

**Exposição por 30 dias ao cobre aumenta a
pressão arterial e altera a contratilidade
cardíaca: Envolvimento do óxido nítrico e do
estresse oxidativo**

Cindy Medici Toscano Rozetti

Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

Vitória, Maio de 2020.

Exposição por 30 dias ao cobre aumenta a pressão arterial e altera a contratilidade cardíaca: Envolvimento do óxido nítrico e do estresse oxidativo

Cindy Medici Toscano Rozetti

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito final para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Comissão examinadora representada por:

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo - Orientador, UFES

Coordenadora do PPGCF: Prof^a. Dr^a. Sônia Alves Gouvêa

Prof. Dr. Leonardo dos Santos (Membro Interno)

Prof. Dr. Maylla Ronacher Simões (Membro Interno)

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

Prof. Dra. Giulia Alessandra Wiggers Peçanha. (Membro externo)

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Maio de 2020.

Rozetti, Cindy Medici Toscano, 1990

Exposição por 30 dias ao cobre aumenta a pressão arterial e altera a contratilidade cardíaca: envolvimento do óxido nítrico e do estresse oxidativo. [Vitória] 2020

XXII, 138p., 29,7 cm (UFES, D. Sc, Ciências Fisiológicas, 2020)

Orientador: Dalton Valentim Vassallo, Co-Orientadora: Mirian Fiorese.

Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

1. Cobre. 2. Pressão arterial. 3. Contratilidade cardíaca. 4. Estresse oxidativo.

À minha amada família:

Wallace, Mara, Eduardo, Felipe, Isis e Dudu,
Agradeço pelo amor, incentivo e por sempre
acreditar em mim!

“Bem aventurado o homem que acha
sabedoria, e o homem que adquire
conhecimento”.

Provérbios 3:13

AGRADECIMENTOS

Sou grata a **Deus** pelo sustento diário, por guiar a minha vida, abrir portas e me permitir viver tantas experiências maravilhosas. Agradeço por ouvir as minhas orações e ser o meu refúgio verdadeiro em todos os momentos!

Ao meu Orientador, **Dalton Valentim Vassallo**. “*Chefe*”, obrigada por me acolher desde a iniciação científica e me permitir aprender com os seus até hoje. Especialmente, concluir essa etapa em minha vida não seria possível sem você, por isso sou eternamente grata! Agradeço pelos cafés e conversas compartilhadas; por ser fonte de inspiração em sua genialidade e tão bom coração; por sempre estar disponível; pelos ensinamentos, conselhos e incentivo. Me sinto privilegiada em ser sua aluna! Obrigada por tanto!

À minha Co-orientadora, **Mirian Fioresi**. “*Mirinha*”, agradeço por me apresentar o laboratório e me adotar como sua “filha científica” desde a iniciação científica. Já disse isso uma vez e vou repetir: Deus usou a sua vida para me abençoar! Obrigada por sempre estar presente em minha vida e poder contar com você não só como mentora, mas como amiga! Sou grata por sempre se preocupar, ser fonte de inspiração, acreditando sempre no meu potencial. Agradeço a Deus pela sua vida, por ser quem você é, uma referência para mim! Muito obrigada!

Aos professores do LEMC: **Ivanita**, **Alessandra** e **Leonardo**, agradeço pelos ensinamentos, paciência e momentos compartilhados em todos esses anos. Vocês contribuíram para a minha formação e os tenho como exemplo de pesquisadores e mestres.

Agradeço aos **professores** do PPGCF, por todo ensino transmitido formal ou informalmente.

Ao **Filipe** e **Camila** pela parceria e colaboração para o desenvolvimento desse projeto.

Karol, obrigada pela amizade, diversão e companheirismo. Poder contar com você fez toda a diferença.

Agradeço à **Maylla** pelo companheirismo e por ajudar e ensinar sempre quando precisei.

Aos **amigos do LEMC**, àqueles que ainda fazem parte e aos que já fizeram, agradeço pelos momentos de alegria e descontração, pelo aprendizado compartilhado e ajuda nos experimentos. Vocês fizeram do LEMC um lugar muito mais leve e amável!

Aos **funcionários** do programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas por desempenharem as suas funções de modo eficiente e prestativo e sempre ajudar a solucionar os problemas.

À **banca** examinadora, pela disposição em aceitar o convite para avaliar este trabalho.

Às **agências** de fomento que contribuíram e tornaram possível a execução dessa pesquisa, CAPES, CNPQ e FAPES.

Ao **Wallace**, meu marido e companheiro da vida. Amor, obrigada por entender as minhas ausências e ser tudo o que eu preciso em todos os momentos. A cada dia ver a sua dedicação e cuidado por mim me faz te amar ainda mais. Obrigada pelo amor, incentivo e ser o meu esteio nessa jornada. Caminhar ao seu lado torna a vida muito melhor e mais feliz!

À minha amada família, em especial à **Mara**. Mãe, sou grata pelo seu amor incondicional, apoio e incentivo. Por fazer além do possível para me ver realizada e feliz. Sei que muitas são as orações que faz a Deus em prol da minha vida. Agradeço por ser uma mãe tão dedicada, amorosa e presente. Te amo! Ao meu pai, **Eduardo**. As saudades são eternas, Pai. Dedico esta vitória também a você, pois tenho certeza de que estaria orgulhoso de sua caçulinha! Aos meus irmãos, **Eduardo** e **Felipe**, agradeço pelo carinho, por acreditar em mim e ser a diversão garantida. Vocês completam a minha vida e fazem parte também desta conquista! **Isis**, obrigada pela amizade, incentivo e torcer por mim sempre. Saber que sempre posso contar com você me torna mais feliz.

À vó **Odette**, vô **Itamar**, **tios** e **primos**. Agradeço por ter vocês em minha vida, pelo amor, orações e por torcerem e vibrarem com a minha felicidade.

À minha segunda família, **Ana**, **Wallace**, **Michelle**, **Fabiano** e **Beatriz**. Agradeço pelas orações e por me acolherem de forma tão amorosa sempre. Amo vocês!

Aos meus queridos **amigos**, por sempre ouvir, apoiar e compartilhar também as minhas alegrias. Muito obrigada!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 COBRE.....	19
1.1.1 Características gerais.....	19
1.1.2 Fontes de exposição.....	20
1.1.3 Recomendações de segurança para o cobre.....	21
1.1.4 Cinética do cobre no organismo.....	23
1.1.5 Cobre e o estresse oxidativo.....	26
1.1.6 Efeitos tóxicos do cobre no organismo.	27
1.1.7 Efeitos cardiovasculares da exposição ao cobre.....	29
1.2 PRESSÃO ARTERIAL.....	31
1.3 CONTRATILIDADE CARDÍACA E ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO- CONTRAÇÃO.....	32
1.4 PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA CONTRATILIDADE CARDÍACA.....	35
1.5 JUSTIFICATIVA.....	37
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 OBJETIVO GERAL.....	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	39
3.1.1 Animais.....	39

3.1.2 Modelo experimental.....	39
3.2 AVALIAÇÃO PONDERAL.....	40
3.3 MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	40
3.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA POR MEDIDA DIRETA.....	41
3.5 AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	42
3.5.1 Montagem e preparação.....	42
3.5.2 Força de contração isométrica e cinética contrátil.....	44
3.5.3 Avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático..	45
3.5.4 Resposta contrátil ao cálcio extracelular.....	46
3.5.5 Avaliação indireta do influxo de cálcio transsarcolemal.....	47
3.5.6 Resposta contrátil à estimulação β-adrenérgica.....	47
3.5.7 Contrações tetânicas.....	48
3.5.8 Papel do óxido nítrico na contratilidade miocárdica.....	49
3.6 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE...	50
3.7 DETECÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	51
3.7.1 Detecção “in situ” da formação de ânion superóxido.....	51
3.7.2 Detecção “in situ” da formação de radical hidroxila.....	51
3.8 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO CICLO DO CÁLCIO.....	52
3.8.1 Preparação e quantificação total das proteínas.....	52
3.8.2 Eletroforese e transferência das amostras.....	53
3.8.3 Incubação com anticorpos.....	53

3.8.4 Detecção das proteínas.....	54
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
4 RESULTADOS.....	56
4.1 AVALIAÇÃO PONDERAL.....	56
4.1.1 Avaliação ponderal dos animais.....	56
4.1.2 Avaliação ponderal dos órgãos.....	56
4.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE SANGUÍNEA E TECIDUAL.....	57
4.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL COM O ANIMAL ACORDADO	59
4.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA.....	60
4.5 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	61
4.5.1 Avaliação ponderal dos papilares.....	61
4.5.2 Avaliação da força de contração isométrica e cinética contrátil.....	61
4.5.3 Avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático..	63
4.5.4 Avaliação da resposta inotrópica frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular.....	64
4.5.5 Avaliação indireta do influxo de cálcio transsarcolemal.....	65
4.5.6 Avaliação da resposta contrátil frente à estimulação β- adrenérgica.....	66
4.5.7 Avaliação das contrações tetânicas.....	67
4.6 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA APÓS INCUBAÇÃO COM L-NAME.....	68

4.6.1 Avaliação ponderal, da força de contração isométrica e da cinética contrátil dos papilares antes e após incubação com L-NAME.....	68
4.6.2 Avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático após incubação com L-NAME.....	70
4.6.3 Avaliação do óxido nítrico na resposta inotrópica frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular após incubação com L-NAME.....	71
4.6.4 Avaliação do óxido nítrico na contração pós-reposo de 10 minutos.....	72
4.6.5 Avaliação do óxido nítrico na resposta β-adrenérgica.....	72
4.6.6 Avaliação do óxido nítrico nas contrações tetânicas.....	73
4.7 DETECÇÃO “IN SITU” DA FORMAÇÃO DE $O_2^{\bullet-}$ E OH^{\bullet}.....	74
4.8 BIOLOGIA MOLECULAR.....	76
5 DISCUSSÃO.....	78
6 RESUMO DOS RESULTADOS.....	84
7 CONCLUSÃO.....	86
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
ANEXO I.....	105

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Captação e metabolismo do cobre no hepatócito.....	24
Figura 2: Formação de radicais livres na mitocôndria.....	26
Figura 3: Transporte intracelular do cálcio em miócitos ventriculares.....	33
Figura 4: Ativação simpática no transporte intracelular do cálcio em miócitos ventriculares.....	34
Figura 5: Registro típico dos parâmetros hemodinâmicos.....	42
Figura 6: Desenho representativo da preparação in vitro dos músculos papilares isolados em banho de solução fisiológica.....	44
Figura 7: Registro típico de força isométrica e dos parâmetros temporais da contração.....	45
Figura 8: Registros típicos de potenciações pós-pausas.....	46
Figura 9: Registro típico da variação de força contrátil em resposta às crescentes concentrações de cálcio extracelular.....	46
Figura 10: Registro típico da resposta β -adrenérgica ao isoproterenol.....	48
Figura 11: Registro típico das contrações tetânicas de músculos papilares.....	49
Figura 12: Esquema representativo do protocolo de avaliação de contratilidade em músculo papilar in vitro.....	49
Figura 13: Avaliação da pressão arterial sistólica ao longo dos 30 dias de exposição ao metal.....	59
Figura 14: Peso úmido dos músculos papilares do ventrículo esquerdo.....	61
Figura 15: Força isométrica e tensão basal.....	62
Figura 16: Avaliação dos parâmetros temporais da contração, tempo de ativação e relaxamento, e das derivadas positivas e negativas, da força de	63

contração dos músculos papilares do ventrículo esquerdo, <i>in vitro</i>	
Figura 17: Avaliação das potenciações relativas após pausas de 15, 30 e 60 segundos em músculos papilares do ventrículo esquerdo, <i>in vitro</i>	64
Figura 18: Avaliação da força contrátil de músculos papilares de VE, <i>in vitro</i> , frente a diferentes concentrações de cálcio extracelular.....	65
Figura 19: Avaliação indireta do influxo de cálcio transarcolema avaliado pela “post rest contraction” de músculos papilares do ventrículo esquerdo, <i>in vitro</i>	65
Figura 20: Avaliação da resposta inotrópica de músculos papilares do ventrículo esquerdo, <i>in vitro</i>	66
Figura 21: Avaliação da força de músculos papilares do ventrículo esquerdo, <i>in vitro</i> , no pico (A) e no platô (B) das contrações tetânicas.....	67
Figura 22: Força de contração isométrica e tensão basal desenvolvida pelos músculos papilares do ventrículo esquerdo antes e após incubação com L-NAME.....	68
Figura 23: Avaliação, <i>in vitro</i> , de parâmetros temporais da contração, tempo de ativação e relaxamento, e derivadas positivas e negativas de força de músculos papilares do ventrículo esquerdo antes e após incubação com L-NAME.....	69
Figura 24: Avaliação das potenciações relativas após pausas (PPP) de 15, 30 e 60 segundos de músculos papilares do ventrículo esquerdo, <i>in vitro</i> , antes e após incubação com L-NAME.....	70
Figura 25: Avaliação, <i>in vitro</i> , da força de músculos papilares de VE de ratos dos grupos controle e tratado antes e após incubação com L-NAME frente a diferentes concentrações de cálcio extracelular.....	71
Figura 26: Avaliação indireta, <i>in vitro</i> , do influxo de cálcio transarcolema avaliado pela “post rest contraction” (PRC) de músculos papilares do ventrículo esquerdo antes e após a incubação com L-NAME.....	72
Figura 27: Avaliação da resposta inotrópica de músculos papilares do ventrículo	73

esquerdo, <i>in vitro</i> , antes e após a incubação com o L-NAME.....	
Figura 28: Avaliação, <i>in vitro</i> , da força de músculos papilares do ventrículo esquerdo antes e após a incubação com o L-NAME, no pico e no platô das contrações tetânicas.....	74
Figura 29: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio <i>in situ</i> após a exposição ao cobre nos músculos papilares do ventrículo esquerdo.....	75
Figura 30: Avaliação da expressão protéica ventricular do trocador sódio/cálcio.	76
Figura 31: Avaliação da expressão protéica ventricular da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, SERCA 2a, da subunidade α -1 da NKA, da fosfolambam e a razão fosfo-Ser16-PLB/PLB.....	77
Figura 32: Esquema representativo dos principais mecanismos sugeridos.....	85

TABELA

Tabela 1: Parâmetros ponderais dos ratos tratados e não-tratados com cobre..	56
Tabela 2: Parâmetros ponderais dos órgãos dos animais controle e tratados....	57
Tabela 3: Dosagem sanguínea de cobre.....	58
Tabela 4: Dosagem tecidual de cobre.....	58
Tabela 5: Parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares dos animais.....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC: Adenilato ciclase

ADP: Adenosina difosfato

AEC: Acoplamento excitação-contração

AMPC: 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico

ANOVA: análise de variância

ATOX1: Proteína antioxidante chaperona 1

ATP: Trifosfato de adenosina

ATP7A/B: ATPase transportadora de cobre

CCS: Cobre chaperona

COX17: Citocromo-C-oxidase

Ct: Controle

Cu: Animais tratados com cobre

Cu²⁺: Íon cúprico

Cu⁺: Íon cuproso

Cu⁰: Cu na forma reduzida

CuCl₂: Cloreto de cobre

DMT1: Transportador de metais divalentes 1

CTR1/2: Importador celular de cobre

DHE: Dihidroetídio

EPM: Erro padrão da média

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HPF: Hidroxifenil fluoresceína

IDR: Ingestão Diária Recomendada

i.v.: Intravenoso

I.P.: Intraperitoneal

L-NAME: NG-nitro-L-arginina metil éster

NCX: Trocador Na⁺/Ca²⁺

NKA: Na⁺,K⁺-ATPase

NO: óxido nítrico

NOS: Oxido nítrico sintase

O₂^{•-}: ânion superóxido

OH[•]: Radical hidroxila

PA: Pressão arterial

PAD: Pressão arterial diastólica

PAS: Pressão arterial sistólica

PDfVE: Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo

PKA: Proteína quinase dependente de AMPc

PKG: Proteína quinase C

PLB: Fosfolambam

PSVE: Pressão sistólica do ventrículo esquerdo

PVC: Cloreto de polivinila

RL: Radicais livres

RS: Retículo sarcoplasmático

SERCA: Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático

SLC25A3: Proteína transportadora de fosfato mitocondrial

SOD: superóxido dismutase

TnC: Troponina C

RESUMO

O cobre contribui como um fator essencial para a homeostase do organismo. No entanto, a exposição ao cobre pode comprometer as funções orgânicas, as quais incluem o sistema cardiovascular. Nós investigamos os efeitos da exposição por 30 dias ao cobre sobre a pressão arterial e a contratilidade cardíaca e o envolvimento do óxido nítrico e das espécies reativas de oxigênio. Ratos Wistar (12 semanas de idade, $275 \pm 5,8$ g) foram randomizados em grupo tratado (Cu) expostos 30 dias ao cobre ($2000 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$ CuCl_2 , I.P.) e grupo controle (Ct) que recebeu salina (0,9%, I.P.). O grupo Cu apresentou concentração de cobre sanguínea de $1,26 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ e Ct $0,024 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mL}$. Os sítios de maior acúmulo do metal foram fígado, rins e tibia em relação aos outros órgãos analisados no presente estudo. A exposição ao cobre aumentou a PA sistólica (Cu: 141 ± 3 mmHg; Ct: $132,8 \pm 3$ mmHg) (manguito de cauda) e os parâmetros hemodinâmicos arteriais e intraventriculares. O cobre aumentou o desenvolvimento da força dos músculos papilares e o L-NAME não alterou essa resposta. O retículo sarcoplasmático parece recaptar menos cálcio do citoplasma no cardiomiócito. A resposta contrátil ao Ca^{2+} foi aumentada pelo cobre e o L-NAME potencializou este aumento. O cobre aumentou as contrações dependentes do influxo transarcolema de Ca^{2+} , mas o L-NAME reduziu o efeito em ambos os grupos. A resposta contrátil ao isoproterenol foi menor nos grupos tratados e o L-NAME não alterou este resultado. O desenvolvimento de força dos músculos papilares no pico e platô das contrações tetânicas aumentou após a exposição de cobre, sem que o L-NAME alterasse esse efeito. A detecção *in situ* mostrou um aumento da produção local de radical hidroxila (OH^\bullet). Em conclusão, a exposição por 30 dias ao cobre aumentou a PA e o desenvolvimento de força dos músculos papilares cardíacos, aumentou o influxo de Ca^{2+} e retardou a sua recaptação pelo RS, nos quais há o envolvimento do OH^\bullet e do NO. Deste modo, a exposição ao cobre pode ser prejudicial e causar danos cardiovasculares.

Palavras-chave: cobre, pressão arterial, contratilidade cardíaca, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Copper contributes as an essential element for the body homeostasis. However, copper excess can compromise organic functions, including the cardiovascular system. We investigated the effects of copper exposure for 30 days on blood pressure (BP) and cardiac contractility and the involvement of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). Wistar rats (12 weeks old, 280 g) were randomized to treated group (Cu) exposed to copper for 30 days (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CuCl_2) and control group (Ct) receiving intraperitoneal saline (0,9%). The Cu group presented increased blood copper concentration $\sim 1,26$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ and Ct $\sim 0,024$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. Copper exposure increased systolic BP (Cu: 141 ± 3 mmHg; Ct: 133 ± 3 mmHg) (tail cuff) and arterial and intraventricular hemodynamic pressures. The sites with the highest accumulation of the metal were liver, kidneys and tibia in relation to the other organs analyzed in the present study. Copper increased the development of papillary muscle force and L-NAME did not alter this response. The sarcoplasmic reticulum appears to capture less calcium from the cytoplasm in the cardiomyocyte. The contractile response to Ca^{2+} was increased by copper and L-NAME potentiated this increase. Copper increased contractions dependent on the Ca^{2+} transsarcolemal influx, but L-NAME reduced the effect in both groups. The contractile response to isoproterenol was lower in the treated groups and L-NAME did not change this result. The force development of the papillary muscles at the peak and plateau of tetanus contractions increased after copper exposure, but without changes by L-NAME. In conclusion, 30 days of copper exposure increased the BP and the development of force of the cardiac papillary muscles, increased the influx of Ca^{2+} and slowed its reuptake by the RS, in which OH^\bullet and NO are involved. Thus, exposure to copper can be harmful and cause cardiovascular damage.

Keywords: copper, blood pressure, cardiac contractility, oxidative stress.

1 INTRODUÇÃO

1.1 COBRE

1.1.1 Características gerais

É um metal de transição, segundo definição da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), de coloração avermelhada, classificado na tabela periódica como um metal nobre, juntamente com o ouro e a prata, e pode ser encontrado na natureza na forma elementar. O cobre apresenta também estados de oxidação distintos, sendo o íon cúprico (Cu^{2+}) o seu estado de oxidação mais importante. Cu^{2+} é o estado de oxidação do cobre geralmente encontrado na água (COTTON; WILKINSON, 1980). O íon cuproso (Cu^+) em solução aquosa pode rapidamente formar Cu^{2+} e Cu^0 (Cu na forma reduzida) por oxi-redução (LINDER *et al.*, 1996, 1998).

Há séculos, o cobre tem sido um dos metais que desempenha sua importância na história da humanidade, datando seus primeiros usos desde 8.000 anos A.C. O domínio do metal para os antigos povos representava riqueza e poder, marcando a época da “Idade do Bronze” e, desde então, continuou a ter relevância para o homem devido às suas características que permitem diversidade para aplicação na indústria (RIBEIRO, 2001; MAAR, 2008).

Ao longo da história do Brasil, conforme o território foi ocupado e o conhecimento geológico adquirido, novas descobertas de depósitos minerais metálicos foram feitas. Tais descobertas tiveram impacto relevante na economia nacional e foram fundamentais para fomentar o processo de industrialização brasileiro (ANM, 2018).

O cobre encontra-se entre os metais mais antigos e mais utilizados devido às suas propriedades químicas e físicas. Dentre estas, destacam-se a alta condutividade térmica e elétrica, a maleabilidade, a baixa corrosão, capacidade de liga e aparência agradável (ATSDR, 2004). Por apresentar estas características, o cobre é extensivamente extraído e processado no mundo e usado principalmente como metal ou liga na fabricação de fios, chapas, tubos e outros produtos metálicos. De acordo com a Agência Nacional de Mineração (2013), a China (31,0 %), o Chile (13,1%), o Japão (7,0%) e os EUA (5,0%) estão entre os principais produtores do metal no mundo.

No Brasil, a produção de cobre refinado primário e secundário registrou em 2013 uma quantidade de 261.950 toneladas, correspondendo a 1,2% do total mundial de refinado (BRASIL, 2017). Vale ressaltar que as principais minas de produção de minério de cobre no Brasil ocorrem nos Estados do Pará, Goiás e Bahia (ANM, 2018). Em 2017, as substâncias metálicas corresponderam cerca de 80% do valor total da produção mineral comercializada brasileira. Dentre essas substâncias, onze destacam-se por corresponderem a 99,6% do valor da produção comercializada da classe: alumínio, cobre, cromo, estanho, ferro, manganês, nióbio, níquel, ouro, vanádio e zinco (ANM, 2018).

1.1.2 Fontes de exposição

O cobre está amplamente distribuído em rochas, no solo, na água, em sedimentos e, em menores quantidades, no ar. A abundância relativa de cobre na crosta terrestre é de aproximadamente 68 ppm e estima-se que 50% de todos os depósitos do metal estejam na forma de calcopirita (CuFeS_2), um mineral sulfetado com 35% de cobre associado ao ferro (GREENWOOD; EARNSHAW, 1997). Assim, a emissão de cobre pode ocorrer por meio de fontes naturais, por meio da poeira transportada ao vento e pelas emissões vulcânicas. Mas também, grande parte do cobre depositado no ambiente é proveniente de fontes antropogênicas, tais como a mineração, produção industrial e agrícola (BARCELOUX, 1999; WINGE; MEHRA, 1990; ARNAL *et al.*, 2014).

Diante de sua ampla distribuição e fácil obtenção, é vastamente empregado na indústria para a fabricação de equipamentos eletrônicos, na construção civil e também na indústria automobilística, naval, aeronáutica e ferroviária para a composição dos mais diversos equipamentos. Também é utilizado na cunhagem de moedas, fabricação de armas e munições, na indústria alimentícia, farmacêutica e química, em equipamentos e produtos agrícolas, alimentícios, pesticida e fungicida, tintas e pigmentos, entre outros (ARNAL *et al.*, 2014; BARCELOUX, 1999; BRASIL, 2016; RIBEIRO, 2001).

Além disso, o cobre é amplamente empregado na indústria de confecção de destiladores para produção de cachaça em alambiques (BOZZA, 2000; RECHE *et al.*, 2007). Há ainda outras aplicações do cobre metálico de alta pureza em menor

escala, como, por exemplo, os dispositivos intrauterinos (conhecidos como DIU) que, em geral, são constituídos de polietileno recoberto com cobre nas hastes (PATAI *et al.*, 2003).

Os compostos de cobre são aproveitados como conservantes de madeira, couro e tecidos (ATSDR, 2004). E, além disso, também são comumente usados na agricultura, como pesticidas (bactericidas e fungicidas) e no tratamento de água, o que pode levar à contaminação do solo, água e alimentos (CHAIGNON *et al.*, 2003; GINOCCHIO *et al.*, 2002; ATSDR, 2004).

O organismo não sintetiza o cobre, sendo necessário recebê-lo através da alimentação pelo consumo de lentilhas, feijão, grão-de-bico, legumes, carnes, frutos do mar, oleaginosas, chocolate amargo, frutos secos e bebidas, inclusive a água. Deste modo, a via oral é a principal forma de obtenção do cobre no organismo pelos seres humanos. (RIBEIRO, 2001; JUNIOR; PASCHOAL, 2004). O cobre é um elemento natural que está presente na água potável, no entanto, apresenta a sua concentração variável. Isso ocorre, uma vez que, a concentração do cobre na água pode aumentar conforme houver corrosão dos sistemas de encanamentos domésticos e pela composição das águas subterrâneas (ZIETZ *et al.*, 2001). Deste modo, a água potável contribui com cerca de 6 a 13% da ingestão diária média do metal (ATSDR, 2004).

A via respiratória constitui uma das mais importantes fontes de exposição ao metal, pois pode levar à intoxicação severa ao cobre. Portanto, há uma grande preocupação na suspensão das partículas deste metal que promovam a toxicidade em tecido pulmonar (AHAMED *et al.*, 2015).

Vale ressaltar que, o cobre apresenta-se naturalmente em todas as plantas e animais e constitui um elemento essencial para todos os organismos vivos conhecidos (YUNUS *et al.*, 2015). Em especial, nos seres humanos, desempenha diversas funções fisiológicas e bioquímicas no organismo humano, portanto, é indispensável para a homeostase do organismo. (MORO *et al.*, 2007).

1.1.3 Recomendações de segurança para o cobre

O cobre é conhecido por ser essencial ao funcionamento do organismo, todavia, ainda não foi estabelecido um valor de referência de normalidade para a

ingestão de cobre e nem há um índice biológico máximo permitido. Vale considerar que as recomendações consideradas seguras para a ingestão diária de cobre ainda estão sendo estudadas e definidas, uma vez que pode variar conforme a população, indivíduo, costumes alimentares e com os fatores ambientais (GAETKE; CHOW-JOHNSON; CHOW, 2014). Nos últimos anos, devido à popularidade da autoadministração de microminerais e suplementos vitamínicos, há certa preocupação com os limites da homeostase do cobre no organismo (ALVES; LIMA, 2009; ARAYA et. al, 2005).

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) de cobre para crianças de 1 a 3 anos, 4 a 8 anos, 9 a 13 anos, 14 a 19 anos e adultos é de 340 µg, 440 µg, 700 µg, 890 µg e 0,9 mg, respectivamente (ATSDR, 2004). Ainda, de acordo com este mesmo Conselho, o nível ótimo para ingestão diária de cobre é de até 10 mg em adultos. A recomendação para a IDR em adultos está em conformidade com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil (ANVISA, 2005).

European Commission and European Union Members Estates (2009) aprova em 0,4 mg/L o valor limite para efeitos da exposição aguda ao cobre em água potável, considerando a população geralmente exposta à 0,7 mg/L. Além disso, estabelece em adultos a IDR mínima de 1 mg e preconiza um limite máximo de 11 mg, considerando que a ingestão da população varia entre 0,6 e 2 mg.

Recentes estudos populacionais estimaram a concentração sanguínea de cobre em indivíduos saudáveis em 1 µg/mL (ZHANG *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2016). Outro grupo de pesquisadores (ARNAL; DE ALANIZ; MARRA, 2010) encontrou a concentração de cobre no plasma humano entre 0,3-2,1 µg/mL em indivíduos saudáveis, cuja ingestão diária de cobre variava entre 1,4-2,0 mg.

Acerca dos contaminantes ambientais, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (2013) estabeleceu as metas de nível máximo para os contaminantes que contenham cobre em 1,3 mg/L ou 1,3 ppm (GAETKE; CHOW-JOHNSON; CHOW, 2014). Na Europa, os níveis de segurança para o cobre na água doce e no mar são 7,8 e 2,6 µg/L, respectivamente e, no solo, o nível considerado seguro é 79 mg/kg de peso seco, de acordo com aprovação da European Commission and European Union Members Estates (2009).

No Brasil, a CONAMA 357/05, alterada pela Resolução 430/11, dispõe sobre as diretrizes ambientais e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes (águas residuais), sendo o valor máximo permitido de 1 mg/L para o cobre dissolvido. Esses valores são baseados em possíveis riscos à saúde e exposição ao longo da vida, com uma margem de segurança adequada para evitar possíveis problemas de saúde.

Portanto, estabelecer recomendações seguras para o consumo de cobre é uma necessidade imprescindível tendo em vista as consequências para a saúde decorrentes da deficiência ou excesso (ATSDR, 2004).

1.1.4 Cinética do cobre no organismo

Desde 1928, Hart et. al descreveram o papel essencial do cobre nos mamíferos, sendo importante no processo de eritropoiese. Desde então, a funcionalidade do cobre vem sendo estudada e conhecido os seus efeitos no organismo humano por desempenhar funções biológicas fundamentais à vida. A habilidade do cobre em participar da ciclagem redox permite um importante papel nas reações de transferência de elétrons, como um intermediário dessa transferência (LINDER, 1996; ESKICI; AXELSEN, 2012). Deste modo, integra uma série de importantes enzimas no organismo humano, tais como a citocromo-C-oxidase, a tirosinase, lisil-oxidase, a superóxido dismutase e a β -hidroxilase, às quais são fundamentais à sobrevivência das células (LINDER, 1996; ESKICI; AXELSEN, 2012; OSREDKAR; SUSTAR, 2011; AMANCIO, 2011).

O cobre é classificado como um metal essencial muito abundante no organismo humano, atrás do ferro e zinco (GREENWOOD; EARNSHAW, 1997). A absorção de cobre na dieta ocorre principalmente na forma do íon cúprico (Cu^{2+}), e apenas uma parte é reduzida a íon cuproso (Cu^+) pelas enzimas redutases, somado ao fato de que na presença de aceptores de elétrons o Cu^+ é rapidamente oxidado a Cu^{2+} (SIOTTO; SQUITTI, 2018; GALHARDI *et al.*, 2004).

A absorção do cobre ocorre principalmente no intestino delgado pelo transportador de metais divalentes 1 (DMT1), embora uma menor parte também é absorvido no estômago (SCHÜMANN *et al.*, 2002). Existem fatores, tais como os fisiológicos, dietéticos e patológicos, os quais são capazes de modificar a absorção

de cobre (WAPNIR, 1998). Fato é que uma produção adequada de ácido clorídrico facilita a digestão no estômago e a disponibilidade de cobre no intestino delgado. Em contrapartida, o pH alcalino no intestino promove a formação de hidróxido de cobre e de sais com uma baixa constante de dissociação, reduzindo assim a quantidade de metal disponível para a absorção. Somado a estes fatores, a absorção dos íons via intestinal também é influenciada pela competição na presença de outros íons, como o zinco, ferro e cádmio (WAPNIR, 1998; SCHÜMANN *et al.*, 2002).

O cobre absorvido move-se para circulação portal, ligados principalmente à albumina e transcuprina (LINDER; HAZEGH-AZAM, 1996). Deste modo, parte do cobre permanece ligado à albumina (25%), enquanto o restante é absorvido pelos hepatócitos (HARVEY *et al.*, 2005) através dos importadores de membrana DMT1 e CTr1 (POLISHCHUK, 2019). O cobre é então ligado à ceruloplasmina e liberado na circulação sanguínea, enquanto o excedente é excretado para o sistema gastrointestinal, principalmente pela bile (HARVEY *et al.*, 2005).

Outro importador, CTR2, já tem sido descrito por auxiliar na regulação do influxo de cobre pela indução da clivagem do ectodomínio de CTR1 e na mobilização do cobre às organelas lisossomais no citosol do hepatócito (POLISHCHUK, 2019).

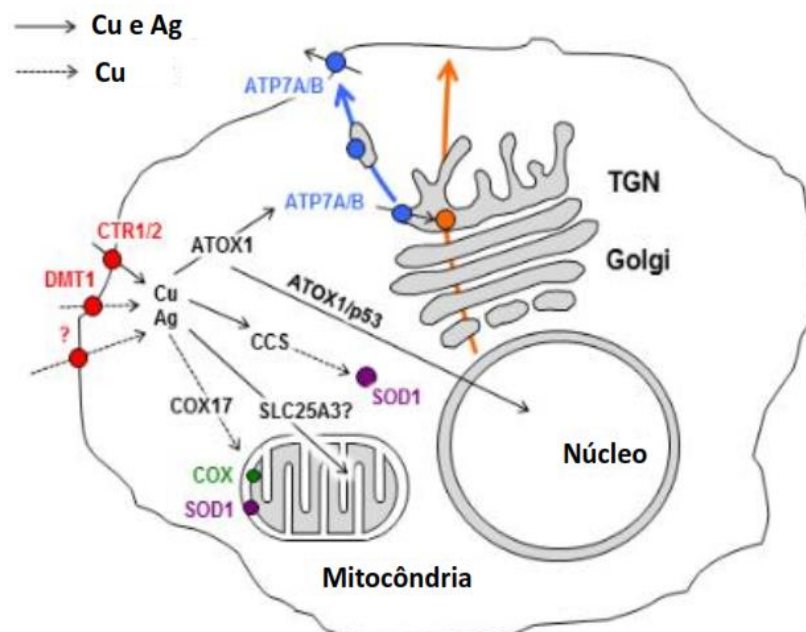


Figura 1: Esquema de captação e metabolismo do cobre no hepatócito. Após ser importado para dentro da célula, na membrana plasmática através de CTR1 ou DMT1, o cobre é transferido até a

proteína antioxidante chaperona 1 (ATOX1), cobre chaperona (CCS) e citocromo-C-oxidase (COX17) que o transportam para a ATPase transportadora de cobre (ATP7A/B) ao complexo de Golgi e fornece Cu à superóxido dismutase Cu/Zn citosólica (SOD1). COX17 fornece Cu à mitocôndria, onde é necessário para a citocromo-C-oxidase. A proteína transportadora de fosfato mitocondrial (SLC25A3) na matriz. No Complexo de Golgi, o ATP7A/B carrega Cu em cuproenzimas recém-sintetizadas (círculo laranja), que o transportam isoladamente pela via biossintética (seta laranja). Um significativo aumento de Cu intracelular induz a exportação da ATP7A/B (seta azul) em direção aos compartimentos pós-Golgi (TGN) e membrana plasmática, onde impulsiona a excreção do excesso de Cu da célula. Adaptado de POLISHCHUK (2019).

Como mostra a figura 1, após ser importado para o citosol, o cobre é transferido a uma enzima ATPase transportadora de cobre, importante reguladora da excreção celular de cobre, uma vez que promove o deslocamento do metal e impulsiona a saída de cobre pela membrana, quando há um significativo aumento intracelular (LA FONTAINE; MERCER, 2007).

O cobre é distribuído aos tecidos, principalmente, pela ceruloplasmina (90-95%), seguido pela albumina (5-10%), transcuprina e outros aminoácidos (BARCELOUX, 1999; BLUNDELL; CURTIN; FITZGERALD, 2003; LINZ; LUTSENKO, 2007). A ceruloplasmina é uma oxidase produzida no fígado, que contém mais de 90% do cobre sérico total encontrado nos vertebrados. A sua estrutura cristalóide confirma a presença de seis íons de cobre fortemente ligados. Esta enzima está envolvida nas reações de fase aguda da inflamação e na remoção de radicais livres protegendo as células contra o dano celular oxidativo (HARRIS; GITLIN, 1996).

O corpo humano possui um sofisticado mecanismo que disponibiliza o cobre quando necessário e, ao mesmo tempo, o elimina quando em excesso. Essa regulação, conhecida como homeostase de cobre, depende de uma rede de proteínas, como a albumina e ceruloplasmina, e outras moléculas biológicas que se encarregam da absorção, transporte, distribuição, armazenamento e excreção de cobre (SIOTTO; SQUITTI, 2018; GALHARDI *et al.*, 2004). No total, a meia-vida do cobre em um indivíduo saudável é de aproximadamente 26 dias (BENTUR *et al.*, 1988).

As alterações no metabolismo do cobre são características de algumas doenças genéticas como a Doença de Menkes que é caracterizada pela deficiência de cobre e tem como principal característica a baixa atividade da enzima

dependente de cobre (ATPA7); e a Doença de Wilson, em que ocorre a toxicidade do cobre e normalmente afeta os sistemas hepático e nervoso severamente (KODAMA *et al.*, 2012).

1.1.5 Cobre e estresse oxidativo

Apesar do cobre ser essencial para o funcionamento do organismo, níveis elevados podem provocar toxicidade. Muitos dos efeitos tóxicos do cobre estão relacionados ao seu papel na geração de radicais livres, tais como o aumento da peroxidação lipídica das membranas celulares e dano no DNA (BREMNER, 1998). Desta forma, o cobre atua como um íon formador de espécies reativas de oxigênio (ERO) (SAMUNI; MODERCHAI; CZAPSKI, 1981).

O estresse oxidativo ocorre quando a ação dos radicais livres produzidos supera a ação antioxidante do organismo pelas enzimas, como a glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e catalase, e vitaminas A, C e E (HALLIWELL *et al.*, 1987, 1995). Portanto, o processo oxidativo é fisiológico e necessário que ocorra em equilíbrio em todos os tecidos. Deste modo, como consequência do metabolismo aeróbio, ocorre a formação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A formação das EROs na toxicidade do cobre tem sido apontada como o mecanismo associado às alterações estruturais e funcionais em biomoléculas essenciais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; LIPPARD, 1999). Na presença de $O_2^{\bullet-}$ ou agentes redutores, o Cu^{2+} pode ser reduzido para Cu^+ , e catalisar a formação de OH^{\bullet} a partir do H_2O_2 , pela reação de Haber-Weiss, como mostra a figura 2 (BREMNER, 1998; KADIISKA *et. al.*, 1993).

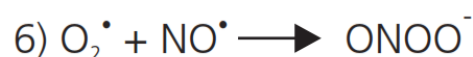
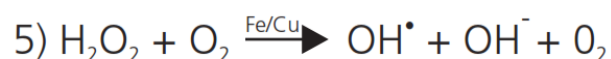
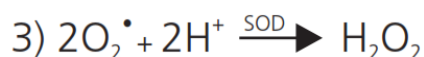
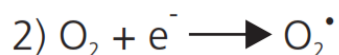


Figura 2: Formação de radicais livres na mitocôndria. Esquema indicando as reações de Fenton (4) e Haber-Weiss (5). BARBOSA (2010).

Dentre as EROs, o OH^\bullet é o radical de maior potencial reativo e com extrema instabilidade e capacidade de produzir de danos oxidativos, contra o qual não há sistema enzimático de defesa. Este radical participa no início do processo de peroxidação lipídica (CHOW, 1991; LETELIER *et al.*, 2010; POWELL, 2000; BURKITT, 2001), indução de quebras na cadeia de DNA e oxidação de bases nitrogenadas, possibilitando a ocorrência de mutações (KAWANISHI *et al.*, 1989; HAYASHI *et al.*, 2000; BUETTNER, 1993; LIANG; DEDON, 2001).

O cobre também participa na defesa anti-oxidante por intermédio da Superóxido Dismutase 1. Contudo, esta e outras defesas não conferem proteção completa contra as EROs produzidas pelo organismo (LEITE; SARNI, 2003).

Considerando o cobre um íon catalisador na formação de EROs, estudos têm associado a exposição ao cobre à redução da atividade do óxido nítrico (NO), causada pela diminuição da síntese ou por sua degradação. Assim, o cobre pode ser um dos fatores desencadeadores das disfunções cardiovasculares (PEPINE, 2009).

1.1.6 Efeitos tóxicos do cobre no organismo

Os efeitos tóxicos da exposição ao cobre geralmente são baseados em manifestações clínicas, as quais são pouco frequentes. Além disso, estes efeitos são manifestados após severas complicações, pois ainda não são conhecidos biomarcadores sensíveis e não invasivos capazes de prever os danos ao organismo de forma precoce, causado pelo excesso de cobre no organismo (UAUY *et. al.*, 2008).

Diante da facilidade do cobre em formar Cu^{2+} e em ser reduzido a Cu^+ , somado à habilidade de formar ERO e por reagir com as cadeias de aminoácido e lipídios, fez o organismo desenvolver mecanismos que pudessem regular esses efeitos. Dentre as enzimas que atuam em sua regulação incluem a superóxido dismutase dependente de Zn, a lisil oxidase e citocromo c oxidase mitocondrial. Quando não há uma regulação adequada dos mecanismos de utilização do cobre, é

possível observar consequências fisiopatológicas no sistema cardiovascular (FUKAI; USHIO-FUKAI; KAPLAN, 2018).

Chattopadhyay, Sarkar e Biswas (2002) demonstraram em um modelo de tratamento intraperitoneal por 26 dias à mesma dose usada no presente estudo, 2000 µg/kg de cloreto de cobre, resultou em aumento do peso, atividade da adrenal e aumento no nível sérico de corticosterona. Por outro lado, este mesmo estudo mostrou que o tratamento com 1000 µg/kg de cobre pelo mesmo período não alterou o peso da glândula adrenal em ratos, além de diminuir a atividade da hidroxisteróide desidrogenase 3.

A homeostase do cobre é regulada por um sistema mediado pelas enzimas ATP-ases ativadas por íons. O cobre em sua forma livre pode causar efeitos prejudiciais à célula e, quando em condições fisiológicas, a sua fração livre é mínima. Deste modo, as metalochaperonas intracelulares se ligam ao metal, levando-no até o local alvo de sua ação, evitando o dano celular. Por outro lado, se houver aumento de cobre livre, maior será o prejuízo à célula (FUKAI; USHIO-FUKAI; KAPLAN, 2018).

Yang et. al (2010) mostraram que altas doses de cobre em ratos induzem aumentos de marcadores hepáticos, tais quais a alanina aminotransferase e a aspartato aminotransferase, além de triglicerídeos, bilirrubina total, e provocando necrose nos hepatócitos. Este mesmo estudo mostrou que os genes relacionados à atividade da oxireductase, mostraram padrões alterados de expressão gênica, os quais foram induzidos pela exposição a uma dose baixa de cobre. Esses achados sugerem que alterações na expressão gênica podem servir como indicadores mais sensíveis dos potenciais efeitos tóxicos do cobre (YANG *et. al*, 2010).

A deficiência de cobre ocorre quando a oferta do metal é insuficiente ou devido a alguma alteração genética. Como na doença de Menkes, há uma deficiência nutricional severa de cobre, uma vez que a ATPase responsável pelo seu bombeado das células intestinais para a corrente sanguínea está alterada (KALER, 1996, 1998). Por outro lado, quando em excesso, o cobre pode levar à toxicidade, seja pela elevada exposição ou por doença pré-estabelecida. Na Doença de Wilson, há toxicidade por excesso de cobre devido à mutação em ATPases responsáveis pela incorporação do metal às ceruloplasminas e pela excreção através da bile,

causando acúmulo de cobre nos hepatócitos, cérebro, rins, olhos e outros órgãos. (LINDER; HAZEGH-AZAM, 1996; ROBERTS; SCHILSKY, 2003).

A toxicidade ao cobre também pode resultar da exposição causada de forma acidental ou ocupacional, seja pela contaminação do meio ambiente, pelo 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 pode prejudicar o organismo de forma severa.

As alterações nos níveis de cobre no organismo podem resultar em mudanças na produção de ATP, aumento do estresse oxidativo, metabolismo anormal de glicose e colesterol, acúmulo de ferro tecidual, alterar a função e estrutura das células sanguíneas e do sistema imune, além de provocar alterações na eletrofisiologia cardíaca (HARRIS, 2003; KEEN *et. al*, 2003; SAARI, 2000). Portanto, quando há deficiência deste metal no organismo, a função de diferentes órgãos e de vários sistemas de defesa fica comprometida. Por outro lado, quando em excesso pode causar efeitos tóxicos (SUKALSKI; LABERGE; JOHNSON, 1997; BAGHERI *et. al*, 2015).

O papel do cobre nas doenças cardiovasculares tem sido relatado, demonstrando que a ingestão elevada do metal pode estar associada ao aumento da mortalidade por estas doenças (REUNANEN *et. al*, 1996; FORD, 2000; BAGHERI *et. al*, 2015).

1.1.7 Efeitos cardiovasculares da exposição ao cobre

Estudos têm demonstrado a correlação entre o aumento na concentração de cobre como fator para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (GHAYOUR-MOBARHAN *et. al*, 2005; LEONE *et. al*, 2006; BO *et. al*, 2008; TSUBOI *et. al*, 2014). O aumento nos níveis séricos de cobre já foi associado a pacientes com cardiomiopatia isquêmica (SHOKRZADEH *et. al*, 2009) ou com doença aterosclerótica (BAGHERI *et. al*, 2015), comparados a indivíduos saudáveis. Além destes, um estudo experimental demonstrou que à medida que ocorre a quelação do cobre, há redução da inflamação cardiovascular e consequente redução da doença aterosclerótica (WEI *et. al*, 2012). Desta forma, o aumento dos níveis sanguíneos do

metal tem sido apontado como um fator de risco para o surgimento ou agravamento das doenças cardiovasculares (FERNES; LAMB; TAYLOR, 1997; BAGHERI *et. al*, 2015). Todavia, ainda resta elucidar os mecanismos envolvidos nos efeitos do cobre sobre o sistema cardiovascular.

Manifestações cardíacas têm sido demonstradas na doença de Wilson, tais como a arritmia e a disfunção cardíaca. Como já descrito, o mecanismo desta doença consiste basicamente no acúmulo de cobre nos hepatócitos, provocando alterações cerebrais e hepáticas irreversíveis já bem estabelecidas (BALKEMAA *et. al*, 2008).

Conforme demonstrado na figura 1, quando há mutação no gene da proteína ATP7B ocorre redução da formação de ceruloplasmina e uma falência na liberação e excreção do cobre pelos ductos biliares. E, como consequência, o acúmulo de cobre nos hepatócitos causa lesão mitocondrial, lesão oxidativa celular e saída de cobre para a corrente sanguínea com consequente sobrecarga para os outros órgãos (BALKEMAA *et. al*, 2008). Desta forma, na doença de Wilson, há toxicidade por excesso de cobre devido ao acúmulo de cobre nos hepatócitos, cérebro, rins, olhos e outros órgãos, causando demência, perda de memória, cirrose, tremores e afetando o sistema cardiovascular (KODAMA *et al.*, 2012).

Os efeitos cardiovasculares do cobre na doença de Wilson parecem estar associados às alterações no endotélio vascular (BAGHERI *et. al*, 2015) e membranas celulares pela peroxidação lipídica por meio da ação dos radicais livres (BREMNER, 1998). Além de causar mudanças na produção de energia celular, aumento do estresse oxidativo e alterações na eletrofisiologia cardíaca (HARRIS, 2003; KEEN *et al.*, 2003; SAARI, 2000).

Em estudos realizados por nosso grupo, foi demonstrado que a exposição aguda de cobre (10 µg/mL) aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), prejudicando a o acoplamento excitação-contração e a força de contração dos músculos papilares, além de alterar a recaptção de cálcio (Ca²⁺) pelo retículo sarcoplasmático (RS) e diminuir a atividade da miosina-ATP-ase (FILETTI *et. al*, 2018). Além deste, Nunes *et. al.* (2018), em anéis isolados de aorta expostos à mesma concentração, observaram que a exposição aguda de cobre prejudica a resposta contrátil em anéis de aorta, devido ao aumento do estresse oxidativo e maior produção de óxido nítrico local.

Dentre os efeitos tóxicos do cobre também estão as alterações no endotélio vascular pela peroxidação lipídica, contribuindo para a formação de aterosclerose e aumento do risco de AVC e enfarte do miocárdio (LEITE; SARNI, 2003).

Com base nas evidências apresentadas, pouco se sabe sobre os efeitos mediados pelas EROs na exposição por 30 dias ao cobre sobre o sistema cardiovascular. Do mesmo modo, o efeito do cobre sobre a pressão arterial é pouco conhecido, portanto, é evidente a necessidade de elucidarmos os mecanismos envolvidos na pressão arterial, no acoplamento excitação contração cardíaco e na contratilidade miocárdica.

1.2 PRESSÃO ARTERIAL

O sistema circulatório tem como função principal transportar substâncias, através do sangue, necessárias ao perfeito funcionamento dos tecidos, eliminando os resíduos do metabolismo e fornecendo nutrientes e oxigênio para os tecidos. Além destas, participa dos processos homeostáticos, tais como a regulação da temperatura corporal e comunicação humoral por todo o corpo (BERNE; LEVY, 1996). A hemodinâmica sistêmica pode ser avaliada pelo análogo da Lei de Ohm, cuja PA é resultado do débito cardíaco do coração direito (DC) multiplicado pela resistência periférica (RP) (AIRES, 2012).

A pressão arterial (PA) é uma variável física que depende do volume sanguíneo ejetado pelo ventrículo esquerdo no leito arterial e é expressa em força por unidade de área. Deste modo, fatores funcionais definirão a entrada e a saída de sangue do compartimento arterial a cada momento. A ejeção de sangue a cada minuto no compartimento arterial é definida como débito cardíaco, o qual pode variar de acordo com a frequência cardíaca (FC). Vale entender que os mecanismos que regulam a PA ocorrem por meio de variações instantâneas da condutância venosa e retorno venoso, bem como do débito cardíaco e da resistência periférica, ou até mesmo quando ocorrem alterações a longo prazo na volemia sanguínea (AIRES, 2012).

Os mecanismos de regulação da PA englobam os de ação imediata, curto e médio prazo, e os de longo prazo. Os de ação imediata são constituídos pelos mecanismos de regulação locais (miogênicos, metabólicos, endoteliais, temperatura,

parácrinos e autócrinos) e os neurais (mecanorreceptores, quimiorreceptores, receptores cardiopulmonares e outros receptores). Além destes, à curto e médio prazo ocorre a regulação neuro-hormonal, por meio da ação das catecolaminas, do sistema-renina-angiotensina-aldosterona, da vasopressina, da ocitocina e do peptídeo atrial natriurético. Os mecanismos de ação mais prolongada envolvem mecanismos de regulação da volemia e neoformação ou rarefação dos vasos sanguíneos, e são responsáveis pela dimensão física da PA (AIRES, 2012).

Em um estudo experimental em coelhos, com um modelo de tratamento agudo, demonstrou que ao infundir 10 mg/kg de CuCl_2 (i.v.), a PA basal não foi alterada durante 5 minutos seguintes em 3 coelhos. No entanto, quando a dose de CuCl_2 foi aumentada para 15 mg/kg, houve uma diminuição significativa da PA e subsequente morte desses animais e mesmo na presença de um quelante do metal, não foi possível reverter a hipotensão (WANG, 2013).

Escassos são os estudos que investigam os efeitos do cobre sobre a pressão arterial. Portanto, tornam-se relevantes os estudos que pesquisam esses mecanismos.

1.3 CONTRATILIDADE CARDÍACA E ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO

O acoplamento excitação-contração (AEC) é organizado por um conjunto de mecanismos, os quais são desencadeados pela excitação elétrica (potencial de ação) e irá gerar a contração (AIRES, 2012). O cálcio (Ca^{2+}) é um íon intimamente envolvido na atividade elétrica cardíaca e atua diretamente nos miofilamentos durante a contração muscular (BERS, 2002).

No miocárdio, o AEC é iniciado pelo potencial de ação cardíaco, tornando a membrana sarcoplasmática mais permeável e permitindo a entrada do Ca^{2+} via canais ativados por despolarização (tipo L), forma-se então o platô do potencial de ação. O influxo de Ca^{2+} promove liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, retículo sarcoplasmático (RS), sendo essa liberação denominada liberação de Ca^{2+} induzida por cálcio (através do receptor de rianodina tipo 2). A concentração de $[\text{Ca}^{2+}]$ resulta da combinação do seu influxo pelo sarcolema e a liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, o principal reservatório intracelular de cálcio. Este aumento do Ca^{2+} mioplasmático irá atuar sobre os miofilamentos, mais

especificamente a proteína regulatória troponina C (TnC), e disparar o mecanismo da contração ou encurtamento muscular (BERS, 2002; AIRES, 2012).

Esta interação do Ca^{2+} à troponina C faz com que a tropomiosina deixe de bloquear o sítio de ligação entre actina e miosina. Deste modo, ocorre a ativação da ATPase miosínica, a qual cliva ATP e libera ADP, produzindo energia para o deslizamento entre miofilamentos e, conseqüente, contração muscular. E, portanto, um dos fatores que contribuem para a modulação da contratilidade é conferido mediante a sensibilidade da troponina C ao íon cálcio, conforme revisado por VASSALLO *et. al*, 2008.

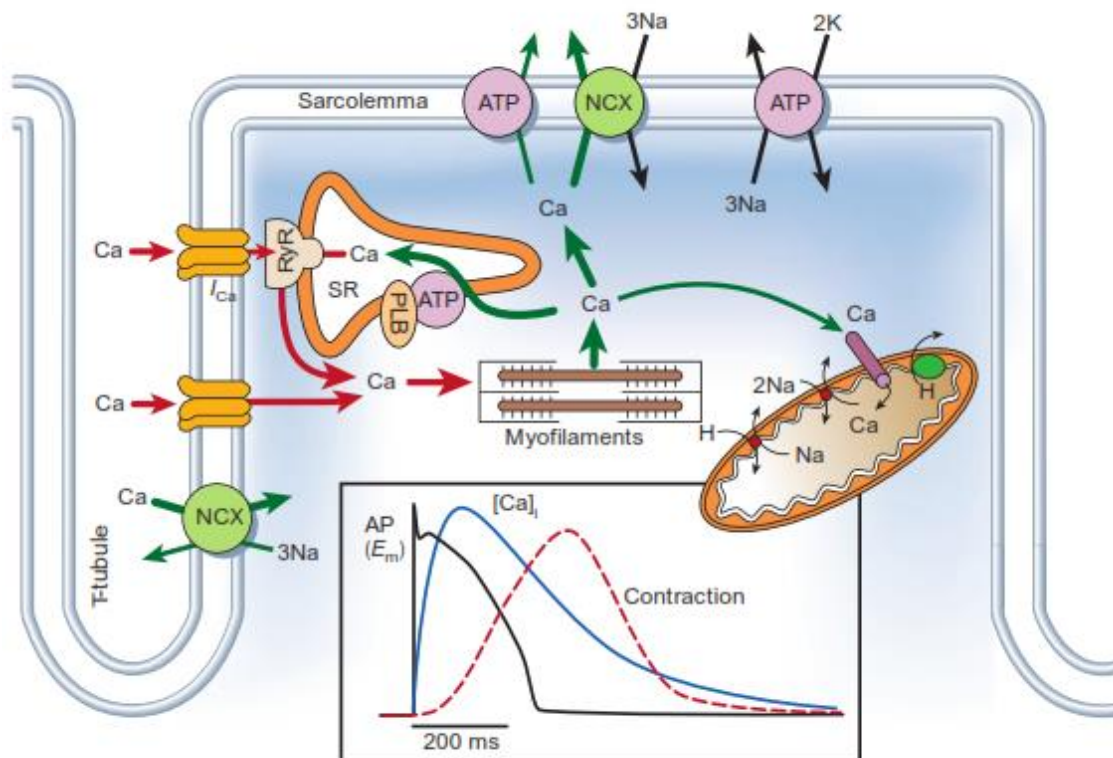


Figura 3: Esquema do transporte intracelular do cálcio em miócitos ventriculares. O potencial ativa o influxo de Ca^{2+} ($I_{\text{Ca,L}}$) em canais do tipo L; a sua entrada desencadeia a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} do SR pelos canais de rianodina (Ryr); este se liga à troponina C nos miofilamentos e provoca a contração. O íon é dissociado da troponina C, recaptado pela ATPase do SR e pelo uniportador mitocondrial e extrusado pelo NCX, promovendo o relaxamento. O gráfico mostra o curso temporal do potencial de ação (AP), o transiente de cálcio ($[\text{Ca}]_i$) e a curva de contração (pontilhado vermelho). Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX); retículo sarcoplasmático (SR); fosfolamban (PLB). BERS (2002).

Durante a repolarização celular, os mecanismos de extrusão do Ca^{2+} são ativados e ele passa a ser retirado da célula, contribuindo para que o Ca^{2+} se desprenda da TnC, impedindo novamente a interação actina-miosina e promovendo relaxamento. A bomba de Ca^{2+} do RS (SERCA), o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), Ca^{2+} -ATPase do sarcolema e o uniporte mitocondrial, constituem os mecanismos responsáveis pela retirada do Ca^{2+} do citosol. Portanto, qualquer alteração nos mecanismos de retirada do cálcio do citosol também pode modular a contratilidade cardíaca (BERS, 2002; AIRES, 2012).

Quando o Sistema Nervoso Autônomo promove estimulação simpática, ocorre a ativação dos receptores β -adrenérgicos cardíacos, desencadeando a acionamento de proteínas intracelulares em efeito cascata. Deste modo, os receptores β -adrenérgicos ao serem estimulados, ativam a proteína ligada ao GTP (G_s), a qual estimula a adenilato ciclase (AC) a produzir AMPc. O AMPc produzido ativa a proteína cinase dependente de AMPc (PKA), a qual fosforila diversas proteínas relacionadas ao acoplamento excitação-contração. Assim, a estimulação simpática também modula a contratilidade cardíaca, produzindo efeitos inotrópicos e lusitrópicos positivos, como está representado na figura 4 (BERS, 2002).

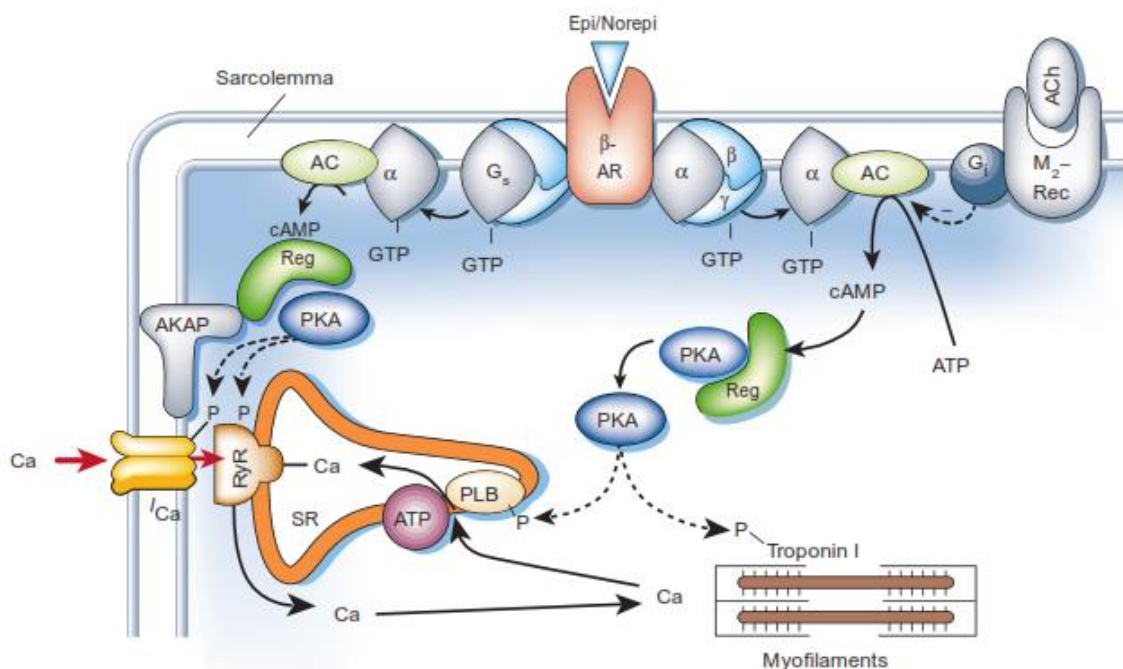


Figura 4: Esquema da ativação simpática no transporte intracelular do cálcio em miócitos ventriculares. Catecolaminas estimulam o receptor β -adrenérgico, ativa a proteína G_s ligada ao GTP

e estimulam a produção de AMPc. PKA é ativada e fosforila as proteínas envolvidas do acoplamento excitação-contração, tais como, os canais de Ca^{2+} tipo L; rianodina (Ryr); troponina I; fosfolamban (PLB) da bomba de Ca^{2+} do retículo (SR). BERS (2002).

1.5 PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO NA CONTRATILIDADE CARDÍACA

O óxido nítrico (NO) é um modulador importante do estado inotrópico cardíaco e pode variar de acordo com sua concentração ou taxa de liberação e estimulação β -adrenérgica (LAYLAND; LI; SHAH, 2002).

O NO é produzido nos cardiomiócitos e fibras nervosas, sintetizado pela isoforma neuronal e endotelial, quando em condições fisiológicas, e pela isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase (NOS), quando em condições patológicas (BREDT, 2003; MASSION *et al.*, 2003). Entretanto, em preparações miocárdicas isoladas, a liberação vascular de NO mediada pela eNOS é suprimida e, por isso, não é considerada a principal mediadora de sua síntese nesses casos. Uma vez sintetizado, o NO pode exercer seus efeitos, de maneira autócrina ou parácrina, seja no estado fisiológico ou em condições patológicas (XIE; WOLIN *et al.*, 1996).

Predominantemente, nos miócitos cardíacos, as fontes dominantes do NO são provenientes da óxido nítrico sintase edotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), no estado fisiológico. Estas isoformas são direcionadas às cavéolas celulares, onde ocorre a sinalização. As cavéolas são domínios especializados da membrana plasmática, onde estão ligadas às proteínas de sinalização, as caveolinas (FERON *et al.*, 1996; SMILJIC *et al.*, 2014).

Feron *et al.* (1996), por meio de análises imunohistoquímicas, demonstraram que no músculo cardíaco de ratos, a isoforma específica predominante é a caveolina-3, já nas células endoteliais a isoforma expressa de forma mais abundante é a caveolina-1. Desta forma, estes autores sugerem que o mecanismo de ligação da NOS às isoformas caveolares é importante para a regulação específica da célula, podendo ser mediado também por outras proteínas de sinalização.

Enquanto a eNOS liga-se ao domínio caveolar da membrana celular, o nNOS se liga aos receptores de rianodina e xantina oxireductase, localizados no RS (XU *et al.*, 1999; BAROUCH *et al.*, 2002; KHAN *et al.* 2004). Portanto, o NO pode regular o ciclo de Ca^{2+} e, quando há alteração da sinalização do NO nesses domínios, pode

levar à disfunção na maquinaria contrátil e consequente arritmias (SIMON *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação do óxido nítrico no cardiomiócito ocorre quando ele se liga à guanilatociclase (Gs), levando à formação de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O GMPc ativa as proteínas kinases (PKG), desencadeando uma cascata de resposta intracelulares. Nos cardiomiócitos, a PKG fosforila a troponina I, diminuindo a afinidade da troponina C ao cálcio. A PKG também é capaz de suprimir o aumento da corrente de cálcio pela fosforilação dos canais de Ca^{2+} do tipo L pela PKA, por exemplo, quando há uma ativação simpática (LAYLAND; LI; SHAH, 2002; SMILJIC; NESTOROVIC; SAVIC, 2014).

Quando há baixas concentrações de NO, há produção de pequenas quantidades de GMP cíclico, impedindo a hidrólise do AMP cíclico pela fosfodiesterase 3. Assim, a PKA é ativada, provocando a liberação de Ca^{2+} pelos receptores de rianodina, favorecendo o aumento da contratilidade do miocárdio (LAYLAND; LI; SHAH, 2002).

O efeito do NO, quando mediado pela eNOS e nNOS e em baixas concentrações, pode atuar na regulação do tônus dos vasos coronarianos e na contratilidade cardíaca (XU *et al.*, 1999; BRUTSAERT, 2003). Além destes, pode inibir a agregação plaquetária e a proliferação de células e fibroblastos no músculo liso, favorecendo o seu efeito antiaterosclerótico (THAKUR *et al.*, 2002; LIU; FENG, 2012). Todavia, o NO é um radical livre e, quando em altas concentrações, regulado principalmente pela isoforma induzível da NOS e em condições patológicas, pode levar à alteração no funcionamento dos cardiomiócitos e até à insuficiência cardíaca (BALLIGAND *et al.*, 1994; RAZAVI; HAMILTON; FENG, 2005). Portanto, estudar a regulação da função cardíaca mediada pelo NO pode favorecer a compreensão destes mecanismos, bem como criar novas abordagens terapêuticas das doenças cardiovasculares.

1.6 JUSTIFICATIVA

Diante da popularidade da autoadministração de microminerais e suplementos vitamínicos há uma preocupação com os limites da homeostase do cobre no organismo. Apesar de ser essencial para diversas funções no organismo, ainda não é conhecido os efeitos em longo prazo da exposição ao cobre. Sabe-se que em altas concentrações, o cobre é tóxico ao organismo, todavia, resta saber qual o Índice Biológico Máximo Permitido para essa exposição.

A ingestão elevada de cobre já tem sido associada a diversas doenças cardiovasculares. Em pacientes com doença aterosclerótica foram encontrados níveis séricos de cobre maiores (BAGHERI *et al.*, 2016). Portanto, o aumento da exposição e da concentração de cobre no sangue pode aumentar o risco para o surgimento ou agravamento dessas doenças.

Poucos são os estudos que mostram as alterações cardiovasculares da exposição prolongada ao cobre em doses acima da recomendada, como as encontradas em trabalhadores expostos. Vale ressaltar a importância pesquisas que envolvem modelos de exposição prolongada, pois estes se aproximam da realidade encontrada em populações expostas. Desta forma, o presente estudo mostra a sua relevância ao ser o primeiro a desenvolver um modelo de exposição por 30 dias ao cobre na dose duas vezes acima da Ingesta Diária Recomendada.

Nós hipotetizamos que a exposição ao cobre produz estresse oxidativo e afeta a biodisponibilidade do óxido nítrico, induzindo alterações hemodinâmicas e disfunções na contratilidade miocárdica. Diante disso, qual seriam os mecanismos envolvidos na regulação da pressão arterial e da contratilidade cardíaca após a exposição prolongada ao cobre, especialmente pela ação dos radicais livres. Assim, nosso objetivo foi investigar os efeitos hemodinâmicos *in vivo* e na maquinaria contrátil *in vitro* da exposição por 30 dias ao cobre.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição por 30 dias ao cobre sobre a pressão arterial e a função cardíaca de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o comportamento da pressão arterial ao longo da exposição crônica ao cobre;
- Avaliar a eficiência da administração intraperitoneal de cobre para o modelo de sobrecarga crônica;
- Conhecer os efeitos hemodinâmicos da exposição ao cobre em ratos
- Investigar os efeitos da sobrecarga crônica de cobre sobre a contratilidade miocárdica e sua regulação
- Avaliar o papel do óxido nítrico sobre os efeitos do cobre na contratilidade miocárdica
- Estudar os efeitos da sobrecarga crônica de cobre sobre o estresse oxidativo miocárdico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) cedidos pelo biotério do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas, submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas, em condições de controle de temperatura e com livre acesso à ração e água.

Os métodos experimentais utilizados nesta pesquisa se adequaram aos princípios éticos de experimentação animal e às Diretrizes Brasileiras para Cuidado e Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos publicada pelo CONCEA (2018). E os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais Experimentais da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA/UFES), os quais estão inscritos neste comitê sob número 015/2015.

3.1.2 Modelo Experimental

Os ratos Wistar, com aproximadamente três meses de idade, pesando aproximadamente 280g, foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: grupo controle (Ct) e grupo cobre (Cu). Os animais destinados ao grupo cobre receberam diariamente por 30 dias, injeção intraperitoneal (IP) de solução de cloreto de cobre (CuCl_2) dissolvido em salina na dose de 2 mg/kg/dia (CHATTOPADHYAY; SARKAR; BISWAS, 2002). Os animais do grupo controle receberam pelo mesmo período descrito acima, injeção intraperitoneal (IP) com apenas o veículo, solução salina (0,9%). Cada grupo foi alojado em gaiolas, de forma que os animais do grupo controle não fossem expostos à água e às excretas dos animais do grupo tratado.

3.2 AVALIAÇÃO PONDERAL

Antes de iniciar o tratamento, semanalmente e ao final dos 30 dias de exposição ao cobre, os ratos dos grupos controle e cobre foram pesados para avaliação do ganho ponderal.

O coração, aorta, fígado, cérebro, pulmão, rins e tibia dos animais de ambos os grupos, após a realização dos protocolos, foram pesados. Para realizar a coleta desses dados, ao final do tratamento, os órgãos foram dissecados, lavados em solução salina (NaCl 0,9%), enxugados para retirar o excesso da solução e pesados. O procedimento de dissecação dos órgãos foi realizado pelo mesmo pesquisador tomando os cuidados na equidade da conduta.

3.3 MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

A pressão arterial sistólica (PAS) dos animais de ambos os grupos foi aferida semanalmente por medida indireta, pelo método de pletismografia de cauda (IITC Life Science non-invasive blood pressure, versão 1.35). Este protocolo foi executado com a finalidade de avaliar os efeitos da sobrecarga de cobre sobre os valores pressóricos dos animais acordados, ou seja, sem possíveis efeitos depressores dos anestésicos, ao longo das semanas de exposição.

O método utilizado nesse protocolo seguiu as recomendações do fabricante. Portanto, antes do início das medidas pressóricas os animais eram submetidos a um período de três dias de aclimação, a qual era efetuada colocando-se os animais no aparelho e mimetizando-se a técnica de mensuração da pressão arterial (PA). Esta aclimação é necessária para reduzir o estresse dos animais durante seu confinamento no cilindro de acrílico para a aquisição dos dados e, conseqüentemente, amenizar possíveis interferências ambientais e de estresse, nos valores pressóricos obtidos.

No momento do registro pressórico os animais eram acomodados em um cilindro de acrílico (*holder*) e a cauda dos animais era conectada a um sensor de pressão presente no manguito (*cuff*), o qual estava conectado ao amplificador e este ao computador, para obtenção dos dados. Os cilindros com os ratos eram colocados no interior da estufa a 37°C, a fim de promover dilatação da artéria caudal permitindo a aferição da PAS. Era observado se os animais estavam em condições ideais:

posição e relaxamento do animal; temperatura e posição do *cuff* e ausência de evacuação durante o procedimento. Depois de averiguada as condições adequadas dos animais, aproximadamente dez novas medidas eram realizadas e destas, as três com menos interferências eram escolhidas para calcular a média aritmética da PAS de cada animal.

3.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA POR MEDIDA DIRETA

Ao final dos 30 dias de exposição ao cobre os animais de ambos os grupos foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, I.P.) sendo a efetividade anestésica avaliada pela responsividade ao estímulo doloroso, com testes como pinçar a cauda do animal. E, quando necessário, houve suplementação do anestésico utilizado.

Os animais anestesiados foram submetidos à cirurgia de cateterização da artéria carótida direita para mensuração dos parâmetros cardiovasculares. A pressão ventricular esquerda foi medida pela introdução do cateter até o ventrículo esquerdo, perfazendo o circuito via artéria carótida comum direita. A canulação foi realizada com cateter de polietileno (*PE 50 Clay-Adams*) preenchidos com salina heparinizada (50 U/mL). O cateter arterial era acoplado a um transdutor de pressão (TSD 104A- Biopac) conectado a um pré-amplificador interligado ao sistema Biopac de aquisição de dados, o qual utilizava uma taxa de amostragem de 2000 amostras/s (MP 30 Byopac Systems, Inc; CA). Foram feitos registros contínuos dos parâmetros hemodinâmicos, os quais foram processados por um computador.

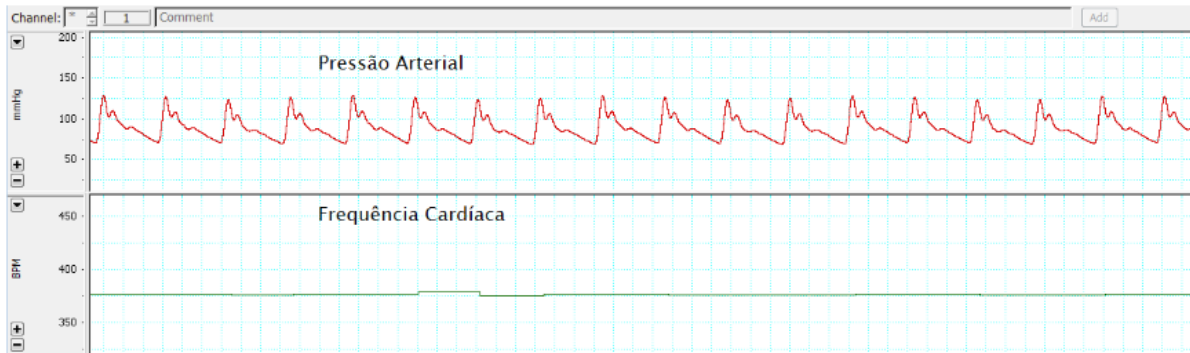
Após 20 min de estabilização, foram analisados em ratos dos grupos controle e cobre os seguintes parâmetros:

- Pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC).
- Pressão sistólica e diastólica final do ventrículo esquerdo (PSVE; PDfVE); máximas derivadas positiva ($+dP/dt_{máx}$) e negativa ($-dP/dt_{máx}$) temporal de pressão intraventricular, obtidas a partir dos registros de ondas de pressão intraventricular em função do tempo.

Estas medidas foram analisadas em ambos os grupos (Controle e Cobre), no intuito de avaliar a efeitos da sobrecarga de cobre sobre os parâmetros hemodinâmicos.

A figura 5 mostra um registro típico dos parâmetros hemodinâmicos avaliados.

A)



B)

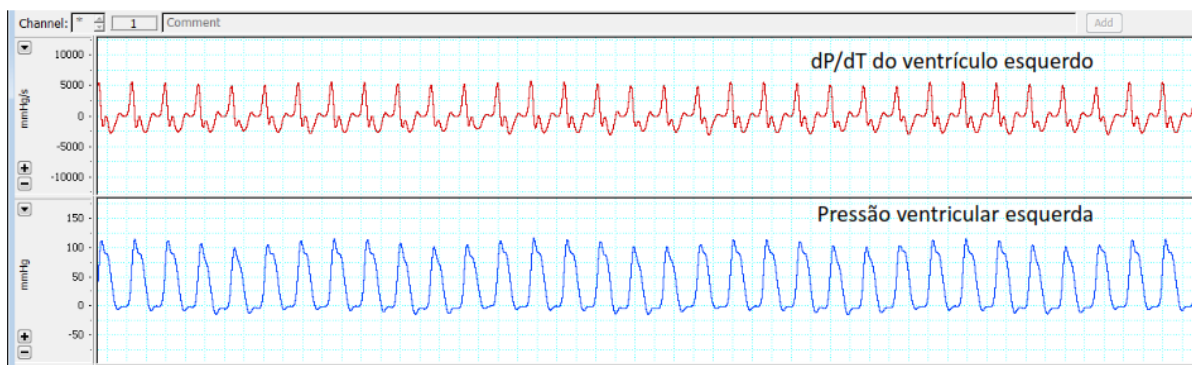


Figura 5: Registro dos parâmetros hemodinâmicos. (A) Pressão arterial e Frequência Cardíaca, (B) Pressão ventricular esquerda e dP/dt do ventrículo esquerdo de ratos Wistar. Fonte: O autor.

3.5 AVALIAÇÃO “IN VITRO” DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

A preparação do músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo permite detectar alterações da contração e relaxamento do músculo cardíaco sem o envolvimento de variações na pós-carga, pré-carga, frequência cardíaca, influência hormonal ou substrato energético. Deste modo, esta técnica possibilita a avaliação direta da função miocárdica (CICOGNA *et al.*, 2000).

3.5.1 Montagem e preparação

Após 30 dias de exposição ao cobre, seguindo a avaliação hemodinâmica, foi avaliada a contratilidade miocárdica pela técnica de registro de força isométrica de músculos papilares isolados. Os animais já anestesiados com uretana (1,2 g/kg, I.P.)

foram submetidos à toracotomia. Em seguida, os corações eram rapidamente removidos e perfundidos com solução de *Krebs-Henseleit* (em mM: NaCl 135; KCl 4,6; CaCl₂ 1,25; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; e glicose 5,5) gaseificada com mistura carbogênica (5% de O₂ e 95 % de CO₃), o qual contribui para a manutenção do pH 7,4. Para a dissecação dos músculos papilares do ventrículo esquerdo (VE), os ventrículos direito e esquerdo foram separados e, quando o septo interventricular foi exposto e dividido ao meio, os músculos papilares eram claramente expostos para realizar a dissecação. Os músculos papilares posteriores do ventrículo esquerdo eram removidos e presos por argolas de aço inoxidável a uma extremidade fixa (inferior) e outra (superior) conectada a um transdutor de força isométrico, em câmaras de vidro com volume de 20 mL de solução de *Krebs-Henseleit*. Conforme descrito por Vassallo e Carvalho (1979), para reduzir a possibilidade de hipóxia, os experimentos foram realizados a 29° C, baixa temperatura, e continuamente gaseificados com mistura carbogênica.

A força foi mensurada por um transdutor de força isométrica (TSD125 - Byopac Systems, Inc; CA, U.S.A.) acoplado a um amplificador (DA100C Byopac Systems, Inc; CA, U.S.A.) e registrada por um sistema de aquisição de dados (MP100 Byopac Systems, Inc; CA, U.S.A.) e um microcomputador com taxa de amostragem de 500 amostras/s.

Os músculos papilares do VE foram estimulados eletricamente através de dois eletrodos de platina posicionados paralelos ao músculo (pulsos retangulares com duração de 5 ms e 10 a 15 V). A taxa de estimulação padrão era de 0,5 Hz (condição-estabilizada). Os músculos eram, então, estirados até o comprimento no qual a tensão ativa é máxima ($L_{máx}$). As preparações foram mantidas por um período de estabilização de, pelo menos 60 minutos e, em seguida, foram iniciados os protocolos experimentais.

Ao final do experimento os músculos papilares do ventrículo esquerdo dos ratos foram pesados.

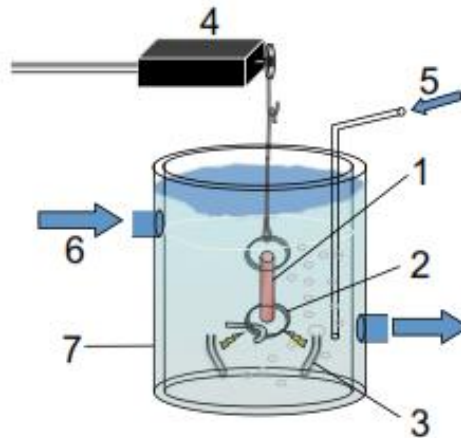


Figura 6: Desenho representativo da preparação “in vitro” dos músculos papilares isolados em banho de solução fisiológica. (1) papilar fixado por pressão; (2) argola de aço inox; (3) eletrodos de estimulação; (4) transdutor de força; (5) liberação de mistura carbogênica; (6) entrada para o banho com controle de temperatura; (7) cuba de vidro termostatazada. RIVAROLI (2011).

3.5.2 Força de contração isométrica e cinética contrátil

A força desenvolvida (F), os tempos de ativação e relaxamento e as máximas derivadas temporais de força (dF/dt) positiva e negativa foram avaliadas nos músculos papilares contraindo isometricamente logo após o período de estabilização. Estes parâmetros foram investigados em ambos os grupos experimentais no intuito de verificar se a sobrecarga crônica de cobre interfere no funcionamento da musculatura cardíaca.

A força desenvolvida foi medida e corrigida pelo peso do papilar para evitar variações promovidas pela diferença no tamanho dos músculos utilizados, sendo expressa em g/mg (razão entre a força desenvolvida, em g, e o peso muscular, em mg).

Os tempos de ativação e de relaxamento correspondem aos tempos (em milissegundos) despendidos do início da contração para atingir o pico máximo de força (Tempo de ativação) e do pico máximo até decrescer 90% do seu valor máximo desenvolvido (Tempo de 90% de relaxamento) (VASSALLO et. al, 2008).

As derivadas temporais de força correspondem à taxa de variação da força desenvolvida por unidade de tempo. Estas, são estabelecidas pelo cálculo da primeira derivada temporal dos valores de força, sendo avaliadas as máximas

derivadas positiva ($+dF/dt_{\text{máx}}$) e negativa ($-dF/dt_{\text{máx}}$) como parâmetros de performance da contração (sístole) e do relaxamento (diástole), respectivamente.

A figura 7 representa a avaliação os parâmetros basais descritos acima.

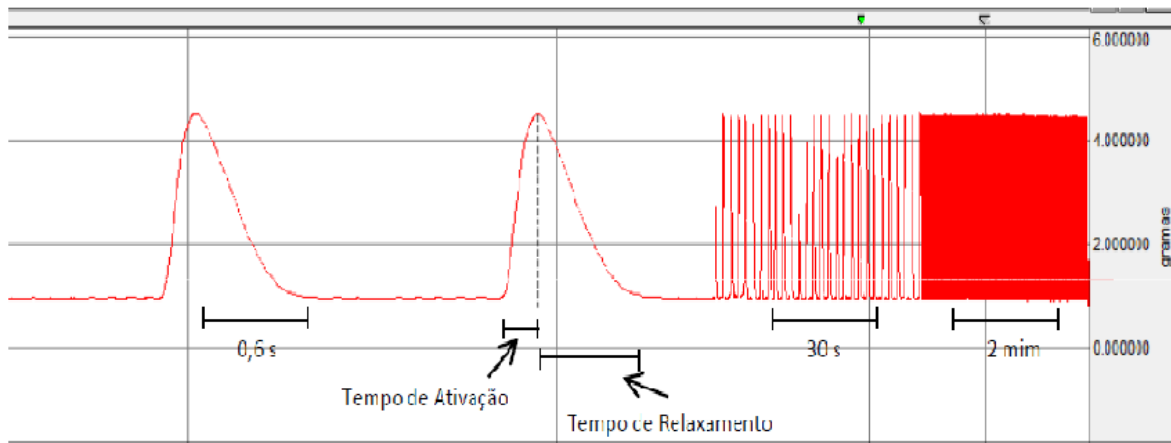


Figura 7: Registro típico de força isométrica e dos parâmetros temporais da contração desenvolvida pelos músculos papilares do VE de ratos Wistar. O pico da deflexão positiva corresponde à força isométrica desenvolvida. FIORESI (2011).

3.5.3 Avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático

Para avaliar efeitos da sobrecarga de cobre na atividade funcional do RS, de forma indireta, foi realizado o protocolo das potenciações relativas pós-pausa (PPP). Os músculos papilares imersos em solução *Krebs*, foram submetidos a períodos de pausas crescentes no estímulo elétrico. Estas potenciações relativas foram obtidas com a reestimulação elétrica após as pausas consecutivas de 15, 30 e 60 segundos, para avaliar a amplitude de contração após a pausa no estímulo elétrico aplicado no músculo, como um indicador da função do RS (VASSALLO; MILL, 1988). O intervalo entre as pausas neste protocolo ocorreu pelo tempo necessário para o retorno da contração às condições basais, de modo a atingir a normalização pelo valor relativo às contrações que precederam a pausa (60 segundos). Este procedimento tornou-se necessário para evitar variações promovidas pelo estado inotrópico diferenciado das contrações anteriores à pausa.

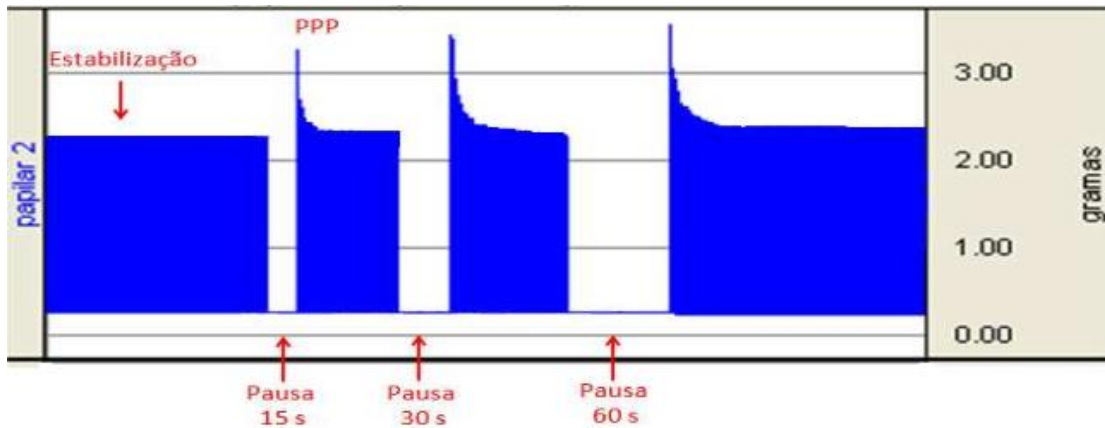


Figura 8: Registros típicos de potenciações pós-pausas (PPP) músculos papilares do VE de ratos Wistar obtidas após pausas de 15, 30 e 60 segundos. FURIERI (2008).

3.5.4 Resposta contrátil ao cálcio extracelular

No intuito de investigar se a sobrecarga crônica de cobre alterou a resposta contrátil ao cálcio, foi realizada uma curva concentração-resposta a crescentes concentrações deste íon na solução do banho.

Para a realização deste protocolo, a solução nutriente era trocada por outra contendo a metade da concentração de Ca^{2+} (0,62 mM), e em seguida, foram adicionadas concentrações crescentes de cloreto de cálcio.

A avaliação da resposta inotrópica na curva concentração-resposta foi realizada pela amplitude máxima da contração estabilizada nas diferentes concentrações extracelular de Ca^{2+} (0,62, 1,25 e 2,5 mM). A variação de força foi corrigida pelo peso dos músculos e expressa em g/mg.

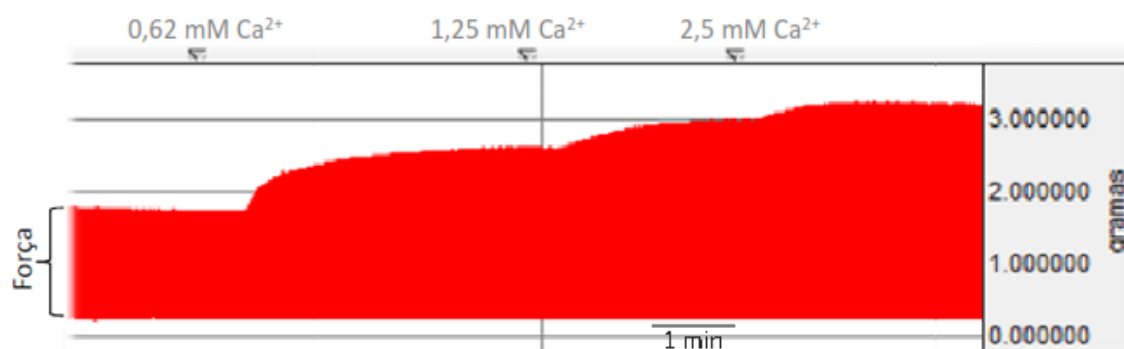


Figura 9: Registro típico da variação de força contrátil em músculos papilares do VE de ratos Wistar na curva concentração-resposta em resposta às crescentes concentrações de cálcio extracelular. Adaptado de FIORESI (2011).

3.5.5 Avaliação indireta do influxo de cálcio transsarcolemal

Para avaliar a interferência da sobrecarga crônica de cobre no influxo transsarcolemal de Ca^{2+} para a contração miocárdica, foi realizada a manobra “post rest contraction-PRC”, já descrita previamente (LEITE; VASSALLO; MILL, 1991). Para essa avaliação foi utilizada a solução nutriente livre de cálcio (*Ca⁺⁺ free*) e acrescida de 10 mM de cafeína. A cafeína nessa concentração ativa os receptores de rianodina e depleta os estoques de Ca^{2+} do RS (BASSANI; BASSANI; BERS, 1994; LEITE; VASSALLO; MILL, 1995), somado à ausência do Ca^{2+} extracelular, favorece a sua extrusão pela membrana sarcolemal. Desta forma, permite-se avaliar a contração miocárdica com as reservas de Ca^{2+} intracelular e do RS anuladas (DE BELCHIOR *et al.*, 2015).

Os músculos foram previamente lavados, por três vezes, com solução sem Ca^{2+} até as contrações serem abolidas e mantidos por 10 minutos sem estímulo elétrico. Imediatamente dois minutos antes de reiniciar a estimulação, a solução foi novamente trocada por *Krebs-Henseleit* gaseificada nas condições padrões (contendo 1,25 mM de cálcio). Desta forma, conclui-se que a 1ª contração pós-reposo de 10 minutos é totalmente dependente do influxo de cálcio do meio extracelular. As contrações obtidas após repouso de 10 minutos, chamadas de “post rest contraction” (PRC), foram calculadas como porcentagem da primeira contração após a pausa em relação à amplitude da contração estabilizada anterior à pausa.

3.5.6 Resposta contrátil à estimulação β -adrenérgica

Para investigar se a sobrecarga crônica de cobre alterou a resposta simpática cardíaca foi utilizado o isoproterenol, um agonista (não-seletivo) β -adrenérgico, na dose de 10^{-2} M, permanecendo uma concentração de 10^{-4} M na cuba.

Para realizar este protocolo foi utilizada solução nutritiva contendo 0,62 mM de cloreto de cálcio, a qual representa metade da concentração fisiológica de cálcio. Esta intervenção foi utilizada considerando que preparações isoladas de ratos exibem melhores respostas inotrópicas positivas quando submetidas a baixas concentrações extracelulares de Ca^{2+} (VASSALLO *et al.*, 1994).

Após a estabilização funcional da preparação, a resposta inotrópica induzida pelo agonista β -adrenérgico foi avaliada pela amplitude máxima da contração estabilizada após a incubação com o agonista.

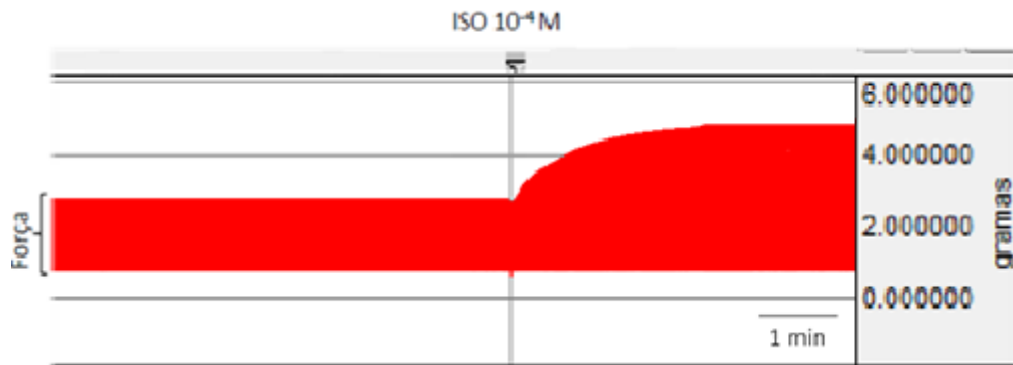


Figura 10: Registro típico da resposta β -adrenérgica ao isoproterenol (10^{-4} M) em preparação de músculos papilares de VE de ratos Wistar. FILETTI (2018).

3.5.7 Contrações tetânicas

O protocolo das contrações tetânicas foi utilizado com a finalidade de investigar o papel conjunto influxo de cálcio transsarcolemal e a responsividade das proteínas contráteis ao cálcio após a sobrecarga crônica de cobre. Esta preparação representa uma maneira de avaliar a resposta contrátil em preparações com o miocárdio intacto em que o RS apresenta-se não-funcional (LEITE; VASSALLO; MILL, 1995).

Com a depleção dos estoques de Ca^{2+} do RS pela ação da cafeína, as contrações dependem exclusivamente do influxo de Ca^{2+} através do sarcolema e da responsividade das proteínas contráteis ao íon (BASSANI; BASSANI; BERS, 1994; BERS, 2002; LEITE; VASSALLO; MILL, 1995). Deste modo, Os músculos papilares foram perfundidos por 30 minutos com solução de *Krebs* acrescida de 10 mM de cafeína e submetidos a uma frequência de estimulação de 10 Hz e duração de 15 segundos (LEITE; VASSALLO; MILL, 1995). Para fins experimentais utilizamos a força desenvolvida nos picos e platôs dessas contrações corrigidas pelo peso dos músculos papilares.

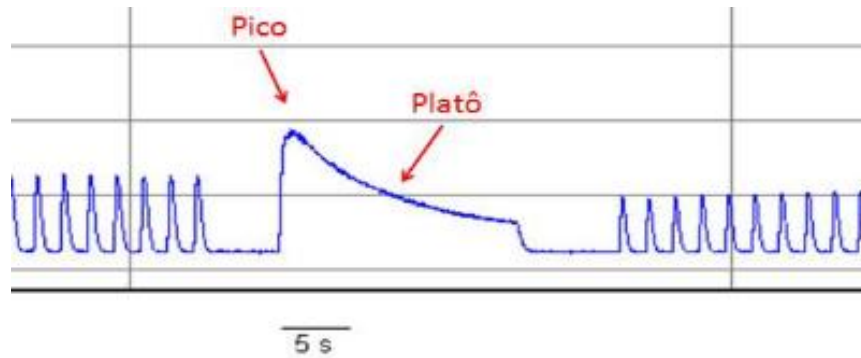


Figura 11: Registro típico das contrações tetânicas de músculos papilares do VE de ratos Wistar, destacando o pico e platô dessas contrações. Adaptado de FURIERI (2008).

A figura 12 apresenta um esquema dos protocolos realizados *in vitro*, em músculos papilares isolados de ratos Wistar.

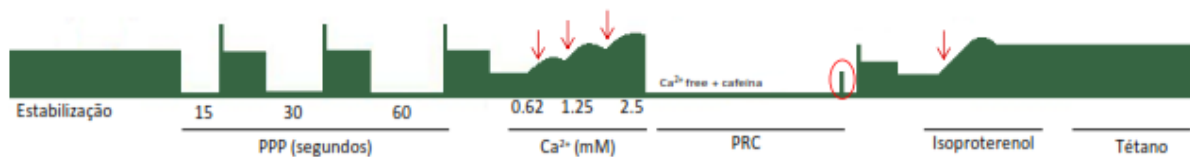


Figura 12: Esquema representativo do protocolo de avaliação de contratilidade em músculo papilar *in vitro*. PPP: Potenciação Pós Pausa, PRC: Post Resting Contraction. Adaptado ÁVILA (2016).

3.5.8 Papel do óxido nítrico na contratilidade miocárdica

O óxido nítrico (NO) é um modulador importante do estado inotrópico cardíaco capaz de regular o ciclo do Ca^{2+} e influenciar os mecanismos da maquinaria contrátil cardíaca, dependendo da sua concentração e de acordo com a isoforma da NOS que o sintetiza (LAYLAND *et al.*, 2002; SIMON *et al.*, 2014).

Para avaliar a participação do NO produzido localmente nas alterações contráteis provocadas pela sobrecarga crônica de cobre, os protocolos descritos anteriormente foram realizados após 1 hora de incubação com N(ω)-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 100 μM).

3.6 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE

Para a análise da concentração de cobre no sangue, as amostras (5 mL) foram armazenadas em tubos de ensaio de PVC tratados com heparina (50 U/mL sangue) e resfriados em geladeira (4°C). A mensuração da concentração sanguínea de cobre foi realizada pela técnica de Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS), pelo equipamento Nexlon 300D (Perkin Elmer, Inc., Shelton, CT, U.S.A.). O sistema de introdução da amostra foi aquoso (Nebulizador Meinhard Tipo C, Câmara ciclônica com anteparo, cones de níquel 1,1 mm i.d.), em que 200 µL de sangue foram adicionados em tubos de polipropileno e diluídos até 15 mL com Triton X-100 0,005 % m/v em ácido nítrico 0,5 % v/v. As amostras foram agitadas no vortex vigorosamente por cerca de 1 min e posteriormente centrifugadas até a leitura.

O cobre é basicamente capturado e metabolizado pelos hepatócitos e, em seguida, facilmente distribuído aos tecidos através da ceruloplasmina (COUSINS, 1985). Desta forma, o fígado representa o principal local de acúmulo de metal e a ceruloplasmina é a forma extra-hepática mais comum, pela qual ocorre uma lenta distribuição aos tecidos (OWEN, 1965; COUSINS, 1985). Sabemos que o aumento da deposição de tecido de cobre nas células pode ser tóxico, no entanto, é pouco elucidado sobre o acúmulo desse metal em outros tecidos e os seus possíveis efeitos (COUSINS, 1985). Por esse motivo, realizamos a análise do cobre em diferentes órgãos e tecidos para conhecer a sua forma de distribuição neste modelo de tratamento utilizado no presente estudo.

Além do sangue, os seguintes órgãos e tecidos foram removidos: cérebro, coração, rins, fígado, pulmão, tíbia e aorta. Estas amostras foram lavadas com solução salina, armazenadas a -20°C e enviadas em reservatório térmico a 4°C para o laboratório de Química Analítica da UFES (LQA). Para a análise da deposição tecidual foi realizada a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com forno de grafite (GF AAS), pelo equipamento AAS ZEE nit 700 BU (AnalytikJena). O sistema de introdução de amostras foi automático, no qual a amostra foi preparada por decomposição ácida assistida por microondas. As condições operacionais do equipamento GF AAS eram adequadas para a leitura do metal de escolha, o cobre.

3.7 DETECÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

3.7.1 Detecção “in situ” da formação de ânion superóxido

Para avaliar se a sobrecarga crônica de cobre favorece a formação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), foi utilizada a fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídio (DHE) como um marcador específico do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O DHE é um derivado do etídio, o qual permeia livremente as células e se liga ao DNA, quando na presença do $O_2^{\cdot-}$, reage e é convertido em fluoresceína com consequente emissão de luz de coloração vermelha a 610 nm.

Após a realização da avaliação da contratilidade com o músculo isolado, os papilares foram mantidos por 1 h em solução de *Krebs-Hepes* (em mM: 130 NaCl; 5,6 KCl; 2 CaCl₂; 0,24 MgCl₂; 8,3 HEPES; e pH 7,4) contendo sacarose a 30%. Em seguida, os músculos papilares foram armazenados em Tissue-Tek O.C.T. e congelados em $-80^{\circ}C$ até o dia do experimento.

Os tecidos congelados foram cortados em criostato secções de 10 μm de espessura e colocados em uma lâmina de vidro gelatinizada, as quais foram secas em estufa à $37^{\circ}C$. Em seguida, as secções seriais foram mantidas em condições idênticas por 30 min a $37^{\circ}C$ em tampão *Krebs-HEPES*, a solução foi escorrida e o excesso seco. Um tampão fresco contendo DHE (2 μM) foi aplicado topicamente em cada seção de tecido, coberto com uma lamínula, incubado por 30 min em uma câmara umidificada e protegida da luz a $37^{\circ}C$. As imagens de ambos os grupos foram digitalizadas por um microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500) usando filtro 568 nm e fotografadas com uma câmera Leica DFC 310 FX. Amostras de cinco segmentos de tecido congelado por animal foram usadas para cada condição experimental e a média foi calculada para quantificação. As densidades médias de fluorescência na região alvo foram calculadas usando o software ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, EUA).

3.7.2 Detecção “in situ” da formação de radical hidroxila

Para investigar se a sobrecarga crônica de cobre favoreceu a formação de radical hidroxila (OH^{\cdot}), foi utilizada a fluorescência de hidroxifenil fluoresceína (HPF). O HPF na presença de OH^{\cdot} reage e é convertido em fluoresceína com consequente emissão de luz verde a 610 nm.

Os protocolos de preparação das lâminas contendo as amostras dos músculos papilares do ventrículo esquerdo para a análise histológica, obtenção e quantificação das imagens de luminescência foram descritos no item anterior. As lâminas contendo as secções das amostras foram incubadas com *Krebs*-HEPES e mantidos em estufa à 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida a solução foi escorrida e o excesso foi seco. Posteriormente, foi feita a incubação com HPF 10 µM por 2 horas em estufa a 37°C, em câmara protegida da luz, conforme descrito por Setsukinai *et al.* (2003).

As imagens de luminescência foram digitalizadas por um microscópio de fluorescência Leica DM 2500 equipado com uma câmera Leica DFC 310 FX. As mesmas configurações foram utilizadas em ambos os grupos experimentais. Amostras de cinco segmentos de tecido congelado por animal foram usadas para cada condição experimental e a média foi calculada para quantificação. A quantificação das imagens foram calculadas usando o software ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, EUA).

3.8 EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO CICLO DO CÁLCIO

Para avaliar se a sobrecarga de cobre altera a expressão de proteínas envolvidas na regulação da contratilidade miocárdica, foi utilizada a técnica de Western blot. Foram mensuradas as expressões das seguintes proteínas: Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2a); fosfolambam (PLB); fosfolambam fosforilado na serina-16 (fosfo-Ser¹⁶-PLB), trocador Na⁺/Ca²⁺ e a subunidade α-1 da Na⁺/K⁺-ATPase (NKA).

3.8.1 Preparação e quantificação total das proteínas

As amostras de ventrículo esquerdo foram coletadas, rapidamente congeladas e mantidas a -80°C até o momento da extração das proteínas. A extração de proteínas foi realizada a partir da trituração e homogeneização das amostras em banho de gelo, com solução tampão de lise RIPA, acrescido de inibidores de protease, NaVO₃ 1 mM, NaF 10 mM e DTT 0,5 mM. A seguir, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf NeitheirHinz, GmbH22331, Alemanha) a 4°C a 12.000 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido e o precipitado descartado. A concentração de proteínas no sobrenadante foi pelo método de Bradford (1976), através de espectrofotometria (Fotômetro Bioquímica, Bio 2000,

Brasil), com amostras previamente diluídas 1:50 em água deionizada. Uma vez quantificada, foram feitas alíquotas contendo 20 ou 80 µg de proteína de cada amostra, que, então foram armazenadas a -80° C.

3.8.2 Eletroforese e transferência das amostras

No dia do experimento, foi acrescida às alíquotas solução de Laemmli (Uréia 0,5 mM; SDS 0,17 mM; DTT 39 µM; Tris-HCl 0,01 M pH=8 e azul de bromofenol 0,5 %), seguida de homogeneização com vórtex e centrifugação a 6000 rpm por dois minutos. Essas amostras foram então aplicadas em gel TGX Stain Free (Bio-rad). Para melhor separação de acordo com o peso da proteína de interesse, para a investigação do PLB e sua forma fosforilada, foram utilizados géis de 12% de acrilamida, e para as demais proteínas, géis de 10% de acrilamida. Após o carregamento das amostras e de um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein Unstained Standards, Bio-rad, California, EUA), as proteínas foram submetidas à eletroforese durante 2 horas e 30 minutos a 4°C com voltagem constante de 80 V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura), submersas em tampão de corrida (Tris Base 25 mM, Glicina 190 mM, SDS 0,1%, pH 8,4), até que as amostras percorressem todo o gel.

Após a eletroforese, os géis foram ativados por um minuto por luz UV através do transiluminador ChemiDoc XRS+ e uma foto foi obtida para a quantificação da proteína total de cada amostra que foi carregada no gel. Os géis foram então equilibrados em solução de transferência (Tris Base 25 mM, Glicina 190 mM e metanol 20%, pH 8,4), durante 10 minutos. As proteínas foram, então, transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, UK) previamente ativada com água durante 20 segundos e equilibrada em solução de transferência por 10 minutos. Foi feita uma transferência líquida, à voltagem constante de 25 V, durante 16 horas, à temperatura de 4° C.

3.8.3 Incubação com anticorpos

Para evitar a união inespecífica com reativos não imunológicos, após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 2 horas com solução de bloqueio (leite desnatado 5% ou albumina de soro bovino 3%, Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, tween-20 0,1%, pH 7,5) à temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em uma solução

a 5% de albumina com tampão TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%, pH 7,5), sob agitação, até o dia seguinte. Os anticorpos primários incubados (isoladamente) foram:

- SERCA-2a: anticorpos monoclonais de camundongo anti-SERCA2 ATPase, 1:1000, Thermo Scientific, Rockford, EUA.
- Fosfolambam: anticorpo monoclonal de camundongo anti-PLB, 1:1000 Santa Cruz, California, EUA.
- Fosfo-Ser¹⁶-fosfolambam: anticorpo policlonal de coelho anti-fosfo-Ser¹⁶-PLB, 1:1000, Badrilla, West Yorkshire, RU.
- Trocador Na⁺/Ca²⁺: anticorpos monoclonais de cabra anti-NCX, 1:1000, Thermo Scientific, Rockford, EUA.
- Na⁺/K⁺-ATPase: anticorpo monoclonal de rato anti- α -1-NKA, 1:500, Santa Cruz, California, EUA.

Após o período de incubação, as membranas foram lavadas com uma solução TBS-T para remoção do excesso dos anticorpos primários durante trinta minutos, com troca de solução a cada 5 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários conjugados com peroxidase, de acordo com a fonte do anticorpo primário utilizado: imunoglobulina IgG anti-camundongo, anti-coelho ou anti-cabra (1:5000, Sigma Aldrich) e streptactina conjugada com peroxidase (1:5000, Bio-rad, California, EUA), para a revelação do padrão de peso molecular, em solução de bloqueio, durante 1 hora. Após a incubação, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos com a solução TBS-T, para remoção do excesso de anticorpo secundário e por mais 10 minutos com a mesma solução sem tween-20.

3.8.4 Detecção das proteínas

As proteínas foram detectadas pela reação de quimioluminescência através da exposição da membrana a um sistema de detecção (ECL Plus, Amersham™, GE Healthcare, UK) e foram registradas por transiluminador ChemiDoc XRS+ (Bio-rad, California, EUA), com exposição otimizada pelo aparelho. A análise densitométrica foi utilizada para quantificar as bandas das proteínas utilizando-se o software Image Lab 6.1 (Bio-rad, California). Os resultados das densitometrias de cada banda da

proteína de interesse foram normalizados pela quantificação da proteína total de cada amostra, obtida pela estimulação com luz UV.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Os valores de “n” representam o número de animais utilizados em cada protocolo experimental.

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando o teste *t* de Student não pareado e/ou análise de variância (ANOVA) uma ou duas vias. Quando a análise de variância apresentava significância, esta era seguida pelo pós-teste de Fisher para comparação das médias. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

A análise dos dados e dos gráficos das figuras foram realizadas utilizando o GraphPad Prism System (San Diego, CA, USA) e o GB-STAT (Dynamic Microsystem Inc., Silver Spring, MD, USA).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO PONDERAL

4.1.1 Avaliação ponderal dos animais

O peso dos animais foi registrado antes do início do tratamento (peso inicial) e semanalmente até completar 30 dias de tratamento (peso final). A tabela 1 apresenta as medidas dos pesos médios semanais dos animais. A avaliação do peso corporal era similar entre os grupos (controle e cobre) no início do tratamento. Após a exposição ao metal, a partir da primeira semana de tratamento, foi possível observar variações no ganho de peso entre os grupos. E ao final dos 30 dias de exposição ao cobre, os animais tratados com cobre (Cu) apresentaram um menor ganho de peso em relação ao peso inicial, comparados ao grupo controle (Ct).

Tabela 1: Parâmetros ponderais dos ratos tratados e não-tratados com cobre.

	Peso inicial	Peso na 1ª semana (g)	Peso na 2ª semana (g)	Peso na 3ª semana (g)	Peso na 4ª semana (g)
Ct (n=8)	273± 9,1	306 ± 9,4	342 ± 12,2	375 ± 15,3	399 ± 15,9
Cu (n=12)	275 ± 7,8	246 ± 8,3*	288 ± 8,2*	305 ± 8,7*	321 ± 12,7*

Avaliação do peso corporal entre os grupos controle (Ct) e cobre (Cu) antes do início do tratamento e durante as subsequentes semanas de exposição. * $P < 0,05$ vs Ct. ANOVA 2 vias seguido do pós teste de Fisher.

4.1.2 Avaliação ponderal dos órgãos

A tabela 2 exhibe os pesos dos órgãos dos animais de ambos os grupos ao final dos 30 dias de exposição ao cobre. O coração, fígado, pulmão, rim direito e esquerdo e a tíbia dos animais expostos à sobrecarga de cobre são proporcionalmente menores do que os dos animais controle. Vale destacar que, o peso absoluto do coração e a sua correlação com o comprimento da tíbia foi

proporcionalmente menor no grupo cobre e, assim demonstrou que não houve hipertrofia cardíaca no grupo tratado com cobre (Tabela 2).

Tabela 2: Parâmetros ponderais dos órgãos dos animais controle e tratados.

	Ct (n=9)	Cu (n=10)
Coração (mg)	926,7 ± 52,2	712 ± 61,42*
Fígado (mg)	1610,2 ± 137,3	1340,4 ± 188,4*
Pulmão (mg)	1623,3 ± 156,9	1428 ± 152,7 *
Rim direito (mg)	1444,4 ± 126	1114 ± 117,9 *
Rim esquerdo (mg)	1453,3 ± 128,4	1141 ± 93,98 *
Tíbia (mm)	38,5 ± 0,88	36,1 ± 1,19 *
Relação coração (mg)/ Tíbia (mm)	23,5 ± 1,42	19,4 ± 1,71 *

Avaliação do peso dos órgãos entre os grupos controle (Ct) e cobre (Cu) após o tratamento com cobre. * $P < 0,005$ vs Ct. Teste t de student não pareado.

4.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE SANGUÍNEA E TECIDUAL

No intuito de averiguar a eficácia do tratamento em promover um modelo de sobrecarga crônica de cobre, ao final dos 30 dias de tratamento foram coletadas amostras de sangue e tecidos para dosagem espectrométrica da concentração de cobre. Os animais do grupo tratado apresentaram a concentração sanguínea total de cobre de aproximadamente 1,26 µg/mL, valor aproximadamente 52 vezes maior do que o grupo Ct, o qual apresentou a concentração aproximada de 0,024 µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3: Dosagem sanguínea de cobre.

Dosagem sanguínea de cobre			
	$\mu\text{g/mL}$	N	P
Ct	0,024 \pm 0,01	9	0,0001
Cu	1,26 \pm 0,56*	9	0,0001

Grupo controle (Ct) e Grupo tratado com cobre (Cu). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. N representa o número da amostra. Teste t de Student não-pareado.

Na tabela 4 está representada a deposição de cobre nos tecidos avaliados: Coração, aorta, fígado, cérebro, pulmão, tíbia, rim direito (D) e esquerdo (E). O acúmulo de cobre foi maior no fígado, tíbia e rins dos animais expostos à sobrecarga crônica de cobre em comparação ao grupo Ct. No coração, pulmão, aorta e cérebro a concentração de cobre foi similar entre os grupos. Deste modo, de acordo com a tabela 4, o sítio de maior acúmulo do metal, em concentração por massa, é o fígado seguido pelos rins e tíbia.

Tabela 4: Dosagem tecidual de cobre ($\mu\text{g g}^{-1}$).

	Ct	N	Cu	N	P
Coração	22,42 \pm 1,22	12	19,49 \pm 1,17	9	0,1
Aorta	5,28 \pm 4,27	5	1,85 \pm 0,29	5	0,44
Fígado	11,89 \pm 0,22	8	243,4 \pm 68,67*	9	0,0064
Cérebro	7,68 \pm 0,28	10	8,19 \pm 0,23	10	0,18
Pulmão	6,05 \pm 0,31	10	5,65 \pm 0,3	10	0,37
Tíbia	0,471 \pm 0,06	9	1,41 \pm 0,11*	10	0,0001
Rim D	39,76 \pm 2,88	9	57,01 \pm 6,83*	10	0,039
Rim E	43,17 \pm 4,2	11	72,31 \pm 10,92*	8	0,012

Grupo controle (Ct) e Grupo tratado com cobre (Cu). Os valores estão expressos como média \pm erro padrão da média. N representa o número da amostra. Teste t de Student não-pareado. Os valores de *P* estão descritos na tabela.

4.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL COM O ANIMAL ACORDADO

Foi realizada a medida da PA com o animal acordado por pletismografia de cauda. Ao final do tratamento, os animais tratados apresentaram aumento da PAS em comparação ao Ct, como demonstra a figura 13. A PAS antes do início do tratamento foi semelhante em ambos os grupos, $121 \pm 6,7$ mmHg e $122 \pm 4,1$ mmHg (N=8; *P* > 0,05), para o Ct e Cu respectivamente. No entanto, a partir da primeira semana de tratamento, somente o grupo Cu apresentou aumento na PAS em. A PAS dos animais tratados manteve-se elevada ao longo das semanas seguintes. E, ao final dos 30 dias de exposição ao cobre, os valores da PAS foi $132 \pm 3,1$ mmHg e $141 \pm 3,0$ mmHg, respectivamente, para o Ct e Cu.

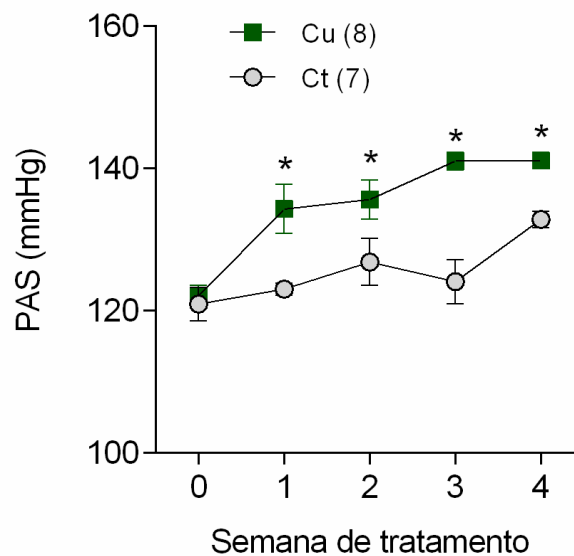


Figura 13: Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS) nos ratos Wistar tratados com cobre (Cu) e ratos controle (Ct) ao longo dos 30 dias de exposição ao metal. Os resultados estão expressos em média \pm EPM. ANOVA 2 vias seguida de pós teste de Fisher. **P* < 0,05 vs mesmo período de exposição no grupo controle Ct.

4.4 AVALIAÇÃO HEMODINÂMICA

Após 30 dias de exposição ao metal, foram avaliados os parâmetros arteriais e o desempenho ventricular *in vivo* pela medida direta dos animais.

Tabela 5: Parâmetros hemodinâmicos arteriais e ventriculares dos animais.

	Ct	N	Cu	N	P
PAS (mmHg)	106 ± 10,10	16	122 ± 8,19*	19	0,0001
PAD (mmHg)	62 ± 7,36	16	76 ± 14,37*	19	0,001
PAM (mmHg)	78 ± 8,06	16	95 ± 12,02*	18	0,0001
PSVE (mmHg)	119 ± 10,86	6	149 ± 16,75*	10	0,003
PDfVE (mmHg)	1,34 ± 0,82	6	3,09 ± 1,60	9	0,0431
dP/dt + VE (mmHg/s)	6626 ± 1102	6	8969 ± 1598*	10	0,0119
dP/dt - VE (mmHg/s)	-3761 ± 657	6	-5685 ± 1534*	10	0,0202
FC (bpm)	297 ± 32	15	325 ± 35*	18	0,0278

Pressão Arterial Sistólica (PAS); Pressão Arterial Diastólica (PAD); Pressão Arterial Média (PAM); Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE); Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDfVE); derivada temporal de pressão do ventrículo esquerdo positiva (dP/dt + VE) e negativa (dP/dt - VE); e frequência cardíaca (FC). Controle (Ct); Grupo tratado com cobre (Cu); Número da amostra (N). Os resultados estão expressos em média ± EPM. Teste *t de Student* não-pareado.

A sobrecarga crônica de cobre aumentou os parâmetros pressóricos arteriais, ventriculares e a FC dos animais do grupo tratado, como demonstrado na tabela 5. Observa-se que o tratamento com o cobre promoveu aumento aproximado de 15 mmHg na PAS e na PAD. A FC do grupo tratado mostrou-se elevada em relação ao Ct em aproximadamente 30 bpm.

Quanto à avaliação do desempenho ventricular esquerdo, a tabela 5 evidenciou que a sobrecarga de cobre foi capaz de elevar a PSVE em aproximadamente 30 mmHg em relação ao Ct. Também ficou evidente o aumento

nas derivadas temporais de pressão positiva ($dP/dt+$) e negativa ($dP/dt-$) do ventrículo esquerdo, as quais representam um índice de contratilidade e de relaxamento, respectivamente.

4.5 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

4.5.1 Avaliação ponderal dos papilares

Ao final de todos os protocolos experimentais realizados *in vitro* o peso dos músculos papilares úmidos de ambos os grupos experimentais foi obtido. Conforme demonstrado na figura 14, o tratamento por 30 dias com a sobrecarga de cobre não promoveu alteração do peso dos músculos papilares do ventrículo esquerdo dos animais.

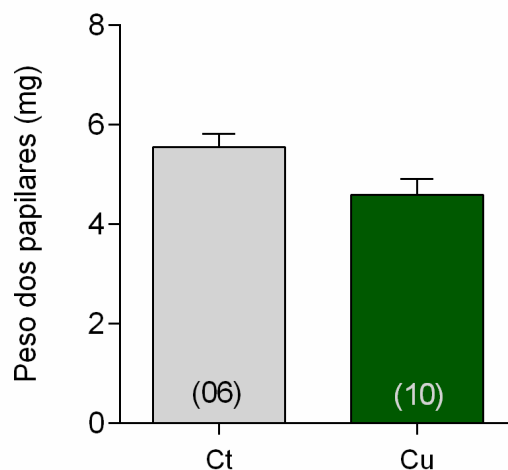


Figura 14: Peso úmido dos músculos papilares do ventrículo esquerdo dos grupos controle (Ct) e tratado com cobre (Cu). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. $P > 0,05$. Teste *t de Student* não-pareado.

4.5.2 Avaliação da força de contração isométrica e cinética contrátil

Os efeitos da sobrecarga crônica de cobre sobre a força contrátil de músculos papilares do VE estão demonstrados na figura 15. Assim como a PA e a PSVE (tabela 5), a força contrátil desenvolvida pelos músculos papilares isolados foi maior no grupo tratado com cobre quando comparadas ao grupo controle (Figura 15 A). A figura 15 B mostra que, apesar de haver aumento na força isométrica dos músculos

papilares dos animais tratados com cobre, a tensão de repouso exercida pelos músculos papilares permaneceu inalterada entre os grupos experimentais.

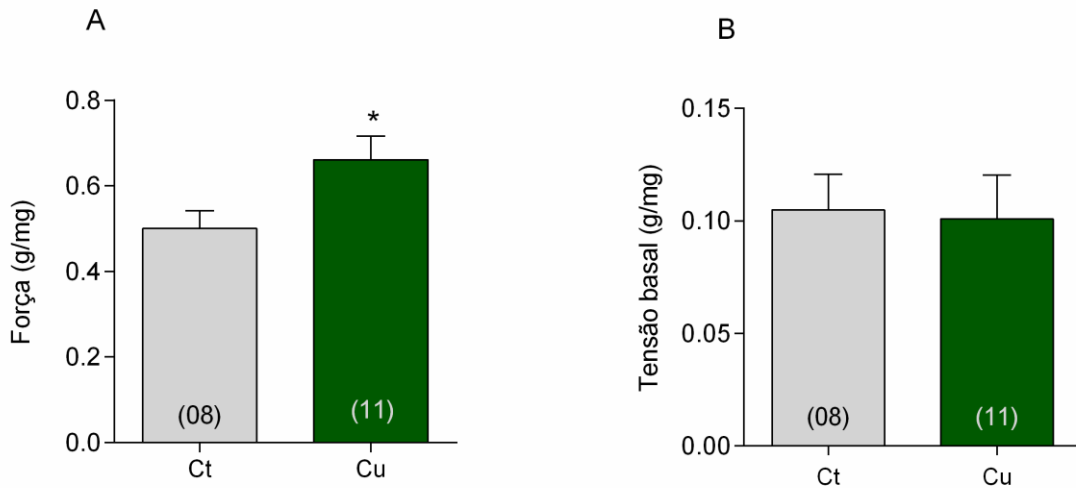


Figura 15: (A) Força isométrica desenvolvida e (B) tensão basal dos músculos papilares de VE dos ratos dos grupos controle (Ct) e tratados com cobre (Cu). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs Ct. Teste t de Student não-pareado.

Ao avaliar os índices de contratilidade e relaxamento, observados pelas dF/dt positivas e negativas (Figura 16 C e D) a sobrecarga de cobre não modificou estes parâmetros inotrópicos. Esses achados não apresentaram alterações, pois os parâmetros temporais de contração, tempo de ativação (Figura 16 A) e de relaxamento (Figura 16B) foram mais longos no grupo Cu em comparação ao Ct.

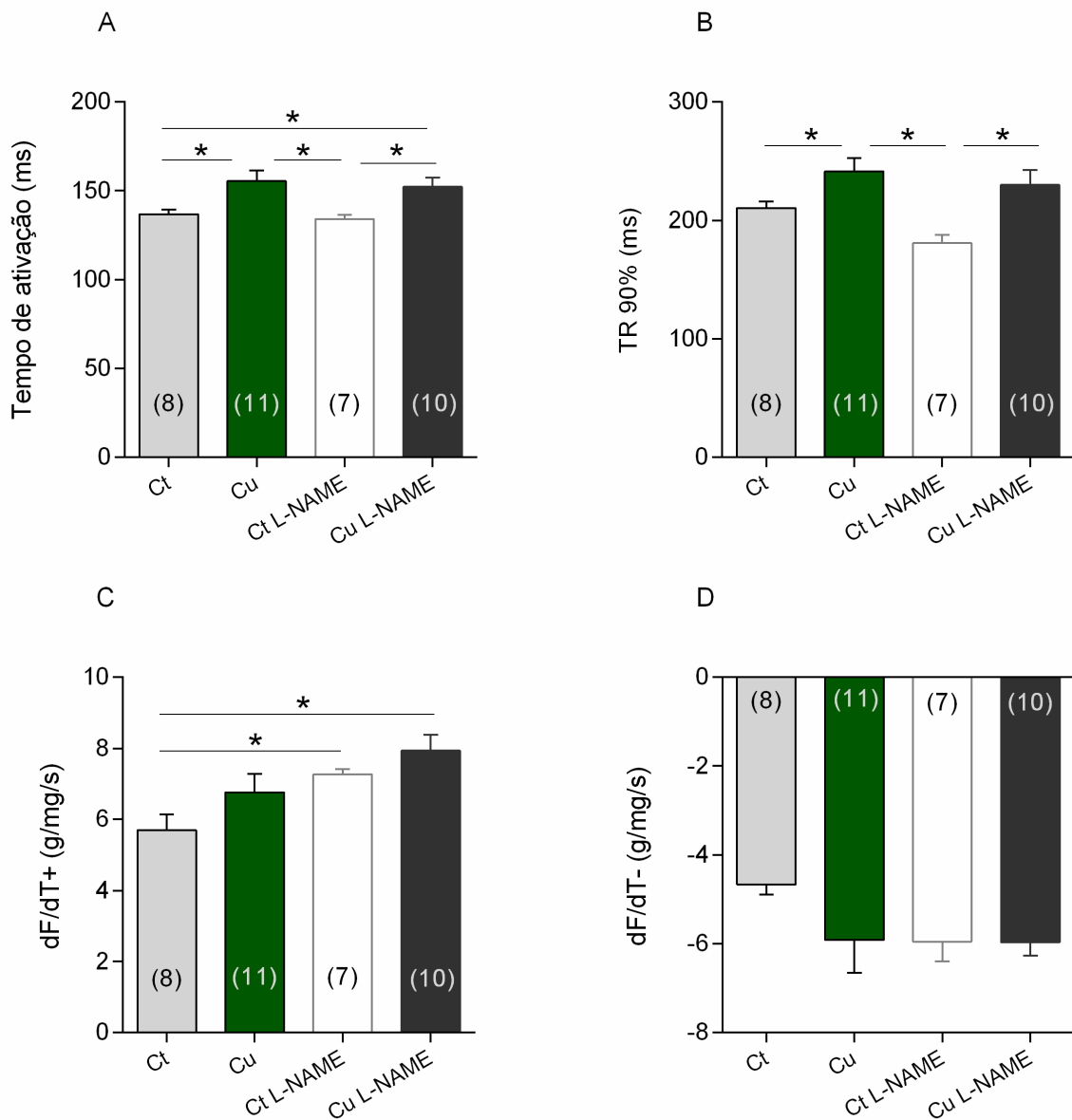


Figura 16: Avaliação, *in vitro*, dos parâmetros temporais da contração, tempo de ativação (A) e relaxamento (B) e das derivadas positivas (C) e negativas (D) da força de contração de músculos papilares de VE de ratos dos grupos controle (Ct) e tratado (Cu). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs Ct. Teste *t de Student* não-pareado

4.5.3 Avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático

A figura 17 mostra que a sobrecarga crônica de cobre resultou na redução da PPP após a pausa de 30 e 60 segundos, sugerindo menor liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático.

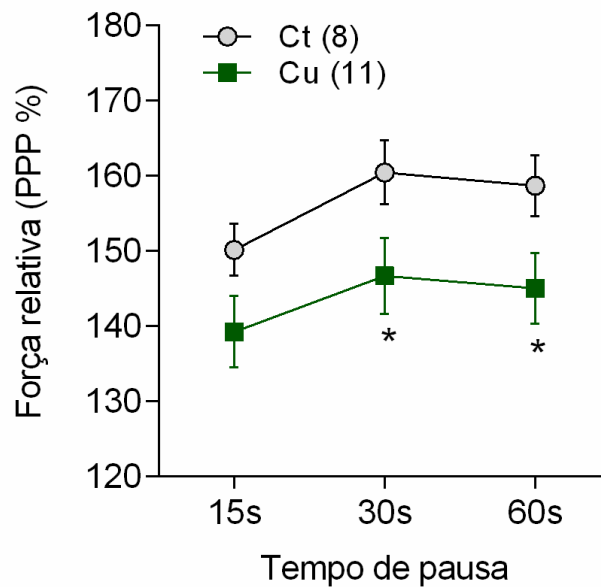


Figura 17: Avaliação das potenciações relativas após pausas de 15, 30 e 60 segundos em músculos papilares de Ventrículo Esquerdo, *in vitro*, de ratos dos grupos controle (Ct) e tratados com cobre (Cu). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs Ct. Anova duas vias seguida de pós teste de Fisher.

4.5.4 Avaliação da resposta inotrópica frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular

A Figura 18 demonstra que quanto maior a concentração de cálcio, maior a força desenvolvida pelos músculos papilares em ambos os grupos experimentais. Entretanto, a resposta contrátil dos papilares tratados com cobre foi maior em comparação com o Ct. Essa descoberta corrobora os resultados da figura 15 A, em que demonstra o aumento da força contrátil do grupo tratado.

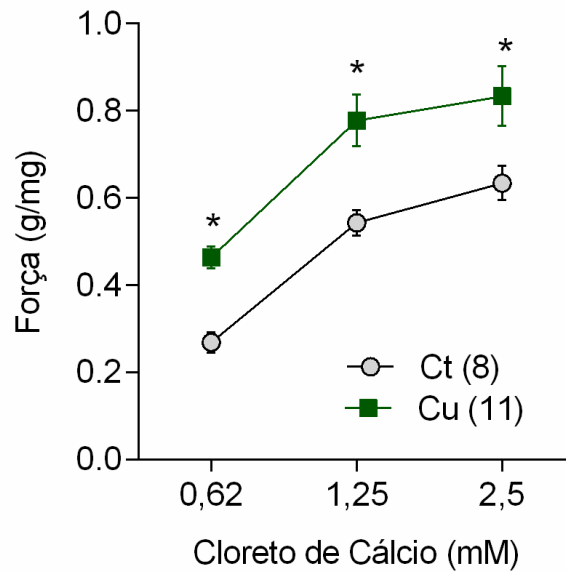


Figura 18: Avaliação da força contrátil de músculos papilares de VE, *in vitro*, de ratos dos grupos controle (Ct) e tratados (Cu) frente a diferentes concentrações de cálcio extracelular. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs Ct para a mesma concentração de cálcio. Anova duas vias seguida de pós teste de Fisher.

4.5.5 Avaliação indireta do influxo de cálcio transsarcolemal

A figura 19 demonstrou que a sobrecarga crônica de cobre promoveu aumento na PRC em relação ao Ct, sugerindo um aumento no influxo de cálcio transsarcolemal após o tratamento.

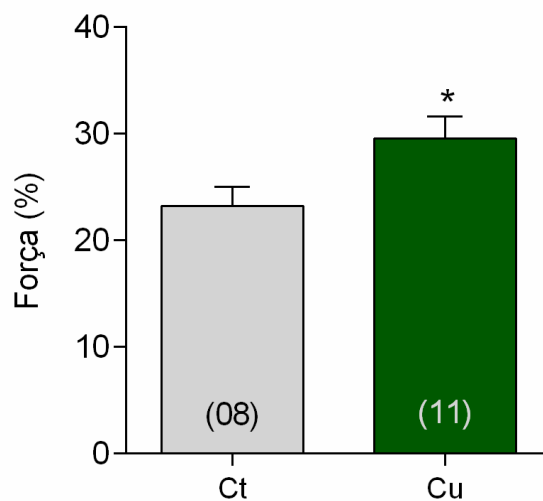


Figura 19: Avaliação indireta do influxo de cálcio transarcolel avaliado pela “*post rest contraction*” (PRC) de músculos papilares de VE, *in vitro*, de ratos dos grupos controle (Ct) e tratado (Cu). A força foi calculada como a porcentagem da força de contração após a pausa e a estabilizada anteriormente ao início da realização da intervenção. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs Ct. Teste *t* de Student não-pareado.

4.5.6 Avaliação da resposta contrátil frente à estimulação β -adrenérgica

Para avaliar outro possível mecanismo regulador da contratilidade cardíaca foi utilizado o isoproterenol, um agonista β -adrenérgico não-seletivo, *in vitro*.

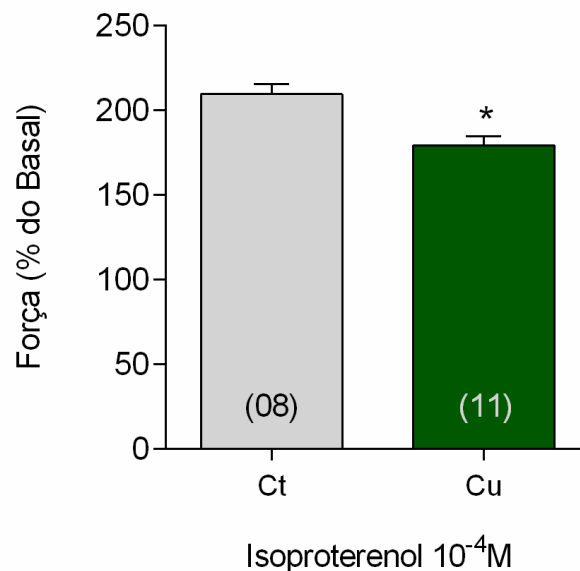


Figura 20: Avaliação da resposta inotrópica de músculos papilares de VE, *in vitro*, de ratos de grupo controle (Ct) e tratado com cobre (Cu). A variação na contratilidade foi calculada pela diferença entre os valores da resposta β -adrenérgica representada pelo valor percentual em ambos os grupos experimentais em relação ao valor basal. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como a média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs Ct. Teste *t* de Student não-pareado.

O isoproterenol promoveu um aumento na força desenvolvida pelos músculos papilares nos dois grupos experimentais. No entanto, a resposta inotrópica positiva expressa em porcentagem em relação às contrações no estado estacionário foi menor no grupo tratado com cobre (Figura 20). Esses achados sugerem que a

sobrecarga de cobre pode afetar a atividade ou os mecanismos reguladores dos receptores β -adrenérgicos, reduzindo a resposta inotrópica à estimulação simpática.

4.5.7 Avaliação das contrações tetânicas

No intuito de investigar o influxo de cálcio transsarcolemal e a sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} (LEITE et. al, 1995), foi realizado o protocolo das contrações tetânicas. Inicialmente ocorreu um súbito aumento de força dependente principalmente do influxo de Ca^{2+} no cardiomiócito, que corresponde ao pico (Figura 21 A) da contração tetânica. Em seguida formou-se o platô (Figura 21 B), com um aumento da força de contração desenvolvida no grupo tratado com cobre em comparação ao grupo controle. Esse achado corrobora os resultados descritos anteriormente no protocolo da curva de cálcio (Figura 18).

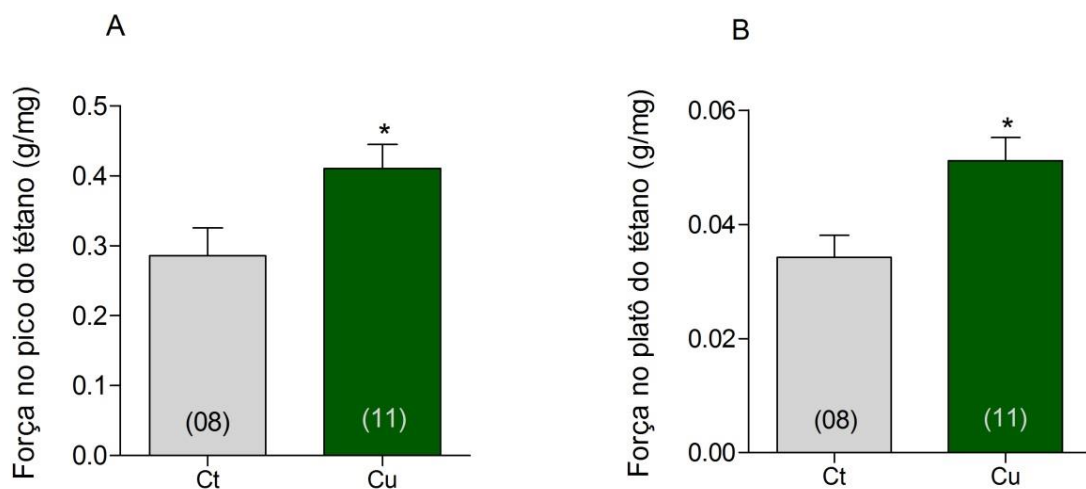


Figura 21: Avaliação da força de músculos papilares de VE, *in vitro*, de ratos dos grupos controle (Ct) e tratados com cobre (Cu) no pico (A) e no platô (B) das contrações tetânicas. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. * $P < 0,05$ vs Ct. Teste *t* de Student não-pareado.

4.6 AVALIAÇÃO DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA APÓS INCUBAÇÃO COM L-NAME

O efeito da modulação do óxido nítrico no estado inotrópico cardíaco é conhecido. O NO promove a fosforilação da troponina I pela proteína quinase C (PKG), diminuindo a afinidade da troponina C ao cálcio nos cardiomiócitos, com consequente redução da força contrátil. Além disso, a PKG também é capaz de suprimir o aumento da corrente de cálcio causada pela fosforilação dos canais de cálcio tipo L, modulando o estado inotrópico cardíaco (LAYLAND; LI; SHAH, 2002).

4.6.1 Avaliação ponderal, da força de contração isométrica e da cinética contrátil dos papilares antes e após incubação com L-NAME

A força dos músculos papilares após a incubação com L-NAME permaneceu aumentada nos grupos tratados com cobre em comparação com o grupo Ct (Figura 22 A). Esse resultado sugere que o NO não desempenha nenhum papel nos mecanismos de desenvolvimento da força de contração dos músculos papilares. Além disso, não houve diferença no desenvolvimento da força entre os grupos (Figura 22 B).

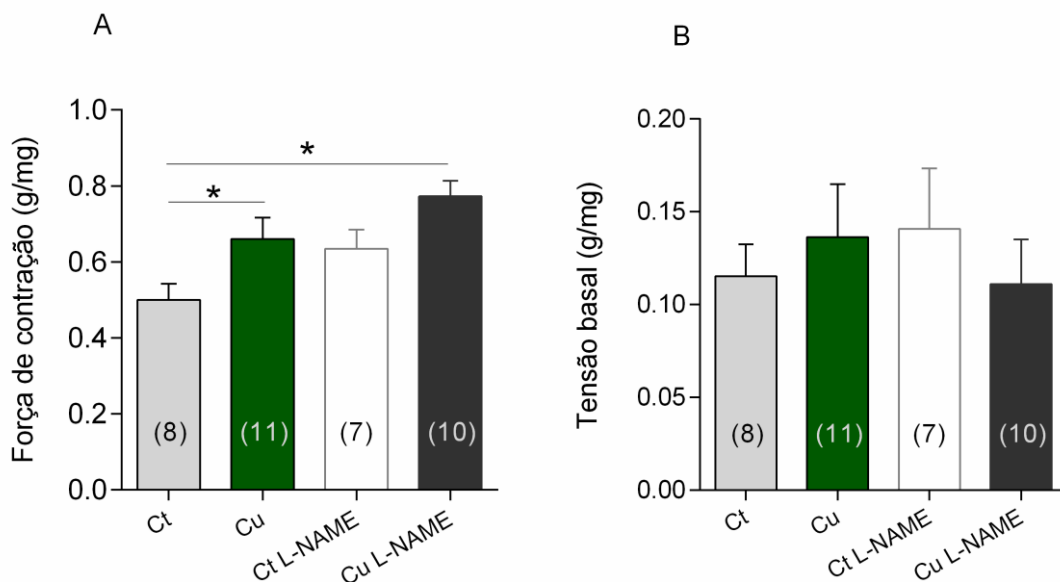


Figura 22: (A) Força de contração isométrica e (B) tensão basal desenvolvida pelos músculos papilares de VE dos ratos dos grupos controle (Ct) e tratado com cobre (Cu) antes (Ct e Cu) e após incubação com L-NAME (Ct L-NAME e Cu L-NAME). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. * $P < 0,05$. ANOVA 1 via seguido de pós teste de Fisher.

Avaliando os parâmetros de contratilidade e tempo de relaxamento, observamos que os tempos de ativação e relaxamento (Figura 23 A e B) permaneceram maiores no grupo tratado em comparação ao controle. E após a incubação com o L-NAME, o tempo de relaxamento não teve seu aumento impedido (Figura 23 B), assim como as derivadas temporais positiva e negativa (Figura 23 C e D) permaneceram inalteradas.

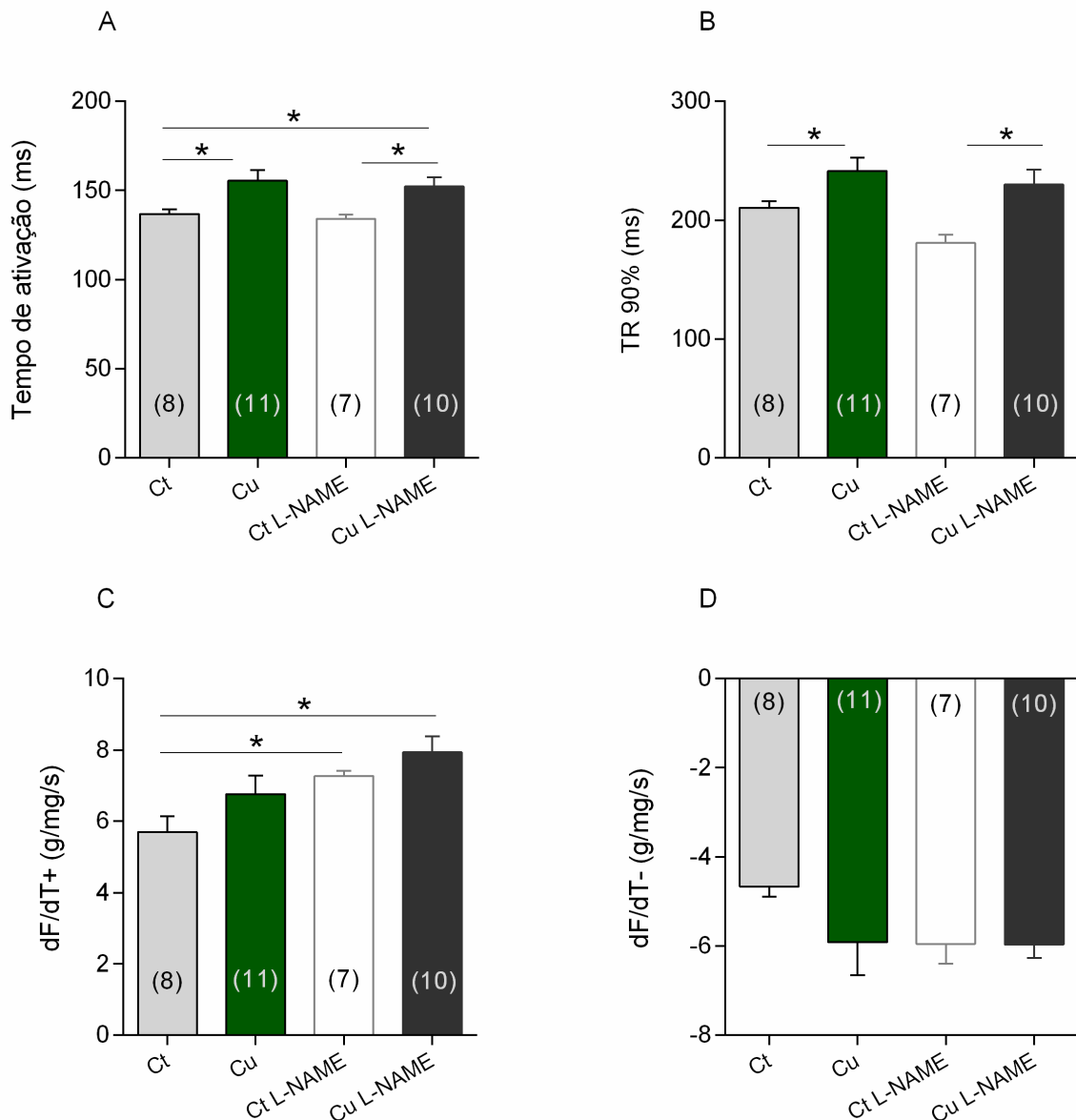


Figura 23: Avaliação, *in vitro*, de parâmetros temporais da contração, tempo de ativação (A) e relaxamento (B), e derivadas positivas (C) e negativas (D) de força de músculos papilares de VE dos ratos dos grupos controle (Ct) e tratado com cobre (Cu) antes (Ct e Cu) e após incubação com L-NAME (Ct L-NAME e Cu L-NAME). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. ANOVA 1 via seguido de pós teste de Fisher. * $P < 0,05$.

4.6.2 Avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático após incubação com L-NAME.

Após a sobrecarga crônica de cobre, as potenciações relativas foram reduzidas nas pausas de 30 e 60 segundos, sugerindo que há interferência do funcionamento do RS na presença do metal. Com o intuito de avaliar a participação do NO sobre a atividade do RS, de forma indireta, foi utilizado o L-NAME.

Observamos que os papilares dos animais tratados com cobre e os papilares incubados com L-NAME (Cu, Ct L-NAME e Cu L-NAME) apresentaram menor potenciação relativa após as pausas de 15, 30 e 60 segundos em comparação ao grupo controle (Figura 24). Os músculos papilares expostos ao cobre exibiram o mesmo comportamento daqueles incubados com L-NAME. Estes dados sugerem que o metal pode interferir no funcionamento do RS e que a redução no NO pode estar envolvida nesse mecanismo.

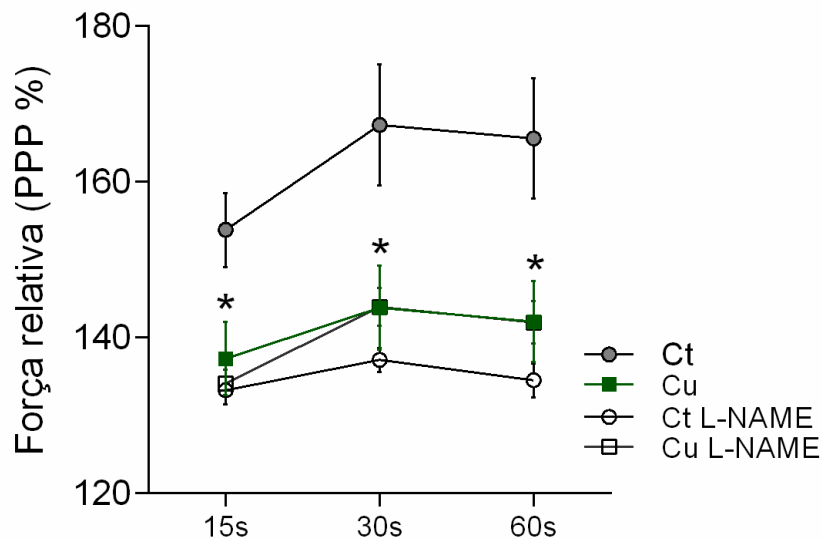


Figura 24: Avaliação das potenciações relativas após pausas (PPP) de 15, 30 e 60 segundos de músculos papilares de VE, *in vitro*, de ratos dos grupos controle (Ct) e tratado (Cu) antes (Ct e Cu) e após incubação com L-NAME (Ct L-NAME e Cu L-NAME). Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. Anova duas vias seguido de pós teste de Fisher. * $P < 0,05$ vs Ct.

4.6.3 Avaliação do óxido nítrico na resposta inotrópica frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular após incubação com L-NAME.

A sobrecarga de cobre aumentou a força de contração dos músculos papilares isolados na presença de diferentes concentrações de cálcio extracelular (Figura 25). Para avaliar a participação do NO sobre os mecanismos reguladores da contratilidade miocárdica frente a diferentes concentrações de Ca^{2+} , foi realizado o protocolo na presença de L-NAME. Após a incubação com L-NAME a força desenvolvida pelos músculos papilares manteve-se maior no grupo tratado com cobre na presença do L-NAME em comparação ao grupo controle em todas as concentrações de CaCl_2 (Figura 25).

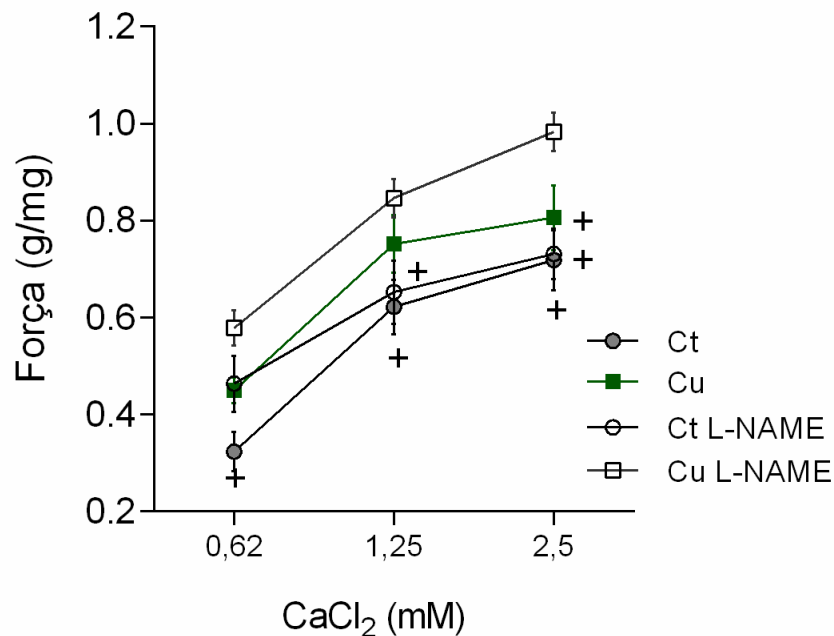


Figura 25: Avaliação, *in vitro*, da força de músculos papilares de VE de ratos dos grupos controle (Ct) e tratado (Cu) antes (Ct e Cu) e após incubação com L-NAME (Ct L-NAME e Cu L-NAME) frente a diferentes concentrações de cálcio extracelular. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. Anova duas vias seguido de pós teste de Fisher. + $P < 0,05$ vs Cu L-NAME.

4.6.4 Avaliação do óxido nítrico na contração pós-reposo de 10 minutos.

O L-NAME reduziu a resposta contrátil após repouso dos papilares de ambos os grupos aos parâmetros do grupo controle (Figura 26). Esses dados sugerem que o tratamento com cobre aumentou o influxo de Ca^{2+} transsarcolemal, elevando a resposta contrátil. No entanto, a resposta contrátil dos papilares expostos ao cobre foi reduzida aos valores do grupo controle após o bloqueio da síntese de NO.

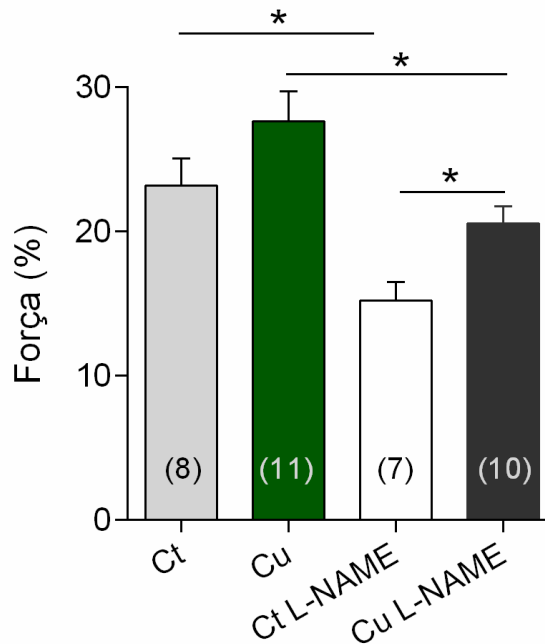


Figura 26: Avaliação indireta, *in vitro*, do influxo de cálcio transsarcolemal avaliado pela “*post rest contraction*” de músculos papilares de VE de ratos dos grupos controle (Ct) e tratado (Cu), antes (Ct e Cu) e após a incubação com L-NAME (Ct L-NAME e Cu L-NAME). A força foi calculada como a porcentagem da força de contração após a pausa e a estabilizada anteriormente ao início da realização da intervenção. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como Média \pm EPM. ANOVA 1 via seguido de pós teste de Fisher. * $P < 0,05$.

4.6.5 Avaliação do óxido nítrico na resposta β -adrenérgica.

Após a sobrecarga crônica de cobre, como mostra a figura 20, a resposta inotrópica ao isoproterenol foi reduzida, comparada ao grupo Controle. Para avaliar a participação do NO nos mecanismos de regulação cardíaca diante da estimulação simpática, foi realizado o protocolo com o agonista β -adrenérgico, o isoproterenol, na

presença do L-NAME. O L-NAME não restaurou os efeitos produzidos pelo tratamento crônico de cobre (figura 27).

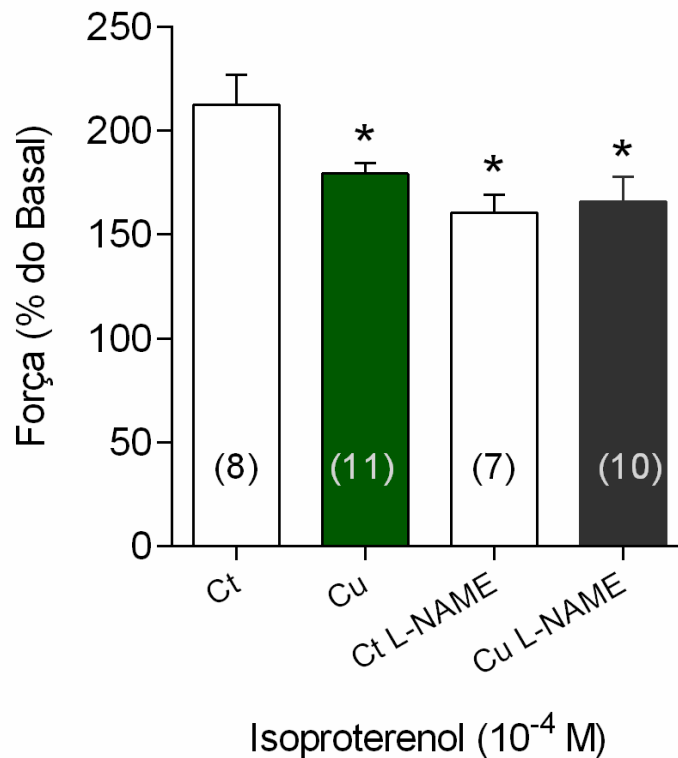


Figura 27: Avaliação da resposta inotrópica de músculos papilares de VE, *in vitro*, de ratos de grupo controle (Ct) e tratado com cobre (Cu) antes (Ct e Cu) e após (Ct L-NAME e Cu L-NAME) a incubação com o L-NAME. A variação na contratilidade foi calculada pela diferença entre os valores da resposta β -adrenérgica representada pelo valor percentual em ambos os grupos experimentais em relação ao valor basal. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. * $P < 0,05$ vs Ct. Os dados estão expressos como a média \pm EPM. ANOVA 1 via seguido de pós teste de Fisher.

4.6.6 Avaliação do óxido nítrico nas contrações tetânicas

A figura 21 mostra que a sobrecarga crônica de cobre promoveu aumento da resposta contrátil no pico e no platô nas contrações tetânicas. Os efeitos produzidos pela sobrecarga de cobre no pico das contrações tetânicas não foram modificados na presença do L-NAME (Figura 28). Além disso, a força desenvolvida no platô das contrações tetânicas pelos músculos papilares do grupo tratado com cobre não foi alterada, quando a síntese de NO foi inibida (Figura 28 B).

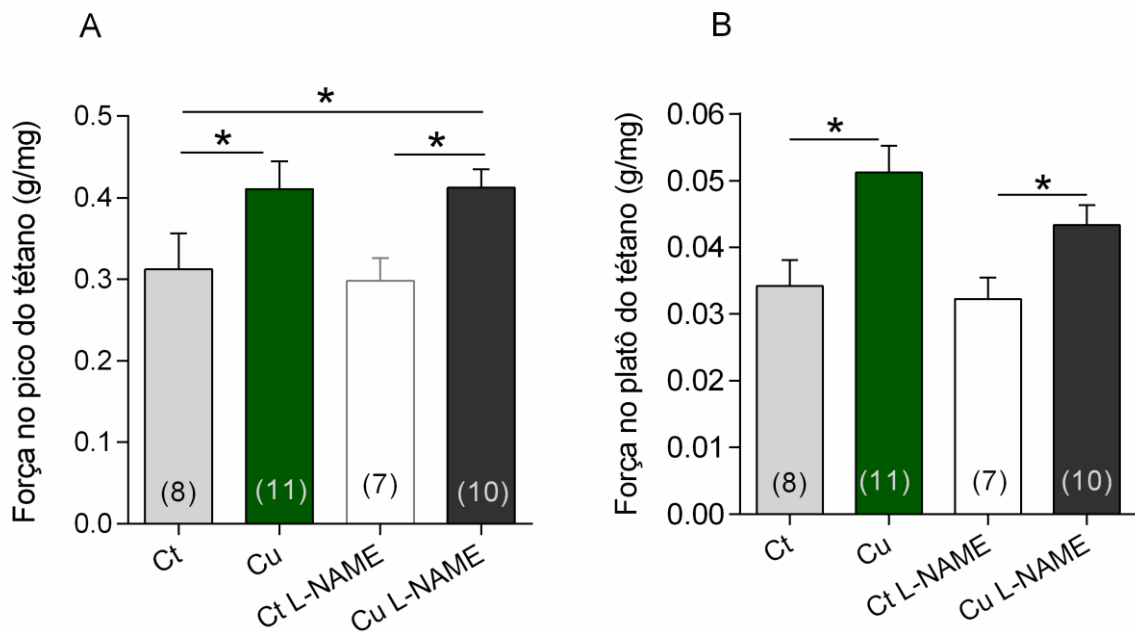


Figura 28: Avaliação, *in vitro*, da força de músculos papilares de VE de ratos dos grupos controle (Ct) e tratado com cobre (Cu) antes (Ct e Cu) e após (Ct L-NAME e Cu L-NAME) a incubação com o L-NAME, no (C) pico e no (D) platô das contrações tetânicas. Os números entre parênteses correspondem ao número de papilares estudados. Os dados estão expressos como a média \pm EPM. ANOVA 1 via seguido de pós teste de Fisher. * $P < 0,05$.

4.7 DETECÇÃO “IN SITU” DA FORMAÇÃO DE $O_2^{\bullet-}$ E OH^{\bullet}

Com a finalidade de investigar os efeitos da sobrecarga crônica de cobre local através da formação de radicais livres, foi realizada avaliação por imunofluorescência “*in situ*” para determinação da produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila (OH^{\bullet}), pela incubação com DHE e HPF, respectivamente.

A produção de $O_2^{\bullet-}$ “*in situ*” não foi diferente entre os grupos (Figura 29 A e B). Entretanto, o grupo tratado com cobre apresentou a produção “*in situ*” de OH^{\bullet} aproximadamente seis vezes maior do que o controle (Figura 29 C e D). Estes dados sugerem que o modelo de sobrecarga de cobre utilizado no presente estudo promoveu aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, aumentando o OH^{\bullet} e induzindo alterações cardiovasculares, corroborando os resultados funcionais encontrados.

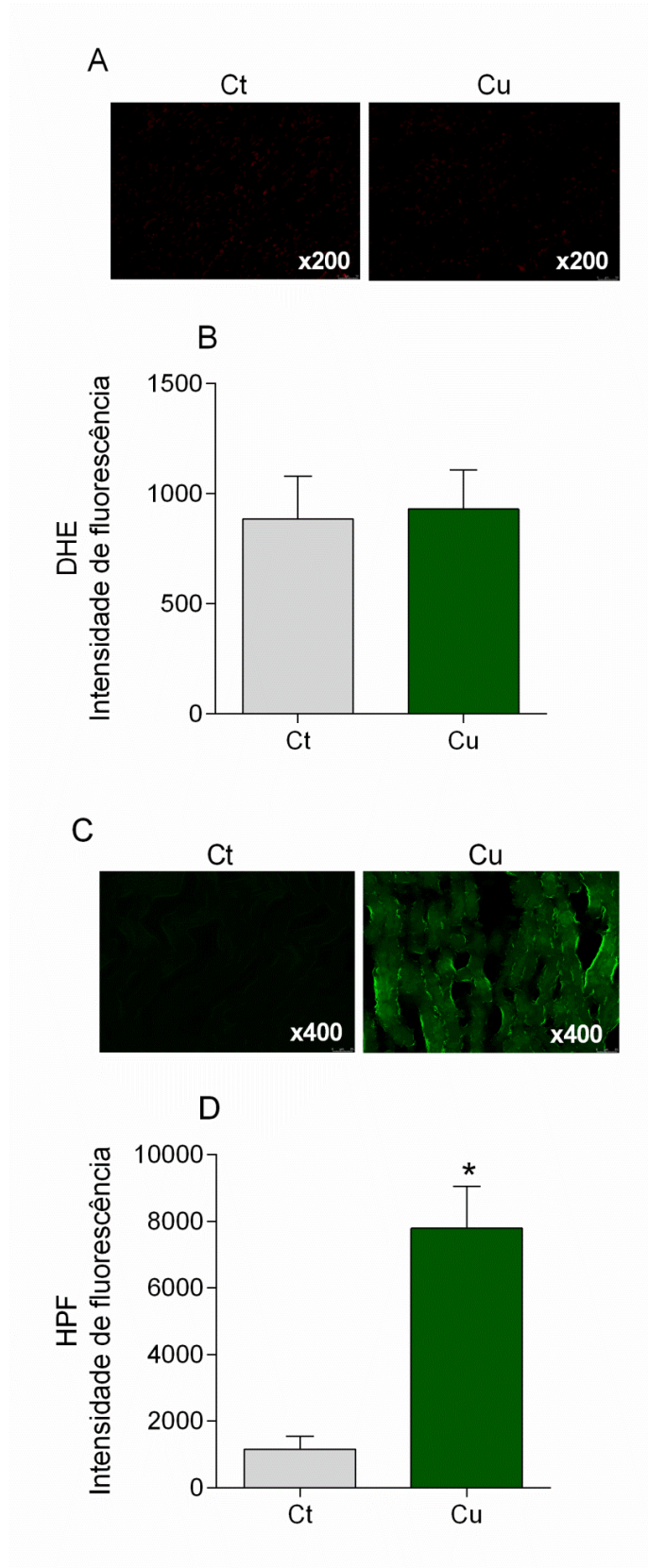


Figura 29: O tratamento com o Cobre aumentou o estresse oxidativo nos músculos papilares do VE. Avaliação da intensidade de fluorescência dos músculos papilares do VE dos animais controles (Ct) e

tratados (Cu) após incubação com (A) DHE e (B) HPF por análise microscópica (400X). (n=7 por grupo). Os valores foram expressos como a média \pm SEM. * $P < 0.05$ vs Ct.

4.8 BIOLOGIA MOLECULAR

Para investigar os efeitos do cobre nas proteínas reguladoras envolvidas no manuseio do cálcio, utilizamos a técnica Western Blot. A quantificação do NCX é ilustrada na figura 30, e demonstra que a sobrecarga crônica de cobre não alterou expressão desta importante proteína cardíaca nos animais estudados.

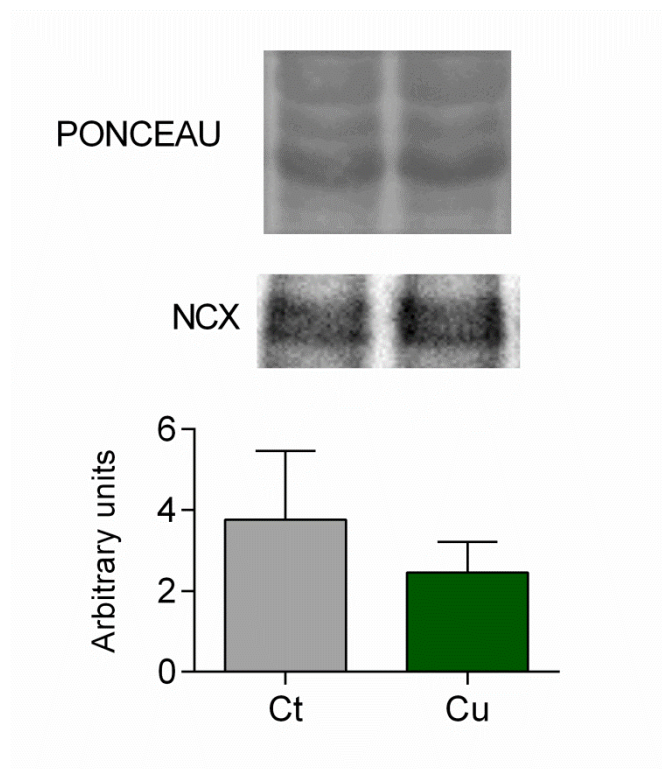


Figura 30: Avaliação da expressão protéica ventricular do trocador sódio/cálcio (NCX) de ratos dos grupos controle (Ct) e tratado (Cu). Na parte superior das figuras estão as bandas de Western blot representativas da expressão do NCX. Os resultados estão expressos como relação entre a área e a densidade do NCX e do GAPDH. $P > 0,05$. Teste *t* de Student não-pareado.

A Figura 31 mostra que a sobrecarga de cobre também não alterou a expressão das proteínas reguladoras da contratilidade cardíaca, SERCA 2, Na^+/K^+ -ATPase, PLB e pPLB.

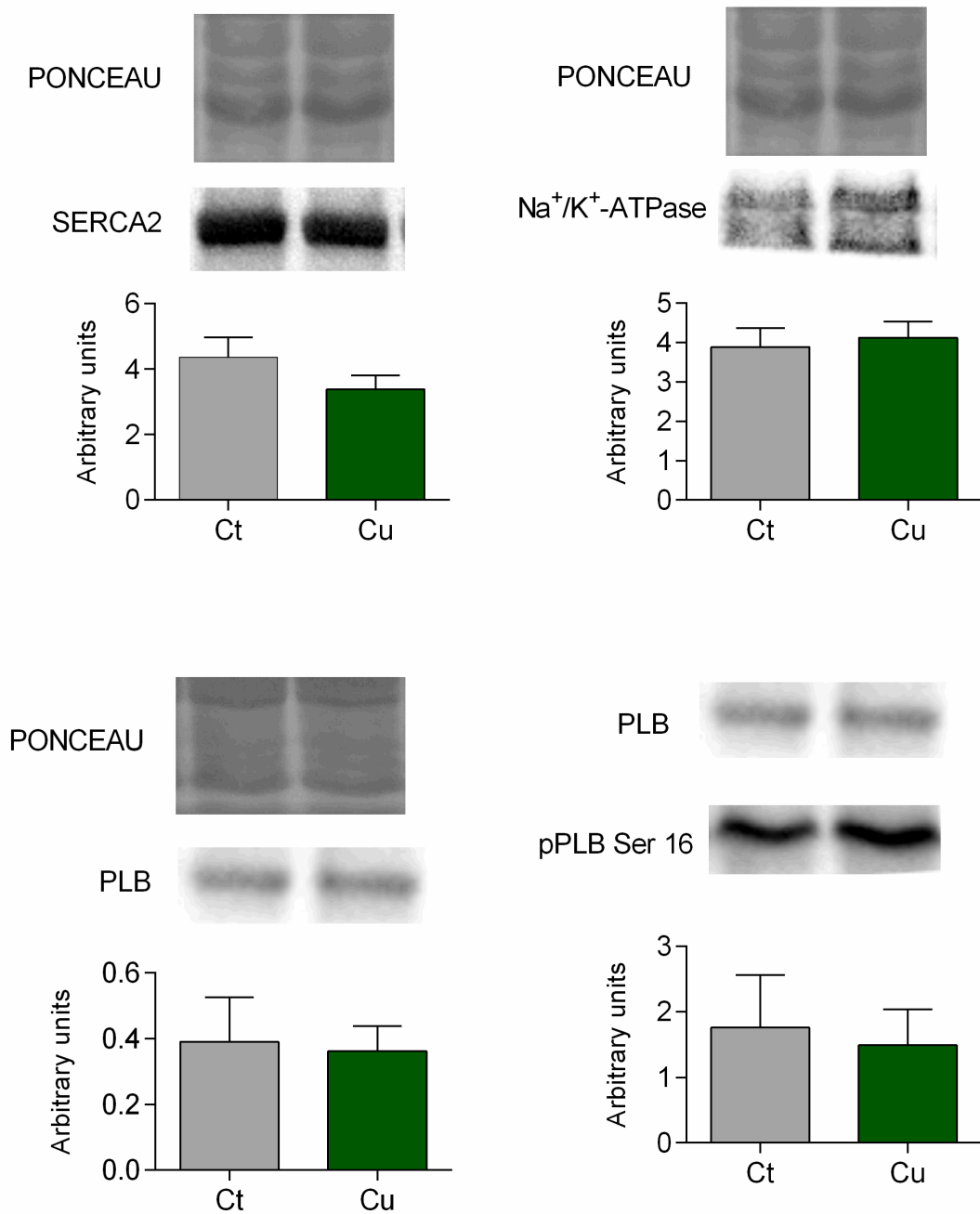


Figura 31: Avaliação da expressão protéica ventricular, (A) da bomba de cálcio do RS, SERCA 2a, da (B) subunidade α -1 da NKA, da (C) fosfolambam e a (D) razão fosfo-Ser¹⁶-PLB/PLB em ratos dos grupos controle (Ct) e tratado (Cu). Na parte superior das figuras estão as bandas de Western blot representativas da expressão das proteínas. $P > 0,05$. Teste t de Student pareado.

5 DISCUSSÃO

Nosso trabalho demonstrou que 30 dias de exposição a uma dose diária de cobre duas vezes maior à recomendada (ADELSTEIN; VALLEE, 1981; TRUMBO *et al.*, 2001; ATSDR, 2004; ANVISA, 2005), apesar de representar uma concentração sanguínea de cobre tolerável pelo organismo, pode aumentar a PA, PSVE, PDFVE, FC, *in vivo*, e o inotropismo cardíaco, *in vitro*. Ao final do tratamento a concentração total de cobre no sangue foi de 1,26 µg/L, cerca de 52 vezes maior que a do grupo controle, e o sítio de maior acúmulo do metal foi o fígado, prosseguido pelos rins e tibia. A avaliação contrátil, *in vitro*, demonstrou aumento no desenvolvimento da força dos músculos papilares do ventrículo esquerdo e sugere que há redução na liberação de Ca²⁺ pelo retículo sarcoplasmático e o NO parece estar envolvido nesses mecanismos. O tratamento com cobre foi capaz de reduzir a resposta inotrópica à estimulação β-adrenérgica e sugere maior influxo de cálcio transsarcolemal. O aumento da força pode ocorrer devido ao maior influxo de Ca²⁺, embora o RS tenha uma reserva menor deste íon e estes mecanismos parecem ser influenciados pela ação do NO. Nossos achados sugerem maior sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca²⁺ após exposição ao metal. O cobre aumentou o estresse oxidativo nos músculos papilares, aumentando a produção de OH[•] *in situ*. Nossos resultados mostraram que não houve evidências de hipertrofia cardíaca pela razão entre a massa cardíaca e o comprimento da tibia.

A ingestão diária recomendada de cobre é de 0,9 mg/dia em adultos (ADELSTEIN; VALLEE, 1981; TRUMBO *et al.*, 2001; ATSDR, 2004; ANVISA, 2005) e a dose máxima considerada ótima em adultos é 10 mg/dia de cobre (TRUMBO *et al.*, 2001). Já a European Commission and European Union Members Estates (2009) estabelece a IDR mínima de 1 mg e preconiza um limite máximo de 11 mg em adultos. Em nosso estudo, utilizamos uma dose de tratamento aproximadamente duas vezes maior (2 mg/kg/dia) que a IDR de cobre, pois nosso objetivo foi descrever os principais efeitos da exposição por 30 dias ao cobre a uma dose maior que a recomendada, como a encontrada nos trabalhadores expostos, e os mecanismos envolvidos nas ações tóxicas cardiovasculares causadas pela exposição ao metal.

Um estudo populacional realizado no Brasil por Rocha *et al.* (2016), demonstrou uma diferença na concentração sanguínea de cobre entre homens e

mulheres, 0,8µg/mL e 1,4 µg/mL, respectivamente. Isso se dá devido à influência dos estrógenos no metabolismo do cobre, o que contribui para o aumento da concentração sanguínea do metal em mulheres (KLINC *et al.*, 2010). No presente estudo, a concentração sanguínea de cobre foi de 1,26 µg/mL em animais machos, o que corresponde ao valor encontrado na população feminina do estudo anterior.

A dosagem sanguínea de cobre encontrada em indivíduos saudáveis é de 1 µg/mL (ZHANG *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2016). Entretanto, ainda não está estabelecida a concentração sanguínea de cobre considerada segura. Os valores encontrados nos animais tratados no presente estudo se assemelham aos valores encontrados em indivíduos saudáveis apresentados na literatura. Todavia, foi possível observar os efeitos causados pelos 30 dias de exposição no presente estudo. Nossos resultados demonstram que o tratamento com o cobre além de aumentar a concentração sanguínea nos ratos, provocou deposição tecidual, principalmente no fígado, rins e tibia. Provavelmente, a ação dos tecidos em concentrar o cobre mitigou a concentração sanguínea no modelo experimental realizado em nossa pesquisa.

A homeostase do cobre é essencial para o correto funcionamento enzimático e do organismo. Portanto, quando há uma deficiência desse metal no corpo, o desempenho de vários órgãos e sistemas de defesa é comprometido. Por outro lado, quando em excesso pode causar efeitos tóxicos e promover as reações de Fenton, com provável dano celular e morte (SAARI, 2000; HARRIS, 2003; KEEN *et al.*, 2003; HUSAIN; MAHMOOD, 2019). Entre os efeitos da toxicidade do cobre estão as doenças neurodegenerativas (BREWER, 2010) e o aumento da mortalidade por doenças cardiovasculares (REUNANEN *et al.*, 1996; FORD, 2000; SHOKRZADEH *et al.*, 2009).

A toxicidade crônica do cobre não é comum em indivíduos saudáveis devido à autorregulação pelo organismo através da absorção e excreção intestinal pela bile. No entanto, se o indivíduo tiver doença hepática ou outras condições que comprometam a excreção biliar, ele pode ter efeitos graves de toxicidade do metal (ARAYA *et al.*, 2006; HUFF *et al.*, 2007).

As mitocôndrias desempenham um papel central no acoplamento excitação- contração do coração, pois compreende a principal fonte de ATP celular, mas também de EROs, sendo a sua função controlada pelo Ca^{2+} (BURGOYNE *et al.*,

2012; NICKEL, KOHLHAAS, MAACK, 2014). Brandes e Bers (1996, 97, 99 e 2002) caracterizaram a importância da absorção mitocondrial de Ca^{2+} para adequar a oferta de energia à demanda celular pela ativação do ciclo de Krebs induzida por Ca^{2+} . Outros estudos utilizando modelos de deleção do uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (MCU) revelaram que a abolição da absorção de Ca^{2+} pela MCU não resulta em um fenótipo patológico, mas demonstra uma resposta cardíaca prejudicada ao estímulo β -adrenérgico (LUONGO *et al.*, 2015; PAN *et al.*, 2013; RASMUSSEN *et al.*, 2015; HOLMSTROM *et al.*, 2015; KWONG *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015). Estes achados indicam o papel da mitocôndria na modulação do acoplamento excitação-contracção no coração diante das variações na concentração de Ca^{2+} citosólico.

Observamos um aumento no desenvolvimento de força nos músculos papilares e do estresse oxidativo pelo aumento da produção de OH^\bullet . Nunes *et al.* (2018) observaram um aumento no estresse oxidativo e na produção de NO ao avaliar a reatividade vascular, *in vitro*, após a exposição aguda ao cobre (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). No entanto, Filetti *et al.* (2018) mostraram que a exposição aguda ao cobre na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CuCl_2 reduz o desenvolvimento de força dos músculos papilares devido à menor liberação de Ca^{2+} pelo RS e ao influxo de Ca^{2+} reduzido pelo sarcolema. Nossos resultados foram diferentes aos da exposição aguda ao cobre, sugerindo que mudanças adaptativas ocorreram durante a exposição crônica ao cobre.

Diante do bloqueio da síntese de NO pelo L-NAME, nossos resultados sugerem que o cobre pode interferir no funcionamento do RS e o NO parecer estar envolvido nesses mecanismos. O L-NAME reduziu a resposta contrátil na PRC e sugere que o cobre aumenta o influxo de Ca^{2+} , favorecendo o aumento da força contrátil. Deste modo, o NO parece favorecer o inotropismo cardíaco positivo encontrado nos nossos resultados.

Benders *et al.* (1994) demonstraram que o cobre pode aumentar a concentração intracelular de Ca^{2+} devido à redução da atividade da Na^+/K^+ -ATPase. A redução da atividade da NKA causa um aumento do Na^+ intracelular, e este, por sua vez, reduz a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. O Ca^{2+} não é extrusado do mioplasma e seu aumento é captado pelo RS. Deste modo, na próxima ativação haverá maior disponibilidade de Ca^{2+} para ser liberado pelo RS, gerando maior força de contracção.

Em situações em que a concentração de Ca^{2+} é alterada, ocorrerá consequente alteração na amplitude e na velocidade dos transientes do Ca^{2+} citosólico, afetando o desenvolvimento da força durante a sístole e o relaxamento durante a diástole (BERS, 2006; LUO; ANDERSON, 2013). Em nossos resultados observamos prolongamento dos tempos de ativação (TA) e de relaxamento (TR 90%). A avaliação do tempo de relaxamento mensura a capacidade de recaptação de cálcio pelo RS e nos permite conhecer a cinética dos mecanismos de retirada de cálcio do meio intracelular (BERS, 2002). Deste modo, nossos achados estão associados à redução da cinética do cálcio, favorecendo o aumento do Ca^{2+} citoplasmático (ZIMA; BLATTER, 2006). Além disso, a exposição ao cobre parece provocar maior permeabilidade da membrana dos cardiomiócitos ao Ca^{2+} , com consequente aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico, resultando na maior exposição das proteínas contráteis a este íon. E, uma vez que as proteínas contráteis estão mais sensíveis ao Ca^{2+} , haverá maior desenvolvimento de força de contração.

Os músculos papilares dos animais expostos ao cobre do presente estudo demonstraram maior papel do Ca^{2+} extracelular na contração e redução do papel do RS para o desenvolvimento da força de contração. Filetti *et al.* (2018) demonstraram que a sobrecarga aguda de cobre (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) parece reduzir a permeabilidade do sarcolema ao cálcio e a atividade da ATPase-miosínica, com consequente redução da resposta contrátil do músculo papilar. Contudo, nossos resultados sugerem que o tratamento crônico com cobre pode levar a mudanças adaptativas nos mecanismos reguladores da contratilidade cardíaca.

O aumento na atividade autonômica simpática pode ser um dos principais mecanismos envolvidos na manutenção do inotropismo cardíaco (BERS, 2002; JAKOB; NAWRATH; RUPP, 1988). Nossos dados mostram que a sobrecarga de cobre aumenta a PA e a FC (Tabela 3). Deste modo, investigamos se a sobrecarga de cobre promoveu um aumento da estimulação simpática com isoproterenol. Observamos que a ativação simpática causada pelos 30 dias de exposição reduziu a resposta inotrópica positiva ao isoproterenol. Possivelmente, a atividade simpática promoveu a dessensibilização dos receptores β 1-adrenérgicos, evidenciada pela diminuição da resposta contrátil ao isoproterenol. Além disso, o L-NAME não alterou os efeitos sobre a resposta adrenérgica nos cardiomiócitos. De acordo com esses resultados, a menor ação β -adrenérgica sugere menor permeabilidade ao Ca^{2+} pelos

canais lentos e, havendo a possível redução na atividade da PKA, também há redução da fosforilação do fosfolamban. E, conseqüentemente, a atividade da SERCA pode diminuir, resultando em menor reserva de Ca^{2+} no RS.

O cobre induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SAMUNI; MODERCHAI; CZAPSKI, 1981). Além disso, a redução da atividade do NO causada pela diminuição da síntese ou por sua degradação pelo estresse oxidativo, pode ser um dos fatores que desencadeiam disfunções cardiovasculares (PEPINE, 2009). O aumento da formação de OH^\bullet através das reações de Fenton ou Haber-Weiss já foi associado à redução da atividade do NO no relaxamento vascular em ratos diabéticos (OHKUWA; SATO; NAOI, 1995; PIEPER; LANGENSTROER; SIEBENEICH, 1997).

O ânion superóxido provavelmente não é o único radical que pode reagir com o NO (CAI; HARRISON, 2000). Em nossos resultados, encontramos aumento significativo da produção de OH^\bullet sem alterar a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Figura 30). Possivelmente, a exposição ao cobre aumentou a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$, no entanto, esta ERO reage com o NO, produzindo o OH^\bullet . Esta hipótese poderia justificar o aumento de OH^\bullet encontrado no nosso estudo. A reação do NO com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ favorece a formação de peroxinitrito (ONOO^-) e a conseqüente formação de OH^\bullet e dióxido de nitrogênio ($^\bullet\text{NO}_2$), potencializando os efeitos citotóxicos mediados por estas EROs (BECKMAN *et al.*, 1990; RADJ *et al.*, 1991).

A toxicidade do cobre pode resultar em estresse oxidativo significativo e subsequente dano tecidual, o que ocorre em parte como resultado de sua capacidade de produzir OH^\bullet (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998; GAZIANO *et al.*, 2012). Esta é a ERO considerada a mais reativa e capaz de interagir rapidamente com moléculas e metais, uma vez que nenhum agente antioxidante endógeno é capaz de neutralizar suas ações. O OH^\bullet gerado pode causar alterações funcionais importantes, inativação de enzimas e dos componentes da membrana celular ou até causar modificação no DNA (GAZIANO *et al.*, 2012). Nosso estudo demonstrou que a exposição por 30 dias ao cobre causou um aumento significativo na produção de OH^\bullet , o qual poderia provocar alterações funcionais nas células.

As EROs podem influenciar a homeostase do Ca^{2+} e a sinalização celular através de modificações pós-traducionais, inibindo a liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} nos cardiomiócitos de ratos (CHEREDNICHENKO *et al.*, 2004). Como resultado, as EROs modulam as proteínas envolvidas na mobilização de Ca^{2+}

(STAMLER; HAUSLADEN, 1998). Essa modulação ocorre devido à oxidação dos receptores Rianodina e SERCA-2a, refletindo no aumento da liberação de Ca^{2+} e na redução da recaptção de Ca^{2+} pelo RS (BALDERAS-VILALLOBOS, 2013) e contribui para que os transientes de Ca^{2+} se tornem mais lentos (KANEKO; BEAMISH; DHALLA, 1989; RUECKSCHLOSS; VILLMOW; KLÖCKNER, 2010). Nossos resultados mostraram que a exposição por 30 dias ao cobre levou ao aumento de OH^\bullet e pode sugerir que este aumento influencie nas possíveis alterações da cinética do Ca^{2+} e na sensibilidade das proteínas contráteis a este íon.

6 RESUMO DOS RESULTADOS

Sumariando os mecanismos propostos para os efeitos cardíacos da exposição crônica ao cobre em ratos, sugerimos que:

- A sobrecarga crônica de cobre parece aumentar o papel do influxo transsarcolemal de cálcio, evidenciada pelo aumento na PRC, pela maior resposta contrátil em resposta às crescentes concentrações do Ca^{2+} extracelular e pelo aumento no pico das contrações tetânicas.
- O aumento no influxo de Ca^{2+} transsarcolemal resultou em aumento na força contrátil desenvolvida pelos músculos papilares dos animais tratados com cobre. Assim, se a permeabilidade das membranas está aumentada, a concentração de cálcio citosólico tende a ser maior. Apesar do RS apresentar a expressão protéica da SERCA 2 inalterada, os dados funcionais sugerem que a atividade desta proteína possa estar diminuída, evidenciado pela redução na PPP. Deste modo, a recaptação de cálcio pelo RS parece estar mais lenta, fazendo com que o RS tenha um menor estoque de cálcio disponível. Vale ressaltar que o aumento da produção de OH^\bullet pode modular as proteínas envolvidas na mobilização de Ca^{2+} pela oxidação dos receptores Rianodina e SERCA-2a, aumentando a liberação de Ca^{2+} e reduzindo a sua recaptação pelo RS (KANEKO; BEAMISH; DHALLA, 1989; RUECKSCHLOSS; VILLMOW; KLÖCKNER, 2010; BALDERAS-VILALLOBOS, 2013).
- Nossos achados sugerem a participação do NO nos mecanismos reguladores da atividade do RS, no influxo de Ca^{2+} transsarcolemal e na afinidade de proteínas contráteis ao cálcio. Esta afirmativa pode ser embasada pelos resultados apresentados na PPP, curva de Ca^{2+} extracelular e na PRC após incubação com L-NAME. O aumento da produção de OH^\bullet demonstrado neste estudo sugere o efeito do radical livre suprimindo os efeitos NO na contratilidade cardíaca.
- Observamos, de forma indireta, que o influxo de Ca^{2+} pelo sarcolema parece ter aumentado, enquanto a recaptação de cálcio pelo RS parece estar mais lenta, levando ao aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico. O aumento do Ca^{2+} intracelular pode favorecer a sua extrusão via NCX, no entanto, a expressão protéica deste trocador não está alterada. Os nossos dados não

são conclusivos para afirmar o comportamento da atividade do NCX e, além disso, outros fatores que não avaliamos podem estar envolvidos na regulação destes mecanismos, como a atividade da NKA. Uma hipótese possível é a de que o cobre pode inibir a NKA, aumentando o Na^+ intracelular, inibindo o NCX, o que explicaria o aumento do Ca^{2+} no cardiomiócito e, conseqüentemente, a força de contração (BENDERS *et al.*, 1994).

- A exposição ao cobre causou aumento da FC e pode estar associada a ativação simpática. Esta afirmação corrobora o aumento da pressão arterial e intraventricular *in vivo* e o aumento da força contrátil *in vitro*. Do mesmo modo, a menor resposta ao agonista β -adrenérgico, contribui para a hipótese de dessensibilização destes receptores devido à maior estimulação simpática.

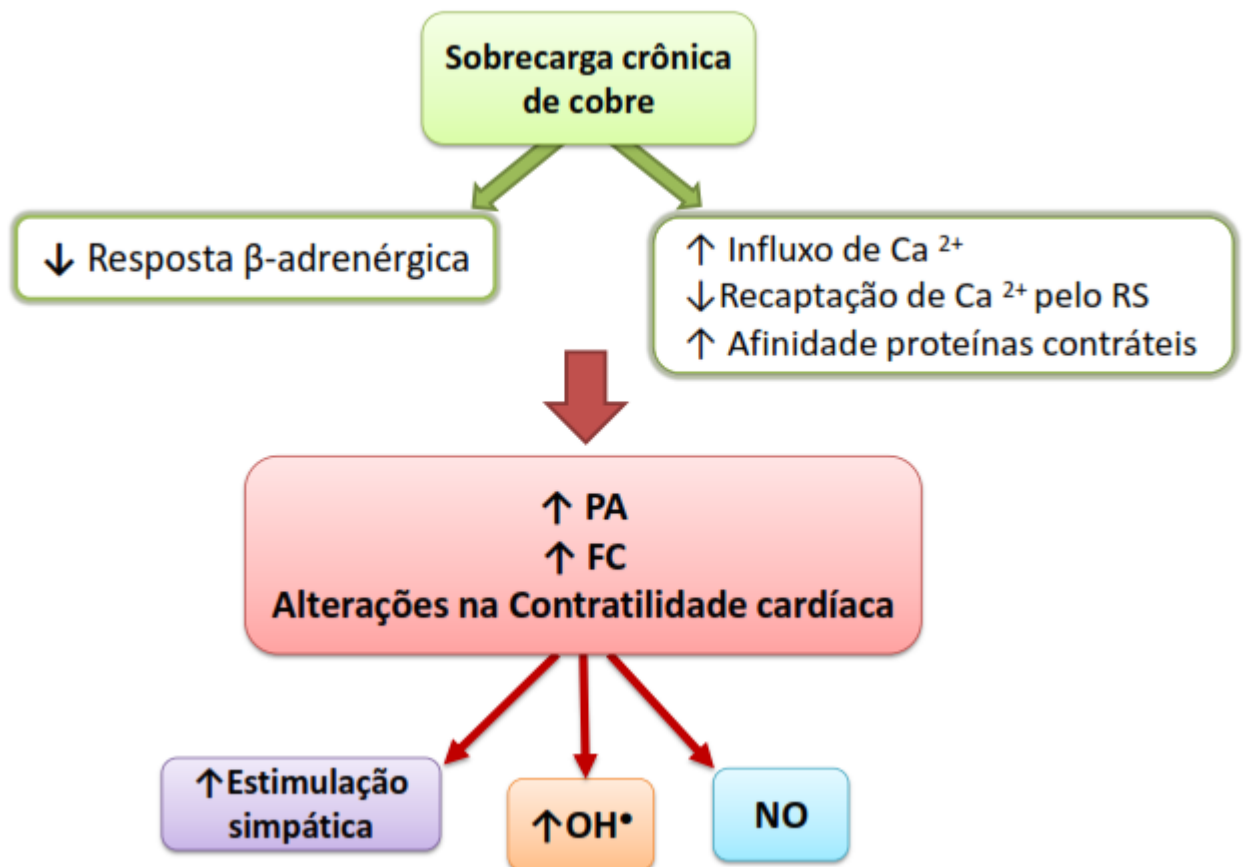


Figura 32: Esquema representativo dos principais mecanismos sugeridos. A exposição por 30 dias ao cobre parece aumentar a PA e FC, influenciando na redução da resposta β -adrenérgica e aumento da estimulação simpática; aumentar a produção de OH^\bullet ; alterar o envolvimento do NO nos mecanismos reguladores da PA e da contratilidade cardíaca; e alterar a contratilidade cardíaca, possivelmente pelo aumento do influxo de Ca^{2+} transsarcolemal, redução da recaptação de Ca^{2+} pelo RS e aumento da sensibilidade das proteínas contráteis ao Ca^{2+} .

7 CONCLUSÃO

Nosso trabalho demonstrou que 30 dias de exposição a uma dose diária de cobre duas vezes maior à recomendada, apesar de representar uma concentração sanguínea de cobre tolerável pelo organismo, pode aumentar a pressão arterial, a FC e o inotropismo cardíaco. Além disso, demonstramos pela primeira vez que a sobrecarga crônica de cobre promove alterações na mecânica miocárdica. Esses efeitos poderiam ser resultantes do aumento da produção de EROs mediado pelo radical hidroxila e a consequente redução na biodisponibilidade do óxido nítrico.

Diante da popularidade da autoadministração indiscriminada dos suplementos compostos por vitaminas e minerais e da escassez de estudos que avaliem a exposição crônica ao cobre, devemos nos preocupar com os limites da concentração sanguínea de cobre. Portanto, sugerimos que a dose diária recomendada para a ingestão de cobre seja revisada e novos valores de limites máximos sejam estabelecidos, pois, quando em excesso, contribui para os efeitos tóxicos do metal no organismo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELSTEIN, S. J., VALLEE, B. L. Copper Metabolism in Man. **N Eng J Med**, 1981. 265(18), 892–897. doi:10.1056/nejm196111022651806

AIRES, M. M. *et al.* Fisiologia. 4ª ed. **Guanabara Koogan**. Rio de Janeiro. 2012.
BERNE, R.M.; LEVY, M.N., 1996, FISILOGIA, 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

ALVES, C.; LIMA R. V. B. Dietary Supplement Use by Adolescents. **J Pediatr**, 2009. 85 (4): 287-94.

AHAMED, M. *et al.* Assessment of the lung toxicity of copper oxide nanoparticles: current status. **Nanomedicine (Lond)**, 2015. v.10, n. 15, p. 2365-77.

AMANCIO, O. M. S. Funções Plenamente Reconhecidas De Nutrientes: Cobre. **ILSI Brasil** (International Life Science Institute do Brasil), 2011. v. 19.

ANUÁRIO MINERAL BRASILEIRO, Principais Substâncias Metálicas, 2018, Ano Base 2017: http://www.anm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/anuario-mineral/anuario-mineral-brasileiro/amb_2018.pdf, acessado em dezembro 2019.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). O Regulamento Técnico Sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005.

ARAYA, M., *et al.* Supplementing copper at the upper level of the adult dietary recommended intake induces detectable but transient changes in healthy adults. **J Nutr**, 2005. 135: 2367-71.

ARAYA, M., *et al.* Understanding copper homeostasis in humans and copper effects on health. **Biol Res**, 2006. 39: 183-187. doi: 10.4067/s0716-97602006000100020.

ARNAL, N.; DE ALANIZ, M.J.; MARRA, C.A. Involvement of Copper Overload in Human Diseases, in: M.S. Giménez (Ed.), **Research Signpost/Transworld Research Network**, Kerala, India, 2010. 1: 1-28.

ARNAL, N. *et al.* Copper-induced alterations in rat brain depends on route of over load and basal copper levels. **Nutrition**, Jan 2014. 30(1):96-106.

ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Copper. Atlanta, GA: U.S, 2004. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

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

BALDERAS-VILALLOBOS, J. *et al.* Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 2013. 305: H1344–H1353, 2013. doi:10.1152/ajpheart.00211.

BALKEMAA, S. *et al.* Haemolytic Anaemia as a First Sign of Wilson's Disease. **J Med**, 2008. v. 66, n. 8, p. 344-7.

BALLIGAND, J.L. *et al.* Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. **J Biol Chem**, 1994; 269:27580–8

BARBOSA, K.B.F *et al.* Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev Nutr**, jul./ago 2010. Campinas, 23(4):629-643.

BARCELOUX, D.G. Copper. **Clin Toxicol**, 1999. 37: 217-230.

BAROUCH, L.A. *et al.* Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. **Nature**, 2002. 416, 337-339.

BASSANI, J. W.; BASSANI, R. A.; BERS, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **J Physiol**, 1994. 476, 279–93.

BECKMAN, J. S. *et al.* Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci**, 1990. 87(4), 1620–1624. doi:10.1073/pnas.87.4.1620.

BENDERS, A.A.G.M. *et al.* Copper toxicity in cultured human skeletal muscle cells: the involvement of Na⁺/K⁺-ATPase and the Na⁺/Ca²⁺-exchanger. *Pfligers Archiv Eur J Physiol*, 1994. 428:461-467. doi:10.1007/bf00374566.

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

BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002. 415 (6868), 198–205.

BERS, D.M. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiol (Bethesda)*, 2006. 21:380–387. doi: 10.1152/physiol.00019.2006.

BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002; 415: 198-205.

BLUNDELL, S.; CURTIN, J.; FITZGERALD, D. Blue lips, coma and haemolysis. *J Paediatr Child Health*, 2003. 39:67-8.

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

BOST, M. *et al.* Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *J Trace Elem Med Biol*, 2016. v. 35, p. 107–115.

BOZZA, Y.; HORII, J. Influência do grau alcoólico e da acidez do destilado sobre o teor de cobre na aguardente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas. v.20, n.3, p.279-284, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248-254.

BRANDES, R.; BERS, D.M. Increased work in cardiac trabeculae causes decreased mitochondrial NADH fluorescence followed by slow recovery. *Biophys J*, 1996. 71:1024–1035. doi: 10.1016/S0006-3495(96)79303-7.

BRANDES, R.; BERS, D.M. Intracellular Ca²⁺ increases the mitochondrial NADH concentration during elevated work in intact cardiac muscle. **Circ Res**, 1997. 80:82–87.

BRANDES, R.; BERS, D.M. Analysis of the mechanisms of mitochondrial NADH regulation in cardiac trabeculae. **Biophys J**. 77:1666–1682, 1999. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77014-1.

BRANDES, R.; BERS, D.M. Simultaneous measurements of mitochondrial NADH and Ca(2+) during increased work in intact rat heart trabeculae. **Biophys J**, 2002. 83:587–604. doi: 10.1016/S0006-3495(02)75194-1.

BRASIL. MINISTÉRIO DA INDÚSTRIAL, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS 2016. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/noticias/9-assuntos/categ-comercio-exterior/480-metarlurgia-e-siderurgia-4>. Acesso em 5 de abril de 2020.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral, Sumário Mineral. 2017. Disponível: <http://www.anm.gov.br/dnpm/sumarios/cobre-sumariomineral2014/view>. Acesso em 07 de abril de 2020.

BRETT, D.S. Nitric oxide signaling specificity: the heart of the problem. **J Cell Sci**, 2003. 116:9-15.

BREMNER, I. Manifestations of copper excess. **Am J Clin Nutr**. 1998; 67:1069S–1073S.

BREWER, G. J. Practical Recommendations and New Therapies for Wilson's Disease. **Drugs**, 1995. 50(2): 240–249. doi:10.2165/00003495-199550020-00004.

BREWER, G. J. Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease. **Exp Biol Med**, 2007. v. 232, pp.323-335.

BREWER, G. J. Risks of copper and iron toxicity during aging in humans. **Che Res Toxicol**, 2010. 23: 319-26.

BRUTSAERT D. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. **Physiol Rev**, 2003. 83:59-115.

BUETTNER, G. The packing order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. **Arch Biochem Biophys**, 1993; 300:535–543.

BURKITT, M.J. A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols and ceruloplasmin. **Arch Biochem Biophys**, 2001; 394:117–135.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. **Circ Res**, 2000. 87:840-844. doi:10.1161/01.RES.87.10.840.

CARPENTER, T. O.; PENDRAK, M. L.; ANAST, C. S. Metabolism of 25-hydroxyvitamin D in copper-laden rat: a model of Wilson's disease. **Am J Physiol**, 1998. 254(2):E150–E154. doi:10.1152/ajpendo.1988.254.2.e150.

CHAIGNON, V. *et al.* Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. **Environ. Pollut**, 2003. v. 123, n. 2, p. 229–238.

CHATTOPADHYAY A.; SARKAR M.; BISWAS N.M. Effect of copper chloride on adrenocortical activities in adult and immature male rats. **Environ Toxicol Pharmacol**, 2002. 11(2): 79-84.

CHEREDNICHENKO, G. *et al.* Conformational activation of Ca²⁺ entry by depolarization of skeletal myotubes. **Proc Natl Acad Sci**, 2004. 101(44): 15793–15798. doi:10.1073/pnas.0403485101.

CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radic Biol Med**. 1991; 11:215–232.

CICOGNA, A. C. *et al.* Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. **Am J Med Sci**, 2000; 320(4):244-48.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). Diário Oficial da república federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 de maio de 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>.

CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Resolução Normativa CONCEA nº 38, de 17.04.2018. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2018.

COUSINS, R. J. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. **Physiol Rev**, 1985. 65(2): 238–309. doi:10.1152/physrev.1985.65.2.238.

COTTON, F.A.; WILKINSON, G. Copper Advanced inorganic chemistry. New York, NY, **John Wiley and Sons**, 1980. 798-821.

DE BELCHIOR, A. C. S. *et al.* Maternal protein restriction compromises myocardial contractility in the young adult rat by changing proteins involved in calcium handling. **J appl physiol** (Bethesda, Md.: 1985), 19 nov. 2015. p. jap.00246.2015.

ESKICI, G.; AXELSEN, P. H. Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Biochem**, 2012. 51:6289–6311.

European Commission and European Union Members Estates. The Copper Voluntary Risk Assessment. A Pioneering Industry/Member State Partnership Approach to the Duty of Care, April 2009.

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

FERON, O. *et al.* Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. **J Biol Chem**, 1996; 271:22810–4.

FILETTI, F.M. *et al.* Reactive oxygen species impair the excitation-contraction coupling of papillary muscles after acute exposure to a high copper concentration. **Toxicol In Vitro**, 2018. 51: 106-113.

FIORESI, M. *Exposição ao chumbo por 30 dias: implicações na pressão arterial e na contratilidade miocárdica*. Orientador: Danton Valentin Vassallo. Orientador: Danton Valentin Vassallo. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2011.

FORD, E.S. Serum Copper Concentration and Coronary Heart Disease Among Us Adults. **Am. J. Epidemiol**, 2000. 151: 1182-1188.

FURIERI, L.B. *Efeitos cardiovasculares da exposição crônica a cloreto de mercúrio em ratos*. Orientador: Danton Valentin Vassallo. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2008.

GAETKE, L. M.; CHOW-JOHNSON, H. S.; CHOW, C. K. Copper: Toxicological relevance and mechanisms. **Arch Toxicol**. 2014 November ; 88(11): 1929–1938. doi:10.1007/s00204-014-1355-y.

GALHARDI, C. M. *et al*. Toxicity of copper intake: lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction. **Food Chem Toxicol**, 2004. 42(12), 2053–2060. doi:10.1016/j.fct.2004.07.020

GAZIANO, J. M. *et al*. Multivitamins in the prevention of cancer in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. **JAMA**, 2012. 14; 308(18): 1871-80.

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

GHAEMIAN, A. *et al*. Zinc and Copper Levels in Severe Heart Failure and the Effects of Atrial Fibrillation on the Zinc and Copper Status. **Biol Trace Elem Res**, 2011. 143(3), 1239–1246. doi:10.1007/s12011-011-8956-6.

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

GREENWOOD, N.N.; EARNSHAW, A.; Chemistry of the Elements; 2nd ed.,
Butterworth Heinemann: Oxford, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition
metals and disease. **Biochem. J.** 1984; 219:1–14.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J**, 1987.
1(5):358-364. doi:10.1096/fasebj.1.5.2824268.

HALLIWELL, B. *et al.* The characterization of antioxidants. **Food Chem Toxicol**,
1995. v. 33, n. 7, p. 601–617.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in biology and medicine.
Oxford Science Publications: **Carbohydr Polym**, 1998. 26(3): 243.
doi:10.1016/0144-8617(95)90055-1.

HARRIS, Z. L., GITLIN J. D Genetic and molecular basis for copper toxicity, **Am J
Clin Nutr**, 1996. v. 63, pp.836S-41S.

HARRIS, E. D. Copper homeostasis: the role of cellular transporters. **Nutr Rev**,
2001. 59: 281-285. doi: 10.1111/j.1753-4887.2001.tb07017.x.

HART, E. B. *et al.* Iron nutrition. VII. Copper is a supplement to iron for hemoglobin
building in rat. **J Biol Chem**, 1928. 77, 797–812.

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

HAYASHI, M. *et al.* Hepatic copper accumulation induces DNA strand breaks in the
liver cells of Long/Evans Cinnamon strain rats. **Biochem Biophys Res Commun**,
2000; 276:174–178.

HOLMSTRÖM, K. M. *et al.* Assessment of cardiac function in mice lacking the
mitochondrial Calcium uniporter. **J Mol Cell Cardiol**, 2015. 85:178–182.
doi:10.1016/j.yjmcc.2015.05.022.

HUFF, J. D. *et al.* Copper deficiency causes reversible myelodysplasia. **Am J Hematol**, 2007. 82(7): 625–630. doi:10.1002/ajh.20864.

HUSAIN, N.; MAHMOOD, R. Copper (II) generates ROS and RNS, impairs antioxidant system and damages membrane and DNA in human blood cells. **Environ Sci Pollut Res**, 2019. doi:10.1007/s11356-019-05345-1.

JAKOB, H.; NAWRATH, H.; RUPP, J. Adrenoceptor-mediated changes of action potential and force of contraction in human isolated ventricular heart muscle. **Br J Pharmacol**, 1988. 94(2):584-90. doi: 10.1111/j.1476-5381.1988.tb11564.x

JING, M. *et al.* Oxidative damage induced by copper in mouse primary hepatocytes by single-cell analysis. **Environ Sci Pollut R**, 2015. 23(2): 1335–1343. doi:10.1007/s11356-015-5360-3.

JUNIOR, J. F.; PASCHOAL, V. C. Sintomas de deficiência de Cobre e fontes alimentares. **Control Soft Nutrition**, 2004. Disponível em: <http://www.medicinacomplementar.com.br/biblioteca4.php?/nu-0064.htm>. Acesso em 05 de abril de 2020.

KADIISKA, M.B. *et al.* Electron spin resonance evidence for free radical generation in copper-treated vitamin E- and selenium-deficient rats: in vivo spin-trapping investigation. **Mol Pharmacol**, 1993. 44:222–227.

KALLER, S. Menkes disease mutations and response to early copper histidine treatment. **Nature Genetics**, 1996. Vol. 13, pp.21-22.

KALLER, S. Diagnosis and therapy of Menkes syndrome, a genetic form of copper deficiency. **Am J Clin Nutr**. 1998. Vol. 67, pp.1029S-34S.

KANEKO, M.; BEAMISH, R. E.; DHALLA, N. S. Depression of heart sarcolemmal Ca²⁺-pump activity by oxygen free radicals. **Am J Physiol**, 1989. 256(2):H368–H374. doi:10.1152/ajpheart.1989.256.2.h368.

KAWANISHI, S.; INOE, S.; YAMAMOTO, K. Hydroxyl radical and singlet oxygen production and DNA damage induced by carcinogenic metal compounds and hydrogen peroxide. **Biol Trace Elem Res**. 1989; 21:367–372.

KEEN, C. L. *et al.* Developmental Consequences of Trace Mineral Deficiencies in Rodents: Acute and Long-Term Effects. **J Nutr**, 2003. 133 (5): 1477S–1480S. doi:10.1093/jn/133.5.1477s.

KHAN, S.A. *et al.* Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation–contraction coupling. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2004. 101:15944–8.

KLINC, M. *et al.* 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**, 2010. 24: 152–6.

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

KWONG, J. Q. *et al.* The mitochondrial calcium uniporter selectively matches metabolic output to acute contractile stress in the heart. **Cell Rep**, 2015. 12:15–22. doi:10.1016/j.celrep.2015.06.002.

LIU, Y.; FENG, Q. NOing the heart: Role of nitric oxide synthase-3 in heart development. **Differentiation**, 2012. 84(1), 54–61. doi:10.1016/j.diff.2012.04.004

LUO, M.; ANDERSON, M. E. Mechanisms of Altered Ca²⁺ Handling in Heart Failure. **Circ Res**, 2013. 113(6):690–708. doi:10.1161/circresaha.113.301651.

LA FONTAINE, S.; MERCER, J. F. Tracking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in copper homeostasis. **Arch. Biochem. Biophys**, 2007, 463, 149–167.

LAYLAND, J.; LI, J. M.; SHAH, A. M. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. **J Physiol**, 2002. 540 (2): 457–467. doi:10.1113/jphysiol.2001.014126.

LEITE, C. M.; VASSALLO, D. V.; MILL, J. G.; Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. **Braz J Med Biol Res**, 1991. 24: 843-846.

LEITE, C. M.; VASSALLO, D. V.; MILL, J. G.; Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. **Can J Physiol Pharmacol**, 1995. 73: 638-643.

LEITE H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Rev Bras Nutr Clín**, 2003. Vol. 18, pp.87-94.

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

LETELIER, M. E. *et al.* Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and proteinbinding effects. **Chem Biol Interact**, 2010; 188:220–227.

LIANG, Q.; DEDON, P. C. Cu(II)/H₂O₂-induced DNA damage is enhanced by packaging of DNA as a nucleosome. **Chem Res Toxicol**, 2001; 14:416–422.

LINDER, M. C.; HAZEGH-AZAM, M. Copper biochemistry and molecular biology. **Am J Clin Nutr**, 1996. 63:797S–811S.

LINDER, M. C. *et al.* Copper transport. **Am J Clin Nutr**, 1998. 67:965S–971S.

LINZ, R.; LUTSENKO, S. Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. **J Bioenerg Biomembr**, 2007. 39:403–407.

LIPPARD, S. J. Free copper ions in the cell? **Science**. 1999; 284:748–749.

LUONGO, T. S. *et al.* The mitochondrial calcium uniporter matches energetic supply with cardiac workload during stress and modulates permeability transition. **Cell Rep**. 2015. 12:23–34. doi:10.1016/j.celrep.2015.06.017.

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

MASSION, P.B. *et al.* Nitric Oxide and Cardiac Function Ten Years After, and Continuing. **Circ Res**, 2003; 93:388-98.

MORO, A. M., *et al.* Quantificação laboratorial de cobre sérico por espectrofotometria vis comparável à espectrometria de absorção atômica com chama. **J Bras Patol Med.** 2007. v. 43, n.4, p.251-6.

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

NUNES, K. Z. *et al.* Acute copper overload induces vascular dysfunction in aortic rings due to endothelial oxidative stress and increased nitric oxide production. **J Toxicol Environ Health,** 2018. 81(8): 218–228, 2018.
doi:10.1080/15287394.2018.1437490.

OWEN, C. A. Metabolism of radiocopper (Cu64) in the rat. **Am J Physiol Legacy Content,** 1965. 209(5): 900–904. doi:10.1152/ajplegacy.1965.209.5.900.

OHKUWA, T.; SATO, Y.; NAOI, M. Hydroxyl radical formation in diabetic rats induced by streptozotocin. **Life Sci,** 1995. 56(21), 1789–1798. doi:10.1016/0024-3205(95)00150-5.

OSREDKAR, J.; SUSTAR, N. Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. **J Clinic Toxicol.** 2011. doi: 10.4172/2161-0495.S3-001

PATAI, K. *et al.* Local tissue effects of copper-containing intrauterine. **Fertil Steril.** 2003, 80, 1281.

PAN, X. *et al.* The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. **Nat Cell Biol,** 2013. 15:1464–1472. doi: 10.1038/ncb2868. doi: 10.1016/s0015-0282(03)01171-3

PEPINE, C. J. The Impact of Nitric Oxide in Cardiovascular Medicine: Untapped Potential Utility. **Am J Med,** 2009. 122(5): S10–S15.
doi:10.1016/j.amjmed.2009.03.003

PIEPER, G. M.; LANGENSTROER, P.; SIEBENEICH, W. Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. **Cardiovasc Res,** 1997. 34(1): 145–156. doi:10.1016/s0008-6363(96)00237-4.

POLISHCHUK, E. V. *et al.* Silver Ions as a Tool for Understanding Different Aspects of Copper Metabolism. **Nutrients**, 2019. 11, 1364; doi:10.3390/nu11061364

POWELL, S. R. The antioxidant properties of zinc. **J Nutr**, 2000; 130:1447S–1454S.

RADI, R. *et al.* Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch Biochem Biophys**, 1991. 288(2), 481–487. doi:10.1016/0003-9861(91)90224-7

RASMUSSEN, T. P. *et al.* Inhibition of MCU forces extra mitochondrial adaptations governing physiological and pathological stress responses in heart. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2015. 112:9129–9134.

RAZAVI, H.M., HAMILTON, J.A., FENG, Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. **Pharmacol Ther**, 2005. 106, 147–162.

REUNANEN, A. *et al.* Serum calcium, magnesium, copper and zinc and risk of cardiovascular death. **Eur J Clin Nutr**, 1996. 50: 431-437.

RECHE, R. V. *et al.* Influence of type of distillation apparatus on chemical profiles of Brazilian cachaças. **J Agric Food Chem**, 2007. 55, 6603. Doi: 10.1021/jf0704110

RIBEIRO, J. A. S. Cobre. Balanço Mineral Brasileiro. 2001.

RIVAROLI, L. Avaliação da função cardíaca do teleósteo neotropical matrinxã, *Brycon amazonicus*: Uma análise matemática e biomolecular. Orientador: Ana Lúcia Kalinin. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 2011.

ROBERTS, E. A., SCHILSKY, M. L. A practice guideline on Wilson Disease. **Hepatology**, 2003. v. 37, pp.1475-1492.

ROCHA, G. H. O. *et al.* Trace metal levels in serum and urine of a population in southern Brazil. **J Trace Elem Med Biol**, 2016, 35: 61– 65.

RUECKSCHLOSS, U.; VILLMOW, M.; KLÖCKNER, U. NADPH oxidase-derived superoxide impairs calcium transients and contraction in aged murine ventricular myocytes. **Exp Gerontol**, 2010. 45(10): 788–796. doi:10.1016/j.exger.2010.05.002.

SAARI, J. T. Copper deficiency and cardiovascular disease: role of peroxidation, glycation, and nitration. **Can J Physiol Pharmacol**, 2000. 78(10): 848–855. doi:10.1139/y00-054

SAMUNI, A.; MODERCHAI, C.; CZAPSKI, G. Unusual Copper-induced Sensitization of the Biological Damage Due to Superoxide Radicals. **J Biol Chem**, 1981. 24: 12632-12635.

SCHÜMANN, K. *et al.* Hohenheim consensus workshop: copper. **Eur J Clin Nutr**. 2002, v. 56, pp.469-483.

SENSI, S. L. *et al.* Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. **Trends Pharmacol Sci**, 2018. doi:10.1016/j.tips.2018.10.001

SETSUKINAI, K. *et al.* Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. **J biol chem**, 2003, 278 (5): 3170–5.

SHOKRZADEH, M. *et al.* Serum zinc and copper levels in ischemic cardiomyopathy. **Biol Trace Elem Res**, 2009, 127:116-23.

SIMON, J.N., *et al.* Nitric oxide synthase regulation of cardiac excitation–contraction coupling in health and disease. **J Mol Cel Cardiol**, 2014. 73, 80-91.

SIOTTO, M.; SQUITTI, R. Copper imbalance in Alzheimer's disease: Overview of the exchangeable copper component in plasma and the intriguing role albumin plays **Coord Chem Rev**, 2018. 371, 86. doi: 10.1016/j.ccr.2018.05.020

SMILJIC S., NESTOROVIC V., SAVICS. Modulatory role of nitric oxide in cardiac performance. **Med Pregl**, 2014; LXVII (9-10): 345-352.

SUKALSKI, K. A.; LABERGE, T. P.; JOHNSON, W. T. In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency. **Free Radic Biol Med**, 1997, 22 (5): 835-42.

STAMLER, J. S.; HAUSLADEN, A. Oxidative modifications in nitrosative stress. **Nat Struct Biol**, 1998. 5(4): 247–249. doi:10.1038/nsb0498-247

THAKUR, et al. Anti-Atherosclerotic Effect of β -Blocker with Nitric Oxide–Releasing Action on the Severe Atherosclerosis. **J Cardiovasc Pharmacol**, 2002. 39(2), 298–309. DOI:10.1097/00005344-200202000-00017.

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**, 2001. 101: 294– 301.

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

UAUY, R.; MAASS, A.; ARAYA, M. Estimating risk from copper excess in human populations. **Am J Clin Nutr**, 2008; 88:867S–871S. [PubMed: 18779311]

VASSALLO, D. V.; de CARVALHO, A. P. Influence of temperature on isometric contractions of rabbit atria during inotropic interventions. **Acta Physiol Lat Am**, 1979. v.29, p. 131-135.

VASSALLO, D. V.; MILL, J. G. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. **Acta Physiol Pharmacol Lat Am**, 1988. 38: 87-97.

VASSALLO, D.V. *et al.* Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. **Pharmacol Res**, 1994. 29: 251- 260.

VASSALLO, D.V. *et al.* Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. **Braz J Med Biol Res**, 2008. v. 41,p. 789-795.

WANG, Y.C. *et al.* Copper Induces Vasorelaxation and Antagonizes Noradrenaline – Induced Vasoconstriction in Rat Mesenteric Artery. **Cell Physiol Biochem**, 2013. 32:1247-1254.

WAPNIR, R. A. Copper absorption and bioavailability, **Am J Clin Nutr**, 1998. v. 67, pp.1054S-60S.

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

WIGGERS, G. A. *et al.* Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. **Am J Physiol**, 2008. doi:10.1152/ajpheart.00430.

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

WU, Y. *et al.* The mitochondrial uniporter controls fight or flight heart rate increases. **Nat Commun**, 2015. 6:6081. doi:10.1038/ncomms7081.

XIE, Y.-W., WOLIN, M.S. Role of Nitric Oxide and Its Interaction With Superoxide in the Suppression of Cardiac Muscle Mitochondrial Respiration. **Circ**, 1996. 94, 2580-2586.

XU, K.Y. *et al.* Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. **Proc Nat Acad Sci USA**, 1999. 96, 657-662.

YANG, C. A. *et al.* Correlation of copper interaction, copper driven aggregation, and copper-driven H₂O₂ formation with A β 40 conformation. **Int J Alzheimers Dis**, 2011 doi:10.4061/2011/607861.

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**, 2015, v. 48, p. 1163-1179.

ZHANG, L. *et al.* Baseline blood levels of manganese, lead, cadmium, copper, and zinc in residents of Beijing suburb. **Environ Res**, 2015.

doi:10.1016/j.envres.2015.03.008.

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**, 2003. v. 92, n. 2, p. 129–138.

ZIMA, A. V.; BLATTER, L. A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. **Cardiovasc Res**, 2006, 71(2):310-21.

ANEXO

ANEXO I (Artigo)**Copper exposure for 30 days increases blood pressure and cardiac contraction:
Involvement of nitric oxide and oxidative stress**

Cindy Medici Toscano Rozetti ^{a,b}, Filipe Martinuzo Filetti ^a, Camila Almenara Cruz Pereira ^a,
Mirian Fioresi ^d, Dalton Valentim Vassallo ^{a,c}

^a Dept. of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, CEP 29043-900, Brazil.

^b Nursing Course, University Center FAESA, Vitória, ES, CEP 29053-360, Brazil.

^c Health Science Center of Vitória-EMESCAM, Vitória, ES, CEP 29045-402, Brazil.

^d Dept. of Nursing, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, CEP 29043-900, Brazil.

Corresponding author:

Cindy Medici Toscano Rozetti

Dept. of Physiological Sciences, Health Science Center, UFES,

Av. Marechal Campos, 1468

29043-900 Vitória, ES, Brasil.

Phone: +55-27-3335-7350 Fax: +55-27-3335-7330

E-mail: cindymedici@gmail.com

Abstract

Copper contributes as an essential factor for the body's homeostasis. However, -copper excess compromises organic functions. **Aims:** We investigated the effects of copper exposure for 30 days on blood pressure (BP) and cardiac contractility and the involvement of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species. **Main methods:** Wistar rats (12 weeks old, 280 g) were randomized to treated group (Cu) exposed 30 days to copper (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ CuCl_2) and control group (Ct) receiving intraperitoneal saline (0,9%). **Key findings:** Cu group presented blood concentration $\sim 1,26$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ and Ct $\sim 0,024$ $\mu\text{g}/\text{mL}$. The greatest metal accumulations were the liver and kidneys. Copper exposure increased systolic BP (Cu: 141 ± 3 mmHg; Ct: 133 ± 3 mmHg) (tail cuff) and arterial and intraventricular hemodynamic pressures. Papillary muscles force development increased without changing by L-NAME. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum was slowed. The contractile response to Ca^{2+} was increased by copper and enhanced by L-NAME. Copper increased contractions dependent on the sarcolemmal Ca^{2+} influx but L-NAME reduced it in Ct and copper groups. The response to isoproterenol decreased in the treated group but L-NAME did not alter this reduction. The developed force of papillary muscles at the peak and plateau of tetanic contractions also increased after copper exposure but without changes by L-NAME. *In situ* detection showed an increased OH^\bullet local production. **Significance:** Chronic copper exposure increased BP and cardiac force, increased Ca^{2+} inflow and slowed its reuptake, effects mediated by OH^\bullet and NO. Even at doses considered tolerable, this exposure might become harmful and cause cardiovascular damage.

Keywords: copper; blood pressure; cardiac contractility; oxidative stress.

Introduction

Copper is an essential nutrient, which plays an important role as an intermediate component of electron transfer reactions [1]. It integrates a number of important enzymes in the human organism, such as cytochrome C-oxidase, tyrosinase, lysyl oxidase, superoxide dismutase and β -hydroxylase, all of which are critical to cell life and survival [1,2,3,4].

However, increase in copper levels in the body may result in changes in energy production, increased oxidative stress, abnormal glucose and cholesterol metabolism, accumulation of tissue iron, blood cell function and structure, altered immune system and cardiac electrophysiology [5,6,7]. Therefore, both deficiency and copper excess in the body can compromise the function of different organs and systems [8].

Recently, due to the popularity of micro-minerals and vitamin self-administration, there is some concern about the limits of copper blood concentration [9,10]. According to the Food Nutrition Board of the Institute of Medicine, the Recommended Daily Intake (RDI) of copper for adults is 0,9 mg [11]. However, there is still no consensus on the safe doses considered for daily intake.

The role of copper on cardiovascular diseases has been reported [12,13,14] and high serum copper levels have been associated to patients with ischemic cardiomyopathy [15] and atherosclerotic disease [8]. We previously showed that acute copper exposure (10 μ g/mL) impairs excitation-contraction coupling and decreases myosin-ATP-ase activity by reactive oxygen species (ROS) [16]. These findings point to increased metal blood levels as a risk factor for the onset or aggravation of cardiovascular disease [8,17]. However, the involvement of copper on cardiovascular mechanisms remains to be elucidated.

Based on the evidence presented, our objective was to investigate the hemodynamic and contractile effects of copper exposure for 30 days at a dose higher than recommended, but easily obtained and tolerated by the body. We hypothesized that copper exposure producing oxidative stress and affecting the bioavailability of nitric oxide, might produce hemodynamic and myocardial contractility dysfunctions.

Materials and methods

Animals

The use and care of animals followed in accordance with the guidelines for biomedical research as stated by the Brazilian Societies of Experimental Biology. The experimental protocols were approved by the local Research Ethics Committee (CEUA/UFES 050/2015).

Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) with approximately 280 g and 12 weeks of age, were kept in cages, subjected to a 12-hour light-dark cycle, under temperature control and with free access to food and water. These animals were randomized into two experimental groups: control group (Ct) and copper group (Cu). The animals assigned for the copper group received daily, intraperitoneal (i.p.) injection of copper chloride solution (CuCl_2) for 30 days dissolved in saline at a dose of 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, a daily dose of copper twice the recommended amount [11,18]. Control animals received for the same period the vehicle (saline) i.p. injection as described above. Each group was housed in independent cages so that animals in the Ct were not exposed to water and excreta from the Cu animals.

Body weight

Prior to beginning of the treatment, weekly and at the end of 30 days of copper exposure, Ct and Cu animals were weighed to assess whether copper exposure changes the weight gain of rats.

Pletismography

The systolic blood pressure (SBP) of the animals was weekly measured indirectly by tail cuff. This protocol was performed to evaluate the effects of copper exposure on the blood pressure of awake animals without possible depressant effects of anesthetics over the weeks of exposure. The methodology used in this protocol followed the manufacturer's recommendations (IITC Life Science non-invasible blood pressure, version 1.35).

Hemodynamics

At the end of 30 days of copper exposure, the animals were anesthetized with urethane (1.2 mg / kg, IP) and the hemodynamic parameters were directly assessed. For this, a cannula (PE 50 Clay-Adams) was used connected to a pressure transducer (TSD 104A-Biopac) connected to a preamplifier interconnected to the Biopac data acquisition system using a sampling rate of 2000 samples/s (MP 30 Byopac Systems, Inc; CA). Continuous BP and heart rate (HR) records were performed and processed by a computer. The following parameters were analyzed: systolic (SBP), diastolic (DBP), heart rate (HR), left ventricular systolic (LVSP) and diastolic pressures (LVEDP); positive (+) and negative (-) left intraventricular pressure derivatives (dP/dt) derived from time-based intraventricular pressure wave recordings.

Evaluation of myocardial contractility of isolated papillary muscles

To evaluate the effects of copper exposure on myocardial contractility, we recorded isometric force of isolated papillary muscles. The animals still anesthetized were submitted to a thoracotomy and the hearts removed and perfused with Krebs-Henseleit solution (in mM: NaCl 120; KCl 5.4; CaCl₂ 1.25; MgCl₂ 1.2; NaH₂PO₄ 2; Na₂SO₄ 1.2; NaHCO₃ 24 and glucose) gassed with 5% O₂ and 95 % CO₂, pH 7.4. The left ventricular papillary muscles were dissected and attached to rings one at a fixed end and the other attached to a force transducer in glass chambers with a volume of 20 mL. The experiments were performed at 26 °C, low temperature, to reduce the possibility of hypoxia [19].

The papillary muscles were electrically stimulated with platinum electrodes positioned along the entire length of the muscle (rectangular pulses 12 ms duration and 10 to 15 V). The default pacing frequency was 0.5 Hz. The muscles were then stretched to the muscle length at which the active tension is maximal (L_{max}). The preparations were maintained for a stabilization period of at least 40 minutes and then the experimental protocols were initiated. Contractile force was measured using an isometric force transducer (TSD125 - Byopac Systems, Inc; CA) coupled to an amplifier (DA100C Byopac Systems, Inc; CA) and recorded by a data acquisition system (MP100 Byopac Systems, Inc; CA). Following the period of stabilization, the experimental protocol was initiated.

Isometric contraction force and contractile kinetics

To investigate whether copper exposure interferes on the functioning of the papillary muscles, we measured: the contraction force (F), the activation and relaxation times and force derivatives positive (dF/dt⁺) and negative (dF/dt⁻). These parameters were evaluated in both experimental groups.

The force developed was normalized by the ratio between the amplitude of contraction, in milligrams (mg), and the weight of the muscle, in mg, to avoid variations promoted by the difference in the size of the muscles used. Activation and relaxation times are the time spent from the onset of contraction to the maximum peak force and the maximum peak to 90% of the isometric relaxation [20].

Indirect evaluation of sarcoplasmic reticulum activity

The post-pause potentiation (PPP) protocol was performed to indirectly assess the effects of copper exposure on RS functional activity. These enhancements were obtained with electrical restimulation after 15, 30 and 60 second pauses applied to the muscle [19]. PPP was evaluated as relative potentiation, calculated as the ratio between the amplitude of contraction after

pause and the amplitude of contraction before pause. This procedure became necessary to avoid variations promoted by the different inotropic state of steady state contractions before the pause.

Evaluation of contractile response to changes in extracellular calcium concentration

To investigate whether copper exposure altered the contractile response to calcium, a concentration-response curve was performed at increasing concentrations of this ion in the extracellular space (0.62, 1.25 and 2.5 mM). The inotropic response in the concentration-response curve was evaluated by the maximum amplitude of the stabilized contraction after the increase in extracellular calcium concentration.

Indirect measurement of sarcolemmal calcium influx by “*post rest contraction-PRC*”

The objective of this protocol was to evaluate the interference of copper exposure on the sarcolemmal calcium influx. Post-rest contractions (PRC) were obtained after 10 minutes in the absence of stimulation. The muscles were placed in a modified calcium-free Krebs solution containing caffeine (5 mM). Caffeine, at this concentration, depletes calcium stores of the RS by keeping ryanodine channels open [21]. Two minutes before the return of electrical stimulation the solution was replaced with the standard Krebs solution. The contractions obtained after rest were calculated as the percentage of the first contraction in relation to the amplitude of the steady state contraction before the pause.

Evaluation of contractile response to β -adrenergic stimulation

To investigate whether copper exposure altered cardiac sympathetic response, incubation was performed with isoproterenol, a (non-selective) β -adrenergic agonist, at a concentration of 10^{-4} M in the well. After functional stabilization of the preparation, the inotropic response was assessed by the maximum amplitude of stabilized contraction after incubation with the agonist.

Evaluation of contractile response in tetanic contractions

To investigate the effects of copper exposure on sarcolemmal Ca^{2+} influx and contractile proteins responsiveness to Ca^{2+} , we evaluated tetanic contractions to assess the myocardial contractile response with nonfunctional SR [21]. The papillary muscle was exposed to Krebs-Henseleit solution containing 5 mM caffeine for 30 minutes. The stimulation rate was 10 Hz for 15 seconds. For experimental purposes we used the force developed at peaks and plateaus of these contractions.

Evaluation of myocardial contractility with L-NAME

NO is an important modulator of the cardiac inotropic state and can vary such modulation according to its concentration [22]. Although there is no preserved coronary bed in this protocol, the substances produced in the coronary vessels that still exist might alter the contractile condition of the cardiomyocytes after 30 days of copper exposure. To evaluate the participation of nitric oxide (NO) locally produced in contractile changes after chronic copper exposure, the protocols previously described were also repeated after 1 hour of incubation with N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 μ M).

Spectrometric analysis

For the analysis of blood copper concentration, blood samples (5 mL) were stored in heparin-treated PVC test tubes (50 U/mL blood) and refrigerated (4°C). Measurement of copper blood concentration was performed by the Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) technique, by a Nexlon 300D equipment, Perkin Elmer. The sample introduction system was aqueous (Meinhard Type C Nebulizer, Bulkhead Cyclonic Chamber, Nickel Cones 1.1 mm i.d.), 200 μ L of blood was added to polypropylene tubes and diluted to 15 mL with Triton X-100 0.005 % m/v in 0.5 % v/v nitric acid. The samples were vortexed vigorously for about 1 min and then centrifuged until reading.

Copper is basically captured and metabolized by hepatocytes and then easily distributed to tissues through ceruloplasmin [23]. Thus, the liver represents the main site of metal accumulation and ceruloplasmin is the most common extrahepatic form, in which slow distribution to tissues occurs [23,24,25]. We know that the increase in copper tissue deposition in cells can be toxic, however, little is elucidated about the other tissues in which the accumulation of this metal occurs and its effects [24,25]. For this reason, we carried out the measurement of copper in different organs and tissues to know the result of the distribution of the metal with the treatment used in the present study.

In addition to the blood sample, the organs and tissues were removed: brain, heart, kidneys, liver, lung, tibia and aorta. They were washed with saline solution, stored at -20°C and sent in a thermal reservoir at 4°C to the UFES Analytical Chemistry laboratory (LQA). Tissue deposition was analyzed by graphite furnace Atomic Absorption Spectrometry (GF AAS) by AAS ZEE nit 700 BU (Analytik Jena). The sample introduction system was automatic, in which the sample was prepared by microwave-assisted acid decomposition. The operating conditions of the GF AAS equipment were adequate for reading the metal of choice, copper.

***In situ* evaluation of the production of OH[•] and O₂^{•-}**

The oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) and hydroxyphenyl fluorescein (HPF) were used to evaluate superoxide anion (O₂^{•-}) and hydroxyl radical (OH[•]) production *in situ* respectively, as described by Wiggers and Setsukinai [26,27]. DHE in the presence of O₂^{•-} and HPF in the presence of OH[•] react and are converted to fluorescein with consequent light emission at 610 nm. Frozen tissue from left ventricular papillary muscle segments were cut into 10-µm-thick sections and placed on a glass slide. Serial sections were equilibrated under identical conditions for 30 min at 37°C in Krebs-HEPES buffer (in mM: 130 NaCl, 5.6 KCl, 2 CaCl₂, 0.24 MgCl₂, 8.3 HEPES, and 11 glucose, pH 7.4). Fresh buffer containing DHE (2 M) and HPF (10 µM) was applied topically on each tissue section, covered with a cover slip, incubated for 30 min in a light-protected humidified chamber at 37°C, and then viewed with a fluorescent laser-scanning confocal microscope (Leica TCS SP2 equipped with a krypton/argon laser, x40 objective) using the same imaging settings in control and treated groups. Images of both groups were digitized by a Leica DM 2500 fluorescence microscope equipped with a Leica DFC 310 FX camera. Samples of five frozen tissue segments per animal were used for each experimental condition and the mean was calculated for quantification. The average fluorescence densities in the target region were calculated using the ImageJ 1.44p software.

Molecular Biology

Proteins from homogenized hearts were separated by 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes and then incubated overnight with monoclonal antibodies to:

- SERCA-2a: anti-SERCA2 ATPase mouse monoclonal antibodies, 1:1000, ThermoScientific, Rockford, EUA.
- Phosfolamban: 1:1000 mouse monoclonal anti-PLB antibody Santa Cruz, California, EUA.
- Phosfo-Ser¹⁶-phosfolamban: 1:1000 polyclonal rabbit anti-fosfo-Ser¹⁶-PLB, 1:1000, Badrilla, West Yorkshire, RU.
- Na⁺/Ca²⁺-Exchanger (NCX): goat anti-NCX monoclonal antibodies, 1:1000, Thermo Scientific, Rockford, USA.
 - Na⁺/K⁺ ATPase: NKA anti-α-1 rat monoclonal antibody, 1:500, Santa Cruz, California, EUA.

After washing, the membranes were incubated with anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin antibody conjugated to anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat IgG immunoglobulin (1:5000,

Sigma Aldrich) and peroxidase-conjugated Streptactin (1:5000, Bio-rad, California, USA). Proteins were detected by chemiluminescence reaction by membrane incubation to a detection system (ECL Plus, Amersham TM, GE Healthcare, UK) and were recorded by ChemiDoc XRS+ transilluminator (Bio-rad, California, USA) with optimized exposure by the device. Densitometric analysis was used to quantify protein bands using Image Lab 6.1 software (Bio-rad, California). The densitometry results of each band of the protein of interest were normalized by quantifying the total protein of each sample obtained by UV light stimulation.

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard error of the mean. The values of “n” represent the number of animals used in each experimental protocol. Statistical analysis was performed using unpaired Student's t-test and/or one or two-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA was significant the Fisher's post-test was used to compare means. $P < 0,05$ values were considered statistically significant. Data analysis and the plot of figures were performed using the GraphPad Prism System (San Diego, CA, USA) and GB-STAT (Dynamic Microsystem Inc., Silver Spring, MD, USA).

Results

Ponderal evaluation

Rats were weighed before (initial weight) and over the next 4 weeks of treatment. Body weight was similar between groups at the beginning of treatment and at the end of the treatment, Cu group showed a lower weight gain compared to Ct.

Moreover, the heart and tibia of the treated animals (Cu) are proportionally smaller than that of the control animals. Especially, the absolute weight of the heart and its correlation with the length of the tibia was proportionally lower in the copper group, and thus demonstrated that there was no cardiac hypertrophy (Table 2).

Blood and tissue copper concentrations

At the end of the 30 days of copper exposure, blood and tissue samples were collected for spectrometric measurement of the metal concentration. Copper levels in the blood were increased in the Cu group (Ct=0.024 $\mu\text{g/mL}$; Cu= 1.26 $\mu\text{g/mL}$, n=9, $P < 0.0001$).

After absorption, hepatic copper uptake occurs and is then distributed to tissues in the free form or linked to small plasma proteins or ligands, mainly ceruloplasmin [23,24,25]. Usually

copper distribution occurs quickly in the blood and reaches its target site. However, the metal may bind to other constituents of the body and concentrate on some parts of the body. These places of higher concentration serve as reservoirs of metal in the body, acting to maintain the concentration of metal in the blood and its effects on other tissues [28,29]. In order to elucidate the form of distribution and possible copper reserves in the body caused by the metal exposure of the present study, we carried out the measurement of copper in different organs and tissues.

Table 3 describes the tissue copper deposition in the evaluated organs and tissues: Heart, aorta, liver, brain, lung, tibia and kidneys. The copper accumulation was greater in the liver, tibia and kidneys of the treated animals compared to Ct. In the heart, lung, aorta and brain the concentration of copper was similar between the groups.

Pletismography

In relation to the measurement of BP performed by plethysmography with the awake animal, Cu showed an increase in SBP compared to Ct. SBP at the beginning of the treatment was similar in both groups (Ct: 121 ± 6.7 mmHg; Cu: 122 ± 4.1 mmHg; N=8; $P>0.05$). However, after the first week of Cu treatment, SBP increased in relation to Ct. The SBP of the treated animals remained high over the following weeks. At the end of the exposure period, the SBP values were 132 ± 3 mmHg and 141 ± 3 mmHg, for Ct and Cu, respectively (Figure 1).

Hemodynamics

The treated animals showed an increase in arterial and ventricular pressure, and HR, as shown in table 4. We observed that the copper exposure promoted an increase of approximately 15 mmHg in the SBP and DBP. The HR of the treated group was high in relation to Ct by approximately 30 bpm. As for the assessment of left ventricular performance (Table 4) copper exposure was able to increase LVSP by approximately 30 mmHg in relation to Ct. The increase of time derivatives, positive ($dP/dt+$) and negative ($dP/dt-$), of left ventricular pressure was also evident.

Myocardial contractility

The weight of wet papillaries was obtained at the end of all experimental protocols performed *in vitro* and the treatment did not change the weight of the left ventricle papillary muscles (results not shown).

The contractile force developed by the isolated papillary muscles was greater in Cu when compared to Ct (Figure 2 A). Although there is a change in the isometric strength of the papillary muscles in Cu, figure 3 B shows that the resting tension exerted by the papillary muscles remained similar in both experimental groups. The indices of contractility and relaxation, positive and negative dF/dt (Figures 2E and F), did not change under copper exposure. These findings had no changes because the time parameters of contraction, the activation (Figure 2 C) and relaxation times (Figure 2 D), were longer in Cu compared to Ct.

Indirect assessment of sarcoplasmic reticulum activity

For the indirect evaluation of the activity of the sarcoplasmic reticulum (RS), the protocol called post-pause potentiation (PPP) of 15, 30 and 60 seconds was used [19]. Figure 3 A shows that copper exposure resulted in a reduction in PPP after a pause of 30 and 60 seconds and suggests less Ca^{2+} released by SR.

Evaluation of the inotropic response to extracellular calcium

Figure 3 B shows that the higher the calcium concentration, the greater the force developed by the papillary muscles, but the contractile response of copper-treated papillaries was greater compared to Ct. This finding corroborates the results of figure 2.

Indirect assessment of sarcolemmal Ca^{2+} influx

This protocol allowed to evaluate the permeability of the sarcoplasmic membrane to Ca^{2+} . Figure 3 C showed that copper exposure promoted an increase in PRC compared to Ct, suggesting an increase of the sarcolemmal Ca^{2+} influx after 30 days of exposure.

Evaluation of contractile response to β -adrenergic stimulation

Isoprotorenol promoted an increase in the strength developed by the papillary muscles in both experimental groups. However, the positive inotropic response expressed as a percentage in relation to the steady state contractions was smaller in Cu (Figure 3 D). These findings are suggestive that copper exposure may affect the activity or regulatory mechanisms of β -adrenergic receptors, reducing the inotropic response to sympathetic stimulation.

Evaluation of tetanic contractions

In order to investigate the influx of sarcolemmal calcium and the sensitivity of contractile proteins, the protocol of tetanic contractions was performed. Initially there was a sudden increase in force dependent mainly on the influx of Ca^{2+} into the cardiomyocyte, which

corresponds to the peak of tetanic contraction. Then the plateau was formed, with a decrease in the developed contraction force in Cu group.

Figure 3 E and F shows the increase in the peak and plateau of tetanic contractions after copper exposure. This finding corroborates the results previously described in the Ca^{2+} curve protocol (Figure 3 B) and the PRC (Figure 3 C).

Myocardial contractility with L-NAME

The effect of nitric oxide modulation on the cardiac inotropic state is known. NO promotes the phosphorylation of troponin I by protein kinase C (PKG), decreasing the affinity of troponin C to calcium in cardiomyocytes reducing force. In addition, PKG is also able to suppress the increase of the calcium current caused by the phosphorylation of type L calcium channels, modulating the cardiac inotropic state [22].

In the present study, we used a preparation of isolated papillary muscles *in vitro* without preserving the entire coronary bed, and so there is no way to evaluate the direct inotropic effect of NO production. However, the 30 days of treatment could alter the bioavailability of NO and produce oxidative stress. These changes could impair the contractile condition of the heart. To investigate the participation of NO in changes in cardiac contractility after 30 days of copper exposure, the protocols previously described were repeated in the presence of L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor (NOS).

The force of the papillary muscles after incubation with L-NAME remained increased in the copper treated groups compared to Ct (Figure 4 A). This result suggests that NO play no role on the mechanisms of development of the contraction force of the papillary muscles. In addition, there was no difference of force development between groups (Figure 4 B). Evaluating the contractility and relaxation time parameters it was seen that the activation and relaxation times (Figure 4 C and D) remained larger in Cu compared to Ct. However, the relaxation time had its increase prevented after L-NAME (Figure 4 D) although the positive and negative time derivatives (Figure 4E and F) remained unchanged after L-NAME.

Indirect assessment of sarcoplasmic reticulum activity after L-NAME incubation

After the copper exposure, the relative potentiation was reduced at pauses of 15, 30 and 60 seconds, suggesting that there is interference in the function of the SR. In order to evaluate the participation of NO on the activity of the sarcoplasmic reticulum (RS) indirectly, L-NAME was used. We observed that the papillaries of animals treated with copper and the papillaries incubated with L-NAME (Cu, Ct L-NAME and Cu L-NAME) showed less relative potentiation after pauses of 15, 30 and 60 seconds compared to Ct (Figure 5 A). Papillary

muscles exposed to copper exhibited the same behavior as those incubated with L-NAME. These data suggest that the metal might interfere with the functioning of the RS and that there is NO involvement in these mechanisms.

NO participation in the inotropic response to extracellular Ca^{2+}

Copper exposure increased the force of contraction of the papillary muscles in the presence of different concentrations of extracellular Ca^{2+} (Figure 3 B). The developed force kept greater in the Cu group after L-NAME compared to Ct in all CaCl_2 concentrations (Figure 5 B).

NO evaluation in post-rest contraction (PRC).

Copper exposure showed an increase in the contractile response after 10 minutes of pause, suggesting an increased Ca^{2+} influx through the sarcolemma (Figure 3 C). And L-NAME reduced the contractile response of the papillaries of both groups to the parameters of the control group (Figure 5 C). These data suggest that copper increases the sarcolemmal Ca^{2+} influx, enhancing the contractile response. However, the contractile response of the papillaries exposed to copper reduced to the values of the Ct group after blocking NO synthesis.

Evaluation of tetanic contractions and contractile response to β -adrenergic stimulation

After copper exposure, the inotropic response to isoproterenol was reduced compared to Ct (Figure 3 D). L-NAME did not restore the effects promoted by copper exposure (Figure 5 D). Figure 5 E and F shows that copper increased the contractile response at both peak and plateau in tetanic contractions. The effects produced by copper exposure at the peak of tetanic contractions were not modified in the presence of L-NAME (Figure 5 E). However, the force developed in the plateau of tetanic contractions by the papillary muscles of the treated group was reduced to the Ct level, when NO synthesis was inhibited (Figure 5 F).

“*In situ*” detection of $\text{O}_2^{\bullet-}$ and OH^{\bullet}

In order to investigate the effects of local copper exposure through the formation of free radicals, an in-situ immunofluorescence evaluation was performed to determine the production of superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) and hydroxyl radical (OH^{\bullet}), by incubation with DHE and HPF, respectively. The production of $\text{O}_2^{\bullet-}$ “in situ” was not different between groups (Figure 6 A and B). However, Cu showed OH^{\bullet} production approximately six times greater than the Ct (Figure 6 C and D). These data suggest that the copper exposure model used in the present study promoted oxidative stress by increasing OH^{\bullet} and induced cardiovascular changes, corroborating the functional results found.

One way that copper can induce oxidative stress is by catalyzing the formation of ROS via Fenton reaction. The cupric ion associated with a superoxide anion radical, can be reduced to

a cuprous ion, which is able to catalyze the formation of hydroxyl radicals through the decomposition of hydrogen peroxide via Fenton reaction [30,31]. This data may justify the findings of the present study, since we found an increase in the production of OH^\bullet without increasing the production of $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Biochemical evaluation

To investigate the effects of copper on the proteins involved with calcium handling we use the Western Blot technique. Figure 7 shows that copper exposure did not alter the protein expression of cardiac contractility regulating proteins, SERCA 2a, Na/K-ATPase, NCX, PLB and pPLB.

Discussion

The results of the present study showed that copper exposure two times greater than recommended daily intake [32] increases SBP, DBP, HR, LVSP, LVEDP, $\text{dP/dt}^+_{\text{LV}}$ and $\text{dP/dt}^-_{\text{LV}}$ *in vivo*. *In vitro*, copper exposure increased the force development of left ventricle papillary muscles and reduced Ca^{2+} released by sarcoplasmic reticulum. The copper treatment was capable of reducing the inotropic response to β -adrenergic stimulation and increased the sarcolemmal Ca^{2+} influx. These results suggest that the increase in force may occur due to the greater Ca^{2+} influx, although the RS has a lower reserve of Ca^{2+} . Copper increased oxidative stress in the papillary muscles by increasing OH^\bullet . The total blood copper concentration was 1.26 $\mu\text{g/L}$, 700 times greater than the Ct and the site of greatest metal accumulation was the liver, followed by the kidneys and tibia. This finding suggests that regarding the popularity of micro-minerals and vitamin self-administration, we must have some concern about the limits of copper blood concentration. Finally, there is no evidence of cardiac hypertrophy by the ratio of cardiac mass and tibia length.

Copper homeostasis is essential for the enzyme and the body to function properly. Therefore, when there is a deficiency of this metal in the body the performance of various organs and defense systems is compromised. On the other hand, when in excess it can cause toxic effects and follow up on Fenton's reactions, with probable cell damage and death [5,6,7,33]. Among the effects of copper toxicity are neurodegenerative diseases [34] and increased mortality from cardiovascular diseases [12,13,15]. Chronic copper toxicity is not common in healthy individuals due to self-regulation by the body through intestinal absorption and excretion by bile. However, if the individual has liver disease or other conditions that compromise biliary excretion, he may have serious effects of metal toxicity [35,36].

Arnal *et al.* [37] demonstrated that the copper blood concentration varies from 0.3 to 2.1 $\mu\text{g/mL}$. Population studies have shown that healthy individuals have 1 $\mu\text{g/mL}$ blood copper [38,39]. It is important to note that there is a great variation in the concentration of the metal in the studies presented, which can cause great impact and alter the functioning of the organism. Rocha *et al.* [39] demonstrated a difference in the copper blood concentration between men and women, 0.8 $\mu\text{g/mL}$ and 1.4 $\mu\text{g/mL}$ respectively, due to the influence of estrogens on copper metabolism [40]. In the present study, the copper blood concentration was 1.26 $\mu\text{g/mL}$ in male animals, which corresponds to that value found in the female population of the previous study.

There is still no consensus on the doses considered safe for daily copper intake. In the United States and Canada, for example, the recommended daily copper intake is 0.9 mg/day, with a maximum tolerable 10 mg/day of copper for an adult (Trumbo, P. *et al.* 2001). The Food Nutrition Board of the Institute of Medicine [11] recommend a daily intake of 0.9 mg for adults and is according to resolution 269 of September 22, 2005 of National Health Surveillance Agency in Brazil [41].

We observed an increased force development in papillary muscles and oxidative stress by increased OH^\bullet production. Nunes *et al.* [42] observed an increase in oxidative stress and NO production when assessing vascular reactivity after acute copper exposure (10 $\mu\text{g/mL}$) and corroborates our data. However, Filetti *et al.* [16] showed that acute exposure to copper at the same concentration reduces the force development of papillary muscles due to less Ca^{2+} release by RS and reduced calcium influx by sarcolemma. Our results were different from those of acute copper exposure, suggesting that adaptive changes occurred during chronic copper exposure.

Benders *et al.* [43] demonstrated that copper can increase the intracellular concentration of Ca^{2+} due to inhibition of the Na^+/K^+ -ATPase pump, generating a reverse influx of Ca^{2+} by the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger into human skeletal muscle cells. Severe heart failure and atrial fibrillation has been associated to increased zinc and copper blood concentration, altering the conduction of the membrane potential and prolonging the opening of L type calcium channels [44]. In situations where the Ca^{2+} concentration is altered, it changes the amplitude and speed of the cytosolic transients of Ca^{2+} , impacting the development of force during systole and relaxation during diastole [45,46]. These studies show that copper can increase the concentration of intracellular Ca^{2+} and corroborates our findings. In papillary muscles exposed to copper we found an increase in the force of contraction of extracellular Ca^{2+} and reduction in the SR Ca^{2+} release. These findings suggest a greater sarcolemmal Ca^{2+} influx, which is in

accordance with increased calcium influx after the resting pause, although the SR has a lower reserve of Ca^{2+} . Filetti *et al.* [16] demonstrated that acute copper overload (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) reduces myosin-ATPase activity and our results in a chronic copper exposure model suggest adaptive changes in these mechanisms.

Greater sympathetic autonomic activity may be one of the main mechanisms involved in maintaining cardiac inotropism [47,48]. Our results show that copper exposure increases BP and HR (Table 4). We investigated whether copper exposure promoted an increased sympathetic stimulation with isoproterenol. We observed that the sympathetic activation maintained during the 30 days of exposure reduced the positive inotropic response to isoproterenol. Possibly, the sympathetic activity promoted the desensitization of $\beta 1$ -adrenergic receptors, evidenced by the decrease of the contractile response to isoproterenol. Toscano *et al.* [49] also demonstrated that chronic lead treatment increases BP and HR via sympathetic stimulation, causing downregulation of $\beta 1$ -adrenergic receptors, corroborating our findings.

Copper induces the production of reactive oxygen species (ROS) [50]. In addition, the reduction in NO activity caused by decreased synthesis or by its degradation through oxidative stress may be one of the factors that trigger cardiovascular dysfunctions [51]. Although the coronary bed is not preserved in the *in vitro* preparation of the present study, the 30 days of exposure to copper could reduce the bioavailability of NO and impair the contractile condition of cardiomyocytes [26,52,53].

Superoxide anion is probably not the only radical that can react with NO [54]. In the present study we demonstrated significant increased OH^\bullet production without altering $\text{O}_2^{\bullet-}$ production (figure 6). The increase in OH^\bullet formation via Fenton or Haber-Weiss reactions has already been associated to reduce NO activity in vascular relaxation in diabetics rats [55,56]. Our results suggested increased OH^\bullet production and the participation of NO in the regulatory mechanisms of SR activity (Figure 5 A and B), in the sarcolemmal Ca^{2+} influx (Figure 5 C), in the permeability of cardiomyocytes to Ca^{2+} and in the affinity of contractile proteins to this ion (Figure 5 E and F). Nunes *et al.* [42] demonstrates that acute copper exposure (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) impairs the contractile response of rat aortic rings, increases NO production and the activation of potassium channels, with consequent vasodilation. This same study suggest the uncoupling of the cofactor of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), leading to increased production of

$O_2^{\bullet-}$ and consequently activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS). It is worth emphasizing the effect of free radical by suppressing a vasodilator mechanism.

Copper toxicity can result in significant oxidative stress and subsequent tissue damage, which occurs in part as a result of its ability to produce the OH^{\bullet} [57,58]. This is the ROS considered to be more reactive and capable of quickly interacting with molecules and metals, since no endogenous antioxidant agent is able to neutralize its actions. The OH^{\bullet} generated can cause important functional changes, inactivation of enzymes, of the components of the cell membrane or even cause DNA modification [58]. This statement reinforces our results, which suggest that copper exposure caused a significant increase in the production of OH^{\bullet} without altering the production of $O_2^{\bullet-}$ (Figure 6).

ROS can influence Ca^{2+} homeostasis and cell signaling through post-translational modifications, inhibiting Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in rat cardiomyocytes [59]. As a result, ROS modulate the proteins involved in Ca^{2+} mobilization [60]. This modulation occurs due to the oxidation of Ryanodine and SERCA-2a receptors, reflecting an increase in the Ca^{2+} release and a decrease in the Ca^{2+} uptake by SR [61] and contributes to the slower Ca^{2+} transients [62,63]. This hypothesis justifies our findings regarding the release of Ca^{2+} from the sarcoplasmic reticulum and the sensitivity of contractile proteins to the ion.

Final considerations

Our work demonstrated that 30 days of exposure to a daily dose of copper twice the recommended amount, although representing a blood concentration of copper tolerable for the body, might increase blood pressure, HR and cardiac inotropism. In addition, we demonstrated for the first time that chronic copper exposure promotes changes in the calcium cycle in cardiomyocytes and in SR function. These effects are the result of an increase in oxidative stress and a consequent reduction in NO bioavailability. We cannot conclude that $O_2^{\bullet-}$ has been completely suppressed, but our results show that OH^{\bullet} was the main source of oxidative stress. Therefore, we suggest that the recommended daily dose for copper intake must be revised, because when in excess it contributes to the toxic effects of metal in the body.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Funding

This work was supported by grants from No 23038.006534/2016-93-CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CAPES/PNPD (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - PNPD-Institucional), No 48511935/2009 PRONEX—FAPES/CNPq (Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and No 44181/2014-9 Edital Universal/CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Atomic Spectrometry Laboratory- LEA (LabPetro/UFES) by analyzing copper in tissues and the Laboratory of Molecular Histology and Immunohistochemical (Health Sciences Center UFES) by the use of the equipment for histological processing and analysis.

References

- [1] Eskici G, Axelsen PH, 2012. Copper and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem.* 51: 6289–6311.
- [2] Linder MC, 1996. Copper In: Ziegler Ee, Filer, Jr. Lj (Eds). *Present Knowledge In Nutrition.* 7 Ed. Washington, Dc: Ilsi Press. 307-19.
- [3] Osredkar J, Sustar N, 2011. Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J ClinicToxicol.* doi: 10.4172/2161-0495.S3-001.
- [4] Amancio OMS, 2011. *Funções Plenamente Reconhecidas De Nutrientes: Cobre.* ILSI Brasil.v.19. ISBN: 978-85-86126-37-6.
- [5] Harris, ED, 2001. Copper homeostasis: the role of cellular transporters. *Nutr Rev.* 59: 281-285. doi: 10.1111/j.1753-4887.2001.tb07017.x.
- [6] Keen CL, Hanna LA, Lanoue L, Uriu-Adams JY, Rucker RB, Clegg MS, 2003. Developmental Consequences of Trace Mineral Deficiencies in Rodents: Acute and Long-Term Effects. *J Nutr.* 133 (5): 1477S–1480S. doi:10.1093/jn/133.5.1477s
- [7] Saari JT, 2000. Copper deficiency and cardiovascular disease: role of peroxidation, glycation, and nitration. *Can J PhysiolPharmacol.* 78(10): 848–855. doi:10.1139/y00-054.
- [8] Bagheri B, Akbari N, Tabiban S, Habibi V, Mokhberi V, 2015. Serum level of copper in patients with coronary artery disease. *Niger Med J.* 56 (1): 39-42. doi: 10.4103/0300-1652.149169.

- [9] Alves C, Lima RVB, 2009. Dietary Supplement Use by Adolescents. *J Pediatr.* 85 (4): 287-94.
- [10] Araya M, Olivares M, Pizarro F, Méndez MA, González M, Uauy R, 2005. Supplementing copper at the upper level of the adult dietary recommended intake induces detectable but transient changes in healthy adults. *J Nutr.* 135: 2367-71.
- [11] ATSDR, 2004. 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.
- [12] Reunanen A, Knekt P, Marniemi J, Maki J, Maatela, J, Aromaa A., 1996. Serum calcium, magnesium, copper and zinc and risk of cardiovascular death. *Eur J Clin Nutr.* 50: 431-437.
- [13] Ford ES, 2000. Serum Copper Concentration And Coronary Heart Disease Among Us Adults. *Am. J. Epidemiol.* 151: 1182-1188.
- [14] Tsuboi A, Terazawa M, Kazumi T, Fukuo K, 2014. Serum copper, zinc and risk factors for cardiovascular disease in community-living Japanese elderly women. *Asia Pac J Clin Nutr.* 23 (2): 239-245. doi: 10.6133/apjcn.2014.23.2.04
- [15] Shokrzadeh M, Ghaemian A, Salehifar E, Aliakbari S, Saravi SS, Ebrahimi P, 2009. Serum zinc and copper levels in ischemic cardiomyopathy. *Biol Trace Elem Res.* 127:116-23. doi: 10.1007/s12011-008-8237-1.
- [16] Filetti FM, Vassallo DV, Fiorese M, Simões MR, 2018. Reactive oxygen species impair the excitation-contraction coupling of papillary muscles after acute exposure to a high copper concentration. *Toxicol In Vitro.* 51: 106-113.
- [17] Ferns GAA, Lamb DJ, Taylor A, 1997. The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus. *Atheroscler.* 133: 139–52.
- [18] Chattopadhyay A, Sarkar M, Biswas NM, 2002. Effect of copper chloride on adrenocortical activities in adult and immature male rats. *Environ Toxicol Pharmacol.* 11(2): 79-84. doi: 10.1016/s1382-6689(01)00107-7
- [19] Vassallo DV, Mill JG, 1988. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. *Acta physiol pharmacol latino am.* 38: 87-97.
- [20] Vassallo DV, et al., 2008. Lead reduces tension development and the myosin ATPase activity of the rat right ventricular myocardium. *Braz J Med Biol Res.* 41: 789-795.
- [21] Leite CM, Vassallo DV, Mill, JG, 1995. Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. *Can J Physiol Pharmacol.* 73: 638-643.

- [22] Layland J, Li JM, Shah AM, 2002. Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 540 (2): 457–467. doi:10.1113/jphysiol.2001.014126.
- [23] Cousins RJ, 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol Rev.* 65(2): 238–309. doi:10.1152/physrev.1985.65.2.238.
- [24] Owen CA, 1965. Metabolism of radiocopper (Cu64) in the rat. *Am. J. Physiol. Legacy Content.* 209(5): 900–904. doi:10.1152/ajplegacy.1965.209.5.900.
- [25] Jing M, Liu Y, Song W, Yan Y, Yan W, Liu R, 2015. Oxidative damage induced by copper in mouse primary hepatocytes by single-cell analysis. *Environ Sci Pollut R.* 23(2): 1335–1343. doi:10.1007/s11356-015-5360-3.
- [26] Wiggers GA, Peçanha FM, Briones AM, Pérez-Girón JV, Miguel M, Vassallo DV, Cachofeiro V, Alonso MJ, Salaices M, 2008. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *Am J Physiol.* doi:10.1152/ajpheart.00430.2008.
- [27] Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T, 2003. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem.* 278 (5): 3170–5. doi: 10.1074/jbc.M209264200
- [28] Delange P, Mintz E, 2012. Chelation therapy in Wilson’s disease: from D-penicillamine to the design of selective bioinspired intracellular Cu(I) chelators. *Dalton T.* 41: 6359-6370. doi: 10.1039/c2dt12188c.
- [29] Pedrosa LFC, Cozzolino SMF, 1999. Metabolic and functional changes of copper in diabetes mellitus. *Nutrition magazine.* 12(3): 213-224.
- [30] Prousek J, 1995. Fenton reaction after a century. *Chem. Listy* 89: 11–21.
- [31] Barbusinski K, 2009. Fenton reaction-controversy concerning the chemistry. *Ecol. Chem. Eng.* 16: 347–358.
- [32] Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M, 2001. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc.* 101: 294– 301.
- [33] Husain N, Mahmood R, 2019. Copper (II) generates ROS and RNS, impairs antioxidant system and damages membrane and DNA in human blood cells. *Environmental Science and Pollution Research.* doi:10.1007/s11356-019-05345-1
- [34] Brewer GJ, 2010. Risks of copper and iron toxicity during aging in humans. *Che Res Toxicol.* 23: 319-26. doi: 10.1021/tx900338d.

- [35] Araya M, Pizarro F, Olivares M, Arredondo M, González M, Méndez M, 2006. Understanding copper homeostasis in humans and copper effects on health. *Biol Res.* 39: 183-187. doi: 10.4067/s0716-97602006000100020.
- [36] Huff JD, Keung YK, Thakuri M, Beaty MW, Hurd DD, Owen J, Molnár I, 2007. Copper deficiency causes reversible myelodysplasia. *Am J Hematol.* 82(7): 625–630. doi:10.1002/ajh.20864.
- [37] Arnal N, De Alaniz MJ, Marra CA, 2010. Involvement of Copper Overload in Human Diseases, in: M.S. Giménez (Ed.), *Research Sign post/Transworld Research Network, Kerala, India.* 1: 1-28.
- [38] Zhang LL, Lu L, Pan YJ, Ding CG, Xu DY, Huang CF, Pan XF, Zheng W, 2015. Baseline blood levels of manganese, lead, cadmium, copper, and zinc in residents of Beijing suburb. *Environ Res.* doi: 10.1016/j.envres.2015.03.008.
- [39] Rocha GH, Steinbach C, Munhoz JR, Madia MA, Faria JK, Hoeltgebaum D. Rocha GH, Steinbach C, Munhoz JR, Madia MA, Faria JK, Hoeltgebaum D, Barbosa F Jr, Batista BL, Souza VC, Nerilo SB, Bando E, Mossini SA, Nishiyama P, 2016. Trace metal levels in serum and urine of a population in southern Brazil. *J Trace Elem Med Biol.* 35: 61– 65. doi: 10.1016/j.jtemb.2015.12.005.
- [40] Klinc M, Coskun A, Bilge F, Imrek S, Atli Y, 2010. 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.* 24: 152–6. doi: 10.1016/j.jtemb.2010.01.004.
- [41] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005. O Regulamento Técnico Sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005.
- [42] Nunes KZ, Fioresi M, Marques VB, Vassallo DV, 2018. Acute copper overload induces vascular dysfunction in aortic rings due to endothelial oxidative stress and increased nitric oxide production. *J Toxicol Environ Health A.* 81(8): 218–228. doi:10.1080/15287394.2018.1437490.
- [43] Benders AA, Li J, Lock RA, Bindels RJ, Bonga SE, Veerkamp JH, 1994. Copper toxicity in cultured human skeletal muscle cells: the involvement of Na⁺/K⁺-ATPase and the Na⁺/Ca²⁺-exchanger. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 428: 461-467. doi:10.1007/bf00374566.
- [44] Ghaemian A, Salehifar E, Jalalian R, Ghasemi F, Azizi S, Masoumi S, Shiraj H, Mohammadpour RA, Bagheri GA, 2011. Zinc and Copper Levels in Severe Heart Failure and the Effects of Atrial Fibrillation on the Zinc and Copper Status. *Biol Trace Elem Res.* 143(3): 1239–1246. doi:10.1007/s12011-011-8956-6.

- [45] Bers DM, 2006. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda)*. 21: 380–387. doi: 10.1152/physiol.00019.2006.
- [46] Luo M, Anderson ME, 2013. Mechanisms of Altered Ca²⁺ Handling in Heart Failure. *Circ. Res.* 113(6): 690–708. doi:10.1161/circresaha.113.301651.
- [47] Bers DM, 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 415: 198–205. doi: 10.1038/415198a.
- [48] Jakob H, Nawrath H, Rupp J, 1988. Adrenoceptor-mediated changes of action potential and force of contraction in human isolated ventricular heart muscle. *Br J Pharmacol.* 94(2): 584-90. doi: 10.1111/j.1476-5381.1988.tb11564.x
- [49] Toscano CM, Simões MR, Alonso MJ, Vassallo DV, Fioresi M, 2017. Sub-chronic lead exposure produces β 1-adrenoceptor downregulation decreasing arterial pressure reactivity in rats. *Life Sciences*. 180 (2017) 93–101. doi:10.1016/j.lfs.2017.05.009.
- [50] Samuni A, Moderchai C, Czapski G, 1981. Unusual Copper-induced Sensitization of the Biological Damage Due to Superoxide Radicals. *J Biol Chem.* 24: 12632-12635.
- [51] Pepine CJ, 2009. The Impact of Nitric Oxide in Cardiovascular Medicine: Untapped Potential Utility. *Am J Med.* 122(5): S10–S15. doi:10.1016/j.amjmed.2009.03.003
- [52] Furieri LB, Galan M, Avendaño MS, García-Redondo AB, Aguado A, Martinez S, Cachofeiro V, Bartolomé MV, Alonso MJ, Vassallo DV, Salaices M, 2011. Endothelial dysfunction of rat coronary arteries after exposure to low concentrations of mercury is dependent on reactive oxygen species. *Br J Pharmacol.* 162(8): 1819–1831. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01203.x.
- [53] Fioresi, M., Furieri, L. B., Simões, M. R., Ribeiro Júnior R. F., Meira, E. F., Fernandes, A. A., Stefanon, I., Vassallo, D. V., 2013. Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development. *Braz J Med Biol Res.* 46:178-85. Doi: 10.1590/1414-431X20122190.
- [54] Cai H, Harrison DG, 2000. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ Res.* 87:840-844. doi: 10.1161/01.RES.87.10.840.
- [55] Ohkuwa T, Sato Y, Naoi M, 1995. Hydroxyl radical formation in diabetic rats induced by streptozotocin. *Life Sci.* 56(21), 1789–1798. doi:10.1016/0024-3205(95)00150-5.
- [56] Pieper GM, Langenstroer P, Siebeneich W, 1997. Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. *Cardiovasc Res.* 34(1): 145–156. doi:10.1016/s0008-6363(96)00237-4.
- [57] Halliwell B, Gutteridge JMC, 1998. Free Radicals in biology and medicine. Oxford Science Publications: Carbohydr Polym. 26(3): 243. doi:10.1016/0144-8617(95)90055-1.

- [58] Gaziano JM, Sesso HD, Christen WG, Bubes V, Smith JP, MacFadyen J, Schvartz M, Manson JE, Glynn RJ, Buring JE, 2012. Multivitamins in the prevention of cancer in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA*. 14; 308(18): 1871-80.
- [59] Cherednichenko G, Hurne AM, Fessenden JD, Lee EH, Allen PD, Beam KG, Pessah IN, 2004. Conformational activation of Ca^{2+} entry by depolarization of skeletal myotubes. *Proc Natl Acad Sci*. 101(44): 15793–15798. doi:10.1073/pnas.0403485101.
- [60] Stamler JS, Hausladen A, 1998. Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nat Struct Biol*. 5(4): 247–249. doi:10.1038/nsb0498-247.
- [61] Balderas-Villalobos J, Molina-Muñoz T, Mailloux-Salinas P, Bravo G, Carvajal K, Gómez-Viquez NL, 2013. Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 305: H1344–H1353. doi:10.1152/ajpheart.00211.2013.
- [62] Kaneko M, Beamish RE, Dhalla NS, 1989. Depression of heart sarcolemmal Ca^{2+} -pump activity by oxygen free radicals. *Am J Physiol*. 256(2):H368–H374. doi:10.1152/ajpheart.1989.256.2.h368.
- [63] Rueckschloss U, Villmow M, Klöckner U, 2010. NADPH oxidase-derived superoxide impairs calcium transients and contraction in aged murine ventricular myocytes. *Exp Gerontol*. 45(10): 788–796. doi:10.1016/j.exger.2010.05.002.

Highlights

- Copper exposure increased BP;
- The force of papillary muscles are increased in copper exposure;
- Chronic copper exposure increased oxidative stress;
- Increased OH^\bullet production "in situ" in copper exposure.

Legends for figures

Figure 1. Systolic blood pressure (SBP) in rats treated with copper (Cu) and control group (Ct) during 4 weeks of treatment by plethysmography. SBP is shown in mmHg on the ordinate axis and the time of exposure to copper is shown in days of treatment on the abscissa axis. The data are presented in Mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs Ct. 2-way ANOVA followed by Fisher's post-test.

Figure 2. In vitro evaluation after copper exposure of isometric strength (A) and basal tension (B) developed by the LV papillary muscles of rats in the control (Ct) and treated (Cu) groups; temporal parameters of contraction, activation time (C) and relaxation (D), positive and negative derivatives of the contraction force, $dF / dt +$ (E) and $dF / dt -$ (F). The numbers in parentheses correspond to the number of papillaries studied. The data are expressed as Mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs Ct. Unpaired Student's t-test.

Figure 3. In vitro evaluation of the relative potentiation after pauses of the electrical stimulus of 15, 30 and 60 seconds (A); the strength developed by the papillary muscles in the face of different concentrations of extracellular calcium (B); and the influx of transsarcolemal calcium assessed by the “post rest contraction” (C) of left ventricular papillary muscles of rats in the control (Ct) and treated (Cu) groups. In the PRC, the force was calculated as the percentage of the contraction force after the pause and the stabilized one before the beginning of the intervention. Graph D shows the inotropic response in the presence of Isoproterenol and the variation in contractility was calculated by the difference between the values of the β -adrenergic response represented by the percentage value in both experimental groups in relation to the baseline value. E and F represent the force developed by the papillary muscles at the peak (A) and the plateau (B) of tetanic contractions. The numbers in parentheses correspond to the number of papillaries studied. The data are expressed as Mean \pm SEM. * $p < 0.05$ vs Ct. Graphs A and B used two-way ANOVA followed by Fisher's post-test. Graphs C, D, E and F used unpaired Student's t-test.

Figure 4. Isometric contraction force (A), basal tension (B), contraction time parameters, activation time (C) and relaxation (D), positive and negative derivatives of the contraction force, $dF / dT +$ (E) and $dF / dT -$ (F) of the LV papillary muscles of rats in the control group (Ct) and treated with copper (Cu) before (Ct and Cu) and after incubation with L-NAME (Ct L-NAME and Cu L-NAME). The numbers in parentheses correspond to the number of papillaries studied. The data are expressed as Mean \pm SEM. ANOVA 1 way followed by Fisher's post-test. * $p < 0.05$.

Figure 5. Relative potentiation after pauses of the electrical stimulus of 15, 30 and 60 seconds (A); the strength developed by the papillary muscles in the face of different concentrations of extracellular calcium (B); and the influx of transsarcolemal calcium assessed by the “post rest contraction” (C) of left ventricular papillary muscles of rats in the control (Ct) and treated (Cu) groups, before (Ct and Cu) and after incubation with L-NAME (Ct L-NAME and Cu L-NAME). In the PRC, the force was calculated as the percentage of the contraction force after

the pause and the stabilized one before the beginning of the intervention. Graph D shows the inotropic response in the presence of Isoproterenol and the variation in contractility was calculated by the difference between the values of the β -adrenergic response represented by the percentage value in both experimental groups in relation to the baseline value. E and F represent the force developed by the papillary muscles at the peak (A) and the plateau (B) of tetanic contractions. The numbers in parentheses correspond to the number of papillaries studied. The data are expressed as Mean \pm SEM. Graphs A and B used two-way ANOVA followed by Fisher's post-test. Graphs C, D, E and F used one-way ANOVA followed by Fisher's post-test. $p < 0.05$; * vs Ct; + vs Cu- L-NAME.

Figure 6. In situ detection of $O_2^{\bullet-}$ (A) and OH^{\bullet} (C) in heart segments of treated (Cu) and control (Ct) rats. Upper panels show representative fluorescence microphotographs of papillary muscle sections labelled with DHE or HPF. Bar graphs demonstrating the semiquantitative analyses of $O_2^{\bullet-}$ (B) and OH^{\bullet} (D). N=7. Bars represent means \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. Ct, Student's t-test.

Figure 7. Evaluation of protein expression SERCA 2 (A), Na^+/K^+ -ATPase (B), phospholamban (PLB) (C) and phosphorylated phospholamban (pPBL) (D) and Na^+/Ca^{2+} -Exchanger (NCX) by Western Blot analysis of LV papillary muscles of rats in the control (Ct) and treated (Cu) groups. The respective graphs presented below each image represent the numerical quantification of protein expression. The data are expressed as the Mean \pm SEM. $p > 0.05$. Unpaired t test.

Table

Table1: Body Weight.

	Initial Weight	Weight on 1 st week (g)	Weight on 2 st week (g)	Weight on 3 st week (g)	Weight on 4 st week (g)
Ct (n=8)	273 \pm 9.1	306 \pm 9.4	342 \pm 12.2	375 \pm 15.3	399 \pm 15.9
Cu (n=12)	275 \pm 7.8	246 \pm 8.3*	288 \pm 8.2*	305 \pm 8.7**	321 \pm 12.7**

Evaluation of body weight between the control (Ct) and copper-treated groups (Cu) before the start of treatment and during the subsequent weeks of exposure.* $p < 0.003$; ** $p < 0.001$ vs Ct. 2-way ANOVA followed by Fisher's post-test.

Table 2: Assessment of hypertrophy by cardiac mass.

	Ct (n=9)	Cu (n=10)
Heart (mg)	926.7 ± 52.2	712 ± 61.42*
Tibia (mm)	38.5 ± 0.88	36.1 ± 1.19 *
Relation Heart (mg)/ Tibia (mm)	23.5 ± 1.42	19.4 ± 1.71 *

Evaluation of heart weight and tibia length in the control (Ct) and copper (Cu) groups after treatment. * $P < 0.005$ vs Ct. *Student's* unpaired t-test.

Table 3: Copper tissue measurement ($\mu\text{g g}^{-1}$).

	Ct	N	Cu	N	P
Heart	22.42 ± 1.22	12	19.49 ± 1.17	9	0.1
Aorta	5.28 ± 4.27	5	1.85 ± 0.29	5	0.44
Liver	11.89 ± 0.22	8	243.4 ± 68.67*	9	0.0064
Brain	7.68 ± 0.28	10	8.19 ± 0.23	10	0.18
Lung	6.05 ± 0.31	10	5.65 ± 0.3	10	0.37
Tibia	0.47 ± 0.06	9	1.41 ± 0.11*	10	0.0001
Right Kidney	39.76 ± 2.88	9	57.01 ± 6.83*	10	0.039
Left Kidney	43.17 ± 4.2	11	72.31 ± 10.92*	8	0.012

Control group (Ct) and copper treated group (Cu). Values are expressed as mean ± standard error of the mean. N represents the sample number. Unpaired *Student's* t-test. The P values are described in the table. * $p < 0.005$ vs Ct.

Table 4: Arterial and ventricular hemodynamic parameters of animals.

	Ct	N	Cu	N	P
SBP (mmHg)	106 ± 10.1	16	122 ± 8.19*	19	0.0001
DBP (mmHg)	62 ± 7.36	16	76 ± 14.37*	19	0.001
LVSP (mmHg)	119 ± 10.86	6	149 ± 16.75*	10	0.003
LVEDP (mmHg)	1.34 ± 0.82	6	3.09 ± 1.60	9	0.0431
dP/dt+ LV (mmHg/s)	6626 ± 1102	6	8969 ± 1598*	10	0.0119
dP/dt- LV (mmHg/s)	-3761 ± 657	6	-5685 ± 1534*	10	0.0202
HR (bpm)	297 ± 32	15	325 ± 35*	18	0.0278

Systolic Blood Pressure (SBP); Diastolic Blood Pressure (DBP); Left ventricular systolic pressure (LVSP); Left ventricular end diastolic pressure (LVEDP); time derivative of positive (dP/dt+ LV) and negative (dP/dt- LV) left ventricular pressure; and heart rate (HR). Control (Ct) and treated with copper group (Cu); Sample number (N). The results are expressed as mean ± SEM. Unpaired *Student's t*-test.

Figure 1

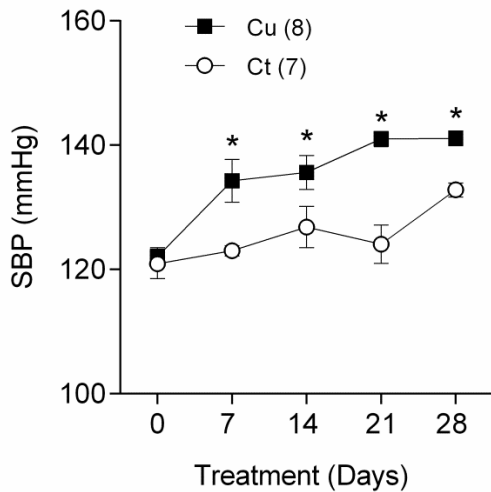


Figure 2

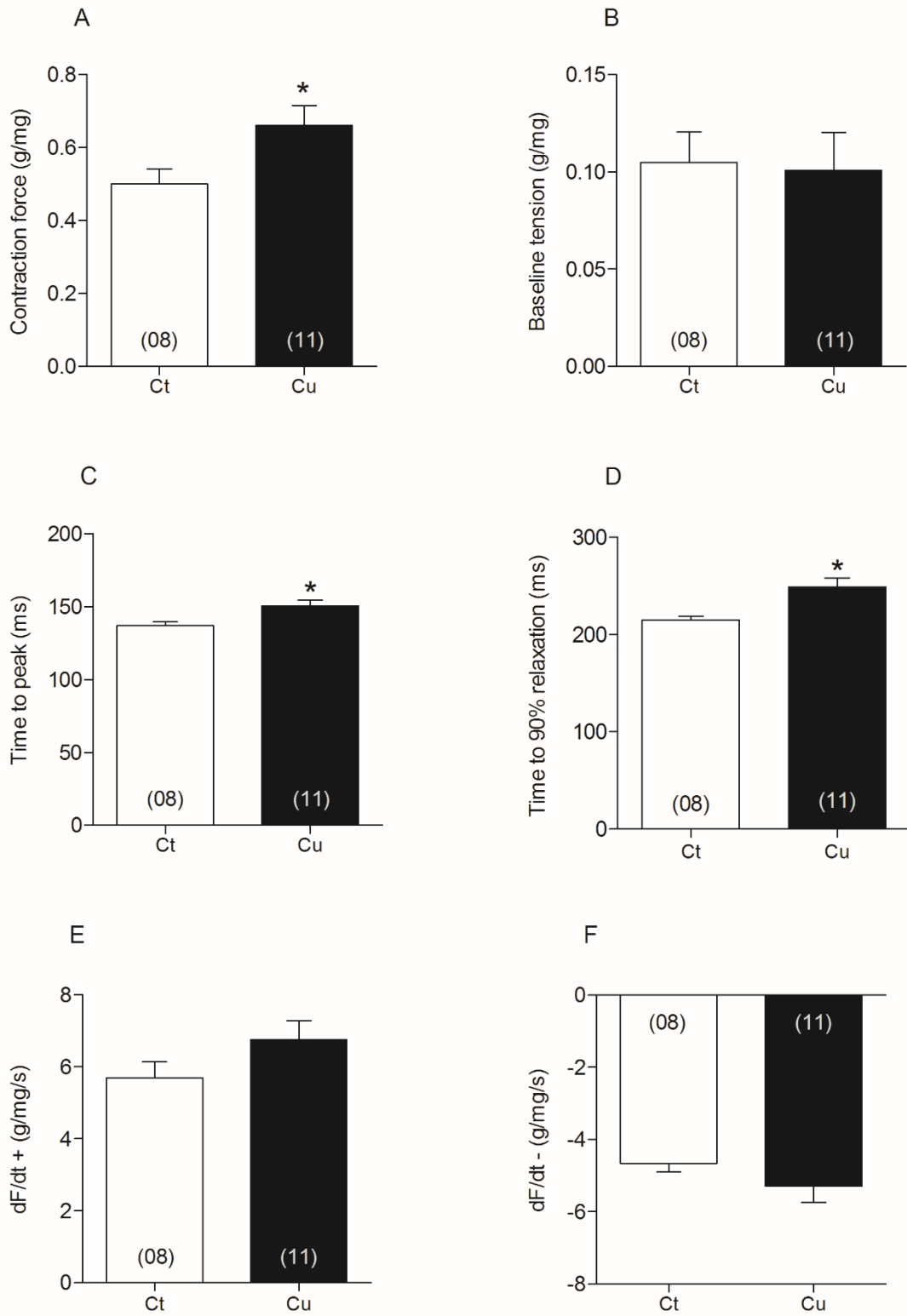


Figure 3

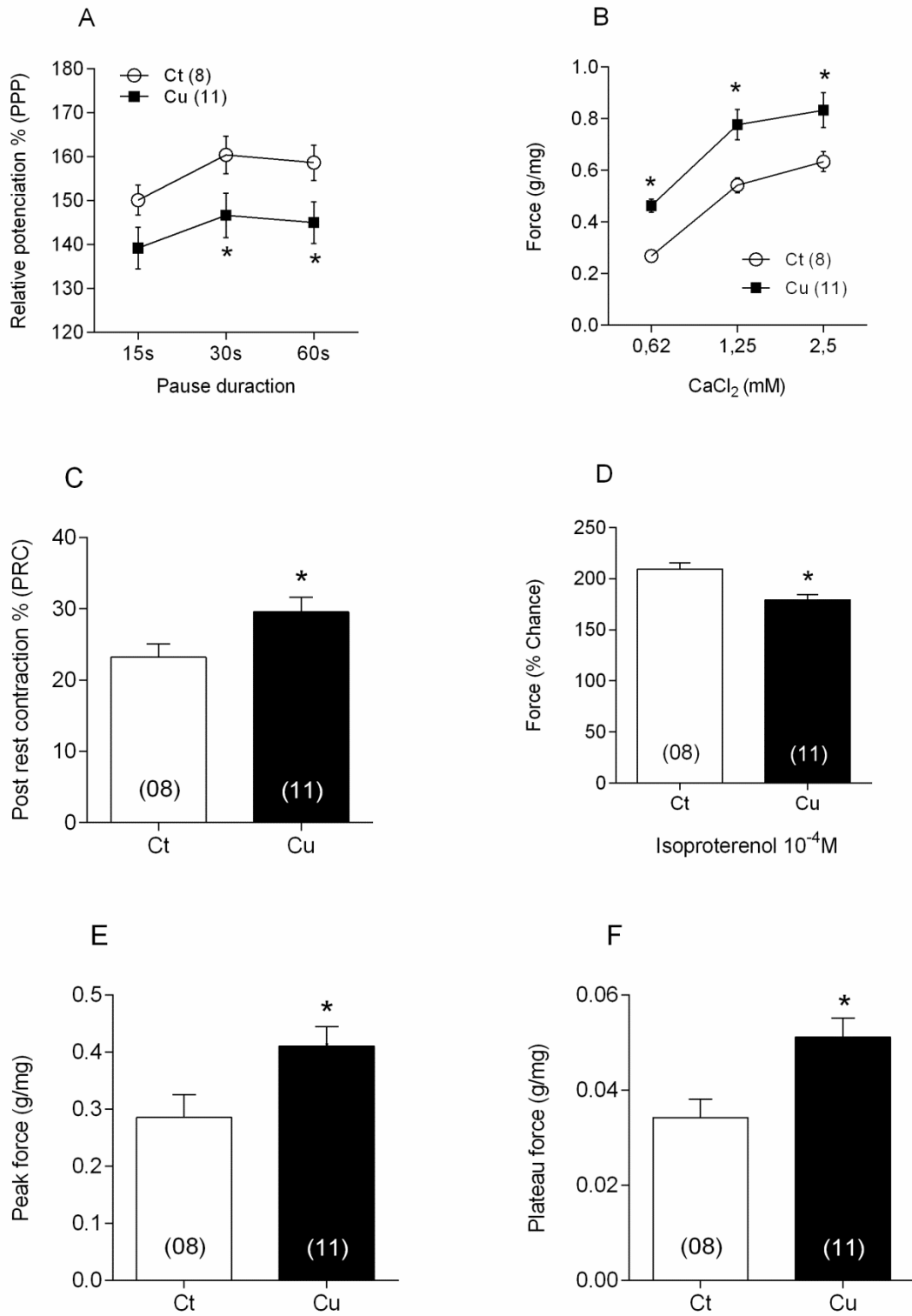


Figure 4

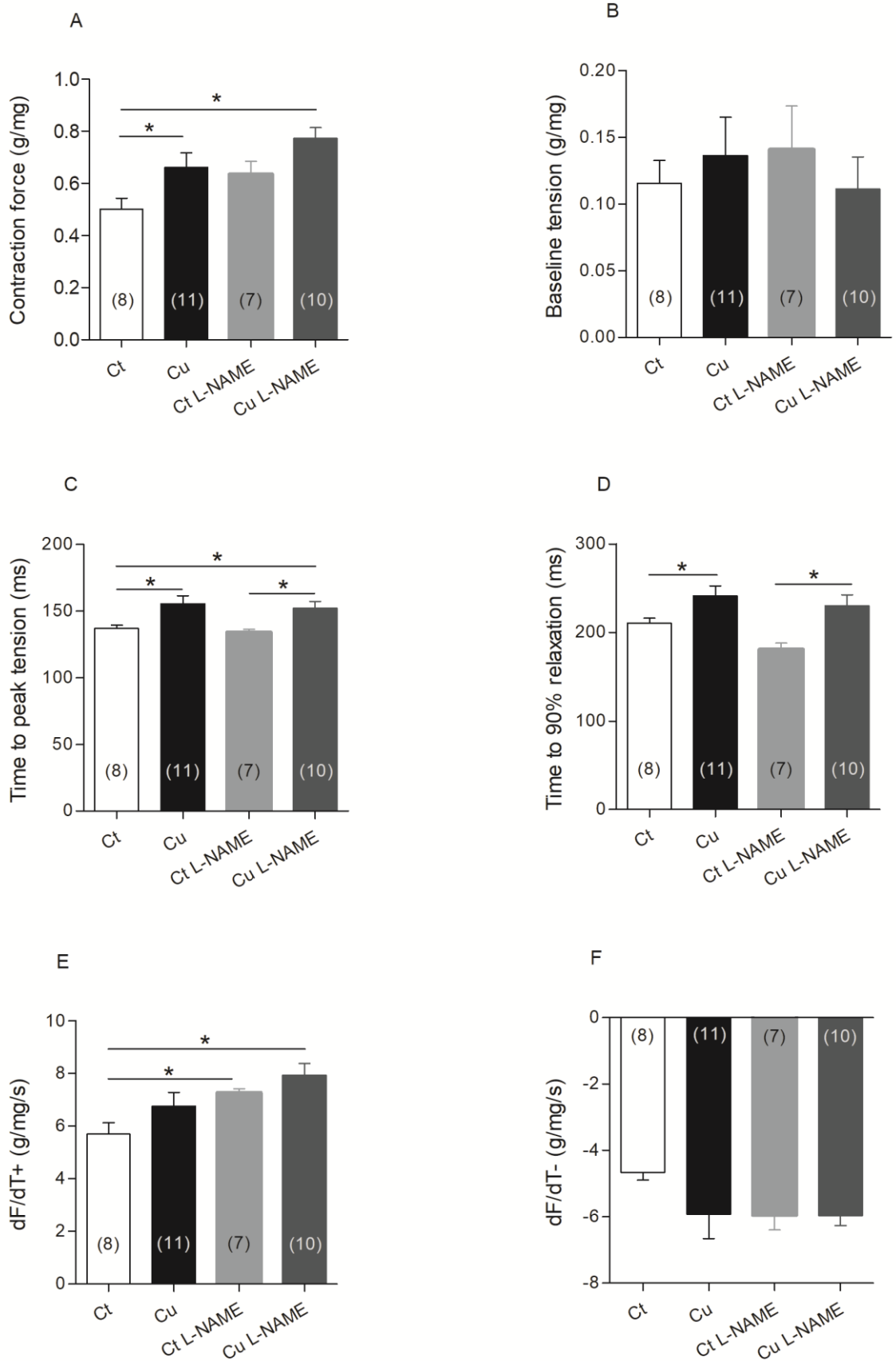


Figure 5

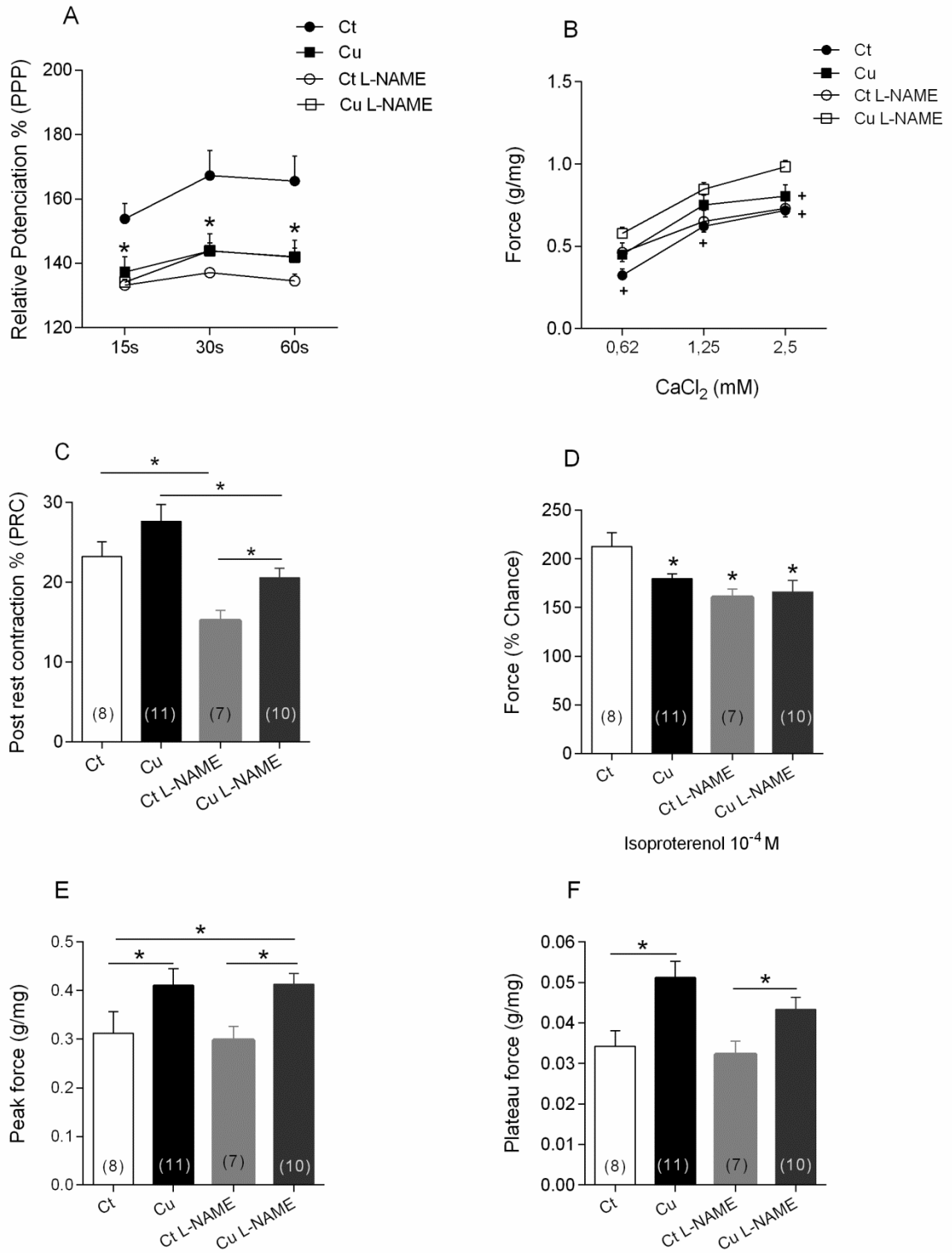


Figure 6

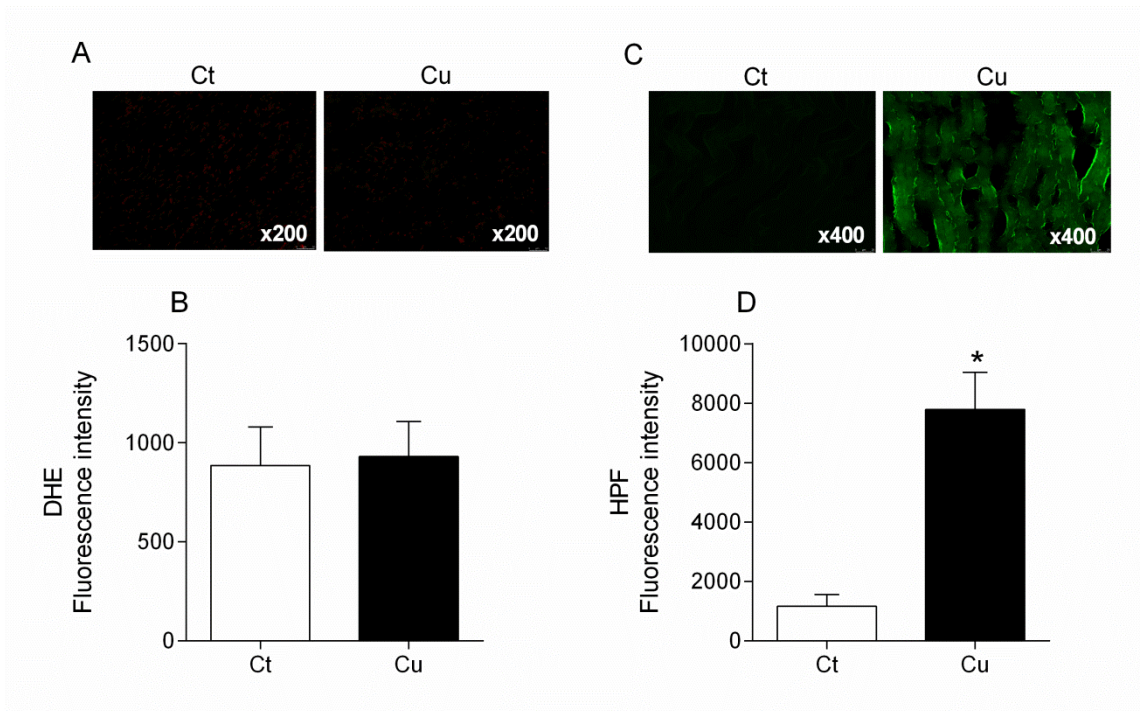


Figure 7