

**A exposição aguda a alta concentração de cobre prejudica a
contratilidade miocárdica: participação das espécies reativas de oxigênio**

Filipe Martinuzo Filetti

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Fisiologia Cardiovascular

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, 2018

**A exposição aguda a alta concentração de cobre prejudica a
contratilidade miocárdica: participação das espécies reativas de oxigênio**

Filipe Martinuzo Filetti

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Aprovado em ___ / ___ / 2018

Profª. Drª. Maylla Ronacher Simões – Orientadora, PPGCF-UFES

Prof. Dr. Dalton Valentim Vassallo – Coorientador, PPGCF-UFES

Prof. Dr. Leonardo dos Santos, PPGCF-UFES

Profª. Drª. Mirian Fioresi, PPGEF- UFES

Coordenadora do PPGCF: Profª.Drª. Sônia Alves Gouvêa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória, 2018

Filetti, Filipe Martinuzo 1993

A exposição aguda a alta concentração de cobre prejudica a contratilidade miocárdica: participação das espécies reativas de oxigênio

[Vitória, 2018]

___ p, 29,7 cm, (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2018)

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo.

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

1.Cobre 2.Músculos Papilares 3.Contratilidade Miocárdica 4.Estresse Oxidativo
5.ATPase miosínica.

“Não vale a pena mergulhar nos sonhos e esquecer de viver.”

Alvo Dumbledore

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **Deus** pelo dom da vida, pela minha sabedoria, pela minha saúde e pelas pessoas incríveis que colocou em meu caminho até aqui.

Aos **meus pais** por todo o apoio que sempre me deram, por me incentivarem a ser uma pessoa cada vez melhor, e um profissional capacitado. Agradeço também por nunca me deixarem faltar nada, e por serem pessoas a quem eu sempre posso recorrer quando precisar. Obrigado pela amizade e amor de vocês.

Aos **meus irmãos**, pelo companheirismo e por estarem ao meu lado durante toda a vida.

Aos **meus avós**, por serem exemplos de pessoas fortes, responsáveis e batalhadoras, em especial a minha avó Luzia que nos deixou durante esse trajeto, mas que de uma forma ou de outra, sempre estará conosco. Aos meus tios, tias, primos e primas, agradeço por serem essa família tão alegre e brincalhona e por sempre podermos contar uns com os outros.

Aos meus amigos da vida, que estiveram presentes em meu dia a dia durante o decorrer de todo esse processo, sem dúvidas vocês fazem da minha vida muito mais alegre e divertida, por disso agradeço a **Monizze Mendes, Marcelo Santana, Carol Guimarães, Júlio Valadares, Kamila Martinuzo, Esteven Colodette, Lays Nakamura, Victor Moreira, Mateus Barbosa e Daiane Cruz.**

Agradeço imensamente a professora do curso de graduação em enfermagem da UFES, professora **Mirian Fiorese** por todas as oportunidades que me abriu e principalmente por ter despertado em mim o interesse pela ciência. Obrigado por

ter me apresentado ao professor Dalton Vassallo e ao LEMC, este mestrado não teria sido o mesmo se não fosse por você.

Ao professor **Dalton Vassallo** por ser esse chefe tão generoso, tão dedicado e tão amigo de seus alunos. Sou grato por ter me acolhido em sua equipe e em seu laboratório, por ter me ensinado a técnica e por todas as vezes que eu tive alguma dúvida sobre meus resultados e você de imediato mostrou algum de seus trabalhos nos quais havia encontrado resultados semelhantes. Devo te agradecer também por sua vida dedicada à pesquisa e a este programa de pós-graduação, com o qual você pode ter certeza de que contribuiu e ainda irá contribuir para a formação de muitas pessoas.

Agradeço a você, professora **Maylla Simões**, ou melhor, **May**, minha orientadora. Obrigado por ter se dedicado tanto ao desenvolvimento do meu trabalho, por ter me dado prazos difíceis de serem cumpridos, mas que graças a eles hoje posso finalizar este mestrado com tranquilidade, e também por ter se empenhado para que eu realizasse uma pesquisa tão ampla. Obrigado por ser essa orientadora tão presente, tão exigente, tão amiga, tão compreensiva e tão competente com o seu trabalho. Serei muito honrado de poder falar para os futuros alunos que fui seu primeiro aluno de mestrado.

Agradeço à **Rose** por ser sempre muito solícita, por cuidar para que não nos falte material e nem recursos, e pela gentileza com que trata não só a mim e também aos meus colegas.

Agradeço aos professores do LEMC: **Alessandra**, **Ivanita** e **Leonardo** pelas suas competências e por cuidarem tão bem do nosso laboratório.

Agradeço à **Marito e Renata** pelo ensinamento da técnica do papilar, e por terem sido tão atenciosos comigo quando tudo dava errado no começo. Renata, obrigado também pela paciência em me ensinar o trabalhoso protocolo da ATPase miosínica. Aos colegas do LEMC, obrigado pela amizade de cada um de vocês, pelas conversas, pelas risadas e pelos drinks que por vezes saímos para tomar: **Bia, Camilla, Cindy, Cleydi, Dieli, Elis, Emilly, Evellyn, Felipe, Gérsica, Gilson, Gustavo, Grazi, Ingrid, João, Karol, Paloma, Patrícia, Priscila, Rakel, Sabrina, Susana, Tati, Thiago Lopes e Thiago Oliveira.**

Agradeço ao **Anderson** por todas as vezes que preparou soluções nutritivas e realizou diluição de fármacos, pela ajuda nos cálculos de concentração, e também por todas as conversas que tivemos e café que tomamos. Anderson, você é sem dúvidas uma pessoa muito importante para todos nós do laboratório.

Agradeço ao **Rodolpho, Marildo e Amaral** do biotério central por sempre atenderem nossas demandas e nos fornecerem bons animais.

Agradeço a equipe de limpeza da pós-graduação por tornarem mais agradável o nosso ambiente de trabalho.

Agradeço as professoras **Suely e Silvana** por terem me permitido utilizar as centrífugas dos seus laboratórios para a realização da ATPase Miosínica.

Agradeço também à **CAPES** pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. COBRE	15
1.1.1. ASPECTOS GERAIS	15
1.1.2. FONTES DE EXPOSIÇÃO E UTILIZAÇÃO DO COBRE	16
1.1.3. CINÉTICA DO COBRE NO CORPO HUMANO	17
1.1.4. EFEITOS DO COBRE SOBRE O ORGANISMO	20
1.1.5. EFEITOS DO COBRE SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR..	21
1.1.6. COBRE E ESTRESSE OXIDATIVO.....	22
1.2. CONTRATILIDADE MIOCARDICA	25
1.2.1. PROTEÍNAS CONTRÁTEIS	26
1.2.2. ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. OBJETIVO GERAL.	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS.	31
3.2. ANÁLISE DA CONTRATILIDADE MIOCARDICA “IN VITRO”.	31
3.2.1. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	33
3.2.1. 1. PARÂMETROS BASAIS	34

3.2.1. 2. POTENCIAÇÕES PÓS-PAUSAS	36
3.2.1. 3. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CÁLCIO EXTRACELULAR	37
3.2.1. 4. RESPOSTA AO AGONISTA β -ADRENÉRGICO.....	38
3.2.1. 5. CONTRAÇÃO PÓS-REPOUSO DE 10 MINUTOS	39
3.2.1. 6. CONTRAÇÕES TETÂNICAS	40
3.3. AVALIAÇÃO DO EXTRESSE OXIDATIVO NO MIOCARDIO.....	41
3.3.1. PARTICIPAÇÃO DAS EROS NOS EFEITOS AGUDOS DA ALTA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA CONTRATILIDADE MIOCARDICA	41
3.3.2. AVALIAÇÃO “IN SITU” DE $O_2^{\cdot-}$ PELA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE DIHIDROETIDEO	42
3.3.3. AVALIAÇÃO “IN SITU” DE OH^{\cdot} PELA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE HIDROXIFENIL FLUORESCEÍNA	43
3.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ATPASE MIOSÍNICA.....	43
3.5. FÁRMACOS E REAGENTES	45
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4. RESULTADOS	47
4.1. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COBRE NA CONTRATILIDADE DE MÚSCULOS PAPILARES.....	47
4.1.1. POTENCIAÇÃO RELATIVA PÓS-PAUSA	50
4.1.2. RESPOSTA AO CÁLCIO EXTRACELULAR	51
4.1.3. CONTRAÇÃO PÓS-REPOUSO DE 10 MINUTOS	51

4.1.4. RESPOSTA β -ADRENÉRGICA	52
4.1.5. CONTRAÇÕES TETÂNICAS	53
4.2. PAPEL DAS EROS NOS EFEITOS AGUDOS DO COBRE NA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA.....	54
4.2.1. AVALIAÇÃO DAS EROS NA FORÇA DE CONTRAÇÃO, PARÂMETROS TEMPORAIS E DERIVADAS	54
4.2.2. AVALIAÇÃO DAS EROS NA POTENCIAÇÃO RELATIVA PÓS- PAUSA (PPP)	57
4.2.3. AVALIAÇÃO DAS EROS NA RESPOSTA AO CÁLCIO EXTRACELULAR	58
4.2.4. AVALIAÇÃO DAS EROS NA CONTRAÇÃO PÓS-REPOUSO DE 10 MINUTOS	59
4.2.5. AVALIAÇÃO DAS EROS NA RESPOSTA β -ADRENÉRGICA	59
4.2.6. AVALIAÇÃO DAS EROS NAS CONTRAÇÕES TETÂNICAS	60
4.2.7. AVALIAÇÃO "IN SITU" DA FORMAÇÃO DE $O_2^{\cdot-}$ E OH^{\cdot}	61
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ATPASE MIOSÍNICA.....	63
5. DISCUSSÃO	63
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
7. REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO I	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

μg : Micrograma

ATP: trifosfato de adenosina

ATP7A: Enzima transportadora de cobre

ATP7B: Enzima removedora de cobre

CTR1: Transportador de cobre

CAPES: Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

dF/dT: derivada de força / derivada de tempo

DHE: Dihidroetídio

EPM: erro padrão da média

EROS: espécies reativas de oxigênio

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

HPF: hidroxifenil fluoresceína

i. p: intra peritoneal

L_{max}: comprimento no qual a tensão é máxima

M: molar

mg: miligramas

mL: mililitro

mM: milimolar

ms: milissegundos

NCX: trocador sódio/cálcio

O₂^{•-}: Ânion superóxido

OH[•]: Radical hidroxila

PPP: potenciação pós-pausa

PRC: *post-rest contraction*

RS: retículo sarcoplasmático

RyR: Receptor de Rianodina

SERCA: Cálcio-atpase do Retículo Sarcoplasmático

SOD= superóxido dismutase

TA: tempo de ativação

TR90%: tempo de relaxamento de 90%

UI: unidade internacional

RESUMO

O cobre é um oligoelemento essencial para a homeostase e o funcionamento dos organismos vivo, mas que em excesso pode provocar efeitos prejudiciais sistêmicos. A toxicidade do cobre pode estar relacionada com a produção das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), levando a ocorrência de doenças cardiovasculares. Objetivamos avaliar os efeitos da alta concentração de cobre (10 µg/mL) na atividade contrátil cardíaca, investigando os possíveis efeitos mediados pelas EROs. A força de contração desenvolvida pelos músculos papilares foi reduzida após exposição aguda a alta concentração de cobre e prevenida pela co-incubação com tempol, DMSO e catalase. A avaliação indireta do retículo sarcoplasmático (RS) foi deprimida pela exposição ao cobre e restaurada pelo tempol. A resposta contrátil ao cálcio extracelular foi reduzida pelo cobre e revertida após a co-incubação com os agentes antioxidantes. A resposta ao agonista β-adrenérgico diminuiu após a exposição ao cobre e foi restaurada pela co-incubação com tempol e catalase. As contrações dependentes do influxo sarcolemal de cálcio foram prejudicadas pelo cobre e restauradas pelos antioxidantes. Além disso, a detecção “in situ” nos músculos papilares mostrou aumento de $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} . A atividade da ATPase miosínica diminuiu significativamente. Em conclusão, a alta concentração de cobre pode prejudicar o acoplamento excitação-contração cardíaco, reduzindo a capacidade de geração força, a redução do influxo de cálcio, da atividade do RS e da ATPase miosínica, sendo esses efeitos mediados pelo aumento da produção local de $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} e H_2O_2 . Esses efeitos tóxicos sugerem que a exposição a alta concentração de cobre é um possível fator de risco para as doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Cobre; músculos papilares; contratilidade miocárdica; estresse oxidativo; ATPase miosínica.

ABSTRACT

Copper is an essential metal for homeostasis and the functioning of living organisms, but in overload can lead to systemic harmful effects. Copper toxicity can be related to reactive oxygen species (ROS) production and cardiovascular diseases. We testing the effects of high copper concentration (10 $\mu\text{g/mL}$) on the myocardial mechanics, investigating the ROS-mediated effects. The developed force of papillary muscles was reduced after acute exposure to high copper and prevented by co-incubation with tempol, DMSO and catalase. The indirect evaluation of sarcoplasmic reticulum activity was reduced by copper and restored by tempol. The contractile response to calcium was reduced by copper and reversed by antioxidants. The response to β -adrenergic agonist decreased after exposure to copper and restored by tempol and catalase. Contractions dependent on the sarcolemmal calcium influx were impaired by copper and restored by antioxidants. In addition, *in situ* detection in papillary muscles showed increased $\text{O}_2^{\cdot-}$ and OH^{\cdot} . The myosin-ATPase activity decreased significantly. In conclusion, high copper concentration can acutely impair myocardial excitation-contraction coupling reducing the capacity to generate force, by reducing calcium inflow and of its reuptake, myosin-ATPase activity, and these effects are mediate by local production of $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} and H_2O_2 . These toxicity effects suggest that exposure to high copper concentration is a risk factor for cardiovascular disease.

Keywords: Copper; papillary muscles; myocardial contractility; oxidative stress; myosin-ATPase.

1. INTRODUÇÃO

1.1. COBRE

1.1.1. ASPECTOS GERAIS

O cobre é um elemento químico de número atômico 29 (29 prótons e 29 elétrons) e de massa atômica 63,54 u (RIBEIRO, 2001). À temperatura ambiente o cobre encontra-se no estado sólido. Ele é classificado como metal de transição pertencente ao grupo 11 (1B) da Classificação Periódica dos Elementos. Além disso o cobre é considerado um metal nobre como o ouro e a prata (BARCELOUX, 1999).

O nome cobre deriva do termo "*aes cyprium*" - minério de Chypre (Chipre) -, mais tarde conhecido como "*cuprum*", palavra latina que deu origem ao símbolo químico *Cu* (RIBEIRO, 2001). O elemento químico cobre é um metal de cor avermelhada, brilho metálico, maleável, ótimo condutor de calor e eletricidade (MOURA, 2001; OLIVEIRA, 2014). Apresenta elevada resistência à tensão física e à corrosão (MOURA, 2001; OLIVEIRA, 2014). Possui propriedade não magnética e forma ligas com outros metais (SILVA, 2007).

O cobre é um dos metais mais antigos utilizados pela civilização humana, datando seus primeiros usos desde 8.000 anos A.C. (McHENRY, 1992). Sua importância na história da humanidade marcou uma época denominada "Idade do Bronze", onde utilizava liga de cobre e estanho. O cobre era usado inicialmente para substituir a pedra como ferramenta de trabalho e na confecção de armas e objeto de decoração (BRASIL, 2016). Durante a Idade Média o cobre também teve sua importância representando a riqueza e o poder (LE GOFF, 2014; RIBEIRO, 2001). O cobre alcançou sua real dimensão como metal

imprescindível para o desenvolvimento industrial em 1831, quando Faraday descobriu o gerador eléctrico (BRASIL, 2016). Na atualidade, o cobre mantém sua relevância para o homem, graças às suas características que lhe conferem diversidade de aplicações no desenvolvimento tecnológico industrial como na confecção de veículos, geladeiras, tubulações, fios de transmissão elétrica, painéis, talheres, entre outros (BARCELOUX, 1999; BRASIL, 2016; RIBEIRO, 2001).

1.1.2. FONTES DE EXPOSIÇÃO E UTILIZAÇÃO DO COBRE

O cobre é o terceiro metal mais usado, atrás do ferro e do alumínio (BARCELOUX, 1999). A obtenção do cobre ocorre através da mineração que é o processo de extração do cobre do meio ambiente e pode ser realizada em minas a céu aberto, subterrâneas ou de forma mista (RIBEIRO, 2001). A partir daí o cobre é utilizado para diferentes finalidades nos seguintes setores da atividade humana. Na indústria elétrica e eletrônica é utilizado na forma de fios de transmissão de energia (SAFRA, 2011) e na fabricação de equipamentos elétricos e eletrônicos (RIBEIRO, 2001). Na engenharia industrial, para serviços de válvulas, tubos e chapas para trocadores de calor, refrigeradores e condicionadores de ar, etc. (PROCOBRE, 2016). Na construção civil, em instalações hidráulicas, metais sanitários, fechaduras, ferragens, etc (PROCOBRE, 2016; RIBEIRO, 2001).

O referido metal também tem papel importante nas indústrias de transportes. Na Indústria automobilística ele é utilizado na produção de radiadores, carburadores, partes elétricas do veículo, etc (RIBEIRO, 2001). Na indústria naval, em hélices de propulsão, tintas anti-corrosivas para proteção dos cascos

dos navios e em diversos equipamentos (RIBEIRO, 2001). Na indústria aeronáutica, nos aparelhos de telecomunicações, mancais de trens de pouso. Na indústria ferroviária, em cabos condutores aéreos para estradas de ferro eletrificadas, motores e outros equipamentos (RIBEIRO, 2001).

Outros usos do cobre, incluem a produção de moedas, a fabricação de armas e munições, embalagens, indústria química, de equipamentos e produtos agrícolas, pesticida e fungicida (PROCOBRE, 2016; RIBEIRO, 2001).

Além das atividades de mineração e industrial, a exposição humana ao cobre pode acontecer de outras formas na natureza. Na atmosfera, a emissão de cobre acontece a partir de fontes como poeiras das minas de cobre transportadas pelo vento, por vulcões, e por incêndios florestais. A utilização de pesticidas a base de cobre pela agricultura pode contaminar o solo, a água e os alimentos (BARCELOUX, 1999).

1.1.3. CINÉTICA DO COBRE NO CORPO HUMANO

O principal meio de obtenção do cobre pelos seres humanos ocorre através da alimentação (BOST et al., 2016), e apesar do cobre ser reconhecido como um elemento essencial para o funcionamento do organismo, não há um consenso quanto a referência dos valores de ingestão diária recomendada. Nos Estados Unidos e no Canadá é de 0,9 mg/dia, com um nível tolerável de 10 mg/dia para adultos de 19 anos ou mais (TRUMBO et al., 2001). No Brasil, a ANVISA também recomenda um consumo diário de 0,9 mg/dia de cobre, mas não estabelece um limite tolerável para a ingestão deste metal (ANVISA, 2004).

Após a entrada do cobre no organismo, a absorção acontecerá principalmente no duodeno. Em concentrações normais de cobre, a enzima ATP7A é a responsável por absorver este íon no intestino e promover sua ligação a albumina, e então ele é transportado através da circulação porta hepática para o fígado, onde é incorporado a ceruloplasmina (DOWDY, 1969; LEBRE et al., 2005; MONTY et al., 2005). O excesso é secretado através da bile para o trato gastrointestinal por ação do exportador de cobre ATP7B (BARCELOUX, 1999).

A concentração habitual de cobre no plasma humano é entre 0,3-2,1 µg/mL para a ingestão de 1,4 a 2,0 mg de cobre/dia (ARNAL et al., 2010). Estudos populacionais mostraram que a concentração de cobre em indivíduos saudáveis é de aproximadamente 1 µg/mL (ZHANG et al., 1990; ROCHA et al., 2016).

A distribuição de cobre para os tecidos é realizada principalmente pela ceruloplasmina (90-95%), e em menor grau pela albumina (5-10%), pela transcupreína e por outros aminoácidos ligadores de cobre (BARCELOUX, 1999; BLUNDELL, 2003; LINZ; LUTSENKO, 2007; PUNKIT; BHAVE, 2002). Seus principais destinos são o fígado, o cérebro, os rins, os músculos, o coração e os glóbulos vermelhos no sangue (DOWDY, 1969).

Na membrana plasmática e em vesículas intracelulares, o transportador CTR1 desempenha um papel fundamental no influxo de cobre nas células dos órgãos alvos (DE FEO et al., 2009; WEE et al., 2013). Após a entrada de cobre nas células, ele se liga a chaperonas citosólicas que, em seguida, transferem o cobre para os destinos celulares específicos (LEARY et al., 2009; WERNIMONT et al., 2004).

A bile é a via de excreção normal, desempenhando um papel fundamental na homeostase do cobre, a excreção renal é mínima (BOST et al, 2016; HARVEY et al, 2005; LIU et al, 2001).

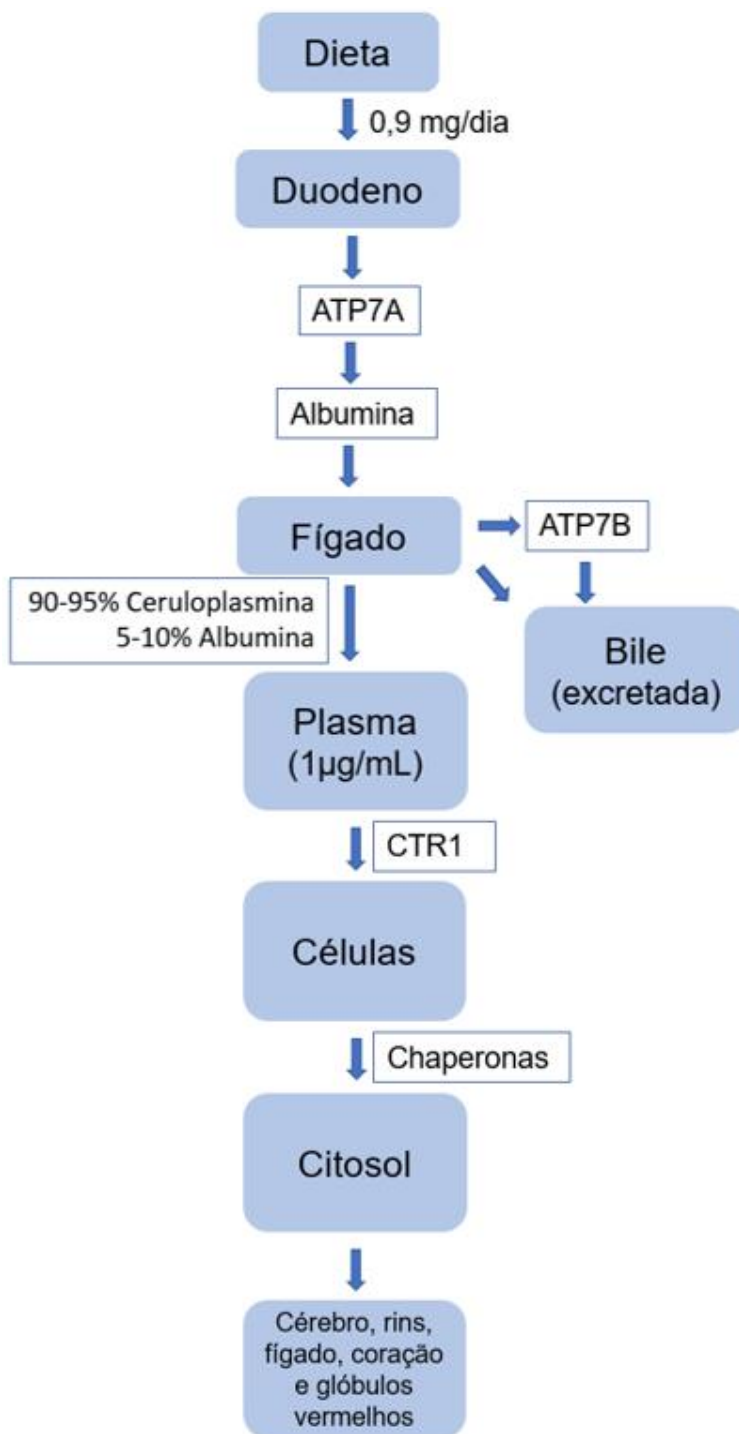


Figura 1: Ciclo do cobre no organismo. Caixas azuis representam os destinos do cobre; caixas brancas representam as proteínas/enzimas carreadoras. Fonte: O autor (2018).

1.1.4. EFEITOS DO COBRE SOBRE O ORGANISMO

O cobre tem funções sistêmicas específicas por ser constituinte de enzimas com atividade de oxirredução, como a cobre-zinco superóxido dismutase, que protege as células dos efeitos tóxicos no metabolismo do oxigênio, a lisil oxidase, que catalisa a formação do colágeno e elastina, a citocromo-c oxidase, necessária para o transporte de elétrons durante a respiração aeróbica mitocondrial, e a ceruloplasmina, que é essencial para absorção e transporte de ferro necessário para a síntese de hemoglobina, entre outras (COZZOLINO, 2007).

Além disso, o cobre possui papel essencial no desenvolvimento e manutenção dos ossos, dos tendões, do tecido conjuntivo e do sistema vascular, pois ele é um cofator da lisil oxidase, enzima envolvida na formação das ligações cruzadas do colágeno (VASHCHENKO; MAC GILLIVRAY, 2013; NIEVES, 2005). O cobre ainda atua na formação da mielina, visto que ela é formada por fosfolipídios, cuja a síntese depende da enzima citocromo-C oxidase (VASHCHENKO; MAC GILLIVRAY, 2013).

Entretanto, o excesso de cobre, em doses acima de 250 mg/dia, provoca efeitos tóxicos sistêmicos no organismo (STEIN et al., 1976): no sistema gastrointestinal ele causa náuseas, queimação epigástrica, vômito de cor verde azulada e diarreia (COLE; LIRENMAN, 1978). Na pele ocorrem depósitos de cobre na forma de manchas esverdeadas, irritação e alergias (BURNETT, 1989). No sistema urinário, o cobre promove danos no túbulo proximal, anúria e oligúria (BARCELOUX, 1999). No sistema respiratório, a inalação do cobre pode perfurar

o septo nasal (COHEN, 1974), e nos pulmões o cobre leva a irritação da mucosa (ASKERGRENN; MELLGREN, 1975).

Aliás, o fumo de materiais que contém cobre gera cefaleia, mal-estar, garganta seca, febre e mialgias (ARMSTRONG et al., 1983); outros efeitos do cobre incluem letargia, coma, arritmias cardíacas, depressão do sistema nervoso central e câncer (COLE; LIRENMAN 1978; SCHWARTZ; SCHIMIDT, 1986).

1.1.5. EFEITOS DO COBRE SOBRE O SISTEMA CARDIOVASCULAR

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo (WHO, 2016), e a exposição a substâncias tóxicas como o excesso de cobre e outros metais, podem contribuir para o aparecimento e agravamento destas doenças.

Os estudos anteriores mostram que a sobrecarga de cobre está relacionada a causa de prejuízos funcionais no sistema cardiovascular (SINGH et al., 1985; KOK et al., 1988; KOSAR et al., 2006). Avaliou-se a relação entre a sobrecarga sérica de cobre e a ocorrência de doenças cardiovasculares como a angina, a insuficiência cardíaca (IC) e o infarto agudo do miocárdio (IAM). Para isso foram coletadas amostras de sangue de pacientes internados por estas causas, e para nível de comparação, amostras de sangue de indivíduos saudáveis também foram obtidas. Então, detectou-se que os indivíduos portadores de IC e IAM apresentavam maior concentração sérica de cobre em relação a aqueles considerados saudáveis. Foi sugerido que a alta concentração de cobre no sangue pode estar relacionada a ocorrência destas doenças.

Buscando determinar se a exposição ambiental ao cobre é capaz de induzir alterações na função ventricular, Waldemarin et al. (2011), realizaram a exposição de peixes da espécie Tilápia do Nilo em água contendo 1 mg/L^{-1} de sulfato de cobre (CuSO_4) durante 96 horas, enquanto os controles foram mantidos em água sem adição de cobre. Após este período os pesquisadores observaram edema celular e mitocondrial cardíacos, além da redução da força de contração, do tempo de contração e das derivadas temporais de força nas tiras de ventrículos dos peixes do grupo exposto ao cobre.

Em outro estudo sobre os efeitos cardiovasculares do cobre, Nunes et al. (2018), investigaram se uma concentração elevada deste metal poderia influenciar agudamente a reatividade vascular. Para isso, foi feita a incubação de anéis de aorta de ratos Wistar em solução contendo $10 \text{ } \mu\text{g/mL}$ de cloreto de cobre (CuCl_2), sendo esta uma concentração dez vezes superior àquela tida como comum em indivíduos saudáveis. Os autores notaram prejuízos na resposta contrátil dos anéis de aorta, e relacionaram essas alterações ao aumento do estresse oxidativo vascular e ao aumento da produção de óxido nítrico.

Todavia, até este momento são escassos os estudos que buscam investigar os efeitos fisiológicos da alta concentração de cobre no sistema cardiovascular com ênfase nos mecanismos envolvidos diretamente na atividade contrátil miocárdica.

1.1.6. COBRE E ESTRESSE OXIDATIVO

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são moléculas ou átomos extremamente reativos, produzidos a partir de reações oxirredução, seja, da

perda ou ganho de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992). No organismo, estão envolvidos em inúmeros processos fisiológicos, embora em excesso atuem prejudicialmente gerando injúrias celulares tais como peroxidação dos lipídios de membrana na membrana celular, danos em proteínas e no DNA (BARREIROS et al., 2006; CELI, 2010; OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010).

A formação das EROs ocorre normalmente em todos os tecidos, como consequência do metabolismo aeróbio que geralmente forma os intermediários reativos: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

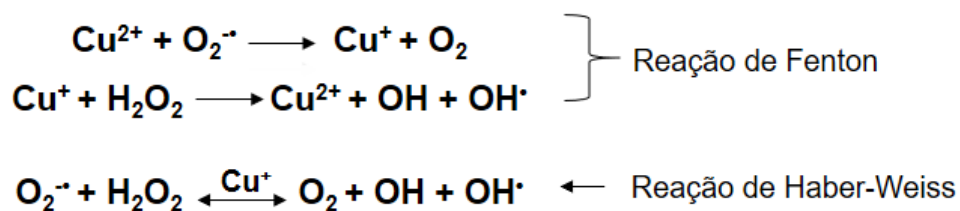
Nos miócitos cardíacos a NADPH oxidase gera $O_2^{\cdot-}$, por meio de sua isoforma NOX2, através da transferência de elétrons do NADPH intracelular na membrana plasmática, acoplando-os ao oxigênio molecular, formando o $O_2^{\cdot-}$, um radical livre bastante reativo (MOLLNAU et al., 2005; PROSSER, et al., 2011). As mitocôndrias geram o $O_2^{\cdot-}$ através da cadeia de transferência de elétrons (IDE et al., 2000). Neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos também podem produzir o $O_2^{\cdot-}$ no interior de fagossomas para atuar na degradação de bactérias e fungos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). O $O_2^{\cdot-}$ é capaz de interagir com um grande número de moléculas gerando OH^{\cdot} e H_2O_2 diretamente ou através de processos catalisados por enzimas ou metais (BARREIROS et al., 2006).

O OH^{\cdot} é considerado a mais reativa das EROs pois os organismos não possuem nenhum agente antioxidante endógeno capaz de neutralizar suas ações. Além disso, ele é capaz de reagir rapidamente com moléculas químicas ou metais presentes no local em que foi gerado. Portanto, se o OH^{\cdot} for gerado próximo ao

DNA, ele pode provocar alterações nas bases púricas e pirimídicas, levando à modificação e/ou inutilização do DNA. Além do mais, o OH^\bullet é capaz de provocar a inativação de várias proteínas estruturais, enzimas e dos componentes da membrana celular (GAZIANO et al., 2012; LANCASTER, 1996).

Já o H_2O_2 não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio altamente tóxico, pois atua como intermediário na reação que produz o radical OH^\bullet (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Ele é gerado a partir da dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ pela superóxido dismutase, tem vida longa e é capaz de penetrar as membranas biológicas, e assim reagir com proteínas (EATON, 1991; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O cobre leva a gênese das EROs a partir das reações químicas de Fenton e de Haber-Weiss (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998), sendo que a reação de Fenton ocorre entre o H_2O_2 e íons cúpricos estimulando a formação de radicais livres. A reação de Haber-Weiss gera radicais hidroxilas através da interação entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , enquanto o cobre atua participando como um catalisador deste processo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998; SAMUNI, 1981; URBAŃSKI; BERESEWICZ, 2000).



(HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1998)

É importante ressaltar que o organismo dispõe de mecanismos antioxidantes naturais que possuem o papel de impedir a formação ou de eliminar essas

substâncias tóxicas (HALLIWELL, 1987). Assim, o efeito prejudicial ocorre quando os radicais livres são produzidos em quantidade excessiva, extrapolando a capacidade dos mecanismos antioxidantes, produzindo assim o que chamamos estresse oxidativo. Dentre os mecanismos enzimáticos da defesa antioxidante endógenos, podemos destacar as enzimas: superóxido-dismutase, a catalase e a glutaciona-peroxidase (HALLIWELL, 1987; SAMUNI et al, 1981).

A superóxido dismutase (SOD) é a enzima mais abundante no organismo humano e importante defesa antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986). Nos humanos são encontradas 3 formas: uma citoplasmática, uma mitocondrial e uma no líquido extracelular, sendo que a primeira e a terceira estão ligadas ao cobre e zinco (Cu/Zn SOD) e a segunda contém manganês no seu centro reativo (Mn-SOD). Além da SOD, o organismo também tem importante atuação das enzimas catalase e glutaciona-peroxidase, ambas atuantes na degradação do H_2O_2 . Enquanto a catalase transforma H_2O_2 em H_2O e O_2 , a glutaciona peroxidase utiliza o H_2O_2 para transformar a glutaciona reduzida (GSH) em glutaciona oxidada (GSSG) (CAI, 2005).

Diante do exposto há uma carência de estudos que mostram os efeitos da alta concentração de cobre na contratilidade miocárdica, incluindo os possíveis efeitos mediados pelas EROs.

1.2. CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

Esta pesquisa visa avaliar os efeitos causados pela exposição aguda a alta concentração de cobre na contratilidade de músculos papilares de ventrículo esquerdo. Para isso, é importante realizar uma breve revisão sobre o

acoplamento excitação-contração cardíaca e proteínas envolvidas neste processo.

1.2.1. PROTEÍNAS CONTRATEIS

A eficiência da contração é dependente de três tipos de proteínas: as proteínas contráteis (actina e miosina), as proteínas moduladoras do coração (troponina e tropomiosina) e as proteínas estruturais (VASSALLO et al., 2008).

A miosina é formada por duas cadeias entrelaçadas que termina em uma região globular, essa associação forma o filamento grosso da célula muscular. Quando hidrolisada, a molécula de miosina se divide em duas partes: uma parte leve chamada meromiosina leve, que é formada pela grande cauda da miosina, e uma parte pesada chamada meromiosina pesada, região globular da miosina (AIRES, 2012).

A cadeia pesada constitui a ATPase miosínica, e as cadeias leves modulam a sua função, pois sua remoção causa a perda da função de hidrólise de ATP (VASSALLO et al., 2008).

Por sua vez, os filamentos finos são compostos por três proteínas: a actina, a tropomiosina e a troponina. A actina apresenta sítios ativos capazes de interagir com a miosina, e durante essa interação a ATPase miosínica é ativada, fazendo a hidrólise do ATP liberando assim a energia necessária para que a contração ocorra. A tropomiosina é uma proteína alongada que durante o repouso mantém o sítio de interação actina-miosina bloqueada. A troponina é formada pelas subunidades I (TnI), C (TnC) e T (TnT). Quando a TnI interage com a tropomiosina, ela provoca a inibição do sítio ativo da actina. A TnC possui grande

afinidade pelo íon cálcio. Já a TnT, se liga à tropomiosina quando o cálcio interage com a troponina (VASSALLO et al., 2008).

Existem outras proteínas no citoesqueleto celular que sustentam a estrutura do sarcômero. Elas interligam as miofibrilas e a linha Z, além de prenderem as miofibrilas aos receptores de integrina, na membrana celular.

1.2.2. ACOPLAMENTO EXCITAÇÃO-CONTRAÇÃO

O conjunto de processos envolvidos entre a estimulação elétrica dos cardiomiócitos, até a contração e o relaxamento cardíaco é chamado de acoplamento excitação-contração, e para que isto ocorra a presença do íon cálcio é essencial (BERS, 2002).

Durante o potencial de ação das células cardíacas, ocorre o influxo de cálcio para a célula por meio dos canais de cálcio do tipo L. A entrada de cálcio através do sarcolema provoca a liberação de cálcio dependente de cálcio do Retículo Sarcoplasmático (RS), através dos canais de rianodina. Combinados, o influxo de cálcio e a liberação do cálcio reticular geram o aumento da concentração de cálcio intracelular, promovendo a ligação do cálcio na TnC para que o processo contrátil aconteça.

Para que o relaxamento celular ocorra é necessário que a concentração mioplasmática de cálcio seja reduzida, e assim o cálcio se desprenda da TnC. Quatro mecanismos são responsáveis por esta redução incluindo: a bomba de cálcio do RS (também chamada de SERCA, ou Ca^{2+} -ATPase do RS), a Ca^{2+} -ATPase do sarcolema, o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ do sarcolema (NCX) e o uniporte mitocondrial. A SERCA e a Ca^{2+} -ATPase do sarcolema são dois sistemas de

transporte ativo, eles estão localizados nas membranas do RS ou do sarcolema e removem o cálcio do sarcolema no sentido oposto ao seu gradiente de concentração. O NCX está situado no sarcolema e faz a troca do íon cálcio pelo íon sódio, com a estequiometria de 3 sódios para cada cálcio. Por fim, as mitocôndrias retêm pequena parte do cálcio em seu interior, o qual só é liberado muito lentamente, possuindo pouca importância no coração normal, mas possuindo significância em casos de falência miocárdica (AIRES, 2012).

A Figura 2 ilustra estes mecanismos envolvidos no ciclo do cálcio durante o processo contrátil do miócito cardíaco.

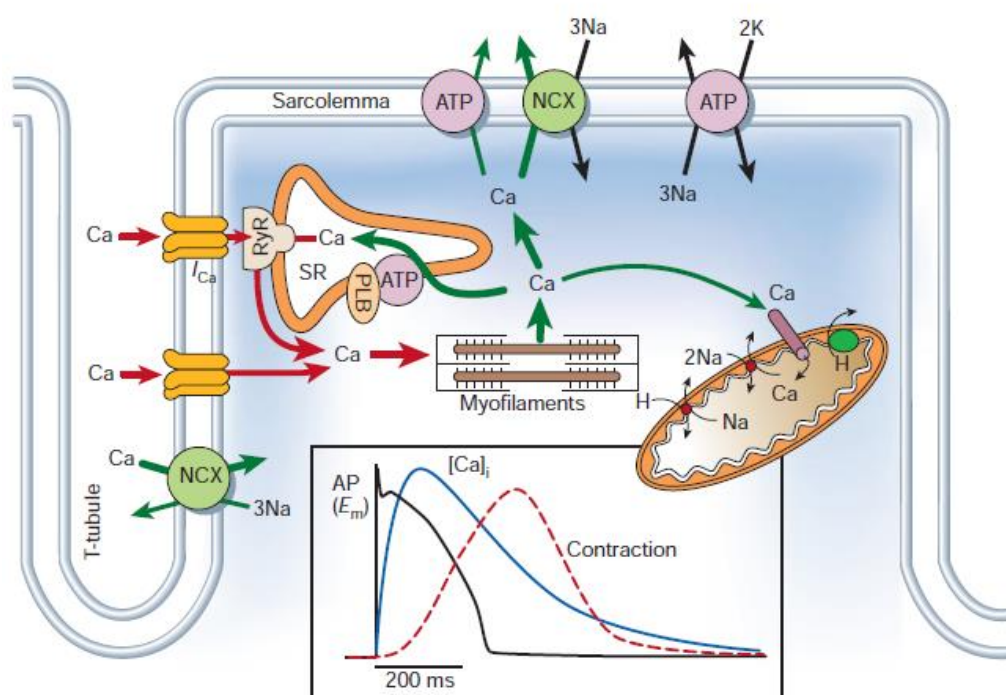


Figura 2: Transporte de cálcio nos miócitos ventriculares. Destaque para o curso temporal do potencial de ação, o transiente de cálcio e a contração, mensurados em miócitos ventriculares de coelhos a 37°C. NCX: trocador Na⁺/Ca²⁺ do sarcolema; PLB: fosfolambam; SR: retículo sarcoplasmático. Fonte: Bers, 2002.

A estimulação simpática também exerce efeito na contratilidade cardíaca. A noradrenalina se liga a receptores β -adrenérgicos acoplados à proteína G, formando o AMPc pela ação da enzima adenilato ciclase. O AMPc atua ativando a proteína cinase A (PKA), que fosforila os canais para cálcio e aumenta o influxo através da membrana. Além disso, a PKA fosforila o receptor de rianodina (RyR) aumentando a probabilidade de abertura e liberação de cálcio do RS, além de fosforilar o fosfolamban (PLB) deixando de inibir a SERCA, recaptando o cálcio para o RS (BERS, 2002).

A Figura 3 ilustra os mecanismos envolvidos na estimulação β -adrenérgica durante o processo contrátil do miócito cardíaco.

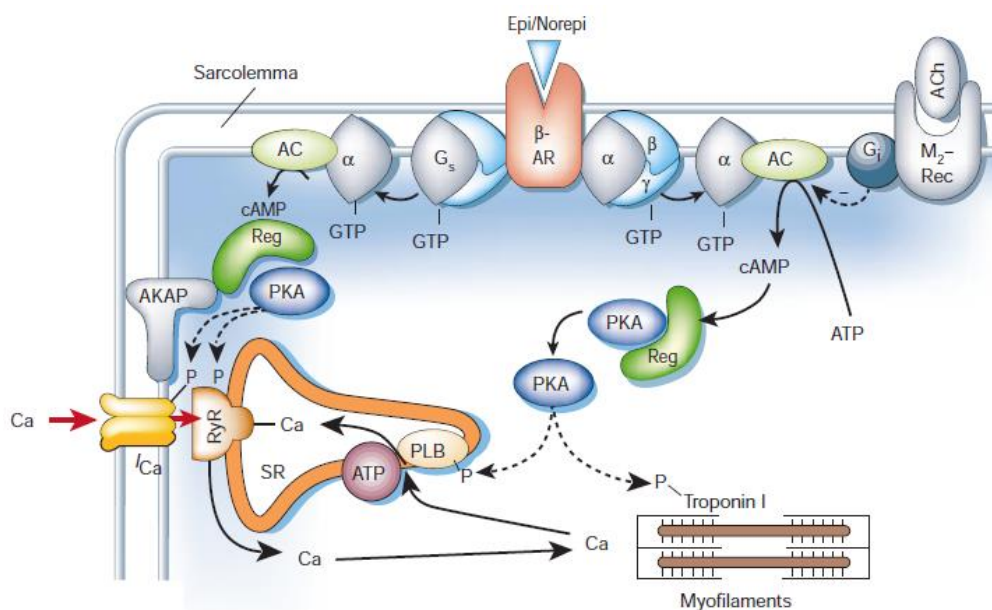


Figura 3: Ativação e fosforilação do receptor β -adrenérgico e alvos relevantes para o acoplamento excitação-contracção. AC: adenilato ciclase; ACh: acetilcolina; AKAP: uma base de quinase proteína; β -AR: β -adrenérgico receptor; M2-Rec: M2-muscarínico receptor; PLB: fosfolamban; Reg: subunidade reguladora PKA; SR: retículo sarcoplasmático. Fonte: Bers, 2002.

Como o cobre é um elemento essencial ao organismo, e também é um catalisador de EROs, seus efeitos podem ser mediados pelo estabelecimento do estresse oxidativo, podendo alterar diferentes mecanismos do processo de contração cardíaca. Além disso, há uma carência de estudos que investigam os mecanismos fisiológicos pelos quais a alta concentração de cobre acarreta danos no aparelho cardiovascular. Baseado nisto, a hipótese deste trabalho é que a exposição aguda a alta concentração de cobre é capaz de comprometer a contratilidade de músculo papilar de ratos, através da formação das EROS, agindo sobre diferentes pontos do acoplamento excitação-contração.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar se a alta concentração de cobre promove prejuízo na contratilidade miocárdica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o inotropismo cardíaco e os parâmetros temporais da contração de músculos papilares do VE expostos agudamente ao cloreto de cobre.
2. Investigar os mecanismos reguladores da contratilidade miocárdica prejudicados pela exposição ao cobre.
3. Avaliar a participação das EROS nas alterações induzidas por alta concentração de cobre na contratilidade de músculos papilares.
4. Avaliar os efeitos agudos da alta concentração de cobre na atividade da ATPase miosínica do músculo cardíaco.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso de 250 a 300 g e aproximadamente 9 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, em 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 (2013). Nossos protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFES (CEUA 050/2015).

3.2. ANÁLISE DA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA “*IN VITRO*”

Os animais foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), via intraperitoneal. 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, pH = 7,4. A parede do ventrículo direito foi separada 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, aerada com solução gasosa

(95% de O₂ e 5% de CO₂) 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). 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.

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 dianteadas novas condições experimentais.

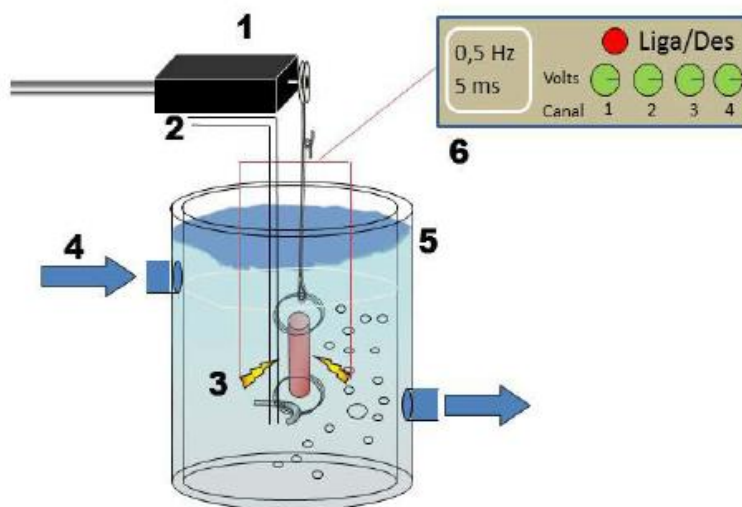


Figura 4: Sistema de avaliação contrátil de músculos papilares de ventrículo esquerdo. 1: transdutor de força, 2: sistema de aeração com mistura carbogênica, 3: eletrodos, 4: banho, 5: cuba, 6: estimulador. Adaptado de RIVAROLI (2011).

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.

3.2.1. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Nosso protocolo experimental envolveu avaliação dos músculos papilares em situação controle, e em seguida foram novamente avaliados após a exposição aguda a 10 $\mu\text{g/mL}$ de CuCl_2 . Devido ao elevado tempo necessário para concluir o protocolo de análise da contratilidade antes e após a exposição ao metal, o protocolo experimental foi fragmentado em duas etapas. Cumpre destacar que cada etapa foi estruturada com um diferente músculo papilar. Assim, os protocolos foram organizados da seguinte forma:

Etapa 01: Parâmetros basais (força de contração, tensão de repouso, tempos de ativação e relaxamento e derivadas), potenciação pós-pausa, resposta contrátil ao cálcio extracelular, e resposta ao agonista β -adrenérgico.

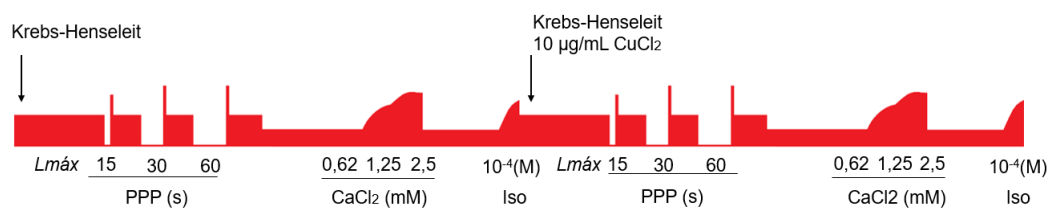


Figura 05: Esquema representativo dos protocolos realizados na primeira etapa da avaliação de músculos papilares, antes e após a exposição ao cobre. $L_{máx}$: estiramento no qual a força desenvolvida é máxima; PPP: potenciação pós-pausa; Iso: Isoproterenol.

Fonte: O autor (2018).

Etapa 02: Parâmetros basais (força de contração, tensão de repouso, tempos de ativação e relaxamento e derivadas), contração pós-reposo e contrações tetânicas.

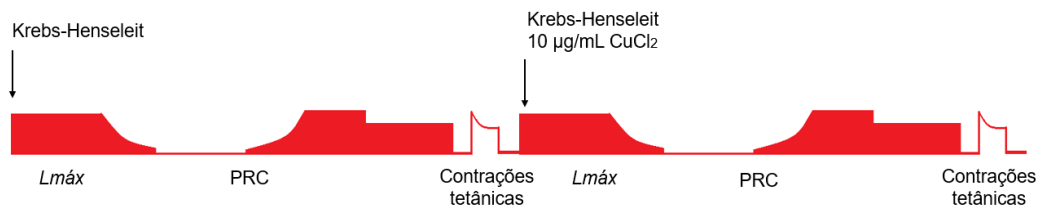


Figura 06: Esquema representativo dos protocolos realizados na segunda etapa da avaliação de músculos papilares, antes e após a exposição ao cobre. *Lmáx*: estiramento no qual a força desenvolvida é máxima; *PRC*: *post rest-contraction*. Fonte: O autor (2018).

Para assegurar que as alterações encontradas foram decorrentes da exposição aguda a alta concentração de cobre, foram feitos controles temporais de todos os parâmetros avaliados.

3.2.1.1. PARÂMETROS BASAIS

Para avaliar possíveis efeitos induzidos pela alta concentração de cobre na contratilidade de músculos papilares de VE foram analisados os seguintes parâmetros, antes e após 60 minutos de exposição ao metal:

- **Força de contração:** Após 60 minutos de estabilização a força de contração foi mensurada. A força de contração está expressa em gramas de força desenvolvida por miligramas de peso de músculo.

- **Tensão de repouso:** tensão desenvolvida pelo músculo durante o repouso. Também está expressa em gramas de força por miligramas de peso de músculo.
- **Tempo de ativação (TA):** Tempo (em milissegundos) para atingir o pico da força de contração, como parâmetro temporal de ativação da contração.
- **Tempo de 90% de relaxamento (TR90%):** Tempo (em milissegundos) decorrido para a força decrescer 90% de seu valor máximo desenvolvido, como parâmetro temporal de capacidade de relaxamento.

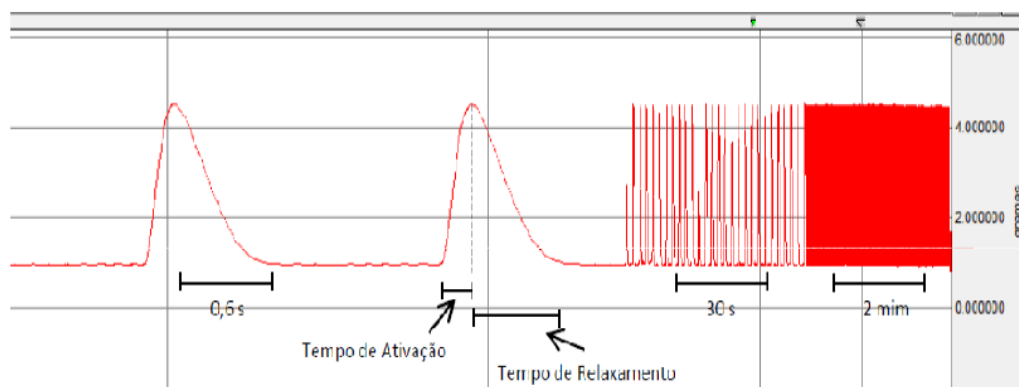


Figura 7: Registro típico de força de contração de músculos papilares do VE de ratos Wistar evidenciando os parâmetros temporais da contração. O pico da deflexão positiva corresponde a força desenvolvida. Adaptado de FIORESI (2011).

- **dF/dT:** Taxa de variação da força de contração em função do tempo. Foi 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.

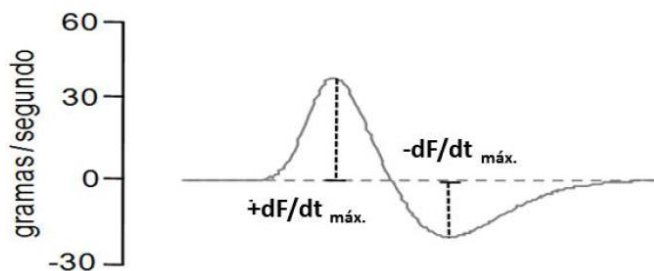


Figura 8: Registro típico de dF/dT máximas positivas e negativas. Adaptado de ÁVILA (2016).

3.2.1.2. POTENCIAÇÕES PÓS-PAUSAS

O protocolo das potenciações pós-pausas foi realizado após 60 minutos de estabilização em solução contendo 1,25 mM de cálcio. Esta manobra 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.

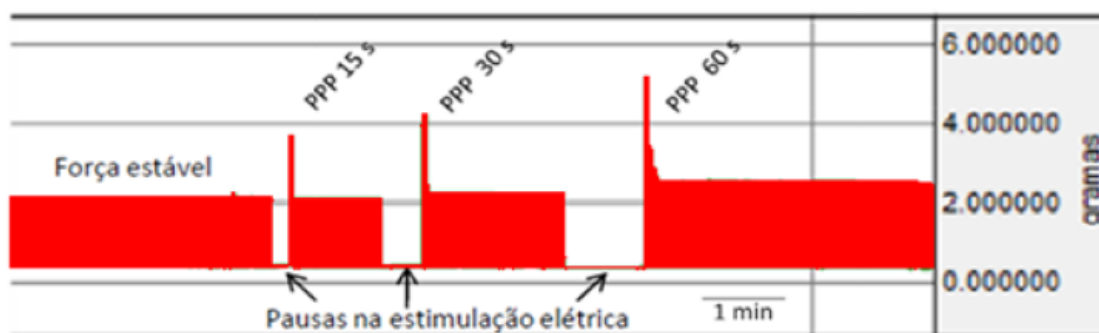


Figura 9: Registro típico de PPP de músculos papilares de VE de ratos Wistar obtidas com a reestimulação elétrica após pausas de 15, 30 e 60 segundos no estímulo elétrico aplicado no músculo. Adaptado de FIORESI (2011).

3.2.1.3. RESPOSTA CONTRÁTIL AO CÁLCIO EXTRACELULAR

Para avaliar se a exposição aguda a alta concentração de cobre poderia alterar a resposta inotrópica ao cálcio foi realizada a avaliação da resposta ao cálcio extracelular. A solução nutritora foi trocada para uma solução contendo metade da concentração de cálcio (0,62mM) até que as contrações se estabilizassem, e então foram acrescentadas concentrações crescentes de cloreto de cálcio. Em seguida este protocolo foi repetido, porém a solução nutritora contendo 0,62 mM de cálcio estava acrescida de 10 µg/mL de cloreto de cobre. Esta resposta foi avaliada pela amplitude máxima de força contrátil estabilizada em cada concentração de cálcio (0,62, 1,25 e 2,5 mM) no banho dos músculos papilares. A variação de força foi corrigida pelo peso dos músculos e expressa em g/mg.

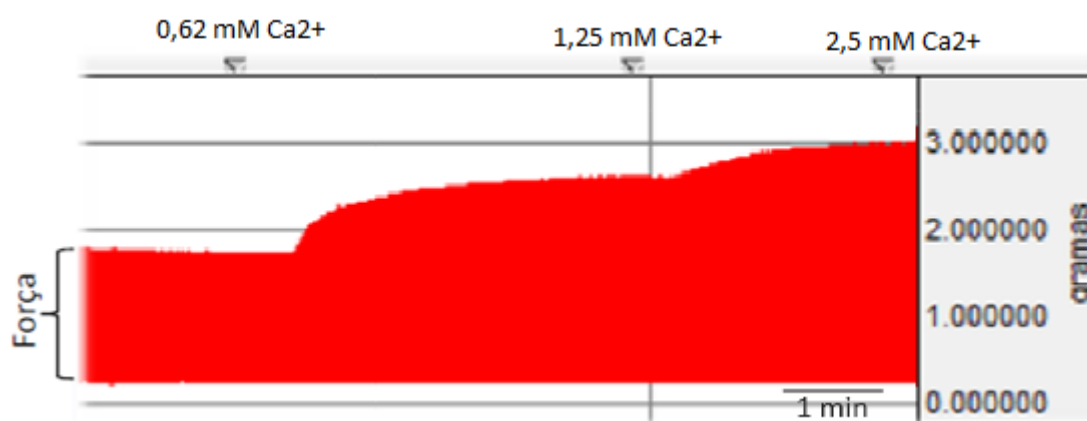


Figura 10: Registro típico da resposta do aumento de força contrátil frente a mudanças na concentração de cálcio extracelular obtida em preparação de músculos papilares de VE de ratos. Adaptado de FIORESI (2011).

3.2.1.4. CONTRAÇÃO PÓS-REPOUSO DE 10 MINUTOS

Essa manobra visa avaliar o influxo de cálcio através do sarcolema e as possíveis alterações causadas pela exposição aguda a alta concentração de cobre neste mecanismo. Para isso, utilizou-se a solução de Krebs previamente descrita, porém livre de cálcio (*cálcio free*) e acrescida de 10 mM de cafeína na solução. Este procedimento permite depletar todo o conteúdo de cálcio do RS.

Na concentração utilizada, a cafeína se liga aos receptores de rianodina (RyR) e depleta os estoques intracelulares de cálcio (BASSANI et al., 1994; LEITE et al., 1995).

Os músculos foram lavados, por três vezes, com solução livre de cálcio até que as contrações fossem abolidas (RINGER, 1883). Em seguida o estímulo elétrico foi desligado por 10 minutos. Dois minutos antes de religar o estimulador, as preparações foram reperfundidas com solução de Krebs-Henseleit contendo 1,25 mM de cálcio. Assim, pode-se inferir que a contração pós-reposo de 10 minutos é totalmente dependente do influxo de cálcio do meio extracelular, visto que os estoques intracelulares haviam sido depletados. Para a avaliação dos efeitos agudos da alta concentração de cobre na “*post-rest contraction*” esta intervenção foi novamente avaliada dessa vez com a adição de 10 µg/mL de CuCl₂ às soluções nutritoras utilizadas.

As contrações obtidas após o repouso de 10 minutos foram calculadas como a porcentagem da primeira contração após a pausa, em relação a amplitude de contração em condição estabilizada anterior a pausa.

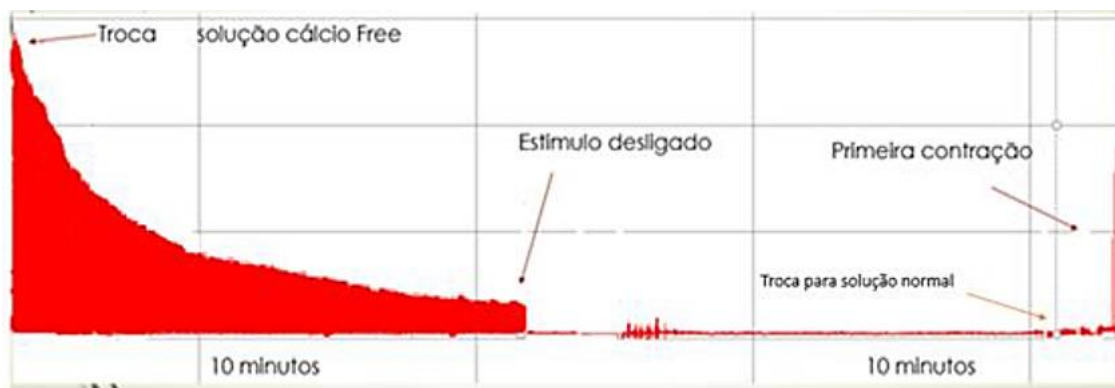


Figura 11: Registro típico de uma “*post-rest contraction*” em preparação de músculos papilares de VE de ratos. Adaptado de SILVA (2014).

3.2.1.5. RESPOSTA AO AGONISTA β -ADRENÉRGICO

Para avaliar os efeitos da exposição aguda a alta concentração de cobre 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), e para a avaliação dos efeitos da alta concentração de cobre na resposta β -adrenérgica, esta manobra foi refeita na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ de CuCl_2 . A resposta inotrópica foi calculada como a razão entre a amplitude máxima de força na presença do Isoproterenol e a amplitude de força estabilizada anterior ao Isoproterenol.

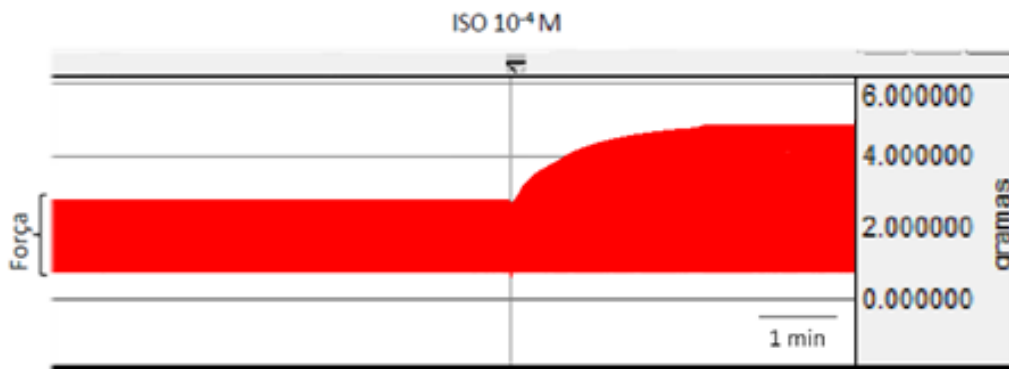


Figura 12: Registro típico da resposta β -adrenérgica em preparação de músculos papilares de VE de ratos após a administração de uma dose de Isoproterenol. Fonte: O autor (2018).

3.2.1.6. CONTRAÇÕES TETÂNICAS

As contrações tetânicas permitem investigar 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), e para a avaliação dos efeitos da alta concentração de cobre nos mecanismos envolvidos nas contrações tetânicas, este protocolo foi repetido com a adição de 10 μ g/mL de CuCl_2 à solução nutritora.

As forças desenvolvidas durante o pico e o platô das contrações foram corrigidas pelo peso dos músculos papilares.



Figura 13: 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).

3.3. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO MIOCARDÍO

3.3.1. PARTICIPAÇÃO DAS EROS NOS EFEITOS AGUDOS DE ALTA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA CONTRATILIDADE DO MÚSCULO PAPILAR

Para avaliar a participação das EROS nas alterações contráteis induzidas pela exposição aguda a alta concentração de cobre, os protocolos descritos anteriormente foram refeitos frente a co-incubação de cobre e dos seguintes antioxidantes durante 60 minutos.

1. Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) 100 μ M: mimético da enzima superóxido dismutase (SOD).
2. DMSO (dimethylsulfoxide) 100mM: varredor de OH^{\bullet} (ESPARZA et al., 2015; FRANCO et al., 2007);
3. Catalase 30 U/mL: enzima que converte o H_2O_2 em H_2O e O_2 .

3.3.2. AVALIAÇÃO “IN SITU” DE $O_2^{\cdot-}$ PELA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA DE DIHIDROETIDEO

A fim de confirmar que a alta concentração de cobre é capaz catalisar a formação de EROs, especificamente o $O_2^{\cdot-}$, foi utilizada a técnica de fluorescência produzida pela oxidação do dihidroetideo (DHE) conforme descrito por Marques et al., (2015). 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.

Após a realização da avaliação da contratilidade com o músculo isolado, os papilares foram mantidos por 1 h em solução de Krebs-Hepes (em mM: 130 NaCl; 5,6 KCl; 2 CaCl₂; 0,24 MgCl₂; 8,3 HEPES; e, pH 7,4) contendo sacarose a 30%. A seguir, 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 Krebs-HEPES. Em seguida, o Krebs-Hepes foi escorrido e o excesso foi seco. Posteriormente, foi feita a incubação com DHE 2 µM por 30 minutos na estufa, em câmara protegida da luz, à 37°, conforme descrito por Nunes et al., (2014).

As imagens de luminescência foram coletadas em um microscópio de fluorescência invertido, Leica DM 2500, com uma câmera fotográfica Leica DFC 310 FX e com filtro de 568 nm. As mesmas configurações de imagem foram usadas para ambos os grupos experimentais. A quantificação das imagens foi realizada pelo software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

3.3.3. AVALIAÇÃO “IN SITU” DE OH[•] PELA TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA COM HIDROXIFENIL FLUORESCÉINA

A fim de confirmar que a alta concentração de cobre é capaz catalisar a formação de EROs, especificamente o OH[•], foi feita a fluorescência de hidroxifenil fluoresceína (HPF). 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 Krebs-Hepes e mantidos em estufa à 37°C por 30 minutos, em câmara úmida. Em seguida a solução foi escorrida e o excesso foi seco. Então foi feita a incubação com HPF 10 µM por 2 horas em estufa à 37°C, em câmara protegida da luz, conforme descrito por Setsukinai et al., (2003).

As imagens de luminescência foram coletadas em um microscópio de fluorescência invertido Leica DM 2500 conectado a uma câmera fotográfica Leica DFC 310 FX e com filtro de 515 nm. As mesmas configurações de imagem foram usadas para ambos os grupos experimentais. A quantificação das imagens foi realizada pelo software ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

3.4. ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ATPASE MIOSÍNICA “IN VITRO”

Analisamos possíveis efeitos induzidos pelo cobre na atividade da ATPase miosínica através de um ensaio enzimático, conforme proposto por Bremel e Weber (1975).

A miosina foi preparada a partir de homogeneizado de ventrículos. A extração foi realizada em solução tampão (0,3 M KCl em tampão fosfato 0,2M [KH₂PO₄],

pH 6,5). A escolha em utilizar o coração isolado de rato neste protocolo se deu devido a maior disponibilidade de miosina para a avaliação, em relação ao músculo papilar de VE. Após a homogeneização, adicionou-se 14 mL de água para cada grama de tecido de ventrículo, sendo que este volume de água foi adicionado gota a gota. Os resíduos musculares 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.

Em seguida, a atividade da ATPase miosínica foi avaliada pela determinação da liberação de fosfato inorgânico (Pi) partir do ATP (1mM) na presença de 0,6 M de KCl, 50 mM de HEPES, 5 mM CaCl₂, e pH 7. Para avaliar os efeitos agudos provocados pela alta concentração de cobre na atividade da ATPase miosínica, 10 µg/mL de CuCl₂ foram adicionados à solução durante o período de reação de liberação de Pi. Dessa forma, avaliamos as mesmas amostras de ventrículos nas condições de controle e expostas ao cobre. 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.

3.5. FÁRMACOS E REAGENTES

Ácido clorídrico – HCl (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)

Glicose (Vetec)

HEPES (Sigma)

Hidróxido de Sódio (Merck)

Hidróxifenil fluoresceína – HPF (Sigma)

Ketamina (Halmen)

KH₂PO₄ (Merck)

L-isoproterenol (Sigma)

Mobilidato de amônio (Nuclear)

Tempol (Sigma)

Xilazina (J.A. Animal Health)

3.6. ANALÍSE ESTATÍSTICA

Realizamos o teste de normalidade dos dados e todos eles foram considerados normais, seguindo uma distribuição gaussiana.

Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizado Teste *t* de Student pareado para as análises de força de contração, tensão basal, parâmetros temporais, resposta β -adrenérgica, contração pós-reposo, contrações tetânicas e atividade da ATPase miosínica. Foi utilizada ANOVA 2 vias seguida por pós teste de Bonferroni para a avaliação temporal dos efeitos do cobre na força de contração, das potenciações pós-pausa e da resposta ao cálcio extracelular. ANOVA 1 via seguida pelo pós-teste de Fisher foi utilizada para avaliar de força de contração, parâmetros temporais, resposta β -adrenérgica, contração pós-reposo e contrações tetânicas após a co-incubação com antioxidantes. Para a avaliação da intensidade de fluorescência foi utilizado o teste *t* não-pareado. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes. A análise dos dados e a plotagem das figuras foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 6.0 System (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COBRE NA CONTRATILIDADE DE MÚSCULOS PAPILARES

Nossos resultados demonstram que a exposição aguda a alta concentração de cobre promoveu redução da força de contração de modo tempo-dependente. Para assegurar que os resultados encontrados foram decorrentes da exposição aguda a alta concentração de cobre, foram feitos controles temporais de todos os protocolos avaliados, o quais não apresentaram diferença significativa. A Figura 14 mostra os efeitos da exposição aguda a alta concentração de cobre (10 µg/mL) durante 60 min sobre a contratilidade do músculo papilar do VE. A exposição aguda ao metal levou a redução da força contrátil desenvolvida, a partir de 45 min de exposição.

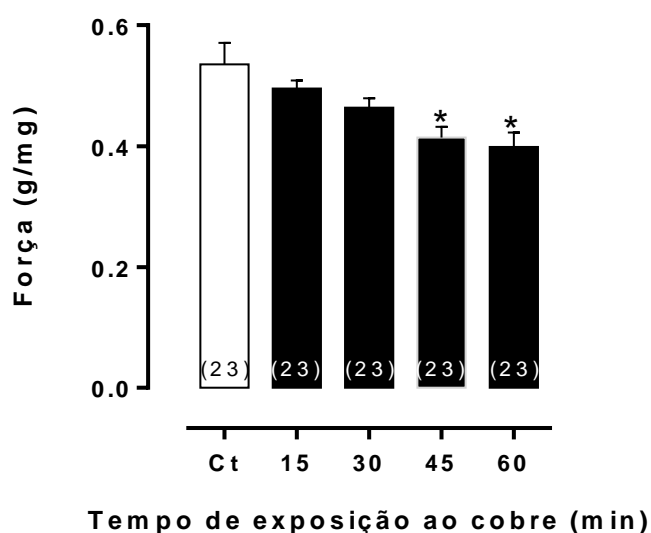


Figura 14: Efeitos da exposição aguda a alta concentração de cobre no desenvolvimento de força de músculos papilares de VE de ratos. Ct: antes da exposição ao metal, Cu: durante 60 min de exposição ao cobre. Os números entre parênteses representam o número de papilares avaliados. *P < 0,05 vs Ct. ANOVA 1 via seguida depós teste de Bonferroni.

Ao final de 60 minutos de exposição a 10 µg/mL de cloreto de cobre, a tensão de repouso, os tempos de ativação (TA) e relaxamento (TR 90%) e as derivadas temporais de força (dF/dT) positiva e negativa das contrações isométricas dos músculos papilares foram mensuradas. A figura 15 nos mostra que a tensão de repouso foi reduzida nos músculos papilares expostos ao cobre em relação aos controles (Ct: $0,119 \pm 0,015$, Cu: $0,084 \pm 0,011$ g/mg). Os tempos de ativação (TA) e de relaxamento (TR90%) foram reduzidos após a exposição aguda a alta concentração de cobre (Figura 16A e B). Da mesma forma, as dF/dT positiva e negativa foram deprimidas após a exposição aguda a alta concentração de cobre (Figura 17A e B).

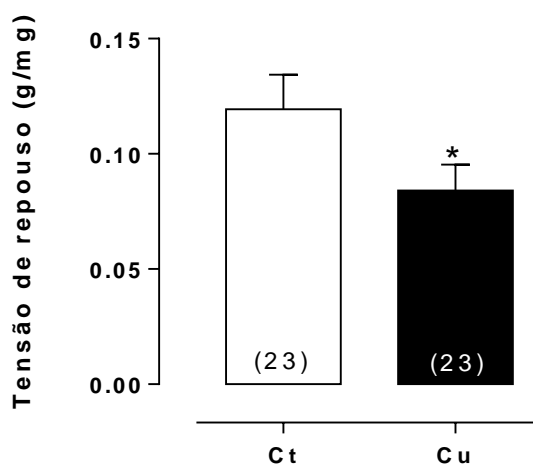


Figura 15: Tensão de repouso exercida por músculos papilares de VE de ratos após 60 minutos de exposição a alta concentração de cobre. Ct: antes da exposição ao metal, Cu: após 60 min de exposição ao cobre. Os números entre parênteses representam o número de papilares avaliados. *P < 0,05 vs Ct. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. Teste *t* pareado.

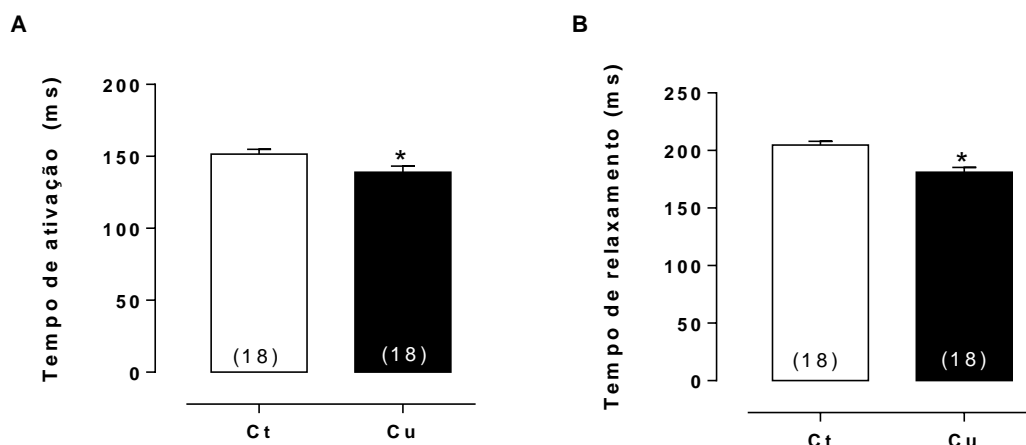


Figura 16: Parâmetros temporais de músculos papilares de VE de ratos após 60 minutos de exposição a alta concentração de cobre. A: Tempo de ativação, B: Tempo de relaxamento. Ct: antes da exposição ao metal, Cu: após 60 min de exposição ao cobre. Os números entre parênteses representam o número de papilares avaliados. * $P < 0,05$ vs Ct. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. Teste t de Student pareado.

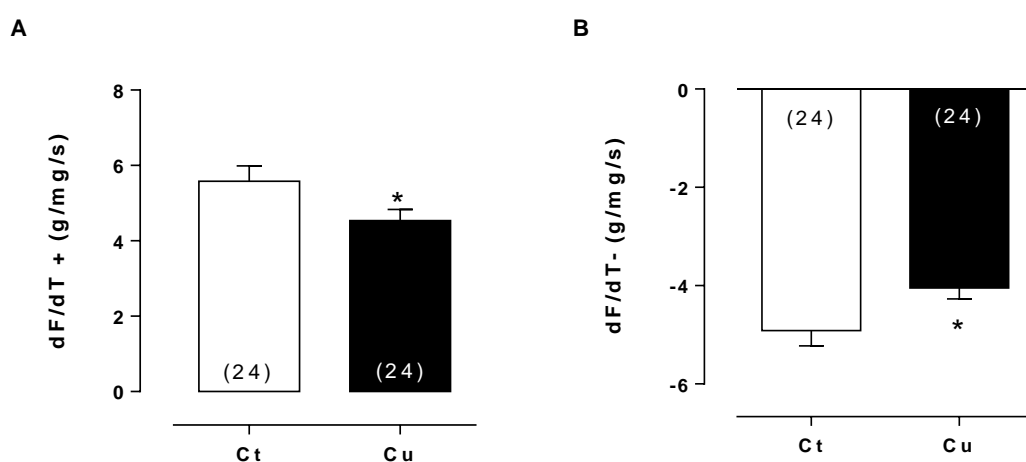


Figura 17: Derivadas temporais da força de contração de músculos papilares de VE de ratos após 60 minutos de exposição a alta concentração de cobre. A: dF/dT máxima positiva, B: dF/dT máxima negativa. Ct: antes da exposição ao metal, Cu: após 60 min de exposição ao cobre. Os números entre parênteses representam o número de papilares avaliados. * $P < 0,05$ vs Ct. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. Teste t de Student pareado.

4.1.1. POTENCIAÇÃO RELATIVA PÓS-PAUSA (PPP)

Após o período de estabilização foram realizadas manobras para avaliar os mecanismos celulares envolvidos na contratilidade dos músculos papilares. A primeira manobra realizada foi a das potenciações pós-pausas programadas de 15, 30 e 60 segundos. Este protocolo permite avaliar, indiretamente, a função do retículo sarcoplasmático (RS).

A Figura 18 ilustra as PPPs obtidas a partir da pausa da estimulação elétrica por 15, 30 e 60 segundos em músculos papilares de ambos os grupos experimentais. Podemos observar que a exposição aguda a alta concentração de cobre prejudicou o funcionamento do retículo sarcoplasmático tendo em vista que as potenciações foram significativamente reduzidas nos músculos papilares após a incubação com 10 $\mu\text{g/mL}$, em relação aos controles.

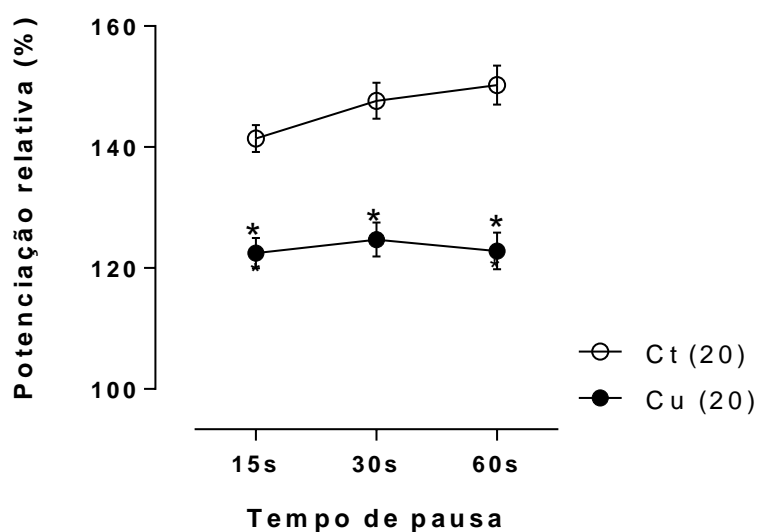


Figura 18: Avaliação das potenciações relativas pós-pausas de 15, 30 e 60 segundos em músculos papilares de VE de ratos. Ct: antes da exposição ao metal, Cu: após 60 min de exposição ao cobre. Os números entre parênteses representam o número de papilares avaliados. *P < 0,05 vs Ct. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida de pós teste de Bonferroni.

4.1.2. RESPOSTA AO CÁLCIO EXTRACELULAR

Outra manobra realizada para avaliar se a exposição aguda a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de cloreto de cobre poderia alterar os mecanismos celulares envolvidos na contratilidade miocárdica consistiu na avaliação da resposta ao cálcio extracelular. A Figura 19 mostra a redução da resposta contrátil dos músculos papilares após a exposição aguda ao cobre, em relação aos controles.

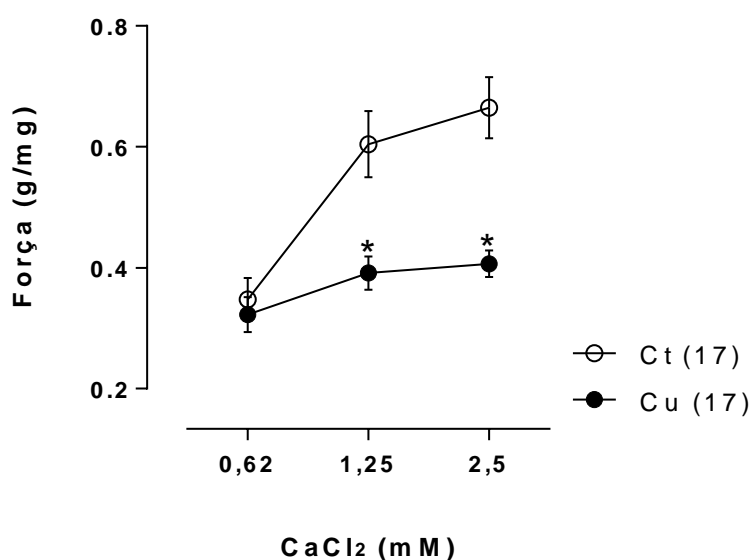


Figura 19: Avaliação da força de músculos papilares de VE de ratos diante de diferentes concentrações de cálcio extracelular. Ct: antes da exposição ao metal, Cu: após 60 min de exposição ao cobre. Os números entre parênteses representam o número de papilares avaliados. * $P < 0,05$ vs Ct para a mesma concentração de cálcio. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. ANOVA duas vias seguida de pós teste de Bonferroni.

4.1.3. CONTRAÇÃO PÓS-REPOUSO DE 10 MINUTOS

As contrações pós-reposo (PRC) de 10 minutos foram obtidas afim de avaliar os efeitos da exposição aguda a alta concentração de cobre no influxo de cálcio

através do sarcolema. A Figura 20 ilustra a redução da PRC nos músculos papilares de VE expostos ao cobre, em relação aos controles. Estes dados são sugestivos de que esteja havendo uma redução no influxo de cálcio transsarcolemal após a exposição ao cobre.

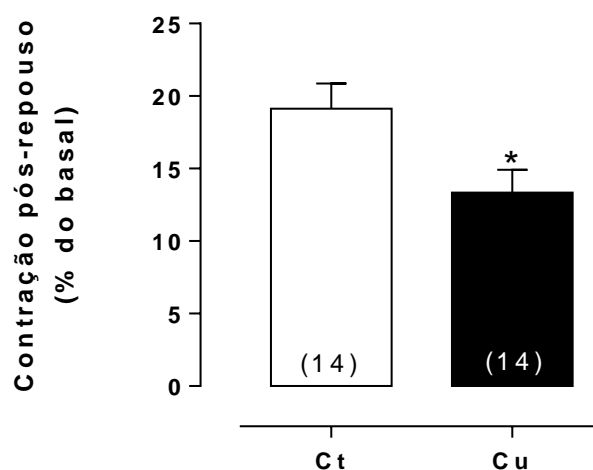


Figura 20: Avaliação indireta do influxo de cálcio através do sarcolema de músculos papilares de VE de ratos. Ct: antes da exposição ao metal, Cu: após 60 min de exposição ao cobre. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. Os números correspondem ao número de papilares estudados. * $P < 0,05$ vs Ct, Teste t de Student pareado.

4.1.4. RESPOSTA β -ADRENÉRGICA

A Figura 21 ilustra a intervenção inotrópica produzida por uma dose do agonista β -adrenérgico Isoproterenol. Após 1 h de exposição ao cobre, o inotropismo cardíaco positivo desencadeado por esta manobra reduziu significativamente em relação aos controles.

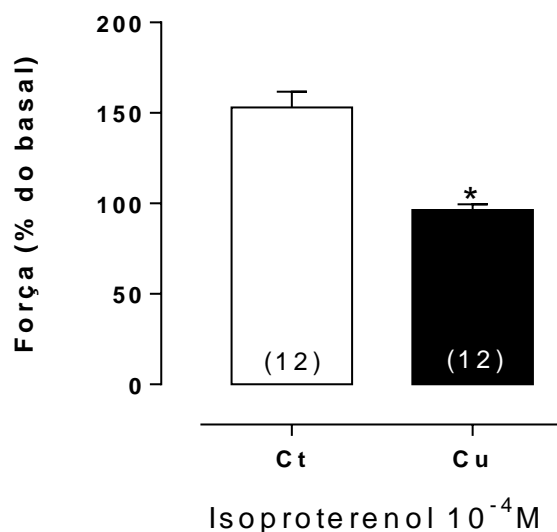


Figura 21: Avaliação da resposta inotrópica promovida pelo Isoproterenol (agonista β -adrenérgico) em músculos papilares de VE de ratos. Ct: antes da exposição ao metal, Cu: após 60 min de exposição ao cobre. * $P < 0,05$ vs Ct. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. Os números correspondem ao número de papilares estudados. Teste *t* de Student pareado.

4.1.5. CONTRAÇÕES TETÂNICAS

As contrações tetânicas foram realizadas com objetivo de avaliar os efeitos da alta concentração de cobre no o influxo de cálcio e na sensibilidade das proteínas contráteis no músculo papilar com o RS disfuncional. Neste protocolo há um rápido aumento de força que corresponde ao pico da contração tetânica, o qual é dependente principalmente do influxo de cálcio no miócito. Após o pico ocorre a diminuição da força de contração havendo a formação de um platô, sendo que este está relacionado com a responsividade das proteínas contrateis ao cálcio. As Figuras 22A e B mostram que houve uma grande redução da força no pico e no platô das contrações tetânicas.

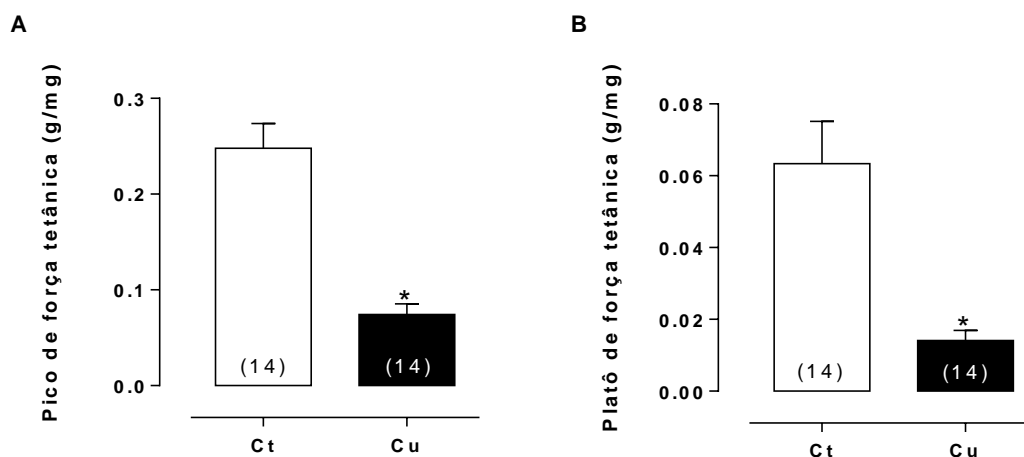


Figura 22: Avaliação das contrações tetânicas em músculos papilares de VE de ratos. A: Pico de força tetânica, B: platô de força tetânica. Ct: antes da exposição ao metal, Cu: após 60 min de exposição ao cobre. * $P < 0,05$ vs Ct. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. Os números correspondem ao número de papilares estudados. Teste t de Student pareado.

4.2. PAPEL DAS EROS NOS EFEITOS AGUDOS DE ALTA CONCENTRAÇÃO DE COBRE NA CONTRATILIDADE MIOCÁRDICA

Sabe-se que o cobre é um íon que participa da formação das EROs (SAMUNI, 1981), por isso, foi investigado a participação destas espécies nos prejuízos contráteis induzidos pelo cobre nos músculos papilares de VE de ratos. Para isso, foram feitas novas preparações de músculo isolado. Eles foram incubados durante 60 min com uma solução de Krebs-Henseleit acrescida de uma concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de CuCl_2 , e co-incubados com tempol (1 mM), DMSO (100 mM), ou catalase (3000 U).

4.2.1. AVALIAÇÃO DAS EROS NA FORÇA DE CONTRAÇÃO, PARÂMETROS TEMPORAIS E DERIVADAS

As Figuras 23 a 25 nos mostram a avaliação dos parâmetros basais após a co-incubação com diferentes agentes antioxidantes. A redução da força de contração induzida pela exposição aguda a alta concentração de cobre foi prevenida pela co-incubação com tempol, DMSO e catalase, conforme mostra a Figura 23. O tempo de ativação (TA) não teve sua diminuição prevenida por nenhum dos antioxidantes testados, enquanto que o tempo de relaxamento (TR90%) foi restaurado após a co-incubação com tempol e catalase (Figuras 24A e B). A dF/dT máxima positiva foi deprimida após a incubação com alta concentração de cobre, porém esse efeito foi abolido quando houve co-incubação com tempo e catalase, enquanto a redução da dF/dT máxima negativa induzida pela alta concentração de cobre foi prevenida pelo tempol (Figura 25A e B).

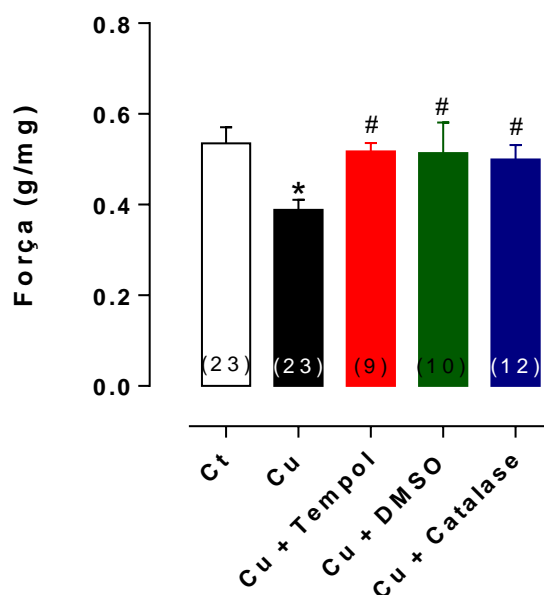


Figura 23: Força de contração de músculos papilares de VE de ratos após 60 minutos de exposição a alta concentração de cobre e na presença de agentes antioxidantes (Tempol-1 mM, DMSO-100 mM e Catalase-3000 U). Ct: controle, Cu: cobre. Os dados são expressos como

Média \pm EPM. *P <0,05 vs. Ct, #P <0,05 vs. Cu. ANOVA uma via seguida de pós teste de Fisher.

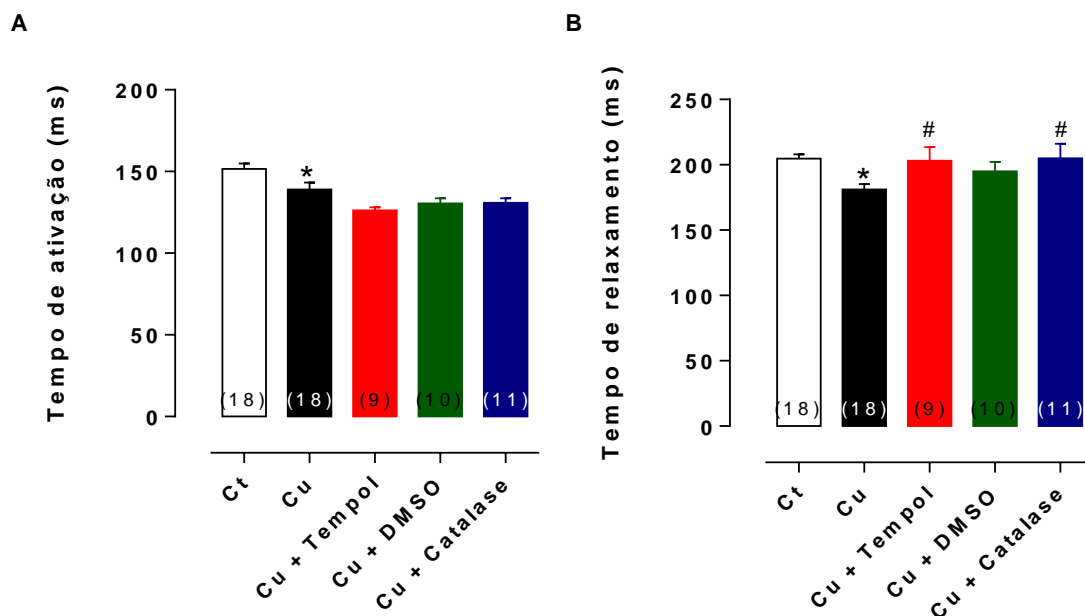


Figura 24: Parâmetros temporais de músculos papilares de VE de ratos após 60 minutos de exposição a alta concentração de cobre e na presença de agentes antioxidantes (Tempol-1 mM, DMSO-100 mM e Catalase-3000 U). Ct: controle, Cu: cobre. A: Tempo de ativação, B: Tempo de relaxamento. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. *P < 0,05 vs. Ct, #P < 0,05 vs. Cu. ANOVA uma via seguida de pós teste de Fisher.

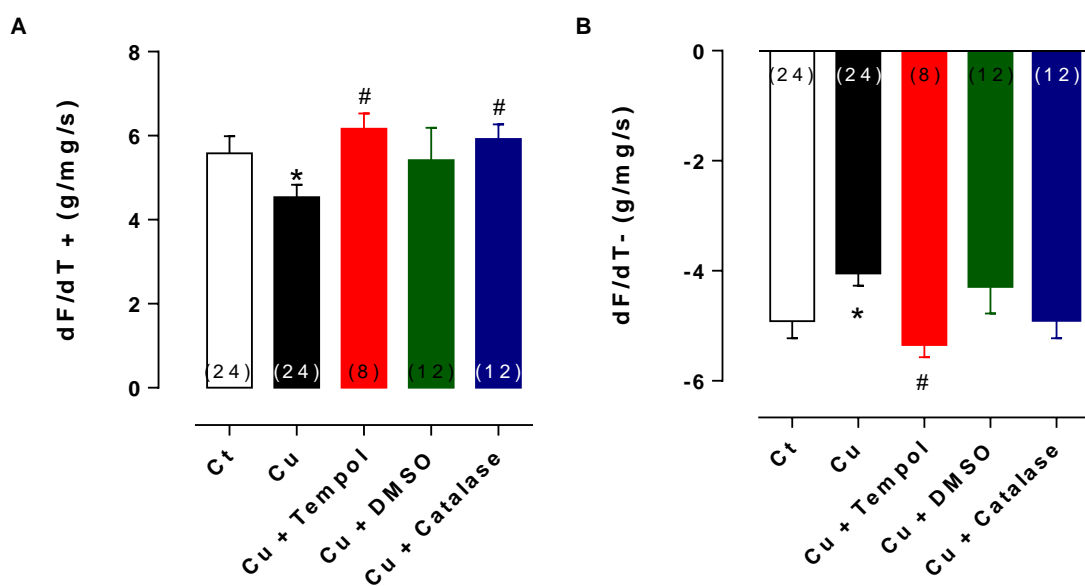


Figura 25: Derivadas temporais de força de músculos papilares de VE de ratos após 60 minutos

de exposição a alta concentração de cobre e na presença de agentes antioxidantes (Tempol -1 mM, DMSO-100 mM e Catalase-3000 U). Ct: controle, Cu: cobre. A: dF/dT máxima positiva B: dF/dT máxima negativa. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. *P < 0,05 vs. Ct, #P < 0,05 vs. Cu. ANOVA uma via seguida de pós teste de Fisher.

4.2.2. AVALIAÇÃO DAS EROS NA POTENCIAÇÃO RELATIVA PÓS-PAUSA (PPP)

As potenciações relativas foram reduzidas nos tempos de 15, 30 e 60 segundos de pausa após a exposição aguda a alta concentração de cobre, sugerindo que o metal esteja interferindo no funcionamento do retículo sarcoplasmático. Para avaliar se esta alteração está relacionada ao aumento das espécies reativas de oxigênio pelo cobre, o protocolo foi repetido na presença de antioxidantes. Apenas a co-incubação com tempol foi capaz de prevenir a redução das PPPs após a incubação com o cobre, como nos mostra a Figura 26.

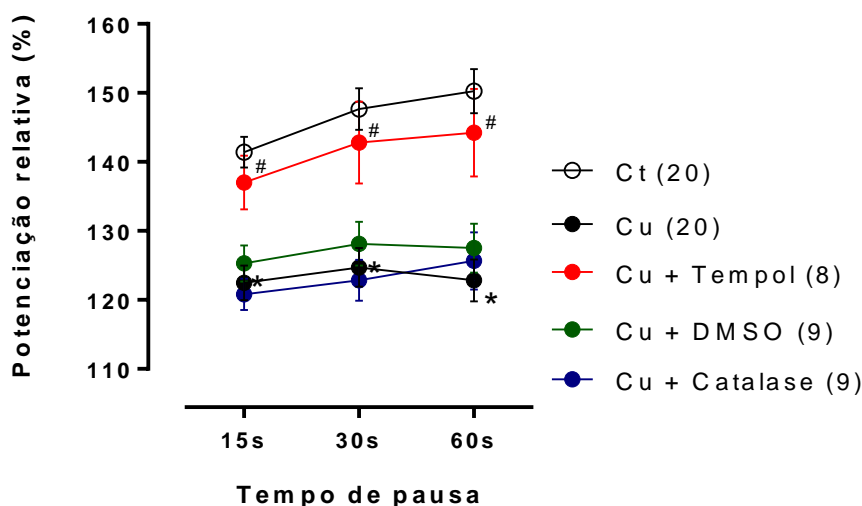


Figura 26: Avaliação das potenciações relativas pós-pausas em músculos papilares de VE de ratos após 60 minutos de exposição a alta concentração de cobre e na presença de agentes antioxidantes (Tempol -1 mM, DMSO-100 mM e Catalase-3000 U). Ct: controle, Cu: cobre. Os

dados são expressos como a Média \pm EPM. *P < 0,05 vs. Ct, #P < 0,05 vs. Cu, nos mesmos tempos de pausa. ANOVA duas vias seguida de pós teste de Bonferroni.

4.2.3. AVALIAÇÃO DAS EROS NA RESPOSTA AO CÁLCIO EXTRACELULAR

A avaliação da resposta ao cálcio extracelular também evidenciou diminuição da gênese de força contrátil após a exposição aguda a 10 $\mu\text{g/mL}$ de CuCl_2 . Assim, avaliamos esse transiente de cálcio extracelular na presença de agentes antioxidante. Conforme nos mostra a Figura 27, a co-incubação com tempol foi capaz de prevenir integralmente a redução da resposta contrátil após a incubação com o Cu^{2+} , enquanto que o DMSO e a catalase foram capazes de prevenir parcialmente esta redução.

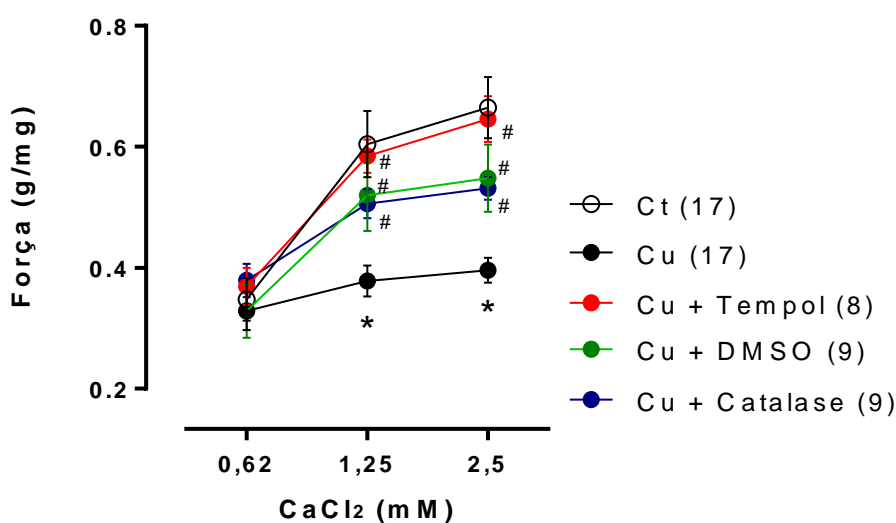


Figura 27: Avaliação da força de músculos papilares de VE diante de diferentes concentrações de cálcio extracelular após 60 minutos de exposição a alta concentração de cobre e na presença de agentes antioxidantes (Tempol -1 mM, DMSO-100 mM e Catalase-3000 U). Ct: controle, Cu: cobre. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. *P < 0,05 vs. Ct, #P < 0,05 vs. Cu, para a mesma concentração de cálcio. ANOVA duas vias seguida de pós teste de Bonferroni.

4.2.4. AVALIAÇÃO DAS EROS NA CONTRAÇÃO PÓS-REPOUSO DE 10 MINUTOS

O protocolo das contrações pós-reposo de 10 minutos sugeriu uma redução no influxo de cálcio após a incubação aguda com 10 µg/mL de CuCl₂. Esse protocolo foi realizado na presença de tempol, DMSO e catalase (Figura 28). Todos os agentes antioxidantes testados foram capazes de prevenir a redução da PRC induzida pelo cobre.

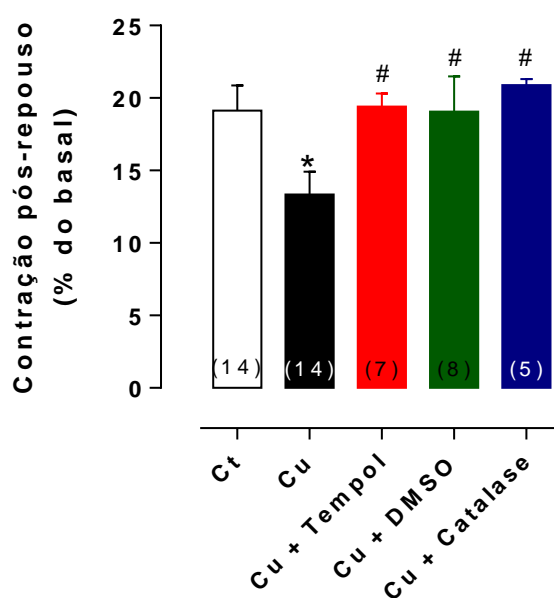


Figura 28: Avaliação indireta do influxo de cálcio através do sarcolema de músculos papilares de VE de ratos após 60 minutos de exposição a alta concentração de cobre e na presença de agentes antioxidantes (Tempol -1 mM, DMSO-100 mM e Catalase-3000 U). Ct: controle, Cu: cobre. Os dados são expressos como a Média ± EPM. *P < 0,05 vs. Ct, #P < 0,05 vs. Cu. ANOVA uma via seguida de pós teste de Fisher.

4.2.5. AVALIAÇÃO DAS EROS NA RESPOSTA β-ADRENÉRGICA

A resposta inotrópica ao agonista β -adrenérgico foi reduzida após a exposição ao cobre, em relação aos controles. Visando avaliar se as EROS também poderiam estar influenciando a resposta β -adrenérgica nos papilares expostos ao cobre, o protocolo foi feito na presença de antioxidantes. O tempol e a catalase foram capazes de impedir os efeitos do cobre, ainda que parcialmente, enquanto o DMSO não exerceu efeito sobre esta alteração.

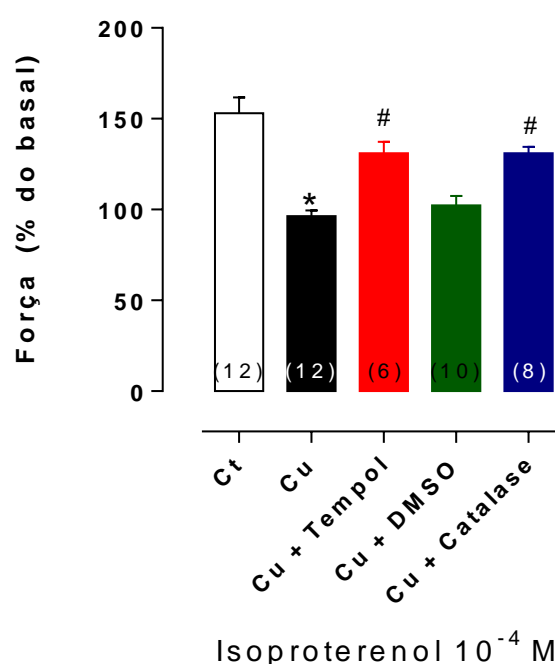


Figura 29: Avaliação da resposta inotrópica promovida pelo Isoproterenol (agonista β -adrenérgico) em músculos papilares de VE de ratos após 60 minutos de exposição a alta concentração de cobre e na presença de agentes antioxidantes (Tempol -1 mM, DMSO-100 mM e Catalase-3000 U). Ct: controle, Cu: cobre. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. *P < 0,05 vs. Ct, #P < 0,05 vs. Cu. ANOVA uma via seguida de pós teste de Fisher.

4.2.6. AVALIAÇÃO DAS EROS NAS CONTRAÇÕES TETÂNICAS

As contrações tetânicas permitem avaliar indiretamente, através do pico e do platô de força desenvolvida, como estão o influxo de cálcio através da membrana

celular e a responsividade das proteínas contráteis. A exposição aguda a alta concentração de cobre reduziu ambos os parâmetros de forma significativa. Após realizar essa manobra com os agentes antioxidantes co-incubados (Figura 30A e B), observou-se que apenas o tempol foi capaz de prevenir, ainda que parcialmente, a redução do pico de força desenvolvida após a incubação com cobre. Nenhum dos antioxidantes avaliados demonstrou ter efeito sobre os efeitos induzidos pelo cobre no platô das contrações tetânicas.

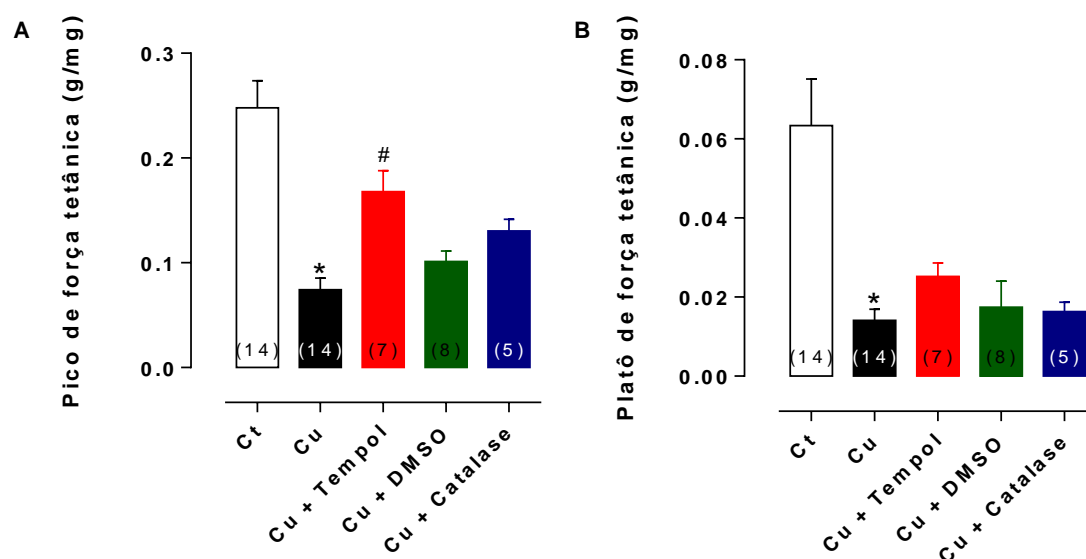


Figura 30: Avaliação das contrações tetânicas em músculos papilares de VE de ratos após 60 minutos de exposição a alta concentração de cobre e na presença de agentes antioxidantes (Tempol -1 mM, DMSO-100 mM e Catalase-3000 U). Ct: controle, Cu: cobre. A: Pico de força tetânica, B: Platô de força tetânica. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. *P < 0,05 vs. Ct, #P < 0,05 vs. Cu. ANOVA uma via seguida de pós teste de Fisher.

4.2.7. AVALIAÇÃO “IN SITU” DA FORMAÇÃO DE $O_2^{\cdot-}$ E OH^{\cdot}

Com o objetivo de confirmar os nossos achados funcionais (*in vitro*), a produção *in situ* de radicais livres foi avaliada. A Figura 31A e B nos mostra que após a

exposição aguda a alta concentração de cobre houve expressivo aumento da formação de $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} . Estes achados corroboram nossos dados funcionais obtidos após a co-incubação com diferentes antioxidantes.

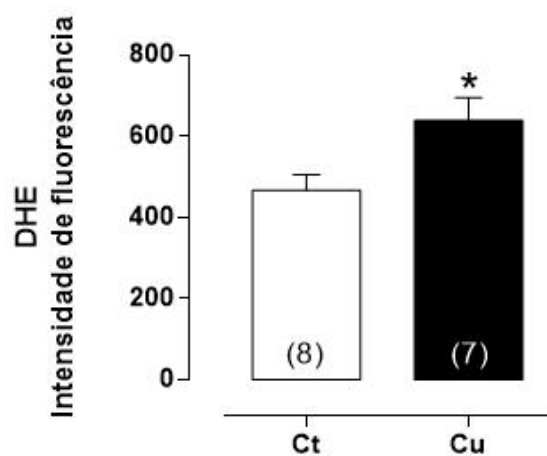
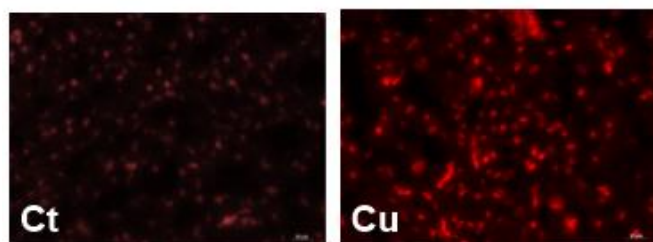
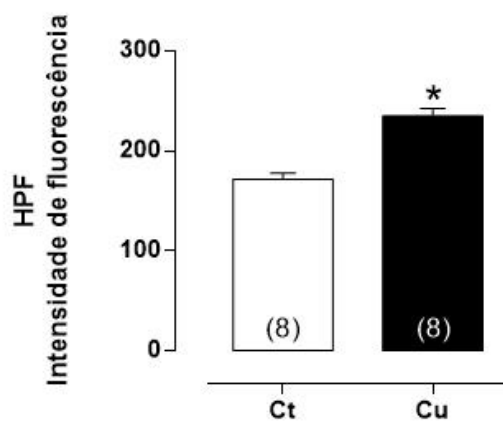
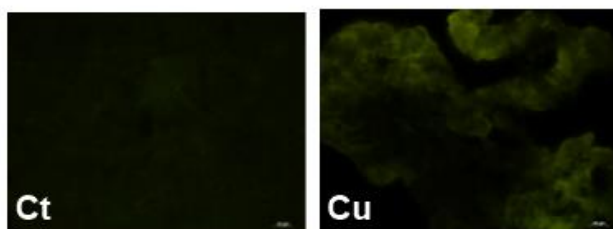
A**B**

Figura 31: Avaliação *in situ* da formação de radicais livres após exposição aguda ao cobre. Os painéis superiores mostram microfotografias fluorescentes representativas de segmentos do músculo papilar marcadas com dihidroethidio (DHE, em vermelho) ou hidroxifenil fluoresceína (HPF, em verde). A análise quantitativa de $O_2^{\cdot-}$ (em A) e OH^{\cdot} (em B) da produção ou biodisponibilidade também está demonstrada no gráfico de barras. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. *P <0,05 vs. Ct. Teste *t* de Student.

4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ATPASE MIOSÍNICA

A atividade da ATPase miosínica foi avaliada através da liberação de fosfato inorgânico (Pi) a partir do ATP. A análise mostrou que a atividade da ATPase miosínica foi significativamente reduzida após a exposição aguda ao cobre (Figura 32).

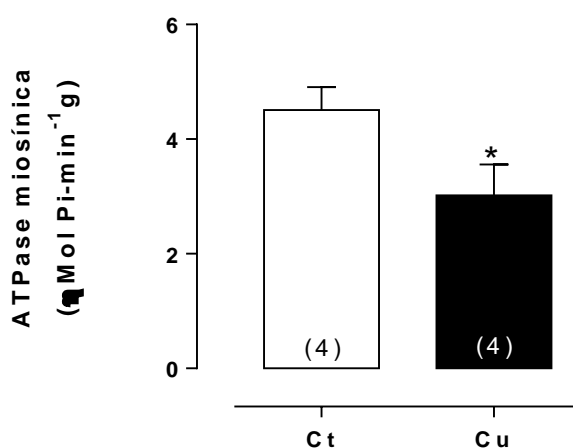


Figura 32: Avaliação da atividade da ATPase miosínica de músculos papilares de VE de ratos após a exposição aguda a alta concentração de cobre. Os dados são expressos como a Média \pm EPM. *P < 0,05 vs Ct. Teste *t* pareado.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a exposição a uma concentração de cobre dez vezes maior que a concentração normalmente encontrada em pessoas saudáveis (ZHANG et al., 2015; ROCHA et al., 2016) é capaz de causar prejuízos na contratilidade miocárdica de músculos papilares de VE de ratos. Os prejuízos causados pela exposição aguda a concentração elevada de cobre na maquinaria contrátil cardíaca podem estar relacionados a redução no papel de influxo de cálcio pelo sarcolema, redução da recaptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e a redução da atividade da ATPase miosínica. Ademais, esses efeitos deletérios parecem estar associados a formação das EROs. Nossos resultados corroboram a ideia de que a exposição à alta concentração de cobre é um fator de risco para a ocorrência de doenças cardiovasculares.

Estudos anteriores realizados com humanos mostraram haver uma importante relação entre o aumento dos níveis séricos de cobre e a incidência de doenças cardiovasculares, como o IAM e IC (KOSAR et al., 2006; SINGH et al., 1985; SALONEN et al., 1991; KOK et al., 1988). Todavia, a cardiotoxicidade aguda provocada pelo cobre e os mecanismos pelos quais este metal prejudica a contratilidade cardíaca ainda não foram adequadamente elucidados.

Nosso objetivo foi investigar os principais mecanismos envolvidos nas alterações da contratilidade miocárdica causadas pela alta concentração de cobre. Para isso utilizamos neste estudo uma concentração superior (10 µg/mL) a aquela encontrada em indivíduos saudáveis (1 µg/mL) (ZHANG et al., 2015; ROCHA et al., 2016). Nunes et al., (2018) investigaram os mecanismos envolvidos nas alterações da reatividade vascular após a exposição aguda a essa mesma concentração de cobre e observaram disfunção vascular relacionada ao aumento do estresse oxidativo e aumento da produção de óxido nítrico. Similarmente,

observamos que a exposição aguda ao cobre reduz o desenvolvimento de força de contração em músculos papilares de VE. Também de acordo com nossos dados, esta alteração parece estar relacionada a menor liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e a diminuição do influxo de cálcio extracelular através do sarcolema cardíaco. Nossos resultados estão de acordo com Zhang et al., (1990) que observaram uma redução da contratilidade de músculos papilares de cobaia após a incubação em uma solução contendo uma concentração elevada de cloreto de cobre (50 $\mu\text{M/L}$ CuCl_2).

O cobre é capaz de reagir com outros íons e/ou atuar como um catalizador de reações químicas levando a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), e assim levar a ocorrência das doenças cardiovasculares (SAMUNI, 1981; KOSAR et al., 2006; COOPER et al., 2004; BARCELOUX, 1999; SALONEN et al., 1991). A habilidade que as EROs possuem em prejudicar a contratilidade miocárdica *in vitro* já foi descrita por Burton et al., (1984), Blaustein et al., (1986) e Seddon et al., (2007), todavia os mecanismos pelos quais o cobre induz as alterações na contração muscular cardíaca ainda não estão totalmente esclarecidos.

Baseado nisto, investigamos se a exposição aguda a alta concentração de cobre pode levar a formação de radicais livres em músculos papilares. Confirmando, nos músculos papilares de VE expostos ao cobre foi observado aumento na formação de ânion superóxido e radical hidroxila, através das técnicas de fluorescência de dihidroetídeo (DHE) e hidroxifenil fluoresceína (HPF), respectivamente. Em nosso estudo demonstramos que a alta concentração de cobre produz efeitos mediados pelas EROs, os quais sugerem ser capazes de reduzir o influxo de cálcio transmembrana e a atividade da ATPase miosínica.

Avaliamos se a resposta contrátil reduzida do músculo papilar isolado expostos agudamente a alta concentração de cobre ($10 \mu\text{g/mL CuCl}_2$) poderia ser restaurada na presença de diferentes antioxidantes. O papel dos radicais livres gerados pela exposição ao cobre na contratilidade miocárdica pôde ser demonstrado pela prevenção dos efeitos tóxicos observados na co-incubação com DMSO, catalase e principalmente com tempol. Assim, OH^\cdot , H_2O_2 , e principalmente o $\text{O}_2^{\cdot-}$ demonstram estar envolvidos nos prejuízos induzidos pela alta concentração de cobre no acoplamento excitação-contração cardíaco.

Para avaliar a cinética de contração (ativação e relaxamento) dos músculos papilares de VE, foram mensurados os tempos de ativação e relaxamento da contração. O tempo de ativação mede a cinética dos processos que aumentam a disponibilidade do cálcio ou interferem na sensibilidade das proteínas contráteis a este íon.

O tempo de relaxamento mede a cinética dos processos que removem o cálcio do citoplasma. Em geral este tempo está relacionado principalmente a capacidade do retículo sarcoplasmático em captar cálcio, principalmente no rato, no qual essa organela é responsável por retirar, aproximadamente, 92% do cálcio citoplasmático durante o relaxamento (Bers, 2002).

Nossos resultados demonstraram o encurtamento dos tempos de ativação (TA) e de relaxamento (TR 90%). Estes achados estão diretamente relacionados a aceleração da cinética de aumento e redução do cálcio mioplasmático (ZIMA; BLATTER, 2006). A co-incubação com os agentes antioxidantes não provocou nenhuma melhora no tempo de ativação dos músculos papilares de VE expostos ao cobre. No entanto, a redução do tempo de relaxamento foi prevenida na

presença de tempol e catalase, indicando prejuízo causado pelo estresse oxidativo.

No que diz respeito a qualidade da contração e relaxamento do miócito, os resultados com músculos papilares corroboram os resultados obtidos por Waldemarin et al., (2011), em que as derivadas temporais de força (positivas e negativas) foram reduzidas após a exposição a alta concentração de cobre. Este achado sugere um prejuízo da performance contrátil cardíaca. A co-incubação com agentes antioxidantes aumentou as derivadas temporais de força, em função da redução da força de contração ter sido prevenida pelos antioxidantes e o tempo de ativação da contração ter mantido se encurtado.

Um outro protocolo realizado com os músculos papilares foi a avaliação das potenciações relativas pós-pausas (PPPs) de 15, 30 e 60 segundos na estimulação elétrica. Sabe-se que em músculos cardíacos de mamíferos a primeira contração após breve período de pausa é potencializada (VASSALLO; MILL, 1988; LEITE et.al, 1991; MILL et. al, 1992). Esta potencialização, é dependente, principalmente, da liberação de cálcio de sítios intracelulares (LEITE et al, 1991) e, como os ratos possuem o retículo sarcoplasmático (RS) muito desenvolvido, este protocolo é utilizado para avaliar indiretamente o papel desta organela durante a contração. De acordo com o protocolo que avalia as PPPs, a força relativa foi significativamente reduzida após a exposição ao Cu^{2+} , sugerindo a ocorrência de prejuízos funcionais do RS. Além do mais, apenas o tempol, um mimético de SOD, é capaz de prevenir a redução das PPPs, sugerindo a participação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ nesta alteração. Kaneko et al., (1989) observaram que o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é capaz de inibir a atividade da Ca^{2+} -ATPase do RS e

apenas a SOD mostrou um efeito protetor sobre a redução da atividade da bomba de Ca^{2+} induzida pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Outra análise importante do nosso estudo foi investigar se a exposição aguda a alta concentração de cobre poderia modificar a resposta inotrópica dos músculos papilares isolados. Para isso, foi realizada a avaliação da resposta ao cálcio extracelular. O resultado obtido por este protocolo evidenciou uma redução da resposta contrátil nos músculos papilares após a exposição aguda a alta concentração de cobre. Esses resultados sugerem que os cardiomiócitos apresentam menor permeabilidade ao cálcio e/ou uma menor afinidade das proteínas contráteis a este íon após serem incubados com o cobre. Além disso, como o protocolos das PPPs sugeriu que há uma redução da atividade do RS devido aos efeitos das EROs, assim outra hipótese possível é que a alta concentração de cobre esteja prejudicando a liberação de cálcio dependente de cálcio do RS.

De fato, a exposição aguda ao cobre provocou aparente redução no influxo de cálcio transsarcolemal mensurado indiretamente pela contração pós-reposo (PRC). Nesta manobra, a adição de cobre na solução nutritora reduziu a contração após o repouso de 10 minutos e, como esta contração é ativada pela entrada de cálcio através da membrana do miócito, é sugestiva que a exposição aguda a alta concentração de cobre esteja prejudicando o influxo de cálcio através dos canais de cálcio do tipo L. Estudos anteriores relatam que as EROS são capazes de alterar os mecanismos que disponibilizam o cálcio para a contratilidade miocárdica, incluindo o influxo de cálcio pelos canais do tipo L presentes no sarcolema cardíaco e a redução a liberação de cálcio do RS (KANEKO et al., 1990; GOLDHABER; QAYYUM, 2000). Nossas descobertas

estão de acordo com o que é descrito na literatura, uma vez que a resposta ao cálcio extracelular prevenida por tempol, DMSO e catalase, demonstrando que há participação das EROs nestas alterações.

Foi observada menor resposta inotrópica induzida pela ação do agonista β -adrenérgico Isoproterenol nos músculos papilares de VE expostos à alta concentração de cobre. Este efeito foi prevenido quando houve co-incubação com os antioxidantes tempol e catalase. Nossos resultados se apoiam no estudo de Kaneko et al., (1991), em que investigaram os efeitos das EROs nos receptores α e β -adrenérgicos dos corações de ratos, eles sugeriram que o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 são capazes de modificar os receptores β -adrenérgicos e levar a *down-regulation* de receptores causando a diminuição da resposta inotrópica.

Para melhor investigar os efeitos do cobre sobre as proteínas contráteis, avaliamos as contrações tetânicas e a atividade da ATPase miosínica. As contrações tetânicas foram utilizadas com o intuito de verificar, de forma indireta, a sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio e a disponibilidade do cálcio para a contração, através de seu influxo pelos canais de cálcio do tipo L (LEITE et al., 1995). Para a realização das contrações tetânicas, a cafeína (5 mM) foi adicionada à solução de Krebs-Henseleit. Na concentração utilizada, a cafeína age depletando o estoque de cálcio do retículo sarcoplasmático e a exposição sustentada à cafeína previne o acúmulo de cálcio pelo retículo sarcoplasmático (LEITE et al., 1995). As contrações tetânicas obtidas após inibição do RS com cafeína têm sido usadas para produzir ativação máxima da maquinaria contrátil no miocárdio intacto (YUE et al., 1986; MOREIRA et al., 2003). As forças desenvolvidas do pico e do platô das contrações tetânicas dos músculos papilares de VE expostos ao cobre foram deprimidas. Esta depressão apresenta

uma prevenção parcial apenas no pico das contrações com a co-incubação com tempol, isso demonstra mais uma vez a importância do $O_2^{\cdot-}$ para a ocorrência dos efeitos tóxicos induzidos pela exposição ao cobre. O platô de força das contrações tetânicas não apresentou prevenção dos efeitos mediados pelo cobre após a co-incubação com os agentes antioxidantes testados, sugerindo que o prejuízo causado na sensibilidade das proteínas contráteis ao cálcio, está relacionado a outras vias induzidas pelo cobre, e não por $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} e H_2O_2 . Como a atividade do RS está bloqueada pela cafeína, as contrações tetânicas dependem apenas do influxo de cálcio sarcolema, da sensibilidade das proteínas contráteis.

Visando comprovar este resultado, mensuramos a atividade da ATPase miosínica de ventrículos de ratos após a exposição aguda à alta concentração de cobre, que se mostrou reduzida. Em resultado similar utilizando o mercúrio, foi descrito que o metal se liga aos grupos SH presentes na molécula da miosina promovendo a redução atividade da ATPase miosínica (MOREIRA et al., 2003). Estudos anteriores sugeriram que dois grupos SH são os mais reativos das cadeias pesadas de miosina: SH1Cys-707 e SH2Cys-697, sendo que ambos os grupos são necessários para a movimentação das cabeças da miosina. Além disso, os grupos SH1 e SH2 estão presentes na hélice da molécula da miosina, cujas alterações nesses sítios prejudicam a hidrólise do ATP envolvido na geração de força de contração (GEEVES; HOLMES, 1999; HOLMES; GEEVES, 2000; BOBKOVA et al., 1999). Todavia, nossos resultados experimentais não nos permitem afirmar que seja este o mecanismo pelo qual a exposição aguda a alta concentração de cobre esteja interferindo na atividade da ATPase miosínica.

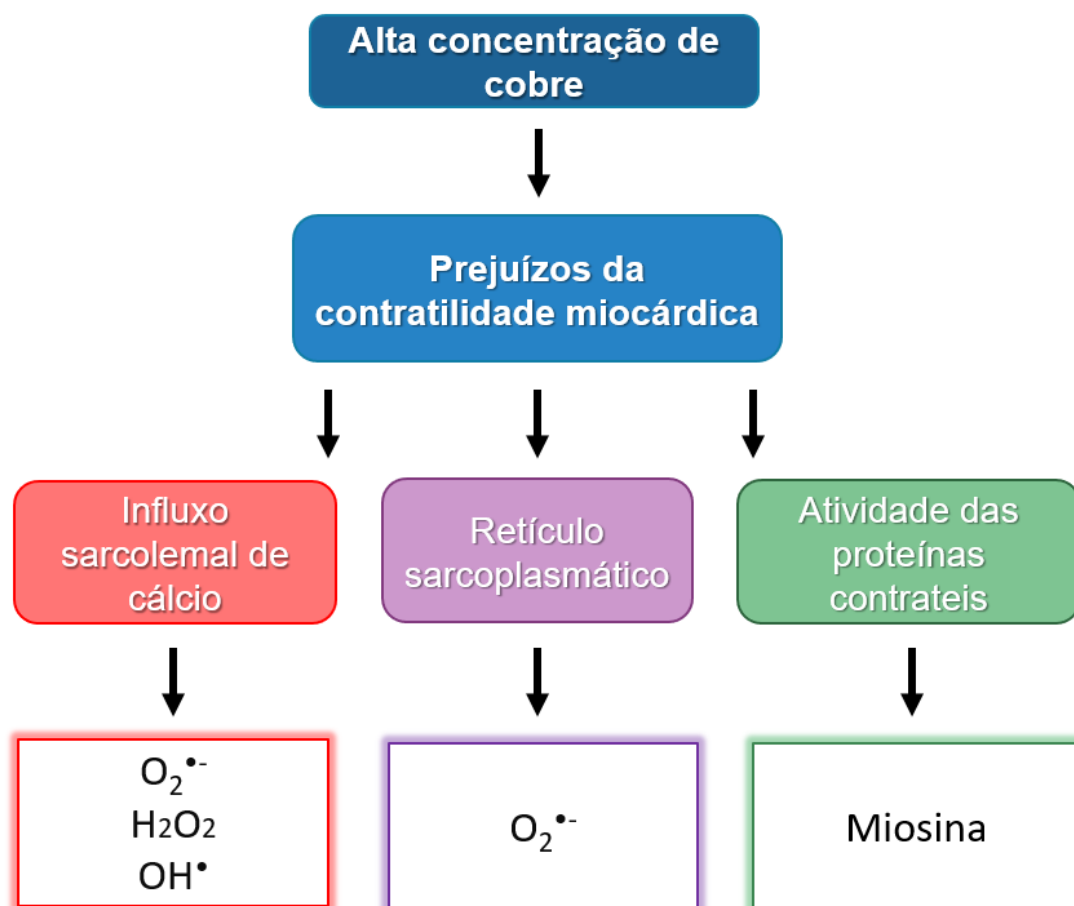


Figura 33: Esquema representativo dos principais achados deste estudo. A alta concentração de cobre promove prejuízos da atividade contrátil cardíaca, influenciando; o influxo sarcolemal de cálcio por ação do $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} e H_2O_2 ; a atividade do retículo sarcoplasmático por ação do $O_2^{\bullet-}$; e, reduzindo a sensibilidade das proteínas contráteis por outras vias. Fonte: O autor (2018).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo concluímos que a exposição aguda à alta concentração de cobre é capaz de prejudicar a função miocárdica em variados mecanismos do processo de contração. Grande parte dessas alterações são mediadas pelo aumento do estresse oxidativo.

Sugerimos que a alta concentração de cobre é capaz de prejudicar a atividade contrátil cardíaca, reduzindo a capacidade máxima de geração de força,

associada a redução do influxo de cálcio, recaptção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e da atividade da ATPase miosínica.

Nossos resultados também sugerem que esses efeitos são causados, pelo menos em parte, pela geração de EROs na presença de alta concentração de cobre, especialmente os radicais livres $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} e H_2O_2 , e essas alterações podem ser prevenidas pela co-incubação com agentes antioxidantes.

Acreditamos que o conhecimento apresentado neste estudo sobre a toxicidade provocada pela alta concentração de cobre na atividade contrátil cardíaca e as alterações no acoplamento excitação-contração mostram que o cobre em alta concentração é um fator de risco para doenças cardiovasculares.

7. REFERÊNCIAS

1. AIRES, M.M. Fisiologia. 4ª ed. *Guanabara Koogan*. Rio de Janeiro. 2012.
2. ANVISA. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Consulta pública nº 80. 2004.
3. AOKI, T. [Genetic disorders of copper transport--diagnosis and new treatment for the patients of Wilson's disease]. *No To Hattatsu*. 37(2):99-109. 2005.
4. 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*. 25: 886–888. 1983.
5. ARNAL, N.; DE ALANIZ, M,J.; MARRA, C,A. Involvement of Copper Overload in Human Diseases, in: M.S. Giménez (Ed.), *Research Signpost/Transworld Research Network*, Kerala, India. 1:1-28. 2010
6. ASKERGREN, A.; MELLGREN, M. Changes in the nasal mucosa after exposure to copper salt dust. a preliminary report. *Scand J Work Environ Health*. 1: 45–49. 1975.
7. 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.
8. BARCELOUX, D.G. Copper. *Clinical Toxicology*. 37: 217-230. 1999.

9. 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* 29, 113-123, 2006.
10. 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*, 476, 279–93. 1994.
11. BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 415 (6868), 198–205. 2002.
12. BLAUSTEIN, A.S.; SCHINE, L.; BROOKS, W.W.; FANBURG, B.L.; et al. Influence of exogenously generated oxidant species on myocardial function. *Am J Physiol*. 250: 595-599. 1986.
13. BLUNDELL, S.; CURTIN, J.; FITZGERALD, D. Blue lips, coma and haemolysis. *J Paediatr Child Health*. 39:67-8. 2003.
14. BOBKOVA, E.A.; BOBKOV, A.A.; LEVITSKY, A.A.; et al. Effects of SH1 and SH2 modifications on myosin similarities and differences. *Biophys. J*. 76, 1001–1007. 1999.
15. BOCALINI, D. S. et al. Remodelamento miocárdico após grandes infartos converte potenciação pós-pausa em decaimento da força em ratos. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 98, n. 3, p. 243–251, mar. 2012.
16. BOST, M.; HOUDART, S.; OBERLI, M.; KALONJI, E.; et al. Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved tissues. *J Trace Elem Med Biol*. 35:107–15. 2016.

17. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 218-254. 1976.
18. BRASIL. MINISTÉRIO DA INDÚSTRIAL, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS 2016. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/noticias/9-assuntos/categ-comercio-exterior/480-metarlurgia-e-siderurgia-4>>. Acesso em 15 de janeiro de 2018.
19. BREMEL, R.D.; WEBER, A. Calcium binding to rabbit skeletal myosin under physiological conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 17; 376(2):366-74. 1975.
20. BURTON, K.P.; MCCORD, J.M.; GHAI, G. Myocardial alterations due to free-radical generation. *Am J Physiol*. 246: 776-783. 1984.
21. BURNETT, J.W. Copper. *Cutis*. 43: 322. 1989.
22. BUTTS, A. "Copper, the Science and Technology of the Metal, its Alloys and Compounds", ed. Reinhold Publishing Corporation. 3 th printing. Nova York. 1960.
23. CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* 68, 26-36, 2005.
24. CALAGHAN, S.C.; BELUS, A.; WHITE, E. Do stretch-induced changes in intracellular calcium modify the electrical activity of cardiac muscle? *Progress in biophysics and molecular biology*, v. 82, n. 1-3, p. 81–95. 2003.

25. CELI, P.O papel do estresse oxidativo na saúde e produção de pequenos ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39 (suplemento especial), 348-363, 2010.
26. COHEN, S.R. A review of the health hazards from copper exposure. *J Occup Med.* 16: 621–624. 1974.
27. COLE, D.E.C.; LIRENMAN, D.S. Role of albumin enriched peritoneal dialysate in acute copper poisoning. *J Pediatr.* 92: 955–957. 1978.
28. 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.* 53: 2501-2508. 2004.
29. COZZOLINO, S.M.F. Biodisponibilidade de nutrientes. *Barueri: Manole* 2. Ed. 991 p. 2007.
30. DE FEO, C. J.; ALLER, S. G.; SILUVAI, G. S.; BLACKBURN, N. J.; et al. Three-Dimensional Structure of the Human Copper Transporter Hctr1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4237–4242. 2009.
31. DOWDY, R.P. Copper metabolism. *Am J Clin Nutr.* 22:887-92. 1969.
32. EATON, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary (editorial; comment). *J Lab Clin Med.* 118: 3-4. 1991.
33. 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*, v. 309, n. 8, p. C558. 2015.
34. FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997.
35. FIORESI, M. Efeitos da exposição aguda ao acetato de chumbo sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 2008.
36. 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.
37. 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*, v. 282, n. 42, p. 30452–65. 2007.
38. FUCHS, F.; SMITH, S. H. Calcium, cross-bridges, and the Frank-Starling relationship. *News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, v. 16, p. 5–10, fev. 2001.

39. GAZIANO, J.M.; SESSO, H.D.; CHRISTEN, W.G.; BUBES, V.; et al. Multivitamins in the prevention of cancer in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA*. 14;308(18):1871-80. 2012.
40. GEEVES, M.A.; HOLMES, K.C. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 687–728. 1999.
41. GOLDHABER, J.I.; QAYYUM, M.S. Oxygen free radicals and excitation-contraction coupling. *Antioxid Redox Signal*. 2000.
42. HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J* 5. 358-364, 1987.
43. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free Radicals in biology and medicine, 3rd ed., *Oxford Science Publications*: Oxford, 1998.
44. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246. 501-514, 1986.
45. HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186: 1-85, 1990.
46. HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59, 609-623, 1992.
47. HART, E.; STEENBOCK, H.; WADDELL, J.; ELVEHJEM, C. Iron in nutrition. VII. Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. *J. Biol. Chem.*, v.77, p.797-812, 1928.

48. HARVEY, L.J.; DAINTY, J.R.; HOLLANDS, W.J.; BULL, V.J.; et al. Use of mathematical modeling to study copper metabolism in humans. *Am J Clin Nutr.* 81(4):807–813. 2005.
49. HOLMES, K.C.; GEEVES, M.A. The structural basis of muscle contraction. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355, 419–431. 2000.
50. KANEKO, M.; BEAMISH, R. E.; DHALLA, N. S. Depression of heart sarcolemmal Ca²⁺-pump activity by oxygen free radicals. *Am. J. Physiol.* 256: 368-374. 1989.
51. 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.* 260H821-6. 1991.
52. KANEKO M.; ELIMBAN, V.; DHALLA N. S. Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca²⁺ pump by oxygen free radicals. *Am. J. Physiol.* 257:804-811. 1989.
53. KANEKO, M.; SINGAL, P.K.; DHALLA, N.S. Alterations in heart sarcolemmal Ca²⁺-ATPase and Ca²⁺-binding activities due to oxygen free radicals. *Basic Res Cardiol.* 85(1):45-54. 1990.
54. KLINC, M.; COSKUN, A.; BILGE, F.; IMREK, S.; et al. Serum reference levels of selenium, zinc and copper in healthy pregnant women at a prenatal screening program in southeastern Mediterranean region of Turkey, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 24:152–6. 2010.

55. KODAMA, H.; FUJISAWA, C.; BHADHPRASIT, W. Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment. *Curr Drug Metab.* 13(3):237-50. 2012.
56. 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.* 128: 352-359. 1988.
57. KOSAR, F., SAHIN, I., TAŞKAPAN, C., KÜÇÜKBAY, Z., GULLU, H., et al. Trace element status (Se, Zn, Cu) in heart failure. *Anadolu Kardiyol Derg.* 6 (3): 216-20. 2006.
58. KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Homeostase de cobre e atividade física. *Revista de Educação Física.* 136:47-56. 2007.
59. LANCASTER, J.J.R. Nitric Oxide: Principles and Actions. *Academic Press, Inc.* 1996.
60. LE GOFF, J. A idade média e o dinheiro. *Civilização brasileira.* 2014.
61. 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.* 1793(1):146- 53. 2009.
62. LEBRE, R.; RUIZ, V.; LEITÃO, S.; SANTOS, A.; et al. Acute poisoning with Copper Sulphate: a clinical case. *Revista da Sociedade Portuguesa de Medicina Interna.* 2005.

63. LEITE, C.M.; VASSALLO, D.V.; MILL, J.G.; Characteristics of tetanic contractions in caffeine-treated rat myocardium. *Can J Physiol Pharmacol.* 73: 638-643. 1995.
64. LEITE, C.M.; VASSALLO, D.V.; MILL, J.G.; Post-rest contractions of amphibian cardiac muscle. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 24: 843-846. 1991.
65. LINZ, R.; LUTSENKO, S. Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. *Journal of bioenergetics and biomembranes.* 39:403–407. 2007.
66. LIU, J.; KASHIMURA, S.; HARA, K.; ZHANG G. Death Following Cupric Sulfate Emesis. *J Toxicol Clin Toxicol.* 39 (2): 161-163. 2001.
67. Lusian Coppers. Portuguese company specialized in copper articles. Disponível em: <<http://www.lusiancoppers.com/files/HistoriaCobre.pdf>>. Acesso em 19 de dezembro de 2017.
68. 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.* 143, 89–97. 2015.
69. McCLELLAN, G.; WEISBERG, A.; WINEGRAD, S. cAMP can raise or lower cardiac actomyosin ATPase activity depending on α -adrenergic activity. *American Journal of Physiology.* 267: 431-442. 1994.
70. McHENRY, C. *The New Encyclopedia Britannica 3 (15 ed).* p. 612. 1992.

71. 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*, v. 25, n. 4, p. 399–408, jan. 1992.
72. MONTY, J.F.; LLANOS, R.M.; MERCER, J.F.; KRAMER, D.R. Copper exposure induces trafficking of the menkes protein in intestinal epithelium of ATP7A transgenic mice. *J Nutr.* 135(12):2762-6. 2005.
73. 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.
74. MOREIRA, F.R.; MOREIRA, J. C. A cinética do chumbo no organismo humano e sua importância para a saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, 9, 167–181. 2004.
75. MOURA, M.C.P.A. Utilização de microemulsoes como agentes modificadores de superfícies para remoção de íons metálicos. Tese (Doutorado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2001.
76. NELSON LS. Toxicologic Emergencies. 7th edition. *New York: McGraw-Hill* 1262-1271. 2002.
77. NIEVES, J;W. Osteoporosis: the role of micronutrients. *Am J Clin Nutr.* 2005 May;81(5):1232S-1239S.

78. NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* v.31. p.1287-1312. 2001.
79. NUNES, D.O.; ALMENARA, C.C.; BROSEGHINI-FILHO, G.B.; SILVA, M.A. Flaxseed oil increases aortic reactivity to phenylephrine through reactive oxygen species and the cyclooxygenase-2 pathway in rats. *Lipids Health Dis.* 3;13:107. 2014.
80. 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 A.* 13:1-11. 2018.
81. OLIVEIRA, E.M.; VASSALLO, D.V.; SARKIS, J.J; et al. Mercury effects on the contractile activity of isolated heart muscle. *Toxicol Appl Pharmacol.* 128(1):86-91. 1994.
82. OLIVEIRA, M.C.; SCHOFFEN, J.P.F. Oxidative stress action in cellular aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53. 1333-1342, 2010.
83. OLIVEIRA, M.R. Eficiência da extração de cobre e níquel utilizando sistemas microemulsionados bifásicos e trifásicos. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2014.
84. OUDIT, G.Y.; SUN, H.; TRIVIERI, M.G.; et al. L-type Ca²⁺ channels provide a major pathway for iron entry into cardiomyocytes in iron-overload cardiomyopathy. *Nat. Med.* 9 (9), 1187–1194. 2003.

85. PANKIT, A.N.; BHAVE, S.A. Copper Metabolic Defects And Liver Disease: Enviromental Aspects. *J Gastroenterol Hepatol*.17 (3): 403-407. 2002.
86. PROCOBRE. História do Cobre. Disponível em: <<http://procobre.org/pt/o-cobre/historia-do-cobre/>>. Acesso em 07 de dezembro de 2017.
87. RIBEIRO, J.A.S. Cobre. *Balanço Mineral Brasileiro*. 2001.
88. RINGER, S. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *The Journal of Physiology*, 4, 29–42.3. 1883.
89. 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*. 35:61–5. 2016.
90. SAFRA, L.C.P.G. Obtenção de fios em ligas de cobre para utilização em linhas de transmissão e em eletrodos para contatos elétricos. *Universidade de São Paulo*. 2011.
91. 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*. 134: 268-276. 1991.
92. SAMUNI, A.; MODERCHAI, C.; CZAPSKI, G. Unusual Copper-induced Sensitization of the Biological Damage Due to Superoxide Radicals. *The Journal of Biological Chemistry*. 24: 12632-12635. 1981.

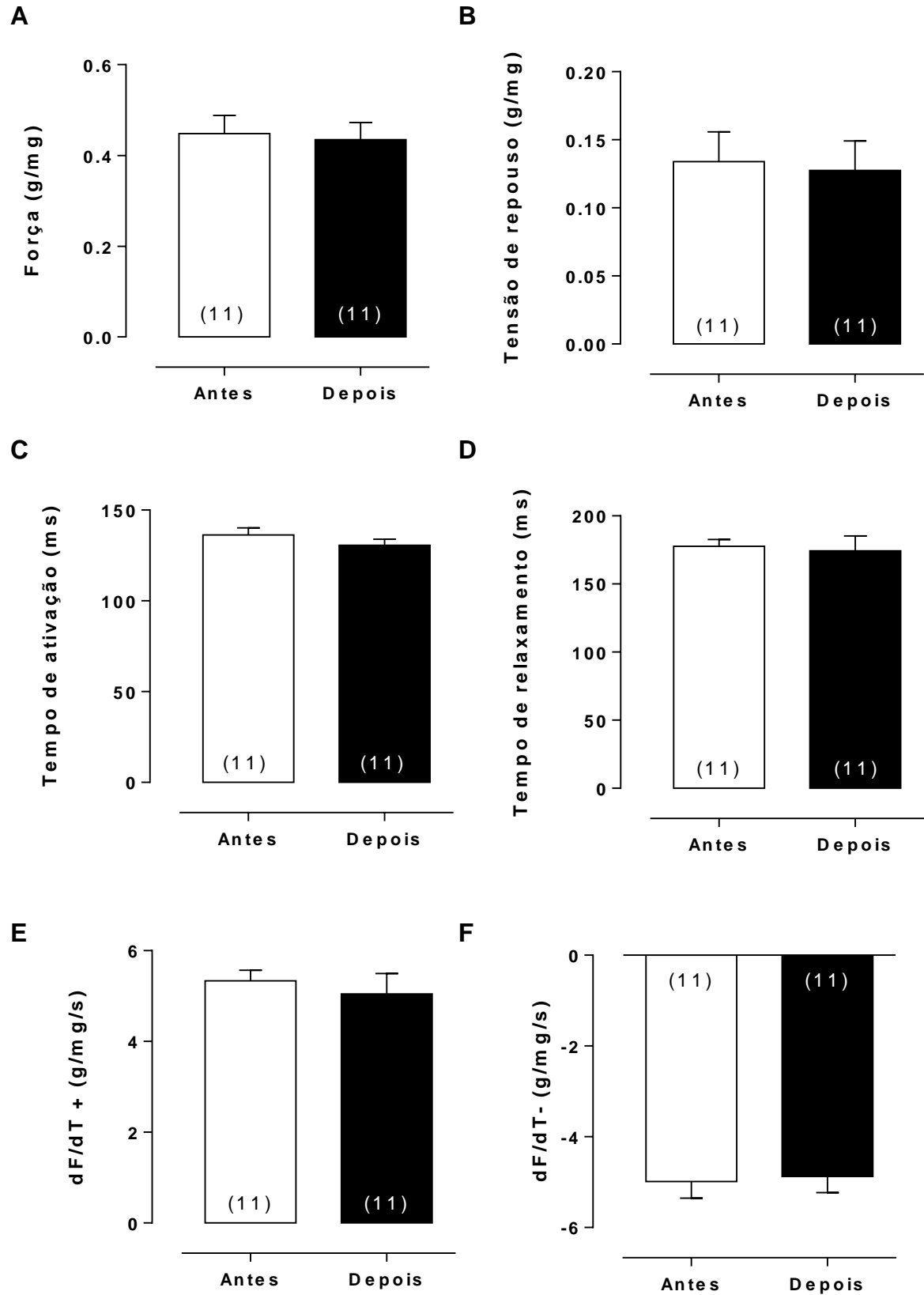
93. SCHWARTZ, E.; SCHMIDT, E. Refractory shock secondary to copper sulfate ingestion. *Ann Emerg Med.* 15: 952–954. 1986.
94. SEDDON, M.; LOOI, Y.H.; SHAH, A.M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart.* 93(8):903-907. 2006.
95. SETSUKINAI, K.; URANO, Y.; 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.* 278 (5) 3170–5. 2003.
96. SILVA, G.M.M.C. Metais e Ligas Metálicas: Uma abordagem experimental no secundário. Dissertação (Mestrado em Química para o Ensino). Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto. Universidade do Porto. 2007.
97. 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.
98. STEIN, R.S.; JENKINS, D.; KORNS, M.E. Letter: Death after use of cupric sulfate as emetic. *JAMA.* 235(8):801. 1976.
99. TRUMBO, P.; YATES, A.A.; SCHLICKER, S.; POOS, M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc.* 101:294– 301. 2001.

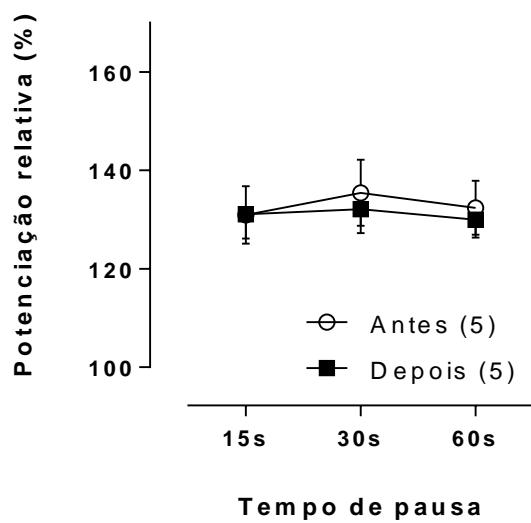
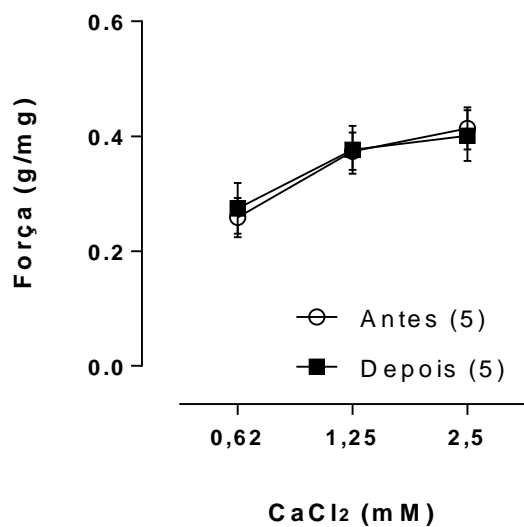
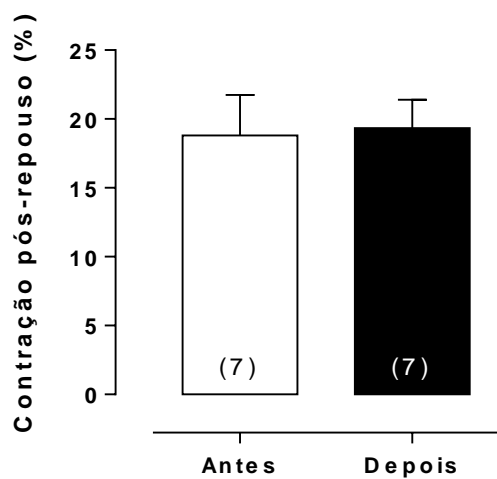
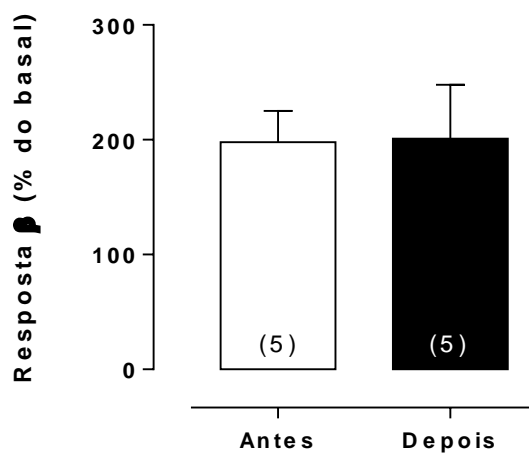
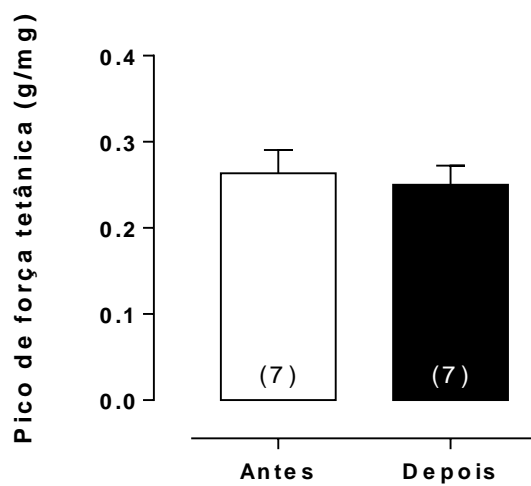
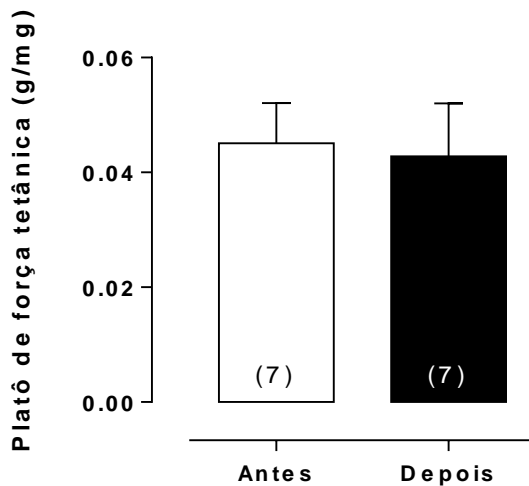
100. URBAŃSKI, N.K.; BERESEWICZ, A. Generation of OH⁻ initiated by interaction of Fe²⁺ and Cu⁺ with dioxygen; comparison with the Fenton chemistry. *Acta Biochim Pol.* 47(4):951-62. 2000.
101. VASHCHENKO, G.; MAC GILLIVRAY, R.T. Multi-copper oxidases and human iron metabolism. *Nutrients.* 5(7):2289-313. 2013.
102. VASSALLO, D.V.; OLIVEIRA, E.M.; STEFANON, I. Contratilidade Miocárdica. In: Aires MM, Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 435–469. 2008.
103. 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.* 29: 251- 260. 1994.
104. VASSALLO, D.V.; MILL, J.G. Mechanical behavior of rest contractions in cardiac muscle. *Acta Physiologica Pharmacologica latinoamericana.* 38: 87-97. 1988.
105. 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.* 21(3):783-94. 2012.
106. WEE, N. K. Y.; WEINSTEIN, D. C.; FRASER, S. T.; ASSINDER, S. J. The Mammalian Copper Transporters Ctr1 and Ctr2 and Their Roles in Development and Disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 960–963. 2013.

107. WERNIMONT, A.K.; YATSUNYK, L.A.; ROSENZWEIG, A.C. Binding of copper(I) by the Wilson disease protein and its copper chaperone. *J Biol Chem.* 279(13):12269-76. 2004.
108. World Health Organization (WHO) (2011) Cardiovascular Diseases. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/> Accessed 26 Oct 2017.
109. YAMAOKA, K.; KAMEYAMA, M. Regulation of L-type Ca²⁺ channels in the heart: overview of recent advances. *Mol Cell Biochem.* 253(1-2):3-13. 2003.
110. YUE D. T.; MARBAN, E.; WIER, W. G. Relationship between force and intracellular [Ca²⁺] in tetanized mammalian heart muscle. *The Journal of General Physiology*, 87, 223–42. 1986.
111. ZIMA, A.V.; BLATTER, L.A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovasc Res.*71(2):310-21. 2006.
112. ZHANG, L.; LU, L.; PAN, Y.; DING. C.; et al.. Baseline blood levels of manganese, lead, cadmium, copper, and zinc in residents of Beijing suburb. *Environmental Research.* 140:10–17. 2015.
113. ZHANG, S.T., LI, X.G., LIU, C.H. Effects of copper chloride on electromechanical activities of myocardial cells. *Acta Pharmacologia Sinica.* 1990.

ANEXO I

Controles-temporais



G**H****I****J****K****L**

Anexo I: Controles-temporais dos protocolos avaliados com exposição aguda a alta concentração de cobre. Antes: primeira avaliação dos protocolos experimentais. Depois: segunda avaliação dos protocolos experimentais. A: Força de contração, B: Tensão de repouso, C: Tempo de ativação, D: Tempo de relaxamento (90%), E: dF/dT máxima positiva, F: dF/dT máxima negativa, G: Potenciação pós-pausa, H: Resposta ao cálcio extracelular, I: Contração pós-repouso, J: Resposta ao agonista β -adrenérgico, K: Pico de força tetânica, e J: Platô de força tetânica. Não foram encontradas diferenças estatísticas nos controles-temporais.