparação de duas médias. Foi estudada, também, a correlação entre a cupremia e a cuprorraquia e a idade dos pacientes epiléticos, tendo sido aplicado o teste de significância para os coeficientes de correlação assim obtidos. Ainda no que se refere aos casos de epilepsia, foi calculada a regressão entre os níveis de cobre no sangue e no LCR; o coeficiente assim obtido foi testado afirm de se saber se a inclinação da reta era significante (ao nível de 5%) ou não.

* As dosagens do cobre e da ceruloplasmina foram feitas pelo Dr. Francisco Bastos de Jorge, Médico-Chefe do Laboratório da 1.ª Clínica Médica.

** Agradecemos a orientação, na parte referente à análise estatística, dada pelo Livre-Docente Rubens Murillo Marques, do Departamento de Estatística da Faculdade de Higiene e Saúde Pública.

Quanto aos doentes mentais, foi feita inicialmente a comparação entre os níveis de ceruloplasmina antes e após eletrochoque simples, por meio do teste de duas médias quando as populações não são independentes. A seguir, o mesmo método estatístico foi aplicado em relação à cupremia antes e após eletrochoque sob ação do curare.

RESULTADOS

As concentrações do cobre do sangue e do LCR dos pacientes epiléticos constam da tabela 1. As concentrações de ceruloplasmina no soro sanguíneo, antes e

Caso	Sôro	L.C.R.	Caso	Sôro	L.C.R.
1	88	1	43	166	4
2	130	1	44	175	60
3	166	—	45	150	20
4	—	50	46	—	81
5	192	91	47	150	—
6	181	20	48	135	1
7	190	78	49	135	—
8	119	1	50	225	—
9	111	1	51	150	—
10	158	14	52	116	—
11	182	43	53	172	46
12	135	—	54	260	—
13	179	—	55	276	—
14	142	80	56	215	4
15	185	40	57	202	25
16	215	45	58	200	25
17	148	14	59	195	10
18	150	1	60	159	1
19	135	7	61	150	22
20	135	29	62	103	14
21	111	1	63	152	7
22	335	—	64	138	1
23	166	1	65	202	15
24	195	40	66	270	43
25	191	27	67	150	—
26	172	22	68	149	54
27	201	45	69	149	—
28	215	14	70	193	—
29	150	22	71	127	7
30	170	1	72	160	1
31	158	31	73	—	1
32	174	30	74	143	—
33	151	14	75	143	14
34	135	14	76	199	22
35	166	—	77	148	87
36	135	1	78	202	65
37	127	14	79	151	7
38	119	22	80	174	10
39	85	14	81	198	45
40	160	15	82	135	51
41	150	20	83	110	—
42	170	27	84	201	—

Tabela 1 — Casos de epilepsia: conteúdo de cobre total ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) do soro sanguíneo e do líquido cefalorraqueano (LCR). Valores normais: cupremia $108\ \mu\text{g}/100\text{ ml}$; cuprorraquia $43\ \mu\text{g}/100\text{ ml}$.

após eletrochoque simples, nos casos de pacientes mentais, estão consignadas na tabela 2. Os valores da cupremia antes e após eletrochoque sob ação do curare figuram na tabela 3.

Caso	Antes	Depois	Dif.	Caso	Antes	Depois	Dif.
1	32,6	33,8	+ 1,2	12	30,5	24,4	- 6,1
2	29,4	31,6	+ 2,2	13	26,4	29,4	+ 3,0
3	25,3	27,4	+ 2,1	14	26,4	22,5	- 3,9
4	31,6	36,0	+ 4,4	15	38,4	44,8	+ 6,4
5	26,4	33,8	+ 7,4	16	28,4	31,6	+ 3,2
6	21,5	21,5	0	17	37,2	38,4	+ 1,2
7	32,6	32,6	0	18	31,6	34,9	+ 3,3
8	39,2	35,0	- 4,2	19	29,4	27,0	- 2,4
9	44,0	45,4	+ 1,4	20	33,8	32,5	- 1,3
10	42,0	44,8	+ 2,8	21	29,4	29,4	0
11	27,9	30,5	+ 2,6	22	32,0	31,1	- 0,9

Tabela 2 — Casos de pacientes mentais: conteúdo de ceruloplasmina (mg/100 ml) do soro sanguíneo antes e após eletrochoque simples (Valor normal da ceruloplasmina: 33,4 mg/100 ml).

Caso	Antes	Depois	Dif.	Caso	Antes	Depois	Dif.
23	111	103	- 8	28	100	100	0
24	103	94	- 9	29	193	116	- 77
25	127	101	- 26	30	177	56	- 121
26	130	98	- 32	31	161	177	+ 16
27	110	80	- 30	32	146	177	+ 31

Tabela 3 — Casos de pacientes mentais: conteúdo do cobre total (μ g/100 ml) do soro sanguíneo antes e após eletrochoque sob ação de substância curarizante.

A comparação entre a concentração média de cobre no sangue dos pacientes epiléticos do sexo masculino e feminino, feita mediante o teste "t" de Student, para comparação de duas médias (tabela 4), comprovou a inexistência de diferença significativa ao nível de 5%, com 79 graus de liberdade ($t = 1,99$). A comparação entre a concentração média do cobre do LCR em relação ao sexo dos pacientes epiléticos (tabela 5) permitiu concluir não haver correlação significativa ao nível de diferença significativa ao nível de 5%, com 64 graus de liberdade ($t = 2,00$).

Com referência à correlação entre a cupremia e a idade dos pacientes epiléticos, o teste de significância para o coeficiente de correlação obtido (tabela 5) comprovou a inexistência de correlação significativa ao nível de 5%, com 79 graus de liberdade ($t = 1,99$). A correlação entre a cuprorraquia e a idade dos pacientes epiléticos (tabela 5) permitiu concluir não haver correlação significativa ao nível de 5%, com 64 graus de liberdade ($t = 2,00$).

O estudo da regressão entre os níveis de cobre no sangue e no LCR resultou numa reta (gráfico I) que, ajustada pelo método dos mínimos quadrados, é assim equacionada: $y = - 16,220 + 0,248 x$, na qual x e y representam, respectivamente,

os níveis de cobre no sangue e no LCR. O coeficiente de regressão foi testado, obtendo-se valor de $t = 3,12$, para 61 graus de liberdade, que foi significativa ao nível de 5% ($t = 2,00$).

O estudo comparativo entre o nível de ceruloplasmina no sangue antes e após eletrochoque simples, feito mediante o teste de duas médias quando as populações não são independentes (tabela 6) permitiu concluir não haver diferença significativa ao nível de 5%, com 21 graus de liberdade ($t = 2,08$). Estudo semelhante feito em relação aos níveis de cobre no sangue antes e após eletrochoque sob ação de substância curarizante (tabela 6) demonstrou não haver diferença significativa ao nível de 5%, com 9 graus de liberdade ($t = 2,26$).

Variáveis	Sexo	n	Média	Desvio padrão	t observado	Graus de liberdade	t crítico
Cupremia	M	44	163,04	42,54	0,20	79	1,99
	F	37	168,40	39,35			
Cuprorraquia	M	34	29,32	25,35	1,66	64	2,00
	F	32	19,90	20,73			

Tabela 4 — Comparação entre as concentrações médias do cobre no sangue e no LCR ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) em relação ao sexo dos pacientes epiléticos.

Variáveis	n	r	t observado	Graus de liberdade	t crítico
Cupremia x idade	81	-0,00069	0,0059	79	1,99
Cuprorraquia x idade	66	-0,00539	0,4348	64	2,00

Tabela 5 — Coeficientes de correlação entre as concentrações do cobre no sangue e no LCR ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) e a idade dos pacientes epiléticos.

Variáveis	n	Diferença média	Desvio padrão	t observado	Graus de liberdade	t crítico
Ceruloplasmina	22	1,01	3,22	1,47	21	2,08
Cobre total	10	25,60	44,68	1,81	9	2,26

Tabela 6 — Comparação entre o nível de ceruloplasmina do sangue ($\text{mg}/100\text{ ml}$) antes e após eletrochoque simples e entre o nível do cobre total do sangue ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) antes e após eletrochoque com curare.

COMENTARIOS

Nos estudos bioquímicos que se vêm desenvolvendo sobre epilepsia, não tem sido dado ao cobre o devido valor. No entanto, o fato de que o metabolismo desse elemento se apresenta alterado no sangue e no LCR de pacientes epiléticos é de conhecimento mais ou menos antigo, tendo sido realçado por Canelas e col.⁷.

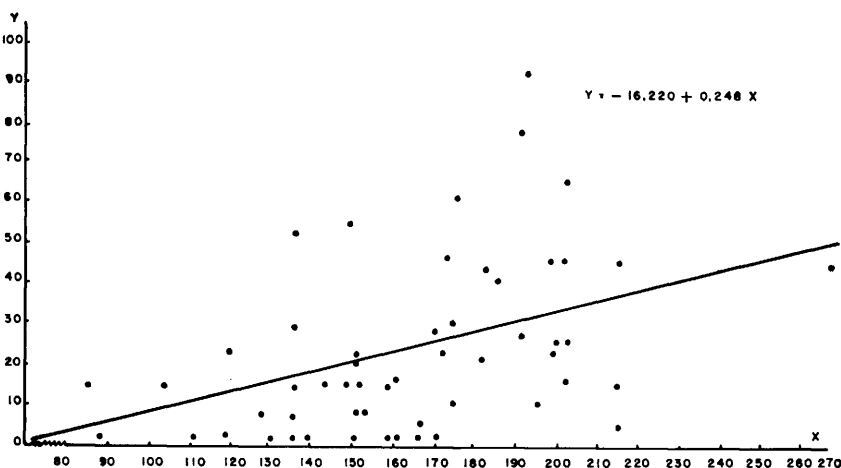


Gráfico 1 — Reta de regressão de y (cuprorraquia em $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$) sobre x (cupremia em $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$.)

Levando em conta o fato de que, em indivíduos normais, o conteúdo de cobre do sangue é significativamente mais elevado no sexo feminino, fizemos estudo comparativo, nos pacientes epiléticos, entre a concentração média do cobre do sangue e do LCR, de um lado, e sexo, do outro, não encontrando variações significativas.

Em indivíduos normais não têm sido referidas alterações da cupremia ou da cuprorraquia em relação à idade. No entanto, foram observados níveis séricos de cobre mais baixos em recém-nascidos². Para verificar se a idade dos pacientes epiléticos estudados tinha influência, ou não, sobre os níveis de cobre do sangue e do LCR, estudamos a correlação entre esses valores, não encontrando, porém, variações significativas. Com o intuito de verificar, nos pacientes epiléticos, o nível de cobre no LCR a partir do nível de cobre no sangue, fizemos uma regressão entre essas variáveis, obtendo uma reta que nos permite concluir estar o teor de cobre do LCR correlacionado com o do sangue nesses pacientes.

No estudo que fizeram, Canelas e col.⁷ sugeriram ser o componente não ceruloplasmínico do cobre o que estaria mais alterado nas epilepsias. A não significância das alterações da ceruloplasmina nos pacientes epiléticos em

período intercrítico fornecia evidências para essa conclusão. No entanto, nos casos em que a convulsão era provocada pelo eletrochoque, as alterações que ocorriam nos níveis de ceruloplasmina no sangue eram significativas (havia queda desses níveis após convulsão). Esse fato nos leva a admitir que, pelo menos por ocasião da convulsão, o cobre ceruloplasmínico desempenha algum papel nas desordens do metabolismo do cobre nas epilepsias. Levando em conta o pequeno número de casos estudados naquela ocasião (13), resolvemos investigar melhor esse aspecto do problema, utilizando 22 casos. Nessa amostra não encontramos, do ponto de vista estatístico, alterações significativas da ceruloplasmina, o que nos leva a concluir que, na verdade, somente o cobre de reação direta tem implicação nas desordens do metabolismo cúprico nas convulsões. Esse fato, conforme veremos a seguir, tem grande importância na interpretação dessas alterações.

A análise dos resultados obtidos por Canelas e col.⁷ deixou de pé alguns problemas. Assim, não ficaram esclarecidas as possíveis interferências da hiperatividade muscular da crise convulsiva sobre o comportamento do cobre. Por essa razão, para complementar o estudo, utilizamo-nos de doentes mentais, nos quais a aplicação convulsoterápica foi feita sob ação de drogas curarizantes, no sentido de eliminar os componentes musculares da crise convulsiva assim provocada. O eletrochoque já fôra utilizado como método de estudo do cobre sérico^{9, 21, 43}; entretanto, não encontramos referências a estudos bioquímicos com o emprego do eletrochoque sob ação do curare. Em nossos 10 casos estudados sob esse aspecto, o uso de substância curarizante com supressão total das manifestações musculares durante crise desencadeada pelo eletrochoque, embora tenha determinado queda dos níveis séricos do cobre, não o fez de maneira significativa. Logo, somos forçados a admitir que parte das alterações que ocorrem no cobre sérico por ocasião das crises convulsivas decorre da atividade muscular. Esse fato encontra apoio no trabalho de Costa-Foru¹⁰, que estudou 28 pacientes com neurose astênica e 19 testemunhas; o cobre foi dosado em repouso e após exercício muscular (20 genuflexões em dois minutos). Após o exercício muscular o autor observou, nos dois grupos, queda do nível de cobre no soro. Se levarmos em conta que, durante convulsão espontânea ou induzida, os músculos entram em ação em maior número e com mais intensidade que nas experiências de Costa-Foru, compreenderemos ser realmente da ação muscular que resulta, na maior parte, a queda dos níveis de cobre do sangue imediatamente após a crise.

Como se pode depreender, existem marcadas alterações do metabolismo cúprico nas epilepsias. Não sendo as funções do cobre conhecidas em toda a sua plenitude mesmo em condições normais, a interpretação dos resultados obtidos em casos patológicos se torna difícil. No entanto, dentre as funções conhecidas do cobre no organismo humano, existe uma que poderia servir de ponte entre o metabolismo desse elemento e as epilepsias. Referimo-nos ao papel desempenhado pelo cobre nos sistemas enzimáticos relacionados com processos de oxidação celular.

Durante a descarga epiléptica os neurônios cerebrais entram em hiperatividade, sendo de supor que as células nervosas se utilizem mais intensamente das matérias primas necessárias para a produção de energia. Na produ-

ção dessa energia desempenha papel importante o processo oxidativo que metaboliza a glicose e que se desenvolve em várias etapas; na última delas, no ciclo de Krebs, liberam-se elétrons e prótons que são captados por um sistema de óxido-redução do qual fazem parte nucleotídeos piridínicos, flavoproteínas e citocromos; em presença de oxigênio há formação de água, com liberação de energia, que é aproveitada para a síntese do ATP⁶⁵.

É conhecida a existência de enzimas, relacionadas a sistemas oxidativos, concentradas na mitocôndria celular⁴². Dessas enzimas, uma das mais importantes, especialmente no que se refere aos processos de oxidação celular, é a citocromo-oxidase. Schneider e Hogeboom⁶² demonstraram que mais ou menos a metade do citocromo C está na mitocôndria. Pope e col.⁵² mediante estudos experimentais em ratos, verificaram o elevado metabolismo oxidativo da substância cinzenta em relação à substância branca cerebral, confirmando que a citocromo-oxidase está ligada primariamente à substância cinzenta, especialmente ao citoplasma dos neurônios que é a principal localização citológica da mitocôndria. Estes autores concluíram afirmando que o alto metabolismo oxidativo do córtex cerebral é devido ao metabolismo das células nervosas e seus prolongamentos citoplasmáticos, não participando de maneira significativa os elementos gliais. Tais fatos foram confirmados por Du Buy¹⁶ que asseverou ser a mitocôndria cerebral o elemento que desempenha papel importante, não somente na energia utilizada para a propagação do impulso nervoso, como também em outras funções cerebrais.

Por outro lado, no cérebro humano o cobre é encontrado em concentração muito maior na substância cinzenta. A esse propósito Porter⁵³, estudando a distribuição intracelular do cobre no cérebro normal, verificou que cerca de um terço está localizado na mitocôndria. O mesmo autor⁵⁴, em 1964, assinalou que, em cérebros de indivíduos normais, para um total de 4,2 $\mu\text{g/g}$ de cobre, 0,08 $\mu\text{g/g}$ correspondem à mitocôndria.

Outra série de experiências possibilitou a conclusão de que o cobre desempenha papel importante na citocromo-oxidase. Eichel e col.¹⁹, 1950, estudando o músculo cardíaco de mamíferos haviam concluído ser provável que a citocromo-oxidase contivesse cobre; tais estudos foram confirmados 8 anos depois por Okunuki e col.⁴⁶. Em 1961, Griffiths e Wharton²⁶ isolaram e analisaram as propriedades da citocromo-oxidase da mitocôndria do coração de boi, concluindo haver fortes indícios de que a citocromo-oxidase seja um complexo citocromo A-cuproproteína e de que o cobre participe na atividade da citocromo-oxidase como transportador de elétrons. Confirmando a participação do cobre nos sistemas de óxido-redução, três outros trabalhos merecem citação. O primeiro foi feito por Gubler e col.²⁹ que provocaram deficiência de cobre em porcos verificando marcada diminuição da atividade da citocromo-oxidase. Outro foi desenvolvido por Howell e Davison³³ que estudaram a atividade da citocromo-oxidase de tecidos de cordeiros normais e com dorso enclado ("swayback lambs"); nestes animais os autores encontraram valores significativamente mais baixos que naqueles. A importância desse trabalho se torna evidente quando se recorda que os cordeiros com dorso enclado são característicos de determinadas regiões da Austrália cujo solo é pobre em cobre e que as alterações que ocorrem no sistema nervoso desses

animais são evitadas pela adição de cobre à sua dieta²⁴. Finalmente, Scheinberg⁵⁹ assinala, entre os efeitos patológicos da deficiência do cobre em animais, a diminuição da atividade da citocromo-oxidase.

Tais conhecimentos levam à conclusão de que, indiretamente, o cobre desempenha papel importante no metabolismo energético celular, com óbvias implicações na descarga neuronal. No entanto, é bastante improvável que as alterações observadas por ocasião das crises convulsivas epiléticas ou provocadas pelo eletrochoque ocorram ao nível desses sistemas enzimáticos, relacionados aos processos de oxidação celular. A esse raciocínio somos impelidos não somente em virtude da rapidez com que se processam tais fenômenos como também porque as enzimas, com ação catalisadora, provavelmente não se alteram de maneira significativa por ocasião das descargas celulares.

Correndo as alterações do metabolismo do cobre nas epilepsias por conta quase que exclusivamente do cobre ligado à albumina sérica, alguns aspectos importantes na interpretação das variações do conteúdo de cobre no sangue e no LCR por ocasião das crises convulsivas podem ser sugeridos. Sabe-se que é sob essa forma que o cobre é transportado no sangue, do trato gastrointestinal para os tecidos e de um tecido para outro; admite-se que o cobre da ceruloplasmina não tem essa capacidade. Esses achados, somados ao fato de que esse metal existe em maior concentração no fígado e no cérebro, além de ser encontrado, em valores absolutos, em maior quantidade nos músculos, devido à sua grande massa ponderal, fazem supor que exista grande facilidade na passagem desse elemento do compartimento sanguíneo para o espaço intracelular desses tecidos. Acreditamos que a rápida queda observada nos níveis sanguíneos logo após convulsão, epilética ou induzida pelo eletrochoque, só pode ser explicada dessa forma. A favor dessa hipótese depõe o trabalho de Costa-Foru⁹ que estudou 26 ratos testemunhas e 26 submetidos ao eletrochoque, tendo verificado, após as crises convulsivas, aumento da concentração de cobre no cérebro e no baço e diminuição, em níveis inconclusivos, no fígado e no rim. Estes achados e os resultados que obtivemos permitem explicar a queda abrupta dos níveis de cobre após a convulsão pela passagem rápida desse metal para os espaços intracelulares dos tecidos que mais são solicitados durante a crise convulsiva (principalmente o cérebro que descarrega maciçamente nas convulsões generalizadas e os músculos que entram em ação de maneira global e intensa nessas ocasiões). Menor oferecimento do cobre, através do sangue, ao fígado e aos rins nesse curto período, explicaria as baixas concentrações encontradas por Costa-Foru nesses órgãos.

A supressão das contrações musculares durante as crises determinadas pelo eletrochoque, com o uso de substância curarizante, seria forma indireta de comprovar tais fatos. Com esse método, verificamos haver queda dos valores séricos do cobre, em níveis não significativos. Nessas condições, as massas musculares do corpo humano permanecem em repouso, sendo provável que o cobre não penetre nas células desse tecido, continuando no sangue. Ocorrendo, nesses casos, apenas a descarga cerebral, somente nesse nível haveria passagem do cobre para os espaços intracelulares. Como, ponderalmente, existe grande diferença entre encéfalo e tecido muscular, as al-

terações determinadas pela descarga neuronal não atingiriam valores elevados de forma a determinar queda significativa da cupremia após aplicação convulsígena sob ação de substância curarizante.

Portanto, as alterações do metabolismo do cobre nas epilepsias envolvem dois fatores principais: aumento da cupremia à custa do cobre de reação direta em período intercrítico e queda significativa da cupremia após crise convulsiva epiléptica, pela passagem desse metal para os compartimento intracelulares. Dentro de nossos conhecimentos atuais a interpretação desses fatos se torna difícil.

A verificação de que o metabolismo do cobre está alterado nas epilepsias nos leva a comparar estas últimas com a doença de Wilson, atribuída a alterações metabólicas desse metal. Na degeneração hepatolenticular o defeito ocorre, provavelmente, em nível hepático, na síntese da ceruloplasmina, disso resultando que certa quantidade de cobre alcança o sangue sob forma livre, difundindo-se através dos capilares para os compartimentos intracelulares; existe queda do cobre total do soro à custa da ceruloplasmina, encontrando-se o cobre de reação direta em níveis superiores ao normal. Nas epilepsias as alterações ocorrem à custa do cobre de reação direta que, por motivos desconhecidos, durante período intercrítico não penetraria nos espaços intracelulares. O fato de que nas epilepsias o cobre, embora permanecendo em níveis altos no sangue sob forma livre, não se deposita nos tecidos, foi confirmado, indiretamente, por Rees⁵⁶ (1961) que, estudando o comportamento do cobre como veneno enzimático, assinalou que, quando esse metal se acumula nas células, inibe muitos enzimas, podendo daí resultar depressão do fornecimento energético; se a energia é indispensável para o funcionamento normal das células, o é muito mais nos estados de hiperatividade, como ocorre nas epilepsias. Além disso pode-se mencionar a raridade, para não dizer ausência, das manifestações epilépticas na doença de Wilson, tudo fazendo crer que, nessa afecção, o cobre se acumularia nas células em níveis tão elevados que bloquearia os mecanismos energéticos.

Finalmente, dentro das implicações que o metabolismo do cobre acarreta, deve-se salientar o fato da cerebropreína I diferir da hepatocupreína, da ceruloplasmina e da eritropreína pela natureza de sua ligação: enquanto nestas a ligação é firme, não havendo reação com agentes do tipo do dietilditiocarbamato, na cerebropreína I a ligação é lábil, havendo reação com o carbamato³¹. Devido a essa labilidade é possível que a cerebropreína I desempenhe importante papel durante a crise epiléptica, tanto mais quando se considera que ela contém 0,29% de cobre em sua molécula⁵⁹.

Evidentemente, não há elementos para considerarmos os distúrbios do metabolismo do cobre nas epilepsias como fator causal das convulsões. Julgamos mais prudente considerá-los, pelo menos em relação aos fenômenos que ocorrem na crise e no período pós-crítico imediato, como decorrência da hiperatividade das células nervosas e musculares.

RESUMO E CONCLUSÕES

Partindo do fato de que o metabolismo do cobre está alterado nas epilepsias, o autor estudou sob que forma essa alteração se manifesta e, me-

diante o uso de curare em pacientes mentais submetidos ao eletrochoque, a influência da hiperatividade muscular própria da crise convulsiva sobre o metabolismo do cobre. Além disso, o autor estudou as correlações entre sexo e idade dos pacientes epiléticos, de um lado, e cupremia e cuprorraquia, do outro, e fez a correlação entre os níveis de cobre do soro e do LCR desses pacientes.

Nos pacientes epiléticos (84) foram colhidas amostras de sangue (81 casos) e de LCR (66 casos) em período intercrítico para dosagem do cobre total. Nos pacientes mentais (32) foram colhidas amostras de sangue antes e imediatamente após crise convulsiva determinada pelo eletrochoque simples (22 casos) para dosagem de ceruloplasmina, e imediatamente após eletrochoque sob ação de curare (10 casos) para dosagem do cobre total.

Os resultados foram submetidos a análise estatística, tendo o autor chegado às seguintes conclusões: 1) o nível de cobre do sangue e do LCR dos pacientes epiléticos não depende do sexo nem da idade; 2) o teor de cobre do LCR está correlacionado com o do sangue nos pacientes epiléticos; 3) a supressão, mediante o uso de substância curarizante, das manifestações musculares da crise produzida pelo eletrochoque acarreta queda não significativa do nível de cobre do sangue; 4) a queda do nível de cobre do sangue após convulsões determinadas pelo eletrochoque depende da hiperatividade muscular que caracteriza a crise convulsiva; 5) a queda do nível de cobre do sangue após convulsões determinadas pelo eletrochoque depende principalmente do cobre de reação direta; 6) a queda dos níveis de cobre do sangue após convulsões determinadas pelo eletrochoque é devida à passagem desse elemento para os espaços intracelulares.

SUMMARY

Copper metabolism in the epilepsies

Since copper metabolism is disturbed in the epilepsies, the author studied in what form this alterations occurs and, by means of curare-like drugs in mental patients submitted to electroshock, the role played by convulsive induced muscular hyperactivity on copper metabolism is analysed. The author studied also the correlations of sex and age with blood and cerebrospinal copper levels in the epileptic patients.

Eight four epileptic patients were studied. Copper was determined in blood samples (81 cases) and cerebrospinal fluid samples (66 cases). In the mental patients (32 cases) blood ceruloplasmin was determined (22 cases) just after electroshock and blood copper was determined (10 cases) just after electroshock under curare-like drugs.

The results were submitted to the conventional statistical analysis and the following conclusions were drawn: 1) the blood and cerebrospinal fluid copper is not dependent on sex or age; 2) the cerebrospinal fluid copper is correlated to the blood copper levels in the epileptic patients; 3) with the supression of the electroshock induced convulsive muscular activity through

curare-like drugs, the fall of blood copper content is not significant; 4) the fall of blood copper levels after the electroshock induced convulsion depends on the convulsive muscular hyperactivity; 5) the fall of the blood copper content after electroshock induced is due to the passage of direct reacting copper into cells.

REFERÊNCIAS

1. ABOOD, L. G.; GIBBS, F. A. & GIBBS, E. — Comparative study in blood ceruloplasmin in schizophrenia and other disorders. Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago) 77:643-645, 1957.
2. ADELSTEIN, J. & VALLEE, B. L. — Cooper metabolism in man. New Engl. J. Med. 265:892-897 e 941-946, 1961.
3. ANGEL, C.; LEACH, B. E.; MARTENS, S.; COHEN, M. & HEATH, R. G. — Serum oxidation tests in schizophrenic and normal subjects. Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago). 78:500-504, 1957.
4. BAKWIN, R. M.; MOSBACH, E. H. & BAKWIN, H. — Ceruloplasmin activity in the serum of children with schizophrenia. Pediatrics. 22:905-909, 1958.
5. BAKWIN, R. M.; MOSBACH, E. H. & BAKWIN, H. — Concentration of cooper in serum of children with schizophrenia. Pediatrics. 27:642-644, 1961.
6. BOVI, A. & MASCELLANI, A. — Determinazione del tasso di rame serico negli schizofrenici. G. Psychiat. Neuropat. 86:163-173, 1958.
7. CANELAS, H. M.; ASSIS, L. M.; DE JORGE, F. B.; TOLOSA, A. P. M & CINTRA, A.B.U. — Disorders of copper metabolism in epilepsy. Acta neurol. scand. 40:97-106, 1964.
8. CARTWRIGHT, G. E. & WINTROBE, M. M. — Copper metabolism in normal subjects. Amer. J. clin. Nutr. 14:224-232, 1964.
9. COSTA-FORU, D. — Modificarile cuprului din creier, ficat, rinichi, splina si sange determinate de accesul convulsiv experimental la sobolani. Stud. Cercet. Neurol. 6:125-129, 1961.
10. COSTA-FORU, D. — Influenta efortului fizic asupra nivelului cuprului sanguin in nevrosa astenica. Stud. Cercet. Neurol. 6:320-323, 1961.
11. DE JORGE, F. B. — Alguns Aspectos do Metabolismo do Cobre. Monografia publicada pelo Serviço de Documentação da Reitoria da Universidade de São Paulo, Cidade Universitária, São Paulo, 1965.
12. DE JORGE, F. B. & CANELAS, H. M. — Contribuição ao estudo da ceruloplasmina. Valores normais no soro sanguíneo. Arq. Neuro-Psiquiat. 22:271-276, 1964.
13. DE JORGE, F. B.; CANELAS, H. M. & COSTA-SILVA, A. — Contribuição ao estudo do metabolismo do cobre. Metodologia da determinação do cobre em materiais biológicos. Rev. paul. Med. 61:350-355, 1962.
14. DE JORGE, F. B.; CANELAS, H. M. & SPINA-FRANÇA, A. — Contribuição ao estudo do metabolismo do cobre. Valores normais no soro sanguíneo, líquido cefalorraqueano e urina. Rev. paul. Med. 62:125-128, 1963.
15. DE JORGE, F. B.; DELASCIO, D. & ANTUNES, M. L. — Copper and copper oxidase concentrations in the blood serum of normal and pregnant women. Obstet. and Gynec. 26:225-227, 1965.
16. DU BUY, H. G. — Mitochondria in brain as the sites of its metabolic activity. Neurology (Minneapolis) 8, supl. 1:69-71, 1958.
17. EARL, C. J. — Anatomical distribution of copper in human brain. In Walshe, J. M. & Cumings, J. N. — Wilson's Disease. Some Current Concepts. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1961, pp. 18-23.
18. EDELSTEIN, E. L.; KRASSILOWSKI, D. & GDALIA, J. — A study on serum copper level in 20 acute schizophrenics. J. ment. Sci. 105:511-513, 1959.
19. EICHEL, B.; WAINIO, W. W.; PERSON, P. & COOPERSTEIN, S. J. A partial separation and characterization of cytochrome oxidase and cytochrome b. J. biol. Chem. 183:89-103, 1950.
20. ESCOBAR, A. I. & NIETO, D. — The role of copper in mental disorders. Bol. Inst. Estud. méd. biol. Mexico. 15:159-170, 1957.
21. FERRONI, A. & INDOVINA, I. — Variazioni della cupremia consecutiva ad elettroshock ed elettroassenza. Acta neurol. (Napoli). 5:291-299, 1950.
22. FROHMAN, C. E.; GOODMAN, M.; LUBY, E. D.; BECKETT, P.G.S. & SENF, R. — Ceruloplasmin, transferrin and tryptophan in schizophrenia. Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago). 79:730-734, 1958.
23. GEKHT, B. M. — Soderzhanie medi v sivorotke krovi v norme i u bolnich nekotornih zabolevaniyamis godovno-gomozga (Resumo em francês: Le contenu de cuivre dans le serum sanguin dans la norme et chez les malades atteints de certaines affections cérébrales organiques). Zh. Nevropat. Psikhiat. 61:707-712, 1961.
24. GOODMAN, L. S. & GILMAN, R. —

- A. — The Pharmacological Basis of Therapeutics. The Mac Millan Co., New York, 1955, pp. 1468-1472. 25. GRASHCHENKOV, N. I. & GEKHT, B. M. — Cooper content of brain tissues in health and in certain nervous diseases. *Exp. Neurol.* 2: 573-580, 1960. 26. GRIFFITHS, D. E. & WHARTON, D. C. — Purification and properties of cytochrome oxidase. *Bioch. biophys. Res. Comun.* 4:151-155, 1961. 27. GUBLER, C. J. — Cooper metabolism in man. *J. Amer. Med. Ass.* 161:530-535, 1956. 28. GUBLER, C. J.; LAHEY, M. E.; CARTWRIGHT, G. E. & WINTROBE, M. M. — Studies on copper metabolism. The transportation of copper in blood. *J. clin. Invest.* 32:405-414, 1953. 29. GUBLER, C. J.; CARTWRIGHT, G. E. & WINTROBE, M. M. — Studies on copper metabolism: enzyme activities and iron metabolism in copper and iron deficiencies. *J. biol. Chem.* 224:533-546, 1957. 30. HEILMEYER, L.; KEIDERLING W. & STUWE, G. — Kupfer und Eisen als korpereigene Wirkstoffe und ihre Bedeutung beim Krankheitsgeschehen. G. Fischer, Yena, 1941. 31. HOLMBERG, C. G. — Development of knowledge of ceruloplasmin. *In* Walshe, J. M. & Cumings, J. N. — Wilson's Disease. Some Current Concepts. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1961, pp. 64-68. 32. HOUCHIN, O. B. — A rapid colorimetric method for the quantitative determination of copper oxidase activity (ceruloplasmin). *Clin. Chem.* 4:519-523, 1958. 33. HOWELL, J. McC. & DAVISON, A. N. — Copper content and cytochrome oxidase activity of tissues from normal and swayback lambs. *Biochem. J.* 72:365-368, 1959. 34. ICHTENKO, M. M. — Soderzhanie medi i margantsa v spinnomoegovoi zhidkosti pri meningitakh u detei (Resumo em francês: Le contenu de cuivre et de manganèse dans le liquide céphalo-rachidien chez les enfants atteints de méningites). *Zh. Nevropat. Psikhiat.* 61:979-983, 1961. 35. JACKSON, J. H. — On the scientific and empirical investigations of epilepsies. *In* Taylor, J. — Selected writings of John Hughlings Jackson. Hodder and Stoughton Ltd., London, 1931, pp. 162-273. 36. LAHEY, M. E.; GUBLER, C. J.; CARTWRIGHT, G. E. & WINTROBE, M. M. — Studies on copper metabolism. Blood copper in normal human subjects. *J. clin. Invest.* 32:322-328, 1953. 37. LAHEY, M. E.; GUBLER, C. J.; CARTWRIGHT, G. E. & WINTROBE, M. M. — Studies on copper metabolism. Blood copper in pregnancy and in various pathologic states. *J. clin. Invest.* 32:329-339, 1953. 38. LAROCHE, C. & GENNES, J. L. — Intoxication aigue avec hémolyse par le sulfate de cuivre. Exsanguino-transfusion. *Guérison. Bull. Soc. méd. Hôp. Paris.* 71:133-139, 1955. 39. LENNOX, W. C. & LENNOX, M. A. — Epilepsy and Related Disorders. Little-Brown Co., Boston, 1960. 40. MANDELBROTE, B. M.; STANIER, M. W.; THOMPSON, R. H. S. & THRUSTON, M. N. — Studies on copper metabolism in demyelinating diseases of the central nervous system. *Brain*, 71:212-228, 1948. 41. Mc ELROY, W. D. & GLASS, B. — Copper Metabolism. John Hopkins Press, Baltimore, 1950. 42. Mc ILWAIN, H. *Biochemistry and Central Nervous System.* J. & A. Churchill Ltd., London, 1955. 43. MISON-CRIGUEL, N.; LASCAR-CONSTANTINESCU, E.; LUCA, N. & COSTA-FORU, D. — Modificari biochemice in singele eferente cerebrali si in circulatia generala dupa accese convulsive experimentale repetate. *Stud. Cercet. Neurol.* 3:415-429, 1958. 44. MUNCH-PETERSEN, S. — The copper content in cerebrospinal fluid in adults and children with and without sufferings in the central nervous system. *Acta psychiat. scand.* 25:251-268, 1950. 45. MUNCH-PETERSEN, S. — On serum copper in patients with schizophrenia. *Acta psychiat. scand.* 25:423-427, 1950. 46. OKUNUKI, K.; SEKUSU, I. & TAKEMORI, S. — Studies on cytochrome A: extraction, purification and some properties of cytochrome A. *J. Biochem. (Tokyo).* 45:847-854, 1958. 47. O'REILLY, S. — Observations on ceruloplasmin and methods for its estimation. *Neurology (Minneapolis).* 11:259-265, 1961. 48. PENFIELD, W. & JASPER, H. — Epilepsy and Functional Anatomy of the Human Brain. Little-Brown Co., Boston, 1954. 49. PETERS, R. A. & WALSHE, J. M. — The toxicity of copper in the brain of the pigeon and its attempted reversal. *Acta neurol. scand. Supl.* 1:70-71, 1962. 50. PHILIPPI, F.; CABEZAS, J.; ILIANES, A. & MEZA, C. — Intoxicación por sulfato de cobre. *Rev. méd. Chile.* 76:20-25, 1948. 51. PLUM, C. M. & HANSEN, S. E. — Studies on variation in serum copper and serum copper oxidase activity, together with studies on the copper content of the cerebrospinal fluid, with particular reference to the variations in multiple sclerosis. *Acta psychiat. scand. Supl.* 148:41-78, 1960. 52. POPE, A.; HESS, H. H.; WARE, J. R. & THOMSON, R. H. — Intralaminar distribution of cytochrome oxidase and DPN in rat cerebral cortex. *J. Neurophysiol.* 19:259-270. 1956. 53.

PORTER, H. — Copper protein combinations in the brain in Wilson's disease. *In* Walshe, J. M. & Cumings, J. N. Wilson's Disease. Some Current Concepts. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1961, pp. 24-35. 54. PORTER, H. — Tissue copper protein in Wilson's disease. *Arch. Neurol. (Chicago)*. 11:341,349, 1964. 55. PORTER, H. & FOLCH, J. — Brain copper-protein fractions in the normal and in Wilson's disease. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chicago)*. 77:8-16, 1957. 56. REES, K. R. — Copper as an enzyme poison. *In* Walshe, J. M. & Cumings, J. N. — Wilson's Disease. Some Current Concepts. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1961, pp. 46-60. 57. SACHS, A. LEVINE, V. E. & FABIAN, A. P. — Copper and iron in human blood. Normal men and women. *Arch. intern. Med.* 55:227-253, 1935. 58. SARATA, U. — Studies in the biochemistry of copper. Copper in relation to the menstruation and pregnancy, with the copper content of men's blood. *Jap. J. med. Sci. II. Biochem.* 3:1-8, 1935. 59. SCHEINBERG, H. — Copper metabolism: a review. *In* Walshé, J. M. & Cumings, J. N. — Wilson's Disease. Some Current Concepts. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1961, pp. 4-17. 60. SCHEINBERG, H. & MORELL, A. G. — Concentration of ceruloplasmin in plasma of schizophrenic patients. *Science* 126:925-926, 1957. 61. SCHEINBERG, H. & STERNLIEB, I. — Copper metabolism. *Pharmacol. Rev.* 12:355-381, 1960. 62. SCHNEIDER, W. C. & HOGEBON, G. H. — Intracellular distribution of enzymes. Further studies on distribution of cytochrome C in rat liver homogenates. *J. biol. Chem.* 183:123-128, 1950. 63. TINGEY, A. H. — Iron, copper and manganese content of human brain. *J. ment. Sci.* 83:452-460, 1937. 64. TOWER, D. B. — Origins and development of neurochemistry. *Neurology (Minneapolis)* 8, supl. 1:3-31, 1958. 65. TOWER, D. B. — Neurochemistry of Epilepsy. Charles C. Thomas, Springfield (Illinois), 1960, pp. 24-63. 66. TURPIN, R.; JEROME, H. & Mme. SCHMITT-JUBEAU — Variations physio-pathologiques de la cuprémie chez l'enfant. *Sem. Hôp. Paris.* 29:2297-2308, 1953. 67. WARREN, P. J.; EARL, C. J. & THOMPSON, R. H. S. — The distribution of copper in human brain. *Brain.* 83:709-717, 1960. 68. WINTROBE, M. M.; CARTWRIGHT, G. E. & GUBLER, C. J. — Studies on the functions and metabolism of copper. *J. Nutr.* 50:395-419, 1953.

*Clínica Neurológica — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
— Caixa Postal 3461 — São Paulo, SP. Brasil.*