

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

FILIFE MARTINUZO FILETTI

**EFEITO DO CONSUMO DE HIDROLISADO DE CLARA DE OVO SOBRE AS
ALTERAÇÕES CARDÍACAS PROMOVIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO
CLORETO DE COBRE (CuCl₂) EM RATOS**

TESE DE DOUTORADO

Vitória, 2022

FILIFE MARTINUZO FILETTI

**EFEITO DO CONSUMO DE HIDROLISADO DE CLARA DE OVO SOBRE AS
ALTERAÇÕES CARDÍACAS PROMOVIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO
CLORETO DE COBRE (CuCl₂) EM RATOS**

Tese apresentada 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.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maylla Ronacher Simões.

Coorientador: Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo.

Vitória, 2022

**EFEITO DO CONSUMO DE HIDROLISADO DE CLARA DE OVO SOBRE AS
ALTERAÇÕES CARDÍACAS PROMOVIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO
CLORETO DE COBRE (CuCl₂) EM RATOS**

Filipe Martinuzo Filetti

Tese de doutorado 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.

Aprovado em 13 de maio de 2022

Prof^a. Dr^a. Maylla Ronacher Simões – Orientadora

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Coorientador

Prof^a. Dr^a. Alessandra Simão Padilha, PPGCF - UFES

Prof^a. Dr^a. Nazaré Souza Bissoli, PPGCF- UFES

Prof^a. Dr^a. Giulia Alessandra Wiggers, PMPGCF- UNIPAMPA

Dr^a. Marta Miguel Castro, CIAL-CSIC-ESPANHA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por RODRIGO COFFLER BATISTA - SIAPE 3154003 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - PPGCFi/CCS Em 23/05/2022 às 08:41

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:

<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/479761?tipoArquivo=O>

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema
Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e
elaborada pelo autor

F481 e Filetti, Filipe Martinuzo, 1993-
Efeito do consumo de hidrolisado de clara de ovo sobre
as alterações cardíacas promovidas pela exposição ao
cloreto de cobre (CuCl₂) em ratos : Tese de doutorado /
Filipe Martinuzo Filetti.
2022.
119 f. : il.

Orientadora: Maylla Ronacher

Simões.

Coorientador: Dalton Valentim

Vassallo.

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

1. Cobre. 2. Hidrolisado da clara do ovo. 3.
Músculos papilares. 4. Reatividade vascular. 5.
Estresse Oxidativo. I. Simões, Maylla Ronacher. II.
Vassallo, Dalton Valentim. III. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 612

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

A minha família, meus pais Assis e Luciléia e meus irmãos André e Benjamin, por nunca deixarem de me incentivar e me apoiar.

Aos meus mestres das ciências e da vida, Maylla e Dalton, por serem uma fonte inesgotável de admiração, dedicação, exemplo e amizade.

AGRADECIMENTOS

Chegar ao final dessa tese de doutorado representa não apenas a conclusão de um ciclo de intenso aprendizado e dedicação, mas também a conquista de um projeto de vida, e isso jamais teria sido possível se não fosse pela contribuição de muitas pessoas às quais eu guardo imensa gratidão.

Inicialmente gostaria de agradecer a **Deus** por se fazer presente em todos os dias e lugares, e por sempre iluminar meu caminho.

A **minha família**, por sempre incentivar meus estudos e apoiar minhas aventuras, por entenderem minha ausência em diversos momentos, por se orgulharem tanto de mim e me motivarem a ser cada dia uma pessoa melhor.

A minha orientadora e grande amiga, **Maylla**, agradeço por me aceitar como seu aluno e me conduzir tão bem no caminho da ciência, pelas riquíssimas discussões que tanto me agregaram e motivaram durante a vida acadêmica e por sempre ter me mostrado o melhor caminho a seguir. Obrigado por estar sempre tão presente e disponível. É uma grande honra ser seu primeiro aluno de doutorado, guardarei seus ensinamentos por toda a minha vida. Muito obrigado por me orientar.

Ao meu coorientador, **Dalton**, ou melhor "**Chefe**", você é grande exemplo de ser humano e profissional, agradeço por ter me aberto as portas do LEMC, por ter me direcionado tão bem na fisiologia cardiovascular e me permitir aprender tanto com você. A conclusão deste ciclo não seria possível sem você. Agradeço por todos os cafés despreziosos que sempre resultaram em riquíssimas conversas, por me inspirar todos os dias com sua genialidade e sua generosidade. Agradeço também por você sempre estar disponível, pelos ensinamentos, conselhos e incentivos.

Aos professores do LEMC, **Alessandra, Ivanita e Leonardo**, agradeço pelos ensinamentos, pelo empenho em manter o laboratório funcionando, e pela contribuição científica com ideias e sugestões realizadas em nossos seminários ou nas nossas conversas no dia-dia.

A **Ingridy**, grande parceira de laboratório e amiga, agradeço pela sua ajuda com o tratamento dos animais, avaliação da reatividade vascular e biologia

molecular. Admiro muito sua competência e dedicação. Os dias no laboratório sempre são melhores e mais leves com você. Muito obrigado por toda ajuda, seu apoio foi fundamental do início ao final deste projeto. Agradeço também pela sua amizade, pelas nossas conversas e pelos conselhos. Contar com você fez toda diferença.

Aos **amigos** do LEMC e do PPGCF, àqueles que ainda fazem parte e aos que já fizeram, agradeço pelos nossos momentos de alegria e descontração, pela troca de aprendizados e por tornarem o nosso laboratório um ambiente tão agradável, em especial à Sabrina, Michelle, Grazi, Tati, Júlia, Evellyn, Rosi, Rakel, Anna, Renata, Camilla, Marito, Dieli, Vinicius, Pollyana, Edgar, Antônio e Gustavo.

Aos **professores** do PPGCF por todo o conhecimento transmitido formal e informalmente.

Aos **funcionários técnicos** do PPGCF, LHMI e LABIOM 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.

Por fim, gostaria de agradecer a **UFES** por ter sido minha segunda casa e por todas as oportunidades de crescimento pessoal e profissional que me foram dadas ao longo dos últimos 11 anos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. COBRE	22
1.1.1. EXPOSIÇÃO HUMANA AO COBRE	23
1.1.2. METABOLISMO DO COBRE NO ORGANISMO.....	24
1.1.3. INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA E LIMITES DE EXPOSIÇÃO AO COBRE.....	26
1.1.4. COBRE E ESTRESSE OXIDATIVO	27
1.1.5. EFEITOS TÓXICOS DO COBRE NO ORGANISMO.....	29
1.1.6. EFEITOS CARDIOVASCULARES DO COBRE	31
1.2. ALIMENTOS FUNCIONAIS	33
1.2.1. PEPTÍDEOS BIOATIVOS	34
1.2.2. FUNÇÕES BIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS.....	35
1.2.3. PEPTÍDEOS BIOATIVOS DA CLARA DO OVO	37
1.3. JUSTIFICATIVA	39
2. OBJETIVOS	40
2.1. OBJETIVO GERAL	40
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3. METODOLOGIA	41
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	41
3.2. MODELOS EXPERIMENTAIS	42
3.2.1. MODELO DE TOXICIDADE INDUZIDA PELO COBRE.....	42

3.2.2. MODELO ANTI-ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO PEPTÍDEO HIDROLISADO DA CLARA DO OVO (HCO)	43
3.3. PREPARO DO PEPTÍDEO HIDROLISADO DA CLARA DE OVO	45
3.4. AVALIAÇÃO PONDERAL	45
3.5. AVALIAÇÃO INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA PELA TÉCNICA DE PLETISMOGRAFIA DE CAUDA	45
3.6. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DE AORTA	46
3.7. AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CARDÍACA.....	47
3.7.1. FORÇA DE CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA E PARÂMETROS TEMPORAIS DE FORÇA	49
3.7.2. AVALIAÇÃO DAS POTENCIAÇÕES PÓS PAUSAS (PPP).....	50
3.7.3. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INOTRÓPICA AO CÁLCIO.....	50
3.7.4. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INOTRÓPICA À ESTIMULAÇÃO BETA-ADRENÉRGICA	51
3.7.5. MEDIDA INDIRETA DO INFLUXO DE CÁLCIO TRANSSARCOLEMAL “ <i>POST REST CONTRACTION-PRC</i> ”	52
3.7.6. AVALIAÇÃO DAS CONTRAÇÕES TETÂNICAS	53
3.8. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	54
3.8.1. AVALIAÇÃO “ <i>IN SITU</i> ” DE $O_2^{\cdot-}$ PELA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE DIHIDROETIDEO	54
3.8.2. AVALIAÇÃO “ <i>IN SITU</i> ” DE OH^{\cdot} PELA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA COM HIDROXIFENIL FLUORESCÉINA	55
3.9. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ATPASE MIOSÍNICA	55
3.10. ANÁLISE DAS ATIVIDADES DA SOD E DA CATALASE	56

3.11. ANÁLISE EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOTTING	57
3.12. FÁRMACOS E REAGENTES	59
3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
4. RESULTADOS	61
4.1. EFEITOS CARDIOVASCULARES DA EXPOSIÇÃO AO COBRE	61
4.2. EFEITOS DO HCO NO MODELO DE INTOXICAÇÃO POR COBRE	69
4.3. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO	76
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS	114
ANEXO I - AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVES NA PRESENÇA DE TEMPOL E DMSO	114
ANEXO II - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CEUA-UFES	117
ANEXO III - AUTORIZAÇÃO DO USO DE FIGURAS DE ARTIGOS	118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

μG	Microgramas
μL	Microlitros
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
ATP7A	Enzima transportadora de cobre
ATP7B	Enzima removedora de cobre
Ca^{2+}	Cálcio
CCS	Chaperona de cobre para a superóxido dismutase
COX	Citocromo C oxigenase
Cp	Ceruloplasmina
Ct	Controle
CTR1	Transportador de cobre
Cu	Cobre
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROS	Espécies reativas de oxigênio
dF/dT	Derivada de força / derivada de tempo
DHE	Dihidroetídio
EPM	Erro padrão da média
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HCO	Hidrolisado da clara de ovo
HPF	Hidroxifenil fluoresceína
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Insuficiência cardíaca
i. p.	Intraperitoneal
Lmáx	Comprimento no qual a tensão é máxima
mg	Miligramas
mM	Milimolar
ms	Milissegundos
Mt	Metalotioneína
NCX	Trocador sódio/cálcio
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Ânion superóxido
OH^{\cdot}	Radical hidroxila

PAS	Pressão arterial sistólica
PLB	Fosfolambam
PLBp	Fosfolambam fosforilado
PKA	Proteína cinase A
PPP	Potenciação pós-pausa
PRC	<i>Post-rest contraction</i>
RS	Retículo sarcoplasmático
SERCA	Cálcio-atpase do retículo sarcoplasmático
SOD	Superóxido dismutase
TR 90%	Tempo de relaxamento de 90%

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: O metabolismo do cobre.	25
Figura 02: Homeostase sistêmica do cobre em humanos.....	26
Figura 03: Aorta torácica em placa de Petri.	47
Figura 04: Sistema de avaliação contrátil de músculos papilares de ventrículo esquerdo	48
Figura 05: Registro típico de força de contração de músculos papilares do VE de ratos Wistar evidenciando os parâmetros temporais da contração.	49
Figura 06: Registro típico de dF/dt máximas positivas e negativas.....	50
Figura 07: Registro típico de PPP de músculos papilares de VE de ratos Wistar obtidas com a reestimulação elétrica após pausas de 15, 30 e 60 segundos no estímulo elétrico aplicado no músculo.....	50
Figura 08: Registro típico da resposta do aumento de força contrátil frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular obtida em preparação de músculos papilares de VE de ratos.	51
Figura 09: Registro típico da resposta β -adrenérgica em preparação de músculos papilares de VE de ratos após a administração de Isoproterenol	52
Figura 10: Registro típico de uma “ <i>post-rest contraction</i> ” em preparação de músculos papilares de VE de ratos.	53
Figura 11: Registro típico das contrações tetânicas destacando o pico e o platô da força tetânica em músculos papilares de VE de ratos.....	53
Figura 12: Ganho de peso ponderal após 4 semanas de exposição com diferentes doses de cobre	62
Figura 13: Reatividade vascular induzida pela fenilefrina nos anéis de aorta .	62

Figura 14: Avaliação ponderal após 4 semanas de exposição com diferentes doses de cobre. Peso do ventrículo direito corrigido pelo comprimento da tíbia (A). Peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento da tíbia (B). Peso dos músculos papilares (C).....	63
Figura 15: Efeitos da exposição a diferentes doses de cobre no desenvolvimento de força de músculos papilares de VE de ratos.	64
Figura 16: Parâmetros temporais e derivadas de músculos papilares de VE de ratos após 4 semanas de exposição ao cobre.	65
Figura 17: Avaliação das potenciações relativas pós-pausas de 15, 30 e 60 segundos em músculos papilares de VE de ratos expostos ao cobre.	66
Figura 18: Avaliação da resposta inotrópica ao cálcio extracelular (A), da <i>post-rest contraction</i> – <i>PRC</i> (B), e da resposta inotrópica ao agonista β - adrenérgico (C) em músculos papilares de VE de ratos expostos ao cobre	67
Figura 19: Avaliação das contrações tetânicas em músculos papilares de VE de ratos expostos ao cobre.	68
Figura 20: Avaliação ponderal após 4 semanas de exposição ao cobre (10mg) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO).....	70
Figura 21: Efeitos de 4 semanas de exposição ao cobre (10mg) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO) no desenvolvimento de força de músculos papilares de VE de ratos	71
Figura 22: Parâmetros temporais e derivadas de músculos papilares de VE de ratos após 4 semanas de exposição ao cobre (10mg) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO).	72
Figura 23: Avaliação dos efeitos da exposição ao cobre (10mg) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO) nas potenciações relativas pós-pausas (A), na expressão da SERCA-2a (B), e na expressão do NCX (C).....	73
Figura 24: Avaliação da resposta inotrópica ao cálcio extracelular (A), da <i>post-rest contraction</i> (B), e da resposta inotrópica ao agonista β - adrenérgico (C) após	

4 semanas de exposição ao cobre (10mg) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO)	75
Figura 25: Avaliação do pico de força tetânica (A); platô de força tetânica (B), e; atividade da ATPase miosínica (C)	76
Figura 26: Avaliação <i>in situ</i> da formação de radicais livres após a exposição ao cobre (10mg) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO).....	78
Figura 27: Avaliação da expressão das enzimas antioxidantes SOD e catalase após 4 semanas de exposição ao cobre (10mg) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO).	79
Figura 28: Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase após 4 semanas de exposição ao cobre (10mg) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO).	80

RESUMO

O cobre (Cu) é um elemento essencial para a homeostase e o funcionamento dos organismos vivos, mas em excesso promove efeitos prejudiciais sistêmicos. De acordo com as agências reguladoras o consumo de cobre deve ser de 0,9 mg ao dia para adultos, sendo que 10 mg/dia é considerada a dose máxima tolerável em humanos. A toxicidade do cobre está relacionada com a produção das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), levando a ocorrência de doenças cardiovasculares. Neste contexto, os peptídeos bioativos derivados do hidrolisado da clara de ovo (HCO) apresentam importante atividade antioxidante, neutralizando radicais livres, e anti-inflamatória podendo atuar em diversas doenças. Objetivamos avaliar os efeitos cardiovasculares da exposição à dose diária recomendada (13 µg/Kg/dia), à dose máxima de ingestão tolerável (0,14 mg/Kg/dia) e ao dobro da dose tolerável (0,28 mg/Kg/dia) de cobre por 4 semanas, para isso utilizamos o cloreto de cobre diluído no veículo salina, e em seguida, avaliar se o consumo de HCO é capaz de atenuar estes efeitos. Avaliamos os efeitos do cobre nos seguintes grupos experimentais: Cu 0,13 µg/Kg/dia, Cu 0,14 mg/Kg/dia e Cu 0,28 mg/Kg/dia, todos via i.p. durante 4 semanas, o grupo Ct recebeu salina 0.9% via i.p. Nossos resultados mostraram que a exposição as doses de 13 µg, 0,14 e 0,28 mg/Kg/dia de cobre não alterou o ganho de peso corporal, a reatividade vascular e não alterou a massa das câmaras cardíacas, entretanto identificamos que a exposição às doses de 0,14 e 0,28 mg/Kg/dia de cobre reduziram a força de contração de músculos papilares e prejudicaram os mecanismos reguladores da contração cardíaca como as derivadas temporais de força, a resposta inotrópica ao cálcio extracelular e ao Isoproterenol, a avaliação indireta do influxo de cálcio transsarcolemal e a afinidade das proteínas contráteis. Apesar da dose de 0,14 mg/Kg/dia de cobre ser considerada segura, nossos resultados mostraram prejuízos causados por essa exposição, por tanto determinamos esta dose para avaliar se o HCO poderia prevenir estes efeitos, então realizamos novamente estes estudos com os seguintes grupos: Ct, Cu, Ct-HCO e Cu-HCO. O tratamento com HCO (1 g/Kg/dia) se mostrou eficaz para a prevenção dos efeitos tóxicos do cobre. A exposição ao cobre e/ou HCO não alterou a pressão arterial sistólica dos animais, o ganho de peso corporal e não alterou a massa das câmaras

cardíacas. O consumo do HCO em animais expostos ao cobre preveniu a redução da força de contração cardíaca, das derivadas temporais de força, da resposta inotrópica ao cálcio e ao Isoproterenol, da avaliação indireta do influxo de cálcio transsarcolemal e reduziu o estresse oxidativo. A atividade da ATPase miosínica foi reduzida pela exposição ao cobre, todavia este efeito foi revertido pelo consumo de HCO. A detecção “*in situ*” mostrou aumento de $O_2^{\cdot -}$ e OH^{\cdot} nos músculos papilares de animais que receberam cobre, enquanto os animais que receberam cobre e HCO apresentaram formação de radicais livres semelhantes aos controles. O HCO aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase nos animais controles e expostos ao cobre. As expressões da SOD, da Catalase e do NCX não foram alteradas, a expressão da SERCA-2a aumentou no grupo Cu-HCO. Concluimos que o HCO pode ser considerado um ingrediente em alimentos funcionais a ser utilizado como ferramenta terapêutica no tratamento de danos induzidos pela exposição ao cobre.

Palavras-chave: Cobre; hidrolisado da clara de ovo; músculos papilares; reatividade vascular; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Copper (Cu) is an essential element for homeostasis and the functioning of living organisms, but in excess it promotes systemic harmful effects. According to regulatory agencies, copper consumption should be 0.9 mg/day for adults, with 10 mg/day being considered the maximum tolerable dose in humans. Copper toxicity is related to the production of Reactive Oxygen Species (ROS), leading to the occurrence of cardiovascular diseases. In this context, the bioactive peptides derived from the egg white hydrolyzate (EWH) have important antioxidant activity, neutralizing free radicals, and anti-inflammatory activity, which can act in several diseases. We aimed to evaluate the cardiovascular effects of exposure to the recommended daily dose (13 µg/Kg/day), the maximum tolerable intake dose (0.14 mg/Kg/day) and twice the tolerable dose (0.28 mg/Kg/day) of copper for 4 weeks, for this we use copper chloride diluted in saline vehicle, and then assess whether EWH consumption is able to attenuate these effects. We evaluated the effects of copper in the following experimental groups: Cu 0.13 µg/Kg/day, Cu 0.14 mg/Kg/day and Cu 0.28 mg/kg/day, via i.p. for 4 weeks, the Ct group received 0.9% saline via i.p. Our results showed that exposure to doses of 13 µg, 0.14 and 0.28 mg/Kg/day of copper did not change body weight gain, vascular reactivity and did not change the mass of cardiac chambers, however we identified that exposure to doses of copper 0.14 and 0.28 mg/Kg/day of copper reduced the force of contraction of papillary muscles and impaired cardiac contraction regulatory mechanisms such as temporal force derivatives, inotropic response to extracellular calcium and isoproterenol, indirect assessment of transsarcolemmal calcium influx and contractile protein affinity. Although the dose of 0.14 mg/Kg/day of copper is considered safe, our results showed harm caused by this exposure, so we determined this dose to assess whether EWH could prevent these effects, so we performed these studies again with the following groups: Ct, Cu, Ct-EWH and Cu-EWH. Treatment with EWH (1 g/Kg/day) proved to be effective in preventing the toxic effects of copper. Exposure to copper and/or EWH did not alter the animals' systolic blood pressure, body weight gain and did not alter the mass of the cardiac chambers. The consumption of EWH in animals exposed to copper prevented the reduction of the force of cardiac contraction, of the temporal derivatives of force, of the

inotropic response to calcium and to Isoproterenol, of the indirect evaluation of the transsarcolemmal calcium influx. Myosin ATPase activity was reduced by copper exposure, however this effect was reversed by EWH consumption. The “*in situ*” detection showed an increase of $O_2^{\cdot-}$ and OH^{\cdot} in the papillary muscles of animals that received copper, while the animals that received copper and EWH showed formation of free radicals similar to the controls. EWH increased the activity of the antioxidant enzymes SOD and catalase in control and copper exposed animals. The expressions of SOD, Catalase and NCX were not altered, the expression of SERCA-2a increased in the Cu-EWH group. We conclude that EWH can be considered a functional food ingredient to be used as a therapeutic tool in the treatment of damage induced by copper exposure.

Keywords: Copper; egg white hydrolyzate; papillary muscles; vascular reactivity; oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

1.1. COBRE

O cobre é um elemento químico de transição pertencente ao grupo 11 (1B) da classificação periódica dos elementos. Ele possui número atômico 29 e de massa atômica 63,54 u (RIBEIRO, 2001). O termo cobre tem origem latina e seu nome remete a ilha de Chipre, principal fonte do metal na antiguidade (RIBEIRO, 2001). Registros históricos mostram que o cobre foi o primeiro metal a ser utilizado pelo ser humano (PINTO, 2002). A importância do cobre para os humanos foi tamanha que marcou um período denominado “Idade do Bronze”, no qual uma liga formada por cobre e estanho passou a ser utilizada na substituição da pedra como ferramenta de trabalho e na confecção de armas (MAAR, 2008), mas foi durante a idade moderna em que o cobre alcançou sua real dimensão como metal imprescindível devido ao seu uso em diversas áreas do setor industrial (MAAR, 2008).

O cobre é um metal avermelhado presente nas rochas, no solo, na água, nos sedimentos e, em baixas concentrações no ar. Além disso, é encontrado em todas as plantas e animais pois é considerado um micronutriente essencial para a manutenção e funcionamento da vida (YUNUS, 2015).

O cobre é essencial para a homeostase do corpo humano pois apresenta funções específicas como constituinte de enzimas como a superóxido dismutase cobre-zinco (SOD-Cu/Zn), principal enzima antioxidante dos seres humanos, a lisil oxidase, que catalisa a formação do colágeno e elastina contribuindo com o desenvolvimento e manutenção dos ossos, dos tendões, do tecido conjuntivo e do sistema vascular (NIEVES, 2005; VASHCHENKO; MAC GILLIVRAY, 2013), a citocromo-c oxidase, que possui atividades de transporte de elétrons durante a respiração aeróbica mitocondrial e também de manutenção da mielina, visto que ela é formada por fosfolípidios, cuja a síntese depende desta enzima (VASHCHENKO; MAC GILLIVRAY, 2013), e a ceruloplasmina, que é essencial para absorção e transporte de ferro necessário para a síntese de hemoglobina, entre outras (COZZOLINO, 2007).

A manutenção da homeostasia do cobre é determinante para as funções enzimáticas e sistêmicas. As atividades de diversas enzimas podem ser reduzidas quando há carência deste íon, causando aumento do estresse oxidativo (MLYNIÉC et al., 2015), complicações hepáticas, neurológicas e cardiovasculares (GAETKE et al., 2014; TASIĆ et al., 2015; BAGHERI et al., 2015; SHIMIZU, 2016). Todavia, mesmo sendo considerado um elemento essencial, o aumento da concentração de cobre é tóxico para os seres humanos, visto que este metal catalisa as reações de Fenton e Haber-Weiss, resultando em dano oxidativo e morte celular (FUKAI et al., 2018; HUANG et al., 2019; MALEKAHMADI et al., 2020).

1.1.1. EXPOSIÇÃO HUMANA AO COBRE

A exposição humana ao cobre acontece de diferentes formas. Na natureza, a emissão de cobre acontece a partir de fontes naturais como poeiras, incêndios florestais e minas de extração de cobre (RIBEIRO, 2001). Após a extração, o cobre é utilizado em diversos setores, sendo o terceiro metal mais utilizado no mundo atrás apenas do ferro e do alumínio. Os principais produtores de cobre são o Chile, os Estados Unidos, a Alemanha, o Japão e a China, o Brasil é responsável por 1,2% da produção mundial (BRASIL, 2017). O interesse comercial em torno do cobre se deve a sua elevada resistência à tensão física e à corrosão (OLIVEIRA, 2014) o que o torna bastante útil no desenvolvimento industrial e tecnológico, sendo utilizado na cunhagem de moedas, arames, fios elétricos, chapas metálicas, tubulações para ar-condicionado e refrigeradores, encanamentos para água, conservante de madeiras (ATSDR, 2004). Além disso, o cobre é usado como componente de bactericidas e fungicidas utilizados em lavouras agrícolas, o que conseqüentemente leva à contaminação dos solos, da água e dos alimentos produzidos (GINOCCHIO, 2002; CHAIGNON, 2003).

A concentração de cobre em alimentos varia de acordo com as condições locais. A maioria das dietas contém o suficiente para manter o nível de cobre estável, e dentre os alimentos com maior concentração de cobre estão os miúdos (fígado, rins), ovos, mariscos (ostras, lulas e siris), os cereais (feijão, grãos-de-bico e lentilhas), a semente de girassol, o amendoim, as passas, as nozes, as

amêndoas, os legumes e o chocolate amargo (JUNIOR; PASCHOAL, 2004). Todavia, a intoxicação alimentar por cobre é rara e a maior parte dos casos está relacionada à exposição ocupacional, acidental ou ambiental (MORTIMER et al., 2010; BOST et al., 2016).

1.1.2. METABOLISMO DO COBRE NO ORGANISMO

Por se tratar de um mineral essencial para os seres vivos, o cobre apresenta um sistema complexo de absorção, distribuição e excreção nos organismos. O principal sítio de absorção de cobre é o duodeno, apesar de uma pequena parte do cobre ser absorvida no estômago. A contribuição do estômago parece ter importância discreta devido à digestão incompleta dos alimentos neste órgão (SCHÜMANN et al., 2002). A absorção do cobre dietético varia entre 15 e 97% (TURNLUND, 1998), pois vários parâmetros afetam a taxa de absorção como sexo, idade, tipo de alimento e quantidade de cobre da dieta (OLIVARES et al., 2001).

No duodeno, a absorção de cobre ocorre principalmente através do transportador de cobre ATP7A que são expressos na membrana dos enterócitos (LEE et al., 2002; MOLLOY; KAPLAN, 2009). Assim inicia-se o ciclo entero-hepático. Após a entrada de cobre nos enterócitos, ele se liga a chaperonas citosólicas que, em seguida, transferem o cobre para destinos celulares específicos (LEARY et al., 2009). Em condições fisiológicas o cobre é liberado pelas células intestinais através do transportador CTR-1, movendo-o para a circulação portal onde é transportado ligado a albumina, a histidina e a transcupreína (KANG, 2011).

Após a absorção hepática, uma parte permanece no fígado ligado a metalotioneína (KANG, 2011) e a maior parte do cobre é destinado à circulação sanguínea, ligado à ceruloplasmina e à albumina, e somente então se inicia uma incorporação apreciável de cobre em outros tecidos. Ao chegar nos órgãos-alvo o cobre é absorvido através do transportador CTR-1 presente nas membranas plasmáticas celulares. O cobre é então armazenado em vários órgãos, sendo o fígado o único capaz de o mobilizar em caso de balanço negativo (LINDER;

HAZEGH- AZAM, 1996). O excesso de cobre é excretado pelo fígado para o sistema gastrointestinal através da bile (HARVEY et al., 2005).

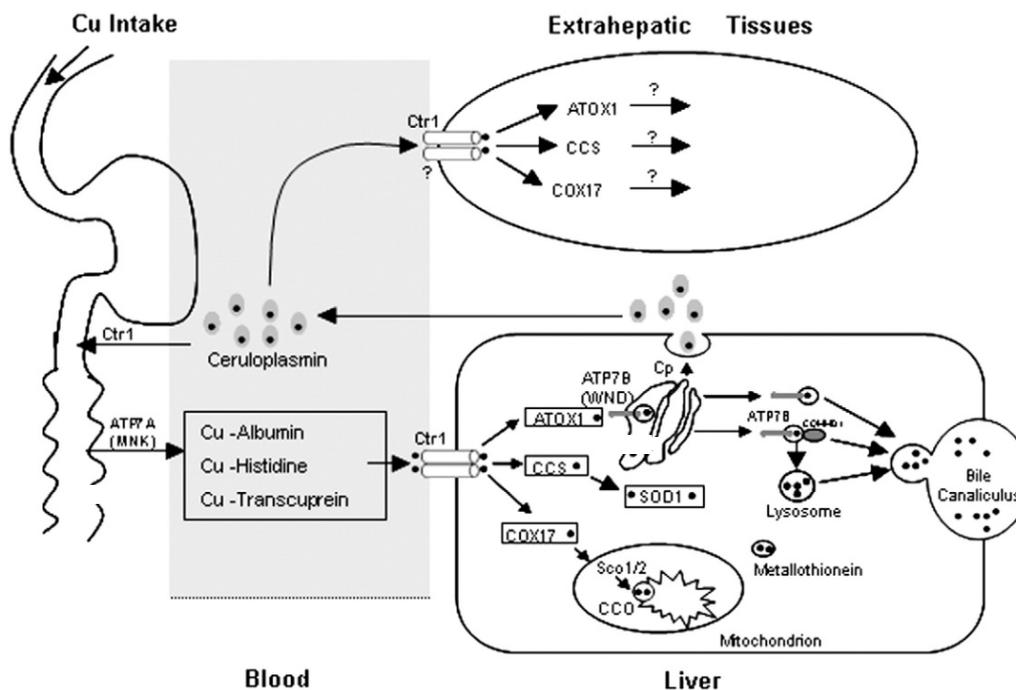


Figura 01: Metabolismo do cobre. O cobre é absorvido através do trato gastrointestinal e transportado para o sistema circulatório pela ATP7A. O cobre circula no sangue ligado a albumina, a histidina e a transcupreína. Em seguida, o cobre é captado pelo transportador de cobre, CTR1. No fígado, o cobre se associa a diferentes chaperonas, incluindo a COX17, a CCS e a ATOX1. A COX17 fornece cobre para citocromo c oxidase (CCO) nas mitocôndrias. A CCS insere cobre na Cu/Zn-SOD. A ATOX1 fornece o cobre para a ceruloplasmina e à albumina, liberando o cobre na circulação. Uma parte do cobre permanece armazenado no fígado ligado a metalotioneína. Em casos de aumento da concentração de cobre, o ATP7B realoca o cobre em vesículas e excreta através da bile. O cobre circulante na forma de Cu-ceruloplasmina é transportado para os órgãos extra-hepáticos, incluindo o coração através de um mecanismo ainda desconhecido, mas provavelmente dependente de CTR1. Fonte: KANG (2011).

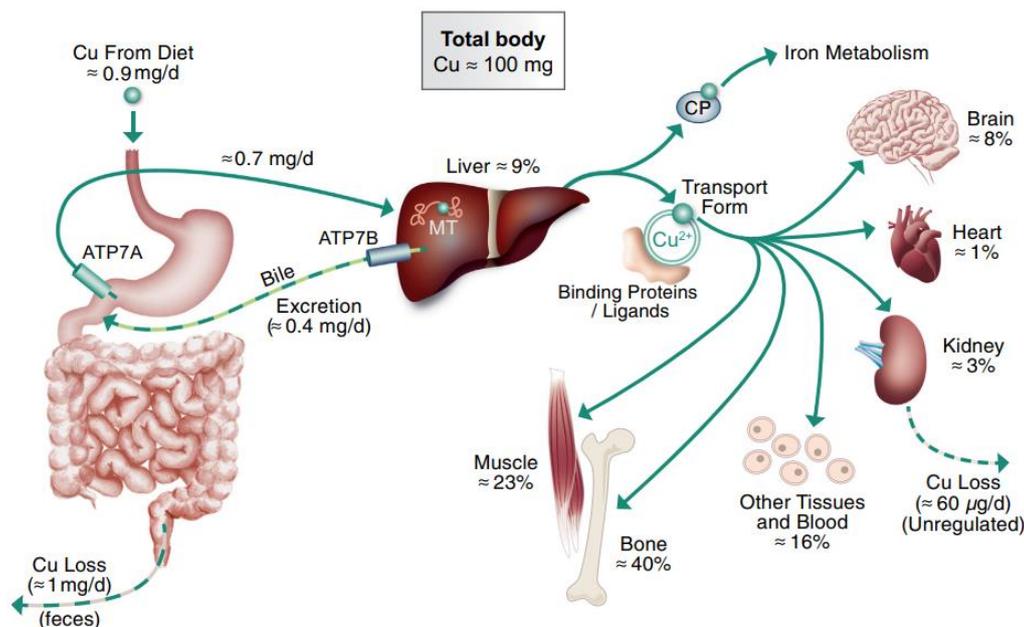


Figura 02: Homeostase sistêmica do cobre em humanos. Os principais mecanismos reguladores que controlam os níveis de cobre do corpo são descritos. As ATPases transportadoras de cobre desempenham funções na absorção intestinal (ATP7A) e na excreção biliar (ATP7B). Após a absorção, a maior parte do cobre dietético é armazenado no fígado ligado à metalotioneína, o restante é incorporado à ceruloplasmina (CP), ou distribuído através do sangue para vários órgãos ligado principalmente à albumina. O complexo Cu-ceruloplasmina circulante participa do metabolismo do ferro, enquanto o cobre cúprico (Cu^{2+}) se liga a vários os ligantes séricos que funcionam como transportadores de cobre. Os números ao lado ou sob os órgãos indicam aproximadamente o percentual de cobre que é presente naquele órgão/tecido. Fonte: COLLINS, 2020.

1.1.3. INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA E LIMITES DE EXPOSIÇÃO AO COBRE

O cobre é considerado um elemento essencial para a manutenção e funcionamento do organismo e pode ser facilmente obtido na dieta de modo que a deficiência de cobre é rara em seres humanos. O Instituto de Medicina dos EUA e a OMS recomendam a ingestão diária de 0.9 mg/dia de cobre para adultos com peso de 70 Kg, e descrevem a dose máxima tolerável de 10 mg/dia de cobre para humanos (IOM, 2001; WHO, 2004).

Todavia, alguns estudos mostram que os limites seguros e tóxicos do cobre podem estar bastante próximos. Freire et al (2021) realizaram um estudo

com humanos hospitalizados em e identificaram que aqueles que ingeriam cerca de 0.96 mg de cobre diariamente representavam mais casos insuficiência cardíaca isquêmica do que aqueles que ingeriam até 0,83 mg de cobre, ou seja, o consumo de cobre mesmo na faixa considerada segura pode estar relacionado a efeitos nocivos cardíacos. Nowicki et al (2021) mostraram que a elevação da concentração sanguínea de cobre de 0.72 para 0.97 $\mu\text{g/ml}$, devido a exposição ambiental, aumentou em sete vezes a ocorrência de infarto do miocárdio. Salehifar et al (2008), Shokrzadeh et al (2009) e Alexanian et al (2014) também identificaram a relação entre discretos aumentos da concentração sérica de cobre com a presença de insuficiência cardíaca e a morte por doenças cardiovasculares. No entanto, ainda são escassos os estudos experimentais que avaliam os efeitos fisiopatológicos da exposição ao cobre no sistema cardiovascular, e os verdadeiros limites seguros e nocivos do cobre parecem não estar completamente definidos.

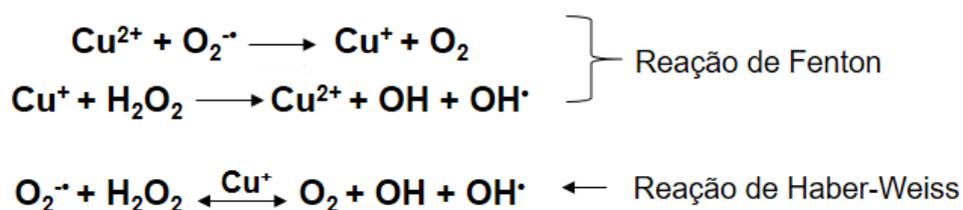
1.1.4. COBRE E ESTRESSE OXIDATIVO

Mesmo sendo essencial para o funcionamento dos organismos, os níveis elevados de cobre podem provocar efeitos tóxicos sistêmicos. Muitos dos efeitos tóxicos do cobre estão relacionados à geração de radicais livres, sendo este um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de ATP (energia), por meio da cadeia transportadora de elétrons, ativação de genes e participação de mecanismos de defesa durante o processo de infecção. Porém, a produção excessiva pode gerar danos oxidativos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SHAMI; MOREIRA, 2004).

O estresse oxidativo é gerado por qualquer espécie reativa de oxigênio (EROs) que contenha um ou mais elétrons desemparelhados (HALIWELL, 1987). A formação das EROs ocorre em todos os tecidos, como consequência do metabolismo aeróbio que forma os intermediários reativos: ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), dentre outros

(FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os radicais livres estão relacionados com uma variedade de doenças, como o câncer, as doenças hepáticas, a aterosclerose e o envelhecimento (LIMA; ABDALLA, 2001; GAETKE et al., 2014; TASIĆ et al., 2015; BAGHERI et al., 2015; SHIMIZU, 2016).

O aumento da formação de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e OH^{\bullet} ocorre através das reações de Fenton ou Haber-Weiss e já foi associado aos efeitos cardiovasculares nocivos do cobre (GOLDHABER; QAYYUM, 2000; FILETTI et al., 2018; DHALLA, 2020). Sabe-se que nos miócitos cardíacos a NADPH oxidase gera $O_2^{\bullet-}$, por meio de sua isoforma NOX2 e que o $O_2^{\bullet-}$ é capaz de catalisar as reações de Fenton e de Haber-Weiss levando a geração de OH^{\bullet} e H_2O_2 (BARREIROS et al., 2006). O H_2O_2 é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição, no entanto, na presença do cobre ele se torna capaz de gerar OH^{\bullet} , de acordo com as reações abaixo.



Esquema 01: Reações de Fenton e Haber-Weiss. Fonte: Halliwell & Gutteridge, (1998).

O excesso de radicais livres no organismo é neutralizado por agentes antioxidantes produzidos pelo corpo ou ingeridos através da dieta. Dentre os antioxidantes endógenos destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina C), e compostos fenólicos. Dessa forma, o estresse oxidativo ocorre quando há grande aumento da produção de radicais livres, superando a capacidade dos mecanismos antioxidantes, ou redução das defesas antioxidantes do organismo (SAMUNI et al, 1981; HALLIWELL, 1987).

A superóxido dismutase (SOD) é a principal defesa antioxidante dos seres humanos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986). Ela catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em O_2 e H_2O_2 . A SOD pode ser encontrada em três diferentes isoformas: uma

citoplasmática, uma mitocondrial e uma no líquido extracelular, sendo que a primeira e a terceira estão ligadas ao cobre e ao zinco (Cu/Zn-SOD) e a segunda contém manganês no seu centro reativo (Mn-SOD). Além da SOD, as enzimas catalase e glutathiona-peroxidase são importantes enzimas atuantes na degradação do H_2O_2 . Enquanto a catalase transforma H_2O_2 em H_2O e O_2 , a glutathiona peroxidase utiliza o H_2O_2 para transformar a glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada e água (GSSG) (CAI, 2005).

1.1.5. EFEITOS TÓXICOS DO COBRE NO ORGANISMO

Apesar de possuir um complexo sistema de controle e distribuição do cobre nos diferentes tecidos corporais, a exposição aumentada ao cobre pode promover a desregulação destes sistemas. Em condições em que há aumento da concentração de cobre há também o aumento do estresse oxidativo (SAMUNI, 1981). Além disso, as alterações no metabolismo do cobre e o aumento do estresse oxidativo são encontrados em muitas doenças crônicas como diabetes, hipertensão e as cardiopatias (PEREIRA et al., 2016).

Na maioria das vezes os efeitos tóxicos da exposição ao cobre são baseados em manifestações clínicas, as quais são pouco frequentes. Além disso, estes efeitos são manifestados após graves 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 (UAUY et al., 2008).

Frente a capacidade do cobre em ser reduzido de Cu^{2+} para a Cu^+ , somado à habilidade de formar EROs, e por reagir com as cadeias de lipídios e aminoácidos, o organismo desenvolveu mecanismos que podem regular esses efeitos. A homeostase do cobre é regulada por um sistema mediado por enzimas, ATPases 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, direcionando-o 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). Quando não há uma regulação

adequada dos mecanismos de utilização do cobre, é possível observar consequências fisiopatológicas sistêmicas (FUKAI; USHIO-FUKAI; KAPLAN, 2018).

A deficiência de cobre em humanos é rara e ocorre quando a disponibilidade do íon é insuficiente devido a alguma alteração genética, como na doença de Menkes, onde há uma deficiência severa de cobre, uma vez que a enzima ATP7A responsável pelo seu bombeamento das células intestinais para a corrente sanguínea está alterada (KALLER, 1996; KALLER, 1998). Por outro lado, o excesso de 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 sub-expressão da enzima ATP7B, responsável 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 (MORTIMER et al., 2010; BOST et al., 2016). Em geral, a deficiência ou toxicidade ao cobre, provenientes de distúrbios metabólicos ou exposição ao metal pode prejudicar o organismo de forma severa.

A desregulação dos níveis de cobre no organismo promove alterações na produção de ATP, aumento do estresse oxidativo, metabolismo anormal de glicose e colesterol, acúmulo de ferro tecidual, altera a função e estrutura das células sanguíneas e do sistema imune (SAARI, 2000; HARRIS, 2003; KEEN et al., 2003). Portanto, quando há deficiência ou excesso deste metal no organismo, a função de diferentes órgãos e de vários sistemas de defesa fica comprometida (SUKALSKI; LABERGE; JOHNSON, 1997; BAGHERI et al., 2015).

Diversos estudos investigaram os efeitos tóxicos do cobre no organismo. Cole e Lirenman (1978) descreveram a ocorrência de náuseas, queimação epigástrica, vômito de cor verde azulada, diarreia, anemia hemolítica, insuficiência renal, arritmia cardíaca e depressão do sistema nervoso central em

uma criança que ingeriu uma solução concentrada de sulfato de cobre. Barceloux (1999) relatou que no sistema urinário, a intoxicação por cobre promove danos no túbulo proximal, anúria e oligúria. Cho et al (2018) acompanharam o caso de uma mulher intoxicada por sulfato de cobre e que apresentou hemólise e intoxicação pulmonar. Tsao et al (2020) acompanharam o caso de uma menina de 12 anos intoxicada após comer glacê de bolo decorado com cobre elementar, cada fatia de bolo apresentava 900 mg de cobre. Cerca de 20 minutos após o consumo do bolo a menina apresentou episódios de vômito e diarreia. Em seguida, a menina mostrou taquicardia, apatia e dificuldades de deglutição. Exames laboratoriais evidenciaram aumento da concentração de cobre e ceruloplasmina no sangue. Richards et al (2020) apresentaram um relato de caso de um fisiculturista de 32 anos que ingeriu de suplementos nutricionais que continham o cobre em sua composição, visando melhorar o desempenho e ganho de peso, entretanto desenvolveu encefalopatia com risco de vida, insuficiência hepática, rabdomiólise e apresentou nível de cobre elevado, similar a doença de Wilson. Otter e Cantrell (2020) relataram a morte de uma mulher que ingeriu fungicida a base de cobre. Foi encontrado vômito azul-turquesa no local e, na autópsia, material turquesa foi encontrado em todo o trato gastrointestinal. O nível de cobre no sangue *post mortem* foi de 500 µg/dL. A causa da morte foi determinada como toxicidade aguda de cobre.

O papel do cobre nas doenças cardiovasculares tem sido relatado, demonstrando que a exposição elevada do metal pode estar associada ao aumento da mortalidade por doença coronariana, hipertensão, infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico (REUNANEN et al., 1996; FORD, 2000; BAGHERI et Al., 2015).

1.1.6. EFEITOS CARDIOVASCULARES DO COBRE

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as doenças cardiovasculares correspondem principal causa de mortalidade no mundo (WHO, 2016), e a exposição a metais pesados como o cobre e pode contribuir para o surgimento e agravamento destas doenças.

Estudos prévios sugerem que a sobrecarga de cobre pode ser a causa de alterações funcionais no sistema cardiovascular (SINGH et al., 1985; KOK et al., 1988; KOSAR et al., 2006). Freire et al (2021) avaliaram que o aumento da ingestão de cobre de 0,83 para 0,96 mg/dia está diretamente relacionado ao aumento da incidência de insuficiência cardíaca isquêmica. Nowicki et al (2021) e Zhang et al (2021) mostraram que o aumento da concentração de cobre no sangue de 0,72 para 0,97 µg/mL, devido à exposição ambiental, aumentou em sete vezes a ocorrência de infarto do miocárdio. Outros estudos também mostraram a relação entre pequenos aumentos na concentração de cobre no sangue, com a ocorrência de insuficiência cardíaca e mortalidade por doenças cardiovasculares (SALEHIFAR et al., 2008; SHOKRZADEH et al., 2009; ALEXANIAN et al., 2014).

De fato, a exposição ambiental ao cobre mostra ser um fator de risco para o funcionamento cardíaco. Em um estudo experimental, Waldemarin et al (2011) avaliaram os efeitos de exposição de peixes em água contendo 1 mg/L de sulfato de cobre durante 96 horas, enquanto os controles foram mantidos em água sem adição de cobre. O estudo mostrou a ocorrência de edema celular e mitocondrial cardíacos, redução da força de contração, do tempo de contração e das derivadas temporais de força nas tiras de ventrículos dos peixes expostos ao cobre.

Em outros estudos sobre os efeitos cardiovasculares do cobre, Nunes et al. (2018) e Filetti et al. (2018) investigaram se os efeitos da sobrecarga aguda de cobre poderia alterar a reatividade vascular e a contração cardíaca de ratos. Para isso, foi feita a incubação de anéis de aorta e músculos papilares de VE de ratos Wistar em solução nutritiva de Krebs contendo 10 µg/mL de cloreto de cobre (CuCl₂), uma concentração dez vezes superior à fisiológica. Em ambos estudos os autores encontraram prejuízos funcionais relacionados ao aumento do estresse oxidativo.

Entretanto, ainda são escassos os estudos que investigam os efeitos cardiovasculares da exposição à dose diária recomendada, à dose máxima tolerável e a doses de cobre discretamente acima do recomendado e os verdadeiros limites entre as doses seguras e nocivas de cobre permanecem incertas.

1.2. ALIMENTOS FUNCIONAIS

Devido ao grande número de indivíduos portadores de doenças crônicas relacionadas ao estilo de vida sedentário e a alimentação inadequada, tem se observado o aumento da busca por alimentos presumidamente saudáveis e/ou curativos (ROS, 2001). A percepção do alimento como provedor da saúde, não é recente, visto que a crença no poder medicinal dos alimentos é tão antiga quanto a história da humanidade. Pesquisas acerca dessa temática vêm ganhando cada vez mais relevância devido a segurança e facilidade de acesso aos alimentos funcionais (LEE et al., 2019; SHOBAKO; OHINATA, 2020; SAPWAROBOL et al., 2021).

O conceito de alimentos funcionais surgiu no Japão, na década de 1980, através de um programa governamental que visava produzir alimentos mais saudáveis para uma população que estava envelhecendo e possuía grande expectativa de vida (STRINGHETA et al., 2007). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define através da RDC 18/99, que os alimentos funcionais são aqueles alimentos ou ingredientes que além das funções nutritivas básicas, quando consumidos como parte de uma dieta usual, produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos, e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguros para consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999).

Para a percepção dos efeitos funcionais dos compostos bioativos contidos nos alimentos, estes devem estar presentes em concentrações adequadas, de preferência incorporados no próprio alimento, inseridos dentro da alimentação. Diversos componentes dos alimentos podem atuar, em determinadas concentrações, como substâncias funcionais. Dentre estes componentes é possível mencionar algumas vitaminas, minerais essenciais, proteínas e peptídeos, ácidos graxos poli-insaturados da família omega-3 e componentes da fibra alimentar (PACHECO; SGARBIERI, 1999; VIDAL, et al., 2012).

A importância de uma dieta saudável rica em alimentos funcionais para a prevenção e tratamento das doenças crônicas tem aproximado cada vez mais os conceitos de medicamentos e alimentos funcionais, tornando-os uma grande tendência do mercado alimentício (RAUD-MATTEDI, 2008). Para que um alimento possa ser considerado funcional é necessária a demonstração da sua

capacidade em afetar benéficamente funções alvo no corpo, além de possuir efeitos nutricionais adequados, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (ROBERFROID, 2002).

Nesse sentido, embora os pesquisadores estejam adquirindo mais experiência e entendimento sobre a saúde e a nutrição, o estudo dos alimentos funcionais ainda é bastante complexo. Torna-se, portanto, de grande importância o reconhecimento do verdadeiro papel do consumo de determinados alimentos sobre o crescimento, desenvolvimento e tratamento de doenças (VERSCHUREN, 2002).

1.2.1. PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Os peptídeos são compostos formados pela união de dois ou mais aminoácidos por intermédio de ligações peptídicas. Esta ligação ocorre entre o grupo carboxila de um aminoácido e o grupo amina de outro, tendo como consequência a liberação de água (LEHNINGER, 2018). Os peptídeos podem ser resultados da digestão, hidrólise ou do processamento de proteínas presentes nos alimentos (HARTMAN; MEISEL, 2007).

Os peptídeos bioativos são aqueles que apresentam função regulatória dos sistemas do corpo humano, além da sua função nutritiva, sem apresentar risco à saúde de quem o ingere (MEISEL; FITZGERALD, 2003). Normalmente estes peptídeos possuem o tamanho de 2-20 aminoácidos (KITTS; WEILER, 2003). A atividade biológica é dada tanto pela sequência dos aminoácidos presentes nos peptídeos, quanto pela composição dos aminoácidos e sua massa molecular (MOLLER et al., 2008; KORHONEN, 2009). Com base em suas propriedades estruturais, sua composição e sequências de aminoácidos, esses peptídeos podem desempenhar vários papéis, como opióides, ligantes de mineral, imunomoduladores, antimicrobianos, antioxidantes, antitrombóticos, hipocolesterolêmicos e anti-hipertensivos (SARMADI; ISMAIL, 2010). Além disso, vários peptídeos foram caracterizados por possuírem propriedades multifuncionais (MOURE, 2006).

Em 1950, os peptídeos bioativos de origem alimentar foram descobertos por Mellander, que pesquisou os peptídeos fosforilados de caseína, que estimulavam a calcificação óssea de lactentes com deficiência de vitamina D (MELLANDER, 1950). Peptídeos bioativos são considerados fragmentos específicos de proteínas que geralmente são inativos dentro da sequência da matriz proteica (ZENEZINI et al., 2016). As proteínas intactas, nativas dos alimentos, geralmente não apresentam ou apresentam pouca atividade biológica. Portanto, faz-se necessário a transformação dessas proteínas em peptídeos para que esses possam expressar sua funcionalidade. Essa transformação pode ser *in vivo* durante digestão, e *in vitro* por hidrólise enzimática ou fermentação microbiana (KORHONEN; PIHLANTO, 2006; ZOU et al., 2016). Uma das maneiras mais eficientes de se obter esses peptídeos é através da hidrólise enzimática (KORHONEN, 2009).

Desse modo, muitas proteínas presentes nos alimentos podem ser fontes de peptídeos biologicamente ativos, desempenhando inúmeros papéis fisiológicos, inclusive no controle de doenças (WU et al., 2021). Alimentos como ovos, leite, peixes, cereais, legumes e frutas demonstram apresentar benefícios à saúde por desempenharem funções antioxidantes, anti-hipertensivas e anti-inflamatórias, sugerindo que esses alimentos podem ser importantes alternativas para a prevenção e controle de doenças que envolvam tais mecanismos fisiopatológicos, incluindo a toxicidade induzida pela exposição a metais tóxicos (MARTÍNEZ-AUGUSTIN et al., 2014; RIZZETTI et al., 2016a; 2016b; RIZZETTI et al., 2017; WU et al., 2021).

1.2.2. FUNÇÕES BIOLÓGICAS DOS PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Os peptídeos bioativos são capazes de desempenhar importantes ações biológicas, podendo apresentar ação de regulação e modulação metabólica, sugerindo o uso potencial como ingredientes de alimentos funcionais para atuar na promoção da boa saúde ou na redução do risco de desenvolvimento de determinadas doenças (PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 2000; SHAHIDI; ZHONG, 2008; GARCÉS-RIMÓN et al., 2016).

As características dos peptídeos bioativos, assim como seus efeitos principais são dependentes da forma como o mesmo é preparado (MOURE et al., 2006). A fonte proteica precursora, o tipo de enzima usada no processo de hidrólise, a relação enzima/substrato, o tempo de incubação, o pH e a temperatura são os principais responsáveis pela variabilidade das atividades biológicas dos peptídeos bioativos obtidos *in vitro* (WANG; GONZALEZ, 2005; MULERO et al., 2011).

Estudos prévios descrevem as propriedades antioxidantes e quelantes (ESCOBAR et al., 2020), anti-hipertensivas (LEE et al., 2019) e anti-inflamatórias (HUANG et al., 2010) para peptídeos oriundos de diversas proteínas, assim como sua atuação sobre desordens neurológicas (MARTINEZ et al., 2019a), cardiovasculares (RIZZETTI et al., 2017) e metabólicas (SON; WU, 2019).

Vários estudos mostraram a presença da ação antioxidante em hidrolisados ou peptídeos bioativos provenientes de fontes proteicas vegetais ou animais como o ovo (SAKANAKA; TACHIBANA, 2006), o leite (LIU et al., 2021), a caseína (MIGUEL et al., 2010), o amendoim (HWANG et al., 2010), o milho (LI et al., 2008), o farelo de arroz (REVILLA et al., 2009) e, animais marinhos (FENG et al., 2015). Muitos peptídeos, que contém tirosina, metionina, histidina, lisina ou triptofano, são aceitos como antioxidantes. Esta atividade vinculada a peptídeos bioativos pode ser atribuída ao seu potencial sequestrador de radicais livres, à inibição da peroxidação dos lipídios e de íons metálicos pela quelação desses últimos (SINGH; VIJ; HATI, 2014).

Além disso, tem sido demonstrado que alguns hidrolisados proteicos vegetais são capazes de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes glutaciona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) *in vivo* (FU, 2003), como exemplo podemos citar alguns antioxidantes naturais, como ácido rosmarínico, os tocoferóis, o ácido ascórbico, entre vários extratos fenólicos de origem vegetal, que são muito utilizados em alimentos processados (SAMUNI et al, 1981; HALLIWELL, 1987).

Os aminoácidos com resíduos aromáticos apresentam efeitos antioxidantes devido a capacidade de doar prótons a radicais deficientes de elétrons, conferindo aos seus peptídeos constituintes boas propriedades de

neutralização de radicais livres (RAJAPAKSE et al., 2005). O grupo SH do aminoácido cisteína tem uma ação antioxidante independentemente devido a sua interação direta com radicais livres (QIAN et al., 2008; SARMADI; ISMAIL, 2010).

1.2.3. PEPTÍDEOS BIOATIVOS DA CLARA DO OVO

O ovo é uma excelente fonte para obtenção de peptídeos bioativos, principalmente a clara, devido ao seu alto conteúdo proteico (YU et al., 2011; REN et al., 2014). Os peptídeos derivados de proteína de ovo podem exercer diversas atividades biológicas, incluindo atividade inibidora da enzima conversora de angiotensina (RIZZETTI et al., 2017), anti-hipertensiva (JAHANDIDEH et al., 2016), antioxidante (CARRILLO et al. 2016), antimicrobiana (YAZDI, ASOODEH, e CHAMANI 2012), anti-inflamatória (PALIKA et al., 2015) e antidiabética (YU et al. 2011).

Assim, muitos pesquisadores têm se dedicado à obtenção de hidrolisados bioativos de ovo, principalmente devido a sua ação antioxidante, seja para a aplicação na saúde, formulação de novos alimentos e suplementos ou para incorporação em alimentos (MINE et al., 2013, REN et al., 2014; NIMALARATNE et al., 2015).

Os peptídeos antioxidantes provenientes da clara do ovo são inibidores potentes da oxidação de biomoléculas (como as proteínas, os lipídios e o DNA) devido à sua eficácia na eliminação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, inativando intermediários reativos e metais de transição pró-oxidativos (ELIAS et al., 2008).

A função antioxidante de alguns peptídeos bioativos derivados do ovo se deve em grande parte as suas propriedades *redox*, que lhes possibilita atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio, e supressores de oxigênio. Além do mais, eles são capazes de atuar como quelantes de metais (ESCOBAR et al., 2020). A presença de aminoácidos tirosina e fenilalanina nos peptídeos está relacionada com a propriedade de neutralização de radicais livres (MIGUEL et al., 2004). Estudos anteriores descreveram também a produção de

hidrolisados proteicos de ovo nos quais a presença de resíduos de aminoácidos tirosina e fenilalanina lhes conferiu capacidade quelante e atuação concomitante como agente antioxidante (TORRES-FUENTES et al., 2014), evidenciando a gama de propriedades funcionais apresentadas pelos peptídeos bioativos derivados do ovo.

Tomados em conjunto, a obtenção de peptídeos antioxidantes a partir de hidrolisados da clara de ovo (HCO), que poderiam ser consumidos diretamente ou adicionados a outros alimentos, o que pode representar uma boa estratégia para prevenir a progressão de doenças relacionadas com o estresse oxidativo induzidos por metais tóxicos. Em contexto similar, foi observado que o HCO apresenta efeito preventivo sobre os danos causados pelo estresse oxidativo após a exposição ao mercúrio em neurônios e espermatozoides (RIZZETTI et al., 2016a; 2016b; RIZZETTI et al., 2017b), e foi capaz de prevenir a disfunção cognitiva e vascular de ratos expostos ao alumínio (MARTINEZ et al., 2019a; MARTINEZ et al., 2019b). As principais sequências de peptídeos identificados no HCO com pepsina por oito horas e suas respectivas atividades biológicas encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 1: Sequências identificadas por Garcés-Rimón et al (2016) presentes no HCO com pepsina e suas atividades biológicas *in vitro*.

Peptídeo	Atividade inibidora da ECA (μM)	Atividade antioxidante ($\mu\text{mol Trolox}$)	Atividade vasodilatadora (%) em artérias de condutância	Atividade vasodilatadora (%) em artérias de resistência
FRADHPFL	3,2	0,1	49,5/68	46,3
RADHPFL	6,2	0,1	40,5	42,6
YAEERYPIL	4,7	3,8	31,5	19,1
YRGGLEPINF	>1000	1,1	44,1	72,4
ESIINF	>1000	<0,02	42,5	17,4
RDILNQ	435,7	<0,02	49,3	66,2
IVF	33,9	<0,02	28,7	n.d.
YQIGL	173,8	1,7	<10	<10
SALAM	229,1	2,7	12,2	<10
FSL	172,9	<0,02	<10	<10

Tabela 01: Adaptado de Garcés-Rimón et al (2016).

Diante do exposto, é notável que os limites seguros e nocivos do cobre para os seres humanos permanecem incertos, apesar de ser reconhecido que a exposição ao cobre configura um fator de risco cardiovascular pois aumenta o estresse oxidativo e isso favorece o desenvolvimento de placas de aterosclerose, hipertensão arterial, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca. Todavia, sendo o HCO um peptídeo com ação antioxidante, anti-inflamatória e anti-hipertensiva e que já mostrou ação protetora contra os efeitos de metais como o mercúrio e alumínio nos sistemas circulatório, nervoso e reprodutivo, ele poderia ser utilizado também na prevenção e/ou tratamento dos efeitos do cobre no sistema cardiovascular. Por isso, a hipótese deste estudo é que o cobre, mesmo em doses descritas como toleráveis é capaz de prejudicar a reatividade vascular e a contração cardíaca, prejuízos estes relacionados, ao menos em partes, ao aumento do estresse oxidativo, todavia o HCO pode representar uma estratégia na prevenção dos efeitos nocivos cardiovasculares promovidos pelo cobre devido a sua capacidade de melhorar as defesas antioxidantes do organismo.

1.3. JUSTIFICATIVA

Diante do aumento da exposição ao cobre no ambiente, na indústria e nos alimentos, há uma preocupação com os limites seguros do cobre no organismo. Apesar de ser essencial para diversas funções no organismo, sabe-se que em alta concentração o cobre promove efeitos tóxicos, todavia, não está claro qual é o limite seguro de exposição ao cobre no organismo e há necessidade de estudos que avaliem os efeitos dessa exposição a longo prazo.

A exposição elevada ao cobre tem sido associada a diversas doenças cardiovasculares. Indivíduos que consomem mais cobre apresentam mais insuficiência cardíaca isquêmica (FREIRE et al., 2021). Pacientes com doença aterosclerótica, infarto do miocárdio e hipertensão apresentam níveis séricos de cobre maiores (SHOKRZADEH et al., 2009; ALEXANIAN et al., 2014; BAGHERI et al., 2016; ZHANG et al., 2021). Logo, o aumento da exposição e da concentração de cobre no sangue pode aumentar o risco para o surgimento ou agravamento dessas doenças.

Poucos estudos avaliaram os efeitos cardiovasculares desencadeados pela exposição ao cobre dentro dos limites recomendados, ou em doses discretamente aumentadas. Zhang et al (2021) descrevem que o ideal é que os efeitos da exposição a metais sejam avaliados cronicamente, pois populações expostas passam longos períodos em contato com os referidos metais, portanto, estudos de exposição prolongada configuram a melhor forma de mimetizar o que acontece na realidade. Desta forma, este estudo é relevante por ser o primeiro a descrever um modelo de avaliação dos efeitos cardiovasculares da exposição ao cobre por 4 semanas. Ademais, o desenvolvimento de pesquisas que viabilizem meios para o conhecimento de substâncias capazes de prevenir ou tratar os efeitos danosos decorrentes da intoxicação por metais pesados e, suas consequências clínicas a longo prazo é necessário e fundamental para a saúde humana.

Além de estratégias para controle da exposição ambiental ao cobre, alternativas terapêuticas naturais são boas estratégias para a prevenção dos prejuízos à saúde induzidos pelo metal. Assim, o HCO pode ser uma boa ferramenta terapêutica pois em estudos anteriores já foi demonstrado atividades antioxidante, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica e anti-hiperinsulinêmica, analisados em outras disfunções orgânicas e em outros modelos animais (YU et al. 2011; PALIKA et al., 2015; JAHANDIDEH et al., 2016; CARRILLO et al. 2016; RIZZETTI et al., 2017).

Ao passo que estudos recentes ressaltam fortemente os benefícios do HCO sobre as funções cardiovasculares, não há relatos na literatura a respeito dos seus efeitos sobre os danos no sistema cardiovascular induzidos pela exposição ao cobre e tampouco, não são claros ainda, os mecanismos moleculares para as suas ações sobre estes sistemas. Portanto, é fundamental verificar se e como o HCO pode converter-se em uma opção natural e eficaz para prevenir ou tratar os efeitos prejudiciais induzidos pelo cobre no organismo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos cardiovasculares da exposição às doses de ingestão diária recomendada, ingestão máxima tolerável e dobro da dose máxima tolerável de cobre e a avaliar ação anti-estresse oxidativo de peptídeos hidrolisados da clara de ovo sobre função cardíaca de ratos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os efeitos cardiovasculares de relacionados a exposição às doses recomendadas de cobre;
- Avaliar se a exposição ao cobre altera o peso corporal, a pressão arterial sistólica, a reatividade vascular e a massa das câmaras cardíacas e se o HCO previne essas possíveis alterações;
- Investigar se a exposição ao cobre altera os mecanismos reguladores da contratilidade miocárdica de músculos papilares e se o HCO é capaz de prevenir essas alterações;
- Determinar se a exposição ao cobre promove aumento da produção de ânion superóxido e radical hidroxila *in situ* e se o HCO pode reverter esse efeito;
- Aferir se a exposição ao cobre altera a atividade da ATPase miosínica, da SOD e da catalase e se o HCO é capaz de prevenir essas alterações;
- Averiguar o efeito da exposição ao cobre e ao HCO na expressão de proteínas envolvidas na regulação do ciclo de cálcio no miócito cardíaco e proteínas antioxidantes como a SERCA, PLB, NCX, SOD, Catalase.

3. METODOLOGIA

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso de 250 g e aproximadamente 8 semanas de idade, fornecidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram mantidos em gaiolas, ambiente de temperatura controlada, submetidos a ciclo claro-escuro de 12h, e com livre acesso a água e ração.

Nossos experimentos foram realizados conforme as Diretrizes Brasileiras para Cuidado e Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos publicada pelo CONCEA (2018). Nossos protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFES (CEUA 026/2018).

3.2. MODELOS EXPERIMENTAIS

3.2.1. MODELO DE TOXICIDADE INDUZIDA PELO COBRE

Conforme identificamos anteriormente (FILETTI et al., 2018; NUNES et al., 2018), a exposição a alta concentração de cobre *in vitro* é capaz de promover prejudicar a contratilidade cardíaca e a reatividade vascular devido ao aumento do estresse oxidativo. Para a determinação deste modelo experimental, três doses de cobre foram escolhidas com base nas recomendações do Instituto de Medicina dos EUA e da Organização Mundial da Saúde (IOM, 2001; WHO, 2004) que recomendam uma ingestão diária de 0,9 mg de cobre para adultos de 70 Kg, equivalente a 13 µg/Kg/dia. A dose de 10 mg de cobre, é equivalente a 0,14 mg/Kg/dia, e é considerada o limite máximo tolerável de ingestão de cobre (IOM, 1998). Apesar de relatos de que esta dose é capaz de promover efeitos gastrointestinais adversos (OMS, 2011), não há descrição de danos cardiovasculares. Portanto, avaliamos também se o dobro da dose máxima tolerada, equivalente a 20 mg para humanos, ou 0,28 mg/Kg/dia, é capaz de promover efeitos adversos no sistema cardiovascular.

Assim, animais foram divididos em quatro grupos randomizados: um grupo controle (Ct, N= 6) e três grupos expostos a diferentes concentrações de cobre (Cu 13 µg, N = 6, Cu 0,14 mg, N = 6, Cu 0,28 mg, N = 6). Os animais do grupo controle receberam 0,1 mL de solução salina intraperitoneal (i.p.) durante 4 semanas, enquanto os animais nos grupos Cu 13 µg, 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia receberam cobre i.p. por 4 semanas, conforme mostra o quadro 1.

Tabela 02: Modelo de exposição ao cobre.

Grupos	Dose	Via	Duração
Ct	0,1 ml NaCl 0,9%	I.p.	4 semanas
Cu 13 µg	13 µg/Kg/dia CuCl ₂	I.p.	4 semanas
Cu 0,14 mg	0,14 mg/Kg/dia CuCl ₂	I.p.	4 semanas
Cu 0,28 mg	0,28 mg/Kg/dia CuCl ₂	I.p.	4 semanas

Tabela 02: As doses são equivalentes aos níveis de ingestão diária recomendada (0,9 mg), dose máxima tolerável (10 mg) e o dobro da dose máxima tolerável (20 mg) em humanos, os valores foram corrigidos considerando o peso dos animais.

A via intraperitoneal foi escolhida para a administração de cobre neste modelo de exposição experimental nos animais. Nesta via o fármaco é injetado diretamente na cavidade peritoneal. Ela foi escolhida por permitir a administração controlada da solução, o que não é possível pela via oral, pois o cobre pode não ser totalmente absorvido pelo organismo. Outra vantagem desta via é a alta velocidade na passagem da solução para a circulação devido à grande superfície absorptiva da cavidade peritoneal e principalmente pela passagem pela veia porta, o que promove o metabolismo hepático e mimetiza o processo metabólico fisiológico do cobre (HARDMAN; LIMBIRD, 1996).

3.2.2. MODELO ANTI-ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO PELO PEPTÍDEO HIDROLISADO DA CLARA DO OVO (HCO)

Para a avaliação experimental das propriedades anti-estresse oxidativo do peptídeo hidrolisado da clara de ovo utilizou-se a dose de cobre equivalente a 10 mg para humanos (0,14 mg/Kg/dia), pois apesar deste ser considerado um limite seguro, os resultados obtidos na avaliação da toxicidade induzida pelo cobre mostraram que o mesmo é capaz de promover prejuízos cardiovasculares. O tratamento com o HCO foi realizado conforme descrito por RIZZETTI et al., (2016a).

Os ratos foram divididos em quatro novos grupos experimentais, os quais foram tratados por 4 semanas com: grupo Ct, recebeu solução salina 0,9% i.p. e

água filtrada por gavagem; grupo Cu 0,14 mg, recebeu 0,14 mg/Kg/dia de cobre (CuCl_2) diluído em solução salina i.p. e água filtrada por gavagem; grupo Ct-HCO, recebeu solução salina 0,9% i.p. e HCO diluído em água filtrada na dose de 1 g/Kg/dia por gavagem; grupo Cu-HCO, recebeu ambos os tratamentos, CuCl_2 i.p. e HCO por gavagem, conforme mostra o quadro 2:

Tabela 03: Modelo de exposição ao cobre e ao HCO.

Grupos	Dose	Via	Duração
Ct	0,1 ml NaCl 0,9% Água filtrada	I.p. Gavagem	4 semanas
Cu 0,14 mg	0,14 mg/Kg/dia CuCl_2 Água filtrada	I.p. Gavagem	4 semanas
Ct-HCO	0,1 ml NaCl 0,9% 1 g/Kg/dia HCO	I.p. Gavagem	4 semanas
Cu-HCO	0,14 mg/Kg/dia CuCl_2 1 g/Kg/dia HCO	I.p. Gavagem	4 semanas

Tabela 03: Exposição experimental ao cobre e ao HCO. Descrição dos grupos experimentais, tratamentos recebidos, vias de administração e período de duração.

3.3. PREPARO DO PEPTÍDEO HIDROLISADO DA CLARA DE OVO

O preparo do peptídeo hidrolisado da clara de ovo ocorreu em Madrid (Espanha) e foi gentilmente cedido pela Dr^a. Marta Miguel Castro. A clara de ovo pasteurizada sofreu hidrolise com enzima pepsina (1:3000, *Sigma Aldrich*), na proporção enzima/substrato (clara de ovo) de 2:100 (w/v). Posteriormente, a clara do ovo foi acidificada com HCl (37%) até obter pH próximo a 2 para que a enzima fosse ativada. As amostras foram então incubadas a 37°C, sob agitação constante num banho com termostato durante 8 horas. Após transcorrido o tempo, a inativação da enzima se deu através do aumento do pH para 7,0 com NaOH. Os hidrolisados foram centrifugados durante 15 minutos a 4500 g. Por fim, o sobrenadante foi liofilizado e armazenado como descrito por Miguel et al., (2007).

Em nosso laboratório, o HCO foi diluído lentamente em água filtrada à 37°C utilizando agitador magnético. Após a total dissolução, o HCO foi armazenado em tubos Falcon com uma quantidade suficiente para o tratamento diário dos ratos e congelado a -20°C. Apenas a quantidade suficiente para o tratamento do dia era descongelada.

3.4. AVALIAÇÃO PONDERAL

Os ratos dos quatro grupos de ambos modelos experimentais foram pesados semanalmente com o objetivo de avaliar possíveis alterações no ganho de peso após a exposição ao cobre e/ou HCO.

Os parâmetros ponderais das câmaras cardíacas foram obtidos ao final das 4 semanas de exposição ao cobre e/ou HCO. Para obtenção destes dados os ventrículos direito e esquerdo foram dissecados, lavados em solução salina (NaCl 0.9 %), enxugados em papel toalha para retirada do excesso de líquidos e pesados. Para evitar possíveis “falsos resultados” em detrimento do tamanho dos ventrículos, o peso das câmaras foi corrigido pelo comprimento da tibia de cada animal correspondente conforme descrito por Fioresi (2011).

3.5. AVALIAÇÃO INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA PELA TÉCNICA DE PLETISMOGRAFIA DE CAUDA

A pressão arterial sistólica (PAS) dos animais dos grupos experimentais foi avaliada semanalmente, de maneira indireta, pelo método de pletismografia de cauda (IITC Life Science non-invasive blood pressure, versão 1.35) conforme descrito por Fioresi (2011). Este protocolo foi executado com a finalidade de avaliar os efeitos do tratamento com o cobre e HCO sobre os valores pressóricos dos animais acordados, ou seja, sem possíveis efeitos depressores dos anestésicos. Antes do início das medidas pressóricas os animais passaram por um período de três dias de aclimatização. Esta adaptação foi realizada colocando os animais no aparelho e mimetizando-se a técnica de mensuração da pressão arterial. Esta aclimatização 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 nos valores pressóricos obtidos dos animais.

No dia do registro pressórico os animais foram colocados em um cilindro de acrílico (*holter*). A cauda dos animais foi então conectada ao sensor de pressão do manguito (*cuff*) estava conectado ao amplificador e este ao computador, para obtenção dos dados pressóricos. Os cilindros com os ratos foram colocados no interior do aquecedor a 37 °C, a fim de promover dilatação da artéria caudal permitindo a aferição da PAS. Foram realizadas três medidas testes para verificar se todas as condições estavam adequadas para iniciar o procedimento.

Como quesitos de avaliação para condição ideal devem ser observados: posição, adaptação e relaxamento do animal; temperatura e posição do *cuff* e ausência de evacuação durante o procedimento. Depois de confirmada a adequação, cinco novas medidas foram realizadas e destas, as três medidas com menos interferências foram escolhidas para calcular a média aritmética da PAS de cada animal.

3.6. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR DE AORTA

Após 4 semanas de exposição às doses diária recomendada, dose máxima tolerável e o dobro da dose máxima tolerável, os ratos foram anestesiados com ketamina (50 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) i.p. e eutanasiados. A aorta torácica descendente foi cuidadosamente retirada e imersa em placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit. Os tecidos conectivo e adiposo foram removidos, e a aorta foi dividida em segmentos com aproximadamente 4 mm de comprimento.

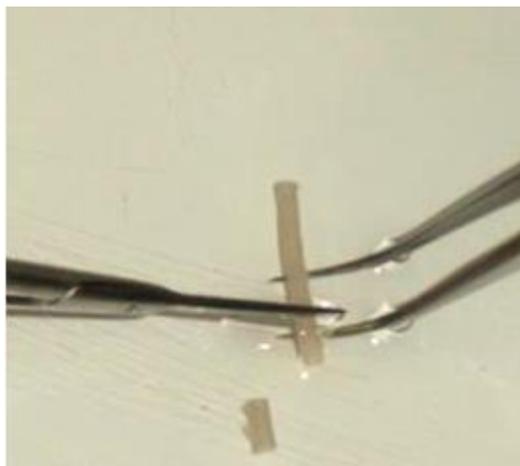


Figura 03: Aorta torácica em placa de Petri banhada em solução nutritora de Krebs, sendo dividida em segmentos com aproximadamente 4 mm. Fonte: ANGELI (2009).

Os anéis de aorta foram colocados em cubas contendo 5 mL de solução de Krebs-Henseleit, composta por (em mM): NaCl 127; KCl 4,7; CaCl₂. H₂O₂ 2,5; MgSO₄.7H₂O 1,2; KH₂PO₄ 1,17; NaHCO₃ 24; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica composta por 5% de CO₂ e 95% de O₂, pH 7.4, e mantida a 36,5 ± 0,5°C. Dois fios de aço inoxidável em formato de triângulos foram passados através do lúmen dos anéis, de forma que ficassem paralelos à luz do vaso. Um fio foi fixado à parte inferior da cuba e o outro conectado verticalmente a um transdutor de força isométrica (TSD125C, CA, USA). Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso de aproximadamente 1 g, reajustada, quando necessário, durante o período de 45 minutos de estabilização. Em seguida, todos os segmentos aórticos foram expostos duas vezes ao cloreto de potássio (KCl, 75mM), primeiro para verificar a integridade funcional do músculo liso vascular e o segundo para a verificar a tensão máxima desenvolvida. A integridade do endotélio foi avaliada, e em seguida a resposta contrátil à fenilefrina (Phe, 10 µM) e o relaxamento à acetilcolina (ACh, 10 µM) e ao nitroprussiato de sódio (NPS, 10 µM) foram avaliadas.

3.7. AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO CARDÍACA

Após a anestesia, o coração foi rapidamente removido e colocado em solução de Krebs-Henseleit contendo (em mM): 135 NaCl; 4,6 KCl; 1,25 CaCl₂;

1,15 MgSO₄; 1,2 KH₂PO₄; 5,5 glicose, aerada com solução carbogênica contendo 95% de O₂ e 5% de CO₂, pH = 7,4. A parede do ventrículo direito foi removida para expor o septo interventricular, que foi dividido ao meio para que os músculos papilares do ventrículo ficassem claramente expostos. O músculo papilar posterior do ventrículo esquerdo foi cuidadosamente dissecado numa plataforma de parafina e suas extremidades presas a anéis de aço inoxidável, sendo em seguida imerso em uma cuba contendo 20 mL de solução de Krebs-Henseleit e mantidas a 29°C para evitar hipóxia (VASSALLO, 1988).

As preparações foram ligadas a um transdutor de força isométrico (TSD125 - Biopac Systems, Inc. CA), sendo a força registrada por sistema de aquisição de dados (MP100 Byopac Systems, Inc; CA) para análise através de um microcomputador. A estimulação por campo elétrico foi induzida por pulsos isolados (10 a 15 V, duração de 5 ms) que foram aplicados através de um par de eletrodos de platina posicionados ao longo de toda a extensão do músculo. A taxa padrão de estimulação foi de 0,5 Hz (VASSALLO, 1988).

Em seguida, o músculo papilar foi estirado sucessivamente, até atingir a força de contração máxima, chamado de *L_{máx}*. O músculo foi mantido nesta condição, realizando contrações estáveis durante 60 minutos, este tempo é necessário para que ele se estabilize diante das novas condições experimentais.

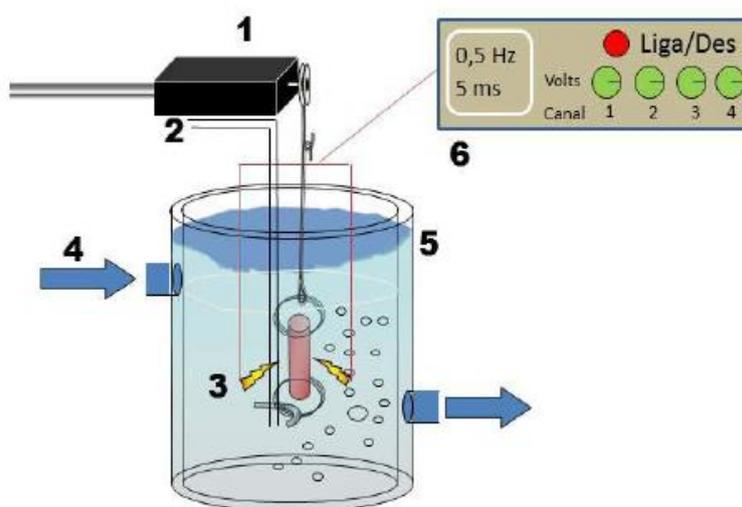


Figura 04: Sistema de avaliação contrátil de músculos papilares de ventrículo esquerdo. 1: transdutor de força, 2: sistema de aeração com mistura carbogênica, 3: eletrodos, 4: banho, 5: cuba, 6: estimulador. Adaptado de RIVAROLI (2011).

A força desenvolvida durante as contrações foi medida em g/mg (força desenvolvida, em g, dividida pelo peso muscular, em mg). A correção pelo peso do papilar foi utilizada para normalizar os dados de diferentes preparações.

3.7.1. FORÇA DE CONTRAÇÃO ISOMÉTRICA E PARÂMETROS TEMPORAIS DE FORÇA

Após o período de estabilização foram mensuradas: a força desenvolvida, os tempos de ativação e relaxamento e as derivadas temporais de força (dF/dt) positiva e negativa das contrações isométricas dos músculos papilares. Estes parâmetros foram avaliados em todos os grupos experimentais. Os resultados de força isométrica foram expressos em gramas por miligramas de peso do músculo. Os tempos de ativação e relaxamento são os tempos gastos, respectivamente, para atingir o pico da força desenvolvida e para a força decrescer 90% de seu valor máximo desenvolvido (VASSALLO et al., 2008).

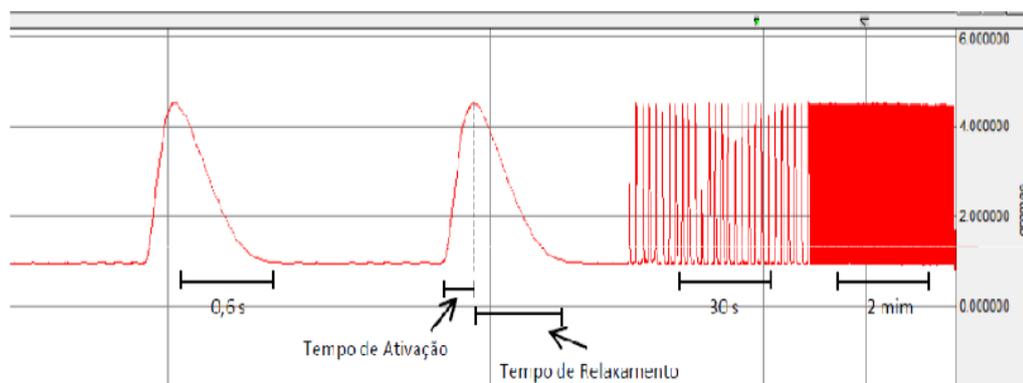


Figura 05: Registro típico de força de contração de músculos papilares do VE de ratos Wistar evidenciando os parâmetros temporais da contração. O pico da deflexão positiva corresponde a força desenvolvida. Adaptado de FIORESI (2011).

As derivadas temporais de força mostram a taxa de variação da força de contração em função do tempo. Ela é dada pelo cálculo da primeira derivada temporal dos valores de força, sendo avaliadas as máximas derivadas positiva ($+dF/dt$ máx) e negativa ($-dF/dt$ máx) como parâmetros de performance da contração (sístole) e do relaxamento (diástole), respectivamente.

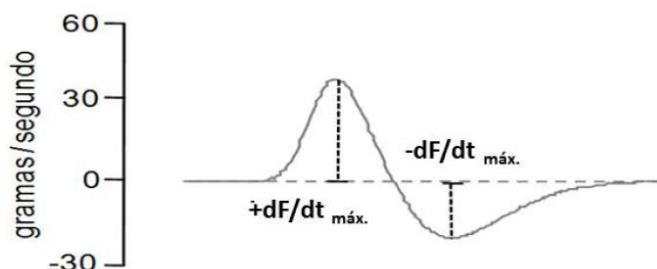


Figura 06: Registro típico de dF/dt máximas positivas e negativas. Adaptado de ÁVILA (2016).

3.7.2. AVALIAÇÃO DAS POTENCIAÇÕES PÓS PAUSAS (PPP)

A manobra das potenciações pós pausas (PPPs) foi realizada para avaliar, de forma indireta, a atividade do retículo sarcoplasmático (RS). Foram realizadas pausas crescentes (15, 30 e 60 segundos) na estimulação elétrica dos músculos papilares para avaliar a amplitude da contração após a pausa, considerada como indicador da função do RS (BOCALINI et al., 2012; MILL et al., 1992). Após o retorno das contrações, a estimulação elétrica foi mantida durante 60 segundos para que as contrações se estabilizassem, e então a pausa seguinte era realizada. A correção da força de contração após a pausa foi normalizada pelo valor relativo da contração anterior a pausa, aguardando o retorno das contrações para condições basais.

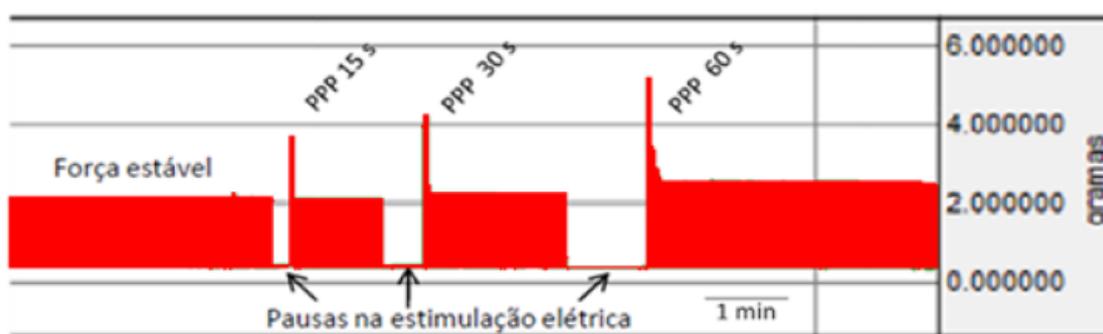


Figura 07: Registro típico de PPP de músculos papilares de VE de ratos Wistar obtidas com a reestimulação elétrica após pausas de 15, 30 e 60 segundos no estímulo elétrico aplicado no músculo. Adaptado de FIORESI (2011).

3.7.3. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INOTRÓPICA AO CÁLCIO

Para avaliar a resposta inotrópica ao cálcio a solução nutritora foi trocada por uma solução contendo a metade da concentração normal de Ca^{2+} (0,62 mM). Após um período de estabilização de aproximadamente 20 minutos, foram acrescidas doses de uma solução com elevada concentração de cloreto de cálcio (500 mM), para avaliação da resposta inotrópica do músculo ao Ca^{2+} . Esta curva foi avaliada pela amplitude máxima da contração estabilizada, após o acréscimo na concentração extracelular de cloreto de cálcio (0,62, 1,25 e 2,5 mM) na perfusão dos músculos papilares isolados dos ratos de todos os grupos experimentais. A variação de força foi corrigida pelo peso dos músculos e expressa em g/mg.

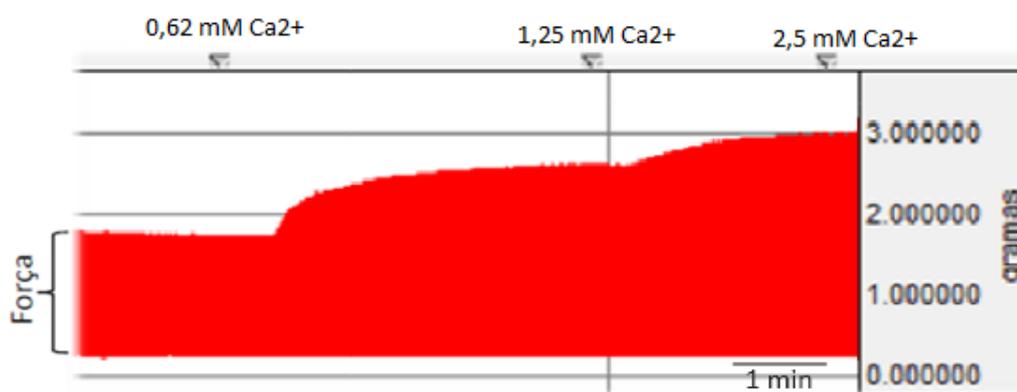


Figura 08: Registro típico da resposta do aumento de força contrátil frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular obtida em preparação de músculos papilares de VE de ratos. Adaptado de FIORESI (2011).

3.7.4. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA INOTRÓPICA A ESTIMULAÇÃO BETA-ADRENÉRGICA

Para avaliar os efeitos dos tratamentos com cobre e HCO na resposta β -adrenérgica de músculos papilares foi utilizado o Isoproterenol (10^{-4} M). Para a realização desta intervenção foi utilizada uma solução de Krebs-Henseleit contendo metade da concentração fisiológica de cálcio (0,62 mM), pois se sabe que as preparações de músculo isolados de ratos apresentam melhor resposta inotrópica positiva quando estão em baixa concentração de cálcio (VASSALLO et al., 1994).

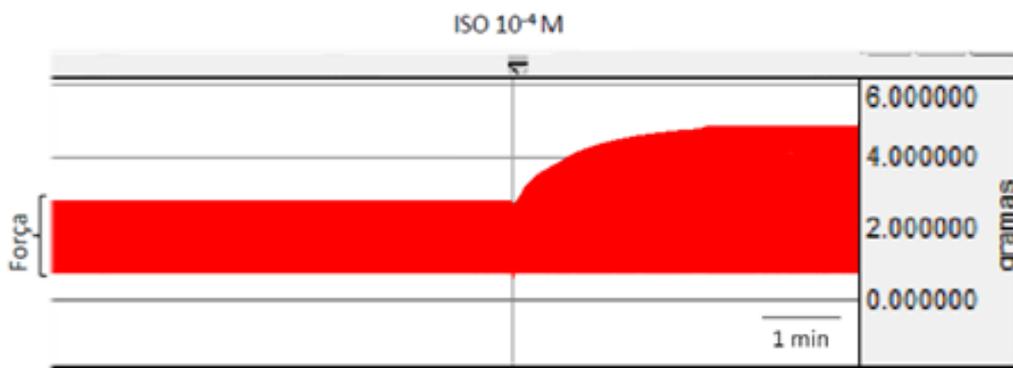


Figura 09: Registro típico da resposta β -adrenérgica em preparação de músculos papilares de VE de ratos após a administração de uma dose de Isoproterenol. Fonte: FILETTI (2018).

3.7.5. MEDIDA INDIRETA DO INFLUXO DE CÁLCIO TRANSSARCOLEMAL “POST REST CONTRACTION-PRC”

As contrações obtidas após pausa de 10 minutos no estímulo elétrico (PRC) foram realizadas para avaliar de forma indireta o efeito da exposição ao cobre e HCO no influxo de cálcio transsarcolemal para contração miocárdica. Para isso, foi utilizada a solução “Krebs” previamente descrita, porém livre de cálcio (cálcio *Free*) e acrescida de 10 mM de cafeína. Este procedimento permite eliminar o cálcio intracelular e do RS, uma vez que a cafeína nessa concentração depleta os estoques intracelulares de cálcio por se ligar aos receptores de rianodina do RS (BASSANI; BASSANI; BERS, 1994; LEITE; VASSALLO; MILL, 1995), ao mesmo tempo que, a ausência de cálcio facilita a extrusão de cálcio pelo sarcolema (VASSALLO et al., 2008). Os músculos foram lavados, por duas vezes, com a solução Ca^{2+} *free* até as contrações serem abolidas e, em seguida, o estímulo elétrico foi cessado por 10 minutos. Dois minutos antes de a estimulação ser reiniciada, as preparações eram reperfundidas com solução Krebs-Henseleit normal (1,25 mM de cálcio). Desta forma, pode-se inferir que a primeira contração após a pausa de 10 minutos é dependente do influxo de cálcio proveniente do meio extracelular, visto que os estoques intracelulares foram depletados. Esta contração após o repouso de estímulos foi expressa como a porcentagem em relação à amplitude da contração em $L_{máx}$ (antes do repouso de estímulos).

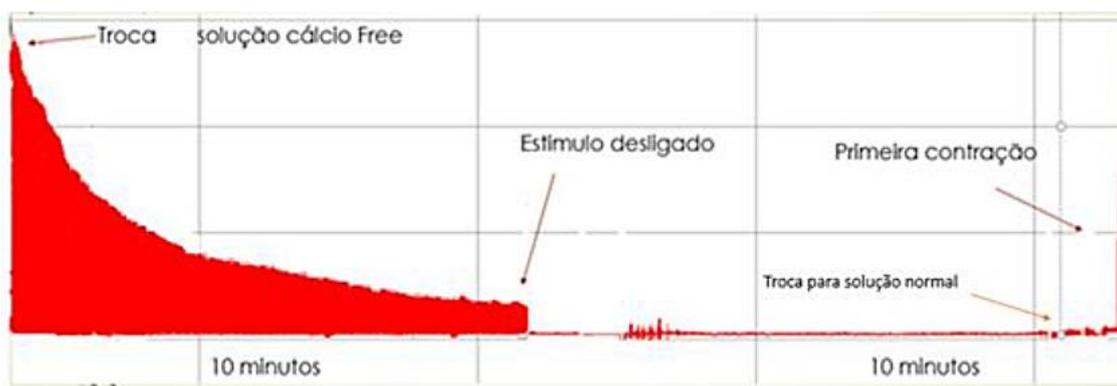


Figura 10: Registro típico de uma “*post-rest contraction*” em preparação de músculos papilares de VE de ratos. Adaptado de SILVA (2014).

3.7.6. AVALIAÇÃO DAS CONTRAÇÕES TETÂNICAS

As contrações tetânicas foram utilizadas para avaliar a resposta contrátil do miocárdio intacto com o retículo sarcoplasmático não-funcional (LEITE et al., 1995). Para isso utilizamos uma solução de Krebs-Henseleit acrescida de 10 mM de cafeína. A cafeína, como já mencionado, promove a depleção do conteúdo de cálcio do retículo sarcoplasmático e as contrações passam ser dependentes do influxo de cálcio através do sarcolema e também da responsividade das proteínas contráteis (BASSANI et al., 1994; BERS, 2002; LEITE et al., 1995).

Os músculos papilares foram perfundidos por 30 minutos com solução de Krebs acrescida de 10 mM de cafeína, e então submetidos a uma frequência de estimulação de 10 Hz e duração de 15 segundos (LEITE et al., 1995). As forças desenvolvidas durante o pico e o platô das contrações foram corrigidas pelo peso dos músculos papilares.



Figura 11: Registro típico das contrações tetânicas destacando o pico e o platô da força tetânica em músculos papilares de VE de ratos. Adaptado de FIORESI (2008).

3.8. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

3.8.1. AVALIAÇÃO “*IN SITU*” DE $O_2^{\cdot-}$ PELA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE DIHIDROETÍDEO

A fim de avaliar a participação do ânion superóxido nos efeitos deletérios induzidos pela exposição aumentada ao cobre e os possíveis efeitos anti-estresse oxidativo do HCO, foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetídeo (DHE) conforme descrito por Marques et al., (2015) e Martinez et al., (2019a). O DHE é um derivado do etídio, ele permeia livremente as células e se liga ao DNA, e emite uma coloração vermelha ao ser excitado.

Os músculos papilares de VE dos animais dos respectivos grupos estudados, foram dissecados e 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°C até o dia do experimento.

As amostras foram cortadas em criostato em secções de 10 µm de espessura e colocados em lâmina de vidro gelatinizado, e secas em estufa à 37 °C. Após a secagem, as secções foram incubadas em condições idênticas durante 30 min a 37 °C em tampão PBS. Em seguida, o PBS foi escorrido e o excesso foi seco. Posteriormente, foi feita a incubação com DHE 2 µM e DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride - DAPI, 1:10.000) por 30 minutos na estufa, em câmara protegida da luz, à 37°C (MARQUES et al., 2015; MARTINEZ et al., 2019). Para confirmar a especificidade da técnica, foi feito o controle negativo utilizando o Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) 100 µM, um mimético da SOD.

As imagens de luminescência foram coletadas em um microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA) com uma câmera fotográfica (Leica DFC 310 FX, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA) e com filtro de 568 nm (DHE) e 420 nm (DAPI). As mesmas configurações de imagem foram usadas em todos os grupos

experimentais. A quantificação das imagens foi realizada pelo software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

3.8.2. AVALIAÇÃO “*IN SITU*” DE OH• PELA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA COM HIDROXIFENIL FLUORESCÉINA

Para avaliar a participação do radical hidroxila nos efeitos deletérios provocados pela exposição aumentada ao cobre e os possíveis efeitos anti-estresse oxidativo do HCO, foi feita a fluorescência de hidroxifenil fluoresceína (HPF). O HPF reage com o OH• e é convertida em fluoresceína, emitindo uma fluorescência verde, quando estimulada.

As lâminas contendo as amostras foram preparadas do modo como descrito no item anterior. As lâminas contendo os cortes foram incubadas com PBS e mantidos em estufa à 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Em seguida a solução foi escorrida e o excesso foi seco. Então foi feita a incubação com HPF 10 µM e DAPI por 30 minutos em estufa à 37°C, em câmara protegida da luz, conforme descrito por Setsukinai et al., (2003) e Martinez et al., (2019). Para confirmar a especificidade da técnica, foi realizado o controle negativo utilizando o varredor de OH•, DMSO (dimethylsulfoxide) 100 mM conforme descrito por Esparza et al., (2015) e Franco et al., (2007).

As imagens de luminescência foram coletadas em um microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500, objetiva 40x, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA) com uma câmera fotográfica (Leica DFC 310 FX, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA) e com filtro de 515 nm (HPF) e 420 nm (DAPI). A quantificação das imagens foi realizada pelo software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

3.9. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ATPASE MIOSÍNICA

Para avaliar os efeitos de 4 semanas de exposição ao cobre (10 mg) e ao HCO na atividade da ATPase miosínica foi feito um ensaio enzimático, conforme descrito por Bremel e Weber (1975).

A miosina foi obtida a partir de homogeneizado de ventrículos esquerdos. A extração foi realizada em solução tampão (0,3 M KCl em tampão fosfato 0,2M [KH₂PO₄], pH 6,5). Após a homogeneização, foram adicionados 14 mL de água, gota a gota, para cada grama de tecido de VE. Os resíduos foram separados por filtração utilizando gaze. O filtrado foi diluído em 18 mL de água para cada grama de tecido de ventrículo e centrifugado a 10 000 rpm por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi diluído em 0,6 M de KCl em tampão, para que assim houvesse a extração da miosina por ação de força iônica (1 mL de água era adicionado para cada grama de tecido para produzir uma nova precipitação). As etapas de diluição e centrifugação se repetiram outras duas vezes, e o último precipitado obtido foi dissolvido em 0,6 M de KCl e 5 mM de HEPES, pH 7.

Depois, a atividade da ATPase miosínica foi determinada pela liberação de fosfato inorgânico (Pi) partir do ATP (1 mM) na presença de 0,6 M de KCl, 50 mM de HEPES, 5 mM CaCl₂, e pH 7. A reação foi iniciada com a adição da amostra ao meio de reação por 8 min. A avaliação da atividade da ATPase miosínica foi realizada em triplicata, o controle negativo foi realizado em duplicata. A atividade específica foi expressa como nmol Pi liberado por minuto por mg de proteína. A proteína foi determinada pelo método *Coomassie Blue* de acordo com Bradford (1976), usando-se albumina como padrão.

3.10. ANÁLISE DAS ATIVIDADES DA SOD E DA CATALASE

A atividade da SOD, foi medida por um método que se baseia na inibição da auto-oxidação da adrenalina pela SOD, de acordo com Bannister e Calabrese (1987). A adrenalina, quando adicionada ao meio básico, reage com o ânion superóxido e forma o adrenocromo, que exibe absorção máxima a 480 nm. Assim, quanto menor a absorbância do adrenocromo, maior a capacidade da SOD de desmutar o ânion superóxido e inibir a reação de auto-oxidação, refletindo sua atividade por um método indireto. Para este fim, 185 µL de tampão de glicina e 15 µL de amostra foi adicionado à placa de Elisa e o espectro foi zerado. Depois, 5 µL de adrenalina foram pipetados em cada poço, imediatamente lidos a 480 nm por 20 minutos, a cada 1 minuto em Leitor de Microplacas Synergy H1 (Biotek).

Já a atividade da catalase foi medida pelo através de uma curva de decaimento da absorbância após a adição de H₂O₂, a partir da enzima catalase, conforme descrito por Aebi (1984). Neste protocolo, 50 µL de amostra e 5 µL de triton a 10% foram pipetados em microtubos, agitados em vórtex e conservados em gelo por 15 minutos para que houvesse a liberação da catalase. Em seguida, 240 µL de tampão fosfato pH 7,0 (10 mM) foram então adicionados a cada poço da placa de Elisa e o espectro foi zerado. Em duplicata, 10 µL de amostra e 240 µL de meio foram pipetados com H₂O₂, a 37° C, e aguardado um minuto para leitura a 240 nm por 10 minutos, com leitura a cada 1 minuto em Leitor de Microplacas Synergy H1 (Biotek).

3.11. ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA POR WESTERN BLOTTING

A técnica de Western Blotting foi utilizada para determinar a influência da exposição ao cobre e ao HCO sobre a expressão das seguintes proteínas: Ca²⁺-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2a), trocador sódio/cálcio (NCX), fosfolamban (PLB), isoforma cardíaca da NADPH oxidase (NOX2), Catalase e das isoformas da superóxido dismutase (SOD-Mn e SOD-Cu/Zn).

Para isto, amostras de VE de ratos dos grupos Ct, Cu (0,14 mg), Ct-HCO e Cu-HCO foram congeladas e mantidas a -80°C para posterior homogeneização. A extração de proteínas foi realizada em temperatura de 4°C, com tampão de lise contendo: Tris - HCl (10 mM, pH 7,4); NaVO₃ (1 mM); SDS, 1%; DTT (0,5 mM); EDTA (5 mM, pH 8); PMSF (1 mM); NaF (10 mM); Inibidor de protease.

Após homogeneizadas as amostras foram centrifugadas a 4°C com 12.000rpm, durante 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido para utilização e o precipitado descartado. Em seguida, foi realizada a quantificação das proteínas totais pelo método de Bradford (Bradford, 1976). Utilizando-se espectrofotômetro com absorbância de 595nm (Cary Varian. San Diego, CA, USA) comparou-se a concentração proteica das amostras com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), em concentrações conhecidas. A leitura da curva e de todas as amostras foram feitas em duplicata. Em seguida, o volume de amostra necessário para uma carga de 80µg de proteína foi calculado, sendo este volume

de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Foi adicionado as alíquotas solução de Laemmli 4X (0,5mM de uréia, 0,17mM de SDS, 39 μ M de ditiolol, 0,01M de Tris e azul de bromofenol 0,5%).

As amostras foram aplicadas em géis SDS-PAGE 7,5% ou 12,5% (Tris HCl 1,5M pH: 8,8, acrilamida 30%, glicerol 100%, SDS 10%, persulfato de amônio (APS) 10% e Temed), juntamente com um marcador de peso molecular de amplo espectro (10 a 250 kDa), previamente imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Trizma base, 190mM de glicina e 0,1% de SDS), sendo submetidos à eletroforese aplicando corrente constante de 80V (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura) durante aproximadamente 3 horas, para separação das proteínas de acordo com seu peso molecular.

Ao final da eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Amersham, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), previamente ativada com água por 20 segundos. Um sistema de transferência líquida foi utilizado no qual um “sanduiche” (papel Whatman, gel e membrana) era montado em suporte Holder Cassete e acoplado a uma cuba (TransBlot SD Cell BioRad, USA) contendo solução tampão de transferência (Trizma base 25mM, glicina 190mM, SDS 0,1% e Metanol 20%) à 8°C com uma corrente de 0,25A durante 20 horas.

Após a transferência, as membranas foram coradas com a solução corante Ponceau S 1% por 20 minutos para quantificação da proteína total e logo após foram descoradas com solução TBS-T. Posteriormente as membranas permaneceram por 2 horas em solução de bloqueio sob agitação contínua em temperatura ambiente (5% de leite desnatado em pó, dissolvida em solução de lavagem das membranas (TBST): 10 mM de TrisHCl a pH = 7,5; 100mM de NaCl; e 0,1% Tween-20) para evitar uniões inespecíficas do anticorpo. Em seguida, as membranas foram incubadas *overnight* (20 h) a 8°C com os anticorpos primários específicos para:

- SERCA-2: anticorpo policlonal de cabra anti-SERCA2 ATPase, diluição de 1:5000; Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA.

- NCX: anticorpo monoclonal de camundongo anti-NCX, diluição de 1:1000; Thermo Fisher Scientific, Rockford, EUA.
- PLB: anticorpo monoclonal de camundongo anti-fosfolamban, diluição de 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA.
- NOX2: anticorpo policlonal de coelho anti-CYBB, diluição de 1:500; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.
- Catalase: anticorpo monoclonal de camundongo anti-catalase, diluição de 1:500; Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.
- Cu/Zn-SOD: (isoforma citosólica); anticorpo monoclonal de camundongo anti-SOD-1, diluição de 1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA.
- Mn-SOD: (isoforma mitocondrial) anticorpo monoclonal de camundongo anti-SOD-2, diluição de 1:100; Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA.

Após incubação *overnight*, as membranas foram lavadas, sob agitação, com solução TBS-T durante 30 minutos (por 6 vezes) para remoção do excesso do anticorpo primário, sendo trocada a solução de TBS-T a cada 5 minutos. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente e agitação contínua, com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, igG anti-mouse ou IgG anti-rabbit, dependendo do anticorpo primário utilizado na proporção de 1:5000 em solução a 5% de leite desnatado em TBS-T (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após a incubação com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas por 30 min com solução de TBS-T, para remoção do excesso de anticorpo secundário. Os imunocomplexos foram detectados utilizando um sistema de quimioluminescência por meio da exposição da membrana por 5 minutos a um sistema de detecção (ECL Prime, Amersham). As bandas foram observadas com o equipamento ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA) e quantificadas usando o software ImageJ. Os resultados foram expressos pela razão entre os sinais no imunoblot correspondentes à proteína estudada e o Ponceau S.

3.12. FARMACOS E REAGENTES

- 4',6-diamidino-2-phenylindole - DAPI (Sigma)
- Ácido aminoacético - Glicina (Sigma)

- Ácido clorídrico – HCl (Merck)
- Ácido etilenodiaminotetraacético - EDTA (Merck)
- Ácido tricloroacético (Merck)
- Albumina, Soro Bovina (Sigma)
- Álcool polivinílico (Merck)
- Bicarbonato de sódio - NaHCO₃ (Merck)
- Cafeína (B. HERZOG)
- Catalase (Sigma)
- Cloreto de cálcio dihidratado - CaCl₂. 2H₂O (Merck)
- Cloreto de Cobre - CuCl₂ (Sigma)
- Cloreto de magnésio Hexahidratado - MgCl₂. 6H₂O (Merck)
- Cloreto de potássio - KCl (Merck)
- Cloreto de sódio - NaCl (Vetec)
- Dihidroetideo – DHE (Sigma)
- Dimetil Sulfóxido – DMSO (Sigma)
- Dodecilsulfato de sódio - SDS (Sigma)
- Epinefrina (Sigma)
- Fosfato monopotássico - KH₂PO₄ (Merck)
- Glicose (Vetec)
- HEPES (Sigma)
- Hidróxido de Sódio (Merck)
- Hidróxifenil fluoresceína – HPF (Sigma)
- Ketamina (Halmen)
- Leite desnatado (Nestle)
- L-isoproterenol (Sigma)
- Metanol (Sigma)
- Mobilidato de amônio (Nuclear)
- N,N,N',N' - Tetrametil-etilenodiamina - Temed (Sigma)
- N,N'- Metilenbisacrilamida - Acrilamida (Sigma)
- Pepsina (Sigma)
- Peróxido de hidrogênio (Sigma)
- Persulfato de amônio - APS (Sigma)

- Polioxietileno sorbitam monolaurato - Tween 20 (Sigma)
- Reagente para detecção de Western Blot - ECL Prime (Amersham)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merk)
- Tempol (Sigma)
- Tris HCl (Sigma)
- Xilazina (J.A. Animal Health)

3.13. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizado ANOVA uma-via seguida pelo pós-teste Fisher para a comparação entre grupos. Foi utilizada ANOVA 2 vias seguida por pós teste de Bonferroni para a análise de múltiplas comparações. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes. A análise dos dados e a plotagem das figuras foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 8.0 System (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. EFEITOS CARDIOVASCULARES DA EXPOSIÇÃO AO COBRE

Os animais dos grupos Ct e Cu 13 μ g, 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia iniciaram e terminaram o período de exposição com pesos semelhantes demonstrando que a exposição às doses de cobre avaliadas não alterou o ganho peso corporal (Figura 12).

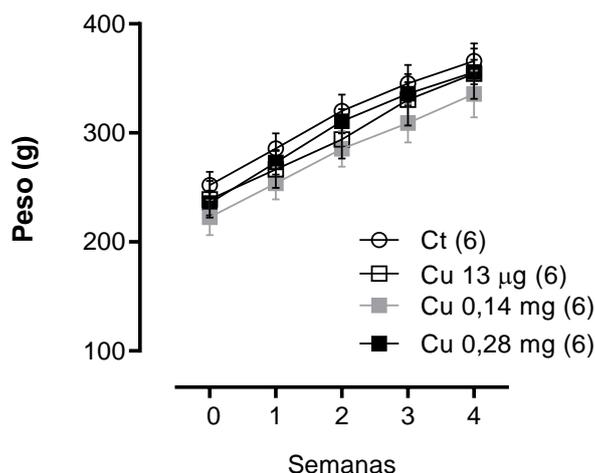


Figura 12: Ganho de peso ponderal a após 4 semanas de exposição a 13 µg, 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia de cobre. Os números entre parênteses representam o número de amostras. Os valores representam a Média \pm EPM. ANOVA duas vias.

Para avaliar os possíveis efeitos vasculares de 4 semanas de exposição às doses de 13 µg, 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia de cobre foram realizados os testes da integridade do endotélio, do relaxamento à Ach e ao NPS o quais não apresentaram diferenças significativas (dados não mostrados). Foi realizada também uma curva concentração-resposta à Phe. Os resultados obtidos mostram que a contração dos anéis de aorta foram similares nos diferentes grupos experimentais (Figura 13).

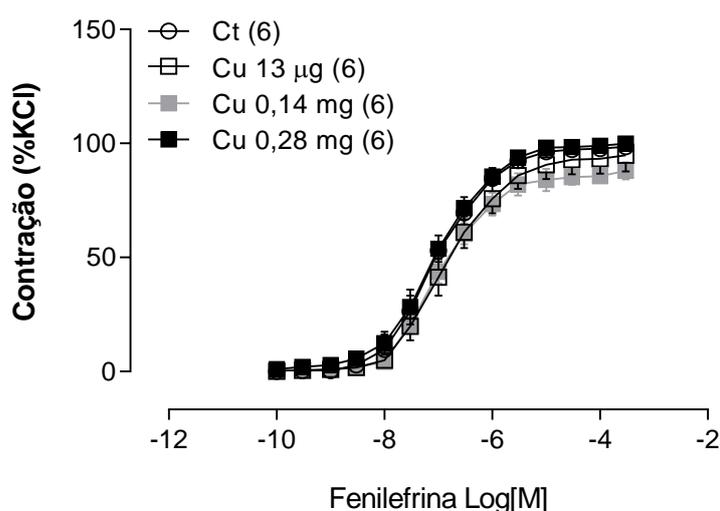


Figura 13: A reatividade vascular induzida pela fenilefrina nos anéis de aorta não foi alterada após 4 semanas de exposição às doses 13 µg, 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia de cobre. Os números

entre parênteses representam o número de amostras avaliadas. Os valores representam Média \pm SEM. ANOVA de duas vias foi usada.

Avaliamos também efeitos sobre o coração. Ao final do período de exposição, o VD, o VE e músculos papilares do VE foram dissecados e sua massa foi medida e corrigida pelo comprimento da tíbia. Não houve diferença estatística na análise dos pesos do VD, VE e músculos papilares como mostra a figura 14.

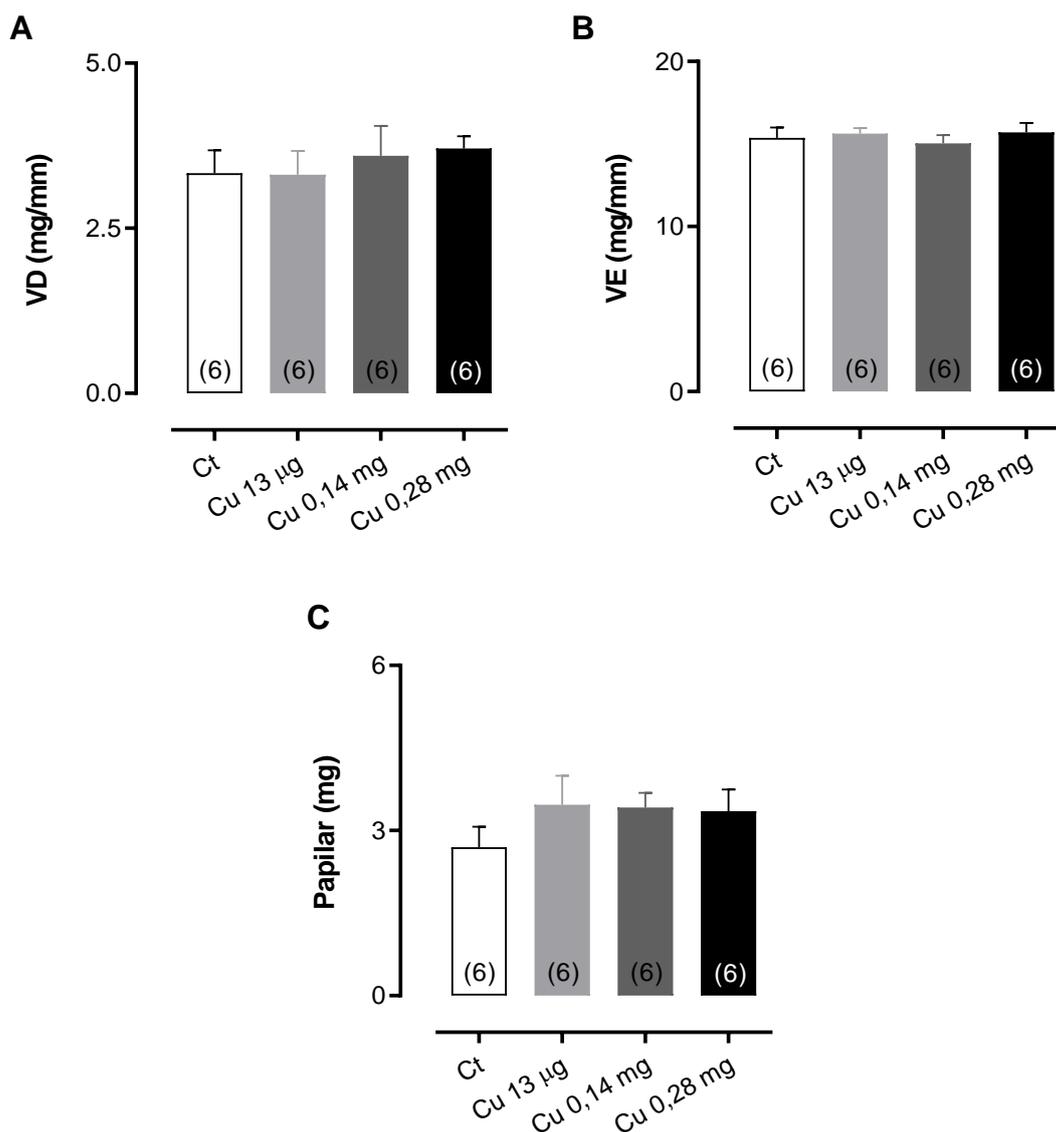


Figura 14: Avaliação ponderal após 4 semanas de exposição a 13 µg, 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia de cobre. Peso do ventrículo direito corrigido pelo comprimento da tíbia (A). Peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento da tíbia (B). Peso dos músculos papilares (C). Os números entre parênteses representam o número de amostras. Os valores representam a Média \pm EPM. ANOVA uma via.

Para avaliar se a exposição às doses de 13 μg , 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia de cobre prejudica a atividade contrátil e o acoplamento excitação-contração cardíacos, os parâmetros contráteis de músculos papilares foram avaliados. Como visto na figura 15, nossos resultados demonstram que a exposição ao cobre reduziu a força de contração dos músculos papilares dos grupos Cu 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia.

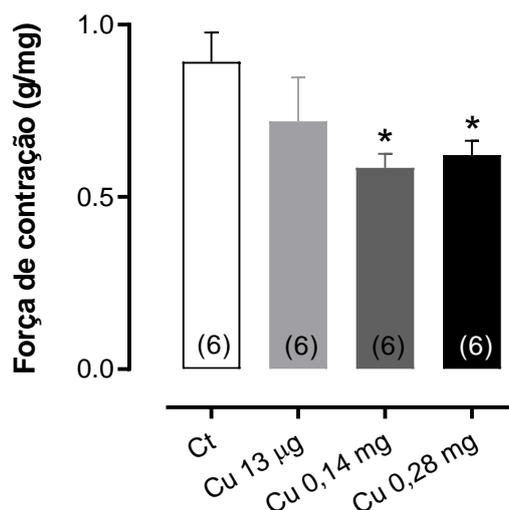


Figura 15: Efeitos de 4 semanas de exposição a 13 μg , 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia de cobre no desenvolvimento de força de músculos papilares de VE de ratos. Os números entre parênteses representam o número amostras. *P < 0,05 vs Ct. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. ANOVA uma via seguida por pós teste Fisher.

Os tempos de ativação da contração (TA) e de 90% de relaxamento (TR 90%) nos permitem avaliar a cinética dos mecanismos que mobilizam e que removem o cálcio do sarcoplasma durante os processos que envolvem o acoplamento excitação-contração nos músculos papilares de VE. A figura 16 nos mostra que o TA permaneceu inalterado após 4 semanas de exposição ao cobre, enquanto o TR 90% aumentou no grupo Cu 0,28 mg/Kg/dia (Figura 16A e B). As derivadas temporais de força máximas (dF/dt) positiva e negativa também foram mensuradas. Igualmente, as dF/dt positiva e negativa foram deprimidas pela exposição às doses de 13 μg , 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia de cobre (Figura 16C e D). Este resultado mostra que embora a força de contração diminua apenas nas doses de 0,14 e 0,28 mg/Kg/dia, a dF/dt também diminui com a exposição à 13

$\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$. Isso sugere que o efeito nocivo produzido pelo cobre já é visível neste grupo.

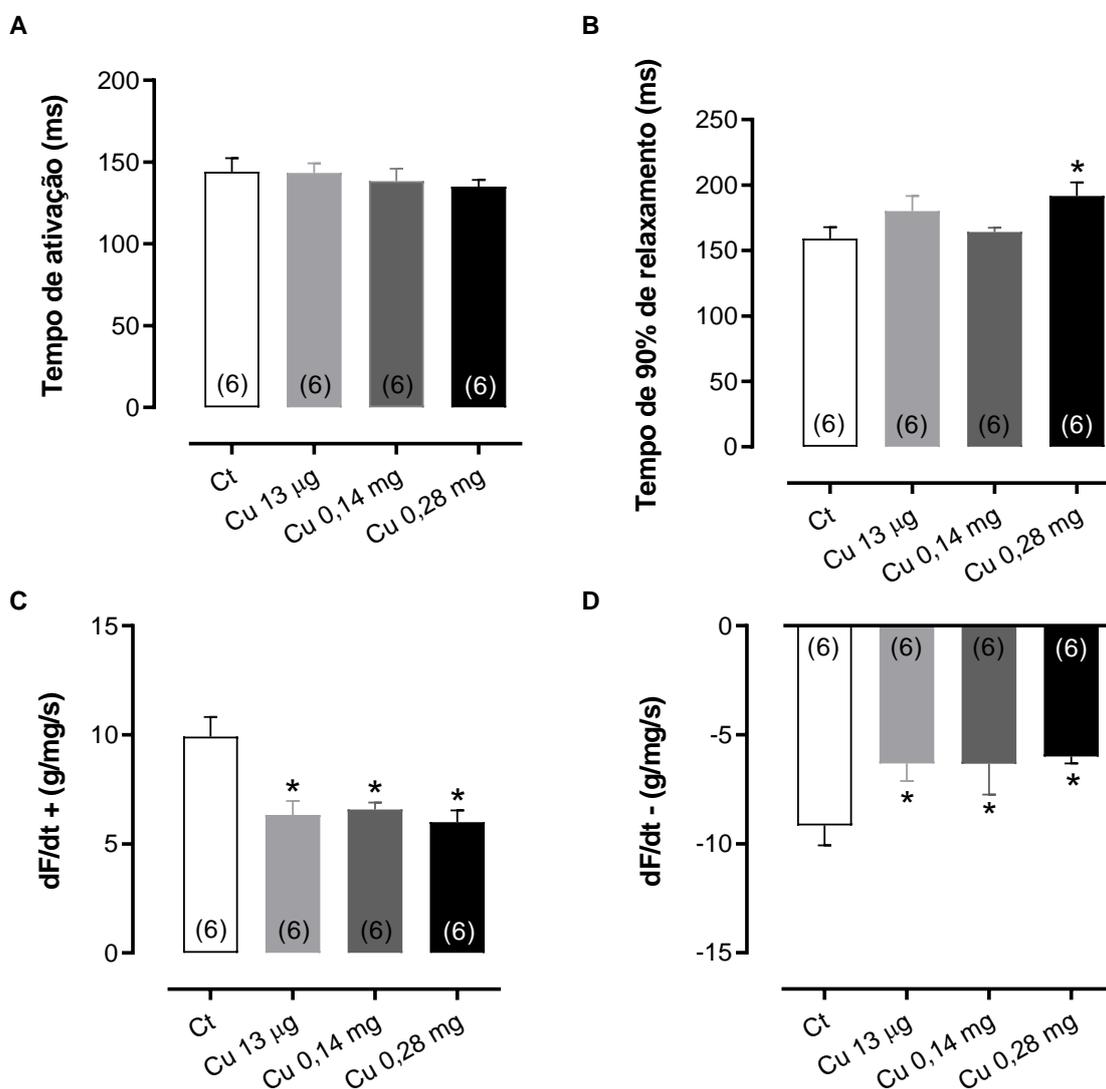


Figura 16: Parâmetros temporais e derivadas de músculos papilares de VE de ratos após 4 semanas de exposição a 13 μg , 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia de cobre. Tempo de ativação (A), tempo de relaxamento (B), derivada temporal de força máxima positiva (C), e, derivada temporal de força máxima negativa (D). Os números entre parênteses representam o número amostras. * $P < 0,05$ vs Ct. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. ANOVA uma via seguida pelo pós-teste Fisher.

Como forma de avaliar os mecanismos envolvidos no prejuízo contrátil induzido pela exposição ao cobre, o primeiro protocolo experimental realizado foi a avaliação indireta da atividade do retículo sarcoplasmático (RS). As doses de 13 μg , 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia não alteraram o funcionamento do RS, uma vez

que a potenciação após a pausa se manteve semelhante nos diferentes grupos experimentais (Figura 17).

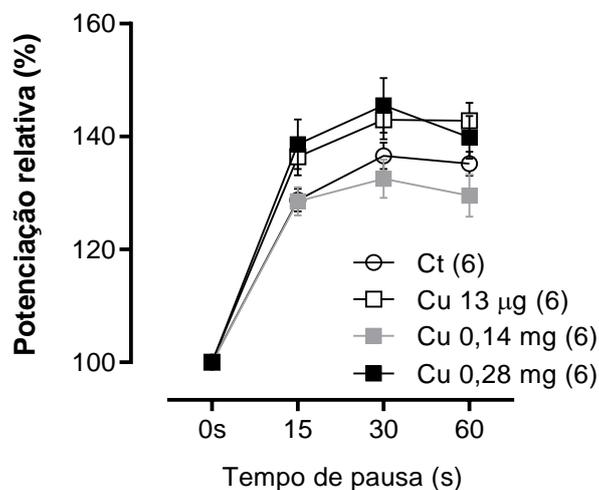


Figura 17: Avaliação das potenciações relativas pós-pausas de 15, 30 e 60 segundos em músculos papilares de VE de ratos expostos ao cobre. Os números entre parênteses representam o número amostras. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. ANOVA duas vias.

Em seguida, avaliamos os efeitos da exposição ao cobre na sensibilidade ao cálcio extracelular, no influxo de cálcio transsarcolemal e na resposta ao agonista β -adrenérgico. A avaliação da sensibilidade ao cálcio extracelular mostrou a redução da resposta inotrópica em 1,25 mM de cálcio nos grupos Cu 0,14 e 0,28 mg/Kg/dia, e em 2,5 mM de cálcio nos três grupos que receberam cobre, conforme mostra a figura 18A. Esta resposta é sugestiva de que os miócitos cardíacos dos animais expostos ao cobre são menos permeáveis ao cálcio ou que as proteínas contráteis possam ter sido afetadas pela exposição ao metal. De fato, o influxo de cálcio transsarcolemal foi avaliado de forma indireta através do protocolo da *post-rest contraction*. A resposta obtida nos grupos Cu 0,14 e 0,28 mg/Kg/dia foram reduzidas (Figura 18B). Por fim, a resposta inotrópica ao agonista de receptor β -adrenérgico Isoproterenol se mostrou reduzida nos grupos Cu 13 µg, 0,14 e 0,28 mg/Kg/dia (Figura 18C).

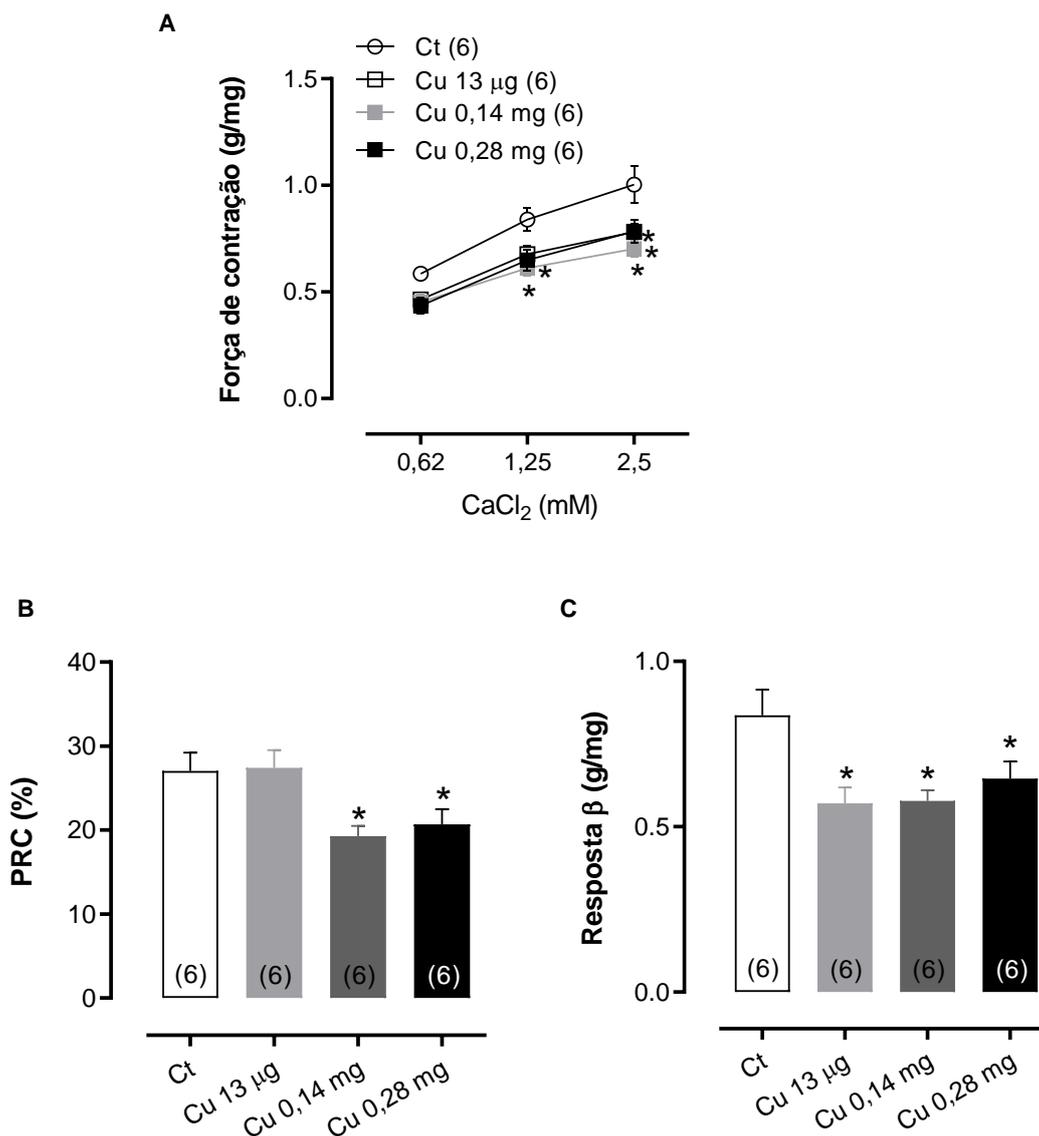


Figura 18: Avaliação da resposta inotrópica ao cálcio extracelular (A), da *post-rest contraction* – PRC (B), e da resposta inotrópica ao agonista β - adrenérgico (C) em músculos papilares de VE de ratos expostos ao cobre por 4 semanas. Os números entre parênteses representam o número de amostras. * $p < 0,05$ vs Ct, # $p < 0,05$ vs Cu para a mesma concentração de cálcio. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni (A). ANOVA uma via seguido pelo pós-teste Fisher (B e C).

As contrações tetânicas foram realizadas para avaliar o influxo de cálcio transarcolema e a atividade das proteínas contráteis (LEITE et al., 1995). A figura 19 mostra a redução no pico e platô de força tetânica para as três diferentes doses de cobre avaliadas. Este achado corrobora com as respostas obtidas na curva de cálcio, na PRC e na resposta β -adrenérgica, confirmando

que os músculos papilares apresentam redução da atividade contrátil em resposta ao aumento da exposição ao cobre.

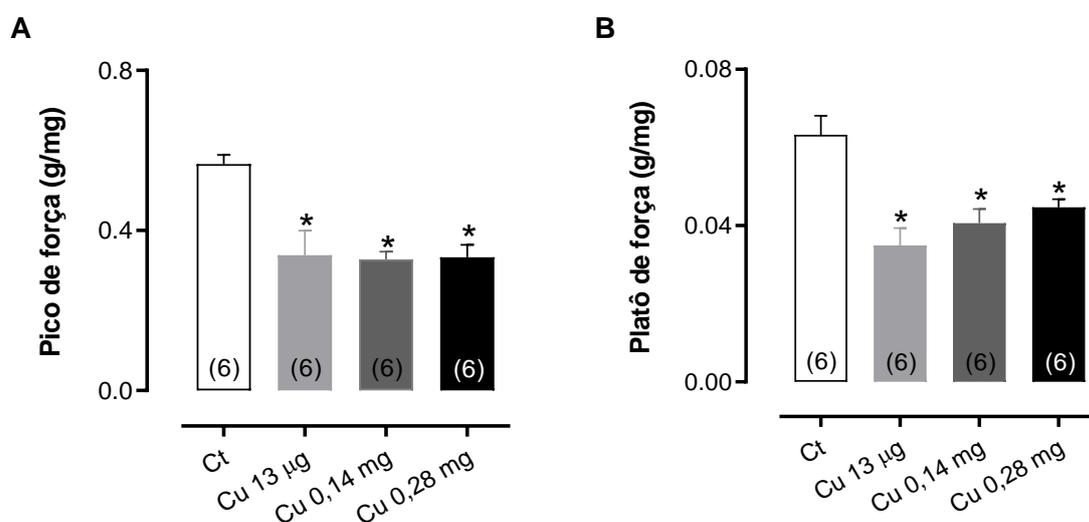


Figura 19: Avaliação das contrações tetânicas em músculos papilares de VE de ratos após 4 semanas de exposição a 13 µg, 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia de cobre. Pico de força tetânica (A), platô de força tetânica (B). *P < 0,05 vs Ct. Os dados são expressos como a Média ± EPM. Os números correspondem ao número de amostras. ANOVA uma via seguida pelo pós-teste de Fisher.

Nossos resultados mostram que a exposição às doses diárias recomendada, à dose máxima tolerável e o dobro da dose máxima tolerável cobre prejudicam contração cardíaca sem alterar a reatividade vascular. A literatura mostra que estes efeitos são, ao menos em partes, devidos ao aumento do estresse oxidativo (SHOKRZADEH, 2009; GHAEMIAN, 2011; ALEXANIAN, 2014). Identificamos que os efeitos nocivos do cobre se tornam mais graves a partir da exposição à dose equivalente a 10 mg em humanos (ou 0,14 mg/Kg/dia) apesar deste valor ser descrito como seguro pelas agências reguladoras internacionais (IOM 2001; WHO, 2004). Estes resultados corroboram dois estudos experimentais em que avaliaram os efeitos da suplementação crônica com 10 mg de cobre em humanos, os quais mostraram alteração da enzima pró-inflamatória hepática transaminase glutâmico pirúvica (TGP), da glutathiona nas células mononucleares periféricas, sugerindo o aumento do estresse oxidativo, além do aumento da expressão de CTR-1 em monócitos (ARAYA et al., 2005; ARAYA et al., 2006). Por isso, determinamos a dose de 0,14 mg/Kg/dia para avaliar se o tratamento com o peptídeo hidrolisado da clara de ovo (HCO), que

possuí propriedades antioxidantes, poderia reduzir e/ou prevenir os efeitos tóxicos do cobre na contração de músculos papilares de VE.

4.2. EFEITOS DO HCO NO MODELO DE INTOXICAÇÃO POR COBRE

A pressão arterial sistólica foi avaliada semanalmente antes do início e durante o período de exposição dos animais. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos Ct, Cu 0,14 mg, Ct-HCO e Cu-HCO (Quadro 03).

Tabela 04: Avaliação da exposição ao cobre e do consumo de HCO na PAS.

Grupos	PAS (mmHg)				
	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
Ct	125,6 ± 3,8	124,6 ± 2,3	124,4 ± 2,3	125,3 ± 2,6	125,7 ± 3
Cu 0,14 mg	126,1 ± 2,8	124,3 ± 2,2	124,7 ± 2,4	125,5 ± 2,8	127,7 ± 2,2
Ct-HCO	126,5 ± 2,4	123,3 ± 1,9	123,6 ± 2	123,5 ± 3	125 ± 2,7
Cu-HCO	127,1 ± 1,2	124,5 ± 2,2	124,6 ± 2	126,2 ± 4	124,7 ± 2,1

Tabela 04: Valores da pressão arterial sistólica (PAS) antes e durante o período de exposição ao cobre (0,14mg/Kg/dia) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO). Os valores representam a Média ± EPM. ANOVA duas vias.

O ganho de peso dos animais não foi alterado pela exposição ao cobre e/ou HCO. Da mesma forma, as massas do VD, do VE e do músculo papilar permaneceram semelhantes entre os grupos experimentais, mostrando que a exposição ao cobre e/ou HCO nas doses descritas por 4 semanas não promovem hipertrofia cardíaca.

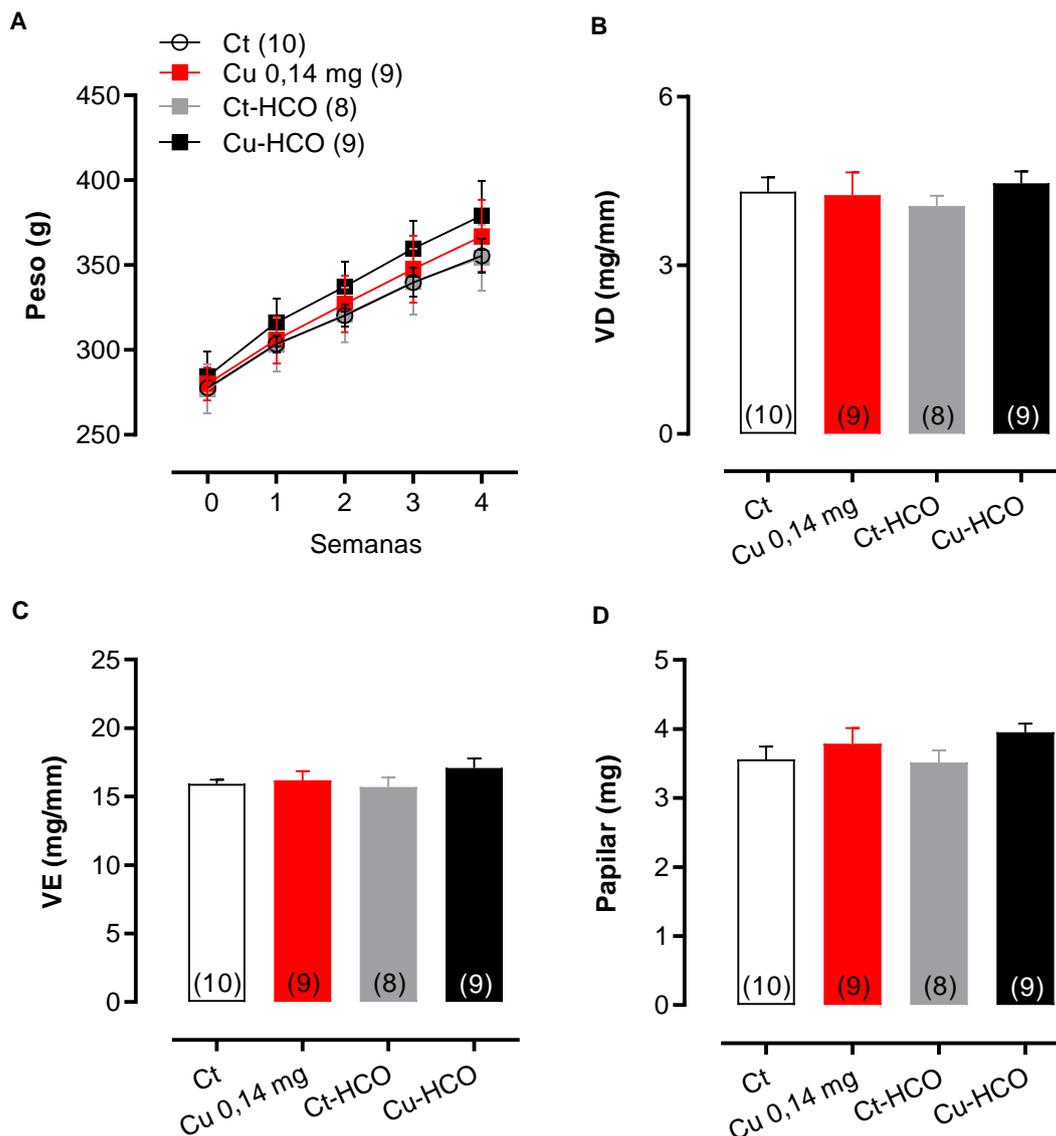


Figura 20: Avaliação ponderal após 4 semanas de exposição ao cobre (0,14 mg/Kg/dia) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO). Ganho de peso dos animais dos diferentes grupos por 4 semanas (A), peso do ventrículo direito corrigido pelo comprimento da tíbia (B), peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento da tíbia (C), e peso dos músculos papilares (D). Os números entre parênteses representam o número de amostras. Os valores representam a Média \pm EPM. ANOVA uma via e duas vias foram utilizadas.

A figura 21 mostra os efeitos do tratamento com cobre e/ou HCO na força de contração de músculos papilares de VE. O grupo Cu 0,14 mg teve a força de contração reduzida em comparação do grupo Ct, entretanto a força se manteve estável nos grupos Ct-HCO e Cu-HCO.

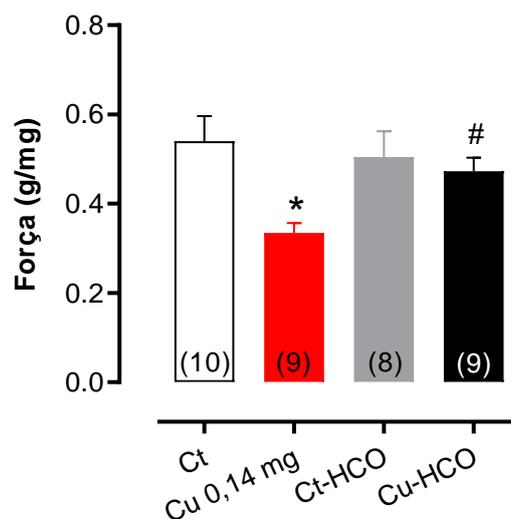


Figura 21: Efeitos de 4 semanas de exposição ao cobre (0,14 mg/Kg/dia) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO) no desenvolvimento de força de músculos papilares de VE de ratos. Os números entre parênteses representam o número de amostras. Os valores representam a Média \pm EPM. *P < 0,05 vs Ct, #P < 0,05 vs Cu. ANOVA 1 via seguida por pós teste de Fisher.

Os parâmetros basais da contração de músculos papilares de VE após a exposição ao cobre e/ou HCO foram mensurados. Os tempos de ativação da contração e de relaxamento não alteraram nos grupos experimentais. As dF/dt máximas positiva e negativa foram reduzidas no grupo Cu 0,14 mg, porém este efeito foi abolido no grupo Cu-HCO, o qual se manteve similar ao grupo Ct, como visto na figura 22.

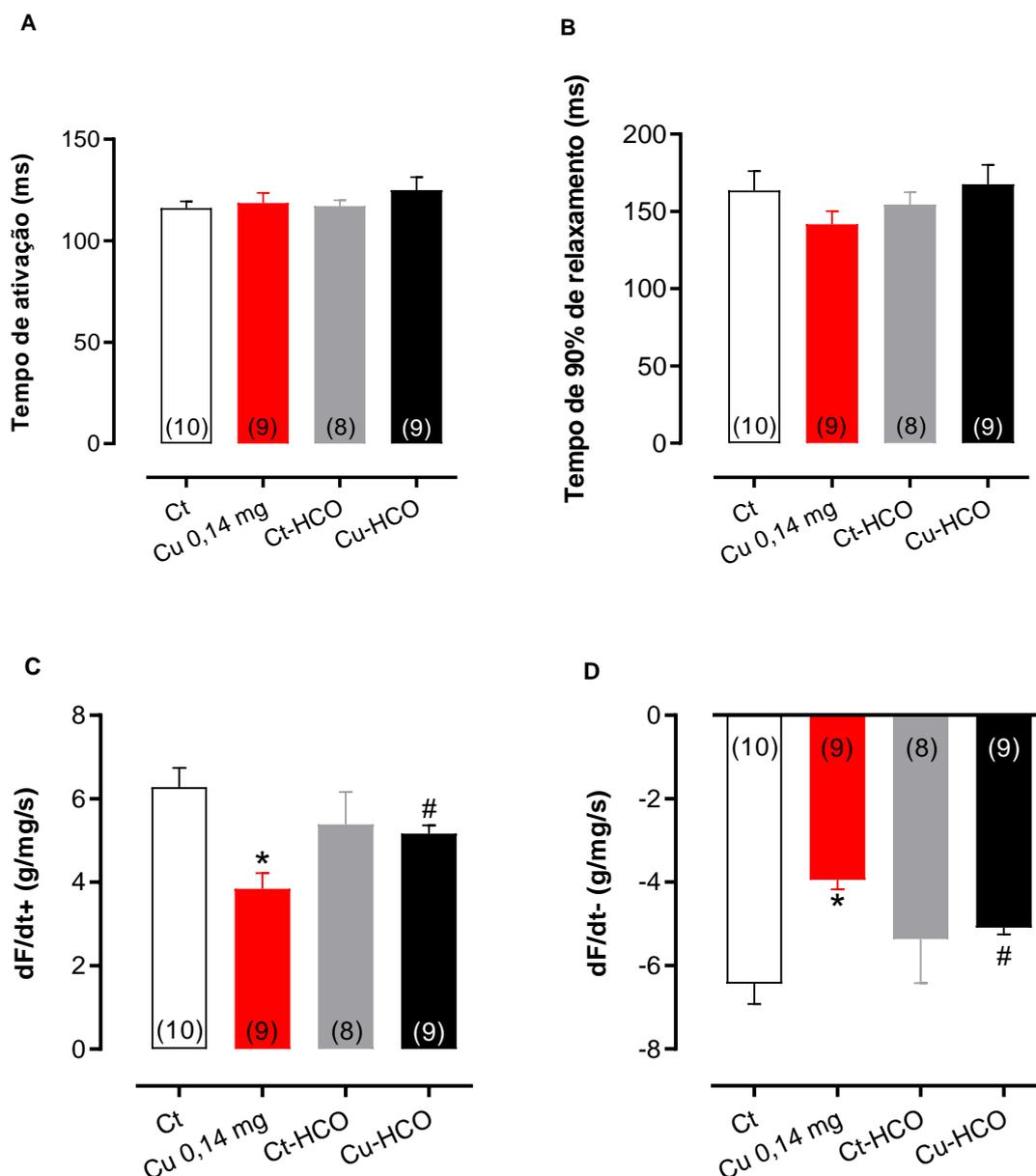


Figura 22: Parâmetros temporais e derivadas de músculos papilares de VE de ratos após 4 semanas de exposição ao cobre (0,14 mg/Kg/dia) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO). Tempo de ativação (A), Tempo de relaxamento (B), Derivada temporal de força máxima positiva (C), Derivada temporal de força máxima negativa (D). Os números entre parênteses representam o número amostras. *P < 0,05 vs Ct, #P < 0,05 vs Cu. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. ANOVA uma via seguida pelo pós-teste de Fisher.

Em seguida, foram feitas avaliações dos mecanismos reguladores da contração. O primeiro mecanismo a ser avaliado de forma indireta foi a atividade do RS. A figura 23A mostra que o grupo Cu-HCO melhora das potenciações relativas em comparação ao grupo Cu 0,14 mg. Este resultado se reflete na

expressão da SERCA-2a, responsável por transportar o cálcio para o RS, do PLB, responsável por regular a atividade da SERCA-2a, e do NCX, responsável por transportar o cálcio para o meio extracelular. A expressão da SERCA-2a não foi alterada nos grupos Cu 0,14 mg e Ct-HCO em relação ao grupo Ct, todavia no grupo Cu-HCO houve aumento da expressão desta proteína quando comparado aos demais, conforme mostra a figura 23B. As expressões do PLB e do NCX se mantiveram semelhantes nos 4 grupos (Figura 23C e D).

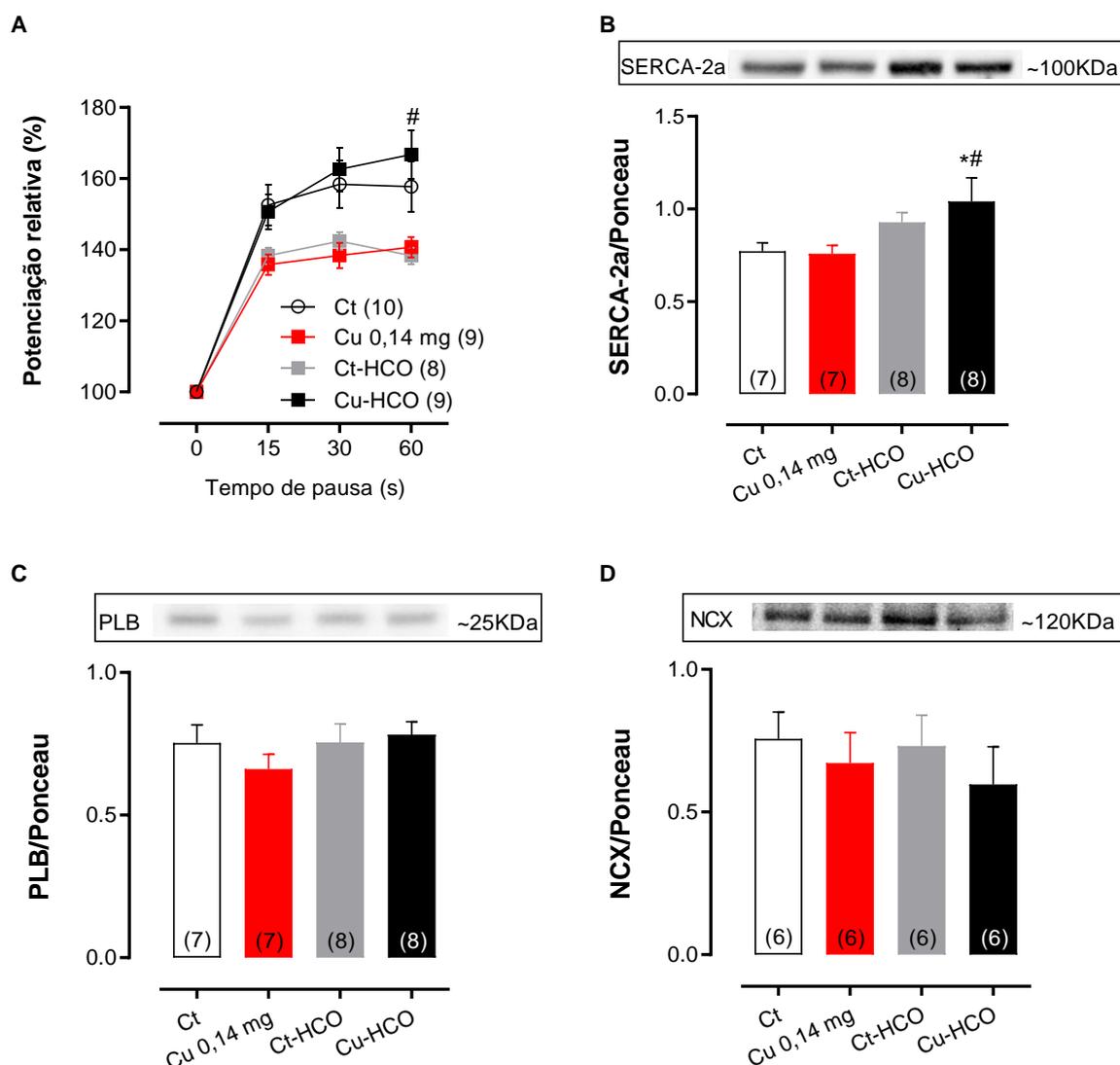


Figura 23: Avaliação dos efeitos de 4 semanas de exposição ao cobre (0,14 mg/Kg/dia) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO) nas potenciações relativas pós-pausas (A), na expressão da SERCA-2a (B), do PLB (C), e do NCX (D). Os números entre parênteses representam o número amostras. *P < 0,05 vs Ct, #P < 0,05 vs Cu. Os dados são expressos

como a Média \pm EPM. ANOVA duas vias seguido pelo pós-teste Bonferroni (A). ANOVA uma via seguido pelo pós-teste Fisher (B e C).

Avaliamos então os efeitos da exposição ao cobre e ao HCO na sensibilidade dos músculos papilares ao cálcio extracelular, no influxo de cálcio extracelular e na resposta β -adrenérgica. A figura 24A mostra a redução da resposta ao cálcio extracelular no grupo Cu 0,14 mg, todavia nos grupos Ct-HCO e Cu-HCO as curvas se mantiveram preservadas. Em seguida, avaliamos de forma indireta se o tratamento com cobre e/ou HCO poderiam influenciar o influxo de cálcio transarcolemal, por isso a *post-rest contraction* (PRC) foi realizada. A figura 24B mostra a redução da PRC no grupo Cu 0,14 mg, todavia nos grupos Ct-HCO e Cu-HCO as PRCs foram similares ao Ct. Avaliamos a modulação da resposta inotrópica ao agonista β -adrenérgico Isoproterenol, uma vez que essa resposta foi reduzida no grupo Cu 0,14 mg. Confirmando, o tratamento realizado no grupo Cu-HCO impediu a redução da resposta ao agonista β -adrenérgico (Figura 24C).

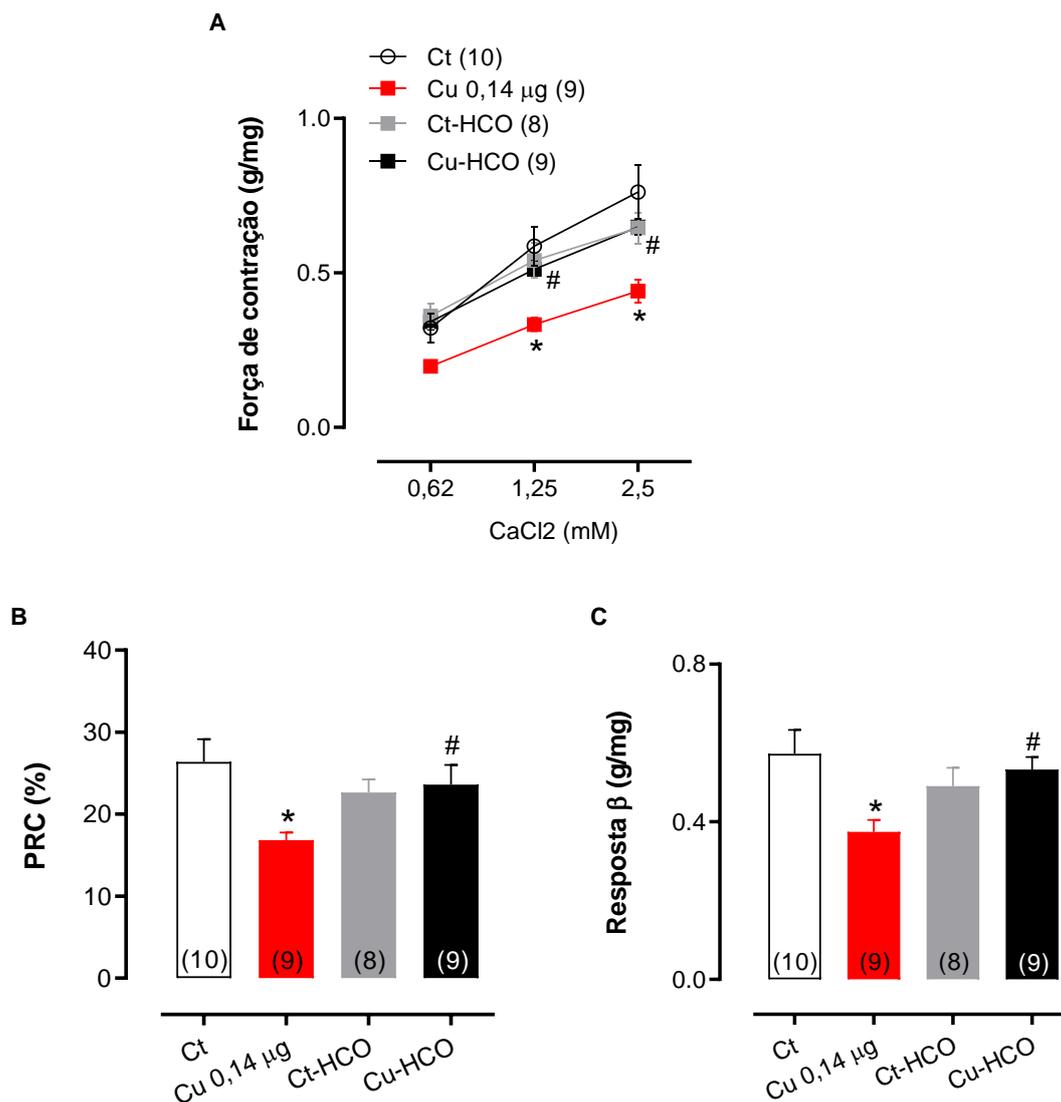


Figura 24: Avaliação da resposta inotrópica ao cálcio extracelular (A), da *post-rest contraction* (B), e da resposta inotrópica ao agonista β - adrenérgico (C) após 4 semanas de exposição ao cobre (0,14 mg/Kg/dia) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO). Os números entre parênteses representam o número de amostras. * $p < 0,05$ vs Ct, # $p < 0,05$ vs Cu. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida de pós teste de Bonferroni (A). ANOVA uma via seguido pelo pós-teste Fisher (B e C).

A figura 25A e B mostra que o tratamento com HCO preveniu os efeitos tóxicos promovidos pelo cobre na força do pico e do platô das contrações tetânicas de músculos papilares de VE. Para confirmar este achado, a atividade da ATPase miosinica foi avaliada. De fato, o resultado mostrou redução da atividade da ATPase miosínica no grupo Cu 0,14 mg. Este efeito foi prevenido no grupo Cu-HCO, conforme nos mostra a figura 25C.

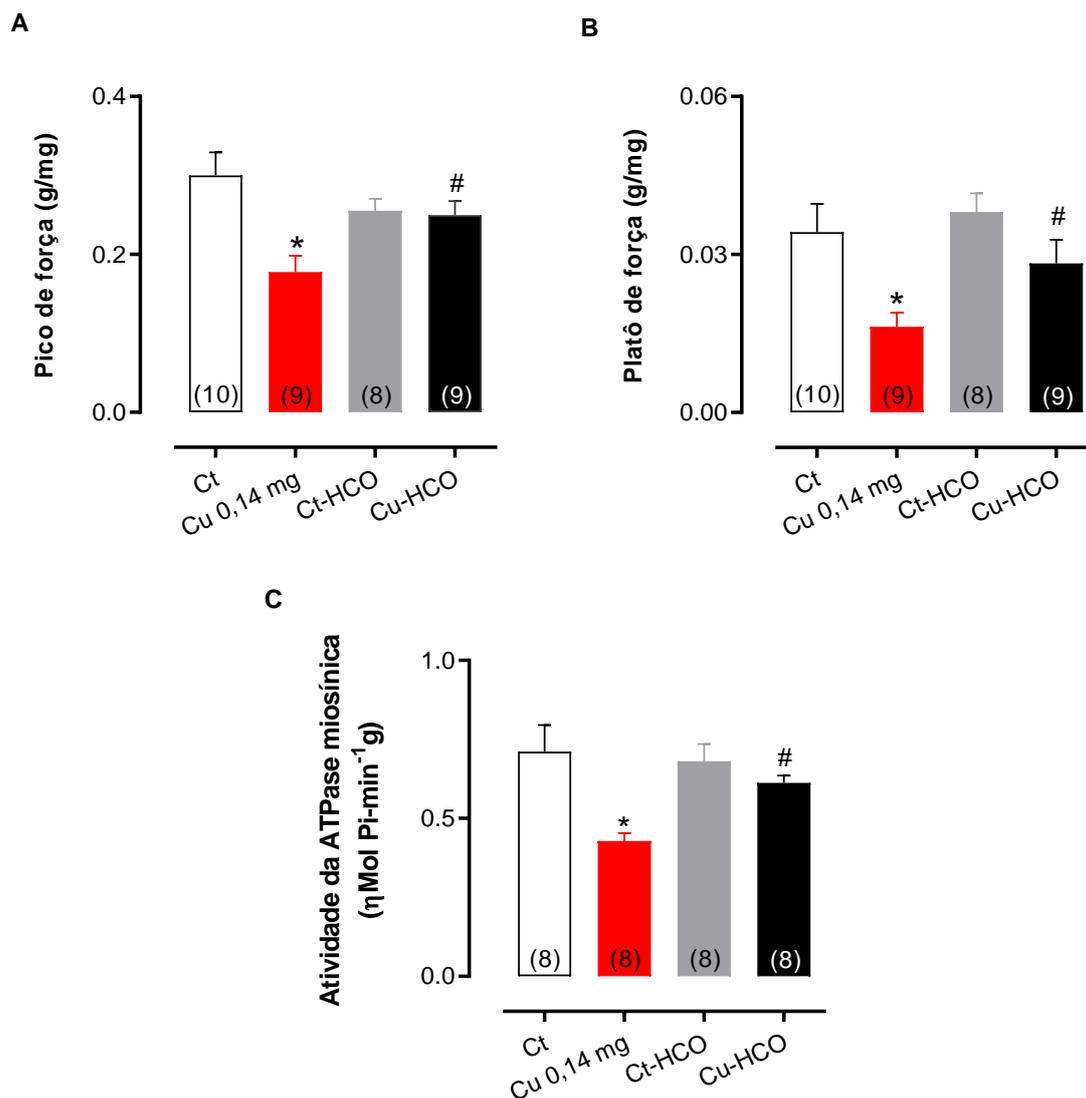


Figura 25: Avaliação do pico de força tetânica (A); platô de força tetânica (B), e; atividade da ATPase miosínica (C). * $p < 0,05$ vs Ct, # $p < 0,05$ vs Cu. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. Os números correspondem ao número de amostras. ANOVA uma via seguida pelo pós-teste de Fisher.

4.3. AVALIAÇÃO DO EXTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO

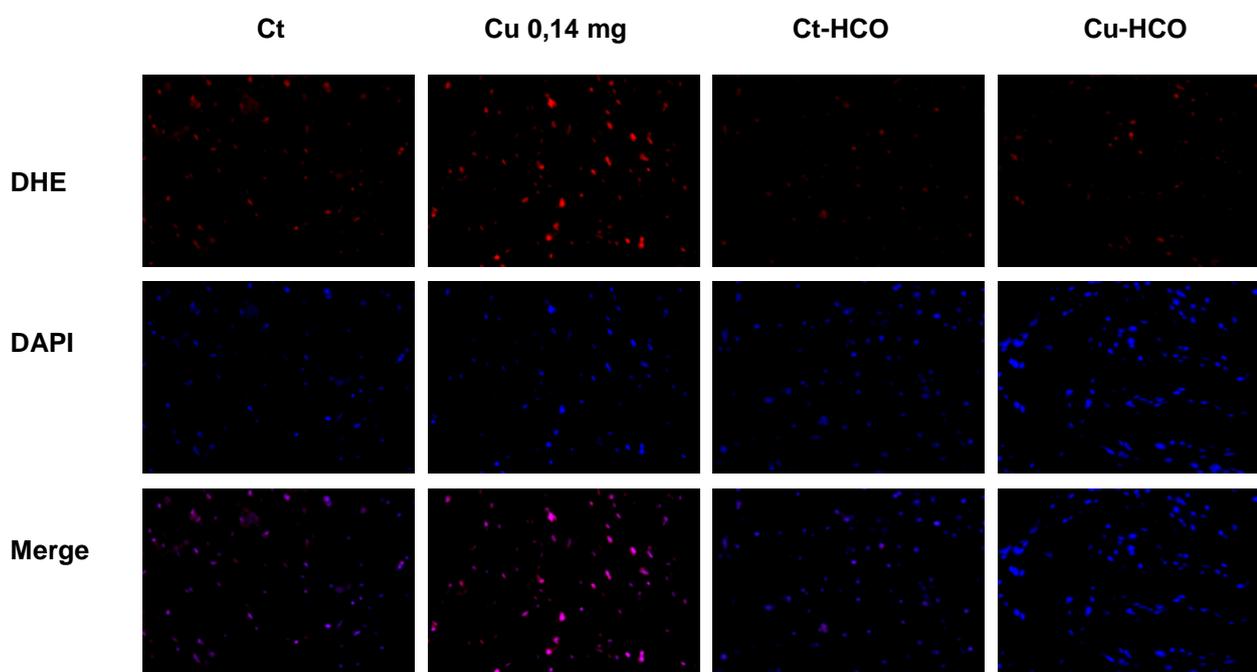
O cobre é um elemento que promove o aumento do estresse oxidativo (SAMUNI, 1981) sendo este o principal mecanismo de danos teciduais promovido por este metal (KOSAR et al., 2006; COOPER et al., 2004; BARCELOUX, 1999; SALONEN et al., 1991), entretanto o HCO é um promissor peptídeo bioativo com propriedades antioxidantes capazes de impedir o aumento

do estresse oxidativo (RIZZETTI et al., 2017; MARTINEZ et al., 2019a; MARTINEZ et al., 2019b).

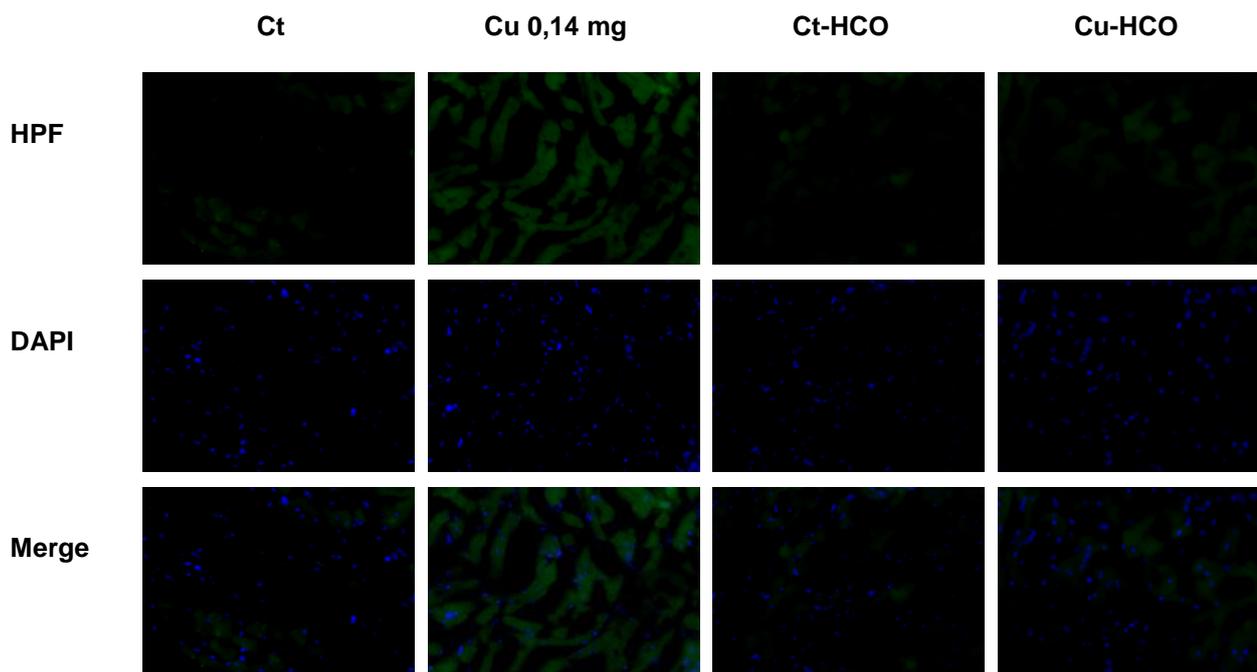
Afim de confirmar a hipótese de que o HCO estaria prevenindo os efeitos tóxicos induzidos do cobre devido a sua ação antioxidante, a formação *in situ* do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e do radical hidroxila (OH^{\cdot}) foram avaliadas. A figura 26 nos mostra através da intensidade de fluorescência, o grande aumento da formação de $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} no grupo Cu 0,14 mg, todavia no grupo Cu-HCO a formação foi menor do que no grupo Cu e semelhante ao Ct. Estes achados corroboram nossos dados funcionais obtidos na avaliação da contração de músculos papilares que mostram o cobre como catalisador da formação de radicais livres, e também a propriedade antioxidante do HCO.

Foram avaliadas também a formação *in situ* de $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} , na presença de Tempol e DMSO respectivamente, as quais foram usados como controles negativos para confirmar a não produção/bloqueio desses radicais. Como esperado não houve observação de fluorescência na presença destes (resultados mostrados em anexo).

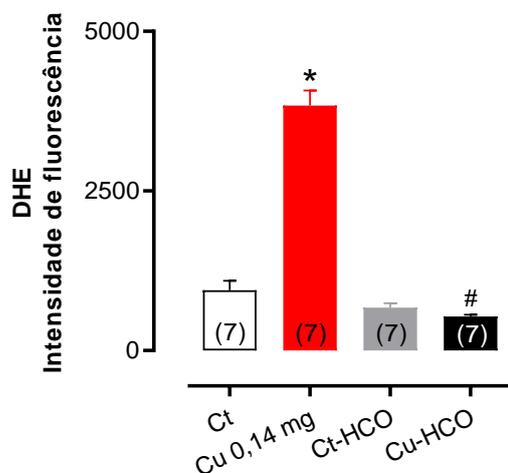
A



B



C



D

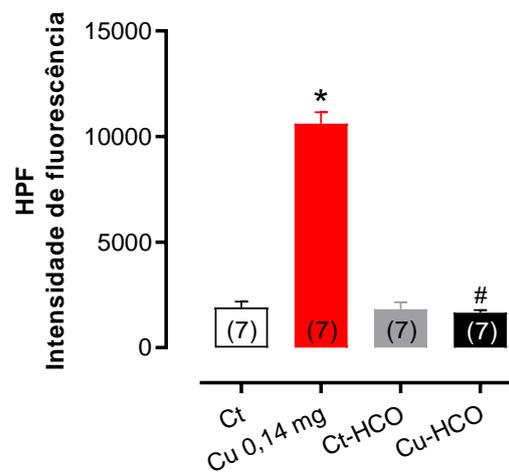


Figura 26: Avaliação *in situ* da formação de radicais livres após 4 semanas de exposição ao cobre (0,14 mg/Kg/dia) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO). Os painéis superiores mostram microfotografias fluorescentes representativas de segmentos de músculo papilar marcadas com dihidroethidio (A) ou hidroxifenil fluoresceína (B). Os painéis medianos mostram microfotografias fluorescentes representativas de núcleos de músculo papilar marcadas com DAPI. Os painéis inferiores mostram as sobreposições das microfotografias. A análise quantitativa de $O_2^{\cdot-}$ (em C) e OH^{\cdot} (em D) da produção ou biodisponibilidade também estão demonstradas no gráfico de barras. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. *P < 0,05 vs. Ct, #P < 0,05 vs Cu. ANOVA uma via seguida por pós teste de Fisher.

Como a exposição ao cobre prejudicou a contratilidade dos músculos papilares de VE de ratos e aumentou a formação de radicais livres *in situ*, efeito este que foi abolido na presença do HCO, do Tempol e do DMSO, as análises das expressões da isoforma NOX2, da catalase e da SOD foram realizadas. Como demonstrado na figura 27, a expressão da NOX2 foi reduzida no grupo Cu 0,14 mg e permaneceu inalterada nos grupos Ct-HCO e Cu-HCO. As expressões da SOD e da Catalase não foram alteradas em nenhum grupo experimental.

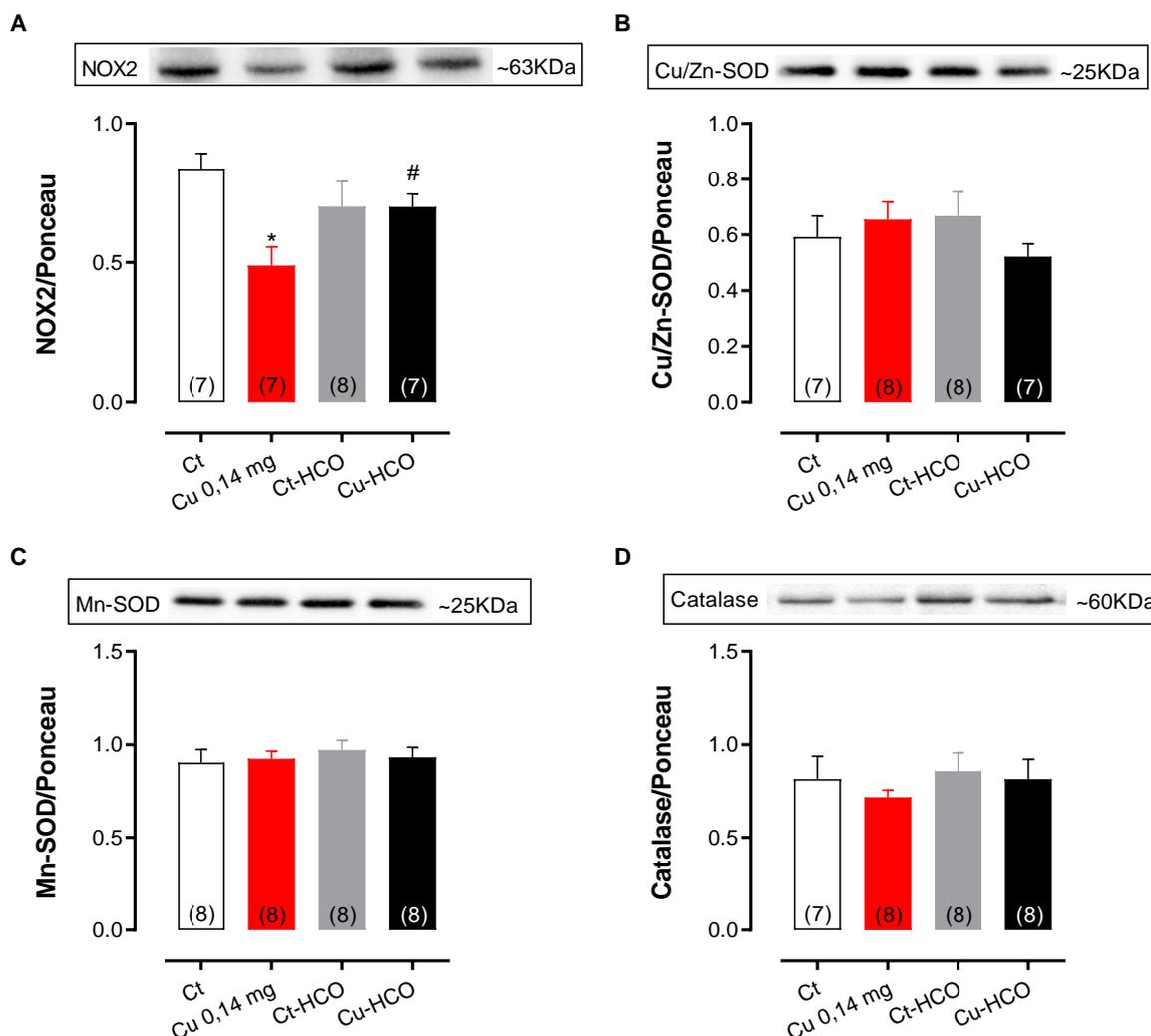


Figura 27: Avaliação da expressão da enzima pró-oxidante NOX2 e das enzimas antioxidantes, Cu/Zn-SOD-, Mn-SOD e Catalase após 4 semanas de exposição ao cobre (014 mg/Kg/dia) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO). Os gráficos mostram a expressão da isoforma NOX2 (A), da isoforma cardíaca da SOD (B), da isoforma mitocondrial da SOD (C) e da catalase (D). Os dados são expressos como a Média \pm EPM. Os números correspondem ao número de amostras. ANOVA uma via seguida pelo pós teste Fisher.

Em seguida medimos as atividades das enzimas antioxidantes SOD e Catalase. As atividades de ambas enzimas aumentaram nos grupos Ct-HCO e Cu-HCO em relação aos grupos Ct e Cu 0,14 mg, como pode ser visto na figura 28).

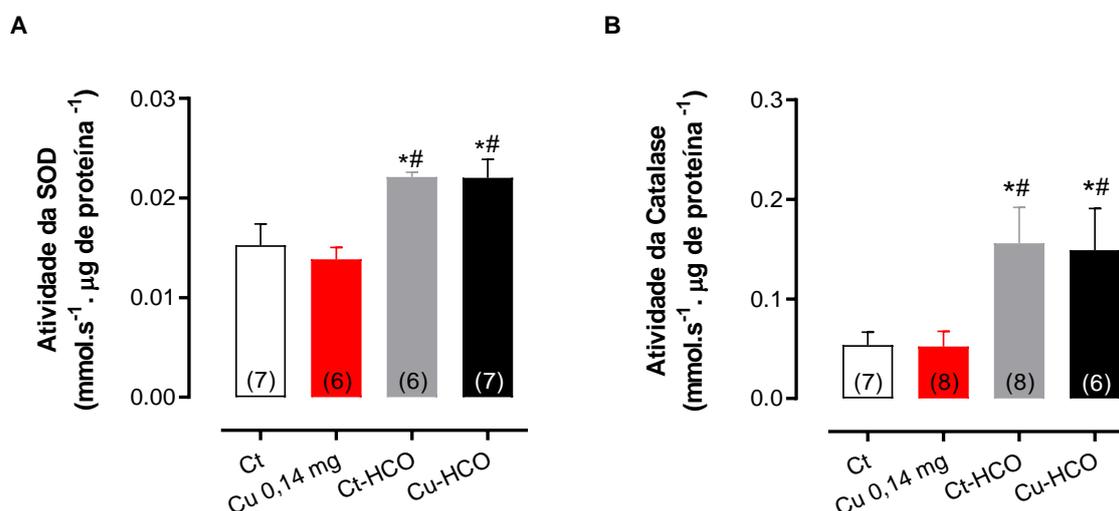


Figura 28: Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase após 4 semanas de exposição ao cobre (0,14 mg/Kg/dia) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO). Atividade da SOD (A) e da catalase (B). Os dados são expressos como a Média \pm EPM. Os números correspondem ao número de amostras. *P < 0,05 vs. Ct, #P < 0,05 vs Cu. ANOVA uma via seguida por pós teste de Fisher.

5. DISCUSSÃO

Este estudo descreveu uma abordagem experimental que permite avaliar os efeitos promovidos pela exposição às doses recomendadas de ingestão diária, de ingestão máxima tolerável e ao dobro dose de ingestão tolerável de cobre sobre o sistema cardiovascular. A exposição ao cobre não alterou o ganho de peso, a reatividade vascular ou promoveu hipertrofia cardíaca nos animais nas doses avaliadas. A dose máxima tolerável é equivalente a 10 mg de cobre/dia para humanos de 70 Kg (ou 0,14 mg/Kg/dia), e embora seja descrita como segura pela OMS e pelo Instituto de Medicina, ela reduziu a contração cardíaca, as derivadas temporais de força, a resposta inotrópica ao cálcio extracelular, a resposta β -adrenérgica, a contração de pós-reposo e contrações tetânicas. Efeitos semelhantes foram obtidos após 4 semanas de exposição a

dose equivalente a 20 mg/dia de cobre em adultos (ou 0,28 mg/Kg/dia), sendo que está dose é considerada o dobro da ingestão máxima tolerável para esse metal. Esse fato sugere que a ingestão máxima tolerável para o cobre já mostra efeitos claramente nocivos. A dose diária recomendada, equivalente a 0,9 mg/dia de cobre (ou 13 µg/Kg/dia), apesar de ter alterado alguns dos mecanismos reguladores da contração cardíaca, não reduziu a força contrátil dos músculos papilares. Além disso, este trabalho demonstra de maneira inédita que o consumo de peptídeos hidrolisados da clara do ovo desempenha uma ação antioxidante eficaz na prevenção dos efeitos do cobre e na melhora da qualidade da contração do cardíaca.

Neste modelo de avaliação experimental o ganho de peso corporal foi semelhante entre os grupos experimentais que receberam as doses de 13 µg, 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia de cobre por 4 semanas. Esse dado corrobora os estudos de Naseri et al., (2011) e Mattioli et al., (2018), em que bovinos tratados com a dose máxima de cobre não apresentaram alteração no ganho de peso corporal e relação aos não tratados.

O estudo de Nunes et al. (2018) mostrou que a exposição aguda ao cobre induz disfunção vascular na aorta principalmente por meio da geração de EROs e produção elevada de NO levando à redução da reatividade vascular. No entanto, a exposição crônica a diferentes doses de cobre não parece alterar a reatividade vascular, conforme foi observado neste estudo. Como a aorta é um vaso que mostra facilmente os efeitos dos metais produzindo estresse oxidativo (SIMÕES et al., 2015; SIMÕES et al., 2020; SCHEREIDER et al., 2021), o fato dessas três doses não alterarem a reatividade vascular reforça a ideia de que os efeitos encontrados neste estudo são restritos apenas ao coração. Portanto, por essa razão, não prosseguimos com estudos vasculares com essas doses.

A hipertrofia cardíaca é um dos fatores de risco mais graves para doenças cardiovasculares. Em nossos achados, a exposição às doses diária recomendada, máxima tolerável e ao dobro da dose máxima tolerável não alteraram a massa dos ventrículos direito e esquerdo e dos músculos papilares de ratos. Sabemos que o cobre atua como cofator da citocromo c oxidase e lisil oxidase, e o aumento da disponibilidade de cobre melhora a atividade dessas enzimas, posto que o aumento da atividade da citocromo c oxidase previne a

hipertrofia cardíaca (ZHENG et al., 2015). Aliás, Rodrigues e González (2019) descrevem que o aumento da concentração de cobre melhora a função da lisil oxidase mantendo a homeostase da matriz extracelular miocárdica por meio da oxidação das cadeias de colágeno e elastina prevenindo à ocorrência de hipertrofia cardíaca.

A avaliação da força de contração, do tempo de ativação da contração, tempo de relaxamento e das derivadas temporais de força positivas e negativas mostram que a exposição ao cobre reduziu o inotropismo cardíaco e afetou os parâmetros temporais de contração. Esses efeitos parecem estar relacionados à redução do influxo de cálcio extracelular através do sarcolema e à redução da atividade das proteínas contráteis cardíacas (BERS, 2002). Sabemos que o aumento da exposição ao cobre pode prejudicar a contração dos músculos papilares e seus mecanismos reguladores, devido ao aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FILETTI et al., 2018). Outros estudos descrevem alterações na função cardíaca em situações de exposição aumentada e/ou concentração sanguínea de cobre elevada, mas não explicam os mecanismos subjacentes responsáveis por esses efeitos (SAMUNI, 1981; SALONEN et al., 1991; BARCELOUX, 1999; COOPER et al., 2004; KOSAR et al., 2006).

Estudos prévios mostram que o aumento do estresse oxidativo é o principal mecanismo pelo qual o cobre prejudica a contratilidade cardíaca (MISRA, 1978; KOK et al., 1988; KINSMAN et al., 1990; SALONEN et al., 1991; JOMOVA, 2011; SINGH et al. al., 2015; CHOWDHURY et al., 2018; RELLOSO et al., 2019). Com base nisso, realizamos uma avaliação detalhada dos mecanismos reguladores do acoplamento excitação-contração cardíaco para descrever como a cardiotoxicidade gerada pela exposição às doses de ingestão diária recomendada, máxima de ingestão tolerável e o dobro da dose máxima tolerável.

O influxo de cálcio avaliado de forma indireta através da contração pós-reposo diminuiu após a exposição à dose de 0,14 mg/Kg/dia de cobre, enquanto a curva concentração-resposta ao cálcio reduziu nos três grupos que receberam o cobre. Esses resultados mostram que o cobre reduz o influxo sarcolemal de cálcio. Nossos resultados estão em concordância com estudos anteriores que

avaliaram a exposição a metais tóxicos, como ferro e chumbo, mostram que as EROs prejudicam os mecanismos que disponibilizam cálcio para a contratilidade miocárdica, incluindo o influxo de cálcio através dos canais do tipo L do sarcolema (FIORESI et al., 2013; ÁVILA et al., 2016).

Outra análise do nosso estudo consistiu em avaliar se a exposição as doses de cobre poderiam influenciar a resposta ao agonista de receptores β -adrenérgico. O agonista β -adrenérgico promove uma série de efeitos mediados por segundos mensageiros nos cardiomiócito. O agonista se liga aos receptores β -adrenérgicos acoplados à proteína G, formando o AMPc pela ação da enzima adenilato ciclase, o AMPc ativa a proteína cinase A (PKA), que fosforila os canais para cálcio e aumenta o influxo através da membrana. Também, promove a fosforilação do fosfolambam (PLBp) que, além de resultar em maior permeabilidade ao cálcio extracelular, aumenta a recaptção de cálcio pela SERCA, resultando em aumento da força de contração e encurtamento do tempo de relaxamento. Esta ação foi diminuída nos músculos papilares de animais expostos às doses de ingestão diária recomendada, máxima tolerável e duas vezes a dose máxima tolerável de cobre.

A resposta reduzida ao Isoproterenol poderia evidenciar uma perda de reserva inotrópica, componente fisiopatológico importante em cardiopatias. Embora não haja dados sobre os impactos da exposição às doses de cobre descritas sobre a resposta inotrópica adrenérgica em modelos “*in vivo*”, nosso grupo demonstrou anteriormente que a incubação aguda com cobre em alta concentração, reduziu a resposta à estimulação β - adrenérgica de músculos papilares (FILETTI et al., 2018). Aliás, a redução da resposta β -adrenérgica é um efeito comum dos metais pesados no músculo cardíaco (SILVA et al., 2015; ÁVILA, 2016; ÁVILA, 2021).

As contrações tetânicas foram utilizadas para avaliar a maquinaria contrátil cardíaca intacta, porém com o retículo sarcoplasmático disfuncional. Dessa forma a contração torna-se dependente do influxo de cálcio e da sensibilidade das proteínas contráteis (FIORESI et al., 2013; FIORESI et al., 2014). As forças desenvolvidas no e pico e no platô das contrações tetânicas foram prejudicadas pela exposição às doses de 13 μ g, 0,14 mg e 0,28 mg/Kg/dia de cobre. Um estudo anterior de Filetti et al. (2018) também mostrou a redução

da contração tetânica após exposição aguda a alta concentração de cobre, que neste caso estava relacionada, os menos em partes, à redução na atividade da ATPase miosínica.

Já foi postulado que o aumento do estresse oxidativo é o principal mecanismo pelo qual o cobre prejudica a contratilidade cardíaca (KOK et al., 1988; KINSMAN et al., 1990; SALONEN et al., 1991; JOMOVA, 2011; SINGH et al. al., 2015; CHOWDHURY et al., 2018; RELLOSO et al., 2019), assim, os efeitos do tratamento antioxidante com HCO foram avaliados na exposição ao cobre. Embora a dose de 13 µg/Kg/dia de cobre tenha alterado alguns mecanismos reguladores da contração cardíaca, a força de contração permaneceu estável, enquanto os grupos expostos às doses de 0,14 e 0,28 mg/Kg/dia de cobre tiveram a redução da contração dos músculos papilares. Todavia, como a dose de 0,14 mg/Kg/dia de cobre é descrita como segura e pode ser facilmente alcançada através da dieta rica em alimentos fontes de cobre, ou da exposição ambiental, a avaliação da ação antioxidante do HCO foi realizada neste grupo.

Avaliamos o efeito dos peptídeos bioativos derivados do HCO contra as alterações cardiovasculares promovidas pela exposição à 0,14 mg/Kg/dia de cobre. Observamos que a administração dietética com HCO protege o coração dos efeitos do cobre, restaurando a força de contração cardíaca e o ciclo do cálcio, através da supressão do estresse oxidativo, melhora da expressão da SERCA-2a e aumento da atividade da ATPase miosínica. Portanto, é provável que restauração da homeostase cardíaca esteja ligada à redução do estresse oxidativo, sendo este o principal efeito do tratamento com HCO.

Atualmente, há uma busca por terapias “naturais” e eficazes para minimizar os efeitos dos metais pesados e contaminantes ambientais, bem como prevenir doenças. Nesse sentido, compostos bioativos derivados de alimentos parecem ser uma alternativa eficaz (DENG et al., 2012; GARCÍA-NINO e PEDRAZA-CHAVERRI, 2014). O HCO é produzido após 8 horas de digestão por hidrólise com pepsina liberando peptídeos bioativos com atividade de eliminação de radicais peroxil *in vitro*. A sequências de aminoácidos como Pro, Lys ou Arg no resíduo C-terminal confere atividade inibidora da ECA. A presença de Arg ou Tyr na posição N-terminal melhora o relaxamento vascular e, finalmente, a

presença de Tyr e Phe na posição C-terminal está relacionado com a redução de radicais livres e melhora das propriedades antioxidantes (MIGUEL et al., 2004).

Portanto, considerando essas propriedades bioativas é possível postular seu papel como agente cardioprotetor. De fato, administração de curto e longo prazo do HCO mostrou efeito anti-hipertensivo em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (MIGUEL et al., 2005; MIGUEL et al., 2006). Em relação aos contaminantes ambientais, o HCO mostrou-se capaz de prevenir complicações cardiovasculares, reprodutivas e neurológicas relacionadas à exposição ao mercúrio (RIZZETTI et al., 2016a; RIZZETTI et al., 2017a; RIZZETTI et al., 2017b;) e melhorou a função cognitiva após exposição prolongada ao alumínio em ratos (MARTINEZ et al., 2019). Todos estes efeitos têm sido atribuídos a suas ações antioxidante e anti-inflamatória. No presente estudo, ratos que receberam o cobre e o HCO não desenvolveram disfunção cardíaca, evidenciando a eficácia do HCO em neutralizar os efeitos adversos induzidos pela exposição ao cobre.

Neste estudo demonstramos que o consumo de HCO simultaneamente à exposição ao cobre não altera o ganho de peso, a pressão arterial sistólica e não causa hipertrofia cardíaca. Os nossos resultados foram promissores demonstrando que o HCO preveniu a perda de força contrátil, das derivadas temporais de força máximas, da resposta inotrópica ao cálcio e ao Isoproterenol, da contração pós-reposo e da geração de força tetânica, além de melhorar a expressão da SERCA-2a, as atividades da ATPase miosínica e das enzimas antioxidantes SOD e catalase e reduzir a formação *in situ* de $O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet} .

Houve expressiva melhora das potenciações pós-pausa no grupo que recebeu cobre e HCO em relação aos demais grupos experimentais. Este efeito está relacionado ao aumento da expressão da SERCA-2a no grupo Cu-HCO, ao passo que a expressão do NCX e do PLB permaneceram inalteradas. Este resultado pode representar um importante mecanismo induzido pelo HCO para compensar a redução de força causada pela exposição ao cobre. Aliás, a SERCA tem atraído atenção como alvo em terapias antioxidantes, pois o aumento da expressão da isoforma cardíaca da SERCA promove melhora da recaptação do cálcio pelo RS, resultando em melhora da força e da qualidade da

contração (LIU et al., 2018; RAHATE et al., 2019; QAISAR et al., 2019). Este achado ainda corrobora com o efeito observado nas derivadas temporais de força às quais foram reestabelecidas pelo tratamento com HCO.

As EROs podem alterar a homeostase do cálcio nos cardiomiócitos de ratos (CHEREDNICHENKO et al., 2004). Como resultado, a exposição ao cobre reduziu o influxo de cálcio, avaliado indiretamente através da *post-rest contraction* e a resposta inotrópica ao cálcio extracelular. Outra análise do nosso estudo consistiu em avaliar a influência do tratamento com HCO na resposta contrátil ao agonista β -adrenérgico, a qual havia sido prejudicada pelo cobre. O HCO reestabeleceu a resposta inotrópica ao agonista β -adrenérgico. Nossos resultados mostraram ainda que a exposição ao cobre por 4 semanas levou ao aumento de $O_2^{\bullet-}$ e $OH\bullet$, sugerindo que este aumento tem relação com as alterações da cinética do cálcio, da afinidade das proteínas contráteis a este íon e da redução da resposta β -adrenérgica. A dessensibilização dos receptores β -adrenérgicos de corações de ratos em casos de aumento do estresse oxidativo já foi descrita por Kaneko et al., (1991). De fato, em nosso estudo estes efeitos foram abolidos pelo tratamento com HCO, assim como a expressiva redução da formação *in situ* de radicais livres.

As forças desenvolvidas do pico e do platô das contrações tetânicas dos músculos papilares de VE que foram reduzidas pela exposição ao cobre foram reestabelecidas pelo tratamento com HCO. Para compreender melhor este efeito, mensuramos a atividade da ATPase miosínica do VE de ratos, a qual se mostrou reduzida pelo cobre e preservada nos grupos tratados com HCO.

A molécula da miosina é rica em radicais sulfidrilas (SH) e o cobre apresenta afinidade por eles, sendo que esta ligação resulta em redução da atividade da ATPase miosínica (MOREIRA et al., 2003), entretanto o tratamento com HCO impediu a redução da atividade da ATPase miosínica. Esse achado se deve principalmente às suas propriedades redox, que lhes permitem atuar como agentes doadores de hidrogênio (DING et al. 2015) impedindo a ligação de metais aos radicais SH.

Estudos anteriores também descreveram a produção de peptídeos quelantes com resíduos de aminoácidos His, Tyr e Phe, que conseqüentemente

exercem atividade antioxidante (TORRES-FUENTES et al. 2014). Levando em conta que os principais componentes do HCO são os aminoácidos Tyr, His, Pro, Phe e Leu, podemos sugerir que o efeito antioxidante do HCO sobre o estresse oxidativo observado neste estudo é provavelmente devido ao sua ação quelante de metais e subsequente de eliminação de radicais livres.

Como o estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante, é natural que os organismos se adaptem e aumentem suas defesas antioxidantes. Investigamos a contribuição do sistema NADPH oxidase, através da isoforma cardíaca NOX2, como fonte de EROs após exposição ao cobre e, conseqüentemente, como alvo terapêutico do HCO. Identificamos que a expressão da isoforma NOX2 está reduzida no grupo cobre apesar do grande aumento da formação de $O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet} . Este resultado possivelmente se deve a um mecanismo compensatório do organismo para tentar reduzir os níveis dos radicais livres, assim como descrito previamente por Yu et al., (2016). Além disso, a via da Xantina oxidase poderia estar relacionada ao aumento da geração de EROs, conforme relatado anteriormente (SEDDON et al., 2007; TSUTSUI et al., 2011; FARIA & PERSAUD, 2017). Em seguida, medimos a atividade e a expressão das enzimas antioxidantes SOD e catalase. A expressão da SOD e da Catalase não foram alteradas. Entretanto, o aumento das atividades da SOD e catalase após o tratamento com HCO indicam que os radicais livres eram de fato importantes agentes causadores dos prejuízos contráteis nos corações dos ratos expostos ao cobre. Resultado semelhante foi obtido por Rizzetti et al., (2017a) que mostrou que o tratamento com HCO em ratos expostos ao mercúrio melhoraram a atividade da SOD sem alterar a sua expressão.

Em resumo, nossos resultados mostram que a exposição ao cobre, mesmo na dose considerada tolerável, promove uma série de efeitos nocivos à contração cardíaca sem alterar a reatividade vascular, sendo que esses efeitos estão relacionados ao aumento do estresse oxidativo cardíaco. Nossos dados também evidenciaram pela primeira vez que o HCO impediu os prejuízos cardíacos promovidos pela exposição ao cobre, o que se mostrou relacionado à sua atividade antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo, melhorando a expressão da SERCA-2a, das atividades da ATPase miosínica e das enzimas

antioxidantes SOD e catalase. Por fim, o HCO pode ser considerado um ingrediente em alimentos funcionais e pode ser usado como terapia adicional no tratamento da toxicidade cardiovascular promovida pelo cobre.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que apesar de ser um metal essencial, a exposição ao cobre gera prejuízos da contração cardíaca em ratos, efeitos estes que estão relacionados ao menos em partes ao aumento do estresse oxidativo e a redução da atividade da ATPase miosínica. Identificamos que apesar da dose de 10 mg para humanos estar dentro de limites considerados seguros pelas agências é capaz de reduzir a força de contração em músculos papilares, assim como o dobro dessa dose (20 mg para adultos). Efeitos nocivos também foram encontrados para a exposição à dose diária recomendada (900 µg) apesar de não terem prejudicado a geração de força contrátil. Esses dados indicam uma necessidade de revisão das doses de cobre recomendadas pelas agências.

Nosso estudo também mostrou de forma inédita que o consumo de HCO apresentou ação cardioprotetora sobre as alterações da força de contração cardíaca, dos mecanismos reguladores do ciclo do cálcio, a redução da atividade da ATPase miosínica, e a formação *in situ* de radicais livres induzidos pela exposição ao cobre, além de melhorar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase e aumentar a expressão da SERCA-2a. Esses achados indicam que o HCO pode representar uma boa estratégia de saúde pública, uma vez que pode ser utilizado como terapia funcional ou complementar no tratamento dos danos induzidos pela exposição ao cobre.

REFERÊNCIAS

1. AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** 1984.
2. ALEXANIAN, I.; PARISSIS, J.; FARMAKIS, D.; ATHANASELIS, S.; PAPPAS, L.; et al. Clinical and echocardiographic correlates of serum copper and zinc in acute and chronic heart failure. **Clin Res Cardiol.** 2014.
3. ALISSA, E. M.; FERNS, G. A. Heavy metal poisoning and cardiovascular disease. **Journal of Toxicology.** 2011.
4. ALTEKIN, E.; ÇOKER, C.; ŞIŞMAN, A. R.; ÖNVURAL, B.; et al. The relationship between trace elements and cardiac markers in acute coronary syndromes. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.** 2005.
5. ANGELI, J.K. Efeitos do Gadolínio sobre a reatividade vascular em aorta de ratos. 2009. 139f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.
6. ARAYA, M.; OLIVARES, M.; PIZARRO, F.; MÉNDEZ, M.A.; GONZÁLEZ, M.; UAUY, R. Supplementing copper at the upper level of the adult dietary recommended intake induces detectable but transient changes in healthy adults. **J Nutr.** 2005.
7. ARAYA, M.; PIZARRO, F.; OLIVARES, M.; ARREDONDO, M.; GONZÁLEZ, M.; MÉNDEZ, M. Understanding copper homeostasis in humans and copper effects on health. **Biol Res.** 2006.
8. ARMSTRONG, C.W.; MOORE, L.W.; HACKLER, R.L.; MILLER, G. B.; et al. An outbreak of metal fume fever: Diagnostic use of urinary copper and zinc determinations. **J Occup Med.** 1983.

9. ASKERGREN, A.; MELLGREN, M. Changes in the nasal mucosa after exposure to copper salt dust. a preliminary report. **Scand J Work Environ Health**. 1975
10. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Copper. Atlanta, GA: U.S. **Department of Health and Human Services, Public Health Service**. 2004.
11. ÁVILA, R.A. Efeitos agudos do ferro (II) sobre a contratilidade miocárdica do rato. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2016.
12. ÁVILA, R.A.; ROSSI, E.M.; DE CARVALHO, G.M.; KRAUSE, M.; LEOPOLDO, A.S.; et al. Moderate-intensity aerobic training reduces cardiac damage attributable to experimental iron overload in rats. **Exp Physiol**. 2021
13. ÁVILA, R.A.; SILVA, M.A.S.C.; PEIXOTO, J.V.; KASSOUF-SILVA, I. et al. Mechanisms involved in the in vitro contractile dysfunction induced by different concentrations of ferrous iron in the rat myocardium. **Toxicol In Vitro**. 2016.
14. BAGHERI, B.; AKBARI, N.; TABIBAN, S.; HABIBI, V.; et al. Serum level of copper in patients with coronary artery disease. **Niger Med J**. 2015.
15. BANNISTER, J.V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods Biochem Ana**. 1987.
16. BARCELOUX, D.G. Copper. **Clinical Toxicology**. 1999.
17. BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. 2006.

18. BASSANI, J. W.; BASSANI, R. A.; BERS, D. M. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. **The Journal of Physiology**. 1994..
19. BASTOLA, M.M.; LOCATIS, C.; MAISIAK, R.; FONTELO, P. Selenium, copper, zinc and hypertension: an analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey (2011-2016). **BMC Cardiovasc Disord**. 2020.
20. BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**. 2002.
21. BOCALINI, D. S. et al. Remodelamento miocárdico após grandes infartos converte potenciação pós-pausa em decaimento da força em ratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 2012.
22. BOONLA, O.; KUKONGVIRIYAPAN, U.; PAKDEECHOTE, P.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; PANNANGPETCH, P.; THAWORNCHINSOMBUT, S. Peptides-Derived from Thai Rice Bran Improves Endothelial Function in 2K-1C Renovascular Hypertensive Rats. **Nutrients**. 2015.
23. BOST, M. et al. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. 2016.
24. BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral, Sumário Mineral. 2017.
25. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999.

26. BREMEL, R.D.; WEBER, A. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. **Biochim Biophys Acta**. 1975.
27. CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovasc Res**. 2005.
28. CARRILLO, W.; GÓMEZ-RUIZ, J.A.; MIRALLES, B.; RAMOS, M.; et al. Identification of antioxidant peptides of hen egg-white lysozyme and evaluation of inhibition of lipid peroxidation and cytotoxicity in the Zebrafish model. **European Food Research and Technology**. 2016.
29. CELI, P.O papel do estresse oxidativo na saúde e produção de pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 2010.
30. CHAIGNON, V. et al. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. **Environ. Pollut.** 2003.
31. CHEREDNICHENKO, G. et al. Conformational activation of Ca²⁺ entry by depolarization of skeletal myotubes. **Proc Natl Acad Sci**. 2004.
32. CHO, Y.S.; MOON, J.M.; JEONG, Y.H.; LEE, D.H.; CHUN, B.J. Successful extracorporeal life support in respiratory failure after copper sulphate ingestion. **Natl Med J India**. 2018.
33. CHOWDHURY, R.; RAMOND, A.; O'KEEFFE, L.M.; SHAHZAD, S.; KUNUTSOR, S.K.; ET AL. Environmental toxic metal contaminants and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. **BMJ**. 2018.
34. COLE, D.E.C.; LIRENMAN, D.S. Role of albumin enriched peritoneal dialysate in acute copper poisoning. **J Pediatr**. 1978.
35. COLLINS. J.F. Copper: Present Knowledge in Nutrition. **Academic Press**. Volume 1: Basic Nutrition and Metabolism. 11^a ed. 2020.

36. COOPER, G.J.S.; PHILIPS, A.R.J.; CHOONG, S.Y.; LEONARD, B.L.; et al. Regeneration of the Heart in Diabetes by Selective Copper Chelation. **Diabetes**. 2004.
37. COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de nutrientes. **Barueri: Manole**. 2007.
38. DENG, Y.; XU, Z.; LIU, W.; YANG, H.; XU, B.; et al. Effects of lycopene and proanthocyanidins on hepatotoxicity induced by mercuric chloride in rats. **Biol. Trace Elem. Res**. 2012.
39. ELIAS, R.J.; KELLERBY, S.S.; DECKER, E.A. Antioxidant activity of proteins and peptides. **Critical reviews in food science and nutrition**. 2008.
40. ESCOBAR, A.G.; RIZZETTI, D.A.; PIAGETTE, J.T.; PEÇANHA, F.M.; et al. Antioxidant Properties of Egg White Hydrolysate Prevent Mercury-Induced Vascular Damage in Resistance Arteries. **Front Physiol**. 2020
41. ESPARZA, A. et al. Iron-induced reactive oxygen species mediate transporter DMT1 endocytosis and iron uptake in intestinal epithelial cells. *American journal of physiology*. **Cell physiology**. 2015.
42. FARIA, A.; PERSAUD, S.J. Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. **Pharmacol Ther**. 2017.
43. FENG, J.; DAI, Z.; ZHANG, Y.; MENG, L.; YE, J.; MA, X. Alteration of Gene Expression Profile in Kidney of Spontaneously Hypertensive Rats Treated with Protein Hydrolysate of Blue Mussel (*Mytilus edulis*) by DNA Microarray Analysis. **PlosOne**. 2015.
44. FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 1997.

45. FILETTI, F.M.; VASSALLO, D.V.; FIORESI, M.; SIMÕES, M.R. Reactive oxygen species impair the excitation-contraction coupling of papillary muscles after acute exposure to a high copper concentration. **Toxicol In Vitro**. 2018.
46. FIORESI, M. Exposição ao chumbo por 30 dias: implicações na pressão arterial e na contratilidade miocárdica. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2011.
47. FIORESI, M.; FURIERI, L.B.; SIMÕES, M.R.; RIBEIRO, R.F.JR. et al. Acute exposure to lead increases myocardial contractility independent of hypertension development. **Braz J Med Biol Res**. 2013.
48. FIORESI, M.; SIMÕES, M.R.; FURIERI, L.B.; BROSEGHINI-FILHO, G.B.; et al. Chronic lead exposure increases blood pressure and myocardial contractility in rats. **PLoS One**. 2014.
49. FORD, E.S. Serum Copper Concentration and Coronary Heart Disease Among Us Adults. **Am. J. Epidemiol**. 2000.
50. FRANCO, R.; PANAYIOTIDIS, M. I.; CIDLOWSKI, J. A. Glutathione depletion is necessary for apoptosis in lymphoid cells independent of reactive oxygen species formation. **The Journal of biological chemistry**. 2007.
51. FREIRE, F.L.A.; DANTAS-KOMATSU, R.C.S.; LIRA, N.R.D.; DINIZ, R.V.Z.; et al.; Biomarkers of Zinc and Copper Status and Associated Factors in Outpatients with Ischemic and Non-Ischemic Heart Failure. **Journal of the American College of Nutrition**. 2021.
52. FU, X. Effect of plant leaf protein on lipotropy peroxidase system of rats. **Chin J Vet Sci Technol**. 2003.

53. FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M.; KAPLAN, J.H. Copper transporters and copper chaperones: roles in cardiovascular physiology and disease. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2018.
54. GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**. 2003.
55. GAETKE, L.M.; CHOW-JOHNSON, H.S.; CHOW, C.K. Copper: toxicological relevance and mechanisms. **Arch Toxicol**. 2014.
56. GARCÉS-RIMON, M.; GONZALEZ, C.; URANGA, J. A.; LOPEZ-MIRANDA, V.; LOPEZ-FANDINO, R.; MIGUEL, M. Pepsin Egg White Hydrolysate Ameliorates Obesity-Related Oxidative Stress, Inflammation and Steatosis in Zucker Fatty Rats. **PlosOne**. 2016.
57. GARCÍA-NINO, W.R.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage. **Food Chem. Toxicol**. 2014.
58. GHAEMIAN, A.; SALEHIFAR, E.; JALALIAN R, G.F.; AZIZI, S.; MASOUMI, S.; 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.
59. 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.
60. GOLDHABER, J.I.; QAYYUM, M.S. Oxygen free radicals and excitation-contraction coupling. **Antioxid Redox Signal**. 2000.
61. HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J**. 1987.

62. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free Radicals in biology and medicine. **Oxford Science Publications**. 1998.
63. HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. As bases farmacológicas da terapêutica. **Goodman & Gilman**. 9a Edição. Rio de Janeiro. 1996.
64. HARRIS, E. D. Copper homeostasis: the role of cellular transporters. **Nutr Rev**. 2003.
65. HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current opinion in biotechnology**. 2007.
66. HARVEY, L. J. et al., Use of mathematical modeling to study copper metabolism in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005.
67. HUANG, L.; SHEN, R.; HUANG, L.; YU, J.; et al. Association between serum copper and heart failure: a meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2019.
68. HUANG, W.; CHAKRABARTI, S.; MAJUMDER, K.; JIANG, Y.; DAVIDGE, S. T.; WU, J. Egg-derived peptide IRW inhibits TNF-alpha-induced inflammatory response and oxidative stress in endothelial cells. *J Agric Food Chem.* 2010.
69. HWANG, J. Y.; SHYU, Y. S.; WANG, Y. T.; HSU, C. K. Antioxidative properties of protein hydrolysate from defatted peanut kernels treated with esperase. *Food Sci Technol.* 2010.
70. IOM. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. A report of the Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board. National Academy Press. Washington, 2001.

71. JAHANDIDEH, F.; CHAKRABARTI, S.; DAVIDGE, S.T.; WU, J. Antioxidant peptides identified from ovotransferrin by the ORAC method did not show anti-inflammatory and antioxidant activities in endothelial cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015.
72. JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011.
73. JUNIOR, J.F.; PASCHOAL, V.C. Sintomas de deficiência de Cobre e fontes alimentares. **Control Soft Nutrition**. 2004.
74. KALLER, S. Diagnosis and therapy of Menkes syndrome, a genetic form of copper deficiency. **Am J Clin Nutr**. 1998.
75. KALLER, S. Menkes disease mutations and response to early copper histidine treatment. **Nature Genetics**. 1996.
76. KANEKO, M.; CHAPMAN, D.C.; GANGULY, P.K.; BEAMISH, R.E.; et al. Modification of cardiac adrenergic receptors by oxygen free radicals. **Am J Physiol**. 1991.
77. KANG, J.Y. Copper and homocysteine in cardiovascular diseases. **Pharmacol Ther**. 2011.
78. KEEN, C. L. et al. Developmental Consequences of Trace Mineral Deficiencies in Rodents: Acute and Long-Term Effects. **J Nutr**. 2003.
79. KINSMAN, G.D.; HOWARD, A.N.; STONE, D.L.; MULLINS, P.A. Studies in copper status and atherosclerosis. **Biochem Soc Trans**. 1990.
80. KITTS, D.D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Curr Pharm Des**. 2003.

81. KOK, F.J., DUIJN., C.M.V., HOFMAN, A., VOET, G.B.V.D., et al. Serum copper and zinc and the risk of death from cancer and cardiovascular disease. **American Journal of Epidemiology**. 1988.
82. KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**. 2009.
83. KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Bioactive peptides from food proteins In: Hui Y. H., editor. **Handbook of food products manufacturing**. John Wiley & Sons, Inc. 2006.
84. KOSAR, F., SAHIN, I., TAŞKAPAN, C., KÜÇÜKBAY, Z., GULLU, H., et al. Trace element status (Se, Zn, Cu) in heart failure. **Anadolu Kardiyol Derg.** 2006.
85. LEARY, S.C.; WINGE, D.R.; COBINE, P.A: Pulling the plug” on cellular copper: the role of mitochondria in copper export. **Biochim Biophys Acta**. 2009.
86. LECH, T.; SADLIK, J.K. Copper Concentration in Body Tissues and Fluids in Normal Subjects of Southern Poland. **Biol Trace Elem Res**. 2007.
87. LEE, D.E.; JUNG, T.H.; JO, Y.N.; YUN, S.S.; et al. Enzymatic Hydrolysis of Egg White Protein Exerts a Hypotensive Effect in Spontaneously Hypertensive Rats. **Food Sci Anim Resour**. 2019.
88. LEE, J. et al. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1, **Journal of Biological Chemistry**. 2002.
89. LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Amino acids and peptides. Lehninger: Principles of Biochemistry. 2018.

90. LEITE, C.M.; VASSALLO, D.V.; MILL, J.G.; Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. **Brazilian Journal of Medical and Biological**. 1995.
91. LI, X. X.; HAN, L. J.; CHEN, L. J. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. **J Sci Food Agric**. 2008.
92. LI, Y. W.; LI, B.; HE, J.; QIAN, P. Quantitative structure-activity relationship study of antioxidative peptide by using different sets of amino acids descriptors. **Journal of Molecular Structure**. 2011.
93. LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. 2001.
94. LINDER, M. C., HAZEGH-AZAM, M. Copper biochemistry and molecular biology, **American Journal of Clinical Nutrition**. 1996.
95. LIU, D.; GUO, Y.; ZHU, J.; TIAN, W.; et al. The necessity of enzymatically hydrolyzing walnut protein to exert antihypertensive activity based on in vitro simulated digestion and in vivo verification. **Food Funct**. 2021.
96. LIU, L.; ZHAO, W.; LIU, J.; GAN, Y.; et al. Epigallocatechin-3 gallate prevents pressure overload-induced heart failure by up-regulating SERCA2a via histone acetylation modification in mice. **PLoS One**. 2018
97. MAAR, J. H. História da química - Primeira Parte - dos primórdios a Lavoisier. Florianópolis: Conceito, 2008.
98. MALEKAHMADI, M.; FIROUZI, S.; REZAYI, M.; GHAZIZADEH, H.; et al. Association of Zinc and Copper Status with Cardiovascular Diseases and their Assessment Methods: A Review Study. **Mini Rev Med Chem**. 2020.

99. MANSO, M.A.; MIGUEL, M.; EVEN, J.; HERNÁNDEZ, R.; et al. Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. **Food Chem.** 2008.
100. MARQUES, V.B.; NASCIMENTO, T.B.; RIBEIRO, R.F.JR.; BROSEGHINI-FILHO, G.B.; et al. Chronic iron overload in rats increases vascular reactivity by increasing oxidative stress and reducing nitric oxide bioavailability. **Life Sci.** 2015.
101. MARTINEZ, C.S.; ALTERMAN, C.D.C.; VERA, G.; MÁRQUEZ, A.; URANGA, J.A.; PEÇANHA, F.M.; VASSALLO, D.V.; EXLEY, C.; MELLO-CARPES, P.B.; MIGUEL, M.; WIGGERS, G.A. Egg White Hydrolysate as a functional food ingredient to prevent cognitive dysfunction in rats following long-term exposure to aluminum. **Nature.** 2019a.
102. MARTINEZ, C.S.; PIAGETTE, J.T.; ESCOBAR, A.G.; MARTÍN, Á.; PALACIOS, R.; et al. Egg White Hydrolysate: A new putative agent to prevent vascular dysfunction in rats following long-term exposure to aluminum. **Food Chem Toxicol.** 2019b.
103. MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; RIVERO-GUTIÉRREZ, B.; MASCARAQUE, C.; SÁNCHEZ DE MEDINA, F. Food derived bioactive peptides and intestinal barrier function. **Int J Mol Sci.** 2014.
104. MEISEL, H. Overview on milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal.** 1998.
105. MEISEL, H.; FITZGERALD, R. J. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. **Current pharmaceutical design.** 2003.

106. MELLANDER, O. L. O. F. The physiological importance of the casein phosphopeptide calcium salts. II. Peroral calcium dosage of infants. Some aspects of the pathogenesis of rickets. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**. 1950.
107. MIGUEL, M.; GÓMEZ-RUIZ, J.Á.; RECIO, I.; ALEIXANDRE, A. Changes in arterial blood pressure after single oral administration of milk-casein-derived peptides in spontaneously hypertensive rats. **Mol Nutr Food Res**. 2010.
108. MIGUEL, M.; LOPEZ-FANDINO, R.; RAMOS, M.; ALEIXANDRE, A. Short-term effect of eggwhite hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. **Br. J. Nutr**. 2005.
109. MIGUEL, M.; LOPEZ-FANDINO, R.; RAMOS, M.; ALEIXANDRE, A. Long-term intake of egg white hydrolysate attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Life Sci**. 2006.
110. MIGUEL, M.; RECIO, I.; GOMEZ-RUIZ, J. A.; RAMOS, M.; LOPEZ-FANDINO, R. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. **J. Food Prot**. 2004
111. MIGUEL, M; ALVAREZ, Y; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; ALONSO, M.; SALAICES, M. Vasodilator Effects of Peptides Derived From Egg White Proteins. **Regul Pept**. 2007.
112. MILL, J. G.; VASSALLO, D. V; LEITE, C. M. Mechanisms underlying the genesis of post-rest contractions in cardiac muscle. **Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica**. 1992.

113. MINE, Y.; ZHANG, H. Egg components in food systems. **Biochemistry of Foods (Third Edition)**. 2013.
114. MISRA, R.; BHAMBAL, S.A.; MISRA, N.P.; MISRA, S.M. Serum copper, ceruloplasmin & iron in ischaemic heart disease. **Indian Heart J**. 1978.
115. MŁYNIĘC, K.; GAWEŁ, M.; DOBOSZEWSKA, U.; STAROWICZ, G.; et al. Essential elements in depression and anxiety. **Part II. Pharmacol Rep**. 2015.
116. MOLLER, N.P.; SCHOLZ-AHRENS, K.E.; ROOS, N.; SCHREZENMEIR, J. Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. **Eur J Nutr**. 2008.
117. MOLLOY, S.A.; KAPLAN, J.H. Copper-dependent recycling of hCTR1, the human high affinity copper transporter. **J Biol Chem**. 2009.
118. MOREIRA, C.M.; OLIVEIRA, E.M.; BONAN, C.D.; et al. Effects of mercury on myosin ATPase in the ventricular myocardium of the rat. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. 2003.
119. MORTIMER, M.; KASEMETS, K.; KAHRU, A. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. **Toxicology**. 2010.
120. MOURE, A.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Antioxidant properties of ultrafiltration recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochem**. 2006.
121. MULERO C. J.; ZAFRILLA R. P.; MARTINEZ-CACHA, M. A.; LEAL, H.A.A.J. Bioactive peptides. **Clinica de Investigacion en Arteriosclerosis**. 2011.
122. NIEVES, J. W. Osteoporosis: the role of micronutrients. **Am J Clin Nutr**. 2005.

123. NIMALARATNE, C.; BANDARA, N.; WU, J. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. **Food chemistry**. 2015.
124. NOWICKI, G.J.; ŚLUSARSKA, B.; PRYSTUPA, A.; BLICHARSKA, E.; et al., Assessment of Concentrations of Heavy Metals in Postmyocardial Infarction Patients and Patients Free from Cardiovascular Event. **Cardiology Research and Practice**. 2021.
125. NUNES, K.Z.; FIORESI, M.; MARQUES, V.B.; VASSALLO, D.V. Acute copper overload induces vascular dysfunction in aortic rings due to endothelial oxidative stress and increased nitric oxide production. **J Toxicol Environ Health**. 2018.
126. OLIVARES, M. et al. Age and copper intake do not affect copper absorption, measured with the use of ⁶⁵Cu as a tracer, in young infants. **Am. J. Clin. Nutr.** 2001.
127. OLIVEIRA, M.C.; SCHOFFEN, J.P.F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 2010.
128. OTTER, J.; CANTRELL, F.L. Death by Copper Ammonium Complex-Containing Fungicide. **Am J Forensic Med Pathol**. 2021.
129. PACHECO, M.T.B; SGARBIERI, V. C. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of food technology**. 1999.
130. PALIKA, R.; MASHURABAD, P.C.; NAIR, M.K.; REDDY, G.B. Characterization of iron-binding phosphopeptide released by gastrointestinal digestion of egg white. **Food Research International**. 2015.

131. PEREIRA, T.C.; CAMPOS, M.M.; BOGO, M.R. Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. **J Appl Toxicol.** 2016.
132. PIHLANTO-LEPPALA, A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory peptides. **Trends in Food Science and Technology.** 2000.
133. PINTO, E.C.O. O cobre e estanho na idade do bronze. Boletim técnico da Escola politecnica da USP. Departamento de engenharia metalurgica e de materiais. São Paulo: Edusp. 2002.
134. QAISAR, R.; BHASKARAN, S.; RANJIT, R.; SATARANATARAJAN, K.; et al. Restoration of SERCA ATPase prevents oxidative stress-related muscle atrophy and weakness. **Redox Biol.** 2019
135. QIAN, Z. J.; JUNG, W. K.; KIM, S. K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresour Technol.** 2008.
136. RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2018
137. RAHATE, K.; BHATT, L.K.; PRABHAVALKAR, K.S. SERCA stimulation: a potential approach in therapeutics. **Chem Biol Drug Des.** 2020
138. RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, W. K.; JE, J. Y.; KIM, S. K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Res Int.** 2005.
139. RAUD-MATTEDI C. Os alimentos funcionais: A nova fronteira da indústria alimentar. **Revista Sociologia Política.** 2008.

140. RELLOSO, A.D.; PEREZ, M. G; FIGUERO, L.B.; ARIZA J.L.G.; BARRERA, T.G.B; LAITA, A.D; ET AL. The association of urine metals and metal mixtures with cardiovascular incidence in an adult population from Spain: the Hortegea Follow-Up Study. **International Journal of Epidemiology**. 2019.
141. REN, Y.; WU, H.; LI, X.; LAI, F.; XIAO, X. Purification and characterization of high antioxidant peptides from duck egg white protein hydrolysates. **Biochemical and biophysical research communications**. 2014.
142. REUNANEN, A. et al. Serum calcium, magnesium, copper and zinc and risk of cardiovascular death. **Eur J Clin Nutr**. 1996.
143. REVILLA, E.; MARIA, C. S.; MIRAMONTES, E.; BAUTISTA, J.; GARCIAMARTINEZ, A.; CREMADES, O. Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. *Food Res Int*. 2009.
144. RIBEIRO, J.A.S. Cobre. **Balanço Mineral Brasileiro**. 2001.
145. RICHARDS, J.R.; SCHEERLINCK, P.H.; OWEN, K.P.; COLBY, D.K. Bodybuilding supplements leading to copper toxicity, encephalopathy, fulminant hepatic failure and rhabdomyolysis. **Am J Emerg Med**. 2020.
146. RIZZETTI, D. A.; PEÇANHA, F.M.; WIGGERS, G.A.; et al. Egg white hydrolysate promotes neuroprotection for neuropathic disorders induced by chronic exposure to low concentrations of Mercury. **Science Direct**. 2016a.
147. RIZZETTI, D.A.; ALTERMANN, C.D.C.; MARTINEZ, C.S.; et al. Ameliorative effects of egg white hydrolysate on recognition memory impairments associated with chronic exposure to low mercury concentration. **Neurochemistry International**. 2016b.

148. RIZZETTI, D.A.; MARTÍN, Á.; CORRALES, P.; FERNANDEZ, F.; et al. Egg white-derived peptides prevent cardiovascular disorders induced by mercury in rats: Role of angiotensin-converting enzyme (ACE) and NADPH oxidase. **Toxicol Lett.** 2017a.
149. RIZZETTI, D.A.; MARTINEZ, C.S.; ESCOBAR, A.G.; DA SILVA, T.M.; URANGA-OCIO, J.A.; et al. Egg white-derived peptides prevent male reproductive dysfunction induced by mercury in rats. **Food Chem Toxicol.** 2017b.
150. ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease.** 2002.
151. ROBERTS, E. A., SCHILSKY, M. L. A practice guideline on Wilson Disease. **Hepatology.** 2003.
152. ROCHA, G.H.; STEINBACH, C.; MUNHOZ, J.R.; MADIA, M.A.; FARIA, J.K.; HOELTGEBAUM, D.; et al. Trace metal levels in serum and urine of a population in southern Brazil. **J Trace Elem Med Biol.** 2016.
153. RODRÍGUEZ, C.; GONZÁLEZ, J.M. The Role of Lysyl Oxidase Enzymes in Cardiac Function and Remodeling. **Cells.** 2019.
154. ROZETTI, C.M.T. Exposição por 30 dias ao cobre aumenta a pressão arterial e altera a contratilidade cardíaca: Envolvimento do óxido nítrico e do estresse oxidativo. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2020.
155. SAARI, J. T. Copper deficiency and cardiovascular disease: role of peroxidation, glycation, and nitration. **Can J Physiol Pharmacol.** 2000.

156. SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y. Active oxygen scavenging activity of egg yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. **Food Chem.** 2006.
157. SALEHIFAR, E.; SHOKRZADEH, M.; GHAEMIAN, A.; ALIAKBARI, S.; et al. The study of Cu and Zn serum levels in idiopathic dilated cardiomyopathy (IDCMP) patients and its comparison with healthy volunteers. **Biol Trace Elem Res.** 2008.
158. SALONEN, J.T., SALONEN, R., KORPELA, H., SUNTIOINEN, S., et al. Serum Copper and the Risk of Acute Myocardial Infarction: A Prospective Population Study in Men in Eastern Finland. **American Journal of Epidemiology.** 1991.
159. SAMUNI, A.; MODERCHAI, C.; CZAPSKI, G. Unusual Copper-induced Sensitization of the Biological Damage Due to Superoxide Radicals. **The Journal of Biological Chemistry.** 1981.
160. SAPWAROBOL, S; SAPHYAKHAJORN, W; ASTINA, J. Biological Functions and Activities of Rice Bran as a Functional Ingredient: A Review. **Nutr Metab Insights.** 2021.
161. SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A Review. **Peptides.** 2010.
162. SCHEREIDER, I.R.G.; VASSALLO, D.V.; SIMÕES, M.R. Chronic mercury exposure induces oxidative stress in female rats by endothelial nitric oxide synthase uncoupling and cyclooxygenase-2 activation, without affecting oestrogen receptor function. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 2021.
163. SCHÜMANN, K. et al. Hohenheim consensus workshop: copper, **European Journal of Clinical Nutrition.** 2002.

164. SCHWARTZ, E.; SCHMIDT, E Refractory shock secondary to copper sulfate ingestion. **Ann Emerg Med.** 1986.
165. SEDDON, M.; LOOI, Y.H.; SHAH, A.M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. **Heart.** 2007
166. SETSUKINAI, K.; URANO, Y.; KAKINUMA, K.; MAJIMA, H.J.; et al. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. **The Journal of biological chemistry.** 2003.
167. SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. **Bioactive peptides.** **Journal of AOAC Internationa.l.** 2008.
168. SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr.** 2004;
169. SHIMIZU, N. Copper metabolism and genetic disorders. **Nihon Rinsho.** 2016.
170. SHOBAKO, N.; OHINATA, K. Anti-Hypertensive Effects of Peptides Derived from Rice Bran Protein. **Nutrients.** 2020.
171. SHOKRZADEH, M.; GHAEMIAN, A.; SALEHIFAR, E.; ALIAKBARI, S.; et al. Serum zinc and copper levels in ischemic cardiomyopathy. **Biol Trace Elem Res.** 2009.
172. SIMÕES, M.R.; AGUADO, A.; FIORIM, J.; SILVEIRA, E.A.; et al. MAPK pathway activation by chronic lead-exposure increases vascular reactivity through oxidative stress/cyclooxygenase-2-dependent pathways. **Toxicol Appl Pharmacol.** 2015.
173. SIMÕES, R.P.; FARDIN, P.B.A.; SIMÕES, M.R.; VASSALLO, D.V.; PADILHA, A.S. Long-term Mercury Exposure Accelerates the Development

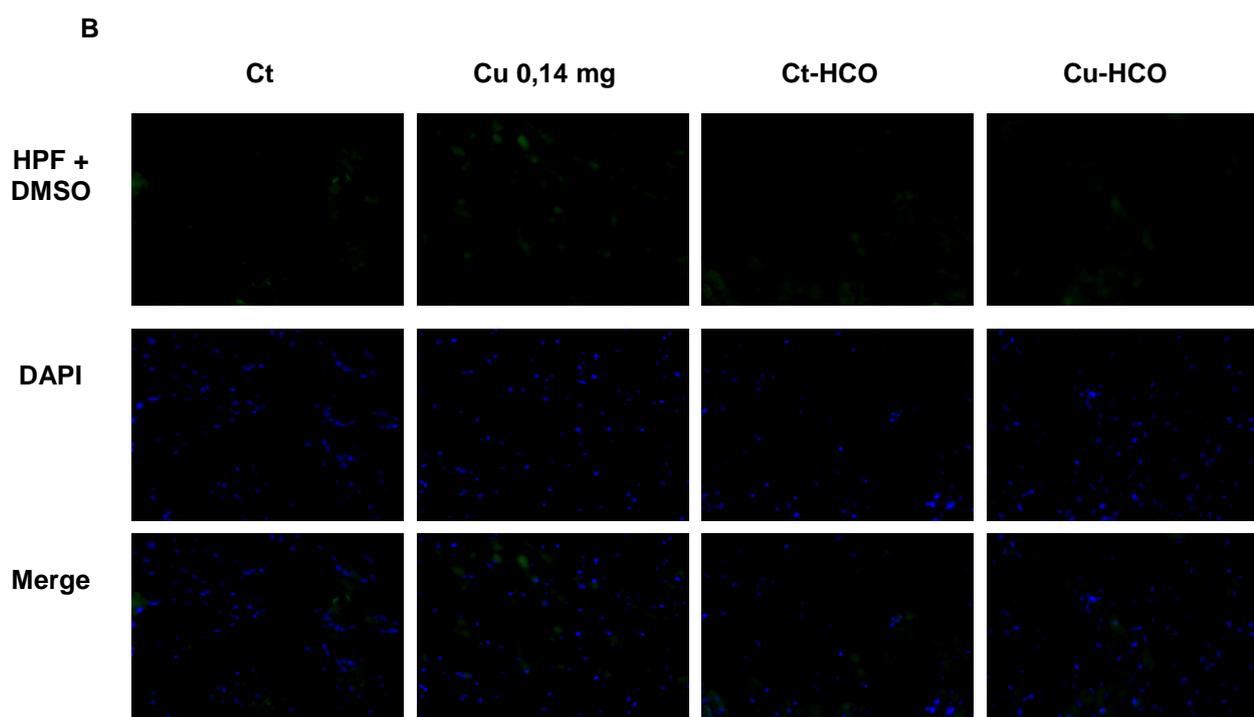
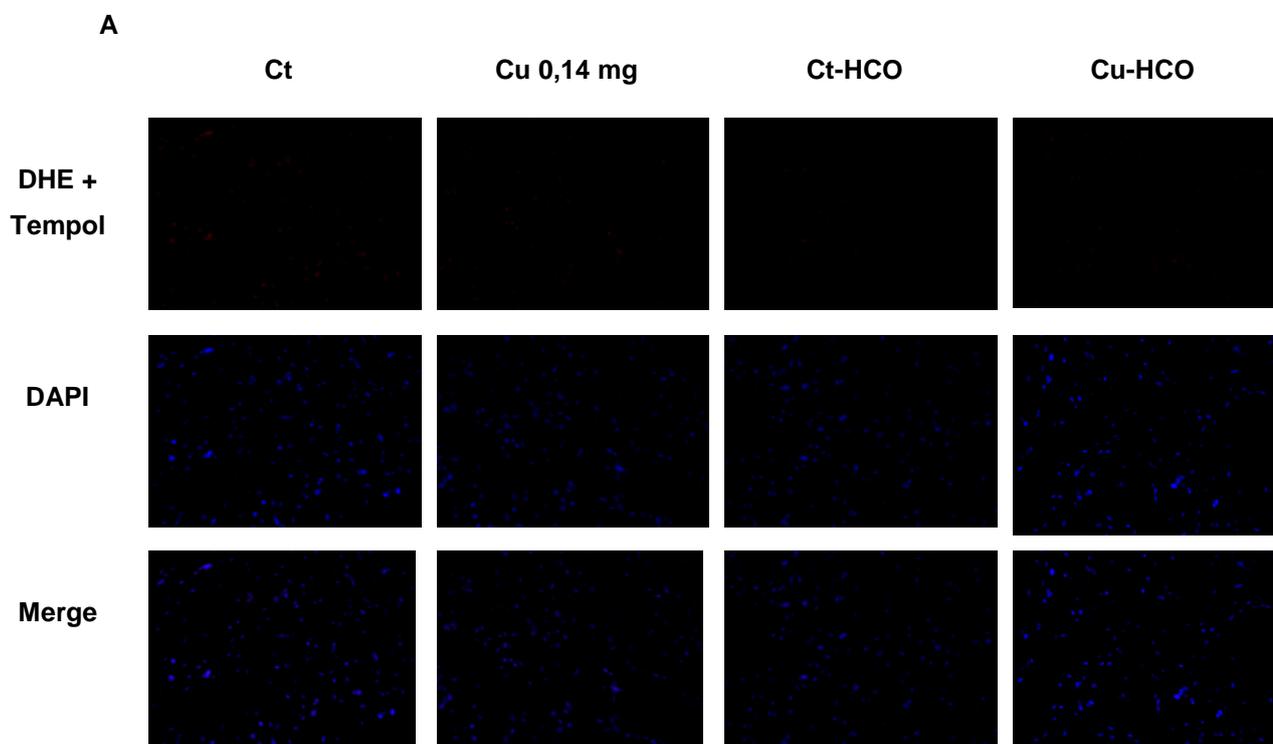
- of Hypertension in Prehypertensive Spontaneously Hypertensive Rats Inducing Endothelial Dysfunction: the Role of Oxidative Stress and Cyclooxygenase-2. **Biol Trace Elem Res.** 2020.
174. SILVA, M.A.S.C. Exposição a baixa concentração de chumbo reduz a força cardíaca em músculos papilares isolados de ratos. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.
175. SILVA, M.A.; DE OLIVEIRA, T.F.; ALMENARA, C.C.; BROSEGHINI-FILHO, G.B.; et al. Exposure to a Low Lead Concentration Impairs Contractile Machinery in Rat Cardiac Muscle. **Biol Trace Elem Res.** 2015.
176. SINGH, B.P.; VIJ, S.; HATI, S. Functional significance of bioactive peptides derived from soybean. **Peptides.** 2014.
177. SINGH, R.; SINGH, S.; PARIHAR, P.; SINGH, V.P.; PRASAD, S.M. Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: a review. **Ecotoxicol Environ Saf.** 2015.
178. SOLENKOVA. N.V.; NEWMAN, J.D.; BERGER, J.S.; THURSTON, G.; et al. Metal pollutants and cardiovascular disease: mechanisms and consequences of exposure. **American Heart Journal.** 2014.
179. SON, M.; WU, J. Egg white hydrolysate and peptide reverse insulin resistance associated with tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in skeletal muscle cells. **Eur J Nutr.** 2019.
180. SONI, D.; SHUKLA, L.; SINGH, S.; GOYAL, V.; BEHARI, M. Cardiovascular and sudomotor autonomic dysfunction in Wilson's disease--limited correlation with clinical severity. **Autonomic Neuroscience.** 2009.

181. STAMLER, J. S.; HAUSLADEN, A. Oxidative modifications in nitrosative stress. **Nat Struct Biol.** 1998.
182. STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; AMARAL, M.P.H.; et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** 2007.
183. SUDHAHAR, V.; DAS, A.; HORIMATSU, T. Copper transporter ATP7A (copper-transporting P-Type ATPase/Menkes ATPase) limits vascular inflammation and aortic aneurysm development: role of MicroRNA-125b. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** 2019.
184. 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.
185. TASIĆ, N.M.; TASIĆ, D.; OTAŠEVIĆ, P.; VESELINOVIĆ, M.; JAKOVLJEVIĆ, V.; et al. Copper and zinc concentrations in atherosclerotic plaque and serum in relation to lipid metabolism in patients with carotid atherosclerosis. **Vojnosanit Pregl.** 2015.
186. TORRES-FUENTES, C.; ALAIZ, M.; VIOQUE, J. Chickpea chelating peptides inhibit copper-mediated lipid peroxidation. *J. Sci. Food Agric.* 2014.
187. TSAO, H.S.; ALLISTER, L.; CHIBA, T.; BARKLEY, J.; GOLDMAN, R.H. A Case Report of Cake Frosting as a Source of Copper Toxicity in a Pediatric Patient. **Clin Pract Cases Emerg Med.** 2020.
188. TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2011.
189. TURNLUND, J. R. Human whole-body copper metabolism, **American Journal of Clinical Nutrition.** 1998.

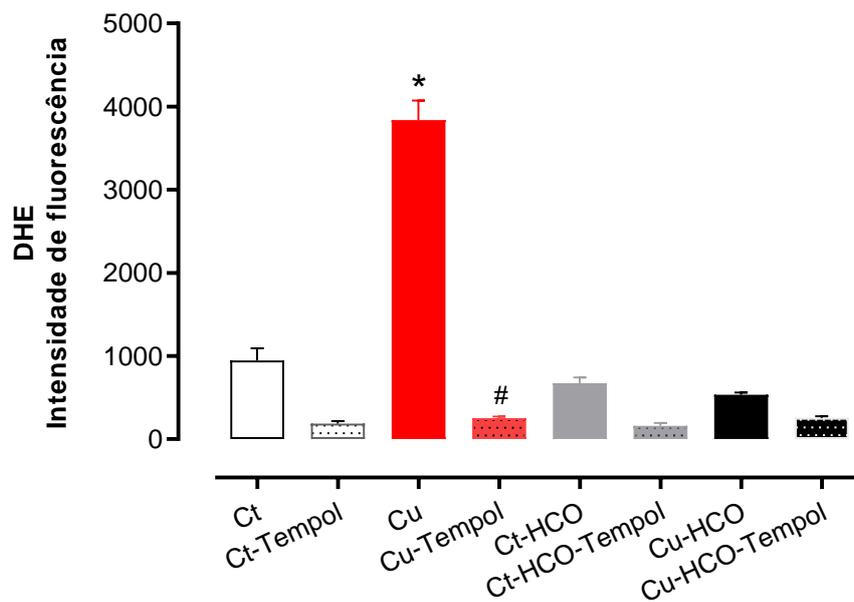
190. UAUY, R.; MAASS, A.; ARAYA, M. Estimating risk from copper excess in human populations. **Am J Clin Nutr.** 2008.
191. VASHCHENKO, G.; MAC GILLIVRAY, R.T. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. **Nutrients.** 2013.
192. VASSALLO, D.V.; LIMA, E.Q.; CAMPAGNARO, P.; STEFANON, I.; et al. Effects of isoproterenol on the mechanical activity of isolated papillary muscles and perfused rat hearts in various calcium concentrations. **Pharmacology Research.** 1994.
193. VASSALLO, D.V.; MILL, J.G. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. **Acta Physiologica Pharmacologica latinoamericana.** 1988.
194. VASSALLO, D.V.; OLIVEIRA, E.M.; STEFANON, I. Contratilidade Miocárdica. In: Aires MM, Fisiologia. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan.** 2008.
195. VERSCHUREN, P. M. Functional foods: scientific and global perspectives. **British Journal of Nutrition.** 2002.
196. VIDAL, A. M.; DIAS, D. O.; MARTINS, E. S. O.; OLIVEIRA, R. S.; NASCIMENTO, R. M. S.; CORREIA, M. G. S. A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. **Ciências Biológicas e da Saúde.** 2012.
197. WALDEMARIN, K.C.A.; ALVES, R.N.; BELETTI, M.E.; RANTIN, F.T.; et al. Copper sulfate affects Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cardiomyocytes structure and contractile function. **Ecotoxicology.** 2012.

198. WANG, C.; WANG, C.; LI, B.; LI, H. Zn(II) chelating with peptides found in sesame protein hydrolysates: identification of the binding sites of complexes. **Food Chem.** 2014.
199. WANG, W.; GONZALEZ, D. E.; MEJIA, E. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.** 2005.
200. WHO. World Health Organization. Cardiovascular Diseases. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> . 2016.
201. WHO. World Health Organization. Copper in Drinking-Water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. 2004.
202. WU, Q.; LUO, F.; WANG, X.L; LIN, Q.; LIU, G.Q. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide: an emerging candidate for vascular dysfunction therapy. **Crit Rev Biotechnol.** 2021.
203. YANG, H. Y.; YANG, S. C.; CHEN, S. T.; CHEN, J. R. Soy protein hydrolysate ameliorates cardiovascular remodeling in rats with L-NAME-induced hypertension. **J Nutr Biochem.** 2008.
204. YAO, J.; HU, P.; ZHANG, D. Associations Between Copper and Zinc and Risk of Hypertension in US Adults. **Biol Trace Elem Res.** 2018.
205. YAZDI, M.; ASOODEH, A.; CHAMANI, J. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. **Journal of Functional Foods.** 2012.
206. YU, B.; MENG, F.; YANG Y.; LIU D.; SHI K. NOX2 Antisense Attenuates Hypoxia-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Cardiomyocyte. **Int J Med Sci.** 2016.

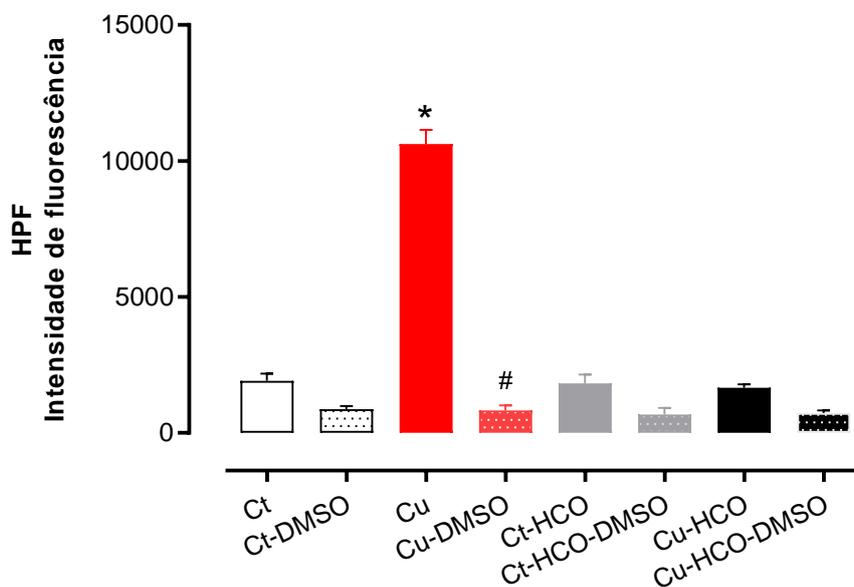
207. YU, Z.W.; ZHAO, J.; LIU, J.; LU, F.C. A novel angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide from egg white protein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2011.
208. YUNUS, E.U. et al. Determination of lead, copper and iron in cosmetics, water, soil and food using polyhydroxybutyrate-B-polydimethyl siloxane preconcentration and flame atomic absorption spectroscopy. **Anal Lett**. 2015.
209. ZENEZINI, C.R.; CAPRIOTTI, A.L.; CAVALIERE, C.; BARBERA, G.; et al. Purification and identification of endogenous antioxidant and ACE-inhibitory peptides from donkey milk by multidimensional liquid chromatography and nanoHPLC-high resolution mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**. 2016
210. ZHANG, Z.; WEICHENTHAL, S.; KWONG, J.C.; BURNETT, R.T.; et al. Long-term exposure to iron and copper in fine particulate air pollution and their combined impact on reactive oxygen species concentration in lung fluid: a population-based cohort study of cardiovascular disease incidence and mortality in Toronto, Canada. **International Journal of Epidemiology**. 2021.
211. ZHENG, L.; HAN, P.; LIU, J.; LI, R.; YIN, W.; et al. Role of Copper in Regression of Cardiac Hypertrophy. **Pharmacol Ther**. 2015.
212. ZOU, T. B.; HE, T. P.; LI, H. B.; TANG, H. W.; et al. The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. **Molecules**. 2016.
213. ZOU, Y.; FENG, W.; WANG, W.; CHEN, Y.; ZHOU, Z.; LI, Q.; ZHAO, T.; MAO, G.; WU, X.; YANG, L. Protective Effect of Porcine Cerebral Hydrolysate Peptides on Learning and Memory Deficits and Oxidative Stress in Lead-Exposed Mice. **Biol. Trace Elem. Res**. 2015.

ANEXO**ANEXO I - AVALIAÇÃO “*IN SITU*” DA FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVES NA PRESENÇA DE TEMPOL E DMSO**

C



D



Anexo I: Avaliação *in situ* da formação de radicais livres após 4 semanas de exposição ao cobre (0,14 mg/Kg/dia) e/ou peptídeos hidrolisados da clara do ovo (HCO) após a incubação com Tempol e DMSO. Os painéis superiores (A e B) mostram microfotografias fluorescentes representativas de segmentos de músculo papilar marcadas com dihidroethidio (DHE, em vermelho) ou hidroxifenil fluoresceína (HPF, em verde). Os painéis medianos mostram microfotografias fluorescentes representativas de núcleos de músculo papilar marcadas com DAPI. Os painéis inferiores mostram as sobreposições das microfotografias. A análise

quantitativa de $O_2^{\cdot-}$ após a incubação com Tempol (em C) e OH^{\cdot} após a incubação com DMSO (em D) estão demonstradas no gráfico de barras. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. *P < 0,05 vs. Ct, #P < 0,05 vs Cu. ANOVA duas vias seguida pelo pós teste Bonferroni.

ANEXO II - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CEUA-UFES



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada *Efeitos do tratamento crônico com cobre e a ação anti-estresse oxidativo de peptídeos da clara de ovo sobre função cardíaca de ratos*

Registrada sob o n.º 26/2018

sob a responsabilidade de **MAYLLA RONACHER SIMÕES**

que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.167 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia 05 de outubro de 2018

Vigência da autorização: outubro/2018 a agosto/2022

Finalidade: Pesquisa

Espécie(s): Rato (*Rattus norvegicus*)

Linhagem(ns)/raça(s): Wistar

Peso: 250 gramas

Idade: 12 semanas

Sexo: Macho

Número de animais: 100

Origem: Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória-ES, 05 de outubro de 2018

Breno S. Salgado
Breno Souza Salgado

Coordenador da CEUA-Ufes

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Avenida Marechal Campos, 1468 – Marujipe – Vitória/ES – CEP 29043-910 - Telefone: (27) 3335-7026 – ceua@ufes.br – www.ceua.ufes.br

ANEXO III - AUTORIZAÇÃO DO USO DE FIGURAS DE ARTIGOS



Home



Help ▾



Email Support



Filipe Filetti ▾



Copper and homocysteine in cardiovascular diseases

Author: Y. James Kang

Publication: Pharmacology & Therapeutics

Publisher: Elsevier

Date: March 2011

Copyright © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Mr. Filipe Filetti ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5314270651122

[Printable Details](#)

License date May 22, 2022

Licensed Content

Order Details

Licensed Content Publisher	Elsevier	Type of Use Portion	reuse in a thesis/dissertation figures/tables/illustrations
Licensed Content Publication	Pharmacology & Therapeutics	Number of figures/tables/illustrations	1
Licensed Content Title	Copper and homocysteine in cardiovascular diseases	Format	electronic
Licensed Content Author	Y. James Kang	Are you the author of this Elsevier article?	No
Licensed Content Date	Mar 1, 2011	Will you be translating?	Yes, without English rights
Licensed Content Volume	129	Number of languages	1
Licensed Content Issue	3		
Licensed Content Pages	11		

About Your Work		Additional Data	
Title	EFEITO DO CONSUMO DE HIDROLISADO DE CLARA DE OVO SOBRE AS ALTERAÇÕES CARDÍACAS PROMOVIDAS PELA EXPOSIÇÃO AO CLORETO DE COBRE (CuCl ₂) EM RATOS	Portions	Fig. 1. Cu metabolism and inter-organ transport.
Institution name	Universidade Federal do Espírito Santo	Specific Languages	Português
Expected presentation date	May 2022		
Requestor Location		Tax Details	
Requestor Location	Mr. Filipe Filetti Rua José Celso Claudio, 170 Jardim Camburi	Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
	Vitória, Espírito Santo 29010010 Brazil Attn: Mr. Filipe Filetti		
\$ Price			
Total	0.00 USD		
		Total: 0.00 USD	
CLOSE WINDOW		ORDER MORE	