

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**KAROLINI ZUQUI NUNES**

**SOBRECARGA AGUDA DE COBRE INDUZ DISFUNÇÃO  
VASCULAR EM AORTAS: PAPEL DO ESTRESSE  
OXIDATIVO E AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO  
NÍTRICO**

VITÓRIA

2018

**KAROLINI ZUQUI NUNES**

**SOBRECARGA AGUDA DE COBRE INDUZ DISFUNÇÃO  
VASCULAR EM AORTAS: PAPEL DO ESTRESSE  
OXIDATIVO E AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO  
NÍTRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Dr<sup>o</sup>. Dalton Valentim Vassallo

Vitória

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

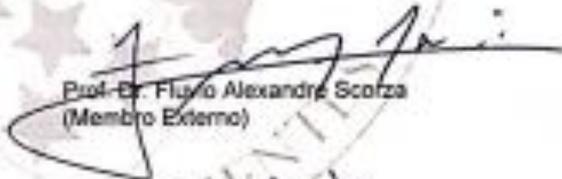
REGISTRO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE TESE DA CANDIDATA AO  
TÍTULO DE DOUTORA PELO PPGCF/CCS/UFES

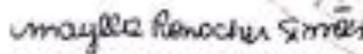
Nº Matricula do<sup>(a)</sup> Candidato<sup>(a)</sup>: 2015141553

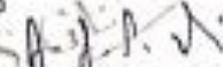
A Comissão Julgadora que examinou a Tese de Doutorado, intitulada "Sobrecarga Aguda de Cobre Induz Disfunção Vascular em Aortas: Papel do Estresse Oxidativo e Aumento da Produção de Óxido Nítrico", apresentada e defendida publicamente pela aluna Karolini Zuqui Nunes, no dia 30 de julho de 2018, às 09h30, decidiu, por unanimidade, aprovar a referida tese de Doutorado e, portanto, declara que a aluna faz jus à obtenção do Título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

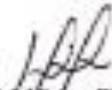
Vitória – ES, 30 de julho de 2018.

  
Prof. Dr. Dalton Valério Vassallo  
(Orientador)

  
Prof. Dr. Flávio Alexandre Scorza  
(Membro Externo)

  
Prof. Dr. Maylla Ronacher Simões  
(Membro Interno)

  
Prof. Dr. José Guilherme Pinheiro Pires  
(Membro Externo)

  
Prof. Dr. Midan Fiorese  
(Membro Externo)

Observação: Documento de tramitação interna da Ufes. Não é comprovante de conclusão de curso.  
Av. Marechal Campos 1468, Vitória - ES 29043-910 - Brasil.  
Tel.: 0XX(27) 3335-7340 Fax: 3335-7330

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)

---

N972s Nunes, Karolini Zuqui, 1990 -  
Sobrecarga aguda de cobre induz disfunção vascular em aortas : papel  
do estresse oxidativo e aumento da produção de óxido nítrico / Karolini Zuqui  
Nunes - 2018.  
100 f. : il.

Orientador: Dalton Valentim Vassallo.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do  
Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Cobre. 2. Aorta. 3. Estresse Oxidativo. 4. Óxido Nítrico. 5. Peróxido de  
Hidrogênio. I. Vassallo, Dalton Valentim. II. Universidade Federal do Espírito  
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 612

---

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus pela minha vida, por ser essa força que me movimenta e por ter me guiado até aqui. Agradeço, sobretudo por tornar meu caminho iluminado, pelas oportunidades que já tive na vida e por ter me permitido viver com tantas pessoas maravilhosas.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais e minha irmã, pelas orações, pelo incentivo, pela educação e por terem abdicado de tantas coisas por mim. Sem a paz e força que me proporcionam não teria chegado até aqui.

Agradeço especialmente ao Chefe, essa pessoa iluminada e maravilhosa que apareceu em minha vida e que me deu a oportunidade de estar vivendo essa felicidade! Chefe, obrigada pelos ensinamentos, conselhos, orientações e por me permitir fazer parte do laboratório. Gostaria de deixar a minha admiração por você e dizer o quanto te adoro e considero uma pessoa de coração maravilhoso!

Dentre tantas pessoas maravilhosas que Deus colocou em minha vida, me presenteou com uma especialmente responsável por estar aqui! Desde o período da faculdade, minha admiração por ela existe e só aumenta! Mirinha, obrigada por ter confiado em mim, por tantos ensinamentos e por hoje me permitir fazer parte da sua vida como sua amiga! Obrigada por tanto carinho e cuidado comigo. Você é luz em minha vida!

Agradeço a Dieli, minha amiga querida, um anjo na minha vida! Obrigada por estar sempre presente, por tantos conselhos, pela paciência de me ensinar tanta coisa no laboratório e por sempre me permitir compartilhar com você minha vida!

Agradeço a todos os meus amigos pelo companheirismo e pela força, em especial aos meus amigos do LEMC que me ajudaram a concluir essa etapa, me auxiliando nos experimentos, colaborando com as ideias e tornando o ambiente de trabalho um lugar alegre.

Obrigada a Cindy pela amizade, companheirismo e pela parceria nos trabalhos e ao Vinícius Bermond pela colaboração neste estudo.

Agradeço a todos os profissionais que colaboraram com meu doutorado, em especial ao Anderson, profissional totalmente competente e admirável, obrigada por me auxiliar no preparo das soluções. Agradeço a Cintia, nossa excelente secretária, sempre disponível a ajudar. E ao Rodolfo, nosso veterinário, que cuida com tanta dedicação dos nossos animais.

Agradeço a todos os professores que tive na vida, que contribuíram com meu processo de formação. À banca examinadora, obrigada pelas correções, contribuições e disponibilidade. E agradeço especialmente ao professor Fulvio, pessoa maravilhosa, pela colaboração com o projeto da epilepsia, que também foi realizado ao longo do período de doutorado.

Agradeço as agências de fomento: CNPq, CAPES e FAPES.

A vida é o que acontece enquanto você está  
ocupado fazendo outros planos.

(John Lennon)

## Resumo

A homeostase do cobre é essencial para o bom funcionamento do corpo. A deficiência e a sobrecarga deste metal podem levar ao desenvolvimento de patologias, inclusive no sistema cardiovascular. Não são conhecidos os mecanismos envolvidos nas alterações vasculares promovidas em situações de toxicidade com o cobre. Sendo assim o objetivo desse estudo foi investigar as alterações da reatividade vascular promovidas pela sobrecarga de cobre (Cu). A aorta torácica obtida de ratos *Wistar* foi dissecada, segmentada e exposta por 1 h a 10 µg/mL de CuCl<sub>2</sub>. A exposição ao Cu diminuiu a resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta (Ct: 104 ± 6,1 vs Cu: 80 ± 6,0). A remoção do endotélio e a subsequente administração de éster metílico de N-nitro-L-arginina (L-NAME), tetrahidrobiopterina (BH4), aminoguanidina, ácido dietilditiocarbâmico (DETCA), catalase ou tetraetilamônio (TEA) aumentaram as respostas contráteis à fenilefrina (Ct L-NAME: 135 ± 8,1 vs Cu L-NAME: 156 ± 12,1; Ct BH4: 99 ± 6,9 vs Cu BH4: 104 ± 3,5; Ct Aminoguanidina: 90 ± 8,3 vs Cu Aminoguanidina: 96 ± 6,8; Ct DETCA: 117 ± 3,2 vs Cu DETCA: 154 ± 14,1; Ct Catalase: 109 ± 6,2 vs Cu Catalase: 113 ± 9,3; Ct TEA: 110 ± 16 vs Cu TEA: 121 ± 12,1). As incubações com apocinina e tiron aumentaram a sensibilidade à fenilefrina (Ct Apocinina: 5,5 ± 0,2 vs Cu Apocinina: 6,8 ± 0,3; Ct Tiron: 6,7 ± 0,06 vs Cu Tiron: 6,8 ± 0,3). Os dados demonstraram que altas concentrações de Cu reduziram a reatividade vascular induzida por fenilefrina, o que foi associada com o aumento da produção de óxido nítrico (NO), atribuída à ativação da sintase induzida do óxido nítrico e níveis elevados de peróxido de hidrogênio, provavelmente relacionado a um aumento na atividade da superóxido dismutase (SOD) e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estes efeitos da sobrecarga de cobre sugerem que este metal é um fator de risco para doenças cardiovasculares.

**Palavras-chave:** cobre, aorta, estresse oxidativo, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio.

## Abstract

Copper homeostasis is essential for the proper functioning of the body. The deficiency and the overload of this metal can lead to the development of pathologies, including the cardiovascular system. The mechanisms involved in vascular changes promoted in situations of copper toxicity are not known. Therefore, in this study we investigated the changes in vascular reactivity promoted by copper (Cu) overload. Thoracic aorta obtained from male Wistar rats was cut into rings and exposed for 1h to 10 $\mu$ g/mL CuCl<sub>2</sub>. Exposure to Cu decreased the contractile responses of aortic rings to phenylephrine (PHE). Removal of the endothelium and subsequent administration of, N-nitro-L arginine methyl ester (L-NAME), tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), aminoguanidine, diethyldithiocarbamic acid (DETCA), catalase or tetraethylammonium (TEA), increased contractile responses fenilefrina (Ct L-NAME: 135  $\pm$  8,1 vs Cu L-NAME: 156  $\pm$  12,1; Ct BH<sub>4</sub>: 99  $\pm$  6,9 vs Cu BH<sub>4</sub>: 104  $\pm$  3,5; Ct Aminoguanidine: 90  $\pm$  8,3 vs Cu Aminoguanidine: 96  $\pm$  6,8; Ct DETCA: 117  $\pm$  3,2 vs Cu DETCA: 154  $\pm$  14,1; Ct Catalase: 109  $\pm$  6,2 vs Cu Catalase: 113  $\pm$  9,3; Ct TEA: 110  $\pm$  16 vs Cu TEA: 121  $\pm$  12,1). Incubation with apocinyn and tiron enhanced the sensitivity to PHE (Ct Apocinyn: 5,5  $\pm$  0,2 vs Cu Apocinyn: 6,8  $\pm$  0,3; Ct Tiron: 6,7  $\pm$  0,06 vs Cu Tiron: 6,8  $\pm$  0,3). Results demonstrated that high concentrations of Cu reduced PHE-induced vascular reactivity which was associated with an increased production of nitric oxide (NO), attributed to the activation of the inducible nitric oxide synthase and elevated levels of hydrogen peroxide probably related to a rise in superoxide dismutase (SOD) activity and reactive oxygen species (ROS) generation. These effects of copper overload suggest that this metal is a risk factor for cardiovascular disease.

**Keywords:** copper, aorta, oxidative stress, nitric oxide, hydrogen peroxide.

## Lista de Figuras

**Figura 1:** Modelo de captação e metabolismo do cobre nos hepatócitos. Atravessando a membrana plasmática através de Ctr1 ou DMT1, a maior parte do cobre é transportada para a rede trans de Golgi (TGN) pelo acompanhante Hah1 / Atox1, que fornece Cu para a ATPase do tipo P localizada no TGN. No caso dos hepatócitos, é ATP7B ou WND, a proteína defeituosa na doença de Wilson. Nos enterócitos, é ATP7A ou MNK, a proteína defeituosa na doença de Menkes. A proteína chaperona, Ccs, fornece Cu à superóxido dismutase Cu/Zn citosólica (SOD), que dissolve o superóxido em peróxido de hidrogênio. Cox17 fornece Cu à mitocôndria, onde é necessário para a citocromo c oxidase. A glutathione (GSH) também pode ser uma chaperona, ligando  $\text{Cu}^{1+}$  e entregando-a a metalotioneína (MT) e a algumas apoenzimas dependentes de cobre, como a SOD (CARROLL et al., 2004).....26

**Figura 2:** Sob estímulo da Acetilcolina, o NO produzido pela célula endotelial difunde-se para a célula e lúmen vascular. No interior da célula ele interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC), acarretando uma alteração na conformação desta enzima, ativando-a. Esta enzima catalisa a saída de dois grupamentos fosfatos da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento de GMPc resulta no relaxamento desta célula muscular lisa. Adaptado de: Motifolio (2018).....36

**Figura 3:** Funções importantes das três isoformas do NOS. A NOS neuronal é expressa em neurônios específicos do sistema nervoso central (SNC). Foi implicado na plasticidade sináptica (fenômenos que estão envolvidos na aprendizagem e na formação da memória), controle central da pressão arterial, mediador de componentes relaxantes do peristaltismo intestinal, vasodilatação e ereção peniana. A expressão induzível da NOS pode ser induzida por citocinas e outros agentes em quase qualquer tipo de célula. Inicialmente, isso foi mostrado para macrófagos. É essencial para o controle de bactérias intracelulares, entretanto, também é regulada positivamente em vários tipos de doença inflamatória, e o NO gerado pela enzima media o desenvolvimento de vários sintomas de inflamação. Finalmente, o NO

induzido por NOS é o mediador predominante da vasodilatação e queda da pressão arterial vista no choque séptico. O NO liberado em direção ao lúmen vascular é um potente inibidor da agregação plaquetária e da adesão à parede vascular, controla a expressão de genes envolvidos na aterogênese e diminui a permeabilidade endotelial. Adaptado de: Fostermann; Sessa (2012).....37

**Figura 4:** (A) Os monômeros de NOS são capazes de transferir elétrons de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) reduzido, para flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) e flavinmononucleotídeo (FMN) e têm uma capacidade limitada para reduzir o oxigênio molecular a superóxido. Os monômeros da NOS são incapazes de se ligar ao cofator tetrahydrobiopterina (BH4) ou o substrato l-arginina e não podem catalisar a produção de NO. (B) Na presença de heme, a NOS pode formar um dímero funcional. Quando substrato suficiente, l-arginina (l-Arg) e cofator BH4 estão presentes, os dímeros de NOS intactos acoplam sua redução de heme e O<sub>2</sub> à síntese de NO (NOS totalmente funcional). Todas as isoformas NOS contêm um íon zinco (Zn) que é de grande importância para a ligação de BH4 e l-arginina. Adaptado de: Fostermann; Sessa (2012).....38

**Figura 5:** A eNOS converte a L-arginina em óxido nítrico (NO). A atividade da eNOS é determinada pela concentração de cálcio intracelular [i (Ca<sup>2+</sup>)] e / ou seu estado de fosforilação (P) em diferentes locais. Além disso, a atividade da eNOS é inibida por sua interação com a caveolina-1, enquanto a associação da eNOS com a proteína de choque térmico 90 (hsp90) favorece sua ativação. Em situações de disfunção endotelial, a síntese de NO é comprometida porque a atividade da eNOS pode estar diminuída devido ao aumento da expressão e interação com caveolina, redução da expressão e associação com hsp90, redução da fosforilação de S1177 e aumento da fosforilação de T494. Além disso, a disponibilidade reduzida de L-arginina e tetrahydrobiopterina (BH4) induz o desacoplamento da eNOS ou altera a enzima para um estado que favoreça a geração de ânion superóxido. Em situações de inflamação vascular induzida por NF-κB a iNOS pode estar regulada positivamente produzindo altos níveis de NO. O NO reage diretamente com o · ânion superóxido produzido pela eNOS desacoplada e por outras fontes vasculares, gerando a peroxinitrito reativo (ONOO<sup>-</sup>), que contribui para a disfunção vascular. Adaptado de: Cau et al. (2012).....39

**Figura 6:** Em situações que alteram o funcionamento vascular (como diabetes, hipertensão, hipercolesterolemia, etc) as NADPH-oxidases e a expressão da NOS são reguladas positivamente na parede vascular e geram superóxido. Os produtos de NADPH oxidases e NOS endotelial ( $O^{2-}$  e NO), rapidamente se recombina para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Isso pode oxidar o cofator essencial da NOS tetrahydrobiopterina (BH4) levando ao desacoplamento da eNOS contribuindo para o estresse oxidativo vascular. Modificado de: Fostermann; Sessa (2012).....43

**Figura 7:** A contração do músculo liso vascular é a soma da atividade da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e da fosfatase de cadeia leve da miosina (MLCP). Com a ligação ao receptor, ocorre um aumento no  $Ca^{2+}$  intracelular, tanto via canais localizados na membrana quanto em reservas intracelulares no retículo sarcoplasmático. O  $Ca^{2+}$  interage com a calmodulina, formando o complexo calmodulina  $Ca^{2+}$  que ativa a MLCK. MLCK pode então fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC-P), permitindo a interação próxima dos filamentos de actina e miosina para geração de força. O relaxamento ocorre com MLCP desfosforilando MLC. Adaptado de: Wynne et al. (2009).....46

**Figura 8:** Fatores vasoativos endoteliais e atividade em BKCa no músculo liso. 20-HETE, o ácido 20-hidroxi-eicosatetraenóico; BKCa, canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância; AMPc, monofosfato cíclico-adenosina; GMPc, o monofosfato cíclico de guanosina; COX, ciclooxigenase; EC, células endoteliais; EDCFs, fatores contratantes derivados do endotélio; EDRFs, fatores relaxantes derivados do endotélio; EETs, ácidos epoxieicosatrienóicos; eNOS, sintase endotelial de óxido nítrico; GS, proteína-G S; GSa, uma subunidade de proteína G-S; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o peróxido de hidrogénio; IP, receptor prostaciclina; NO, óxido nítrico; NOX, NAD(P)H-oxidase; P450-2C 2J ou 4A, o citocromo P450; PGI<sub>2</sub>, prostaciclina; R ?, receptor; ROS, espécies reativas de oxigénio; sGC, guanilato ciclase solúvel; SOD, superóxido-dismutase; TP, receptor de tromboxano; VSMC, célula do músculo liso vascular; XO, xantina oxidase. (FÉLÉTOU, 2009).....48

**Figura 9:** Distribuição dos grupos experimentais: Controle (Ct) e Cobre (Cu).....52

**Figura 10:** (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (NUNES, 2012).....53

**Figura 11:** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular in vitro (NUNES, 2014).....54

**Figura 12:** Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1.3g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contração com fenilefrina (Fe)  $10^{-6}$ M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh)  $10^{-5}$ M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. Modificado de: Dias (2007).....55

**Figura 13:** Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$ M) (ANGELI, 2009).....57

**Figura 14:** Efeitos da sobrecarga de cobre nas curvas concentração-resposta. (A) fenilefrina, (B) acetilcolina e (C) nitroprussiato de sódio (NPS) e reposta ao KCl em anéis aórticos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \*p < 0.05.....63

**Figura 15:** (A) Influência da remoção do endotélio (E-) na vasoconstrição induzida pela fenilefrina em anéis de aorta expostos a Cu. (B) O gráfico demonstra a diferença na área abaixo da curva (dAUC) em aortas com e sem o endotélio.(C) Efeitos da incubação com L-NAME na vasoconstrição induzida pela fenilefrina nos

anéis dos grupos Ct e Cu. (D) Ilustram a diferença na dAUC nos grupos Ct e Cu. (E) Efeito da sobrecarga de Cu na produção e / ou biodisponibilidade de NO em segmentos aórticos. (F) Microfotografias fluorescentes representativas de seções da aorta marcadas com corante fluorescente sensível a NO 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \*p < 0.05.....65

**Figura 16:** Efeitos da aminoguanidina nas curvas concentração-resposta à fenilefrina nos grupos (A) Ct e (B) Cu. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \*p < 0.05.....67

**Figura 17:** Influência da tetra-hidrobiopterina nas curvas de concentração-resposta à fenilefrina nos grupos (A) Ct e (B) Cu. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \*p < 0.05.....68

**Figura 18:** Efeitos do Tiron nas curvas concentração-resposta à fenilefrina nos grupos (A) Ct e (B) Cu. Efeitos do inibidor específico da NAD(P)H oxidase, apocinina, nas curvas de concentração-resposta à fenilefrina em anéis dos segmentos de aorta (C) Ct e (D) Cu. (E) Microfotografias fluorescentes representativas de seções aórticas marcadas com dihidroetidina (DHE) (F) e análise quantitativa da produção e/ou biodisponibilidade de  $O_2^{\cdot-}$ . Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \*p < 0.05.....69

**Figura 19:** Influência do inibidor da superóxido dismutase Cu/Zn, DETCA nas curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis aórticos (A) Ct e (B) Cu. Efeitos da catalase nas curvas de concentração-resposta à fenilefrina em anéis dos segmentos de aorta (C) Ct e (D) Cu. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \*p < 0.05.....71

**Figura 20:** Efeito de bloqueadores de canais não seletivos para  $K^+$ , TEA, em anéis (A) Ct e (B) Cu. (C) Efeitos da co-incubação da catalase com TEA e (D) aminoguanidina com TEA nas curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta dos grupos Ct e Cu. A inserção mostra diferenças na dAUC na presença e

ausência de TEA. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \*p < 0.05.....73

**Figura 21:** A exposição a altas concentrações de Cu promove o desacoplamento da eNOS, levando ao aumento da produção de superóxido e ativação da iNOS. A ativação da iNOS aumenta a produção de NO e contribui para o aumento da produção de superóxido a partir da NAD(P)H oxidase. O aumento desses radicais livres induz um aumento da atividade da SOD, contribuindo para a formação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o NO atuam nos canais para potássio promovendo a redução da reatividade vascular.....85

## Lista de Tabelas

- Tabela 1:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e Sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle e Cobre.....64
- Tabela 2:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis com e sem endotélio (E-) e na presença ou não de L-NAME dos grupos Controle e Cobre.....66
- Tabela 3:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis na presença ou não de BH4 dos grupos Controle e Cobre.....67
- Tabela 4:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis na presença ou não de Tiron e Apocinina dos grupos Controle e Cobre.....68
- Tabela 5:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis na presença ou não de DETCA e Catalase dos grupos Controle e Cobre.....70
- Tabela 6:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis na presença ou não de TEA, TEA + Catalase e TEA + Aminoguanidina dos grupos Controle e Cobre.....72
- Tabela 7:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis na presença ou não de TEA, TEA + Catalase e TEA + Aminoguanidina dos grupos Controle e Cobre.....74

## Lista de Abreviaturas

1,4,5 – inositol trifosfato (IP3)

3,5 – monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)

5'-trifosfato de adenosina (ATP)

Acetilcolina (ACh)

Ácido Dietilditiocarbâmico (DETCA)

Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)

Adenosina difosfato (ADP)

Adenosina trifosfato (ATP)

Água (H<sub>2</sub>O)

Ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Apocinina (Apo)

Áreas abaixo da curva (AUC)

Canais para K<sup>+</sup> de larga condutância, ativados por alterações de Ca<sup>+2</sup> intracelular (BKCa)

Canais para K<sup>+</sup> dependentes de Ca<sup>+2</sup> (KCa<sup>+2</sup>)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Ciclooxigenase (COX)

Cloreto de Cobre (CuCl<sub>2</sub>)

Cloreto de potássio (KCl)

Cobre (Cu)

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Concentração intracelular de  $\text{Ca}^{+2}$  [ $\text{Ca}^{+2}$ ]

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES)

Debito cardíaco (DC)

Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM)

Diacilglicerol (DAG)

Diaminofluoresceína (DAF-2)

Diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC)

Dihidroetidio (DHE)

Endotelina (ET)

Endotelina-1 (ET-1)

Endotelina-2 (ET-2)

Endotelina-3 (ET-3)

Endotélio íntegro (E+)

Endotélio removido mecanicamente (E-)

Enzima conversora da angiotensina II (ECA II)

Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Enzima fosfolipase A2 (PLA2)

Erro padrão da média (EPM)

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES)

Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Fator inibitório da migração de macrófagos (MIF)

Fenilefrina (FE)

Flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD)

Flavinmononucleotídeo (FMN)

Fundação de Apoio a Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (FAPES)

Fundo Estadual de Ciência e Tecnologia (FUNCITEC)

Glutathione peroxidase (GPx)

Graus Celsius (°C)

Grupo Cobre (Cu)

Grupo Controle (CT)

Hipertensão arterial sistêmica (HAS)

Indometacina (Indo)

Inibidor não-seletivo da NOS, o N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

Intraperitoneal (i.p)

Ion chumbo ( $Pb^{+2}$ )

Isoforma da ciclooxigenase tipo 1 (COX-1)

Isoforma da ciclooxigenase tipo 2 (COX-2)

Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS)

Isoforma induzível da sintase de óxido nítrico (iNOS)

Kilotoneladas (Kt)

Lipoproteína de baixa densidade/ Low Density Lipoprotein (LDL)

Malondialdeído (MDA)

Megatoneladas (Mt)

Micromolar ( $\mu\text{g}$ )

Mililitros (ml)

Milimolar (Ml)

Ministério da Saúde (MS)

Minuto (min)

Mitogen-activated protein (MAPKs)

Molar (M)

Músculo liso vascular (MLV)

Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH)

Nitroprussiato de sódio (NPS).

Norma Regulamentadora nº 7 do Ministério do Trabalho (NR7)

Óxido nítrico (NO)

Óxido nítrico sintase (NOS)

Partículas por milhão (ppm)

Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),

Peróxido de nitrito ( $\text{ONOO}^-$ )

Porcentagem (%)

Pressão arterial (PA)

Pressão arterial sistólica (PAS)

Prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)

Proteína de choque térmico 90 (hsp90)

Proteína quinase A (PKA)

Proteína quinase dependente de AMPc (AMPK)

Radical sulfidril (-SH)

Receptor de angiotensina do subtipo 1 (AT1)

Receptor de angiotensina do subtipo 2 (AT2)

Resposta máxima (R<sub>máx</sub>)

Retículo sarcoplasmático (RS)

Sensibilidade (pD<sub>2</sub>)

Sistema nervoso central (SNC)

Sistema renina angiotensina (SRA)

Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)

Superóxido dismutase (SOD)

Superóxido dismutase cobre/zinco (Cu/Zn SOD; SOD1)

Superóxido dismutase extracelular (EC SOD; SOD3)

Superóxido dismutase mitocondrial (Mn SOD; SOD2)

Tetraetilamônio (TEA)

Tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>)

The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)

Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1)

Trifosfato de guanósina (GTP).

Tromboxano (TXA<sub>2</sub>)

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
1.1 COBRE .....	24
1.1.1 <b>Metabolismo do cobre</b> .....	<b>25</b>
1.1.2 <b>Exposição humana ao cobre</b> .....	<b>27</b>
1.1.3 <b>Ingestão diária recomendada e concentração sanguínea segura</b> .....	<b>29</b>
1.1.4 <b>Efeitos da intoxicação e deficiência no organismo humano</b> .....	<b>30</b>
1.1.5 <b>Efeitos no sistema cardiovascular</b> .....	<b>31</b>
1.2 ENDOTÉLIO VASCULAR.....	34
1.2.1 <b>Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio</b> .....	<b>34</b>
1.2.1.1 <b>Óxido Nítrico (NO)</b> .....	<b>35</b>
1.2.1.2 <b>Prostaciclina</b> .....	<b>39</b>
1.2.1.3 <b>Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF)</b> .....	<b>40</b>
1.2.2 <b>Fatores vasoconstritores produzidos pelo endotélio</b> .....	<b>41</b>
1.2.2.1 <b>Prostaglandinas e Tromboxanos</b> .....	<b>41</b>
1.2.2.2 <b>Endotelina</b> .....	<b>41</b>
1.2.2.3 <b>Angiotensina II</b> .....	<b>42</b>
1.2.2.4 <b>Espécies reativas do oxigênio</b> .....	<b>42</b>
1.3 MUSCULO LISO VASCULAR .....	45
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>49</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>50</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	50
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	50
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	51
4.2 MODELO EXPERIMENTAL .....	51
4.3 METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA.....	<b>52</b>
4.3.1 <b>Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)</b> .....	<b>54</b>
4.3.2 <b>Avaliação da integridade funcional do endotélio</b> .....	<b>55</b>
4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	<b>55</b>
4.4.1 <b>Efeito da exposição a altas concentrações de cobre sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina e ao cloreto de potássio</b> .....	<b>56</b>

4.4.2	Efeito da exposição a altas concentrações de cobre sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina ..	56
4.4.3	Efeito da exposição a altas concentrações de cobre sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio .....	56
4.4.4	Efeito da exposição a altas concentrações de cobre sobre a resposta de relaxamento independente do endotélio .....	57
4.4.5	Estudo dos fatores endoteliais envolvidos na exposição a altas concentrações de cobre sobre a resposta à fenilefrina na aorta .....	57
4.4.5.1	Influência da exposição a altas concentrações de cobre sobre a via do óxido nítrico .....	58
4.4.5.2	Envolvimentos dos radicais livres sobre resposta contrátil à fenilefrina após a exposição a altas concentrações de cobre .....	58
4.4.5.3	Envolvimentos dos canais para potássio sobre resposta contrátil à fenilefrina após a exposição a altas concentrações de cobre .....	58
4.4.6	Detecção <i>in situ</i> da produção de óxido nítrico .....	58
4.4.7	Detecção <i>in situ</i> da produção de ânion superóxido .....	59
4.5	DROGAS E REAGENTE .....	60
4.6	ANALISE DE DADOS E ESTATÍSTICA .....	60
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>62</b>
5.1	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO COBRE NA REATIVIDADE VASCULAR ....	62
5.2	PARTICIPAÇÃO DE FATORES ENDOTELIAIS NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA .....	64
5.3	PARTICIPAÇÃO DA INOS NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA .....	66
5.4	ENVOLVIMENTO DE RADICAIS LIVRES NA ATIVAÇÃO DO INOS .....	67
5.5	PARTICIPAÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA EM ANÉIS EXPOSTOS AO COBRE .....	70
5.6	PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA .....	72
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
6.1	MODELO EXPERIMENTAL IN VITRO E CONCENTRAÇÃO DE COBRE.....	75
6.2	EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO COBRE SOB A REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA E MODULAÇÃO ENDOTELIAL .....	76

6.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO COBRE SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO .....	78
6.4 FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DO COBRE SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA .....	79
<b>6.4.1 Efeito da exposição aguda ao cobre na via do Óxido Nítrico .....</b>	<b>79</b>
<b>6.4.2 Efeito da exposição aguda ao cobre na via do estresse oxidativo.....</b>	<b>81</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>84</b>
7.1 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS .....	85
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>86</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 COBRE

O cobre é um metal avermelhado presente em rochas, no solo, na água, nos sedimentos e, em baixas concentrações no ar. Sua concentração média na crosta terrestre é de cerca de 50 gramas de cobre por 1.000.000 gramas de solo (ATSDR, 2004). Está presente em todas as plantas e animais sendo um elemento essencial para manutenção e funcionamento dos organismos vivos (YUNUS et al., 2015). Foi provavelmente o primeiro metal a ser descoberto e trabalhado pelo homem. Ainda que seja difícil estabelecer a data na qual iniciou sua utilização, acredita-se que tenha sido há mais de 7000 anos. O emprego do cobre possibilitou um progresso para as civilizações mais antigas que evoluíram da idade da pedra para a do bronze. O termo cobre é de origem latina, *cuprum*, que, por sua vez, deriva da palavra *cyprium*, usada para designar a ilha de Chipre, que foi a principal fonte do metal no mundo antigo (MAAR, 2008).

Atualmente, o Chile, os Estados Unidos, a China, o Japão e a Alemanha são os principais produtores do metal. Os dados mais atualizados publicados pela Agência Nacional de Mineração demonstram que produção brasileira atingiu o patamar de 1,2% do total mundial de refinado em 2013 (BRASIL, 2017). É considerado um elemento muito importante no desenvolvimento de novas tecnologias e industrialmente pode ser utilizado para fabricação de moedas, fiação elétrica, arames, chapas metálicas, encanamentos de água. Ainda pode ser utilizado como pesticida, conservante de madeiras e no tratamento de água (ATSDR, 2004). Por ser maleável, reciclável, resistente à corrosão e a altas temperaturas, o cobre é principalmente empregado na geração e na transmissão de energia, em fiações e em praticamente todos os equipamentos eletrônicos (ATSDR, 2004).

O referido elemento é o terceiro metal mais abundante no corpo humano (WILLIS et al., 2015) e desempenha um papel importante no metabolismo humano, principalmente, atuando como um cofator para a atividade de várias enzimas (HARRIS, 2011). Entre estas enzimas, podemos destacar a citocromo C oxidase, necessária para o metabolismo aeróbico; lisil-oxidase, que participa na síntese do

colágeno e da elastina; dopamina β-hidroxilase, que desempenha um papel importante na conversão de dopamina em noradrenalina; e a superóxido dismutase, uma enzima antioxidante que atua na conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio (OSREDKAR; SUSTAR, 2011).

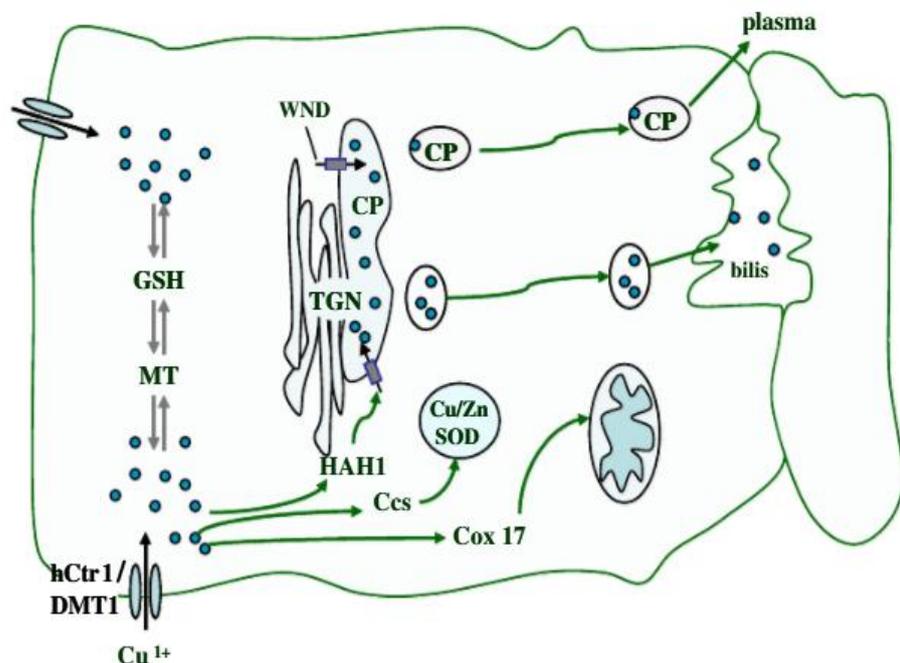
A homeostase do cobre é essencial para o funcionamento enzimático e bom funcionamento do corpo. A deficiência do metal pode levar à diminuição da atividade de várias enzimas, resultando principalmente no desenvolvimento de desequilíbrio oxidativo (MŁYNIEC et al., 2015), alterações neurológicas (SHIMIZU, 2016), hepáticas e cardiovasculares (TASIĆ et al., 2015; GAETKE et al., 2014; BAGHERI et al., 2015). Além disso, embora seja um micronutriente essencial para o homem, o Cu é tóxico em concentrações sanguíneas elevadas. Uma sobrecarga desse metal conduz facilmente às reações de Fenton, resultando em dano celular oxidativo e morte celular. A toxicidade do Cu como um resultado do excesso dietético geralmente não é considerada uma das mais importantes fontes de exposição ao metal, provavelmente como resultado de mecanismos de controle de absorção e excreção de Cu (BOST et al., 2016). No entanto, quando a homeostase do cobre é interrompida, condições patológicas como doenças neurológicas, cardiovasculares, respiratórias, e metabólicas podem ser desenvolvidas (BOST et al., 2016; MORTIMER et al., 2010).

Além das alterações metabólicas, a toxicidade do Cu pode resultar da exposição ao excesso de Cu causado por acidente, a contaminação do meio ambiente, o uso de agentes bactericidas e fungicidas à base de cobre em agricultura e da emissão de indústria de fundição de cobre (BOST et al., 2016; MORTIMER et al., 2010). Em geral, a deficiência ou toxicidade ao cobre, provenientes de distúrbios metabólicos ou exposição ao metal podem resultar em sérios danos para o corpo humano.

### **1.1.1 Metabolismo do cobre**

Na matéria viva, o Cu possui dois estados de oxidação: cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ) e cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Nos sistemas biológicos, o cobre é encontrado principalmente na forma  $\text{Cu}^{2+}$ , já que na presença de oxigênio ou outros aceptores de elétrons,  $\text{Cu}^{1+}$  é prontamente oxidado em  $\text{Cu}^{2+}$  (GALHARDI et al., 2004). A absorção do cobre ocorre

principalmente na parte proximal do intestino delgado, onde é transportada para o fígado através da veia porta. A Figura 1 demonstra um modelo de captação e metabolismo do cobre pelos hepatócitos. Vários parâmetros afetam a taxa de absorção de Cu dietético, incluindo sexo, idade, tipo de alimento e quantidade de Cu da dieta. Foi demonstrado que a absorção do cobre é maior em mulheres e crianças e que não há diferenças entre adultos jovens e pessoas mais idosas (OLIVAREA et al., 2001). Após a absorção intestinal, 25% do cobre permanece na circulação ligados à albumina, enquanto o restante é absorvido pelo fígado. Após a absorção no fígado, cerca de 80% do cobre se destina à circulação sanguínea, ligado à ceruloplasmina, enquanto o restante é re-excretado para o sistema gastrointestinal (HARVEY et al., 2005). A meia-vida do cobre em um indivíduo saudável é de aproximadamente 26 dias (BENTUR et al., 1988) e a maior parte da excreção se dá pela via biliar. Não há nenhuma evidência de que a excreção urinária desempenhe um papel de controle da homeostasia do Cu em resposta a alterações na ingestão do metal (BOST et al., 2016).



**Figura 1:** Modelo de captação e metabolismo do cobre. Atravessando a membrana plasmática através de Ctr1 ou DMT1, a maior parte do cobre é transportada para a rede trans de Golgi (TGN) pelo acompanhante Hah1 / Atox1, que fornece Cu para a ATPase do tipo P localizada no TGN. No caso dos hepatócitos, é ATP7B ou WND, a proteína defeituosa na doença de Wilson. Nos enterócitos, é ATP7A ou MNK, a proteína defeituosa na doença de Menkes. A proteína chaperona,

Ccs, fornece Cu à superóxido dismutase Cu/Zn citosólica (SOD), que dissolve o superóxido em peróxido de hidrogênio. Cox17 fornece Cu à mitocôndria, onde é necessário para a citocromo C oxidase. A glutationa (GSH) também pode ser uma chaperona, ligando  $\text{Cu}^{1+}$  e entregando-a à metalotioneína (MT) e a algumas apoenzimas dependentes de cobre, como a SOD (CARROLL et al., 2004).

Como demonstrado na Figura 1, sob condições fisiológicas normais, nas quais a concentração de cobre no corpo é normal, a ATP7A é a enzima responsável por absorver o cobre no intestino e transporta-lo para as enzimas dependentes do metal. No entanto, quando as reservas totais de cobre intracelulares aumentam, ATP7A se desloca para a membrana celular para promover o efluxo do cobre (MONTY et al., 2005).

Já na membrana plasmática e em vesículas intracelulares o transportador CTR1 desempenha um papel fundamental na captação de cobre. Esse transportador atua de forma a controlar a absorção de cobre através das membranas plasmáticas celulares, ao passo que elevações de cobre extracelular induzem endocitose de CTR1 para vesículas enquanto que uma diminuição de cobre extracelular restaura os níveis CTR1 na membrana plasmática (MOLLOY; KAPLAN, 2009). Após a entrada de cobre na célula, ele se liga a chaperonas citosólicas que, em seguida, transferem o cobre para destinos celulares específicos (LEARY et al., 2009).

A homeostase de cobre é essencial para o funcionamento do organismo. Alterações no metabolismo do cobre são características de algumas doenças genéticas como: a Doença de Menkes e a Doença de Wilson. A Doença de Menkes é caracterizada pela deficiência de cobre sendo sua principal característica a baixa atividade da enzima dependente de cobre (ATPA7). Já a Doença de Wilson é caracterizada pela toxicidade do cobre que normalmente afeta os sistemas hepático e nervoso severamente (KODAMA et al., 2012). Na Doença de Wilson, ocorre um comprometimento da excreção biliar de cobre que conduz a uma acumulação do metal no fígado. Quando a capacidade de armazenamento hepática é excedida, a morte celular começa, com liberação de cobre no plasma resultando na hemólise e deposição de cobre nos tecidos extra-hepáticos (AOKI, 2005).

### 1.1.2 Exposição humana ao cobre

Na natureza, a emissão de cobre acontece a partir de fontes naturais como poeiras transportadas pelo vento, vulcões, incêndios florestais e através da liberação das minas de cobre. Cu é um dos metais mais importantes para a aplicação comercial e industrial. É utilizado como liga metálica para fabricação de máquinas, em construções, nas indústrias de transportes e armas militares (BARCELOUX, 1999; WINGE & MEHRA, 1990). Além disso, é um importante componente do ouro branco e outras ligas usadas para bijuterias, produtos odontológicos e cosméticos. Pode também ser empregado como aditivo em tintas, plásticos, lubrificantes e revestimentos metálicos. Na África é tradicionalmente utilizado em práticas medicinais (STREET et al., 2016). Devido à sua elevada demanda comercial e industrial, os produtos a base de cobre são produzidos em grande escala e acredita-se que haverá uma expansão dessa produção nos próximos anos (AHAMED et al., 2015).

Além da utilização do cobre nos setores industriais citados acima, ele também é extensamente utilizado em produtos bactericidas e fungicidas em muitas lavouras agrícolas, o que conseqüentemente leva a contaminação dos solos e dos alimentos que são produzidos (CHAIGNON et al., 2003; GINOCCHIO et al., 2002). Além disso, o cobre também pode estar presente na água potável e sua concentração pode variar dependendo dos sistemas de encanamentos domésticos e da composição das águas subterrâneas. Um aumento da acidez da água pode provocar corrosão em encanações de cobre e aumentar a concentração do metal na água (ZIETZ et al., 2001).

A concentração de Cu em alimentos varia de acordo com as condições locais. A maioria das dietas contém o suficiente Cu (1-5 mg) para evitar uma deficiência e não o suficiente para causar toxicidade. Há pouca informação disponível sobre a ingestão de Cu e adequação em populações com dietas específicas, como os vegetarianos e veganos. No entanto, foi demonstrado que o consumo diário de Cu é 27% mais elevado em mulheres vegetarianas do que em mulheres onívoras (BOST et al., 2016). Os alimentos com maior concentração de cobre são: carnes (fígado, rins), frutos do mar (ostras, lulas e siris), grãos (feijão, grãos-de-bico e lentilhas),

sementes de girassol, amendoim, passas, nozes, amêndoas, legumes e o chocolate amargo (JUNIOR; PASCHOAL, 2004).

### **1.1.3 Ingestão diária recomendada e concentração sanguínea segura**

Embora o cobre seja reconhecido como um elemento essencial para o funcionamento do organismo, as incertezas permanecem sobre referência dos valores de ingestão diária para os seres humanos. A Ingestão Diária Recomendada nos Estados Unidos e no Canadá é de 0,9 mg/dia, com um nível de ingestão tolerável de 10 mg/dia para adultos de 19 anos ou mais (TRUMBO et al., 2001).

The Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine desenvolveu recomendações dietéticas de 340 microgramas ( $\mu\text{g}$ ) de cobre por dia para crianças de 1 a 3 anos, 440  $\mu\text{g}/\text{dia}$  para crianças de 4 a 8 anos, 700  $\mu\text{g}/\text{dia}$  para crianças de 9 a 13 anos, 890  $\mu\text{g}/\text{dia}$  para crianças de 14 a 18 anos e 900  $\mu\text{g}/\text{dia}$  (0,9 mg/dia) para adultos. Isso fornece cobre suficiente para manter a saúde (ATSDR, 2004).

A concentração habitual de cobre no plasma humano é entre 0,3-2,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para a ingestão de 1,4 a 2,0 mg de cobre/dia (ARNAL et al., 2010). Estudos populacionais demonstraram concentrações de cobre em indivíduos saudáveis de aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ZHANG et al., 2015; ROCHA et al., 2016). Estudo realizado com a população brasileira demonstrou concentração de cobre no soro de 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em homens e 1,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em mulheres (ROCHA et al., 2016). Essa diferença entre os sexos é esperada, uma vez que é bem conhecido que as mulheres, especialmente aqueles na faixa etária dos 20-60 anos, aumentam a absorção do cobre. É sabido que estrógenos também influenciam diretamente o metabolismo do cobre, contribuindo para o aumento dos níveis plasmáticos deste metal. Os efeitos dos estrógenos sobre os níveis de cobre também são mais evidentes em mulheres grávidas, pois eles tendem a apresentar concentrações ainda mais elevadas (KLINC et al., 2010).

#### 1.1.4 Efeitos da intoxicação e deficiência no organismo humano

Como mencionado, o cobre é um metal essencial, sendo importante a sua ingestão nos alimentos. Porém, além da exposição relacionada à ingestão alimentar, a população ainda é exposta ao metal devido sua ocorrência no ambiente e sua utilização industrial. As concentrações de cobre no organismo são rigidamente controladas sob condições fisiológicas. Porém quando há perda desta regulação seu excesso ou seu déficit são prejudiciais para o organismo. Em condições inflamatórias, os níveis séricos de cobre são aumentados e desencadeiam respostas de estresse oxidativo. Curiosamente, alterações no metabolismo do cobre, estresse oxidativo e inflamação são comumente presentes em várias doenças crônicas como diabetes e hipertensão (PEREIRA et al., 2016).

A inalação é uma das vias mais importantes de intoxicação ao cobre. Portanto, a toxicidade em tecido pulmonar é de grande preocupação. Estudos *in vitro* indicaram que o Cu pode induzir citotoxicidade, estresse oxidativo e toxicidade genética em cultura de células pulmonares humanas. Ainda foi mostrado que a instilação intratraqueal de Cu induz estresse oxidativo, inflamação e lesões neoplásicas em ratos (AHAMED et al., 2015).

A toxicidade crônica ao cobre tem sido conhecida por causar hepatotoxicidade e cirrose hepática. Como observado na doença de Wilson e em certas condições de intoxicação ao metal, o aumento da concentração de cobre tem contribuído para o desenvolvimento da doença Alzheimer (PAL; PRASAD, 2015). A doença de Alzheimer é caracterizada pela perda progressiva da função cognitiva levando à morte. As características neuropatológicas incluem acúmulo de placa amilóide extracelular em regiões afetadas do cérebro, formação de emaranhados neurofibrilares intraneuronais, neuroinflamação crônica e estresse oxidativo. Mudanças nos níveis e localização do cobre foram identificadas no cérebro de pessoas com doença de Alzheimer (MATHYS; WHITE, 2017). Tanto a proteína precursora amilóide (APP) quanto o peptídeo beta-amilóide (A $\beta$ ) possuem sítios de ligação ao Cu, e a interação com Cu pode levar a resultados potencialmente neurotóxicos por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (MATHYS; WHITE, 2017).

Também tem sido levantada a hipótese de que o acúmulo de cobre possa estar relacionado ao declínio cognitivo e alterações na produção de fatores humorais e celulares do sistema imunitário. De mesmo modo, animais com deficiência de Cu apresentam redução das populações de neutrófilos e células T, diminuição da atividade dos fagócitos e linfócitos B. A produção de anticorpos pelas células T de esplenócitos também é reduzida. Nos seres humanos, a relação entre a ingestão de Cu e a função imunológica é limitadamente documentada (BOST et al., 2016).

O acúmulo de óxido de cobre foi analisado em tilápias e observou-se que as nanopartículas de cobre têm maior potencial de acumulação nos tecidos moles, o que pode causar desconforto respiratório e estresse oxidativo, indução de defesa antioxidante por aumento da glutathione e genotoxicidade (SHAHZAD et al., 2018).

Além das alterações nos sistemas descritos, a intoxicação e a deficiência de cobre também são capazes de desencadear alterações cardiovasculares. Estudos experimentais e epidemiológicos tem demonstrado relação entre a exposição ao metal e o surgimento de algumas doenças do sistema cardiovascular. Algumas dessas relações e seus mecanismos serão descritos a seguir.

#### **1.1.5 Efeitos no sistema cardiovascular**

Vários estudos tem demonstrado que concentrações elevadas de cobre estão associadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GHAYOUR-MOBARHAN et al., 2005; LEONE et al., 2006; BO et al., 2008; TSUBOI et al., 2014). Dentre essas doenças, a doença aterosclerótica representa uma das causas mais importantes de mortalidade no mundo (BAGHERI et al., 2015), sendo caracterizada por inflamação vascular persistente (LUSIS, 2000), oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e formação de radicais livres. Nesse contexto, o cobre (Cu) é um micronutriente essencial para o funcionamento das enzimas que catalisam as reações de oxidação de LDL e têm sido implicados na aterogênese através de mecanismos que envolvem as vias de sinalização de ativação de NF- $\kappa$ B (factor nuclear kappa B) (BAGHERI et al., 2015; WEI et al., 2012). Tem sido demonstrado que a concentração sérica de Cu é maior em pacientes com aterosclerose, e ainda,

aumenta com a gravidade da doença (BAGHERI et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que a quelação de cobre em ratos apoE- (apolipoproteína E deficientes) inibe eficazmente o desenvolvimento da lesão aterosclerótica e reduz a inflamação no sistema cardiovascular (WEI et al., 2012).

Ainda em relação ao desenvolvimento de reações inflamatórias no organismo e ao controle do tônus vascular, o cobre parece desempenhar um papel importante no controle da atividade das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) e guanilato ciclase (GC) (PLANE et al., 1997). O cobre aumenta a taxa de conversão de L-arginina para L-citrulina, dependendo da presença do cálcio extracelular. A concentração de cálcio extracelular é um pré-requisito para a ativação da eNOS por agonistas. Desse modo, o Cu pode afetar a mobilização intracelular de Ca e alterar o funcionamento da eNOS (DEMURA et al., 1998).

Além de regular o funcionamento da eNOS, o Cu é essencial para o funcionamento de outra enzima importante para o controle do tônus vascular, a superóxido dismutase Cu/Zn (SOD) (AL-BAYATI et al., 2015). Ele regula a atividade desta enzima, de modo a controlar a vasoconstrição causada por radicais livres de oxigênio. Já que o cobre é um cofator para o funcionamento da SOD, concentrações aumentadas do metal poderiam aumentar a atividade enzimática, enquanto concentrações diminuídas poderiam levar a diminuição da atividade da SOD e consequente aumento na produção de ânions superóxido. Foi demonstrado em estudos experimentais que o cobre poderia impedir o desenvolvimento de vasoespasmos periféricos (GUMUS et al., 2014) e que a incubação com concentrações submicromolares de Cu prejudicam o vasorelaxamento endotélio-dependente provavelmente por causa da geração intracelular de  $O_2^-$  (CHIARUGI et al., 2002).

O cobre é caracterizado como um cofator obrigatório em todas as cascatas de sinalização angiogênicas, tanto que uma deficiência do metal faz com que a neovascularização diminua. Além disso, o progresso de várias patologias angiogênicas (por exemplo, diabetes, hipertrofia cardíaca e isquemia) pode ser rastreado por medição dos níveis de cobre no soro, que são cada vez mais considerados como um marcador de prognóstico útil, mostrando-se elevado nessas

condições patológicas (URSO; MAFFIA, 2015). O Cobre estimula fatores envolvidos na formação dos vasos e maturação, tal como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), sendo necessário para a ativação do fator-1 induzido por hipóxia (HIF-1), um importante fator de transcrição que regula a expressão de VEGF. O papel essencial do cobre na produção de VEGF o torna importante, por exemplo, na terapia anti-angiogênese, tais como a aplicação de agentes quelantes de cobre em terapia de cancro. No entanto, a supressão da angiogênese está envolvida na progressão da hipertrofia cardíaca, tanto é que a suplementação de cobre melhora as condições de doença cardíaca hipertrófica (SHIOJIMA et al., 2005).

Além de participar do controle do funcionamento vascular, o cobre também é essencial para o funcionamento cardíaco. Tem sido demonstrado experimentalmente que a suplementação de Cu restaura a hipertrofia cardíaca crônica induzida por sobrecarga de pressão. A sobrecarga de pressão gerada por constrição da aorta ascendente provoca uma diminuição nos níveis de Cu no coração juntamente com o desenvolvimento da cardiomiopatia hipertrófica (JIANG et al., 2007). A sobrecarga provoca um acúmulo de homocisteína no coração, o qual é acompanhado pela depleção de cobre através da formação de complexos de cobre-homocisteína e a excreção dos complexos. A suplementação de cobre recupera a atividade do citocromo C oxidase e promove a angiogênese do miocárdio, juntamente com a regressão da hipertrofia cardíaca e a recuperação da função contrátil (ZHENG et al., 2015). Conforme mencionado anteriormente, o Cu aumenta os níveis de VEGF e promove a angiogênese em corações hipertróficos, melhorando os parâmetros da atividade cardíaca (JIANG et al., 2007).

No entanto, algumas vezes observa-se que, sob condições isquêmicas crônicas, a densidade capilar é diminuída no coração (HINKEL et al., 2011; FRANGOIANNIS; ENTMAN, 2005). Estudos epidemiológicos demonstraram uma relação entre a deficiência de cobre e doença cardíaca isquêmica. As razões para esta observação não são claras, porém pesquisas têm sugerido que um dos efeitos produzidos pela isquemia, é a perda de cobre no coração (CHEVION et al., 1993). A suplementação de cobre pode estimular a atividade de transcrição do HIF-1 (Fator Induzido por Hipóxia) e restaurar a capacidade angiogênica, levando ao aumento da densidade capilar no coração (HE; JAMES KANG, 2013). Além do desenvolvimento

da hipertrofia cardíaca (JIANG et al., 2007), a deficiência de cobre leva a alterações cardíacas mitocondriais, estruturais e alterações na fosforilação oxidativa (GOODMAN et al., 1970; KOPP et al., 1983). Em situações de alterações no metabolismo do cobre, como da doença de Wilson, arritmias cardíacas, disfunções diastólicas, cardiomiopatias e morte cardíaca súbita são complicações raras, mas podem ser vistas principalmente em crianças, devido à acumulação de cobre no tecido cardíaco (KARAKURT et al., 2016).

Em um estudo do no nosso laboratório, foram avaliados os efeitos da sobrecarga aguda de cobre nos músculos papilares de ratos e foi demonstrado que nas condições experimentais estudadas o cobre pode prejudicar o acoplamento excitação-contração do miocárdio, reduzir o influxo e receptação de  $Ca^{2+}$  e diminuir a atividade da miosina-ATPase. Esses efeitos são mediados pela produção local de radicais livres (FILETTI et al., 2018).

## 1.2 ENDOTÉLIO VASCULAR

Por muito tempo o endotélio vascular foi considerado apenas uma barreira passiva sem funções fisiológicas vasculares específicas. Até que em 1980 Furchgot e Zawadski demonstraram sua participação na dilatação vascular através da ação da acetilcolina (FELIZZOLA, 1996). Desde então vários estudos vem demonstrando as inúmeras funções do endotélio na manutenção do tônus vascular, na inibição da agregação plaquetária, na adesão leucocitária e na proliferação das células musculares lisas. Em várias doenças cardiovasculares, inclusive a hipertensão arterial, ocorre disfunção endotelial (BATLOUNI, 2011).

A integridade do endotélio é essencial à regulação do tônus vascular, estrutura dos vasos, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e à proteção contra espasmo, trombose e aterogênese. Entre as múltiplas funções biológicas do endotélio, as relacionadas à vasomotricidade incluem: 1) síntese de substâncias vasodilatadoras, antiproliferativas e antiagregantes plaquetária; 2) síntese de substâncias vasoconstritoras, promotoras do crescimento celular e ativadoras plaquetária (BATLOUNI, 2011). Os principais fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio são: o óxido nítrico, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio e a

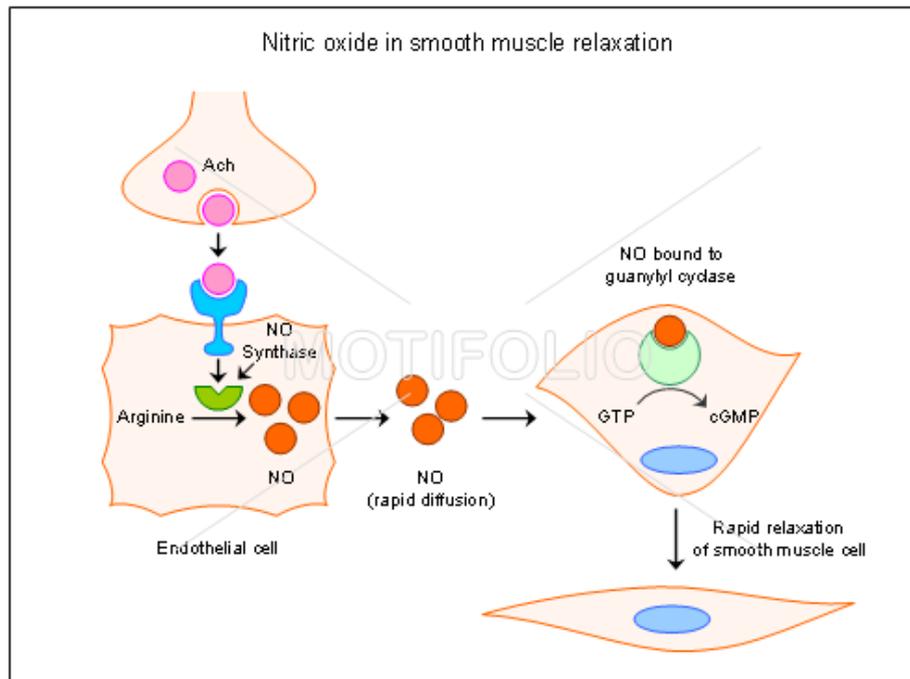
prostaciclina. Dentre os principais fatores contráteis estão: as prostaglandinas, os tromboxanos, a endotelina I, a angiotensina II e as espécies reativas do oxigênio (CARVALHO et al., 2001).

## **1.2.1 Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio**

### **1.2.1.1 Óxido Nítrico (NO)**

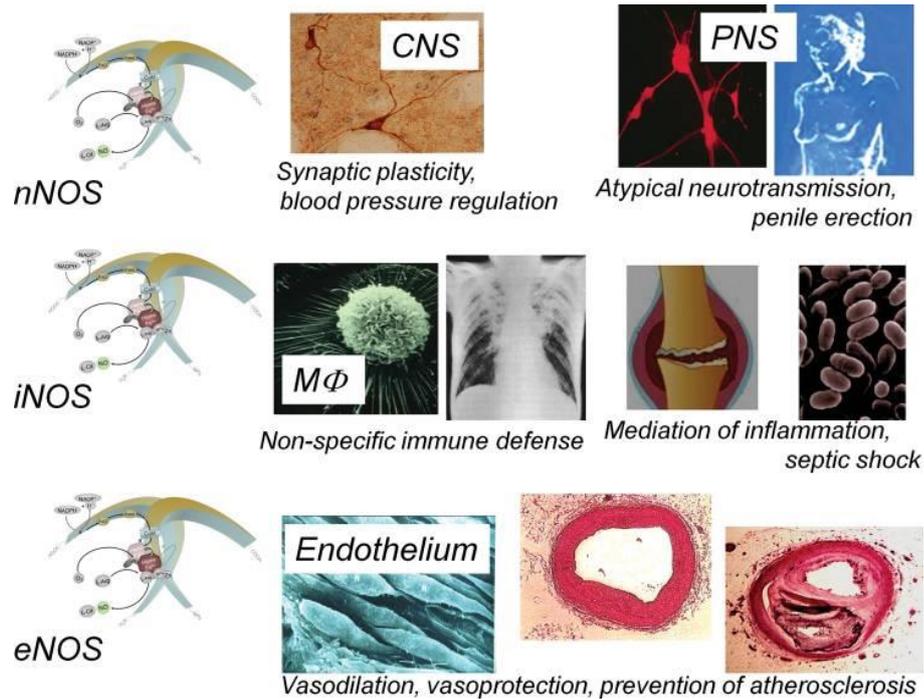
O óxido nítrico é sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina, reação mediada pela óxido nítrico sintase (NOS), com formação simultânea de L-citrulina (BATLOUNI, 2011). Como já descrito, o NO tem um papel fundamental no relaxamento do vaso sanguíneo. Em condições fisiológicas o relaxamento ocorre quando há um aumento do atrito das células circulantes na camada endotelial levando a ativação da NOS e consequente produção de NO (*shear stress*) ou pela estimulação de receptores (da acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) na membrana das células endoteliais (DUSSE et al., 2003; CARVALHO et al., 2001).

O NO produzido pela célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula e lúmen vascular. No interior da célula ele interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC), acarretando uma alteração na conformação desta enzima, ativando-a. Esta enzima catalisa a saída de dois grupamentos fosfatos da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento de GMPc resulta no relaxamento desta célula (Figura 2). O mecanismo envolve a diminuição da entrada de cálcio para o interior da célula, a inibição da liberação de cálcio do retículo endoplasmático e o aumento do sequestro de cálcio para o retículo endoplasmático (DUSSE et al., 2003).



**Figura 2:** Sob estímulo da Acetilcolina, o NO produzido pela célula endotelial difunde-se para a célula e lúmen vascular. No interior da célula ele interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase (GC), acarretando uma alteração na conformação desta enzima, ativando-a. Esta enzima catalisa a saída de dois grupamentos fosfatos da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento de GMPc resulta no relaxamento desta célula muscular lisa. Adaptado de: Motifolio (2018).

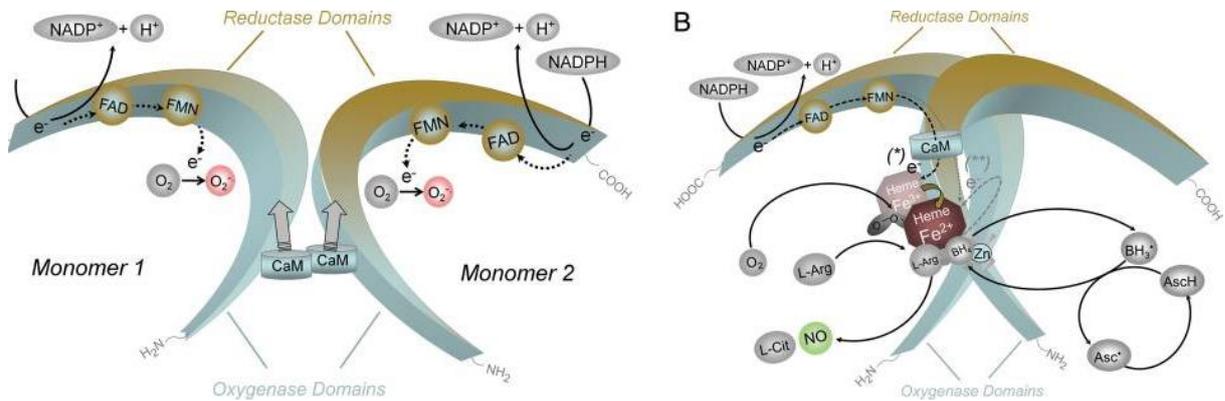
Foram caracterizadas três isoformas da NOS (Figura 3). Duas são dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina: Sintase de Óxido Nítrico neuronal (nNOS), presente principalmente no sistema nervoso central e periférico; e Sintase de Óxido Nítrico endotelial (eNOS), presente principalmente no endotélio vascular. A eNOS é a responsável pela geração de níveis baixos e intermitentes de NO suficientes para manter o tono vascular basal (BATLOUNI, 2011). A terceira isoforma da NOS é a Sintase de Óxido Nítrico induzível (iNOS). Essa é independente de  $\text{Ca}^{2+}$ , induzível por citocinas, e se expressa em macrófagos, células musculares lisas, mesangiais e em células da microcirculação, produzindo grandes quantidades de NO (BUSSE; MULSCH, 1990).



**Figura 3:** Funções importantes das três isoformas do NOS. A NOS neuronal é expressa em neurônios específicos do sistema nervoso central (SNC). Foi implicado na plasticidade sináptica (fenômenos que estão envolvidos na aprendizagem e na formação da memória), controle central da pressão arterial, mediador de componentes relaxantes do peristaltismo intestinal, vasodilatação e ereção peniana. A expressão induzível da NOS pode ser induzida por citocinas e outros agentes em quase qualquer tipo de célula. Inicialmente, isso foi mostrado para macrófagos. É essencial para o controle de bactérias intracelulares, entretanto, também é regulada positivamente em vários tipos de doença inflamatória, e o NO gerado pela enzima media o desenvolvimento de vários sintomas de inflamação. Finalmente, o NO induzido por NOS é o mediador predominante da vasodilatação e queda da pressão arterial vista no choque séptico. O NO liberado em direção ao lúmen vascular é um potente inibidor da agregação plaquetária e da adesão à parede vascular, controla a expressão de genes envolvidos na aterogênese e diminui a permeabilidade endotelial. Adaptado de: Forstermann; Sessa (2012).

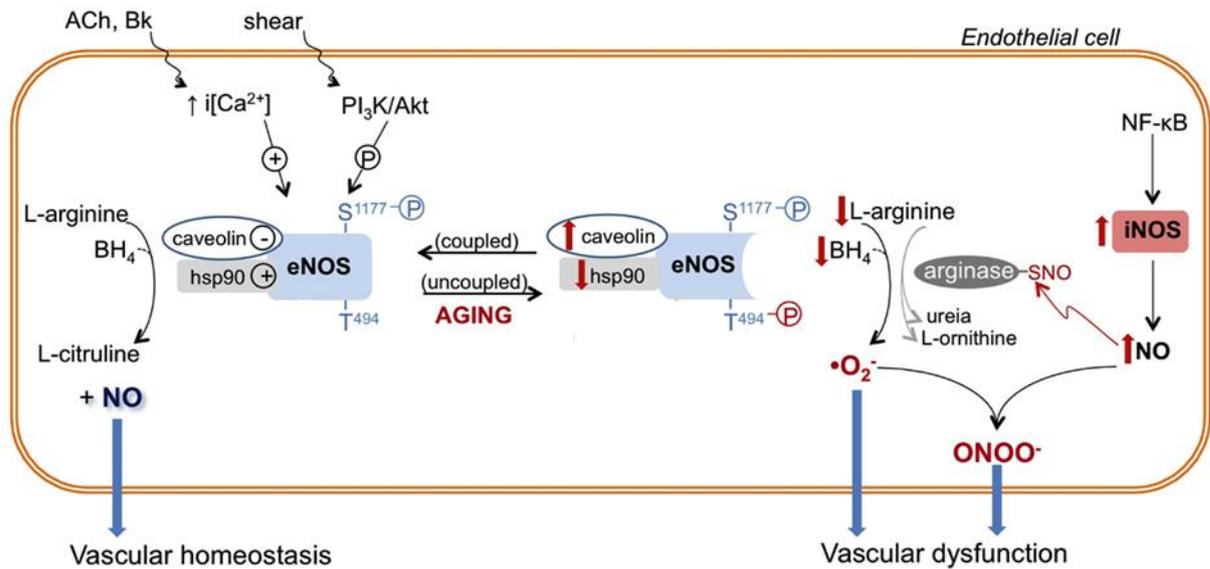
Todas as isoformas de NOS utilizam L-arginina como substrato, oxigênio molecular e co-substratos de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) reduzidos. Os monômeros da NOS são capazes de transferir elétrons de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) reduzido, para flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) e flavinmononucleotídeo (FMN). Os monômeros da NOS são incapazes de se ligar ao cofator tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) ou o substrato L-arginina e não podem catalisar a produção de NO. Somente na presença de heme, a NOS pode formar um dímero funcional. Quando L-arginina e cofator BH<sub>4</sub> estão

presentes, os dímeros da NOS intactos acoplam o grupamento heme e reduzem  $O_2$  para síntese de NO. A l-citrulina é formada como subproduto (Figura 4) (FORSTERMANN; SESSA, 2012).



**Figura 4:** (A) Os monômeros de NOS são capazes de transferir elétrons de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NAD(P)H) reduzido para flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) e flavinamonucleotídeo (FMN) e têm uma capacidade limitada para reduzir o oxigênio molecular a superóxido. Os monômeros da NOS são incapazes de se ligar ao cofator tetrahydrobiopterina (BH4) ou o substrato l-arginina e não podem catalisar a produção de NO. (B) Na presença de heme, a NOS pode formar um dímero funcional. Quando substrato suficiente, l-arginina (l-Arg) e cofator BH4 estão presentes, os dímeros de NOS intactos acoplam sua redução de heme e  $O_2$  à síntese de NO (NOS totalmente funcional). Todas as isoformas NOS contêm um íon zinco (Zn) que é de grande importância para a ligação de BH4 e l-arginina. Adaptado de: Forstermann; Sessa (2012).

Em situações não fisiológicas, a eNOS pode se tornar uma produtora de radicais livres. Essa situação é referida como desacoplamento da eNOS. Os mecanismos implicados no desacoplamento incluem a oxidação do cofator BH4, a depleção de l-arginina e a acumulação de metilargininas endógenas (FORSTERMANN; SESSA, 2012). A Figura 5 demonstra o papel da NOS na função endotelial preservada e na disfunção endotelial.



**Figura 5:** A eNOS converte a L-arginina em óxido nítrico (NO). A atividade da eNOS é determinada pela concentração de cálcio intracelular [ $i[Ca^{2+}]$ ] e / ou seu estado de fosforilação (P) em diferentes locais. Além disso, a atividade da eNOS é inibida por sua interação com a caveolina-1, enquanto a associação da eNOS com a proteína de choque térmico 90 (hsp90) favorece sua ativação. Em situações de disfunção endotelial, a síntese de NO é comprometida porque a atividade da eNOS pode estar diminuída devido ao aumento da expressão e interação com caveolina, redução da expressão e associação com hsp90, redução da fosforilação de S1177 e aumento da fosforilação de T494. Além disso, a disponibilidade reduzida de L-arginina e tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>) induz o desacoplamento da eNOS ou altera a enzima para um estado que favoreça a geração de ânion superóxido. Em situações de inflamação vascular induzida por NF-κB a iNOS pode estar regulada positivamente produzindo altos níveis de NO. O NO reage diretamente com o ânion superóxido produzido pela eNOS desacoplada e por outras fontes vasculares, gerando a peroxinitrito reativo (ONOO<sup>-</sup>), que contribui para a disfunção vascular. Adaptado de: CAU et al. (2012).

Em ocasiões onde já se existe produção aumentada de radicais livres, o NO pode interagir com ânions superóxido formando peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Este por sua vez é um dos principais fatores responsáveis pelo desacoplamento da eNOS, o ONOO<sup>-</sup> pode oxidar a BH<sub>4</sub> ao radical BH<sub>3</sub> que é biologicamente inativo (WERNER et al., 2003). Essa situação implica num círculo vicioso de formação de ROS, uma vez que a eNOS desacoplada passa a gerar radicais livres.

### 1.2.1.2 Prostaciclina

As prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) são eicosanóides derivadas do ácido araquidônico que são liberadas dos fosfolipídios da membrana pela ação de fosfolipases ativas. As prostaciclina têm ação antiplaquetária e antiproliferativa (BATLOUNI, 2001). Em modelos experimentais a diminuição da síntese de prostaciclina induziu hipertensão e esclerose arterial (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009).

A contribuição da prostaciclina para a vasodilatação dependente do endotélio é usualmente pequena. A atividade da PGI<sub>2</sub> depende dos receptores específicos acoplados a proteína G no músculo liso vascular. Assim, o acoplamento da PGI<sub>2</sub> com seu receptor preferencial, o receptor de prostaciclina (IP), ativará a adenilato ciclase, e conseqüentemente, o AMPc (monofosfato cíclico de adenosina) (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006, 2009). Esta interação também pode estimular a proteína quinase dependente de AMPc (AMPK), no músculo liso vascular. A proteína quinase pode atuar abrindo canais para K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP, hiperpolarizando as células do músculo liso vascular e estimulando a saída de Ca<sup>+2</sup> do citosol, diminuindo a oferta deste íon a maquinaria contrátil (BATLOUNI, 2001).

### **1.2.1.3 Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio (EDHF)**

O EDHF é um potente fator vasodilatador derivado do endotélio que produz hiperpolarização do músculo liso vascular sem aumentos celulares de GMPc nas células musculares lisas. A contribuição de EDHF para a vasodilatação dependente do endotélio é maior nos vasos sanguíneos de resistência do que nos vasos de condutância (URAKAMI-HARASAWA et al., 1997).

A vasodilatação induzida por este composto ocorre com participação ativa dos canais para potássio presentes nas células do músculo liso vascular. Em geral, as respostas mediadas pelos EDHFs envolvem o aumento de Ca<sup>+2</sup> intracelular, que ao ser liberado, induz vasodilatação por meio da abertura de canais para potássio ativados por Ca<sup>+2</sup> (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2006, 2009).

## **1.2.2 Fatores vasoconstritores produzidos pelo endotélio**

### **1.2.2.1 Prostaglandinas e Tromboxanos**

A produção destes eicosanóides é regulada pela disponibilidade do ácido araquidônico e pela atividade das sintases da prostaglandina H (PGHS). O ácido araquidônico é formado por fosfolípidios da membrana através da ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2) (DAVDGE, 2001). Uma vez liberado, o ácido araquidônico pode ser metabolizado pela ciclooxigenase (COX) e, posteriormente, convertido em PGH2 pelas sintases das prostaglandinas H (PGHS). A PGH2 é a precursora das demais prostaglandinas, incluindo o tromboxano e possui atividade direta sobre o músculo liso vascular, promovendo vasoconstrição. O tromboxano é o maior produto vasoconstritor derivado da ciclooxigenase. As prostaglandinas e os tromboxanos estimulam a atividade contrátil do músculo liso vascular através do acoplamento com receptores específicos. Esta interação leva ao aumento de cálcio intracelular e a maior sensibilidade às proteínas contráteis (DAVDGE, 2001).

### **1.2.2.2 Endotelina I**

Endotelina é um peptídeo com 21 aminoácidos existente no homem em três isoformas: endotelina-1 (ET-1), endotelina-2 (ET-2) e endotelina-3 (ET-3). O endotélio vascular produz somente a ET-1. Cada isoforma de ET exerce seu efeito após unir-se ao seu receptor específico. Foram denominados três tipos de receptores: ETA, ETB, ETC. O receptor ETA tem maior afinidade com a ET-1 e são expressos principalmente em células musculares lisas, provendo vasoconstrição através da ativação da fosfolipase C, da proteína quinase (PKC) e do aumento do  $Ca^{+2}$  intracelular, pelos canais de  $Ca^{+2}$  dependentes de voltagem. Normalmente, os níveis circulantes de endotelina são relativamente baixos, sugerindo que em condições fisiológicas pouca endotelina produzida (BATLOUNI, 2001).

### **1.2.2.3 Angiotensina II**

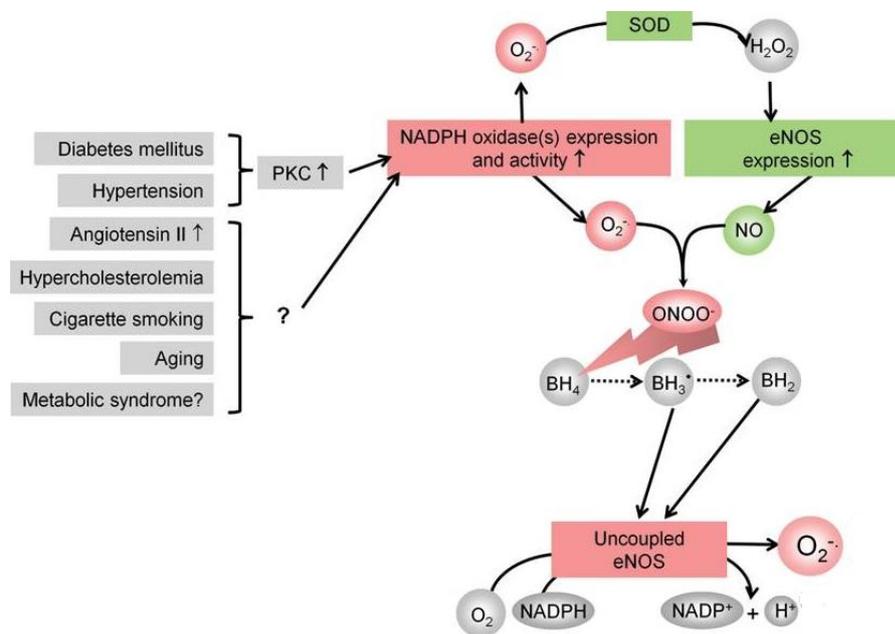
A formação da angiotensina II se inicia com a liberação de renina pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais quando estimuladas por redução da pressão arterial, desequilíbrio hidroeletrólítico ou ativação simpática. Assim, a pré pró-renina, um peptídeo não ativo se transforma em pró-renina. Posteriormente, a pró-renina, através da proteólise celular transforma-se em renina. Esta, ao ser liberada, irá atuar sobre o angiotensinogênio, que será clivado, gerando a angiotensina I. Esta, por sua vez, sofrerá ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) no pulmão, originando a angiotensina II. A transformação da angiotensina I em angiotensina II também ocorre no plasma e em vários outros tecidos, assim como nas células endoteliais. São conhecidos dois tipos de receptores para a angiotensina II: AT1 e AT2. A maioria dos efeitos biológicos é atribuída à ativação de AT1 (CRACKOWER, 2002; BATLOUNI, 2001). A angiotensina II exerce efeitos locais, como nos vasos sanguíneos, rins, coração e sistema endócrino, realizando importante papel na regulação da pressão sanguínea. Ela exerce efeito predominante no tônus vascular via interação com o receptor AT1, levando a efeitos vasoconstritores. Os receptores AT2 são expressos durante o desenvolvimento fetal, entretanto, esta expressão é amplamente diminuída após o nascimento. O mecanismo de ação deste receptor está relacionado à liberação de NO promovendo relaxamento do músculo liso vascular (CRACKOWER, 2002; BATLOUNI, 2001).

### **1.2.2.4 Espécies reativas do oxigênio**

A homeostase em torno do endotélio vascular é uma função do equilíbrio entre a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e a oxidação de espécies reativas de oxigênio. As Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) são metabólitos derivados da redução do oxigênio, e incluem as espécies radicais livres e outras que embora não possuam elétrons desemparelhados, são altamente instáveis e reativos (YUYUN et al., 2018).

No endotélio vascular a formação das EROs é mediada por algumas enzimas vasculares que incluem a NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, mieloperoxidase,

eNOS desacoplada, isoenzimas da citocromo P450, lipooxigenase, ciclooxigenase, heme oxigenase e glicose oxidase. A principal fonte de EROs no endotélio parece ser a NAD(P)H oxidase (CAI; HARRINSON, 2000). No diabetes por exemplo, espécies reativas de oxigênio geradas pela NADPH oxidase supra-regulada contribuem para alterações estruturais e funcionais da parede vascular. Além disso, o aumento da atividade da NAD(P)H pode estimular a produção de radicais livres por outras vias, como pelo desacoplamento da eNOS visualizado na Figura 6 (MANEA et al., 2018).



**Figura 6:** Em situações que alteram o funcionamento vascular (como diabetes, hipertensão, hipercolesterolemia, etc) as NAD(P)H-oxidases e a expressão da NOS são reguladas positivamente na parede vascular e geram superóxido. Os produtos de NADPH oxidases e NOS endotelial ( $O_2^-$  e NO), rapidamente se recombinam para formar peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Isso pode oxidar o cofator essencial da NOS tetrahydrobiopterina ( $BH_4$ ) levando ao desacoplamento da eNOS contribuindo para o estresse oxidativo vascular. Modificado de: Forstermann; Sessa (2012).

Muitas funções do endotélio e do músculo liso vascular são afetadas pelas EROs. No endotélio vascular os radicais livres podem causar diminuição da biodisponibilidade de NO, apoptose, aumento da adesão de monócitos e angiogênese. Já no MLV, os radicais livres podem promover crescimento celular, migração de mediadores inflamatórios, desorganização da matriz extracelular e aumento do tônus muscular (TANIYAMA & GRIENDLING, 2003). A produção

endógena de ROS é controlada por mecanismos anti-oxidantes, compostos por enzimas e doadores de elétrons de baixo peso molecular (como o ácido ascórbico, os  $\alpha$ -tocoferóis, a catalase, superóxido dismutase e a glutatona) que limitam a ação das ROS por eliminá-las ou reparam modificações oxidativas potencialmente danosas à célula (TANIYAMA & GRIENGLING, 2003).

O termo estresse oxidativo descreve a condição que envolve um aumento na produção das espécies reativas do oxigênio, onde há uma incapacidade das enzimas antioxidantes controlarem essa produção, ocasionando também um desequilíbrio na biodisponibilidade do sistema enzimático (PARAVICINI, 2008).

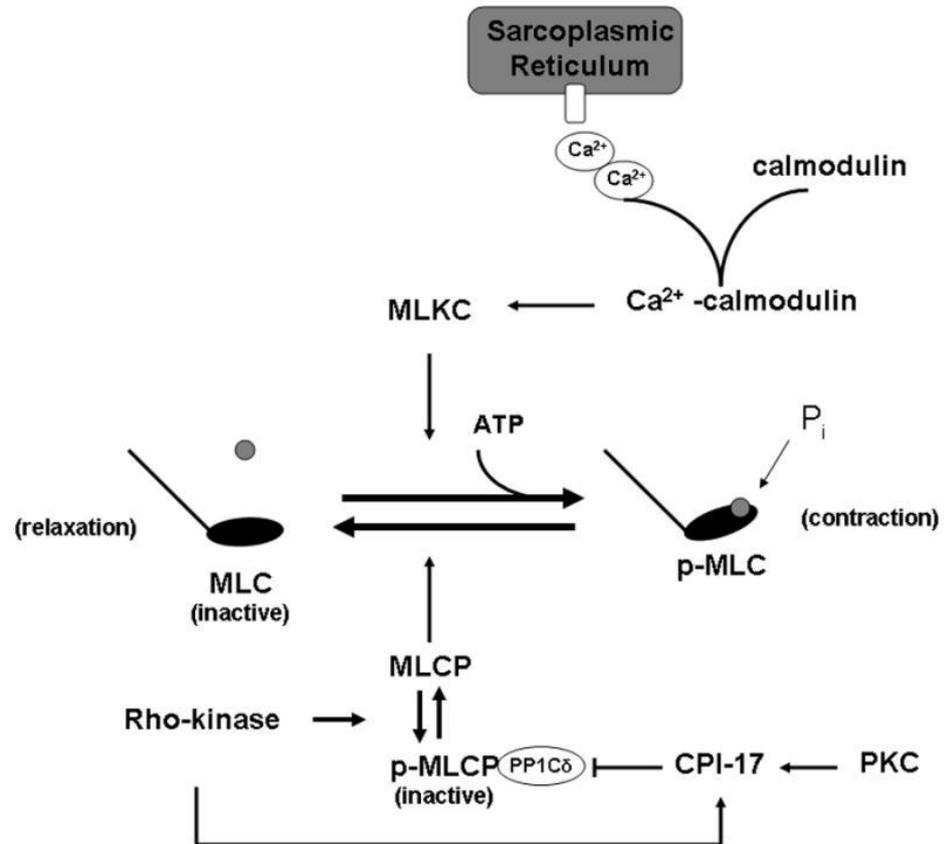
Dentre as principais EROs destacam-se: o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH\cdot$ ), o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Um dos mais importantes radicais para a biologia vascular é o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o qual é formado pela redução univalente do oxigênio (TANIYAMA & GRIENGLING, 2003). Apesar do  $O_2^{\cdot-}$  poder diretamente promover alterações na função vascular, ele também é fundamental na produção de outras espécies reativas. Radicais superóxido são rapidamente dismutados pelas enzimas: superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), superóxido dismutase citoplasmática (Cu, Zn-SOD) e superóxido dismutase extracelular (EC-SOD), produzindo peróxido de hidrogênio (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A glutatona peroxidase e a catalase são as enzimas envolvidas na degradação do peróxido de hidrogênio. A catalase transforma  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . Já a glutatona peroxidase transforma o  $H_2O_2$  glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG) (GRIENGLING; USHIO-FUKAI, 2000).

Dentre as EROs destacamos o papel do peróxido de hidrogênio, que é capaz de desempenhar função vasodilatadora ou vasoconstritora dependendo do leito vascular, da presença do endotélio, das condições experimentais ou das concentrações estudadas. A produção de  $H_2O_2$  pode ser envolvida no relaxamento dependente do endotélio em resposta a agonistas e fluxo ou compensada pela diminuição na produção de NO. O relaxamento envolvendo o  $H_2O_2$  envolve múltiplas vias, incluindo a hiperpolarização das células do músculo liso vascular pela ativação dos canais de potássio (FÉLÉTOU, 2009).

Em suma, o desequilíbrio na produção dos fatores vasodilatadores e vasoconstrictores derivados do endotélio promovem alterações na função endotelial e aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. E a exposição ao cobre pode ser um importante fator desencadeador da disfunção endotelial.

### 1.3 MÚSCULO LISO VASCULAR

O músculo liso vascular (MLV) é responsável pelo controle da resistência periférica total, pelo tônus arterial e venoso e pela distribuição do fluxo sanguíneo. A atividade contrátil das células do MLV é estimulada por fatores neurais e humorais. A contração das células do músculo liso também se dá pela interação entre actina e miosina, assim como no músculo esquelético (Figura 7). Porém o mecanismo pelo qual o cálcio regula a contração do músculo liso difere do esquelético. A concentração de cálcio que desencadeia a contração pode ser obtida através de canais para cálcio dependentes de voltagem e através de canais para cálcio mediados por receptores no sarcolema e através da liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático. As células se relaxam quando o cálcio intracelular livre é bombeado de volta para dentro do retículo sarcoplasmático, para fora da célula pela bomba de cálcio intracelular e removido da célula pelo trocador Na-Ca. O acoplamento farmacomecânico é o mecanismo predominante para promover a contração do MLV (AIRES, 2008).



**Figura 7:** A contração do músculo liso vascular é a soma da atividade da cinase da cadeia leve da miosina (MLCK) e da fosfatase de cadeia leve da miosina (MLCP). Com a ligação ao receptor, ocorre um aumento no  $Ca^{2+}$  intracelular, tanto via canais localizados na membrana quanto em reservas intracelulares no retículo sarcoplasmático. O  $Ca^{2+}$  interage com a calmodulina, formando o complexo calmodulina  $Ca^{2+}$  que ativa a MLCK. MLCK pode então fosforilar a cadeia leve da miosina (MLC-P), permitindo a interação próxima dos filamentos de actina e miosina para geração de força. O relaxamento ocorre com MLCP desfosforilando MLC. Adaptado de: WYNNE et al., 2009.

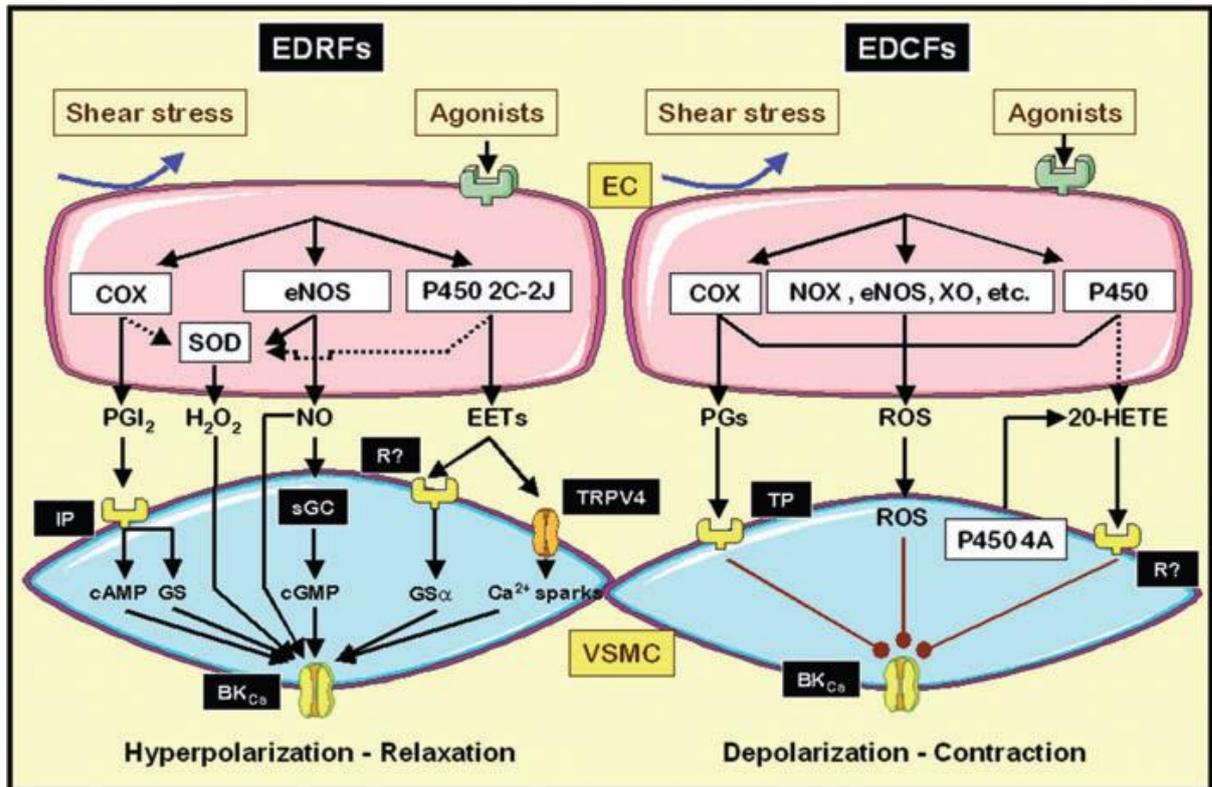
A atividade dos canais para potássio constitui um mecanismo essencial na regulação do potencial de membrana das células musculares vasculares. A abertura de um canal para potássio presente na membrana das células musculares vasculares provoca um aumento da saída de íons do meio intracelular para o meio extracelular o que impede que os canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem se abram com facilidade, conseqüentemente resultando numa diminuição do influxo de  $Ca^{2+}$  para o interior da célula, causando o relaxamento vascular. De forma inversa, o fechamento de um canal para potássio causa um estado de despolarização, levando a abertura de canais para  $Ca^{2+}$  dependentes de voltagem e conseqüente, aumento

da concentração de cálcio intracelular e vasoconstrição (FÉLÉTOU, 2009; AIRES, 2008).

Vários fatores vasoativos endoteliais regulam o tônus vascular através da ação nos canais para potássio. O relaxamento produzido pelas prostaciclina, peróxido de hidrogênio e pelo NO são associados à hiperpolarização das células do MLV e envolve a abertura de canais para potássio. A ativação de canais para potássio também é o mecanismo preponderante do relaxamento produzido por ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), gerados pelo citocromo P450 endotelial (FÉLÉTOU, 2009).

Os fatores contráteis derivados do endotélio também desempenham sua ação nos canais para potássio. A endotelina I dependendo dos vasos sanguíneos inibe vários grupos de canais para potássio (PARK et al., 2005). Similarmente a ativação de receptores de tromboxanos inibem canais para potássio e despolarizam as células do MLV (COGOLLUDO et al., 2003). As espécies reativas de oxigênio podem contribuir diretamente para a contração do músculo liso vascular. Elas aumentam a sensibilidade das proteínas contráteis ao íon cálcio e despolarizam as células do MLV inibindo a ativação dos canais para potássio (FÉLÉTOU, 2009).

A Figura 8 elucida os principais fatores vasoativos endoteliais que agem nos canais para potássio dependentes de cálcio de alta condutância (BK<sub>Ca</sub>).



**Figura 8:** Fatores vasoativos endoteliais e atividade em BKCa no músculo liso. 20-HETE, o ácido 20-hidroxiciclopentanoico; BKCa, canais para potássio ativados por cálcio de alta condutância; AMPc, monofosfato cíclico-adenosina; GMPc, o monofosfato cíclico de guanosina; COX, ciclooxigenase; EC, células endoteliais; EDCFs, fatores contratantes derivados do endotélio; EDRFs, fatores relaxantes derivados do endotélio; EETs, ácidos epoxieicosatrienóicos; eNOS, sintase endotelial de óxido nítrico; GS, proteína-G S; GS $\alpha$ , uma subunidade de proteína G-S; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o peróxido de hidrogénio; IP, receptor prostaciclina; NO, óxido nítrico; NOX, NAD(P)H-oxidase; P450-2C 2J ou 4A, o citocromo P450; PGI<sub>2</sub>, prostaciclina; R ?, receptor; ROS, espécies reativas de oxigênio; sGC, guanilato ciclase solúvel; SOD, superóxido-dismutase; TP, receptor de tromboxano; VSMC, célula do músculo liso vascular; XO, xantina oxidase. Fonte: FÉLÉTOU (2009).

## 2 JUSTIFICATIVA

A exposição ao cobre tem sido reconhecida como um problema comum de saúde ocupacional e ambiental. Assim, os estudos da exposição ao cobre, mesmo que conduzidos em animais, podem despertar a atenção dos órgãos públicos responsáveis pelo controle da emissão deste metal e da população em geral para este tema. Apesar de se saber que a sobrecarga de cobre traz prejuízos à saúde humana, não existem valores de referência de normalidade e Índice Biológico Máximo Permitido para esse metal.

Como exposto previamente, alguns estudos já demonstraram que o cobre mostra-se cardiotoxíco. Estudos anteriores sugeriram que o aumento da concentração de cobre pode aumentar o risco de doença cardiovascular e que os níveis séricos deste metal foram maiores em pacientes ateroscleróticos (BAGHERI et al. 2016). O cobre também pode promover mudanças diretamente no endotélio vascular ou, indiretamente, através do metabolismo das lipoproteínas, além disso, é um micronutriente essencial para enzimas que catalisam as reações oxidativas da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (ALISSA et al. 2006), exercendo assim um papel importante no processo de desenvolvimento da aterosclerose (BAGHERI et al. 2016; TASIĆ et al. 2015). Diante da hipótese de que a sobrecarga de cobre pode causar alterações vasculares, surgiu o questionamento sobre quais seriam as alterações vasculares desencadeadas pela sobrecarga deste metal, especificamente em relação à reatividade vascular, uma vez que alterações de reatividade poderiam elucidar mecanismos envolvidos com disfunção endotelial e, conseqüentemente, com o surgimento da aterosclerose. Diante destes fatos, o presente estudo busca investigar quais são os efeitos vasculares desencadeados, em um modelo agudo e *in vitro* pela sobrecarga de cobre, em concentrações dez vezes maiores que a média encontrada na população e elucidar os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações provocadas por este metal.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o efeito da sobrecarga aguda de cobre sobre a reatividade vascular em segmentos isolados de aorta torácica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar se a exposição aguda à alta concentração ao  $\text{CuCl}_2$  promove alteração na reatividade vascular à fenilefrina em aorta torácica;
- Analisar se essa exposição aguda à alta concentração ao  $\text{CuCl}_2$  altera a participação do endotélio na resposta contrátil à fenilefrina;
- Avaliar se em anéis de aorta torácica as respostas vasodilatadoras dependentes e independentes do endotélio são alteradas pela exposição aguda à alta concentração ao  $\text{CuCl}_2$ ;
- Elucidar os mecanismos envolvidos com alterações provocadas pela sobrecarga aguda de cobre sobre a reatividade vascular em segmentos isolados de aorta torácica.
- Detectar a produção *in situ* de ânions superóxidos em artérias aortas torácicas expostas às altas concentrações de cobre.
- Mensurar a produção *in situ* de óxido nítrico em artérias aortas torácicas expostas às altas concentrações de cobre.

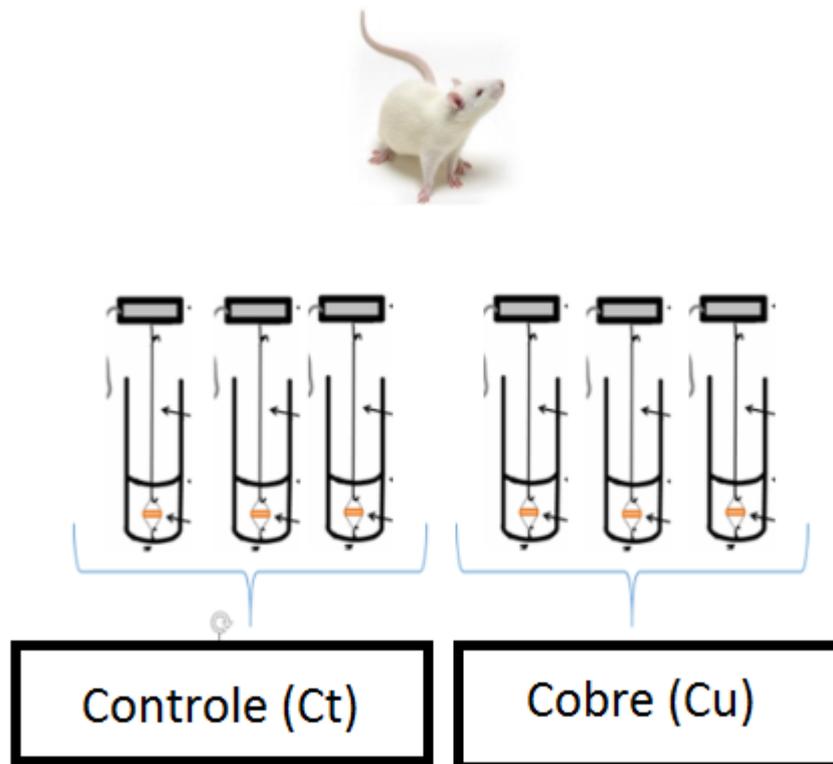
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), cedidos pelo Biotério do Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Estes animais foram mantidos em gaiolas, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas, sob condições controle de temperatura, com livre acesso à ração e água. O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-1991). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA 050/2015).

### 4.2 MODELO EXPERIMENTAL

Os ratos com aproximadamente três meses de idade, pesando entre 280 e 350 g foram anestesiados com uretana a 1,5 g/kg, ip no momento da realização do protocolo experimental e depois sacrificados. As aortas torácicas foram extraídas e o tecido conjuntivo removido. As aortas foram divididas em segmentos cilíndricos de 4 mm de comprimento e foram distribuídas de forma aleatória em dois grupos experimentais: Controle e Cobre (Figura 9).

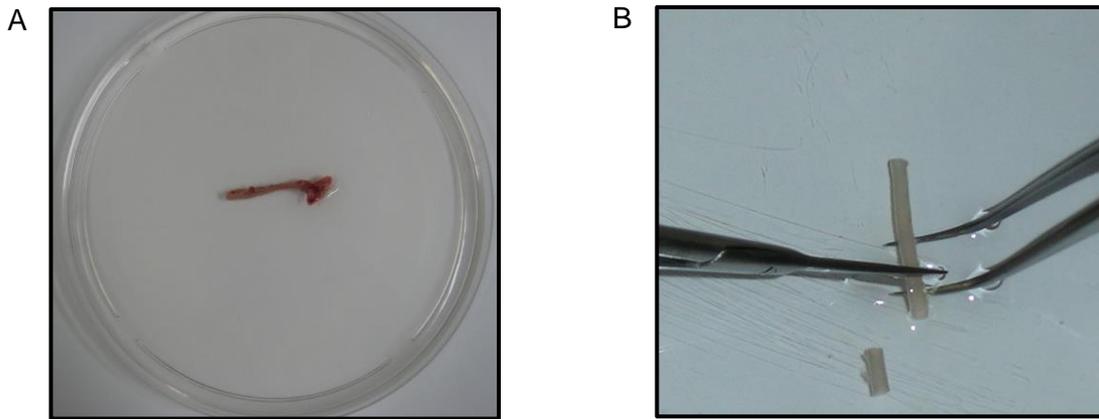


**Figura 9:** Distribuição dos grupos experimentais: Controle (Ct) e Cobre (Cu).

#### 4.3 METODOLOGIA EMPREGADA PARA OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA

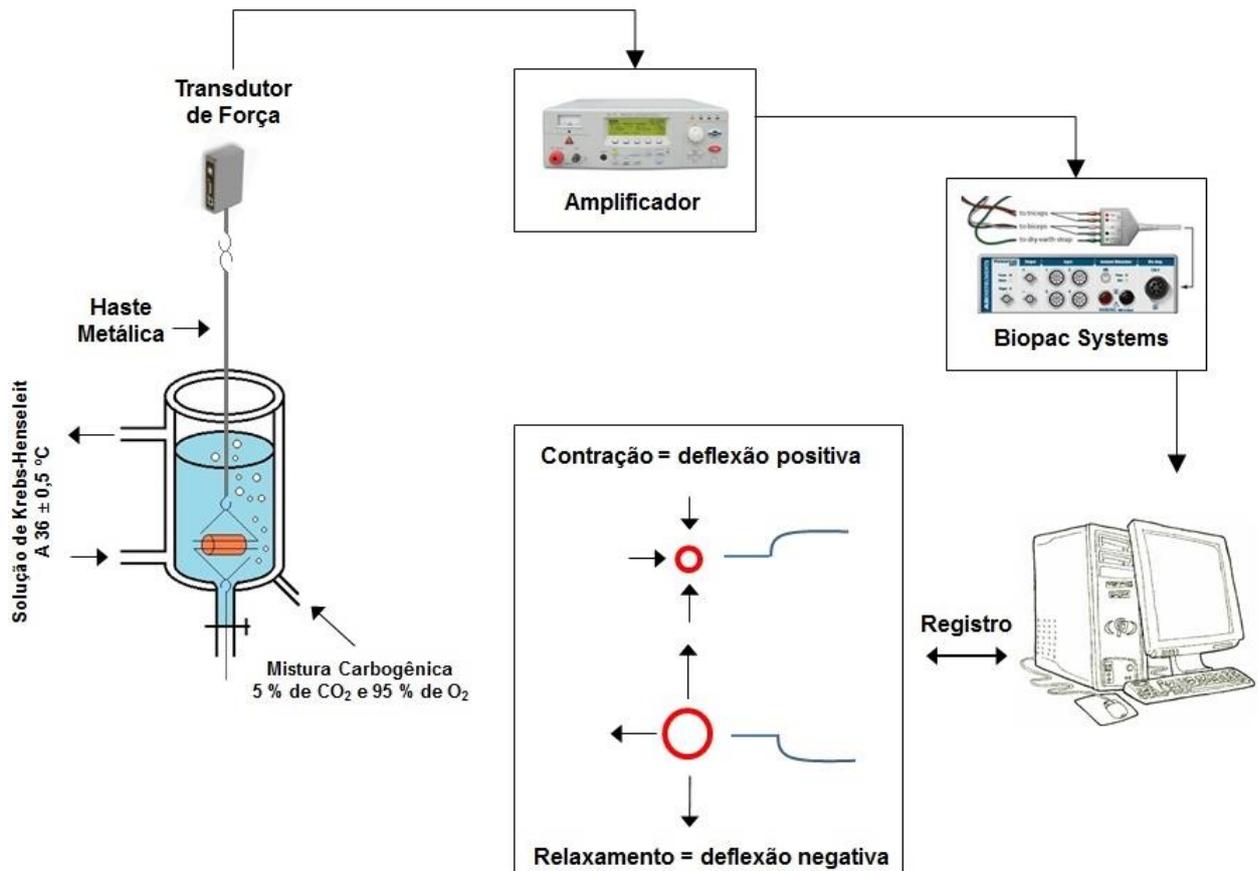
A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-modificado, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,17;  $\text{NaHCO}_3$  24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de  $\text{O}_2$ . Esta solução foi mantida com pH 7,4.

Como já mencionado, após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em seis segmentos cilíndricos de aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento (Figura 10).



**Figura 10:** (A) Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo; (B) Após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (NUNES, 2012).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs-Henseleit aquecida a  $36 \pm 0,5$  °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulo, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que ficassem paralelos na luz do vaso. Um fio foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração do diâmetro do vaso era captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA - USA) e este a um computador (Figura 11).



**Figura 11:** Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular *in vitro* (NUNES, 2014).

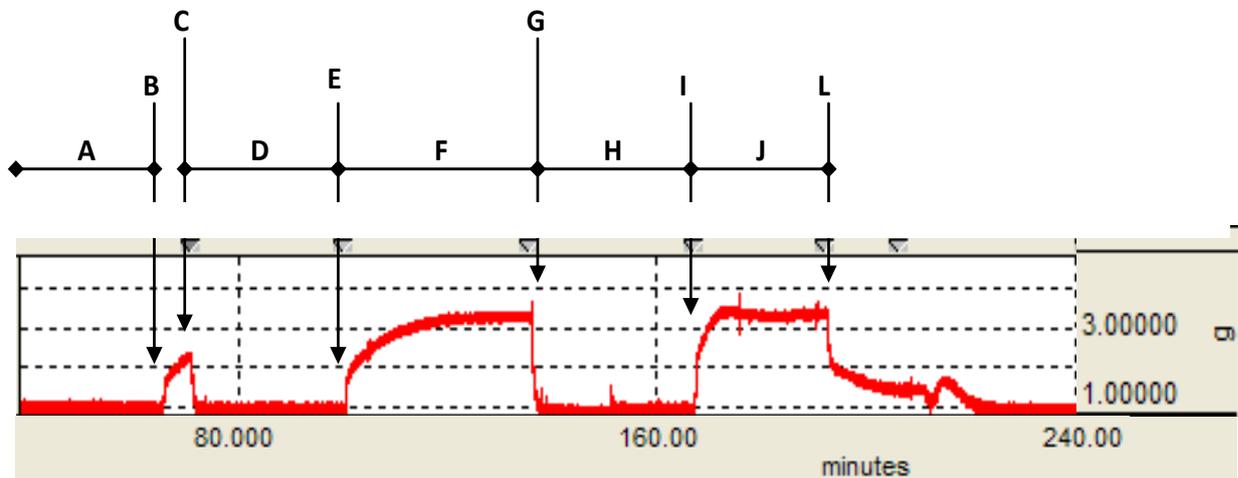
#### 4.3.1 Avaliação da reatividade vascular ao cloreto de potássio (KCl)

Após o período de 45 minutos de estabilização, foi administrado ao banho 125  $\mu\text{l}$  de KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem uma variação de um grama de força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados com solução de Krebs-Henseleit até retornar a tensão de repouso (Figura 12 B, C). Assim, os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura 12 D), uma nova dose de 125  $\mu\text{l}$  de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a aquisição de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida após 30 minutos da adição, tempo necessário para atingir um platô no registro da contração (Figura 12 E, F). Após este platô, os anéis foram novamente lavados três vezes com a solução de

Krebs-Henseleit para atingir o valor basal (1.0 grama) e, após 30 minutos (Figura 12G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

#### 4.3.2 Avaliação da integridade funcional do endotélio

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico, acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina (Fe)  $10^{-6}$  M. Uma vez atingido o platô, uma dose única de acetilcolina (ACh)  $10^{-5}$  M foi aplicada (Figura 12 I, J, L). A integridade endotelial era determinada por um relaxamento maior ou igual a 80%.



**Figura 12:** Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1.3g); B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; D) Período de estabilização (30 min); E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: I) Pré-contracção com fenilefrina (Fe)  $10^{-6}$ M; J) Platô da contração induzida pela Fe; L) Adição de acetilcolina (ACh)  $10^{-5}$ M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. Modificado de DIAS (2007).

#### 4.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### **4.4.1 Efeito da exposição a altas concentrações de cobre sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina e ao cloreto de potássio**

Após a avaliação da integridade funcional do endotélio, a solução nutritiva do banho foi trocada três vezes para que a tensão basal fosse estabelecida. Em seguida os anéis aórticos foram incubados ou não com alta concentração de cloreto de cobre (II) ( $\text{CuCl}_2$ ; 10  $\mu\text{g/mL}$ ) por 1 h. Após 30 minutos de estabilização, foi realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados. Para avaliar os efeitos da exposição ao cloreto de cobre sobre a resposta vasoconstritora ao KCl, um grupo de anéis foi utilizado em protocolo experimental a parte. Após o período de 1 h de estabilização com o cobre, foi administrado ao banho 125  $\mu\text{L}$  de KCl 75 mM para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização.

#### **4.4.2 Efeito da exposição a altas concentrações de cobre sobre a modulação do endotélio na resposta vasoconstritora à fenilefrina**

Com a finalidade de avaliar a capacidade do endotélio em modular a resposta constritora à fenilefrina, foram utilizados nos protocolos experimentais anéis de aorta com endotélio íntegro (E+) e sem endotélio (E-). As células endoteliais foram removidas mecanicamente através do uso de fios metálicos. Estes foram inseridos na luz do vaso e friccionados à sua íntima, ocasionando lesão do endotélio. A ausência do endotélio foi confirmada pela incapacidade da acetilcolina ( $10^{-5}$  M) de induzir o relaxamento, após a pré-contracção com fenilefrina ( $10^{-7}$  M). A preparação foi lavada e, após 30 minutos de retorno à tensão basal, foram realizadas curvas concentração-resposta à fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M).

#### **4.4.3 Efeito da exposição a altas concentrações de cobre sobre a resposta de relaxamento dependente do endotélio**

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta com endotélio foram pré-

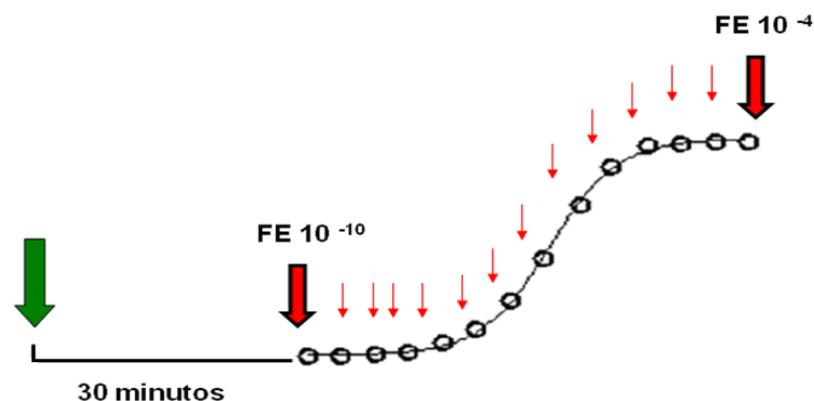
contraídos com fenilefrina  $10^{-6}$  M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina ( $10^{-11}$  a  $3 \times 10^{-5}$  M).

#### 4.4.4 Efeito da exposição a altas concentrações de cobre sobre a resposta de relaxamento independente do endotélio

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para acetilcolina, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina  $10^{-6}$  M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta ao NPS em concentrações de  $10^{-11}$  a  $3 \cdot 10^{-5}$  M.

#### 4.4.5 Estudo dos fatores endoteliais envolvidos na exposição a altas concentrações de cobre sobre a resposta à fenilefrina na aorta

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da seguinte forma: após o teste do endotélio e 1 h de estabilização da preparação, em que os anéis eram expostos ao cloreto de cobre, o fármaco a ser estudado era incubado por trinta minutos (L-NAME, Aminoguanidina, BH4, Tiron, Apocinina, DETCA, Catalase e TEA) e, logo após, era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) (Figura 13).



**Figura 13:** Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE ( $10^{-10}$  a  $3 \times 10^{-4}$  M) (ANGELI, 2009).

#### **4.4.5.1 Influência da exposição a altas concentrações de cobre sobre a via do óxido nítrico**

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) nos efeitos vasculares promovidos pela exposição ao chumbo, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100  $\mu$ M); e um inibidor da iNOS, aminoguanidina (50  $\mu$ M).

#### **4.4.5.2 Envolvimentos dos radicais livres sobre resposta contrátil à fenilefrina após a exposição a altas concentrações de cobre**

A fim de investigar a participação das espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido e peróxido de hidrogênio) foram realizadas curvas concentração-resposta a fenilefrina na presença Tiron (1mM), um varredor de ânions superóxido; de apocinina (10  $\mu$ M), um inibidor seletivo da enzima NAD(P)H oxidase; catalase (1000 U.mL<sup>-1</sup>), um “varredor” enzimático de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); ácido dietilditiocarbâmico (DETCA, 0.5mM), um bloqueador da superóxido dismutase; e um cofator da eNOS tetrahydrobiopterina (BH<sub>4</sub>, 1 mM).

#### **4.4.5.3 Envolvimentos dos canais para potássio sobre resposta contrátil à fenilefrina após a exposição a altas concentrações de cobre**

Para verificar o envolvimento dos canais para potássio, os anéis foram incubados com tetraetilamônio (TEA, 2mM), um inibidor não específico dos canais para potássio.

#### **4.4.6 Detecção *in situ* da produção de óxido nítrico**

A produção de NO foi determinada usando a 4,5-diaminofluoresceína (DAF2), um método descrito previamente e ajustado a partir de outros estudos (KOJIMA et al., 1998; LOBATO et al., 2011). Após isolamento e dissecção, as aortas foram imersas em solução tampão de Krebs-HEPES (em mM: 130 NaCl, 5,6 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>,

0,24 MgCl<sub>2</sub>, 8,3 HEPES, e 11 glicose, pH 7.4) com 30% de sacarose durante uma hora, a seguir foram embebidas em meio de inclusão para cortes com criostato (Killik®, Easy Path) e mantidas em -80 °C até o momento de realização dos cortes. As secções de aorta foram cortadas em criostato a 10 µm de espessura e transferidas para lâminas gelatinizadas, congeladas até o momento do protocolo com DAF-2. As lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora para retirar o meio de inclusão. A seguir as secções de aorta foram incubadas em idênticas condições a 37 °C por 30 min com tampão fosfato (0,1 M) contendo CaCl<sub>2</sub> (0,45 M). As lâminas foram secadas e incubadas durante 30 min a 37°C em câmara úmida protegida da luz com 8 µM de DAF diluído em solução tampão fosfato contendo CaCl<sub>2</sub>. A fim de excluir autofluorescência e fluorescência não específica, incubamos L-NAME (100 µM) por uma hora após os protocolos de incubação com DAF, para avaliar a fluorescência sensível à inibição da NOS. Imagens digitais foram coletadas no microscópio de fluorescência Leica DM 2500 com a objetiva de 40x e câmera Leica DFC 310 X, usando a mesma configuração de imagem para controle e grupo com sobrecarga de cobre. Para quantificação, 5 segmentos da aorta por animal foram utilizados para obter a média amostral. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software *Image J*. 50 3.4.3.

#### **4.4.7 Detecção *in situ* da produção de ânion superóxido**

A fluorescência oxidativa ao dihidroetídio (DHE) foi utilizada para avaliar a produção de ânion superóxido *in situ*, e os procedimentos se seguiram como previamente descrito (NUNES et al., 2014). A membrana celular é permeável ao hidroetídio, e na presença de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, esse componente é oxidado a brometo de etídio, que intercala com o DNA. Brometo de etídio é excitado a 546 nm e emite luz a 610 nm. Após isolamento e dissecação, as aortas foram imersas em eppendorf contendo solução tampão de Krebs-HEPES com 30% de sacarose durante uma hora, a seguir foram embebidas em meio de inclusão para criostato e mantidas em -80 °C até o momento de realização dos cortes. As secções de aorta foram cortadas com criostato em 10 µm de espessura e colocadas em lâminas gelatinizadas, congeladas até o momento do protocolo com DHE. No dia do protocolo as lâminas foram mantidas em estufa a 37°C por uma hora para retirar o meio de inclusão. A seguir as secções de aorta foram incubadas com tampão Krebs-HEPES, em idênticas

condições por 30 min a 37°C. Foram então secadas e incubadas com solução tampão de Krebs-HEPES contendo DHE (2  $\mu$ M) em câmara úmida e protegida da luz, à temperatura de 37°C por 30 min. Após este período as lâminas foram montadas com meio de montagem (Erv-Mount, Easy Path) e lamínula. As imagens das secções de aorta foram detectadas com microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500) usando filtro 568 nm, no aumento de 100 $\times$  e fotografadas com a câmara acoplada ao microscópio (Leica DFC 310 FX). Para quantificação, 5 segmentos da aorta por animal foram utilizados para obter a média amostral. A densidade de fluorescência média foi calculada usando o software *Image J*.

#### 4.5 DROGAS E REAGENTES

Cloreto de cobre (II), cloridrato de l-fenilefrina, L-NAME, cloreto de acetilcolina, pentobarbital de sódio, apocinina, tiron, catalase, tetraetilamónio, aminoguanidina, tetra-hidrobiopterina, ácido dietilditiocarbâmico, 4,5 diaminofluoresceína, foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, EUA). Os sais e reagentes utilizados foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* e da *Merck* (Darmstadt, Alemanha). Todas as drogas foram diluídas em água desionizada.

#### 4.6 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental. As respostas contráteis ao KCl foram expressas como tensão desenvolvida pelo anel de aorta, em gramas de contração. Os resultados de reatividade vascular das curvas concentração-resposta à fenilefrina foram normalizados em função da resposta máxima de contração ao KCl (75 mM) e estão expressas em porcentagem. As respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio, induzidas pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, foram expressas em porcentagem de relaxamento em relação à pré-contração obtida pela fenilefrina ( $10^{-6}$  M).

Para a determinação dos valores de resposta máxima ( $R_{\text{máx}}$ ) e  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ , que corresponde ao valor da concentração de fenilefrina que produz 50% da

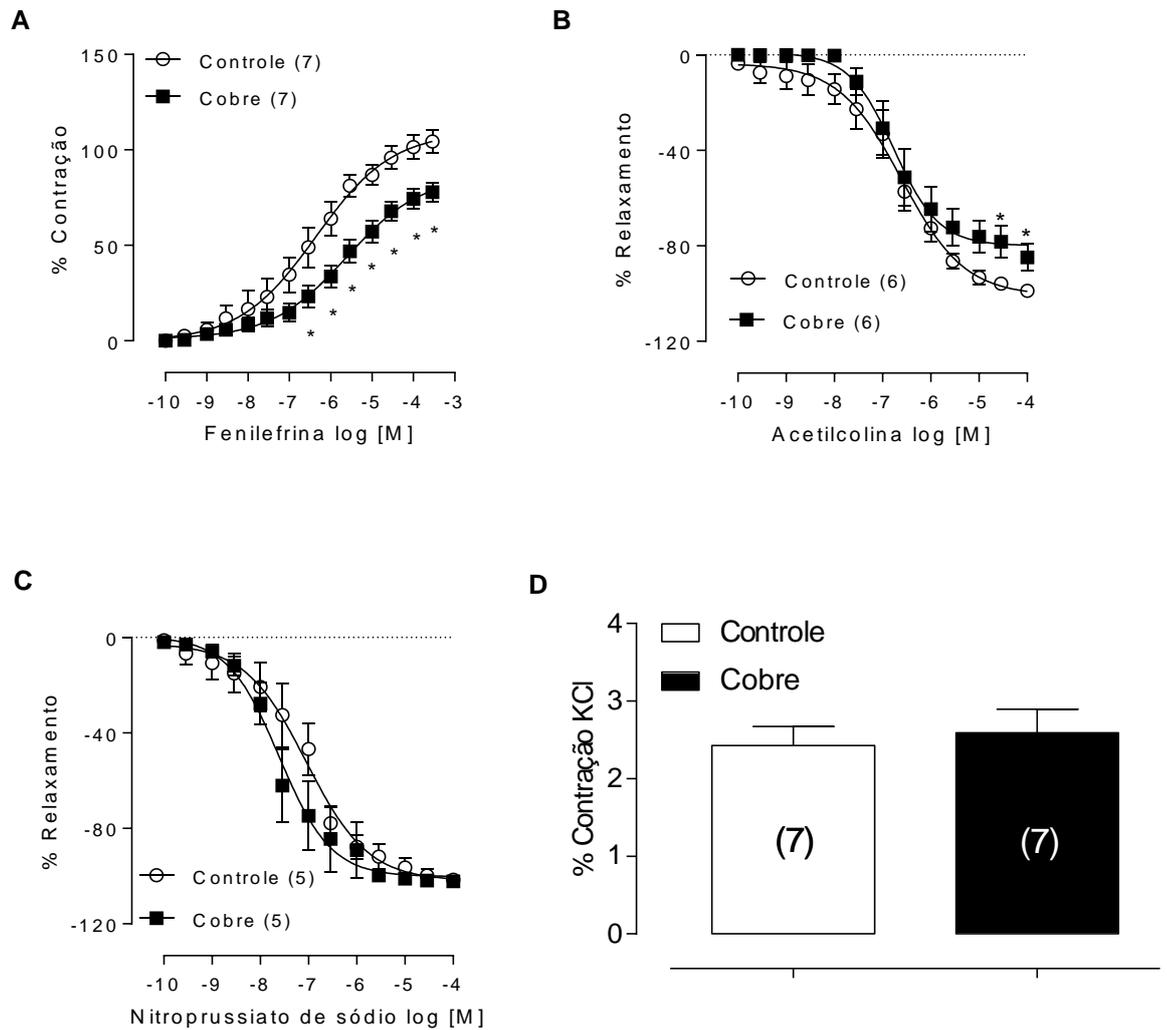
resposta máxima), em resposta aos diferentes agonistas utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se *GraphPrism Software* versão 6.01 (San Diego, CA, USA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A dAUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (% dAUC) da curva controle correspondente. Os resultados apresentados nas tabelas foram analisados usando o teste *t* de Student equando apresentados nas figuras utilizou-se ANOVA *two-way* completamente randomizadas para comparação entre grupos. Quando ANOVA mostrou um efeito significativo do tratamento, o teste *post hoc* de Tukey foi usado para comparar médias individuais.  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO COBRE NA REATIVIDADE VASCULAR

A exposição ao cobre não alterou a tensão de repouso dos anéis. No entanto, reduziu as respostas contráteis induzidas pela fenilefrina nas aortas de ratos (Figura 14A). Também diminuiu  $R_{m\acute{a}x}$ , mas não a sensibilidade à fenilefrina (Tabela 1). Além disso, o relaxamento concentração dependente induzido pela ACh no grupo Cobre foi reduzido em comparação com a resposta observada no grupo Controle (Figura 14B). As respostas induzidas pelo nitroprussiato de sódio (NPS) e pela incubação com KCl foram as mesmas nos dois grupos (Controle:  $2,29 \pm 0,21$  g,  $n = 30$ ; Cobre:  $2,32 \pm 0,92$  g,  $n = 30$ ;  $P > 0,05$ ) (Figura 14C, 14D), sugerindo que o músculo liso vascular não foi afetado.



**Figura 14:** Efeitos da sobrecarga de cobre nas curvas concentração-resposta. (A) fenilefrina, (B) acetilcolina e (C) nitroprussiato de sódio (NPS) e (D) resposta ao KCl em anéis aórticos. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \* $p < 0.05$  Cobre vs Controle, ANOVA *two way*.

**Tabela 1:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e Sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas de concentração-resposta à fenilefrina dos anéis isolados de aorta dos grupos Controle e Cobre.

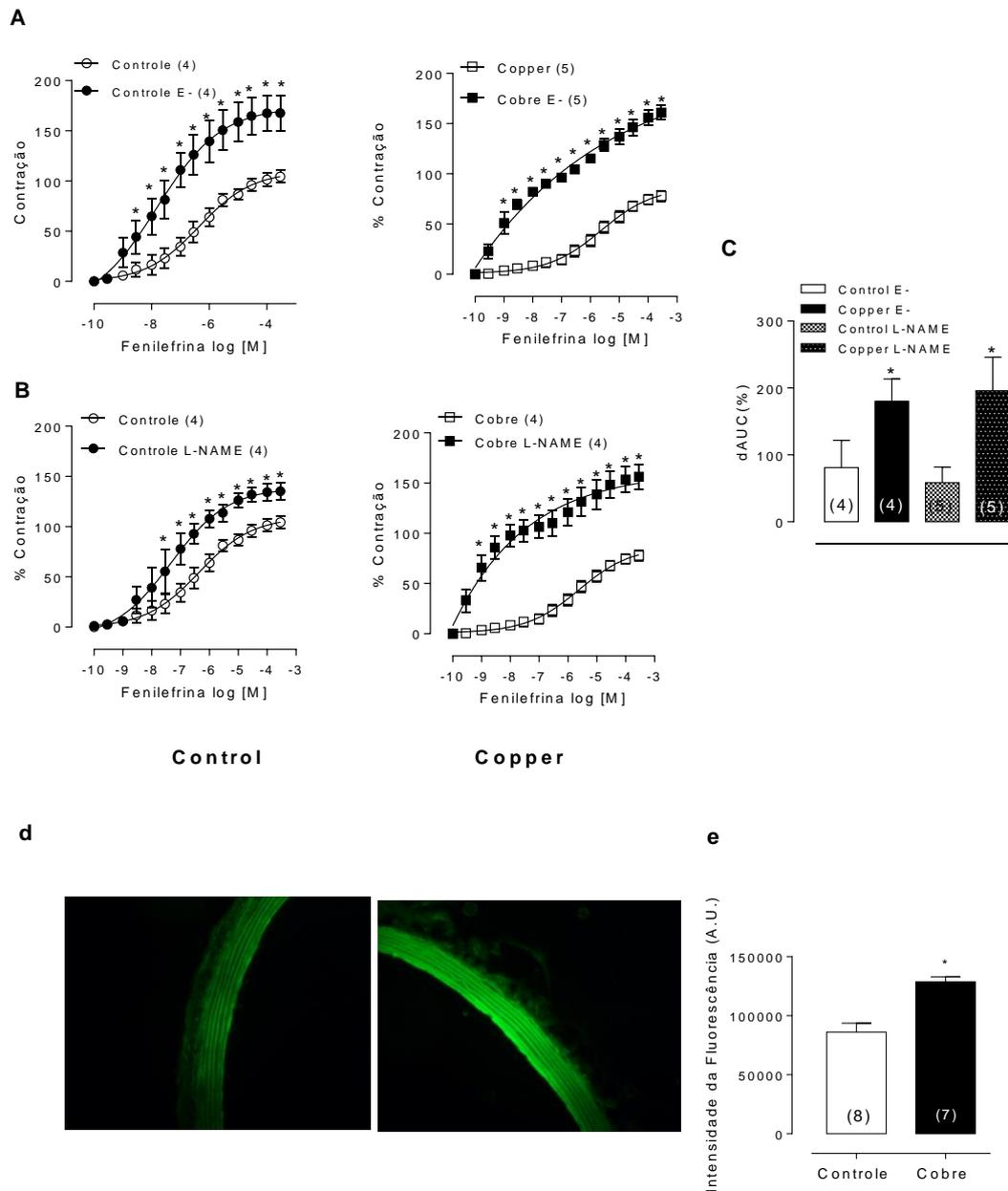
	R <sub>máx</sub> (%)	pD <sub>2</sub>
Controle	104 ± 6,1	5,6 ± 0,4
Cobre	80 ± 6,0 *	6,4 ± 0,2
Acetilcolina Ct	- 98 ± 2,2	6,60 ± 2,3
Acetilcolina Cu	- 84 ± 5,6 *	6,95 ± 2,4
Nitroprussiato Ct	-101 ± 2,2	8,16 ± 0,05
Nitroprussiato Cu	-102 ± 0,5	8,05 ± 0,05

Os valores estão expressos em média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, \*p<0,05 vs R<sub>máx</sub> de Controle, #p<0,05 vs R<sub>máx</sub> de Cobre.

## 5.2 PARTICIPAÇÃO DE FATORES ENDOTELIAIS NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Para elucidar o mecanismo da resposta de reatividade à fenilefrina reduzida pelo cobre, avaliamos a influência do endotélio removido mecanicamente. A reatividade da fenilefrina após dano endotelial foi aumentada em ambos os grupos experimentais (Figura 15A/Tabela 2), contudo este aumento foi maior no grupo Cobre, como demonstrado pelos valores da dAUC (Figura 15B). Esses dados associados à diminuição da reatividade vascular à fenilefrina sugerem que a exposição ao cobre pode aumentar a liberação de um fator de relaxamento derivado do endotélio.

Para avaliar se a exposição ao cobre alterava a modulação induzida pelo NO nas respostas contráteis à fenilefrina, os anéis aórticos foram incubados com o inibidor da NOS, L-NAME (100 µM). O L-NAME aumentou a resposta máxima à fenilefrina nas artérias dos grupos Cobre e Controle (Figura 15C/Tabela 2). No entanto, os valores de dAUC sugeriram que o papel desempenhado pelo óxido nítrico na resposta contrátil à fenilefrina foi maior no grupo exposto ao cobre (Figura 15D/Tabela 2). Corroborando nossos achados funcionais, a produção *in situ* de NO aumentou no grupo Cobre (Figura 15E).



**Figura 15:** (A) Influência da remoção do endotélio (E-) na vasoconstrição induzida pela fenilefrina em anéis de aorta expostos a Cu. (B) O gráfico demonstra a diferença na área abaixo da curva (dAUC) em aortas com e sem o endotélio. (C) Efeitos da incubação com L-NAME na vasoconstrição induzida pela fenilefrina nos anéis dos grupos Ct e Cu. (D) Ilustram a diferença na dAUC nos grupos Ct e Cu. (E) Efeito da sobrecarga de Cu na produção e / ou biodisponibilidade de NO em segmentos aórticos. (F) Microfotografias fluorescentes representativas de secções da aorta marcadas com corante fluorescente sensível a NO 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2). Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM.

O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \* $p < 0.05$  Cobre vs Controle, ANOVA *two way*

**Tabela 2:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis com e sem endotélio (E-) e na presença ou não de L-NAME dos grupos Controle e Cobre.

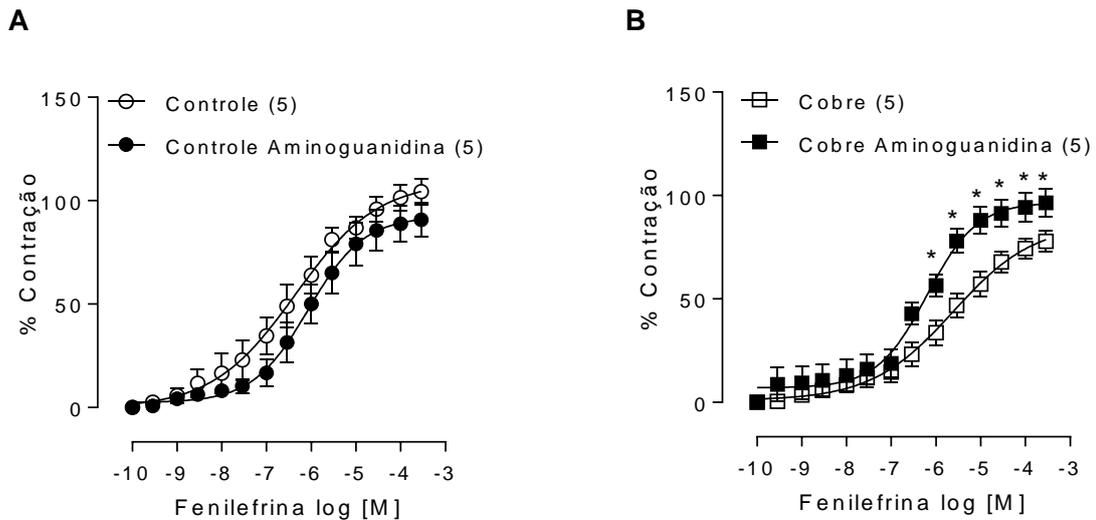
	R <sub>máx</sub> (%)	pD <sub>2</sub>
Controle	104 ± 6,1	5,6 ± 0,4
Cobre	80 ± 6,0 *	6,4 ± 0,2
Controle E-	104 ± 6,2*	-8,0 ± 0,4 *
Cobre E-	102 ± 4,3 <sup>#</sup>	-8,9 ± 0,1 <sup>#</sup>
Controle L-NAME	135 ± 8,1*	-7,7 ± 0,4 *
Cobre L-NAME	156 ± 12,1 <sup>#</sup>	-8,9 ± 0,09 <sup>#</sup>

Os valores estão expressos em média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, \* $p < 0,05$  vs R<sub>máx</sub> de Controle, <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs R<sub>máx</sub> de Cobre.

### 5.3 PARTICIPAÇÃO DA iNOS NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Como observamos uma redução na reatividade vascular à fenilefrina com aumento da produção de NO, a resposta vasodilatadora dependente do endotélio foi avaliada. Foi observado um comprometimento no relaxamento induzido pela acetilcolina, dependente de NO, nos anéis expostos ao cobre. Este resultado sugere que o aumento do NO não foi originado da sintase endotelial do óxido nítrico (eNOS).

Assim, investigamos se a iNOS poderia estar envolvida no aumento da produção de NO. Para isso, foi realizada incubação com o inibidor da iNOS, aminoguanidina (50  $\mu$ M). A aminoguanidina causou um aumento da resposta máxima apenas nos anéis expostos ao cobre (Figura 16/Tabela 3), corroborando a hipótese de que o aumento da produção de NO no grupo Cobre não foi causada pela eNOS.



**Figura 16:** Efeitos da aminoguanidina nas curvas concentração-resposta à fenilefrina nos grupos (A) Ct e (B) Cu. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \* $p < 0.05$ . Cobre vs Controle, ANOVA two way.

**Tabela 3:** Resposta máxima ( $R_{m\acute{a}x}$ ) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis na presença ou não de Aminoguanidina dos grupos Controle e Cobre.

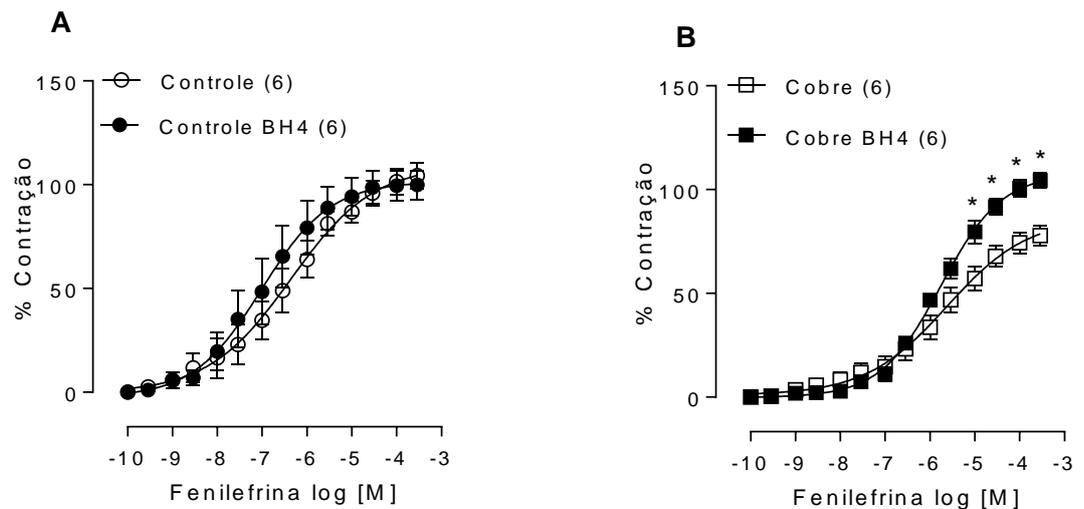
	$R_{m\acute{a}x}$ (%)	$pD_2$
Controle	$104 \pm 6,1$	$5,6 \pm 0,4$
Cobre	$80 \pm 6,0$ *	$6,4 \pm 0,2$
Controle Aminoguanidina	$90 \pm 8,3$	$5,8 \pm 0,3$
Cobre Aminoguanidina	$96 \pm 6,8$ #	$6,1 \pm 0,1$

Os valores estão expressos em média e EPM. Teste  $t$ -Student não pareado, \* $p < 0,05$  vs  $R_{m\acute{a}x}$  de Controle, # $p < 0,05$  vs  $R_{m\acute{a}x}$  de Cobre.

#### 5.4 ENVOLVIMENTO DE RADICAIS LIVRES NA ATIVAÇÃO DA INOS

Em decorrência dos resultados anteriores, surgiu uma questão sobre qual fator estaria ocasionando a ativação da iNOS. Decidimos investigar se poderia haver um desacoplamento da eNOS, que levaria ao aumento da produção de  $O_2^{\cdot-}$  e, portanto, à ativação da iNOS. Realizamos a incubação com o cofator da eNOS, BH4, e observamos um aumento na resposta vasoconstritora à fenilefrina apenas nos anéis expostos ao cobre (Figura 17/Tabela 4). Este achado sugere que a eNOS estava desempenhando um papel nesse mecanismo na condição de

desacoplamento, aumentando a produção de ânions superóxido. Para confirmar nossa hipótese de que ânions superóxido estavam aumentados no grupo de anéis expostos ao cobre, realizamos uma incubação com o varredor de radicais livres, Tiron (1mM). A droga foi capaz de aumentar a resposta vasoconstritora à fenilefrina somente em anéis expostos ao cobre (Figura 18AB/Tabela 5).



**Figura 17:** Influência da tetra-hidrobiopterina (BH4) nas curvas de concentração-resposta à fenilefrina nos grupos (A) Ct e (B) Cu. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \* $p < 0.05$ . Cobre vs Controle, ANOVA *two way*.

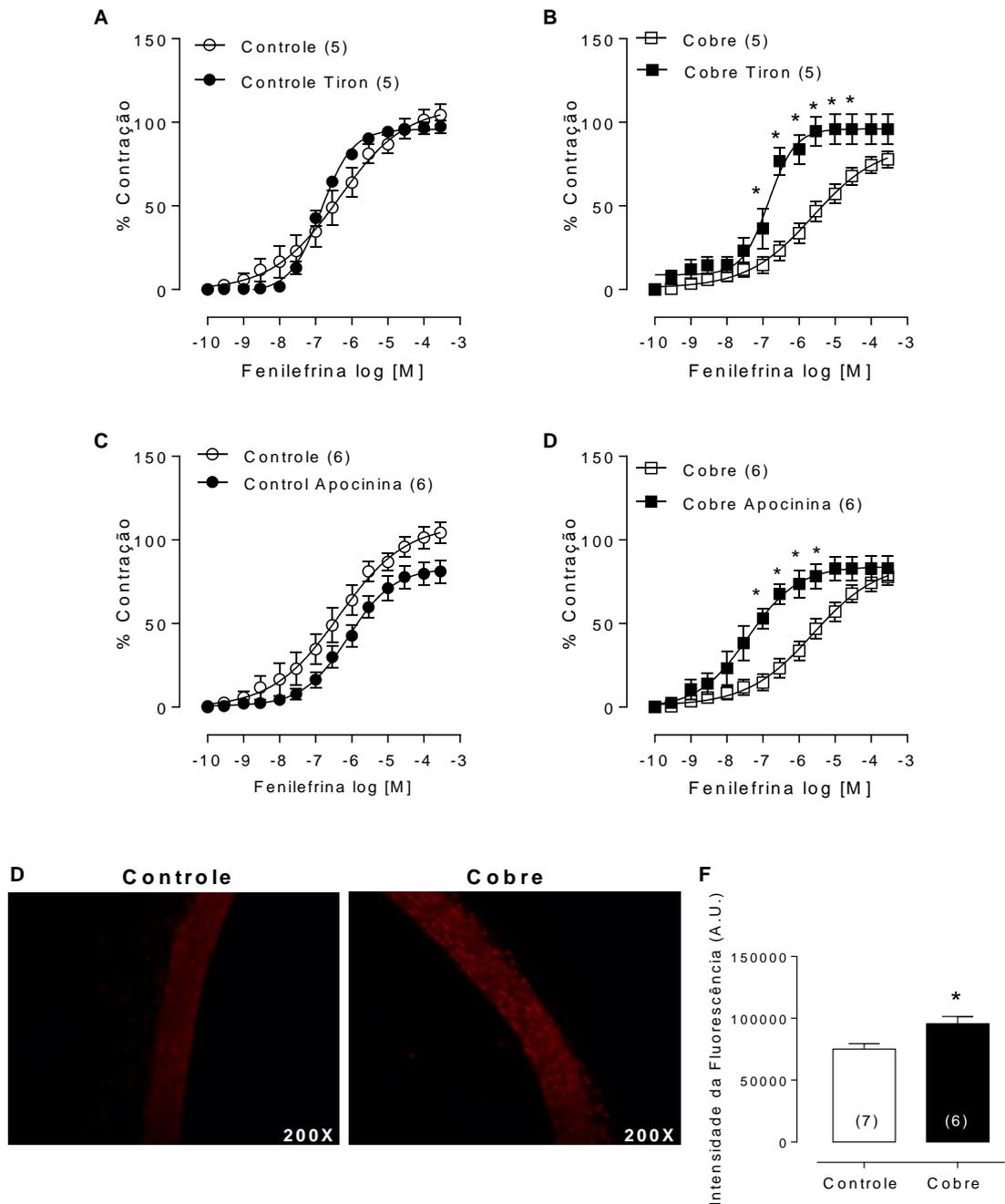
**Tabela 4:** Resposta máxima (Rmáx) e sensibilidade ( $pD_2$ ) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis na presença ou não de BH4 dos grupos Controle e Cobre.

	Rmáx (%)	$pD_2$
Controle	104 $\pm$ 6,1	5,6 $\pm$ 0,4
Cobre	80 $\pm$ 6,0 *	6,4 $\pm$ 0,2
Controle BH4	99 $\pm$ 6,9	6,8 $\pm$ 0,4
Cobre BH4	104 $\pm$ 3,5 #	5,8 $\pm$ 0,1

Os valores estão expressos em média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, \* $p < 0,05$  vs Rmáx de Controle, # $p < 0,05$  vs Rmáx de Cobre.

Investigamos também a participação da NAD(P)H oxidase na produção desses radicais livres. Para isso, realizamos a incubação dos anéis com apocinina

(30 $\mu$ M). A incubação com apocinina mostrou uma sensibilidade aumentada frente à resposta vasoconstrictora à fenilefrina apenas no grupo Cobre (Figura 18CD/Tabela 5). Além disso, corroborando nossos achados funcionais, a produção de  $O_2^{\cdot -}$  *in situ* mostrou-se aumentada pela fluorescência de DHE (Figura 18E).



**Figura 18:** Efeitos do Tiron nas curvas concentração-resposta à fenilefrina nos grupos (A) Ct e (B) Cu. Efeitos do inibidor específico da NAD(P)H oxidase, apocinina, nas curvas de concentração-resposta à fenilefrina em anéis dos segmentos de aorta (C) Ct e (D) Cu. (E) Microfotografias

fluorescentes representativas de seções aórticas marcadas com dihidroetidina (DHE) (F) e análise quantitativa da produção e/ou biodisponibilidade de  $O_2^{\cdot-}$ . Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \* $p < 0.05$ . Cobre vs Controle, ANOVA *two way*.

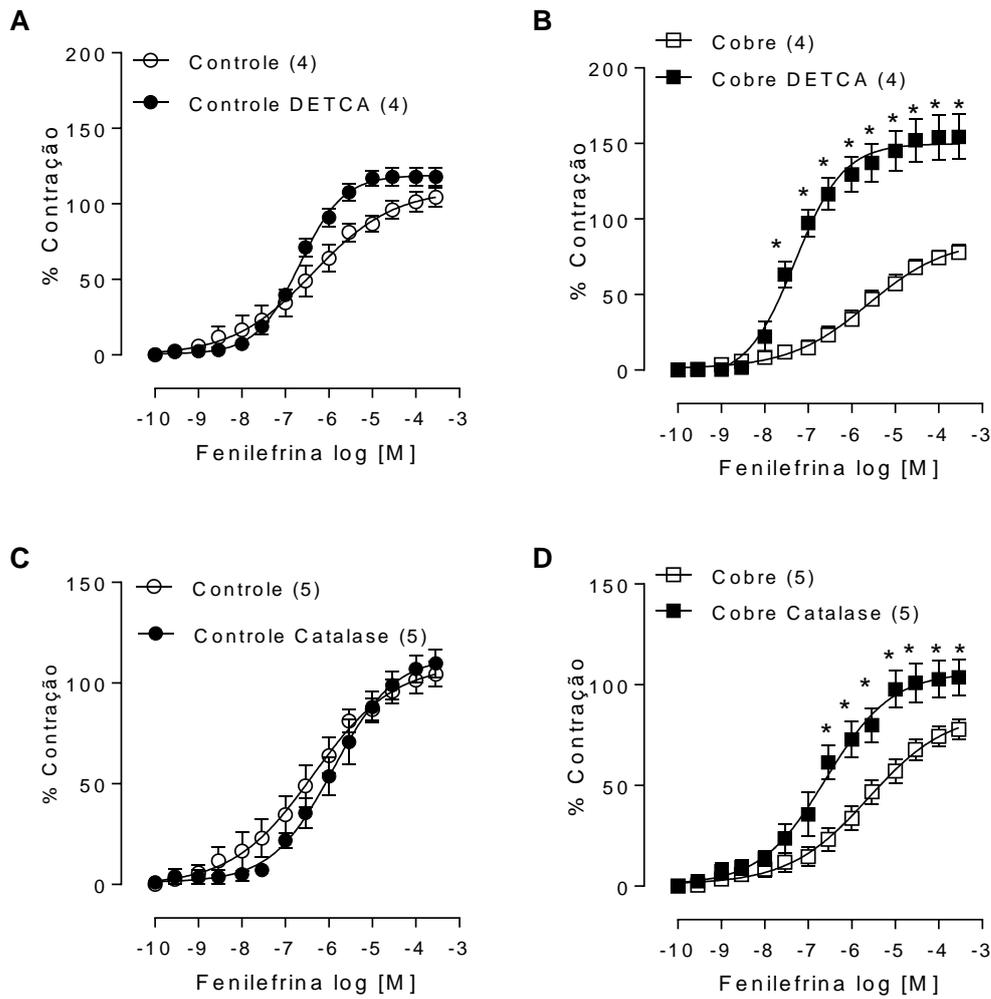
**Tabela 5:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis na presença ou não de Tiron e Apocinina dos grupos Controle e Cobre.

	R <sub>máx</sub> (%)	pD <sub>2</sub>
Controle	104 $\pm$ 6,1	5,6 $\pm$ 0,4
Cobre	80 $\pm$ 6,0 *	6,4 $\pm$ 0,2
Controle Tiron	97 $\pm$ 3,2	6,7 $\pm$ 0,06
Cobre Tiron	95 $\pm$ 8,1 <sup>#</sup>	6,8 $\pm$ 0,3
Controle Apocinina	98 $\pm$ 6,3	5,5 $\pm$ 0,2
Cobre Apocinina	83 $\pm$ 7,2	6,8 $\pm$ 0,3

Os valores estão expressos em média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, \* $p < 0,05$  vs R<sub>máx</sub> de Controle, <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs R<sub>máx</sub> de Cobre.

## 5.5 PARTICIPAÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA EM ANÉIS EXPOSTOS AO COBRE

Diante do aumento de ânions superóxido, investigamos se a atividade da SOD poderia estar aumentada no grupo de anéis expostos ao cobre. Realizamos a incubação com o inibidor da SOD, DETCA, e observamos um aumento na sensibilidade e na resposta máxima à fenilefrina apenas no grupo Cobre (Figura 19B/Tabela 6). Esse achado sugere que o aumento da atividade da SOD poderia estar levando a um aumento da produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A fim de investigar um aumento na produção de peróxido de hidrogênio, foi realizada a incubação com catalase, um varredor desses radicais livres. A incubação com catalase foi capaz de aumentar a resposta vasoconstritora à fenilefrina apenas nos anéis de expostos ao cobre (Figura 19D/Tabela 6), reforçando o papel do  $H_2O_2$  como vasodilatador.



**Figura 19:** Influência do inibidor da superóxido dismutase Cu/Zn, DETCA nas curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis aórticos (A) Ct e (B) Cu. Efeitos da catalase nas curvas de concentração-resposta à fenilefrina em anéis dos segmentos de aorta (C) Ct e (D) Cu. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses.  $*p < 0.05$ . Cobre vs Controle, ANOVA *two way*.

**Tabela 6:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis na presença ou não de DETCA e Catalase dos grupos Controle e Cobre.

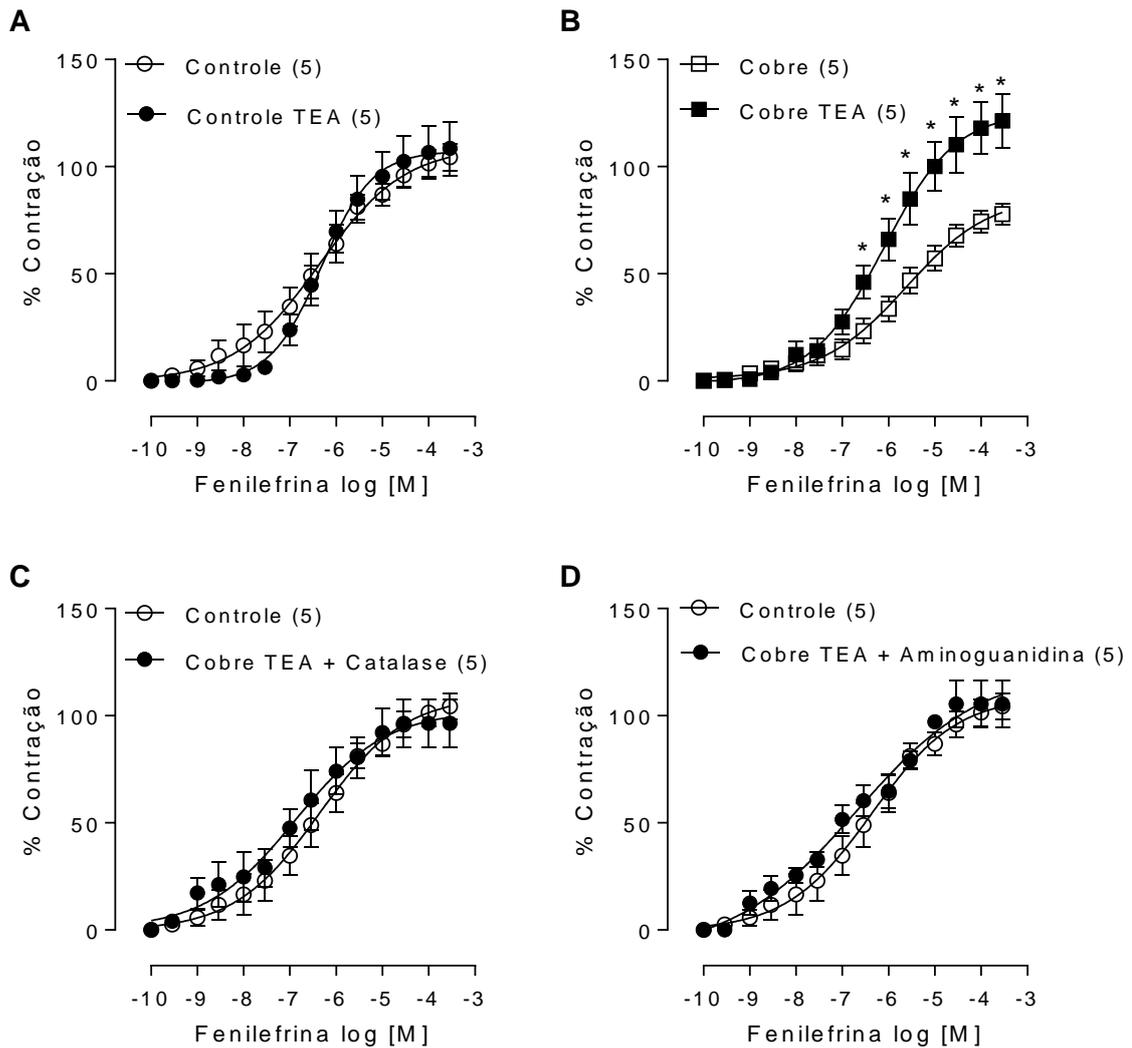
	R <sub>máx</sub> (%)	pD <sub>2</sub>
Controle	104 ± 6,1	5,6 ± 0,4
Cobre	80 ± 6,0 *	6,4 ± 0,2
Controle DETCA	117 ± 3,2	6,6 ± 0,1
Cobre DETCA	154 ± 14,1 <sup>#</sup>	7,6 ± 0,1 <sup>#</sup>
Controle Catalase	109 ± 6,2	6,0 ± 0,2
Cobre Catalase	113 ± 9,3 <sup>#</sup>	6,6 ± 0,2

Os valores estão expressos em média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, \**p*<0,05 vs R<sub>máx</sub> de Controle, <sup>#</sup>*p*<0,05 vs R<sub>máx</sub> de Cobre.

## 5.6 PARTICIPAÇÃO DOS CANAIS PARA POTÁSSIO NA RESPOSTA VASOCONSTRITORA À FENILEFRINA

Tanto o NO quanto o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atuam nos canais para potássio levando à hiperpolarização celular e consequente vasodilatação (FÉLÉTOU, 2009). A fim de investigar o envolvimento dos canais para potássio na resposta vasodilatadora à fenilefrina, utilizamos o TEA, um bloqueador não seletivo de canal para potássio. O TEA potencializou a resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina apenas nos segmentos aórticos expostos ao cobre (Figura 20B/Tabela 7).

Para confirmar nossa hipótese de que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o NO atuavam nos canais para potássio e induziam uma resposta vasodilatadora nos anéis expostos ao cobre, incubamos a catalase com TEA e aminoguanidina com TEA. A co-incubação aboliu o efeito vasodilatador observado, somente nos anéis do grupo Cobre (Figura 20CD/Tabela 7).



**Figura 20:** Efeito de bloqueadores de canais não seletivos para  $K^+$ , TEA, em anéis (A) Ct e (B) Cu. (C) Efeitos da co-incubação da catalase com TEA e (D) aminoguanidina com TEA nas curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta dos grupos Ct e Cu. A inserção mostra diferenças na dAUC na presença e ausência de TEA. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM. O número de animais utilizados é indicado entre parênteses. \* $p < 0.05$ . Cobre vs Controle, ANOVA two way.

**Tabela 7:** Resposta máxima (R<sub>máx</sub>) e sensibilidade (pD<sub>2</sub>) das curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis na presença ou não de TEA, TEA + Catalase e TEA + Aminoguanidina dos grupos Controle e Cobre.

	R <sub>máx</sub> (%)	pD <sub>2</sub>
Controle	104 ± 6,1	5,6 ± 0,4
Cobre	80 ± 6,0 *	6,4 ± 0,2
Controle TEA	110 ± 16,0	6,1 ± 0,2
Cobre TEA	121 ± 12,1 <sup>#</sup>	6,1 ± 0,1
TEA + Catalase	96 ± 11,4	6,7 ± 0,4
TEA + Aminoguanidina	105 ± 10,2	6,9 ± 0,2

Os valores estão expressos em média e EPM. Teste *t*-Student não pareado, \*p<0,05 vs R<sub>máx</sub> de Controle, <sup>#</sup>p<0,05 vs R<sub>máx</sub> de Cobre.

## 6 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo sugerem que a sobrecarga aguda de cobre reduziu a resposta contrátil à fenilefrina em anéis aórticos de ratos. O aumento do NO e ações subsequentes nos canais para potássio resultaram em diminuição da reatividade vascular à fenilefrina. A sobrecarga de cobre desencadeou o desacoplamento da eNOS aumentando a produção de ânions superóxido. Além disso, levou à ativação da iNOS e ao aumento da atividade da SOD, o que foi associado à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Conseqüentemente, NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram capazes de induzir respostas vasodilatadoras em anéis aórticos de ratos pela ativação de canais para potássio.

### 6.1 MODELO EXPERIMENTAL *IN VITRO* E CONCENTRAÇÃO DE COBRE

A concentração usual de cobre no plasma humano está na faixa de 0,3 a 2,1 µg/mL para ingestões de 1,4 a 2,0 mg de cobre/dia (ARNAL; MARRA, 2011). Segundo Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2004), a água potável não deve conter mais de 1,3 mg de cobre por litro de água (1,3 mg/L). Estudos populacionais demonstraram que as concentrações de cobre no sangue em indivíduos saudáveis são de aproximadamente 1µg/mL (ZHANG et al., 2015; ROCHA et al., 2016). Em nosso estudo, utilizamos uma concentração *in vitro* dez vezes maior (10µg/mL) do que a encontrada nessas situações, pois nosso objetivo foi descrever os principais efeitos e mecanismos envolvidos nas ações tóxicas vasculares causadas pela sobrecarga de cobre.

Em estudo caso controle desenvolvido na China, foi realizada uma associação entre o aumento da concentração sanguínea de cobre e desenvolvimento de morbidades decorrentes do diabetes (LI et al., 2017). No diabetes tipo 1, a expressão da proteína ATP7A (transportador de cobre / ATPase) e a atividade da SOD estão diminuídas em vasos. O transportador de cobre ATP7A é necessário para a ativação completa da SOD (superóxido dismutase extracelular), que é secretada pelas células musculares lisas vasculares (VSMCs) e ancorada à superfície endotelial para preservar a função endotelial pela eliminação de ânions superóxido extracelulares (SUDHAHAR et al., 2018). Ou seja, em situações de

aumento da concentração sanguínea de cobre e diminuição da atividade da ATP7A, a atividade da SOD também pode ser diminuída contribuindo para o desenvolvimento do estresse oxidativo.

Em pacientes com DM, o aumento do cobre plasmático provoca o aumento dos níveis de proteínas glicadas e sua acumulação pode contribuir para o desenvolvimento de outras doenças (NOWOTNY et al., 2015; PINKAS et al., 2016). A aceleração desse processo pode ocorrer através da reação de íons cobre com  $H_2O_2$  para gerar radicais livres e EROs (ALDINI et al., 2013) que reagem muito rapidamente com glicose. O resultado é a formação de muitos compostos dicarbonílicos mais reativos que participam de um ciclo que produz ainda mais ROS, que estão associadas aos efeitos do envelhecimento (WOLFF et al., 1991), câncer (LIN et al., 2016), doença de Alzheimer (DA) (VIÑA et al., 2004) e doença de Parkinson (ZHANG et al., 2000).

## 6.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO COBRE SOB A REATIVIDADE VASCULAR À FENILEFRINA E MODULAÇÃO ENDOTELIAL

Observamos uma redução na reatividade vascular à fenilefrina nos anéis aórticos expostos ao cobre. Esta resposta foi acompanhada por um aumento da modulação endotelial. Este resultado mostra que a exposição a altas concentrações de cobre é capaz de diminuir a resposta máxima à fenilefrina por um fator produzido pelo endotélio.

O desequilíbrio entre a produção de vasoconstritor endotelial e os fatores vasodilatadores caracteriza a disfunção endotelial, presente no estágio pré-clínico da aterosclerose. O aumento da produção de radicais livres e alterações na produção de NO é importante nesse processo (DAVIGNON; GANZ, 2004). Além disso, tem sido relatado que o cobre é capaz de oxidar o LDL, contribuindo para o processo de aterogênese (BREWER, 2007), e também pode afetar a estabilidade da placa aterosclerótica levando à ruptura (TASIC, et al., 2015). Nesse contexto, nossos achados sugerem que altas concentrações de cobre podem levar ao aumento da produção de fatores endoteliais que quando *in vivo* contribuiriam para o surgimento da aterosclerose, assim como de outras patologias.

O desenvolvimento da aterosclerose é caracterizado por um acúmulo de lipídios e elementos fibrosos nas grandes artérias. Os lipídeos que se acumulam nas placas ateroscleróticas são principalmente derivados da LDL, que podem filtrar através do endotélio vascular para a parede da artéria. O LDL aprisionado na parede da artéria pode sofrer modificações, como a oxidação. O LDL oxidado é reconhecido e absorvido pelos macrófagos na parede da artéria. A presença de macrófagos carregados de lipídios (células espumosas) na parede da artéria é uma característica da aterosclerose (STEINBERG, 1997). O que se sabe é que o cobre ativa genes colesterogênicos em macrófagos, o que pode fornecer um mecanismo para a associação entre este metal e a aterosclerose (BREWER, 2007).

Por outro lado, estudos demonstram os efeitos benéficos do cobre em relação a prevenção do desenvolvimento da aterosclerose. O acoplamento de nanopartículas de sulfeto de cobre a anticorpos visando os receptores TRPV1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1) atuam como um interruptor fototérmico para a sinalização de TRPV1 em células musculares lisas vasculares (CMLVs). Após a irradiação, os aumentos locais de temperatura abrem canais TRPV1 termo-sensíveis e causam o influxo de  $Ca^{2+}$ . O aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular ativa a autofagia e impede a formação de células espumosas nas CMLVs tratadas com lipoproteína de baixa densidade oxidada. Isso sugere que ligação do cobre com os receptores (CuS-TRPV1) pode representar uma ferramenta terapêutica para atenuar local e temporalmente a aterosclerose (GAO et al., 2018).

Em estudo experimental realizado com coelhos com hipercolesterolemia, a suplementação dietética de cobre diminui a aterosclerose na aorta torácica desses animais. Além disso, essa redução é inversamente proporcional à concentração de cobre local. Esses autores sugerem que este metal pode exercer um efeito protetor através de diferentes mecanismos mediados pelo óxido nítrico. O cobre pode aumentar a biodisponibilidade do NO aumentando a vasodilatação, reduzindo a pressão arterial e o estresse de cisalhamento. O NO também reduz a agregação plaquetária em locais de disfunção endotelial, reduzindo a liberação de fatores de crescimento plaquetário (LAMB et al., 1999). Também tem sido demonstrado que os íons de cobre podem modular diretamente a ação de outros fatores de crescimento implicados na aterosclerose, como a IL-1 $\beta$  e (VIGNERI; PURRELLO, 1995).

desempenhar papel anti-inflamatório (BERTHON, 1993), colaborando nessas situações para a prevenção da doença.

Esses resultados divergentes descritos acima, só reforçam a ideia de que é necessário conhecer a concentração sanguínea ideal do cobre para a minimização do surgimento de doenças associadas à intoxicação ou deficiências desse metal.

### 6.3 EFEITO DA EXPOSIÇÃO AO COBRE SOBRE O RELAXAMENTO DEPENDENTE E INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO

O óxido nítrico é o principal fator vasodilatador produzido pelo endotélio. É produzido pela eNOS e atua nas células musculares lisas (DAVIGNON, 2004). A princípio, poderíamos supor que o NO seria o fator produzido pelo endotélio, causador da diminuição da reatividade vascular. No entanto, também demonstramos uma diminuição do relaxamento dependente do endotélio causado pela acetilcolina, que é dependente do NO. Um resultado semelhante foi encontrado em experimentos com aortas de coelhos, onde o relaxamento dependente de ACh em vasos ateroscleróticos foi atenuado, mas um aumento de NO foi encontrado. Os autores sugeriram um possível aumento da eNOS nas células musculares lisas (MINOR et al., 1990). No nosso estudo, nossa sugestão foi que o cobre poderia estar desencadeando mecanismos de ativação de outras isoformas da NOS aumentando a produção de NO. Nossos resultados confirmaram um aumento da produção de NO via iNOS e esses dados serão comentados posteriormente.

Chiarugi et al. (2002) também demonstraram que a incubação prolongada de anéis aórticos com concentrações submicromolares de Cu prejudicou o relaxamento induzido pela ACh e não afetou o relaxamento induzido pelos doadores de NO. Estes autores associaram em parte esses achados à presença de estresse oxidativo, já que na presença de tiron, o prejuízo do relaxamento do endotélio foi parcialmente abolido (CHIARUGI et al., 2002). Prejuízos no relaxamento dependente do endotélio também foram observados por Saari et al. (1992), porém neste estudo a deficiência dietética de cobre também reduziu o relaxamento em resposta ao nitroprussiato de sódio em anéis aórticos de ratos.

Esses autores associaram os achados a alterações da interação do EDRF com o músculo liso vascular (SAARI et al., 1992).

Bianchini et al. (1999) relatam que a eNOS é inibida pelo Cu apenas quando o metal é direcionado para o compartimento citoplasmático por portadores tipicamente presentes no soro, como ceruloplasmina, histidina ou albumina. Foi relatado que, quando ligado a ceruloplasmina, o Cu prejudica o relaxamento dependente do endotélio na aorta isolada de coelho provavelmente por agir capturando NO (CAPPELLI-BIGAZZI et al., 1997). No nosso estudo a sugestão foi que o cobre estaria promovendo um desacoplamento da eNOS, o que poderia explicar o prejuízo no relaxamento dependente do endotélio observado através da ação da ACh. Esse desacoplamento foi confirmado através da incubação com BH4.

#### 6.4 FATORES ENVOLVIDOS NO EFEITO DO COBRE SOBRE A RESPOSTA À FENILEFRINA

##### 6.4.1 Efeito da exposição aguda ao cobre na via do óxido nítrico

Sugerimos que a exposição ao cobre poderia induzir a produção de outro fator vasodilatador endotelial além do NO ou um aumento na produção de NO por outra isoforma da NOS. O NO também pode ser produzido pela nNOS e pela iNOS (FORSTERMANN, 2012). Investigamos através da incubação com L-NAME, se a produção total de NO seria alterada em anéis expostos ao cobre. O resultado desta incubação mostrou um aumento na produção de NO, corroborando o aumento do NO detectado *in situ* pelo DAF-2.

Apesar do aumento da produção de NO demonstrada pela incubação com L-NAME, o resultado anterior demonstrou que o relaxamento dependente do endotélio causado pela acetilcolina foi diminuído em anéis expostos ao cobre. A hipótese levantada foi que a exposição ao cobre poderia estar desencadeando mecanismos de ativação da iNOS e levando ao aumento da produção de NO. Nossa hipótese foi confirmada através dos resultados de incubação com aminoguanidina.

A NOS induzível não é expressa comumente nas células endoteliais, mas a sua expressão pode ser induzida por citocinas e outros agentes. A expressão da enzima pode ser estimulada em praticamente qualquer célula ou tecido, desde que os agentes indutores sejam apropriados. Uma vez expressa, a iNOS é constantemente ativa e não é regulada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (FORSTERMANN, 2012; FORSTERMANN, 2000). Quando estimulado, produz concentrações tóxicas de NO, o que, por sua vez, reage com os ânions superóxidos que produzem peroxinitrito, o que contribui para o desacoplamento da eNOS (CHEN et al., 2010), levando a um ciclo vicioso de aumento da produção de ROS.

Outros estudos demonstraram o aumento da atividade da iNOS em situações de exposição ao cobre. Em investigação sobre os efeitos do cobre na resposta inflamatória e os papéis protetores das proteínas de choque térmico (Hsps) em testículos de frango, os resultados mostraram que a atividade e o nível da iNOS foram aumentadas em comparação com o grupo controle. Os níveis de mRNA de citocinas pró-inflamatórias e fatores inflamatórios foram aumentados como um todo. (SHAO et al., 2018).

A concentração sérica de cobre é maior que o normal em várias doenças inflamatórias em humanos e animais de laboratório (LEWIS, 1984), assim como em situações de infecção, doenças crônicas e neoplasias (BESHGETOOR; HAMBIDGE, 1998). Sugere-se que o aumento da ceruloplasmina é provavelmente responsável pelo aumento do cobre sérico nas condições supracitadas (LEWIS, 1984). A ceruloplasmina responde como uma proteína reativa de fase aguda ao estresse e trauma (BESHGETOOR; HAMBIDGE, 1998). É formada principalmente por hepatócitos, monócitos e macrófagos ativados. O nível plasmático de ceruloplasmina quase duplica em resposta a inflamação, trauma ou infecção (VASSILIEV et al., 2005). Pelo menos três atividades da ceruloplasmina são consistentes com os achados de aumento da concentração em respostas inflamatórias: antioxidante, bactericida e ferroxidase (BAKHAUTDIN et al., 2013). Sabe-se ainda que a ligação da ceruloplasmina com cobre é um pré-requisito para a inibição do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF), uma citocina pró-inflamatória (KOSTEVICH et al., 2015).

Esses estudos demonstram um aumento das concentrações de cobre em situações de inflamação, porém em decorrência do aumento da ceruloplasmina. No nosso estudo, nossa hipótese é que o cobre é um fator responsável pelo desenvolvimento de uma situação inflamatória.

#### **6.4.2 Efeito da exposição aguda ao cobre na via do estresse oxidativo**

Estudos anteriores relataram que o cobre pode modular diretamente a atividade da NOS, devido ao fato desta enzima envolver reações catalisadas por heme e ferro, que possuem propriedades semelhantes ao cobre (IGNARRO, 1990; PLANE et al., 1997). Nossa sugestão é que a sobrecarga de cobre, poderia levar ao desacoplamento da eNOS através de sua interação com o ferro ou zinco dessa enzima (Figura 4). O desacoplamento desta enzima aumentaria a produção de radicais livres, que estavam levando à ativação da iNOS. Confirmamos nossa hipótese de que a eNOS estaria desacoplada através da incubação com BH4. Além disso, nossos resultados também mostraram que a incubação com o varredor de ânion superóxido, tiron, aumentou a sensibilidade vascular à fenilefrina apenas no grupo no Cobre. Sugerimos também que a reatividade aumentada observada nos anéis expostos ao cobre incubados com tiron, pode ser explicada pelo aumento da produção de um radical livre vasodilatador, que é o peróxido de hidrogênio. Posteriormente discutiremos os resultados da incubação com a catalase, que confirmaram nossa hipótese de aumento de peróxido de hidrogênio. Para finalizar, confirmando os dados funcionais, as aortas do grupo Cobre apresentaram uma produção aumentada de ânions superóxido, avaliada *in situ* pela técnica de DHE.

Um dos principais fatores responsáveis pela ativação da iNOS é o fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). O NF- $\kappa$ B é aumentado principalmente em condições de estresse oxidativo (BAEUERLE, 1998). A produção aumentada de estresse oxidativo estimula cascatas de sinalização incluindo a proteína quinase C e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), levando à translocação nuclear de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e a proteína ativadora-1 (AP-1) para se ligar ao DNA (SCHLEICHER; FRIESS, 2007). Esses fatores de transcrição estão envolvidos na regulação de uma variedade de moléculas celulares, como a NAD(P)H oxidase (MANEA et al., 2008). Para avaliar a participação da NAD(P)H oxidase, realizamos a incubação com

apocinina. E ao contrário do que esperávamos este estudo também encontramos uma reatividade aumentada à NAD(P)H oxidase. Esta resposta pode ser explicada pelo fato de que a NAD(P)H oxidase poderia estar levando a uma conseqüente produção de um fator vasodilatador que é  $H_2O_2$  produzido pela dismutação de ânions superóxido a partir da SOD. A ativação dessa enzima e da iNOS, poderiam estar levando à geração de um ciclo vicioso de ROS.

Muitas alterações celulares são mediadas direta ou indiretamente através da modulação da via de sinalização do fator nuclear-kB (ALLEN; TRESINI, 2000). O NFkB, tem sido reconhecido como um importante fator no controle das respostas celulares ao estresse oxidativo. NF-kB está envolvido na regulação de um grande número de genes que controlam vários aspectos da imunidade e resposta inflamatória, incluindo citocinas, quimiocinas, lipídios mediadores, enzimas, moléculas de adesão e óxido nítrico (ALI; MANN, 2004). Nas células em repouso, a localização nuclear do NF-kB é dificultada pela ligação da proteína inibidora Ikb $\alpha$ , que sequestra o NF-kB no citoplasma (VIATOUR et al., 2005). A ativação do NFkB pode ter várias conseqüências fisiológicas e tem sido implicada na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular pela indução de proteínas antiapoptóticas. No entanto, o NFkB é mais conhecido por seu papel no sistema imunológico, onde atua como um importante regulador positivo da resposta inflamatória (VIATOUR et al., 2005).

Está bem descrito que o cobre é um co-fator para a atividade de várias enzimas, dentre elas a superóxido dismutase (Cu, Zn-SOD) (GAETKE, 2014). A deficiência de cobre pode levar à diminuição da atividade dessa enzima (URIU-ADAMS et al., 2005) enquanto a suplementação com metal pode restaurar a atividade do cobre, Zn-SOD (HARRIS, 1992; FERNS et al., 1997). Portanto, levantamos a hipótese de que a atividade da SOD poderia ser aumentada devido ao aumento da concentração de cobre. De fato, demonstramos através da incubação com DETCA um maior envolvimento dessa enzima no grupo de anéis expostos ao cobre. No entanto, vale a pena mencionar que o aumento da atividade da SOD pode ser explicado também como um efeito compensatório para o aumento da produção de ânions superóxido (NUNES et al., 2015).

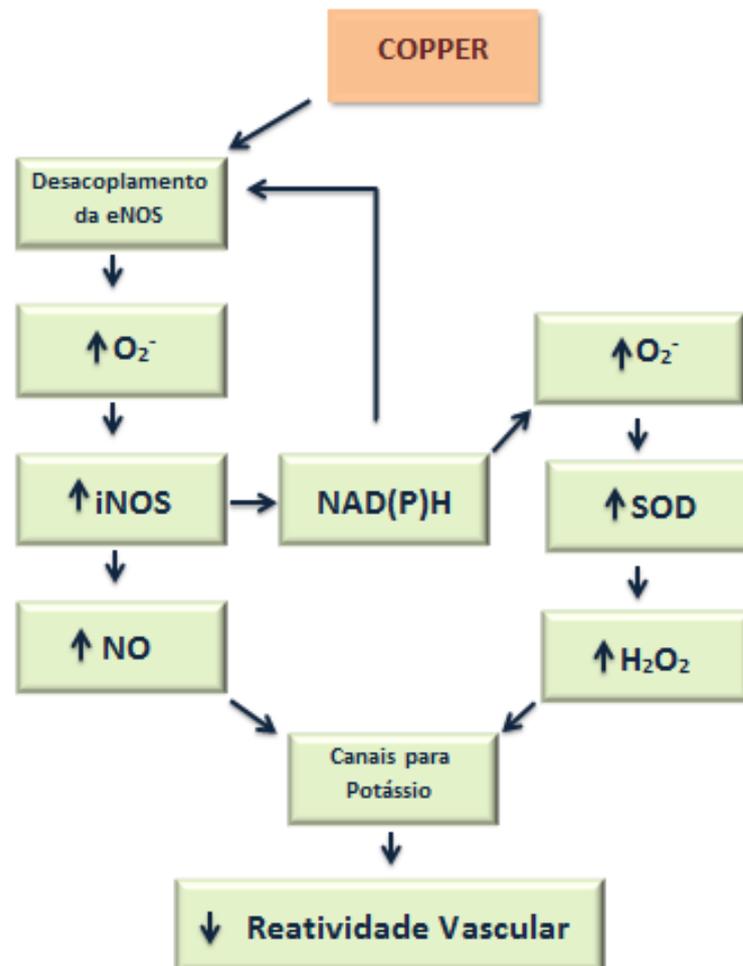
Como mencionado anteriormente, o aumento da atividade da SOD pode levar à produção de um fator vasodilatador, o peróxido de hidrogênio (FÉLÉTOU, 2009). Nós demonstramos através da incubação com a catalase, uma produção aumentada de peróxido de hidrogênio. Esta incubação com catalase corrobora nossos achados anteriores de diminuição da reatividade vascular encontrados nas incubações com apocinina e tiron, que sugerem um aumento na produção de peróxido de hidrogênio por meio do aumento da produção de ânions superóxidos derivados da NAD(P)H oxidase. Está bem descrito que em certas situações, o peróxido de hidrogênio pode atuar nos canais para potássio levando a uma resposta vasodilatadora (FÉLÉTOU, 2009; NUNES et al., 2015). Assim, para investigar o envolvimento de canais para potássio, realizamos a incubação com TEA. A incubação com esse fármaco aumentou a reatividade vascular induzida pela fenilefrina, sugerindo um maior envolvimento dos canais para potássio nos anéis expostos ao cobre.

Até o momento, mostramos uma redução na reatividade vascular à fenilefrina em anéis aórticos expostos ao cobre, acompanhados pela produção de NO a partir da iNOS e produção de peróxido de hidrogênio. Ambos os fatores podem atuar nos canais de potássio e produzir relaxamento vascular (FELÉTOU, 2009). A fim de esclarecer qual dos fatores estaria diminuindo a reatividade vascular nos anéis expostos ao cobre, realizamos a co-incubação com TEA-aminoguanidina e TEA-catalase. Ambas as incubações foram capazes de abolir a redução da reatividade vascular em anéis expostos ao cobre. Estas respostas sugerem que tanto o NO quanto o peróxido de hidrogênio estariam reduzindo a reatividade vascular através da atuação nos canais para potássio nos anéis de aorta expostos ao cobre.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais achados deste estudo sugerem que a sobrecarga aguda de cobre reduz a resposta contrátil à fenilefrina em anéis aórticos de ratos. O aumento do NO e ações subsequentes nos canais para potássio resultaram em vasodilatação. A sobrecarga de cobre desencadeou o desacoplamento da eNOS aumentando a produção de ânions superóxido. A sobrecarga de cobre levou à ativação da iNOS e ao aumento da atividade da SOD o que foi associado à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Consequentemente, NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram capazes de induzir respostas vasodilatadoras em anéis aórticos de ratos pela ativação de canais para potássio. Estes resultados demonstram que o cobre em altas concentrações é capaz de desencadear mecanismos que alteram a regulação do tônus vascular. Nosso estudo aponta para o aumento da concentração sanguínea de Cu como fator de risco para morbimortalidade cardiovascular e ressalta a importância da compreensão dos mecanismos pelos quais o cobre pode afetar as funções vasculares, sugerindo que a regulação das concentrações sanguíneas deste metal possa ser um alvo terapêutico potencial para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares.

## 7.1 SUMARIZAÇÃO DOS RESULTADOS



**Figura 21:** A exposição a altas concentrações de cobre promove o desacoplamento da eNOS, levando ao aumento da produção de superóxido e ativação da iNOS. A ativação da iNOS aumenta a produção de óxido nítrico e contribui para o aumento da produção de superóxido a partir da NAD(P)H oxidase. O aumento desses radicais livres induz um aumento da atividade da SOD, contribuindo para a formação do peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico atuam nos canais de potássio promovendo a redução da reatividade vascular.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHAMED, M. et al. Assessment of the lung toxicity of copper oxide nanoparticles: current status. **Nanomedicine (Lond)**. v.10, n. 15, p. 2365-77, 2015.
- AIRES, M. M (Coord.). **Fisiologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.
- AL-BAYATI, M.A. et al. Cardiovascular effects of copper deficiency on activity of superoxide dismutase in diabetic nephropathy. **N Am J Med Sci**. v .7, n. 2, p.41-6, 2015.
- ALDINI, G. et al. Molecular strategies to prevent, inhibit, and degrade advanced glycoxidation and advanced lipoxidation end products. **Free radical research**. v. 47, p. 3–137, 2013.
- ALI, S.; MANN, D.A. Signal transduction via the NF-kB pathway: a targeted treatment modality for infection, inflammation and repair. **Cell.Biochem.Funct**. v. 22, n. 67–79, 2004.
- ALLEN, R.G., TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic. Biol. Med**. v. 28, n. 463–499, 2000.
- AOKI, T. [Genetic disorders of copper transport--diagnosis and new treatment for the patients of Wilson's disease]. **No To Hattatsu**. v. 37, n. 2, p.99-109, 2005.
- Arnal, N. et al. Involvement of Copper Overload in Human Diseases, in: M.S. Giménez (Ed.). **Research Signpost/Transworld Research Network**. v.1, p. 1-28, 2010.
- ARNAL, N. et al. Involvement of Copper Overload in Human Diseases, in: M.S. Giménez (Ed.). **Research Signpost/Transworld Research Network**. v. 1, p. 1-28, 2011.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Copper. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2004.

BAEUERLE, P. I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B structures: at the interface of inflammation control. **Cell**. v. 95, p. 729-731, 1998.

BAGHERI, B. et al. Serum level of copper in patients with coronary artery disease. **Niger Med J**. v. 56, n.1, p. 39-42, 2015.

BAKHAUTDIN, B. et al. Protective role of macrophage-derived ceruloplasmin in inflammatory bowel disease. **Gut**. v. 62, n. 2, p. 209-219, 2012. doi:10.1136/gutjnl-2011-300694.

BARCELOUX, D.G. Zinc. **Clinical Toxicology**. v. 37, n. 279, 1999.

BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**. v. 8, p. 328-338, 2001.

BENTUR, Y.; KOREN, G.; MCGUIGAN, M. An unusual skin exposure to copper: Clinical and pharmacokinetic evaluation. **Clin Toxicol**. v. 26, p. 371-80, 1988

BENY, J.L., BRUNET, P.C. Electrophysiological and mechanical effects of substance P and acetylcholine. **J Physiol (London)**. v. 398, p. 277–289, 1988.

BESHGETOOR, D.; HAMBIDGE, M. Clinical conditions altering copper metabolism in humans. **Am J Clin Nutr**. v. 67, p. S1017–21, 1998.

BIANCHINI, A.; MUSCI, G.; CALABRESE, L. Inhibition of endothelial nitric-oxide synthase by ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* v. 274, p. 20265–20270, 1999. [PubMed]

BO, S. et al. Associations of dietary and serum copper with inflammation, oxidative stress, and metabolic variables in adults. **J Nutr**. v. 138, p. 305-10, 2008.

BOST, M. et al. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 35, p. 107–115, 2016.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral, Sumário Mineral. 2017. Disponível: <<http://www.anm.gov.br/dnpm/sumarios/cobre-sumario-mineral-2014/view>>. Acesso em 05 de abril de 2018.

- BREWER, G.J. Iron and Copper Toxicity in Diseases of Aging, Particularly Atherosclerosis and Alzheimer's Disease. **Exp Biol Med.** v. 232, p. 323-335, 2007.
- BUSSE, R.; MULSCH, A. Induction of nitric oxide synthase by cytokine in vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett.** v. 275, p. 87- 90, 1990.
- CAI, H.; HARRINSON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: The role of oxidative stress. **Circulation Research.** v. 87, p. 840-844, 2000.
- CAPPELLI-BIGAZZI, M. et al. Ceruloplasmin impairs endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Am. J. Physiol.* v. 273, p. H2843–H2849, 1997.
- CARROLL, M.C. et al. Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* v. 101, p. 5964–5969, 2004.
- CARVALHO, M.H.C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras Hipertens.** v. 8, n. 1, 2001.
- CAU, S.B.; CARNEIRO, F.S.; TOSTES, R.C. Differential modulation of nitric oxide synthases in aging: therapeutic opportunities. *Front Physiol.* v. 25, n. 3, p. 218, 2012. doi: 10.3389/fphys.2012.00218. eCollection 2012.
- CHAIGNON, V. et al. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. **Environ. Pollut.** v. 123, n. 2, p. 229–238, 2003.
- CHEN, C.A. et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function. **Nature.** 2010. doi: 10.1038/nature09599
- CHEVION, M. et al. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: Possible predictive criteria for tissue injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 90, n. 1, p. 1102–1106, 1993.
- CHIARUGI, A. et al. Effect of prolonged incubation with copper on endothelium-dependent relaxation in rat isolated aorta. **British Journal of Pharmacology.** v. 136, p. 1185-1193, 2002.

CHIARUGI, A. et al. Effect of prolonged incubation with copper on endothelium-dependent relaxation in rat isolated aorta. **British Journal of Pharmacology**. v. 136, n. 8, p. 1185-1193, 2012. doi:10.1038/sj.bjp.0704816.

COGOLLUDO, A. et al. Thromboxane A<sub>2</sub>-induced inhibition of voltage-gated K<sup>+</sup> channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase C zeta. **Circ Res**. v. 93, p. 656–663, 2003.

COWAN, C.L., COHEN, R.A. Two mechanisms mediate by bradykinin of pig coronary artery: NO dependent and independent responses. **Am J Physiol**. v. 261, p. H830–H835, 1991.

CRACKOWER, M.A. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. **Nature**. v. 417, p. 822-828, 2002.

DAVIDGE, S.T. Prostaglandin H synthase and vascular function. **Circulation Research**. v. 89, p. 650-660, 2001.

Davignon, P.; Ganz, P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. **Circulation**. v. 109, p. 27-32, 2004.

DEMURA, Y. et al. The activation of enos by copper ion (Cu<sup>2+</sup>) in human pulmonary arterial endothelial cells. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 25, n. 3, p. 314–320, 1998.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FÉLÉTOU, M. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? **British Journal of Pharmacology**. 2009. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00052.x

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium- Derived hyperpolarizing factor. Where are we now? **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**. v. 26, p. 1215-1225, 2006.

FELIZZOLA, L.R. et al. O papel do endotélio vascular na fisiologia circulatória. **Cir Vasc Angiol.** v. 12, n. 129-136, 1996.

FERNS, G.A.A.; LAMB, D.J.; TAYLOR, A. The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus. **Atherosclerosis.** v.133, p. 139–52, 1997.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira.** v. 43, p. 61-68, 1997.

FILETTI, F. M.; VASSALLO, D.V.; FIORESI, M.; SIMÕES, M.R. Reactive oxygen species impair the excitation-contraction coupling of papillary muscles after acute exposure to a high copper concentration. **Toxicol In Vitro.** v. 51, p. 106-113, 2018.

FORSTERMANN, U. Regulation of nitric oxide synthase expression and activity. In: Mayer B, ed. **Handbook of Experimental Pharmacology - Nitric Oxide.** Berlin: Springer. 2000.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal.** v. 33, p. 829-837, 2012.

FRANGOIANNIS, N.G.; ENTMAN, M.L. Chemokines in myocardial ischemia. **Trends in Cardiovascular Medicine.** v. 15, p. 163–169, 2005.

GAETKE, L.M. et al. Copper: Toxicological relevance and mechanisms. **Arch Toxicol.** v. 88, p. 1929-1938, 2014.

GAETKE, L.M.; CHOW-JOHNSON, H.S.; CHOW, C.K. Copper: Toxicological relevance and mechanisms Department. **Arch Toxicol.** v. 88, n. 11, p.1929-1938, 2014.

GAO, W. et al. Copper sulfide nanoparticles as a photothermal switch for TRPV1 signaling to attenuate atherosclerosis. **Nat Commun.** v. 15, n. 9, p. 231, 2018. doi: 10.1038/s41467-017-02657-z.

GHAYOUR-MOBARHAN, M. et al. Determinants of serum copper, zinc and selenium in healthy subjects. **Ann Clin Biochem.** v. 42, p. 364-75, 2005.

GINOCCHIO, R. et al. Effect of soil copper content and pH on copper uptake of selected vegetables grown under controlled conditions. **Environ. Toxicol. Chem.** . v. 21, n. 8, p. 1736–1744, 2002.

GOODMAN, J.R.; WARSHAW, J.B.; DALLMAN, P.R. Cardiac hypertrophy in rats with iron and copper deficiency: Quantitative contribution of mitochondrial enlargement. **Pediatric Research.** v.4, p. 244–256, 1970.

GRIENGLING, K.K. 2000. Angiotensin II stimulates NADH and NAD(P)H oxidase activity in vascular smooth muscle cells. **Circulation Research.** v. 86, p. 494-501, 2000.

GUMUS, E. et al. Effect of Copper on Vasospasticity in Rats. **Turkish Neurosurgery.** v. 24, n. 1, p. 25-29, 2001.

HARRIS, E.D. Copper as a cofactor and regulator of Cu, zinc superoxide dismutase. **J. Nutr.** v. 122, p. 636–640, 1992.

HARRIS, E.D. Copper homeostasis: the role of cellular transporters. **Nutr Rev.** v.59, p. 281-285, 2001.

HARVEY, L. J. et al., Use of mathematical modeling to study copper metabolism in humans. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 81, n. 4, p. 807–813, 2005.

HASUNUMA, K. et al. Effects of inhibitors of Biossay EDHF on vasoreactivity of perfused rat lungs. **Am J Physiol.** v. 260, p. L97–L104, 1991.

HE, W.; JAMES, K.Y. Ischemia-induced copper loss and suppression of angiogenesis in the pathogenesis of myocardial infarction. **Cardiovasc Toxicol.** v. 13, n. 1, p. 1-8, 2013.

HINKEL, R.; TRENKWALDER, T.; KUPATT, C. Gene therapy for ischemic heart disease. **Expert Opinion on Biological Therapy.** v. 11, p. 723–737, 2011.

IGNARRO, L.J. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signalling. **Pharmacol.Toxicol.** v. 67, p. 1-7,1990.

JIANG, Y. et al. Dietary copper supplementation reverses hypertrophic cardiomyopathy induced by chronic pressure overload in mice. **Jem Vol.** v. 19, n. 204, 2007.

JUNIOR, J.F.; PASCHOAL, V.C. Sintomas de deficiência de Cobre e fontes alimentares ControlSoft Nutrition. 2004. Disponível em: <http://www.medicinacomplementar.com.br/biblioteca4.php?/nu-0064.htm>. Acesso em 09 de abril de 2018.

KANG, K.T. Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. **Toxicol Res.** v. 30, n. 3, p.141-148, 2014.

KARAKURT C, et al. Strain and strain rate echocardiography in children with Wilson's disease. **Cardiovasc J Afr.** v. 13, n. 27, p. 1-8, 2016.

KLINC, M. Serum reference levels of selenium, zinc and copper in healthy pregnant women at a prenatal screening program in southeastern Mediterranean region of Turkey. **J. Trace Elem. Med.Biol.** v. 24, p. 152–156, 2010.

KODAMA, H.; FUJISAWA, C.; BHADHPRASIT, W. Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment. **Curr Drug Metab.** v. 13, n. 3, p. 237-50, 2012.

KOPP, S.J.; KLEVAY, L.M.; FELIKSIK, J.M. Physiological and metabolic characterization of a cardiomyopathy induced by chronic copper deficiency. **The American Journal of Physiology.** v. 245, p. H855–H866, 1983.

KOSTEVICH, V.A. et al. Interaction of macrophage migration inhibitory factor with ceruloplasmin: role of labile copper ions. **Cell.Biochem.Funct.** v. 28, n. 5, p. 817-26. doi: 10.1007/s10534-015-9868-2.

LEARY, S.C.; WINGE, D.R.; COBINE, P.A: Pulling the plug” on cellular copper: the role of mitochondria in copper export. **Biochim Biophys Acta.** v. 1793, n. 1, p:146-153, 2009.

LEONE, N, et al. Zinc, copper, and magnesium and risks for all-cause, cancer, and cardiovascular mortality. **Epidemiology**. v. 17, p. 308-14, 2006.

LEWIS, A.J. The role of copper in inflammatory disorders. **Agents Actions**. v. 15, p. 513–9, 1984.

LI, X.T. et al. Association between Plasma Metal Levels and Diabetes Risk: a Case-control Study in China. **Biomed Environ Sci**. v. 30, n. 7, p. 482-491, 2017. doi: 10.3967/bes2017.064.

LIN, J. A. et al. Glycative stress from advanced glycation end products (AGEs) and dicarbonyls: An emerging biological factor in cancer onset and progression. **Molecular Nutrition and Food Research**. v. 3, p. 1–15, 2016.

LUSIS, A.J. Atherosclerosis. **Nature**. v. 14, n. 407, p. 233-41, 2000.

MAAR, J. H. História da química - Primeira Parte - dos primórdios a Lavoisier. Florianópolis: Conceito, 2008.

MANEA, S.A. et al. Epigenetic regulation of vascular NADPH oxidase expression and reactive oxygen species production by histone deacetylase-dependent mechanisms in experimental diabetes. **Redox Biol**. v. 17, n. 16, p. 332-343, 2018. doi: 10.1016/j.redox.2018.03.011. [Epub ahead of print]

MANEA, S.A. et al. Simionescu, AP-1-dependent transcriptional regulation of NAD(P)H oxidase in human aortic smooth muscle cells. Role of p22 phox subunit. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 28, n. 5, p. 878-85, 2008. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.163592

MATHYS, Z.K.; WHITE, A.R. Copper and Alzheimer's Disease. **Adv Neurobiol**. v. 18, p. 199-216, 2017. doi: 10.1007/978-3-319-60189-2\_10.

MINOR, R.L. et al. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. **J. Clin. Invest**. v. 86 p. 2109-2116, 1990.

Młyniec, K. et al. Essential elements in depression and anxiety. **Part II Pharmacol Rep**. v. 67, n. 2, p. 187-194, 2015.

MOLLOY, S.A.; KAPLAN, J.H. Copper-dependent recycling of hCTR1, the human high affinity copper transporter. **J Biol Chem**. v. 284, n. 43, p. 29704-29713, 2009.

MONTY, J.F. et al. Copper exposure induces trafficking of the Menkes protein in intestinal epithelium of ATP7A transgenic mice. **J Nutr**. v. 135, n. 12, p. 2762–2766, 2005.

MORTIMER, M.; KASEMETS, K.; KAHRU, A. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticlesto ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. **Toxicology**. v. 269, p. 182–189, 2010.

MOTIFOLIO - Scientific illustration Toolkits for Presentations and Publications. Nitric oxide in smooth muscle relaxation. 2018. Disponível em: <http://www.motifolio.com/5111118.html>. Acesso em: 10 de abril de 2018.

NOWOTNY, K. et al. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. **Biomolecules**. v. 5, p.194–222, 2015.

NUNES, K.Z. et al. Chronic lead exposure decreases the vascular reactivity of rat aortas: the role of hydrogen peroxide. **PLoSOne**. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0120965

OLIVARES, M. et al. Age and copper intake do not affect copper absorption, measured with the use of <sup>65</sup>Cu as a tracer, in young infants. **Am. J. Clin. Nutr**. v. 76, n. 3, p. 641–645, 2001.

OSREDKAR, J.; SUSTAR, N. Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. **J Clinic Toxicol**. 2011.

PAL, A.; PRASAD, R. An overview of various mammalian models to study chronic copper intoxication associated Alzheimer's disease like pathology. **Biomaterials**. v. 28, n.1, p.1-9, 2015.

PARAVICINI, T.M.; TOUYZ, R.M. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. **Diabetes Care**. v. 31, n. 2, 2008.

PARK, W.S. et al. Endothelin-1 inhibits inward rectifier K<sup>+</sup> channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells through protein kinase C. **J Cardiovasc Pharmacol.** v. 46, p. 681–689, 2005.

PEREIRA, T.C.; CAMPOS, M.M.; BOGO, M.R. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. **J Appl Toxicol.** v. 36, n. 7, p. 876-85, 2016.

PINKAS, M. Advanced glycation end-products and their receptors: related pathologies, recent therapeutic strategies and a potential model for future neurodegeneration studies. **Chemical Research in Toxicology.** v. 3, p. 707–714, 2016.

PLANE, F. et al. Effect of copper on nitric oxide synthase and guanylyl cyclase activity in the rat isolated aorta. **British Journal of Pharmacology.** v. 121, p. 345-350, 1997.

ROCHA, G.H.O. et al. Trace metal levels in serum and urine of a population in southern Brazil. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.** v. 35, p. 61–65, 2016.

SCHLEICHER, E.; FRIESS, U. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. **Kidney International Supplement.** v. 72, p. 17-26, 2007.

SHAHZAD, K. et al. Evaluating toxicity of copper(II) oxide nanoparticles (CuO-NPs) through waterborne exposure to tilapia (*Oreochromis mossambicus*) by tissue accumulation, oxidative stress, histopathology, and genotoxicity. **Environ Sci Pollut Res Int.** 2018. doi: 10.1007/s11356-018-1813-9.

SHAO, Y. et al. Arsenic and/or copper caused inflammatory response via activation of inducible nitric oxide synthase pathway and triggered heat shock protein responses in testis tissues of chicken. **Environ Sci Pollut Res Int.** v. 25, n. 8, p. 7719-7729, 2018. doi: 10.1007/s11356-017-1042-7. Epub 2017 Dec 29.

SHIMIZU, N. Copper metabolism and genetic disorders. **Nihon Rinsho.** v. 74, n. 7, p. 1151-5, 2016.

SHIOJIMA, I.K. et al. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. **J. Clin. Invest.** v. 115, p. 2108–2118, 2005.

STREET, R.A.; KABERA, G.M.; CONNOLLY, C. Copper sulphate use in South African traditional medicine. **Environ Geochem Health.** 2016.

SUDHAHAR, V. et al. Akt2 (Protein Kinase B Beta) Stabilizes ATP7A, a Copper Transporter for Extracellular Superoxide Dismutase, in Vascular Smooth Muscle: Novel Mechanism to Limit Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v. 38, n. 3, p. 529-541, 2018. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309819. Epub 2018 Jan 4.

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K.K. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. **Hypertension.** v. 42, p. 1075-1081, 2003.

TASIĆ, N.M, et al. Copper and zinc concentrations in atherosclerotic plaque and serum in relation to lipid metabolism in patients with carotid atherosclerosis. **Vojnosanit Pregl.** v. 72, n. 9, p. 801-6, 2015.

TRUMBO, P. et al. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **J. Am. Diet. Assoc.** v. 101, p. 294–301, 2001.

TSUBOI, A. et al. Serum copper, zinc and risk factors for cardiovascular disease in community-living Japanese elderly women. **Asia Pac J Clin Nutr.** v. 23, n. 2, p. 239-245, 2014.

URAKAMI-HARASAWA, L. et al. Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. **J Clin Invest.** v. 100, p. 2793-2799, 1997.

URIU-ADAMS, J.Y. et al. Diabetes and dietary copper alter <sup>67</sup>Cu metabolism and oxidant defense in the rat. **J. Nutr. Biochem.** v. 16 p. 312–320, 2005.

URSO, E.; MAFFIA, M. Behind the Link between Copper and Angiogenesis: Established Mechanisms and an Overview on the Role of Vascular Copper Transport Systems. **J Vasc Res.** v. 52, n. 3, p. 172-96, 2015.

VASSILIEV, V.; HARRIS, Z.L.; ZATTA, P. Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. **Brain Res Brain Res Rev.** v. 49, p. 633–40, 2005. [PubMed: 16269323]

VIATOUR, P. et al. Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: implications in cancer and inflammation. **Trends Biochem. Sci.** v. 30, p. 43–52, 2005.

VIÑA, J. et al. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: Prevention of oxidative stress. **Molecular Aspects of Medicine.** v. 25, p. 117–123, 2004.

WEI, H. et al. Copper Chelation by Tetrathiomolybdate Inhibits Vascular Inflammation and Atherosclerotic Lesion Development in Apolipoprotein E-deficient Mice. **Atherosclerosis.** v. 223, n. 2, p. 306–313, 2012.

WERNER, E.R, et al. Tetrahydrobiopterin and nitric oxide: mechanistic and pharmacological aspects. **Exp Biol Med.** v. 228, p. 1291–1302, 2003.

WILLIS, M.S. et al. Zinc-induced copper deficiency: a report of three cases initially recognized on bone marrow examination. **Am J Clin Pathol.** v. 123, p. 125-131, 2015.

WINGE, D.R.; MEHRA, R.K. Host defenses against copper toxicity. **Int. Rev. Exp. Pathol.** v. 31, p. 47–83, 1990.

WOLFF, S.P. et al. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. **Free radical biology & medicine.** v. 10, p. 339–352, 1991.

WYNNE, B.M.; CHIAO, C-W.; WEBB, R.C. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. **Journal of the American Society of Hypertension : JASH.** v. 3, n. 2, p. 84-95, 2009.  
doi:10.1016/j.jash.2008.09.002.

YUNUS, E.U. et al. Determination of lead, copper and iron in cosmetics, water, soil and food using polyhydroxybutyrate-B-polydimethyl siloxane preconcentration and flame atomic absorption spectroscopy. **Anal Lett.** v. 48, p. 1163-1179, 2015.

YUYUN, M.F.; NG, L.L.; NG, G.A. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular

disease. Where are we with therapy? **Microvasc Res.** v. 27, n. 119, p. 7-12, 2018.  
doi: 10.1016/j.mvr.2018.03.012.

ZHANG, L. et al., Baseline blood levels of manganese, lead, cadmium, copper, and zinc in residents of Beijing suburb. **Environmental Research.** 2015. doi:  
10.1016/j.envres.2015.03.008

ZHANG, Y. et al. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurobiology of disease.** v. 7, p. 240–250, 2007.

ZHENG, L. et al. Role of copper in regression of cardiac hypertrophy. **Pharmacol Ther.** v. 148, p. 66-84, 2015.

ZIETZ, B.P.; DE VERGARA, J.D.; DUNKELBERG, H. Copper concentrations in tap water and possible effects on infant's health—results of a study in Lower Saxony, Germany. **Environ. Res.** v. 92, n. 2, p. 129–138, 2003.