

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
Instituto De Ciências Básicas Da Saúde  
Departamento De Fisiologia

Programa De Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

TESE DE DOUTORADO

**EFEITOS DO SULFORAFANO SOBRE VIAS DE MORTE CELULAR  
EM CARDIOMIOBLASTOS EM CULTURA E NO  
REMODELAMENTO CARDÍACO PÓS-INFARTO DO MIOCÁRDIO**

Rafael Oliveira Fernandes

Porto Alegre, abril de 2015

**Rafael Oliveira Fernandes**

EFEITOS DO SULFORAFANO SOBRE VIAS DE MORTE CELULAR  
EM CARDIOMIOBLASTOS EM CULTURA E NO  
REMODELAMENTO CARDÍACO PÓS-INFARTO DO MIOCÁRDIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Fisiologia.

Orientadora: Dra. Adriane Belló Klein

Co-orientador: Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Porto Alegre  
2015

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço, primeiramente, a minha família, ao meus pais Nelson Pintos Fernandes e Liliane Oliveira Fernandes, e a minha irmã Sabrina, pelo amor e pela ajuda em todos os momentos. Com certeza, não chegaria onde estou se não fosse o suporte de vocês. Incluo aqui, toda a minha família do Alegrete!*

*Agradeço a minha orientadora, Profa Adriane Belló-Klein, pelo apoio, pelos estímulos, pelas orientações, pelos aconselhamentos, assim como pelas diversas oportunidades que me proporcionou nesta caminhada de longa data. Profa, te admiro muito. Obrigado!*

*Agradeço a minha melhor amiga, minha namorada e minha grande parceira, Jéssica H. Poletto Bonetto, pela ajuda e companheirismo.*

*Agradeço ao Prof. Alex Sander da Rosa Araujo, meu co-orientador e parceiro nesta caminhada;*

*Agradeço ao meu amigo Paulo Cavalheiro Schenkel, pela amizade.*

*Agradeço aos colegas e amigos do laboratório por termos compartilhado bons tempos de trabalho, assim como os demais momentos durante este período.*

*Agradeço aos amigos Gustavo Ferreira, Taína Scheid, Felipe Moysés e Eduardo Sanches por compartilharmos essa caminhada juntos, assim como os bons momentos.*

*Agradeço aos Professores do PPG Fisiologia pelos ensinamentos, em especial a Profa. Ilma Simoni Brum da Silva, pelo apoio, estímulo e conversas; a Profa. Mária Flávia Ribeiro, pela confiança, e ao Prof. Luiz Kucharski pelo auxílio de todas as horas.*

*I thank you Dr. Pawan Singal and, in special, Dr. Neelam Khaper, "my Canadian supervisor", for all opportunities and welcome during all periods that I was in Canada. Also, thank you all colleagues at NOSM, and friends that I met in Canada.*

*Agradeço a todos os colaboradores que participaram do desenvolvimento destes trabalhos. A nossa téc. Tânia Fernandes. Aos colegas Jéssica Bonetto, Alexandre Castro, Dalvana Müller, Vanessa Ortiz, Giana Corsac, Lucas Barbosa, Cristina Campos, e demais colegas.... Assim como, a Profa. Matilde Achaval, téc. Sílvia Barbosa, Prof. Léder Xavier e a Laura Tartari.*

*Agradeço aos colegas do PPG Fisiologia, em especial ao "grande" grupo da Profa. Ilma.*

*Agradeço aos funcionários do PPG Fisiologia, aos funcionários do CREAL, e demais setores do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, que contribuem para o andamento dos trabalhos. Em especial, agradeço a Sílvia Guimarães pelos bons momentos.*

*Agradeço aos ratinhos Wistar por proporcionarem o desenvolvimento de pesquisa básica.*

*Agradeço a população brasileira que, através dos impostos, permite que milhares de estudantes possam fazer uma formação gratuita no nosso Brasil.*

*Agradeço a Deus por trilhar meus caminhos.*

*Rafael Fernandes (18.04.2015)*

## RESUMO

**Introdução:** O remodelamento cardíaco patológico é um processo complexo que ocorre no coração após dano, com eventos de morte celular, hipertrofia, fibrose e inflamação que favorecem a progressão para a insuficiência cardíaca. Envolvido na patogênese do remodelamento cardíaco está o estresse oxidativo, onde espécies reativas de oxigênio (ERO) podem modular vias de sinalização relacionadas com sobrevivência e morte celular. O aumento das defesas antioxidantes é uma estratégia eficaz na redução dano oxidativo, atenuando a progressão do remodelamento cardíaco patológico. O uso do sulforafano (SFN), um isotiocianato encontrado em vegetais crucíferos (ex. broto de brócolis), pode ser uma estratégia de intervenção. Este tem capacidade de aumentar as defesas antioxidantes e as proteínas detoxificadoras intracelulares, por sua ação sobre fatores de transcrição intracelulares, como Nrf-2 e PGC-1 $\alpha$ , os quais aumentam a expressão das defesas antioxidantes citoplasmáticas e mitocondriais, tal como a heme oxigenase-1 (HO-1).

**Objetivos:** Estudar o efeito do sulforafano como um agente estimulador das defesas antioxidantes endógenas em células cardíacas em cultura, assim como no coração em processo de remodelamento após infarto do miocárdio. Neste contexto, focar a relação do estresse oxidativo com a modulação de vias de sinalização para a sobrevivência e morte celular, assim como do processo de autofagia.

**Materiais e Métodos:** Mioblastos cardíacos (H9c2) foram incubados com R-sulforafano (5  $\mu$ mol/L), durante 24 horas. A viabilidade celular, os marcadores de estresse oxidativo e as proteínas relacionadas com a via intrínseca da apoptose foram investigados. No modelo de infarto do miocárdio, ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: *SHAM*, *SHAM* + sulforafano (*SHAM+SFN*), infarto (*MI*), infarto + sulforafano (*MI+SFN*). Os grupos *SHAM+SFN* e *MI+SFN* receberam R-S-sulforafano (5 mg/Kg/dia, i.p.), durante 25 dias. Análise ecocardiográfica, conteúdo total de colágeno, análises bioquímicas e moleculares de marcadores de estresse oxidativo, via de sinalização para sobrevivência e morte celular, proteínas envolvidas no processo apoptótico e autofágico foram realizadas.

**Resultados:** Células tratadas com SFN apresentaram elevação da viabilidade quando comparadas às células controle. O sulforafano aumentou a atividade das defesas antioxidantes da SOD (103%), catalase (101%) e GST (72%), assim como a expressão da HO-1 (400%) e reduziu o estresse oxidativo observado pela diminuição das EROs (15%) e da peroxidação lipídica (65%). Somado a isso, a via associada com apoptose intrínseca reduziu, pois aumentou a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, reduzindo a razão Bax/Bcl-2, a atividade da caspase 3/7 reduziu, assim como os níveis de fosforilação da JNK. Essas respostas foram associadas com aumento da expressão do co-fator de transcrição PGC-1 $\alpha$  (42%). Foi observado que os grupos *MI* e *MI+SFN* apresentaram disfunção cardíaca e remodelamento patológico. No entanto, o SFN atenuou a progressão do remodelamento cardíaco no grupo *MI+SFN*, observada pela manutenção do índice de estresse de parede em níveis controle, redução da fibrose intersticial e preservação da musculatura cardíaca. Somado a isso, o tratamento com SFN reduziu a deterioração da função cardíaca observada pela manutenção das dilatações da câmara ventricular esquerda e dos índices de contratilidade (fração de ejeção e mudança da área fracional), quando comparados os dados ecocardiográficos do 3º dia com o 28º dia pós-cirúrgico. O grupo *MI* apresentou maiores

níveis de peroxidação lipídica e elevação das defesas antioxidantes (GPx, CuZn-SOD). Por outro lado, o grupo *MI+SFN* apresentou redução das EROs e elevação da proteína HO-1, sem mostrar elevação da peroxidação lipídica. Além disso, o grupo *MI* apresentou elevação da fosforilação das MAPKs ERK 1/2 e p38, sendo que o grupo *MI+SFN* apresentou aumento apenas da ERK 1/2, mantendo os níveis da p38 iguais aos do grupo *SHAM*. Adicionalmente, apenas o grupo *MI+SFN* apresentou redução da razão Bax/Bcl-2 (pela diminuição da proteína pró-apoptótica Bax). A atividade autofágica foi reduzida no grupo *IM*, quando comparada ao grupo *SHAM*, enquanto que, no grupo *MI+SFN*, manteve-se semelhante ao seu controle *SHAM+SFN*.

**Conclusão:** Em cultura de cardiomioblastos, uma baixa concentração de sulforafano (5 µmol/L) foi capaz de aumentar as defesas antioxidantes, em especial a expressão da HO-1, sendo estes efeitos associados à redução de estresse oxidativo e atenuação da via intrínseca do processo de apoptose celular. Semelhante ação deste isotiocianato foi observada no remodelamento cardíaco patológico após infarto do miocárdio. O sulforafano atenuou eventos críticos para a manutenção da função cardíaca, tais como redução do conteúdo de colágeno e preservação da musculatura cardíaca. Estes efeitos benéficos foram associados a um aumento da expressão da HO-1, com conseqüente redução de EROs. Estas adaptações do ambiente redox celular foram associadas com uma modulação da sinalização intracelular em direção à sobrevivência, com preservação da função autofágica. O conjunto de resultados aponta para a ativação da HO-1 como um mecanismo central da cardioproteção oferecida pelo sulforafano, envolvendo a modulação de vias de morte e sobrevivência celular, culminando com um remodelamento cardíaco mais favorável.

## LISTA DE FIGURAS

Figure 1: Patogênese da insuficiência cardíaca. Eventos que envolvem a progressão da fase compensada para a descompensada da insuficiência cardíaca.

Figure 2: Estresse oxidativo envolvido nos eventos do remodelamento cardíaco, contribuindo na patogênese da insuficiência cardíaca.

Figura 3: Desenho experimental do estudo *in vivo*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	AMP-activated protein kinase
Bax	Proteína pró-apoptótica da família da Bcl-2
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica da família da Bcl-2
CAT	Catalase
CO	Monóxido de carbono
CuZn-SOD	Enzima superóxido dismutase citosólica
DCV	Doenças Cardiovasculares
DMSO	Dimetilsulfóxido
EF	Fração de ejeção
ERK 1/2	Extracellular signal regulated kinases
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAC	Área de mudança fracional
GPx	Glutationa Peroxidase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
GST	Glutationa S-transferase
HO-1	Heme Oxigenase-1
IM	Infarto do miocárdio
JNK 1/2	c-Jun N-terminal kinases
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
LVEDD	Diametro diastólico final do ventrículo esquerdo
LVPWD	Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole
Mn-SOD	Enzima superóxido dismutase mitocondrial
Nrf-2	Fator relacionado ao NF-E2
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Ânion Superóxido
OH <sup>•</sup>	Radical Hidroxil
p38	P38 mitogen-activated protein kinases
PD	Pressão Desenvolvida pelo Ventrículo
PDFVE	Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo
PGC-1 $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ coactivator 1 $\alpha$
SAPK	Proteína cinase ativada por estresse (stress-activated protein kinases)
SFN	Sulforafano
SOD	Enzima superóxido dismutase
WTI	Índice de tensão de parede

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Doenças Cardiovasculares E Infarto Miocárdio .....</b>	<b>10</b>
1.1.1. Remodelamento cardíaco patológicos pós infarto do miocárdio .....	10
<b>1.2. Morte Celular .....</b>	<b>13</b>
1.2.1. Apoptose .....	13
1.2.2. Autofagia .....	14
<b>1.3. Estresse Oxidativo No Tecido Cardíaco .....</b>	<b>16</b>
1.3.1. Dano oxidativo e defesas antioxidantes .....	16
<b>1.4. Proteínas Redox Sensíveis Envolvidas No Remodelamento Cardíaco .....</b>	<b>20</b>
<b>1.5. Papel Do Sulforafano Como Cardioprotetor .....</b>	<b>22</b>
<b>2. HIPÓTESE .....</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
3.1. Objetivo Geral .....	24
3.2. Objetivos Específicos .....	24
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Estudo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>26</b>
4.1.1. Cultura de células de linhagem .....	26
4.1.2. Grupos experimentais .....	26
4.1.3. Viabilidade celular .....	27
4.1.4. Preparo das células para análise da atividade das enzimas antioxidantes .....	27
4.1.5. Detecção de EROs em células cardíacas através de citometria de fluxo .....	27
4.1.6. Isolamento e quantificação do RNA .....	28
4.1.7. Quantificação por PCR em tempo real .....	28
4.1.8. Atividade da caspase-3/7 por citometria de fluxo .....	28
4.1.9. Análise estatística .....	29
<b>4.2. Estudo <i>in vivo</i> .....</b>	<b>29</b>
4.2.1. Animais .....	29
4.2.2. Grupos experimentais .....	29
4.2.3. Desenho experimental .....	30
4.2.4. Procedimento cirúrgico de indução do infarto do miocárdio .....	30
4.2.5. Tratamento com sulforafano .....	31
4.2.6. Avaliação hemodinâmica por ecocardiografia .....	32
4.2.7. Morte dos animais e coleta de tecidos.....	32
4.2.8. Avaliação dos índices morfométricos .....	33
4.2.9. Enzimas hepáticas .....	33
4.2.10. Análise histológica do tecido cardíaco .....	33
4.2.11. Homogeneização do tecido cardíaco para as técnicas bioquímicas de estresse oxidativo e para biologia molecular por western blot .....	34



4.2.12. Quantificação das ERO totais em homogeneizado de tecido .....	35
4.2.13. Análise estatística .....	35
<b>4.3. Análises bioquímicas e de biologia molecular comuns para ambos os experimentos in vitro e in vivo .....</b>	<b>35</b>
4.3.1. Quantificação de proteínas .....	35
4.3.2. Atividade das enzimas antioxidantes .....	36
4.3.3. Quantificação de peroxidação lipídica .....	36
4.3.4. Quantificação da expressão proteica por western blot .....	37
4.3.5. Descarte de materiais e materiais tóxicos .....	37
4.3.6. Considerações éticas .....	38
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
5.1. <b>Artigo I</b> – <i>Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1<math>\alpha</math> stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts</i> .....	40
5.2. <b>Artigo II</b> – <i>Sulforaphane modulates apoptosis-related proteins and attenuates pathological cardiac remodeling post-myocardial infarction in rats</i> .....	50
Introduction .....	53
Material and Methods .....	55
Results .....	59
Discussion .....	62
Conclusion .....	68
References .....	68
Tables and figures .....	73
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>85</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>91</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. DOENÇAS CARDIOVASCULARES E INFARTO DO MIOCÁRDIO**

As doenças cardiovasculares (DCV) são as principais causas de morte na grande maioria dos países, assim como no Brasil, atingindo principalmente a população adulta e idosa. Segundo o último censo realizado no Brasil em 2010, observou-se um crescimento da população idosa. Esse dado está intimamente relacionado com um potencial aumento de pacientes em risco ou portadores de DCV (Bocchi EA et al., 2009). A via final comum de diversas doenças que afetam o coração é a insuficiência cardíaca, considerada um dos mais importantes desafios para o Sistema de Saúde, tratando-se de um problema epidêmico em progressão (Bocchi EA et al., 2009). Dentre os diferentes grupos de causas, as doenças do aparelho circulatório apresentam índices de 30,69% do total das causas de morte no Brasil (DATASUS, 2012). Dentre as DCV mais prevalentes, estão as doenças isquêmicas, como é o caso da doença arterial coronariana, seguida de infarto do miocárdio, a qual é a principal causa de morte isolada no país, responsável pela morte de 104.345 brasileiros no ano de 2012 (DATASUS, 2012). Pacientes que sobrevivem ao infarto do miocárdio apresentam remodelamento do miocárdio remanescente, caracterizado por alterações estruturais, eletrofisiológicas, bioquímicas, celulares e moleculares, em cardiomiócitos e não-cardiomiócitos, culminando na insuficiência cardíaca (Burchfield JS et al., 2013). Sendo o remodelamento um evento complexo, intervenções terapêuticas são necessárias para atuar amplamente sobre os mecanismos patofisiológicos, objetivando reduzir a progressão para a insuficiência cardíaca, preservando a qualidade de vida das pessoas acometidas.

#### **1.1.1. Remodelamento cardíaco patológico pós-infarto do miocárdio**

O infarto do miocárdio (IM) é uma cardiomiopatia isquêmica que ocorre por uma deficiência de perfusão do tecido cardíaco, levando à necrose miocárdica. Entre as principais complicações dessa patologia estão a disfunção contrátil do ventrículo esquerdo, as arritmias, o tromboembolismo, a disfunção dos músculos papilares e a insuficiência cardíaca congestiva (Bocchi EA et al., 2009). Em resposta à lesão isquêmica, com perda de tecido contrátil, o coração remanescente é exposto a uma maior carga de trabalho. Com isso, ocorrem eventos adaptativos do coração para manter sua função de bomba, preservando assim a vida do indivíduo. Em fases iniciais desta doença, ocorrem adaptações compensatórias, mantendo

uma boa funcionalidade do coração. Porém, a progressão da doença causa disfunção cardíaca, sendo este o período descompensado, culminando no desenvolvimento de insuficiência cardíaca (ver figura 1) (Burchfield JS et al., 2013).

Os eventos que ocorrem no tecido cardíaco após um dano isquêmico, seguido de sobrecarga de pressão nas câmaras cardíacas e de respostas dos sistemas neuro-humorais, causam o remodelamento cardíaco patológico. Este remodelamento envolve um complexo mecanismo de alterações, tais como morte celular dos cardiomiócitos, crescimento dos miócitos que culmina em hipertrofia cardíaca, processo inflamatório, dilatação das câmaras ventriculares e acúmulo de colágeno, causando fibrose tecidual (Mill JG et al., 2011; González A et al., 2011; Burchfield JS et al., 2013; Heusch G et al., 2014). Esses eventos são os responsáveis pela resposta inicial compensatória do coração para manter a funcionalidade, principalmente a resposta de hipertrofia dos cardiomiócitos remanescentes. A resposta hipertrófica, após o infarto do miocárdio, visa à manutenção do débito cardíaco. Esta resposta, inicialmente, pode ser considerada como um processo benéfico, uma vez que permite ao coração se adaptar ao aumento do estresse de parede, ocasionado pela sobrecarga mecânica (Francis J et al., 2001). No entanto, um longo período de hipertrofia pós-infarto predispõe à disfunção ventricular, progredindo para a insuficiência cardíaca (Pfeffer MA et al., 1985).

Além disso, o remodelamento cardíaco patológico após infarto do miocárdio é acompanhado por perda ainda maior de cardiomiócitos no tecido remanescente à área isquêmica, por processos de morte celular, como a ativação de apoptose e modificações no processo de autofagia (Dorn II, 2009; Abbate A & Narula J, 2012). A taxa de morte dos cardiomiócitos no tecido remanescente é preditor da severidade do remodelamento cardíaco, o qual determinará a velocidade de progressão para a insuficiência cardíaca (Abbate A & Narula J, 2012). Essa perda de células viáveis leva à dilatação e à disfunção ventricular (Baines CP et al., 2005). A dilatação das câmaras ventriculares, torna sua geometria mais esférica, resultando em importantes alterações para o músculo cardíaco, como o aumento do estresse de parede e da necessidade energética, favorecendo a ativação dos processos de morte celular (Dorn GW, 2007). Além da morte de células cardíacas, ocorre a deposição de matriz extracelular, aumentando os níveis de fibrose no coração, causando prejuízo na contratilidade e distúrbios no ritmo cardíaco (Burchfield JS et al., 2013). O aumento do conteúdo de tecido fibrótico ocorre pela maior atividade dos fibroblastos cardíacos, os quais, sob estímulos estressores e neuro-humorais, proliferam e se diferenciam, produzindo mais colágeno dos tipos I e III e fibronectina. (Distefano G, Sciacca P, 2012; Burchfield JS et al., 2013). A perda de cardiomiócitos por morte celular e o processo de fibrose tecidual têm sido considerados os

principais determinantes da progressão da compensação para a descompensação cardíaca durante o remodelamento cardíaco (Abbate A & Narula J, 2012; Distefano G, Sciacca P, 2012).

Somado a estes fatores, o processo inflamatório crônico é, também, um componente que apresenta um papel importante sobre o remodelamento ventricular, pois sua constante ativação favorece a progressão da disfunção cardíaca (Mill JG et al, 2011, Burchfield JS et al., 2013). No entanto, a resposta inflamatória é um processo fisiológico fundamental para manutenção da homeostasia e processo cicatricial, principalmente, após uma situação de dano tecidual (Anzai T, 2013).

O remodelamento vascular também contribui para o processo de adaptação ou mal-adaptação cardíaca, pois se a circulação coronariana colateral não acompanha o crescimento da massa cardíaca, bastante observado em situações de estímulo patológico, isso contribui para a ativação de processos de morte celular (Burchfield JS et al., 2013).

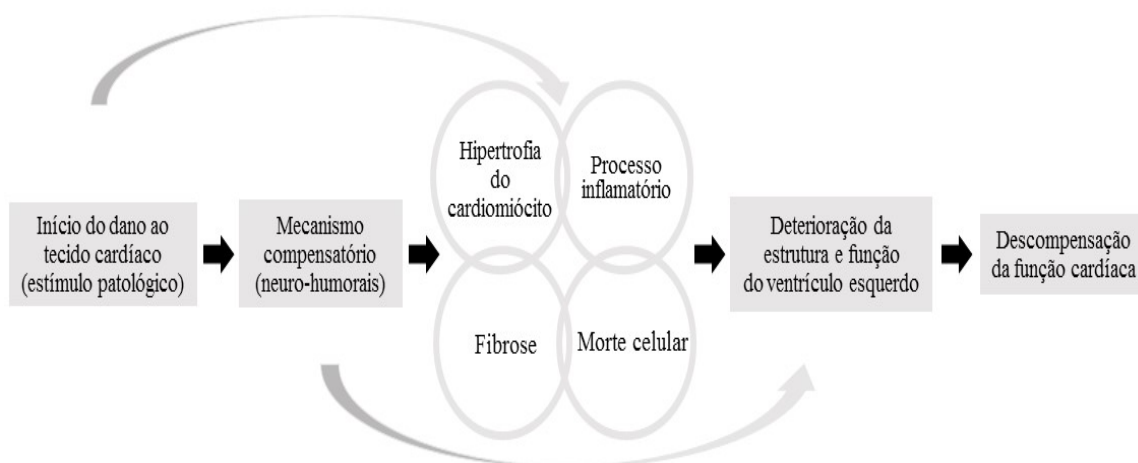


Fig  
ure 1: Patogênese da insuficiência cardíaca. Eventos que envolvem a progressão da fase compensada para a descompensada da insuficiência cardíaca (figura adaptada de Gonzáles A et al., 2011; Burchfield JS et al., 2013).

Sendo o remodelamento cardíaco patológico um mecanismo complexo, a busca de estratégias terapêuticas que possam reduzir os eventos que compreendem este processo, podem contribuir para evitar a progressão para a insuficiência cardíaca. Estudos demonstram que as estratégias médicas convencionais para o tratamento da insuficiência cardíaca não atingem ou focam na redução das origens dos eventos envolvidos na patogênese da disfunção cardíaca, que levam à redução do tecido cardíaco viável e funcional (Gonzáles A et al., 2011; Distefano G & Sciacca P, 2012). No entanto, estratégias como a utilização de inibidores da enzima conversora de angiotensina (captopril) e de bloqueadores do receptor de angiotensina

(losartan) protegem o coração e reduzem a velocidade de progressão para a disfunção. Porém, os efeitos destes fármacos sobre o coração são secundários à atuação sobre sistemas neuro-hormonais, que consequentemente, estão associados com atenuação dos processos do remodelamento cardíaco (González A et al., 2011; Onodera H et al., 2005; Moller EJ & Singh D, 2006; Díez J et al., 2002).

O desenvolvimento de novas estratégias que possam modular o processo de remodelamento cardíaco patológico pode ser explorado em modelo experimental de infarto do miocárdio. Ratos submetidos a infarto agudo do miocárdio, realizado através da técnica de ligadura da artéria coronária descendente anterior, apresentam redução na função contrátil do ventrículo esquerdo, aumento no diâmetro das câmaras ventriculares, modificação das pressões intraventriculares, aumento da síntese e deposição de colágeno, morte celular e inflamação, caracterizando o processo de remodelamento cardíaco patológico (Schenkel PC et al., 2010; Mill JG et al., 2011).

## **1.2. MORTE CELULAR**

A perda de cardiomiócitos, além daqueles que sofreram morte por necrose na fase aguda do infarto, é um dos eventos-chave que influenciam o remodelamento cardíaco após um dano (Qin F et al., 2005). Além disso, a morte celular está envolvida na patogênese de muitas das DCV (Whelan RS et al., 2010). Sendo assim, investigar ações que possam reduzir a ativação de vias de morte, pode ser útil para prevenir ou reduzir a progressão do remodelamento cardíaco patológico. Os mecanismos de morte de cardiomiócitos observados no remodelamento cardíaco são apoptose, necrose e morte ativada por autofagia (Whelan RS et al., 2010).

### **1.2.1. Apoptose**

A apoptose é uma forma de morte celular programada, na qual estímulos internos e externos à célula podem ativar proteínas intracelulares que culminam na ativação do processo de morte (Whelan RS et al., 2010). O processo de degeneração e de fragmentação da célula em resposta ao mecanismo apoptótico não gera inflamação, uma vez que ocorre a e formação dos corpos apoptóticos, sendo estes fagocitados por macrófagos.

A apoptose pode ser controlada e ativada por duas distintas vias de sinalização, chamadas de controle intrínseco e extrínseco, sendo que ambas vias culminam na ativação das caspases – família de proteases (Whelan RS et al., 2010). A ativação da via intrínseca envolve a mitocôndria e o retículo endoplasmático, e a via extrínseca é disparada por receptores da membrana celular. A via intrínseca é a responsável por transmitir a maioria dos estímulos apoptóticos, sendo esta via ativada por estresse oxidativo, dano oxidativo ao DNA, membranas e proteínas, toxinas, inadequação de nutrientes e fatores de sobrevivência (Trachootam D et al., 2008). Ao nível mitocondrial, proteínas da família da Bcl-2 controlam a permeabilidade das membranas mitocondriais, mantendo em seu interior agentes pró-apoptogênicos (Trachootam D et al., 2008). A permeabilidade é controlada pelo balanço entre proteínas anti-apoptótica Bcl-2 e pró-apoptótica Bax. A Bcl-2 além de evitar a abertura dos poros de transição na membrana mitocondrial, protege as células contra o estresse oxidativo, e a Bax promove a abertura de poros, permitindo que proteínas como o citocromo *c*, alcancem o citoplasma, ativando as caspases, consideradas indicadores do processo apoptótico (Trachootam D et al., 2008; Whelan RS et al., 2010; Abbate A & Narula J, 2012). A via extrínseca é especializada na transdução de sinais extracelulares, onde moléculas ativadoras do processo reconhecem receptores específicos, localizados na membrana plasmática, os quais ativam a via das caspases no interior da célula (Whelan RS et al., 2010). A via das caspases compreende as caspases-2, 8, 9 e 10, as quais são ativadas inicialmente, culminando na ativação das caspases efetoras do processo de morte, que são as caspases-3, 6 e 7.

Além destas duas vias de ativação de apoptose, uma terceira via pode contribuir ou ser a causa do processo de ativação da morte celular programada, a qual ocorre quando há uma perda da homeostasia do processo de autofagia (Lavandero et al., 2013).

### **1.2.2. Autofagia**

Autofagia é um processo de manutenção do ambiente intracelular em que organelas não-funcionais e proteínas modificadas ou danificadas são degradadas no interior de autofagolissomas. Os produtos da degradação são utilizados como nutrientes para a maquinaria celular, sendo isso associado como uma resposta para manter a sobrevivência (Whelan RS et al., 2010). Nas células cardíacas, a autofagia é responsável por uma resposta de sobrevivência dos cardiomiócitos expostos a diversas formas de estímulos danosos e estressores, como por exemplo (Lavandero S et al, 2013). Sendo assim, níveis basais de

autofagia são essências para a manutenção da homeostasia dos cardiomióitos e da função cardíaca.

A autofagia é controlada por uma via de sinalização, onde a proteína cinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK – *AMP-activated protein kinase*) participa sobre a ativação deste processo. A AMPK atua como um sensor do estado energético celular, coordenando uma resposta metabólica geral intracelular, assim como ativando o processo autofágico para que a degradação de componentes intracelulares (proteínas e lipídeos) sejam disponíveis para geração de energia (Beauloye C et al., 2011). A AMPK pode então atuar sobre a *Ren* (ULK), uma proteína cinase que controla os processos iniciais da formação dos autofagossomas. Finalmente, ocorre a ativação da *Microtubule-associated protein 1 light chain 3* (isoformas LC3-I (16 kDa) e LC3-II (14 kDa)), proteína associada as vesículas autofágicas (Lavandero S et al., 2013). As proteínas LC3 indicam ativação do processo autofágico, uma vez que a conversão na LC3-II, isoforma ligada às membranas dos autofagolissomas, indica formação das vesículas (Kabeya Y et al., 2000).

A autofagia está sendo associada como causadora de cardiomiopatia em estudos experimentais e clínicos (Zhu H et al., 2009). A falha deste processo frente a situações de estresse, além de poder causar ativação de morte celular, contribui para o processo de transição de uma resposta compensada para descompensada do coração, no remodelamento cardíaco patológico (Beauloye C et al., 2011; Zhang et al., 2008). Além disso, a autofagia pode reduzir a hipertrofia dos cardiomiócitos, a fibrose intersticial e a apoptose das células cardíacas, que ocorrem no remodelamento cardíaco pós-infarto (Matsushima S et al., 2006). É, também, um mecanismo que deve ser mais explorado para entender melhor seu papel na fisiologia e na patofisiologia das doenças que acometem o coração.

A morte celular dos cardiomiócitos está intimamente relacionada com o estado redox intracelular, sendo que estados mais oxidados são relacionados com a atiação destes processos (Figura 2) (Trachootam D et al, 2008). Sendo assim, o estresse oxidativo é considerado um alvo terapêutico nas doenças que acometem o coração, uma vez que este está envolvido na piora progressiva da função cardíaca e no remodelamento patológico (Hori M et al., 2009; Singal PK et al., 2005).

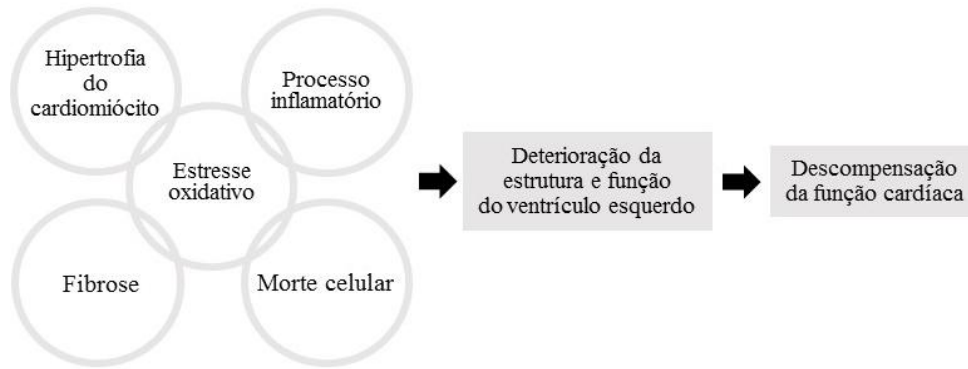


Figure 2: Estresse oxidativo envolvido nos eventos do remodelamento cardíaco, contribuindo na patogênese da insuficiência cardíaca.

### 1.3. ESTRESSE OXIDATIVO NO TECIDO CARDÍACO

#### 1.3.1. Dano oxidativo e defesas antioxidantes

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e de defesas antioxidantes em favor dos primeiros, podendo levar à lesão tecidual e modificações na sinalização redox e vias de controle específicas (Kaul N et al., 1993; Jones DP, 2006).

Muitos dos agentes oxidantes surgem da ação catalítica de enzimas e processos de transferência de elétrons que ocorrem normalmente no metabolismo celular e levam à produção de radicais livres (Kaul N et al., 1993). Radical livre é qualquer espécie química (átomo ou molécula) capaz de existir independentemente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados, em qualquer orbital, normalmente no mais externo (Gutteridge JM & Halliwell B, 2000). São, portanto, reativos e capazes de iniciar reações em cadeia por extrair um elétron de moléculas próximas e completar seus próprios orbitais (Grieve et al., 2004). Sua interação com moléculas biológicas como aminoácidos, carboidratos, lipídios e DNA pode levar a danos irreversíveis a essas estruturas (Jones DP, 2006).

O metabolismo do oxigênio é a uma das principais fontes de radicais livres, no qual, aproximadamente, 5% do oxigênio consumido pelas células é reduzido de forma monovalente, gerando intermediários reativos conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) (Kaul N et al., 1993). As maiores fontes intracelulares geradoras de EROs são a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, as NADPH oxidases, a xantina oxidase e a óxido nítrico sintase desacoplada (Afanas'ev I, 2011; Poljsak B, 2011).

A redução monovalente do oxigênio molecular leva à formação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Este radical possui uma meia-vida relativamente curta e limitada capacidade de difusão. Em pH ácido este ânion é protonado à forma de  $HO_2^{\bullet}$  que é mais tóxica às



membranas devido a sua grande lipofilicidade. A enzima superóxido dismutase (SOD) atua dismutando o  $O_2^{\bullet-}$  em um não radical, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Em mamíferos, existem 3 isoformas da SOD: a mitocondrial que contém manganês (Mn-SOD), a citosólica que contém cobre e zinco (Cu-Zn-SOD) e a extracelular que também contém Cu-Zn (EC-SOD) (Poljsak B, 2011). O  $H_2O_2$  tem meia-vida relativamente longa e pode atravessar as membranas celulares e percorrer distâncias consideráveis, causando danos em alvos distantes de sua origem (Kaul N et al., 1993). É reduzido pela catalase ou por peroxidases, como a glutathione peroxidase (GPx) (Grieve DJ et al., 2004; Murphy MP et al., 2011). A GPx é considerada a principal removedora de  $H_2O_2$  e hidroperóxidos lipídicos (Trachootam D et al., 2008). A GPx utiliza a glutathione reduzida (GSH) como um agente redutor para levar o  $H_2O_2$  à água, sendo a GSH modificada para sua forma oxidada (GSSG). Na simples presença de metais de transição como  $Fe^+$  e  $Cu^{++}$ , o  $H_2O_2$  é reduzido à radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e íon hidroxil ( $OH^-$ ). O  $OH^{\bullet}$  é altamente reativo, com tempo de meia-vida muito curto e apresenta limitada capacidade de difusão. Dessa forma, modifica estruturas próximas ao seu sítio de geração, principalmente por abstração de hidrogênios de ligações insaturadas. A adição de um quarto elétron juntamente com um próton leva à formação de  $H_2O$  (Kaul N et al., 1993).

A GSH, peptídeo mais abundante intracelular, além de ser um cofator para a atividade das enzimas antioxidantes, atua como um varredor direto de EROs. Somado a isso, outro sistema antioxidante tiol-dependente é o sistema tioredoxina. Estes sistemas tiol contribuem para o “tamponamento redox” intracelular (Trachootam D, et al, 2008). Ainda, existem as peroxirredoxinas que são um grupo de peroxidases que, juntamente com a GPx, contribuem para a redução do  $H_2O_2$  (Golbidi S et al., 2012).

Além disso, algumas enzimas podem atuar atenuando o estresse oxidativo, através de sua própria ação ou da ação de seus subprodutos. Neste contexto, a heme oxigenase (HO) é uma enzima que metaboliza a degradação do heme, gerando produtos como a biliverdina, ferro livre e monóxido de carbono (CO). O heme, na sua forma livre, pode catalisar a amplificação da geração de EROs, favorecendo o dano oxidativo intracelular e causando disfunção celular e tecidual (Kim YM et al., 2011). Através da enzima biliverdina redutase, a biliverdina é rapidamente metabolizada à bilirrubina e o ferro livre é prontamente sequestrado pela ferritina (Paine A et al., 2010).

Em humanos, existem duas isoformas, a HO-2 (constitutiva) e a HO-1 (induzível) também conhecida por HSP-32. A HO-1 é uma isoforma cuja atividade e expressão aumentam em situações de perda da homeostasia, como durante o estresse oxidativo (Yeh CH et al., 2009). Estudos têm demonstrado que a estimulação da HO-1 apresenta efeitos

citoprotetores, os quais são relacionados à ação dos produtos destas enzimas (Kim G et al., 2011). Os subprodutos CO e bilirrubina podem mediar efeitos protetores quando em determinadas concentrações, visto que seu acúmulo causa toxicidade. A biliverdina e a bilirrubina apresentam fortes efeitos antioxidantes no organismo, tanto por atuarem como varredoras diretas das EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERN), assim como por inibirem a enzima NADPH oxidase, suprimindo sua ação pró-oxidante (fonte de ânion superóxido) (Kim G et al., 2011). Uma vez que a biliverdina atua como potente antioxidante, isso acaba representando, também, um efeito anti-inflamatório, quebrando o ciclo vicioso estresse oxidativo-inflamação (Kim YM et al., 2011; Khaper N et al., 2010). O subproduto CO, em níveis fisiológicos, apresenta profundos efeitos em processos intracelulares, com ação anti-inflamatória, anti-proliferativa e anti-apoptóticos (Kim YM et al., 2011). No entanto, há estudos que mostram que o CO pode apresentar ações desfavoráveis, como contribuir para a formação de EROs (Kim YM et al., 2011). Com isso, é o balanço de diversos fatores que irá determinar se o efeito do CO será de ação protetora ou não.

No tecido cardíaco, a HO-1 apresenta-se como uma proteína-chave para a preservação e manutenção da função cardíaca, principalmente em situações patológicas. Estudos experimentais têm demonstrado que a HO-1 tem efeitos cardioprotetores e anti-apoptóticos em corações com insuficiência cardíaca, sendo o mecanismo de ação relacionado com a geração de gás CO como molécula sinalizadora (Foo RS et al., 2006; Wang G et al., 2010; Piantadosi CA et al., 2008). O CO participa deste mecanismo de ação via inibição da p53, assim como supressão da produção de EROs por macrófagos em diferentes modelos e tipos celulares (Liu XM et al., 2002; Wang G et al., 2010). Em relação às ações anti-apoptóticas, a HO-1 parece atuar principalmente sobre a via intrínseca de ativação de morte celular (via mitocondrial) (Wang G et al., 2010). Porém, não há grande número de evidências na literatura sobre os efeitos da HO-1 em modelos crônicos de remodelamento cardíaco e insuficiência cardíaca (Wang G et al., 2010). Estudos clínicos também já estão demonstrando associação da ação da HO-1 com diferentes situações patológicas; no entanto, não há sólidas informações sobre sua ação e uso terapêutico (Grebellus F et al 2002; Xia WF et al., 2011). Já estão descritas diversas substâncias que são capazes de ativar a HO-1; no entanto, muitos dos estudos desenvolvidos apresentam fatores que podem dificultar a aplicabilidade clínica, como por exemplo, doses utilizadas que causaram toxicidade (Abraham NG & Kappas A, 2008). Além disso, estas substâncias em doses terapêuticas, como a aspirina e a sinvastatina, não foram capazes de estimular a HO-1 em indivíduos saudáveis (Bharucha AE et al., 2014). A terapia gênica para estimulação da HO-1 também tem apresentado efeitos positivos ao nível

experimental, mas existe o risco de aumentar a incidência de câncer (Abraham NG & Kappas A, 2008). Em indivíduos saudáveis, já foi demonstrado que o hemina (porfirina) aumenta a expressão e a atividade da HO-1, porém com administração intravenosa (Doberer D et al., 2010; Bharucha AE et al., 2014). Compostos naturais, como a curcumina, o resveratrol e o sulforafano apresentam efeito estimulador sobre a HO-1 (Abraham NG & Kappas A, 2008). No entanto, ensaio clínico com indivíduos saudáveis, utilizando curcumina (curcumin C3 complex<sup>®</sup>), não estimulou a HO-1 em células sanguíneas mononucleares (Klickovic U et al., 2014). Por outro lado, estudos com sulforafano vêm demonstrando capacidade de estimular a HO-1 em ambos tipos de estudos, experimentais e clínicos (Conzatti A et al., 2014). Cabe ressaltar que a ativação constante de sistemas compensatórios pode não apresentar os mesmos efeitos benéficos quando induzida de forma aguda, podendo esta ativação causar efeitos prejudiciais ao tecido (exemplo: citocinas inflamatórias) (Wang G et al., 2010).

Além das enzimas citadas, existem também as enzimas de detoxificação de fase II, as quais têm um papel importante na biotransformação de moléculas, inativando substratos potencialmente danosos, aumentando sua solubilidade e facilitando sua excreção (Halliwell B et al., 2006). A maioria dessas enzimas são transferases e entre elas se encontram as glutatona S-transferases (GSTs). As glutatona S-transferases são um grupo de enzimas multifuncionais que catalisam reações de conjugação da GSH com vários grupos de substratos, como metabólitos tóxicos endógenos, compostos químicos exógenos e radicais superóxido, apresentando assim, um importante papel na proteção contra toxicidade e estresse oxidativo. A manutenção da GSH em diferentes compartimentos celulares também é regulada pelas GSTs (Boddupalli S et al., 2012; Raza H, 2011).

As defesas antioxidantes contribuem para manter em baixas concentrações as EROs, as quais são moléculas de sinalização para a homeostasia intracelular. Em concentrações elevadas, seja por produção excessiva ou por falha dos sistemas antioxidantes, surge o estresse oxidativo (Lee J et al., 2012). Tem sido demonstrado que a diminuição dos níveis de EROs e do dano oxidativo aos componentes moleculares intracelulares está associada com a manutenção da função cardíaca após infarto do miocárdio (Khaper N et al., 2001; Hill MF et al., 2005; de Castro AL et al., 2013). A principal estratégia para reduzir o estresse oxidativo e, consequentemente, o dano oxidativo é aumentar as proteínas e enzimas antioxidantes endógenas (Hori M et al., 2009). No entanto, diversos estudos clínicos randomizados, com intervenções exógenas para redução do estresse oxidativo, não apresentaram resultados positivos, como seria esperado (Ye Y et al, 2013). As possíveis explicações para a ausência de efeitos positivos podem estar associadas com o inadequado conhecimento sobre as

modificações das fontes das ERO durante as doenças, escolha de estratégias antioxidantes não apropriadas, assim como por um incompleto entendimento da variabilidade individual das defesas antioxidantes em humanos (Sawyer D, 2011).

A expressão de um grande número de enzimas e proteínas antioxidantes endógenas é controlada por fatores de transcrição, como o Nrf-2 (*NF-E2-related factor 2*) e o PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1  $\alpha$* ). O Nrf-2 é considerado o regulador máximo da resposta celular antioxidante, induzindo a transcrição de enzimas de fase II e antioxidantes intracelulares, como a HO-1, a NADPH quinona oxirredutase, a GST, a catalase, entre outras (Dinkova-Kostova AT & TalalayP, 2008; Juge N et al., 2007). Em situações basais, o Nrf-2 fica ancorado no citoplasma pela proteína Keap1 (*Kelch-like ECH association protein 1*), formando um complexo com a Culina 3, uma ligase sinalizadora para degradação proteossomal por ubiquitinação do Nrf-2. Alterações do estado redox ou a ação de proteínas cinases promovem a dissociação do complexo Keap-1/Nrf-2/Cul3, permitindo que o Nrf-2 fique livre para translocar ao núcleo e se ligar ao ARE (elemento responsivo a antioxidantes) (Guerrero-Beltrán CE et al., 2012; Hybertson BM et al., 2011; Boddupalli S et al., 2012).

O cofator de transcrição PGC-1 $\alpha$ , considerado o regulador da biogênese mitocondrial e do metabolismo energético, também contribui para o controle da expressão de antioxidantes endógenos. O PGC-1 $\alpha$  atua principalmente em tecidos com alta capacidade oxidativa, como o tecido cardíaco (Fink B & Kelly DP, 2007). Por estimular os processos oxidativos mitocondriais, a fim de aumentar a produção de energia para suprir a demanda metabólica, este fator também ativa mecanismos antioxidantes, buscando manter a homeostasia redox (Fink B & Kelly DP, 2007). Recentes estudos têm demonstrado que o PGC-1 $\alpha$  é importante estimulador das defesas antioxidantes mitocondriais do tecido cardíaco, como a Mn-SOD, a peroxirredoxina, a tioredoxina e a glutarredoxina (Lu Z, 2010; Valle I et al, 2005), contribuindo para a proteção contra o estresse oxidativo no tecido cardíaco.

#### **1.4. PROTEÍNAS REDOX SENSÍVEIS ENVOLVIDAS NO REMODELAMENTO CARDÍACO**

Os processos de remodelamento cardíaco são controlados por vias de sinalização intracelular que coordenam respostas de sobrevivência e de morte celular. Muitas das proteínas que participam destas vias de sinalização sofrem regulação redox (Trachootam D et al., 2008). Os principais mecanismos redox que controlam a função das proteínas ocorrem por

oxidação de aminoácidos como cisteína, tirosina e metionina, os quais apresentam grupos tióis em sua estrutura, alvos de oxidação e de redução (Trachootam D et al., 2008). Em geral, moderados níveis de oxidação, devido a uma elevação modesta nas concentrações de EROs e ERN, funcionam como sinais que promovem sobrevivência celular, enquanto que o aumento severo dessas espécies pode induzir morte celular (Trachootam D et al., 2008). Estudos demonstram que, estágio compensado da hipertrofia cardíaca, a reserva antioxidante tecidual é aumentada, enquanto que, em um estágio descompensado/insuficiente do músculo cardíaco, essa reserva encontra-se reduzida. Essa redução compromete o balanço redox e, conseqüentemente, favorece o estresse oxidativo (Singal PK et al., 1999).

As vias de sinalização das MAPKs (proteínas cinase ativadas por mitógeno) e da PI3K/Akt estão envolvidas nas respostas dos cardiomiócitos frente a situações de estresse, coordenando suas adaptações em situações de sobrecarga mecânica, metabólica e redox (McMullen JR & Jennings GL, 2007; Schenkel PC et al., 2010).

As MAPKs são uma família de proteínas cinases que compreendem a ERK1/2, a JNK1/2 e a p38, sendo estas duas últimas referidas como proteínas cinases ativadas por estresse, as SAPKs (*Stress-activated protein kinases*). Geralmente, a ERK 1/2 promove sobrevivência celular sob estresse oxidativo leve a moderado, estando relacionada com crescimento e diferenciação celular (Muslin AJ, 2008). A ERK1/2 tem sido diretamente associada com hipertrofia cardíaca sem presença de fibrose (Muslin AJ, 2008; Bueno OF et al., 2000). Por outro lado, as SAPKs estão relacionadas com morte celular em resposta a danos oxidativos (Trachootam D et al., 2008). Em resposta ao estresse oxidativo, a JNK e a p38 induzem ambas as vias intrínseca e extrínseca de morte celular e necrose (McCubrey JA et al., 2006). A indução da apoptose pela JNK e pela p38 envolve fosforilação direta das proteínas da família da Bcl-2, as quais controlam a permeabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a via intrínseca da apoptose (Matsusawa A & Ichijo H, 2005; Baines CP & Molkentin JD, 2005). A ativação das três MAPKS, em conjunto, tem sido associada com resposta mal adaptativa do tecido cardíaco, uma vez que isso é observado em modelos de sobrecarga de pressão induzida por coarctação aórtica (Asrih M et al., 2013).

Já a via da PI3K/Akt fosforila um grande número de substratos intracelulares que regulam o crescimento, o metabolismo e a sobrevivência celular (Debosch BM et al., 2006). A via da PI3K/Akt também é regulada por moderados níveis de estresse oxidativo, os quais modulam esta via para adaptação e sobrevivência celular (Trachootam D et al., 2008). A atividade da Akt está relacionada com atenuação do remodelamento cardíaco patológico (Matsui T & Rosenzweig A, 2005; Schenkel PC et al., 2012) e sinalização nos processos de

hipertrofia fisiológica (McMullen JR & Jennings GL, 2007). Cabe salientar que estas vias de ativação podem apresentar efeitos contrários aos classicamente observados. Por exemplo, a ativação crônica ou super-expressão da Akt pode também apresentar consequências mal adaptativas ou deletérias (O'Neill, BT & Abel ED, 2005; Araujo AS et al., 2008, Fernandes RF et al., 2011). As cinases p38 e JNK podem participar de sinalizações para crescimento e sobrevivência, em situações em que não há estresse oxidativo (Muslin AJ, 2008). No entanto, estas últimas observações são encontradas com menor frequência nos estudos científicos.

A regulação específica de vias de sinalização intracelular pelas EROs é reconhecida como um importante contribuinte para a patofisiologia da insuficiência cardíaca, influenciando a resposta hipertrófica, remodelamento da matriz extracelular, disfunção cardíaca e viabilidade celular (Hafstad AD et al., 2013). Os recentes avanços no entendimento da complexidade dos eventos nos quais as EROs participam para modular o processo de remodelamento cardíaco, como observado pós-infarto do miocárdio, contribuem para a proposição de novas terapias para combater os processos mal adaptativos.

## **1.5. PAPEL DO SULFORAFANO COMO AGENTE CARDIOPROTETOR**

O sulforafano (1-isotiocianato-(4R)-(metilsulfinil)butano) é um composto bioativo encontrado em vegetais crucíferos, principalmente no broto de brócolis, repolho, couve de bruxelas, dentre outros (Fahey JW & Talalay P, 1999; Angeloni C et al., 2009). Em estudos com isotiocianatos, no início dos anos 90, observou-se que o sulforafano, isolado do brócolis, era o maior indutor das enzimas de fase II com propriedades quimioprotetoras *in vivo* (Zhang Y et al., 1992). Esses vegetais, por serem constituídos por compostos que podem ser benéficos para a saúde, são chamados alimentos funcionais. Pesquisas mostram ainda que podem atuar como agentes preventivos, assim como complementares e auxiliares nos tratamentos de doenças (Heber D, 2004; Conzatti A et al., 2014). O uso do sulforafano já tem sido utilizado em modelos experimentais e em estudos clínicos, apresentando resultados positivos em relação a marcadores de estresse oxidativo (Murashima M et al., 2004; Conzatti A et al., 2014). Segundo Evans (2011) existem evidências de que o consumo regular de vegetais crucíferos promove ação preventiva para reduzir risco de DCV (Evans PC, 2011).

Os efeitos benéficos deste composto estão classicamente relacionados com a ativação da via de sinalização da Keap-1/Nrf-2/ARE (Dinkova-Kostova AT & Talalay P, 2008). Além disso, o sulforafano está também associado à ativação do fator de transcrição PGC-1 $\alpha$  (Negrette-Guzmán M et al., 2013). Estas duas vias de sinalização estimulam a transcrição dos

genes de proteínas antioxidantes e de enzimas detoxificadoras de fase II, aumentando a reserva de antioxidantes endógenos (Fahey JW & Talalay P, 1999). Conseqüentemente, este composto favorece o combate contra moléculas pró-oxidantes (ERO, ERN, dentre outras), importantes agentes envolvido na patogênese de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Trachootam D et al., 2008).

Estudos desenvolvidos contra o câncer foram os pioneiros a observarem os efeitos benéficos do uso do sulforafano, os quais comprovaram que este composto apresenta efeitos anti-carcinogênicos (Fahey JW & Talalay P, 1999; Jude N et al., 2007). Além disso, sulforafano pode prevenir a inflamação vascular e a aterosclerose (Evans PC, 2011). No entanto, investigações da ação do sulforafano sobre processos de DCV estão começando a ser investigados. Um estudo demonstrou que este isotiocianato aumenta a expressão de enzimas antioxidantes em células cardíacas em cultura, sendo esta resposta relacionada à redução dos níveis de EROs (Angeloni C et al., 2009). Além disso, foi evidenciado que o sulforafano apresenta mecanismo de ação que envolve a via da Akt em cardiomiócitos neonatos (Leoncinie E et al., 2011). Estes achados têm encorajado o uso do sulforafano como agente nutracêutico para combater doenças cardíacas. No entanto, o entendimento da ação deste composto sobre outras vias de sinalização, como as pertencentes às MAPKs, faz-se necessário.

Nos últimos anos, estudos têm demonstrado efeito benéfico do sulforafano em modelos experimentais. Em modelo animal de cardiomiopatia diabética, o sulforafano foi capaz de prevenir e reverter a disfunção cardíaca (Bai Y et al, 2013; Zhang Z et al, 2014), assim como na cardiomiopatia observada em camundongos com a síndrome da imuno deficiência adquirida (AIDS) (Ho JN et al., 2012). O sulforafano demonstrou proteger também o tecido cardíaco transplantado, aumentando a sobrevida dos animais que receberam o coração, estando este efeito relacionado com a cardioproteção contra o dano induzida pela isquemia-reperusão (Wu W et al. 2013; Li et al, 2013). No entanto, o papel do sulforafano sobre o remodelamento cardíaco após infarto agudo do miocárdio, a maior causa de morte mundial (Heusch G et. al. 2014), ainda não foi investigado.

## **2. HIPÓTESE**

A hipótese deste estudo foi que o sulforafano estimula as defesas antioxidantes endógenas do tecido cardíaco, reduzindo o estresse oxidativo e consequente ativação de vias de morte celular, contribuindo para a melhora do remodelamento cardíaco patológico pós-infarto do miocárdio.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo Geral**

Estudar o efeito do uso de sulforafano como um agente estimulador das defesas antioxidantes endógenas em células cardíacas em cultura, assim como no tecido em processo de remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio, em modelo experimental com ratos. Neste contexto, focar a relação do estresse oxidativo com a modulação de vias de sinalização para a sobrevivência e morte celular, assim como do processo de autofagia.

### **3.2. Objetivos Específicos**

#### ***Estudo in vitro***

- Investigar o efeito de diferentes concentrações de sulforafano sobre células cardíacas, na ausência de estímulo estressor, analisando sua resposta sobre a viabilidade celular;
- Avaliar o efeito do sulforafano sobre marcadores de estresse oxidativo (peroxidação lipídica e espécies reativas totais), sobre defesas antioxidantes enzimáticas e sobre a expressão da proteína heme oxigenase-1, em células cardíacas;
- Avaliar se o sulforafano modula vias de morte e sobrevivência celular em células cardíacas;

#### ***Estudo in vivo***

- Estabelecer a administração de sulforafano, por via intraperitoneal, em animais submetidos ou não ao modelo de infarto do miocárdio, por ligadura da coronária descendente anterior;
- Avaliar parâmetros ecocardiográficos em ratos infartados e não-infartados, submetidos ou não a administração de sulforafano;



- Avaliar o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e parâmetros de congestão de órgãos em ratos infartados e não-infartados, submetidos ou não a administração de sulforafano;
- Quantificar o conteúdo de colágeno cardíaco, através de análise histológica do coração dos ratos infartados e não-infartados, submetidos ou não a administração de sulforafano;
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo no coração de ratos infartados e não-infartados, submetidos ou não a administração de sulforafano;
- Avaliar a expressão de proteínas miocárdicas redox sensíveis envolvidas com sobrevivência e morte celular no coração de ratos infartados e não-infartados, submetidos ou não a administração de sulforafano;
- Avaliar a expressão de proteínas envolvidas com o processo de autofagia no coração de ratos infartados e não-infartados, submetidos ou não a administração de sulforafano;

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

**NOTA: Análises bioquímicas e moleculares comuns aos estudos *in vitro* e *in vivo* estão descritas no item 5.3.**

### **4.1. ESTUDO *IN VITRO***

#### **4.1.1. Cultura celular de linhagem**

Mioblastos cardíacos de linhagem H9c2 (células embrionárias de ventrículo de rato; adquiridas da empresa ATCC) foram cultivados em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 10% soro fetal bovino e 1% antibiótico-antimicótico (penicilina 10,000 U/mL, estreptomicina 10,000 µg/mL, 25 µg/mL de Fungizone®) e incubados a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 100% umidade. Para a manutenção do cultivo da linhagem celular, o meio de cultura era trocado a cada 2 a 3 dias e as novas passagens celulares eram realizadas quando as células atingiam confluência de aproximadamente 75-85%, objetivando a manutenção das características mioblásticas.

Para os protocolos experimentais, as células eram semeadas nas seguintes quantidades: 1x10<sup>4</sup> células/poço para o ensaio de viabilidade celular por MTT; 2x10<sup>5</sup> células/frasco T-25 para as análises no citômetro de fluxo; 8x10<sup>5</sup> células por placa de 10 cm para as análises por western blot e PCR em tempo real. Uma vez semeadas, as células foram deixadas em repouso (24 -30 horas) para aderirem à placa e atingirem a confluência desejada.

O período de tratamento com o composto sulforafano teve duração de 24 horas de incubação e foi realizado com meio de cultura livre de soro fetal bovino.

#### **4.1.2. Grupos experimentais**

Dois grupos experimentais foram estabelecidos para o primeiro estudo:

- Controle – células H9c2 foram mantidas somente com o meio de cultura DMEM, contendo o veículo DMSO (0,017% v/v).
- Sulforafano – células H9c2 que foram mantidas com meio de cultura DMEM, contendo 5 µmol/L de R-sulforafano (TRC, Canada).

A concentração de 5  $\mu\text{mol/L}$  de SFN foi determinada através da análise da viabilidade celular (**item 4.1.3**), onde as células foram expostas a variações da concentração de 1, 5, e 10  $\mu\text{mol/L}$ . Baseado nos resultados encontrados, foi determinado que a concentração de 5  $\mu\text{mol/L}$  foi a que apresentou maior viabilidade celular, sendo esta concentração escolhida para a realização dos demais experimentos.

#### **4.1.3. Viabilidade celular**

A viabilidade das células cardíacas foi determinada pelo ensaio do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio). Para essa técnica, as células foram semeadas em placas de 96 poços e, após aderência na placa, foi iniciado o tratamento dos grupos experimentais. Passadas 20 horas de incubação com as diferentes condições de tratamento, a solução de MTT foi adicionada em cada poço (concentração final de MTT 10% (v/v)), e incubada por mais 4 horas. Ao final da incubação, as soluções foram aspiradas cuidadosamente. Foram adicionados 0,05 mL de DMSO por poço, para dissolver os cristais formados pela reação. Após 10 min de incubação, a absorbância foi quantificada a 570 nm (650 nm comprimento de onda de correção) em leitora Zenyth 200rt (Biochrom Inc, UK). Os dados foram expressos como porcentagem do controle (Bryan S et al, 2011).

#### **4.1.4. Preparo das células para análise da atividade das enzimas antioxidantes**

Após 24 horas de incubação das células, as placas de 10 cm eram lavadas 3 vezes com tampão fosfato. Após isso, com a placa sobre o gelo, foram adicionados 0,4 mL de tampão fosfato (10 mmol/L, pH 7,4) contendo 2,7 mmol/L KCl, 137 mmol/L NaCl, and 1 mmol/L PMSF para raspar e coletar as células da placa. O homogeneizado celular foi submetido a 5 ciclos de congelamento-descongelamento, e após centrifugado à 8000 x g por 10 minutos, 4°C, para coleta do sobrenadante.

Técnicas das atividades enzimáticas descritas no **item 5.3**.

#### **4.1.5. Detecção de EROs em células cardíacas através de citometria de fluxo**

A quantificação das EROs totais foi realizada após a incubação das células com DCFH-DA (Sigma-Aldrich, USA), molécula que é permeável na membrana plasmática e, quando oxidada por ERO intracelulares, transforma-se em DCF, composto fluorescente que fica

sequestrado no interior celular (não permeável na membrana). O sequestro deste composto é mensurado por citometria de fluxo - Accuri C6 BD, FL-1 channel, como descrito em Bryan S et al. (2011) e Mallik A et al. (2011). O resultado foi expresso como média  $\pm$  D.P.

#### **4.1.6. Isolamento e quantificação do RNA**

O RNA total foi extraído das células H9c2 utilizando o kit UltraClean tissue RNA isolation (MoBio Laboratories, Carlsbad, USA), segundo protocolo do fabricante. A integridade e a concentração do RNA foram determinadas pelo sistema Experion semi-automated electrophoretic (Bio-Rad, Hercules, USA) (Shewchuk LI et al., 2010).

#### **4.1.7. Quantificação por PCR em tempo real**

O RNA (1  $\mu$ g) foi transcrito reversamente à cDNA utilizando o *Kit First Strand cDNA Synthesis* (MBI Fermentas, Flamborough, ON, CAN), segundo protocolo do fabricante. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando os *primers* para o peptídeo natriurético atrial (ANP): sense: 5'-TGCCGGTAGAAGATGAGGTC-3'; antisense: 5'-ATTCACCACCTC TCAGTGGC-3') (Anestopoulos I et al., 2013), e o gene de referência da  $\beta$ 2-microglobulina (SuperArray, Frederick, MD, USA). Foi utilizado, para isso, o termociclador iQ5 iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), segundo protocolo e sugestão do fabricante: 1 ciclo de 95°C/10 min, seguido de 45 ciclos de 95°C/15 segundos, e 60°C/60 segundos. As *relative fold changes* foram calculadas como sugerido por convenção: alterações no limiar do ciclo da amostra em relação à expressão do gene de referência ( $\beta$ -2-microglobulina). (Shewchuk LI et al., 2010). Os valores foram expressos como número de vezes de aumento ("*fold changes*") em relação ao grupo controle, e calculados como média de 3 experimentos independentes.

#### **4.1.8. Atividade da caspase-3/7 por citometria de fluxo**

A apoptose celular foi mensurada através da presença de caspase-3/7 ativas, detectadas pelo Kit CaspaTag caspase-3/7 Assay (Chemicon, Temecula, USA), segundo o protocolo do fabricante. Células positivas para caspase-3/7 ativadas foram mensuradas através de citometria de fluxo (FACScalibur, BD) baseado na fluorescência após a incubação com o inibidor da caspase-3/7 peptídeo fluorometil cetona marcado com carboxifluoresceína (Bryan

S et al., 2011). Os dados foram expressos como intensidade de fluorescência na área M2 do histograma, segundo sugerido pelo protocolo do fabricante.

#### **4.1.9. Análise estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  D.P. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student (Software GraphPad Prism 5.01). Valores com  $P < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### **4.2. ESTUDO *IN VIVO***

O estudo *in vivo* foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRGS, registrado pelo número: 26627.

#### **4.2.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso médio de  $347 \pm 18$  gramas. Os animais foram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Durante o período do estudo, os animais foram alojados no biotério setorial do Departamento de Farmacologia, localizado no prédio do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Os ratos foram mantidos em caixas plásticas de 270 x 260 x 310 mm, com quatro ratos cada, com o assoalho recoberto com serragem. Os ratos receberam alimentação e água à vontade e foram mantidos sob ciclo claro-escuro de 12/12 horas, sob temperatura de 22°C.

#### **4.2.2. Grupos experimentais**

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- Grupo sham (*SHAM*) – ratos submetidos ao procedimento cirúrgico, com exceção da ligadura da artéria coronária descendente anterior. Receberam administração i.p. do veículo de diluição do composto SFN: NaCl 0,9% + 0,5% DMSO (v/v).

- Grupo infarto do miocárdio (*MI - myocardial infarction*) – ratos submetidos ao procedimento cirúrgico com ligadura da artéria coronária descendente anterior. Receberam administração i.p. do veículo de diluição do composto: NaCl 0,9% + 0,5% v/v DMSO (v/v).

- Grupo sham + sulforafano (*SHAM+SFN*) – ratos submetidos ao procedimento cirúrgico, com exceção da ligadura da artéria coronária descendente anterior. Receberam administração i.p. do sulforafano, durante 25 dias.

- Grupo infarto do miocárdio + sulforafano (*MI+SFN*) – ratos submetidos ao procedimento cirúrgico com ligadura da artéria coronária descendente anterior. Receberam administração i.p. do sulforafano, durante 25 dias.

#### 4.2.3. Desenho experimental

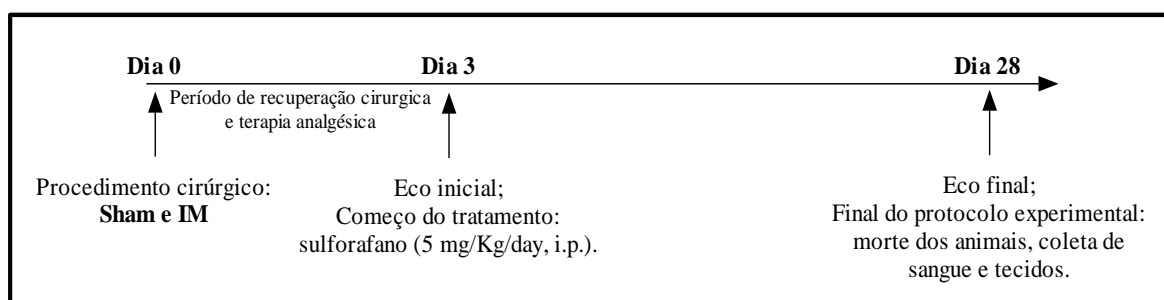


Figura 3: Desenho experimental do estudo *in vivo*.

#### 4.2.4. Procedimento cirúrgico de indução do infarto do miocárdio

O procedimento de infarto do miocárdio foi induzido de acordo com o que está descrito na literatura e adaptado ao laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS (Schenkel PC et al., 2010; de Castro A et al., 2014). Os ratos foram anestesiados (90 mg/kg cetamina e xilazina 20 mg/kg, i.p.) e realizado tricotomia na região do hemitórax esquerdo. A assepsia do local foi feita com gaze estéril embebida em álcool 70%, seguida de solução de iodo 2%, e o excesso de iodo, foi removido novamente com o álcool 70% (Silva DAR et al., 2000). Os animais foram então colocados em decúbito dorsal e entubados com cânula traqueal (Gelko-14G) e ventilados com ventilador para roedores com volume constante. Um pequeno corte foi realizado no 5º espaço intercostal, seguido de rompimento do pericárdio para visualização do coração, sem exteriorizá-lo. Uma vez observada a artéria coronária descendente anterior, foi

realizada sua oclusão no seu ramo superior, utilizando fio mononylon 6.0. Após a ligadura da coronária, a incisão torácica foi fechada (fio mononylon 5.0) e o pneumotórax foi reduzido mediante aspiração do ar com agulha e seringa, e a pele suturada. Ratos dos grupos SHAM também passaram por todos os passos do procedimento cirúrgico, sendo a linha apenas transpassada ao redor da artéria, mas não ocluída. Após a cirurgia, com os ratos retornando do anestésico, a intubação era removida no momento em que os animais começavam a “brigar” com a ventilação. Uma vez extubados, os ratos foram colocados em local aquecido, e foi iniciada intervenção analgésica para alívio da dor e desconforto. Foi utilizada analgesia opioide com tramadol (5mg/Kg, 8-8horas, i.p.), durante os primeiros 3 dias pós-cirúrgico (Santos RP et al., 2012), sendo os ratos monitorados diariamente.

Este procedimento é considerado com grau de severidade severo.

A taxa de mortalidade no presente estudo foi de 10%, as quais ocorreram apenas nas primeiras 24 horas após procedimento cirúrgico.

Nota: analgésicos e anti-inflamatórios não-esteroides (AINES) não foram utilizados neste projeto experimental para alívio da dor, pois os efeitos anti-inflamatórios destes fármacos podem vir a alterar os resultados das análises bioquímicas, assim como modificar a resposta de remodelamento cardíaco após lesão.

#### **4.2.5. Tratamento com sulforafano**

O tratamento com o sulforafano (R-S-Sulforaphane – LKT Laboratories - USA) foi realizado durante 25 dias, com injeções diárias de 5 mg/Kg (i.p.). Esta dose de administração foi baseada em um estudo realizado com modelo *ex-vivo* de isquemia-reperfusão do coração isolado de rato, no laboratório de Fisiologia Cardiovascular - UFRGS. Neste estudo, foi administrado 0,5 mg/Kg (i.p.) de sulforafano, durante 3 dias, antes do protocolo experimental (Piao CS et al., 2010). No entanto, não foi observada melhora em parâmetros funcionais dos corações. Sendo assim, foi decidido aumentar a concentração em 10 vezes do sulforafano para realização do presente estudo.

O sulforafano foi preparado em soro fisiológico contendo 0,5% DMSO (v/v).

O volume injetado i.p. nos animais, da solução com sulforafano ou da solução com veículo, durante o período de estudo, ficou em torno de 0,47 a 0,65 mL. Evitou-se que o volume das soluções excedesse 1 mL por aplicação (orientação das veterinárias do CREAL/UFRGS e segundo descrito no manual: “Investigating the Laboratory Rat Manual” – Office of Research Services - University of Manitoba, Canadá.

Este procedimento é considerado com grau de severidade moderado, pelo longo período de tratamento.

#### **4.2.6. Avaliação hemodinâmica por ecocardiografia**

Para a análise ecocardiográfica, os ratos foram anestesiados (cetamina 90 mg/kg e xilazina 20 mg/kg, i.p.) e colocados em posição de decúbito lateral esquerdo, para obter imagens cardíacas. A aquisição de imagens ecocardiográficas foi realizada por meio de um sistema de ultra-som Philips HD7 XE, com um transdutor L12-13 MHz. As imagens foram avaliadas por operador experiente. Foram medidos o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE, cm) e sistólico final (DSFVE, cm), a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a diástole (PPVED, cm) e durante a sístole (PPVES, cm) e a frequência cardíaca (batimentos/min), utilizando-se o módulo M, no plano basal, médio e apical (Nozawa E et al., 2006; de Castro A et al, 2013). O índice de tensão da parede (WTI) foi medido como:  $WTI = DDFVE / 2 \times PPVED$ . Além disso, a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (EF%), calculada como:  $EF = (\text{volume diastólico final} - \text{volume sistólico final}) / \text{volume diastólico final} \times 100$ , e mudança de área fracional (FAC, %), medida como:  $FAC = (\text{área diastólica} - \text{área sistólica}) / \text{área diastólica} \times 100$ , foram utilizadas para determinar, respectivamente, a função contrátil e a função sistólica do ventrículo esquerdo (Nozawa E et al., 2006). O tamanho da área de infarto (AI) foi estimado como  $AI\% = (I / PE) \times 100$ , onde I representa a medição do plano transversal do arco correspondente aos segmentos com infarto e EP representa o perímetro total do endocárdio (EP), medido no final de diástole (Tavares AM et al., 2010).

A análise ecocardiográfica é considerada um procedimento de severidade leve.

#### **4.2.7. Morte dos animais e coleta de tecidos**

Após as avaliações hemodinâmicas, ainda sob efeito anestésico, foi coletado sangue arterial via artéria carótida, e imediatamente, os animais foram mortos através de decapitação por guilhotina, realizado por profissional treinado. O grau de severidade é sem recuperação.

O tecido cardíaco foi retirado, lavado em solução gelada de KCl 1,15%, os átrios foram removidos. Foi aferido o peso da massa cardíaca e, após isso, uma fatia transversal foi removida para a análise histológica (terço médio do coração – fatia com espessura de aproximadamente 0,5 cm). A cicatriz da região infartada foi removida e o restante do tecido



cardíaco foi armazenado à -80°C para a realização das análises bioquímicas e de biologia molecular.

Foram removidos também o tecido pulmonar, hepático.

#### **4.2.8. Avaliação dos índices morfométricos**

O índice de hipertrofia cardíaca (IHC) foi calculado utilizando a massa ventricular do coração, sem a presença dos átrios. Uma vez que não houve diferenças significativas no peso corporal dos ratos ao longo do experimento, o peso corporal foi utilizado com normalizador para o IHC. O índice foi calculado como se segue:

$$\text{IHC} = \text{peso coração (mg)} / \text{peso corporal final (g)}.$$

Os índices de congestão pulmonar (ICP) e hepática (ICH) fornecem dados indicativos da presença de insuficiência cardíaca congestiva. O peso seco dos órgãos foi obtido após secagem à 65°C, até ser obtido peso constante do tecido.

$$\text{ICH} = \text{peso úmido fígado (mg)} / \text{peso seco do fígado (g)}$$

$$\text{ICP} = \text{peso úmido pulmão (mg)} / \text{peso seco do fígado (g)}$$

#### **4.2.9. Enzimas hepáticas**

O sangue arterial foi centrifugado 1000 x g, 10 min, 4°C, e o soro foi utilizado para realizar a mensuração das enzimas hepáticas: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (kit da Kovalent Ltda), e a fosfatase alcalina (ALP) (Kit da Labtest Diagnóstica SA - Brasil), de acordo com o protocolo dos fabricantes.

#### **4.2.10. Análise histológica do tecido cardíaco**

Uma fatia transversal da região central do coração (~0,5 cm) foi fixada em solução saturada de Bouin (12 horas, temperatura ambiente), criopreservada utilizando solução de sacarose (15% e 30%, 24 horas cada - 4°C) e após incorporada em Tissue Tek OCT para realizar os cortes em criostato (10 µm). As secções histológicas foram coradas com 0,1% Sirius Red (Direct Red 80, Sigma Aldrich), durante 30 segundos à temperatura ambiente, lavou-se uma vez com água, contra corada com hematoxilina de Harris (15 min, temperatura ambiente), desidratados e cobertos com Bálsamo Canadense. A fim de estimar o teor de

colágeno cardíaco, os cortes histológicos foram digitalizados usando um microscópio Olympus BX 50 acoplado à câmera de vídeo. Foi utilizado o software Imagem Pro-Plus 6.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). A área ocupada por esses tecidos foi estimada, utilizando o método de contagem de pontos (Weibel ER, 1979; Zacharová G & Kubinová L, 1995; De Paula S et al., 2009; Rodrigues FS et al., 2013; Alvarez OS et al., 2014). Duas imagens histológicas do ventrículo esquerdo de cada animal foram digitalizadas e um sistema de teste ponto, composto por cruces equidistantes, foi colocado sobre as imagens. Quando o quadrante superior direito da cruz atingia a imagem de músculo cardíaco, colágeno ou dos vasos sanguíneos, estes eram contados. A percentagem da área ocupada por cada tecido foi obtida usando a seguinte equação:

Percentagem de área ocupada pelo tecido = (Número de cruzamentos contados na imagem de tecido/número total de cruzamentos contados na imagem) x 100.

Os cruzamentos localizados em artefatos histológicos não foram contados, como se observa na figura 2.

#### **4.2.11. Homogeneização do tecido cardíaco para as técnicas bioquímicas de estresse oxidativo e para biologia molecular por western blot**

Para a realização das análises de estresse oxidativo, as fatias de coração foram homogeneizadas durante 40 segundos em Ultra-turrax com KCl 1,15% + PMSF 100 mmol/L. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 20 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada à 4°C (Modelo Mikro 220R, Hettich Zentrifugen) e os sobrenadantes foram separados e congelados em freezer -80°C para posteriores análises (Llesuy S et al., 1985).

Para a realização das análises por western blot, as fatias de coração foram homogeneizadas em Ultra-turrax, utilizando Cell Lyses Buffer 10x (Cell Signaling Technology, USA), seguindo as orientações do fabricante do produto. Após centrifugados, os sobrenadantes foram armazenados para análise.

#### **4.2.12. Quantificação das ERO totais em homogeneizado de tecido**

Quantificação das ERO totais foram mensuradas através da emissão de fluorescência do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, EUA). O DCFH-DA em contato com as EROs é oxidado à molécula fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF). O

DCFH-DA é considerado um indicador geral de espécies reativas, reagindo com  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{ONOO}^-$ , hidroperóxidos lipídicos e em menor extensão com  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Uma vez que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é um produto secundário do  $\text{O}_2^-$ , a fluorescência a partir do DCF tem sido utilizada para estimar a produção de  $\text{O}_2^-$ .

O homogeneizado cardíaco foi incubado em tampão fosfato contendo DCFH-DA, e a reação foi mensurada após 30 min de incubação no escuro, à temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram excitadas à 488 nm e a emissão foi coletada à 525nm. Foi utilizado DCF para realizar curva de calibração. O resultado foi expresso em nmoles/mg proteína (Lebel et al., 1992).

#### **4.2.13. Análise estatística**

A avaliação da normalidade (distribuição Gaussiana) dos dados foi realizada através do método de Kolmogorov e Smirnov. Os dados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Todos os resultados foram analisados por ANOVA de 2 vias, com exceção das análises da progressão da função cardíaca que foi analisada com teste *t* pareado. Foi utilizado o post-hoc de *Student Newman Keuls*. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### **4.3. ANÁLISES BIOQUÍMICAS E DE BIOLOGIA MOLECULAR COMUNS PARA AMBOS OS EXPERIMENTOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

#### **4.3.1. Quantificação de proteínas**

A quantificação da concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (Lowry OH et al., 1951) ou Proteína DCTM Assay (Bio Rad), segundo instruções do fabricante, utilizando albumina de soro bovino como padrão.

#### **4.3.2. Atividade das enzimas antioxidantes**

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi baseada na reação da inibição da auto-oxidação do pirogalol, mensurada em espectrofotômetro a 420 nm, como descrito em Marklund S (1985). Foi feita uma curva padrão, utilizando as concentrações de 0; 0,25; 0,5 e

1 unidade de SOD (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO*), através da qual pode ser obtido o fator de correção para converter a percentagem de inibição da auto-oxidação em unidades de enzima. A atividade da enzima foi expressa em U /mg de proteína (Marklumb S, 1985).

A atividade da enzima catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, realizado por análise espectrofotométrica, utilizando comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos em nmoles/min/mg de proteína (Aebi H, 1985).

A atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) foi mensurada pelo consumo de NADPH na reação em que a GPx utiliza para realizar a reação de hidroperóxidos com glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG). Os resultados foram expressos em nmoles/min/mg de proteína (Flohé L & Gunzler WA, 1984).

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi medida através da reação com cloro-dinitro-benzeno (CDNB), sendo a conjugação deste com GSH, e gerando a formação do composto corado dinitro-fenil-glutathione. A reação é mensurada espectrofotometricamente a 340 nm. A atividade da GST foi expressa em nmoles/minuto/mg proteína (Mannervik B & Gluthenberg C, 1981).

#### **4.3.3. Quantificação de peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica foi determinada através da reação de quimiluminescência iniciada por t-BOOH (hidroperóxido de tert-butil). A reação de quimiluminescência foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation spectofotometer-1215, Bromma, Sweden) com o circuito de coincidência desconectado e utilizando o canal de trítio. Os dados foram quantificados em contagens por segundo por miligrama de proteína, segundo descrito por Gonzalez Flecha B et al. (1991).

#### **4.3.4. Quantificação de expressão proteica por western blot**

Western blot foi usado para analisar o imunoconteúdo de proteínas no tecido cardíaco e nas culturas dos mioblastos cardíacos. A eletroforese foi realizada em gel de acrilamida-bis 8-15%, de acordo com o tamanho da proteína de interesse. O gel foi carregado com 30 µg de proteína em um sistema de mini-gel vertical (Bio-Rad). As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore), em tanque mini-transblot ou no Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Transfer Cell. As membranas foram bloqueadas em

5% de leite em pó preparado em TBS-T (Tampão TRIS - 20 mmol/L, 137 mmol/L de NaCl, pH 7,4, com 0,1% de Tween-20). As membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários específicos (lista abaixo). Os anticorpos primários ligados foram detectados utilizando anticorpo secundário horseradish anti-rabbit e anti-mouse peroxidase (HRP)-conjugated preparados em TBS-T 5% de leite (1: 1000-1: 5000); incubou-se durante 2 horas à temperatura ambiente. As membranas foram desenvolvidas utilizando o reagente quimiluminescente. Alguns Western blots foram detectados utilizando ECL Hyper Film, revelados em um sistema preparado manual com um revelador radiográfico e fixador Kodak, preparado de acordo com as instruções do fabricante. As imagens de *hyper films* foram capturadas no aparelho ImageQuant 350 (GE Healthcare Biosciences), e quantificadas utilizando o software ImageJ 1.74t (National Institute of Health, USA). Em outros, as imagens fluorescentes da membrana foram capturadas utilizando o aparelho ChemiDoc MP (BioRad), e quantificadas utilizando o software Quantity one<sup>®</sup> (BioRad). Os dados foram expressos como a média da densidade óptica. As proteínas normalizadoras utilizadas foram a anti- $\beta$ -actina e anti- $\beta$ -tubulina (Santa Cruz Bio.). Em alguns casos, utilizou-se o Ponceau Red (Laemmli, 1970; Klein, 1995) para normalização de carga.

Os anticorpos primários utilizados foram: da empresa Santa Cruz Biotechnology: CuZn-SOD, HO-1, Bax, Bcl-2, phospho-p38 (Thr180), p38, PGC-1, JNK, p-JNK, Akt, p-Akt, Nrf-2, JNK, phospho-JNK (Thr183, Tyr185), phospho-Akt1/2/3 (Ser473); da empresa Abcam: GPx; da empresa Cell Signaling: caspase-3, phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), ERK 1/2, phospho-AMPK (Thr172), AMPK, e LC3B; da empresa Millipore: Mn-SOD, Anti-Akt; da empresa Sigma Aldrich: Catalase.

#### **4.4. Descarte de materiais biológicos e químicos**

As carcaças dos animais mortos e os demais resíduos biológicos foram acondicionados em sacos brancos, identificados e levados ao biotério setorial da Morfologia, local onde há um freezer onde são acondicionadas as carcaças. Após, os técnicos do CREAL ficaram responsáveis por orientar o recolhimento pela empresa especializada no serviço de coleta de materiais biológicos. Os materiais tóxicos foram usados na capela e encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para sua correta eliminação. Todos os procedimentos com os animais e análises posteriores foram feitos com

uso de avental, luva cirúrgica, máscara (se necessário), respeitando os devidos cuidados para proteção tanto dos animais como do pesquisador.

#### **4.5. Considerações éticas**

Todos os procedimentos desse estudo foram de acordo com:

- Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, da Constituição Federal que estabelece procedimento para o uso científico de animais (“Lei Arouca”).

- Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBAC), Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA.

## 5. RESULTADOS

Os resultados estão expressos na forma de artigo.

### **Artigo I:**

*Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1 $\alpha$  stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts*

Publicado: Molecular and Cellular Biochemistry (2015) 401:61-70

### **Artigo II:**

*Sulforaphane modulates apoptosis-related proteins and attenuates pathological cardiac remodeling post-myocardial infarction in rats*

(em desenvolvimento)

## 5.1. Artigo I

Mol Cell Biochem (2015) 401:61–70  
DOI 10.1007/s11010-014-2292-z

### Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1 $\alpha$ stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts

Rafael O. Fernandes · Jéssica H. P. Bonetto · Boran Baregzay · Alexandre L. de Castro ·  
Stephanie Puukila · Heidi Forsyth · Paulo C. Schenkel · Susana F. Llesuy ·  
Ilma Simoni Brum · Alex Sander R. Araujo · Neelam Khaper · Adriane Belló-Klein

Received: 12 August 2014 / Accepted: 26 November 2014 / Published online: 7 December 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** Sulforaphane is a naturally occurring isothiocyanate capable of stimulating cellular antioxidant defenses and inducing phase 2 detoxifying enzymes, which can protect cells against oxidative damage. Oxidative stress and apoptosis are intimately involved in the pathophysiology of cardiac diseases. Although sulforaphane is known for its anticancer benefits, its role in cardiac cells is just emerging. The aim of the present study was to investigate whether sulforaphane can modulate oxidative stress, apoptosis, and correlate with PGC-1 $\alpha$ , a transcriptional cofactor involved in energy metabolism. *H9c2* cardiac myoblasts were incubated with R-sulforaphane 5  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h. Cell viability, ANP gene expression, oxidative stress and apoptosis markers, and protein expression of PGC-1 $\alpha$  were studied. In

cells treated with sulforaphane, cellular viability increased (12 %) and ANP gene expression decreased (46 %) compared to control cells. Moreover, sulforaphane induced a significant increase in superoxide dismutase (103 %), catalase (101 %), and glutathione *S*-transferase (72 %) activity, reduced reactive oxygen species levels (15 %) and lipid peroxidation (65 %), as well as stimulated the expression of the cytoprotective enzyme heme oxygenase-1 (4-fold). Sulforaphane also promoted an increase in the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 (60 %), decreasing the Bax/Bcl-2 ratio. Active Caspase 3/7 and p-JNK/JNK were also reduced by sulforaphane, suggesting a reduction in apoptotic signaling. This was associated with an increased protein expression of PGC-1 $\alpha$  (42 %). These results suggest that sulforaphane offers cytoprotection to cardiac cells by activating PGC-1 $\alpha$ , reducing oxidative stress, and decreasing apoptosis signaling.

R. O. Fernandes · J. H. P. Bonetto · A. L. de Castro ·  
I. S. Brum · A. S. R. Araujo · A. Belló-Klein (✉)  
Laboratory of Cardiovascular Physiology, Institute of Basic  
Health Science (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul  
(UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil  
e-mail: belklein@ufrgs.br

B. Baregzay · S. Puukila  
Department of Biology, Lakehead University, Thunder Bay, ON,  
Canada

H. Forsyth · N. Khaper (✉)  
Medical Sciences Division, Northern Ontario School of  
Medicine, Lakehead University, Thunder Bay, ON, Canada  
e-mail: nkhaber@nosm.ca

P. C. Schenkel  
Department of Physiology, Federal University of Pelotas  
(UFPeI), Pelotas, RS, Brazil

S. F. Llesuy  
General and Inorganic Chemistry Division, School of Pharmacy  
and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires,  
Argentina

**Keywords** Oxidative stress · Heme oxygenase-1 · PGC-1  
alpha · Bcl-2 · Caspase

#### Introduction

Sulforaphane (1-isothiocyanate-4-[(R)-methylsulfanyl]-butane) is an important bioactive compound found in edible, low cost, tolerable and accessible vegetables, such as broccoli [1]. The role of sulforaphane as an anticarcinogenic and antiproliferative agent is well documented [1–3]. However, its role in cardiac disease conditions has just started to emerge. The major target of sulforaphane is the Nrf-2/Keap-1/antioxidant responsive element (ARE) pathway [2]. This pathway can induce cellular defense by stimulating the transcription of phase 2 enzymes such as catalase, glutathione *S*-transferase (GST), NADPH quinone



oxidoreductase, as well as other antioxidant proteins attenuating oxidative stress [1, 2]. More recently, its role as a modulator of mitochondrial function is emerging [4]. PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$ ) is considered to be the main regulator of mitochondrial biogenesis and energy metabolism [4–6]. Recent studies have demonstrated that PGC-1 $\alpha$  can regulate myocardial mitochondrial antioxidants and oxidative stress [7] suggesting that perhaps there is an interplay between sulforaphane and the transcriptional factors, Nrf-2 and PGC-1 $\alpha$ , in the regulation of antioxidant defense system. Based on its capacity in attenuating oxidative stress and up regulating antioxidants, sulforaphane offers an excellent choice for therapeutic potential in cardiac disease conditions which are the leading causes of mortality and morbidity worldwide [4].

Apoptosis is an integral component of cardiac remodeling and it can occur when the mitochondrial outer membrane becomes more permeable, releasing pro-apoptotic agents (intrinsic apoptotic pathway) [8–11]. Membrane permeability is controlled by the balance between the Bcl-2 family proteins, whereby Bcl-2 is an anti-apoptotic protein which protects cells against oxidative stress, while Bax triggers apoptosis [12]. An imbalance in favor of pro-apoptotic pathways is closely related to the activation of caspase, a hallmark of apoptosis [9, 12]. PGC-1 $\alpha$  plays a critical role in the control of energy balance, especially oxidative metabolism in cardiac cells [13, 14]. PGC-1 $\alpha$  knockout mice demonstrated development of cardiac dysfunction [15]. Moreover, sulforaphane induced PGC-1 $\alpha$  in normal human fibroblasts and spinal muscular atrophy fibroblasts [16], suggesting a role of PGC-1 $\alpha$  in cardiac cells in the presence of sulforaphane.

The goal of the present study was to investigate the effect of sulforaphane on oxidative stress and apoptosis and its correlation with PGC1- $\alpha$ .

## Materials and methods

### Reagents

Rat cardiac myoblast cells (*H9c2*) were obtained from the American Type Culture Collection (Virginia, USA). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), antibiotic–antimycotic (10,000 units/mL of penicillin, 10,000  $\mu$ g/mL of streptomycin, 25  $\mu$ g/mL of Fungizone<sup>®</sup>), and Trypsin 0.05 % were purchased from Life Technologies. R-Sulforaphane (TRC, Canada) was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, vehicle). Antibodies were purchased from Santa Cruz: polyclonal heme oxygenase-1 (HO-1), polyclonal Nrf-2, polyclonal PGC-1

alpha (H-300), Jun N-terminal kinase (JNK), phospho-JNK (Thr183, Tyr185), phospho-Akt1/2/3 (Ser473), polyclonal PI3-Kinase p110; from Cell Signaling; Bax and Bcl-2; from Millipore; Anti-Akt; from Invitrogen; monoclonal anti- $\beta$ -tubulin. Secondary antibodies rabbit anti-mouse IgG–HRP conjugate (Invitrogen) and sheep anti-rabbit IgG–HRP conjugate (Millipore). Cell lysis buffer was purchased from Cell Signaling Technology.

### Cell culture

Cells were cultivated in DMEM supplemented with 10 % FBS and 1 % antibiotic–antimycotic, and incubated at 37 °C with 5 % CO<sub>2</sub> and 100 % humidity. To maintain the cell culture, medium was changed every 2- to 3-days and cells were passaged when they reached 75–85 % confluence to preserve myoblast cell characteristics. For experimental protocols, cells were seeded at: 1  $\times$  10<sup>4</sup> cells/well for the MTT assay; 2  $\times$  10<sup>5</sup> cells/T-25 for flow cytometry analysis; 8  $\times$  10<sup>5</sup> cells/10-cm plate for enzymatic assays, western blot, and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Cells were allowed to adhere 24–30 h to achieve a desired confluence, and two experimental groups were established: *Control* (serum-free culture medium containing vehicle 0.017 % DMSO) and *Sulforaphane* (serum-free culture medium containing R-sulforaphane), cells were then incubated for 24 h prior to experiments. For the MTT assay, cells were exposed to various concentrations of sulforaphane (1, 5, and 10  $\mu$ mol/L). Based on cell viability data, 5  $\mu$ mol/L of sulforaphane was chosen for all of the experiments.

### Cellular viability

Viability of cardiac cells was determined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. For this technique, cells were seeded in 96-well microplate and after 20 h of sulforaphane treatment, MTT solution (final concentration 10 % (v/v)) was added to each well. The cells were further incubated at 37 °C for 4 h, then the supernatant was removed carefully and 50  $\mu$ L of DMSO was added to each well. After 10 min of incubation, the cytotoxicity of each treatment was quantified by determining absorbance in each well at 570 nm (650 nm correction wavelength) using a microplate reader Zenyth 200rt (Biochrom Inc, UK) [17]. Data were expressed as percentage of control.

### Isolation and quantification of total RNA

Total RNA was extracted from *H9c2* cells by using the UltraClean tissue RNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, USA) as per manufacturer's instructions. RNA

integrity and concentration was determined via the Experion semi-automated electrophoretic system (Bio-Rad, Hercules, USA) [18].

#### cDNA amplification and quantitative real-time PCR

RNA (1 µg) was reverse-transcribed to cDNA using the First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Flamborough, ON, CAN) according to manufacturer's instructions. Quantitative real-time PCR reactions were performed using atrial natriuretic peptide (ANP) (target gene: sense: 5'-TGCCGGTAGAAGATGAGGTC-3'; antisense: 5'-ATTCACCACCTCTCAGTGGC-3') [19] and β2-microglobulin (reference gene) primers (SuperArray, Frederick, MD, USA) on an iQ5 iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) according to manufacturer's instructions: 1 cycle at 95 °C/10 min, followed by 45 cycles of 95 °C/15 s; 60 °C/60 s. Relative fold change was calculated as per the convention: change in sample cycle threshold with regard to reference gene expression (β2-microglobulin). The first-derivative dissociation curves showed a single peak for every PCR reaction on all arrays, indicating that only the gene of interest was amplified [18]. Values are expressed in fold change of control group, and calculated from the average threshold cycle of 3 independent experiments.

#### Antioxidant enzymatic activities, lipid peroxidation and reactive oxygen species (ROS) determination

After 24 h of incubation with 5 µmol/L of sulforaphane, cells were scraped on ice with phosphate buffer (10 mmol/L, pH 7.4) containing 2.7 mmol/L KCl, 137 mmol/L NaCl, and 1 mmol/L PMSF. Cells were subjected to five cycles of freeze–thaw to break the membranes and the supernatant was collected after centrifugation at 8,000 ×g for 10 min at 4 °C.

Superoxide dismutase (SOD) activity was based on the inhibition of superoxide radical reaction with pyrogallol [20]. SOD activity was expressed as units per milligram of protein per minute. Catalase (CAT) activity was determined by measuring the absorption of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 240 nm and expressed as nanomoles of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced per minute per milligram of protein [21]. Glutathione S-transferase (GST) activity, expressed as nanomoles per milligram of protein, was measured by the rate of formation of dinitrophenyl S-glutathione at 340 nm [22].

Lipid peroxidation was determined by spontaneous chemiluminescence. It was measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB-Produkt AB, Sweden). Data were quantified by counts per

second per milligram of protein, and expressed as percentage of control [23].

Protein concentration of cell lysates was determined by Lowry's method [24].

To measure reactive oxygen species (ROS) concentrations, cells were incubated with DCFH-DA (Sigma-Aldrich, USA), a cell-permeant indicator of ROS. Quantification was performed by flow cytometry (Accuri C6 BD, FL-1 channel), as described by Bryan, et al. [17] and Mallik, et al. [25]. Fluorescence was expressed as mean fluorescence, after  $1 \times 10^4$  events were acquired per trial.

#### Protein expression

Western blot was used to analyze the immunoccontent of different proteins. After treatment with 5 µmol/L of sulforaphane, cells were scraped with cell lysis buffer according to manufacturer's instructions, and protein concentration was performed by Lowry's method. Electrophoresis was done with a 8–14 % bis-acrylamide gel, according to the size of the proteins of interest, and 40 µg of proteins was loaded in a mini vertical gel system (Bio-Rad). Proteins were transferred to a PVDF membrane (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore) in a mini trans-blot electrophoretic tank (Bio-Rad) [26]. The membrane was blocked in 5 % non-fat milk, Tris buffer saline (20 mmol/L Tris, 137 mmol/L NaCl). Membranes were probed with the appropriate primary antibodies (1:250–1:1,000) in Tris buffer saline with 5 % milk. Bound primary antibodies were detected using anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies prepared in Tris buffer saline with 1 % milk (1:5,000–1:10,000). Membranes were developed using chemiluminescent reagent. ECL hyper films were resolved in a manual prepared system using a radiographic revelator and Kodak fixator, prepared as per manufacturer's instruction. The loading control used was anti-β-tubulin. Images were captured in ImageQuant 350 (GE Healthcare Biosciences). Data were expressed as media of optical density quantified by the software ImageJ 1.47i (National Institute of Health, USA) and normalized to the protein loading control.

#### Active caspase 3/7

Apoptosis was measured by the presence of active caspase-3/7, detected by the CaspaTag caspase-3/7 Assay Kit (Chemicon, Temecula, USA) according to the manufacturer's protocol. Active caspase-3/7 positive cells were assessed by flow cytometry (FACScalibur, BD) on the basis of their fluorescence after incubation with a carboxyfluorescein-labeled fluoromethyl ketone peptide inhibitor of caspase-3/7 [17]. Data were expressed as fluorescence



intensity in M2 area of histogram as per the manufacturer's instructions.

#### Statistical analysis

Data were expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed using the Student's *t* test (GraphPad Prism 5.01). Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant.

## Results

### Cellular viability and ANP gene expression

Cell viability was accessed by MTT assay and it was found that treatment with 1 and 5  $\mu\text{mol/L}$  sulforaphane increased viability by 16 and 12 %, respectively, as compared to control condition (Fig. 1). The highest concentration (10  $\mu\text{mol/L}$ ) of sulforaphane induced a significant reduction in cardiac cell viability compared to control (Fig. 1). Based on these results, the concentration of 5  $\mu\text{mol/L}$  of sulforaphane was used for all the experiments. ANP gene expression in cardiac cells after treatment with 5  $\mu\text{mol/L}$  sulforaphane was decreased by 46 % when compared to control group (Fig. 2).

### Antioxidant enzymes, HO-1 protein expression and oxidative stress

To determine the role of sulforaphane on the cellular antioxidant system, antioxidant enzyme activity was analyzed. Sulforaphane (5  $\mu\text{mol/L}$ ) increased the activity of antioxidant enzymes: SOD (103 %, Fig. 3a), catalase (101 %, Fig. 3b) and, GST (72 %, Fig. 3c) as compared to

control group. Moreover, heme oxygenase-1 (HO-1) protein expression increased fourfold in sulforaphane treated cells as compared to control cells (Fig. 3d). Sulforaphane reduced lipid peroxidation by 65 % (Fig. 4a) and levels of ROS were also significantly reduced (15 %) as compared to control (Fig. 4b).

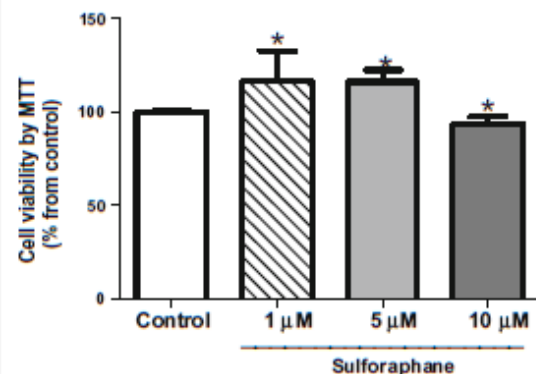
### Signaling protein expression

Pro-apoptotic Bax protein expression did not differ between control and sulforaphane treated cells (Fig. 5a). Sulforaphane increased anti-apoptotic Bcl-2 protein expression by 60 % as compared to control (Fig. 5b). Bax/Bcl-2 ratio was reduced by 31 % in sulforaphane treated cells as compared to control (Fig. 5c). Moreover, sulforaphane decreased (32 %) active caspase 3/7 as compared to control (Fig. 6). The p-JNK/JNK was reduced by 30 % in cardiac cells treated with sulforaphane compared to control (Fig. 7). PI3K/Akt survival signaling pathway was also studied. Sulforaphane did not alter any of these proteins after 24 h incubation compared to control (Fig. 8a, b).

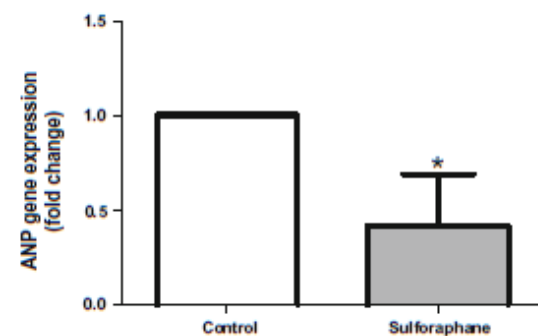
To investigate the underlying mechanisms of the cardioprotective effect of sulforaphane, protein expression of two transcriptional factors, Nrf-2 and PGC-1 $\alpha$ , was determined. There was no difference in the cytosolic expression of Nrf-2 between groups (Fig. 9a). However, sulforaphane was able to increase PGC-1 $\alpha$  protein expression (42 %) significantly compared to control cells (Fig. 9b).

## Discussion

In the present study, we have demonstrated that sulforaphane attenuated apoptosis in cardiac myoblasts. This was

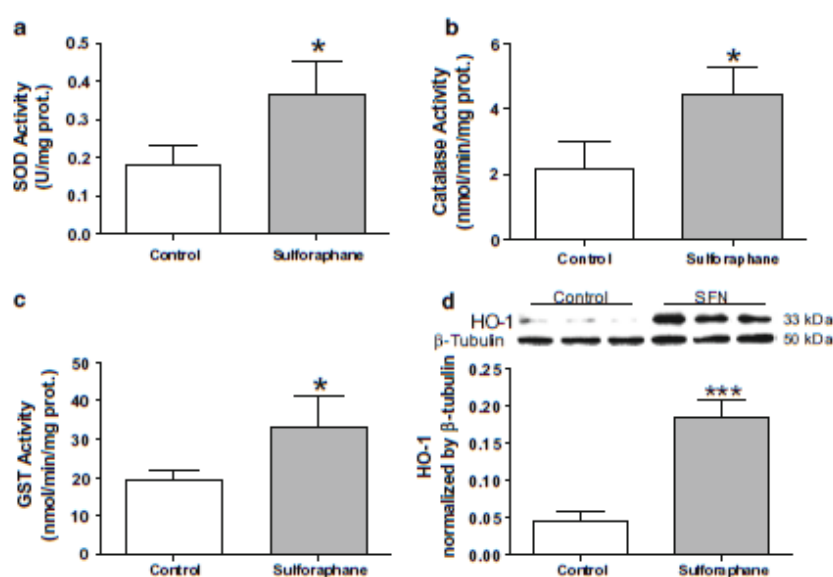


**Fig. 1** Cellular proliferation/viability assay. Colorimetric MTT assay in *H9c2* cardiac cells treated with sulforaphane (1, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) during a period of 24 h. Values are expressed as mean  $\pm$  SD from 3 to 4 independent experiments, *t* test: \* vs. Control, *P* < 0.05



**Fig. 2** Atrial Natriuretic Peptide (ANP) gene quantified by Real-Time PCR in *H9c2* cardiac cells treated with sulforaphane (5  $\mu\text{mol/L}$ ) during a period of 24 h.  $\beta$ -2-microglobulin was used as a normalizer gene. Values are expressed in fold change of control with mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments. \* vs. Control, *P* < 0.05

**Fig. 3** Antioxidant analysis in *H9c2* cardiac cells treated with sulforaphane (5  $\mu\text{mol/L}$ ) during a period of 24 h. **a** Superoxide dismutase (SOD), **b** catalase, and **c** glutathione *S*-transferase (GST) enzyme activity assays through a colorimetric assay. **d** Immunoblot of heme oxygenase-1 (HO-1) in *H9c2* cardiac cells treated with sulforaphane (SFN, 5  $\mu\text{mol/L}$ ) during a period of 24 h. Values are expressed as mean  $\pm$  SD **a**, **b**, **c**: 3 independent experiments; **d**: 6 independent experiments. Three representative bands per group are shown. *t* test: \* vs. Control,  $P < 0.05$ ; \*\*\* vs. Control,  $P < 0.001$

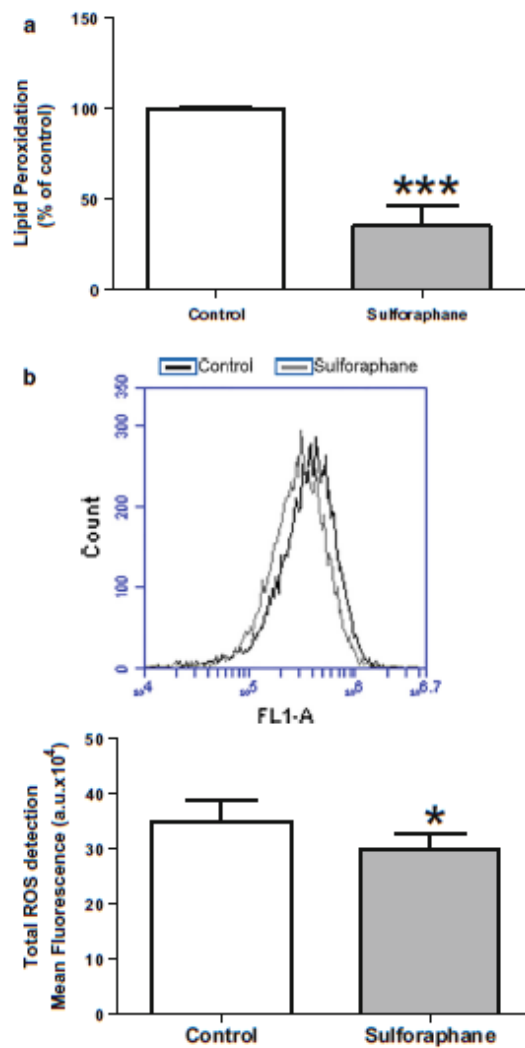


associated with reduced oxidative stress and improvement of antioxidant defenses. Moreover, sulforaphane increased the protein expression of PGC-1 $\alpha$ , a transcriptional factor involved in energy metabolism and antioxidant defense system (Fig. 10).

The concentration of sulforaphane used in this study was based on previous published studies [27, 28] as well as our own data. Sulforaphane concentrations of 1, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  were tested in *H9c2* cells, and the results demonstrated that the lower concentrations were able to preserve cell viability. 10  $\mu\text{mol/L}$  sulforaphane caused a decrease in cell viability. It has been reported that high concentrations (greater than 10  $\mu\text{mol/L}$ ) of sulforaphane induce programmed cell death by intrinsic and extrinsic apoptotic pathways [2, 29]. A high concentration of sulforaphane has been reported to damage the mitochondria leading to increased oxidative stress, energy deprivation, and release of apoptotic proteins [30]. It was reported that 10  $\mu\text{mol/L}$  sulforaphane in kidney, bronchial epithelial, and cancer cells induced cell cycle arrest, decreased viability, and caused apoptosis [27, 31, 32]. The rationale for using lower concentrations of sulforaphane in our study (5  $\mu\text{mol/L}$ ) was to obtain physiologically relevant conditions. ANP is a cardiac stress marker [15]. Corroborating with the cell viability data, ANP gene expression was decreased in cardiac myoblasts treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  sulforaphane. Two other studies using sulforaphane at lower levels showed a reduction of this cardiac stress marker [33, 34].

Sulforaphane improved antioxidant defenses by increasing SOD, catalase, and GST enzyme activities. These results clearly demonstrate that the antioxidant defense system was upregulated by sulforaphane, a compound which is not considered to be an antioxidant per se [1]. Improved antioxidant status could also attribute to reduced oxidative stress. Furthermore, the increase in HO-1 expression may have also contributed to the protective effects of sulforaphane in cardiac cells, as HO-1 is an inducible stress-response protein with antioxidant and anti-apoptotic properties [2]. Sulforaphane treatment also reduced lipid oxidative damage, another target of ROS. All these data suggest that a low concentration of sulforaphane can improve the redox environment of cardiac cells, which indicates that sulforaphane intervention could be a therapeutic option for cardiac protection.

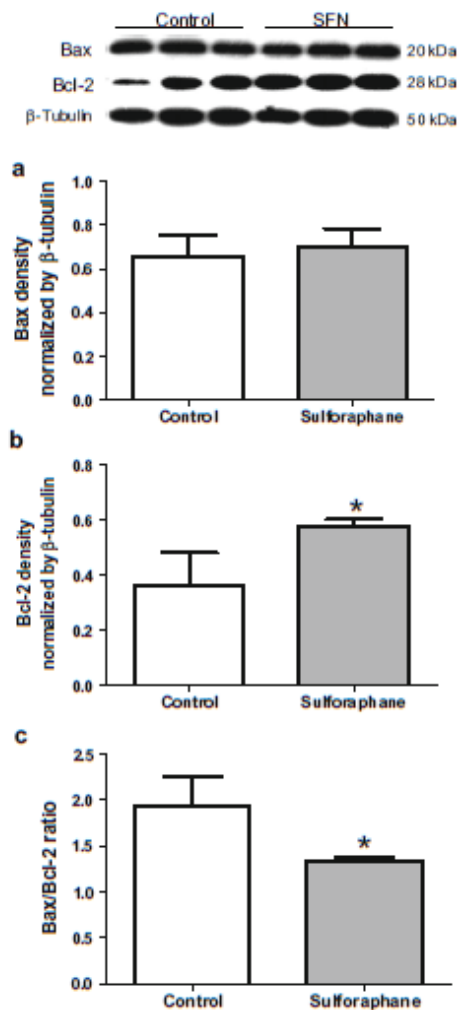
The reduction of oxidative stress by sulforaphane was associated with attenuated apoptosis as evidenced by an increase in Bcl-2 protein expression. Anti-apoptotic effects of HO-1 have also been reported in failing hearts [35] as well as in ischemia–reperfusion injury by upregulating Bcl-2 [36, 37]. Perhaps the increase of HO-1 expression by sulforaphane could contribute to reduced apoptosis as seen in our study. Active caspase 3/7 were reduced in cardiac myoblasts treated with sulforaphane, indicating a decreased activation of this apoptotic pathway. A reduction in the activation of JNK, a redox-sensitive protein kinase intimately related with apoptosis signaling [38], was also observed. Since GST is known to inhibit JNK and reduce



**Fig. 4** Oxidative stress analysis in *H9c2* cardiac cells treated with sulforaphane (5  $\mu\text{mol/L}$ ) during a period of 24 h. **a** Lipid peroxidation by spontaneous chemiluminescence (data expressed as % of control:  $3.123 \pm 1.103$  cps/mg prot.). **b** Intracellular reactive oxygen species (ROS) assay (CM-H<sub>2</sub>DCE-DA) by flow cytometer. Representative histogram indicating FL-1 fluorescence versus cell counts of ROS levels in control (black line) and sulforaphane group (gray line) (a.u.: arbitrary units; image: BD Accuri™ C6 Analysis Software). Values are expressed as mean  $\pm$  SD a: 3 independent experiments; b: 6 independent experiments, *t* test: \* vs. Control,  $P < 0.05$ ; \*\*\* vs. Control,  $P < 0.001$

oxidative stress [12, 39, 40] the decrease in JNK activation in our study could be due to an increase in GST activity.

The role of sulforaphane in inducing antioxidant response via Nrf-2 transcriptional factor is well



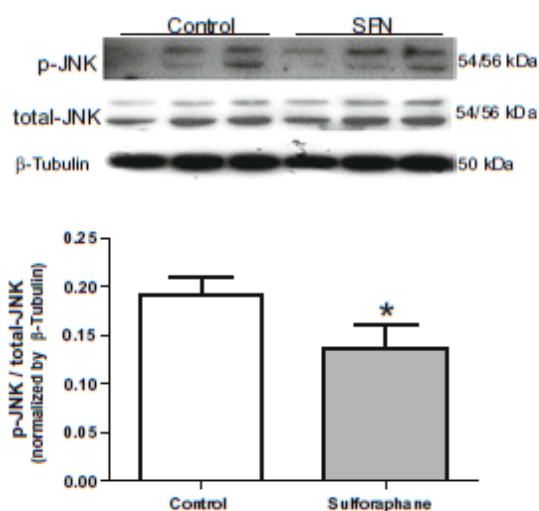
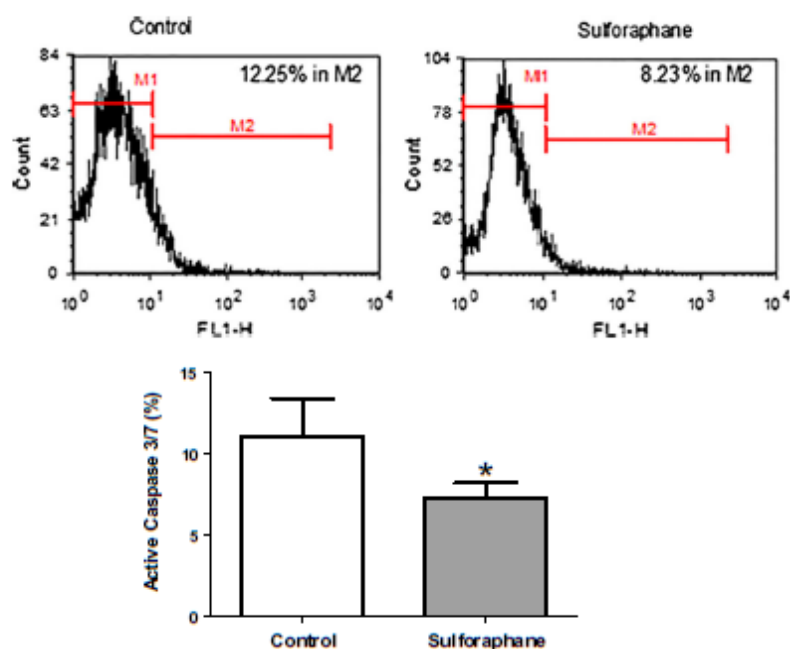
**Fig. 5** Immunoblot of **a** Bax, **b** Bcl-2, and **c** Bax/Bcl-2 ratio in cardiac *H9c2* cells treated with sulforaphane (SFN, 5  $\mu\text{mol/L}$ ) during a period of 24 h.  $\beta$ -tubulin was used for normalization. Values are expressed as mean  $\pm$  SD from 3 to 6 independent experiments. Three representative bands per group are shown. *t* test: \* vs. Control,  $P < 0.05$

documented [41]. Nrf-2 translocates to the nucleus in response to oxidative stress to activate the transcription of antioxidant genes [1]. To investigate the role of Nrf-2 in cardiac myoblasts, analysis of the total Nrf-2 protein content was performed. No alteration in Nrf-2 expression was observed after 24 h of treatment with sulforaphane. Another redox-sensitive protein, Akt, which is closely related to Nrf-2 activation [41], was also not altered in our study. These results are in support of the observation of



**Fig. 6** Active caspase-3/7 in cardiac *H9c2* cells treated with sulforaphane (5  $\mu\text{mol/L}$ ) during a period of 24 h. Fluorescence flow cytometry CaspaTag 3/7 assay indicating an abundance of active caspase-3/7.

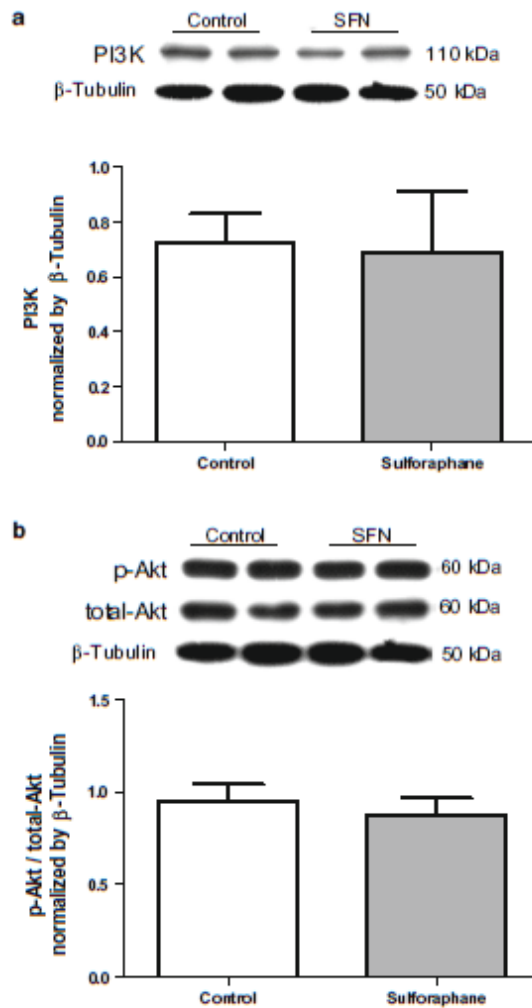
Representative histograms showing FL1 fluorescence versus cell counts of control and sulforaphane group, indicating activated caspase-3/7 (M2 area) (image: FCS4 Express, De Novo Software™). Bar graph indicates the percentage fluorescence in M2 histogram area. Values are expressed as mean  $\pm$  SD from 4 independent experiments in M2 histogram area. a.u. arbitrary units. *t* test: \* vs. Control,  $P < 0.05$



**Fig. 7** Immunoblot of phospho-JNK/total-JNK in cardiac *H9c2* cells treated with sulforaphane (SFN, 5  $\mu\text{mol/L}$ ) during a period of 24 h.  $\beta$ -tubulin was used for normalization. Values are expressed as mean  $\pm$  SD from 3 independent experiments (all experiments were repeated twice). Three representative bands per group are shown. *t* test: \* vs. Control,  $P < 0.05$

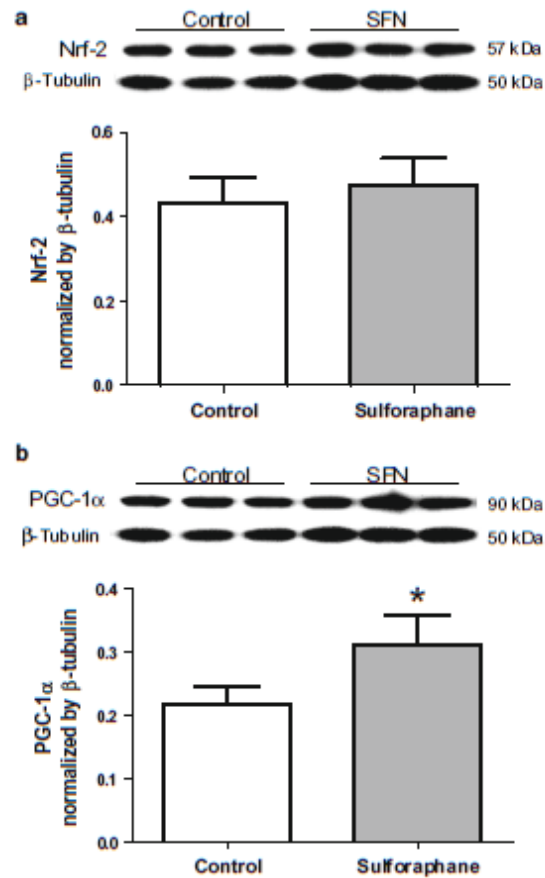
diminished ROS levels and reduced lipid peroxidation. PGC-1 $\alpha$  is another transcription factor known to be activated by sulforaphane in fibroblasts [16]. The underlying

mechanism behind upregulation of PGC-1 $\alpha$  by sulforaphane in cardiac cells remains to be investigated. PGC-1 $\alpha$  expression was analyzed and results demonstrated that the expression was increased after sulforaphane treatment. Besides its role in energy metabolism, it is well known that PGC-1 $\alpha$  can also stimulate antioxidant defenses and ROS-detoxifying enzymes [6, 7, 13, 42], which corroborates with reduced oxidative stress data in our study. Moreover, PGC-1 $\alpha$  is considered to be the major regulator of mitochondrial function [43]. Reduction of PGC-1 $\alpha$  levels has been demonstrated as a strong causative candidate in mitochondrial dysfunction [43]. However, in a recent study by Lynn and colleagues [44], it was demonstrated that transient induction of PGC-1 $\alpha$  in the heart diminished cardiac contractility in response to ischemia reperfusion. Furthermore, both gain of function and loss of function studies support a role for PGC-1 $\alpha$  in the control of cardiac metabolism and function (as reviewed in Fink and Kelly [45]) suggesting that PGC-1 $\alpha$  may exhibit different roles depending on the nature and duration of the stimulus [45]. PGC-1 $\alpha$  can both directly and indirectly activate antioxidant proteins localized in the mitochondria (thioredoxin 2, peroxiredoxin 3/5, superoxide dismutase-2) as well as in the cytoplasm and peroxisome (glutathione peroxidase, superoxide dismutase-1, catalase) [5, 6]. Reduction in PGC-1 $\alpha$  has also been associated with a decrease in antioxidant enzymes suggesting that PGC-1 $\alpha$  is a broad and powerful regulator of ROS metabolism [6]. In our study



**Fig. 8** Immunocent of a phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and b phospho-Akt/total-Akt in cardiac *H9c2* cells treated with sulforaphane (SFN, 5  $\mu$ mol/L) during a period of 24 h.  $\beta$ -tubulin was used for normalization. Values are expressed as mean  $\pm$  SD from 4 and 3 independent experiments, respectively. Two representative bands per group are shown

with cardiac myoblasts, a reduction in oxidative stress and increase in antioxidant enzymes correlated with an increase in PGC-1 $\alpha$ . A recent study, conducted on L6 myoblasts reported that a PGC-1 $\alpha$  stimulator was unable to induce expression of Bax and Bcl2 in normal conditions [46]. However, when the myoblasts were exposed to oxidative stress, PGC-1 $\alpha$  was able to increase BCL-2 expression suggesting that induction of PGC-1 $\alpha$  protects against caspase dependent and independent apoptosis [46]. Although



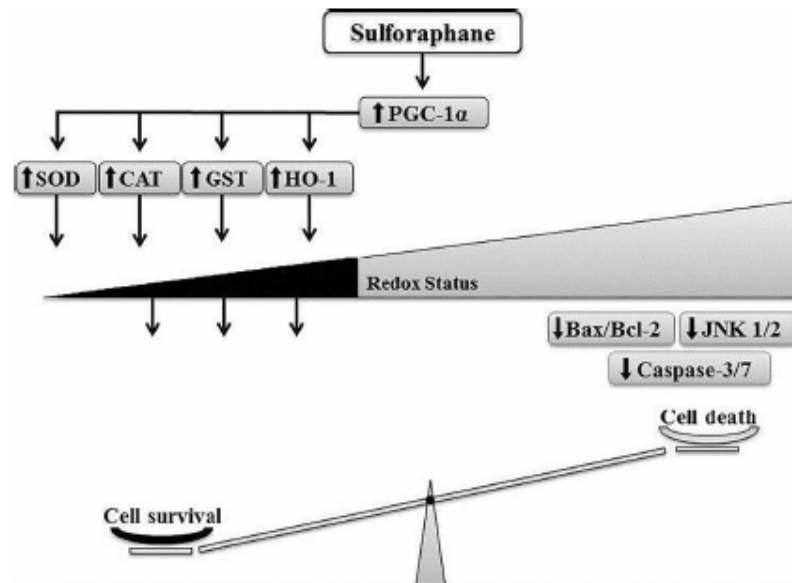
**Fig. 9** Immunocent of a nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf-2), and b peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in *H9c2* cardiac cells treated with sulforaphane (SFN, 5  $\mu$ mol/L) during a period of 24 h.  $\beta$ -tubulin was used for normalization. Values are expressed as mean  $\pm$  SD from 4 to 7 independent experiments. Three representative bands per group are shown. *t* test: \* vs. Control,  $P < 0.05$

an in-depth understanding of the mechanism by which sulforaphane effects PGC-1 $\alpha$  in the heart is needed, the present study provides a novel insight into the role of sulforaphane in modulating oxidative stress and apoptosis by activating PGC-1 $\alpha$  signaling in cardiac cells.

Since clinical trials and meta-analysis have not shown clear benefits with the use of antioxidant supplementation in cardiovascular diseases [47, 48], it justifies the need for alternative interventions. In that sense, sulforaphane is an attractive alternative as a therapeutic strategy, where it can upregulate the antioxidant machinery, downregulate apoptosis, and prevent adverse remodeling.

**Fig. 10** Schematic illustration of the proposed mechanism by which sulforaphane exerts cardioprotection in H9c2 cells in the present study.

Sulforaphane, through PGC-1 $\alpha$ , promotes increase in the antioxidant reserve, decreasing oxidative stress, which in turn causes decrease of apoptosis



**Acknowledgment** This work was supported by Brazilian Research Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), as well as the Northern Ontario School of Medicine. Technical assistance from Tânia Fernandes, Sílvia Guimarães, and Lucas Barbosa is acknowledged. We acknowledge intellectual contribution from Prof. Dr. Maria Flávia Ribeiro, Cláudio Felipe K. Rocha, and Dr. Carmem Sartório. We would also like to thank the Laboratory of Molecular Biology, Endocrinology and Tumor (Labimet, UFRGS).

## References

- Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2008) Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52(Suppl 1):S128–S138
- Juge N, Mithen RF, Traka M (2007) Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci* 64(9):1105–1127
- Kensler TW, Egner PA, Agyeman AS, Visvanathan K, Groopman JD, Chen JG, Chen TY, Fahey JW, Talalay P (2013) Keap1-nrf2 signaling: a target for cancer prevention by sulforaphane. *Top Curr Chem* 329:163–177
- Negretie-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Tapia E, Pedraza-Chaverri J (2013) Modulation of mitochondrial functions by the indirect antioxidant sulforaphane: a seemingly contradictory dual role and an integrative hypothesis. *Free Radic Biol Med* 65:1078–1089
- Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M (2005) PGC-1 $\alpha$  regulates the mitochondria antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 66(3):562–573
- St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jäger S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R,

Spiegelman BM (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127(2):397–408

- Lu Z, Xu X, Hu X, Fassett J, Zhu G, Tao Y, Li J, Huang Y, Zhang P, Zhao B, Chen Y (2010) PGC-1 $\alpha$  regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal* 13(7):1011–1022
- Distefano G, Sciacca P (2012) Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure. *Ital J Pediatr* 38:41
- Abbate A, Narula J (2012) Role of apoptosis in adverse ventricular remodeling. *Heart Fail Clin* 8(1):79–86
- Sawyer DB (2011) Oxidative stress in heart failure: what are we missing? *Am J Med Sci* 342(2):120–124
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S (2008) Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodeling. *Cardiovasc Res* 81(3):449–456
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P (2007) Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10(8):1343–1374
- Rowe GC, Jiang A, Arany Z (2010) PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circ Res* 107(7):825–838
- Ramjiawan A, Bagchi RA, Albak L, Czubyrt MP (2012) Mechanism of cardiomyocyte PGC-1 $\alpha$  gene regulation by ERR $\alpha$ . *Cell Biol* 91(3):148–154
- Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, Ahmad F, Matsui T, Chin S, Wu PH, Rybkin II, Shelton JM, Manieri M, Cinti S, Schoen FJ, Basell-Duby R, Rosenzweig A, Ingwall JS, Spiegelman BM (2005) Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab* 1(4):259–271
- Brose RD, Shin G, McGuinness MC, Schneidereith T, Purvis S, Dong GX, Keefer J, Spencer F, Smith KD (2012) Activation of the stress proteome as a mechanism for small molecule therapeutics. *Hum Mol Genet* 21(19):4237–4252



17. Bryan S, Yang G, Wang R, Khaper N (2011) Cystathionine gamma-lyase-deficient smooth muscle cells exhibit redox imbalance and apoptosis under hypoxic stress conditions. *Exp Clin Cardiol* 16(4):e36–e41
18. Shewchuk LJ, Bryan S, Ulanova M, Khaper N (2010) Integrin  $\beta 3$  prevents apoptosis of HL-1 cardiomyocytes under conditions of oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol* 88(3):324–330
19. Anastopoulos I, Kavo A, Tenites I, Kortsaris A, Panayiotidis M, Lazou A, Pappa A (2013) Silibinin protects H9c2 cardiac cells from oxidative stress and inhibits phenylephrine-induced hypertrophy: potential mechanisms. *J Nutr Biochem* 24(3):586–594
20. Marklund S (1985) Handbook of Methods for Oxygen Radical Research. CRC Press, Boca Raton, pp 243–247
21. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126
22. Mannervik B, Guthenberg C (1981) Glutathione transferase. *Methods Enzymol* 77:231–235
23. Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic Biol Med* 10: 93–100
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265–275
25. Mallik A, Bryan S, Puukila S, Chen A, Khaper N (2011) Efficacy of Pt-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cardiac cells. *Exp Clin Cardiol* 16(1):6–10
26. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
27. Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Tapia E, Medina-Campos ON, Sánchez-González DJ, Martínez-Marúnez CM, Ortiz-Vega KM, Franco M, Pedraza-Chaverri J (2010) Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 192(3):278–285
28. Angeloni C, Leoncini E, Malaguti M, Angelini S, Hrelia P, Hrelia S (2009) Modulation of phase II enzymes by sulforaphane: implications for its cardioprotective potential. *J Agric Food Chem* 57(12):5615–5622
29. Pham NA, Jacobberger JW, Schimmer AD, Cao P, Gronda M, Hedley DW (2004) The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest, and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Mol Cancer Ther* 3(10): 1239–1248
30. Tang L, Zhang Y (2005) Mitochondria are the primary target in isothiocyanate-induced apoptosis in human bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* 4(8):1250–1259
31. Lee YJ, Lee SH (2011) Sulforaphane induces antioxidative and antiproliferative responses by generating reactive oxygen species in human bronchial epithelial BEAS-2B cells. *J Korean Med Sci* 26(11):1474–1482
32. Clarke JD, Dashwood RH, Ho E (2008) Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Lett* 269(2):291–304
33. Wu QQ, Zong J, Gao L, Dai J, Yang Z, Xu M, Fang Y, Ma ZG, Tang QZ (2014) Sulforaphane protects H9c2 cardiomyocytes from angiotensin II-induced hypertrophy. *Herz* 39(3):390–396
34. Bai Y, Cui W, Xin Y, Miao X, Barati MT, Zhang C, Chen Q, Tan Y, Cui T, Zheng Y, Cai L (2013) Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. *J Mol Cell Cardiol* 57: 82–95
35. Wang G, Hamid T, Keith RJ, Zhou G, Partridge CR, Xiang X, Kingery JR, Lewis RK, Li Q, Rokosh DG, Ford R, Spinale FG, Riggs DW, Srivastava S, Bhatnagar A, Bolli R, Prabhu SD (2010) Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. *Circulation* 121(17):1912–1925
36. Melo LG, Agrawal R, Zhang L, Rezvani M, Mangi AA, Ehsan A, Griese DP, Dell'Acqua G, Mann MJ, Oyama J, Yet SF, Layne MD, Perrella MA, Dzau VJ (2002) Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene. *Circulation* 105(5):602–607
37. Yeh CH, Chen TP, Wang YC, Lin YM, Lin PJ (2009) HO-1 activation can attenuate cardiomyocyte apoptosis via inhibition of NF- $\kappa$ B and AP-1 translocation following cardiac global ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 155(1):147–156
38. Muslin AJ (2008) MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond)* 115(7):203–218
39. Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z (1999) Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J* 18(5):1321–1334
40. Wang T, Arifoglu P, Ronai Z, Tew KD (2001) Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *J Biol Chem* 276(24):20999–21003
41. Leoncini E, Malaguti M, Angeloni C, Motori E, Fabbrì D, Hrelia S (2011) Cruciferous vegetable phytochemical sulforaphane affects phase II enzyme expression and activity in rat cardiomyocytes through modulation of Akt signaling pathway. *J Food Sci* 76(7):H175–H181
42. Kolwicz SC Jr, Purohit S, Tian R (2013) Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res* 113(5):603–616
43. Kim HK, Song IS, Lee SY, Jeong SH, Lee SR, Heo HJ, Thu VT, Kim N, Ko KS, Rhee BD, Jeong DH, Kim YN, Han J (2014) B7-H4 downregulation induces mitochondrial dysfunction and enhances doxorubicin sensitivity via the cAMP/CREB/PGC1- $\alpha$  signaling pathway in HeLa cells. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 466:2323–2338
44. Lynn EG, Stevens MV, Wong RP, Carabenciov D, Jacobson J, Murphy E, Sack MN (2010) Transient upregulation of PGC-1 $\alpha$  diminishes cardiac ischemia tolerance via upregulation of ANTI1. *J Mol Cell Cardiol* 49(4):693–698
45. Fink BN, Kelly DP (2006) PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116(3):615–622
46. Dam AD, Mitchell AS, Quadrilatero J (2013) Induction of mitochondrial biogenesis protects against caspase-dependent and caspase-independent apoptosis in L6 myoblasts. *Biochim Biophys Acta* 1833(12):3426–3435
47. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C (2007) Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 297(8):842–857
48. Ye Y, Li J, Yuan Z (2013) Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS ONE* 8(2):e56803

## 5.2. Artigo II

### **Sulforaphane modulates apoptosis-related proteins and attenuates pathological cardiac remodeling post-myocardial infarction in rats**

Rafael Oliveira Fernandes<sup>1</sup>, Alexandre Luz de Castro<sup>1</sup>, Jéssica Hellen Poletto Bonetto<sup>1</sup>, Dalvana Müller<sup>1</sup>, Vanessa Ortiz<sup>1</sup>, Cristina Campos Carraro<sup>1</sup>, Sílvia Barbosa<sup>2</sup>, Matilde Achaval<sup>2</sup>, Laura Tartari Neves<sup>3</sup>, Léder Leal Xavier<sup>3</sup>, Paulo Cavalheiro Schenkel<sup>4</sup>, Pawan Singal<sup>5</sup>, Neelam Khaper<sup>6</sup>, Alex Sander da Rosa Araujo<sup>1</sup>, Adriane Belló-Klein<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Cardiovascular Physiology, Institute of Basic Health Science (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Physiology, Federal University of Pelotas (UFPEL), Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>5</sup> Institute of Cardiovascular Sciences, St. Boniface General Hospital Research Centre, Winnipeg, Canada.

<sup>6</sup> Medical Sciences Division, Northern Ontario School of Medicine, Lakehead University, Thunder Bay, Ontario, Canada.

Keywords: compensate cardiac function, reactive oxygen species, heme oxygenase-1, AMPK/LC3, ERK 1/2, p38

Corresponding Author:

Dr. Adriane Belló-Klein. Mailing address: Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre/RS, CEP: 90050-170 - Brazil. Phone: 0-55-51-33083621. Fax: 0-55-51-33083656. e-mail: belklein@ufrgs.br

## Abstract

The present study was developed to investigate the role of sulforaphane (SFN) in apoptosis and autophagy-related proteins post-myocardial infarction (MI). Adult Wistar rats were divided in 4 groups: SHAM, SHAM+SFN, MI, and MI+SFN. Surgery procedure was performed in all rats, but coronary artery occlusion just in MI groups. Three days post-surgery, cardiac function was assessed by echocardiography and, at this time, treatment with sulforaphane started (5 mg/Kg, i.p. during 25 days). At the end of sulforaphane administration, final echocardiography was performed, and cardiac tissue was collected to quantification of collagen content, oxidative stress markers, heme oxygenase-1 (HO-1) protein, ERK 1/2 and p38 expression, apoptosis and autophagy-related pathways, and expression of total Nrf-2 and PGC-1 $\alpha$  transcriptional factors. Both MI groups exhibited cardiac dysfunction evaluated by reduction of cardiac contractility, left ventricular chamber dilatation, and increase of fibrosis. In MI group it was observed increased wall stress index. Sulforaphane prevented the increase of this index in MI+SFN group, which did not differ from SHAM+SFN group. At time-course analysis, comparing day 3 to day 28 post-MI, MI group presented increased deterioration of cardiac function and chamber dilation. However, sulforaphane maintained similar cardiac function during the course of the disease. Moreover, sulforaphane was able to decrease collagen content, reducing cardiac muscle loss when compared to MI group. It was observed, in MI group, a significant increase on lipid peroxidation levels and on GPx activity in cardiac tissue. In MI+SFN group, it was observed a decrease in reactive oxygen species levels and no changes in lipid peroxidation compared to MI. MI+SFN group also shown increased HO-1, and ERK 1/2 protein expression, as well as decrease in apoptosis-related proteins, such as Bax/Bcl-2 ratio and p38 activity as compared to MI. Furthermore, sulforaphane maintained autophagy process similar to SHAM+SFN, evaluated by AMPK and LC3II/I ratio protein expression. In conclusion, sulforaphane can attenuate the pathological cardiac remodeling post-myocardial infarction by modulating cardioprotective HO-1 protein and pro-survival signaling pathways in MI+SFN group. This therapeutics may contribute to reduce oxidative stress and activation of pro-apoptotic signaling pathways in viable muscle post-MI.

## 1. Introduction

Loss of cardiac tissue by myocardial infarction causes an overload of remained myocardium, which has to compensate cell lost to maintain cardiac function, starting an adaptation process known as cardiac remodeling (Heusch G et al., 2014). Pathological stimulation causes remodeling, which is coordinated by a complex interplay of mechanisms, such as cardiomyocytes death, inflammation, myocytes growth, and fibroblast proliferation, culminating in ventricular chamber dilatation, cardiac hypertrophy and fibrosis (González A et al., 2011). Therefore, discovery of new therapeutic intervention to decrease or to delay this complex set of mechanisms is fundamental to prevent the progression of cardiac dysfunction, and ultimately, heart failure (González A et al, 2011).

Oxidative stress has been considered a therapeutic target once it is a common event enrolled and associated with the mechanisms of cardiac remodeling (González et al, 2011; Takimoto E & Kass DA, 2007), once it can occur by increased neuro-humoral systems (sympathetic and renin-angiotens system) (González et al, 2011). Increased levels of oxidative stress is involved in progressive worsening of cardiac dysfunction and remodeling (Hori M et al, 2009; Hill et al., 2005). It was demonstrated that reductions of reactive oxygen species (ROS) and lipid oxidative damage are associated to the preservation of cardiac function post-myocardial infarction (Khaper N et al, 2001; Hill MF et al, 2005; de Castro A et al, 2013). The main strategy to reduce oxidative stress, and consequently, oxidative damage is increasing the endogenous antioxidant reserve (Hori M et al, 2009). Endogenous antioxidants have been considered the better option to reduce cell dysfunction and disease's progression, once the use of exogenous antioxidant therapy has not been shown effective results against cardiovascular diseases, as demonstrated in randomized clinical trial studies (Ye Y al, 2013). As it has been observed in experimental studies with stimulation of endogenous antioxidants and citoprotective proteins, overexpression of heme oxygenase-1 (HO-1) showed a cardioprotective and anti-apoptotic role on pathological cardiac remodeling (Wang G et al., 2010). Moreover, the overexpression of superoxide dismutase-1 (SOD-1) prevented post-ischemic injury in cardiac tissue of mice (Wang P et al., 1998). Khaper N (2001) demonstrated that increased glutathione peroxidase activity (GPx), which is considered the most important antioxidant protein in the heart, was associated to improved cardiac function 16-weeks post-myocardial infarction in rats (Khaper N et al., 2001), indicating a important role of this antioxidant to preserve cardiac tissue. A common intracellular target that can regulate endogenous antioxidant proteins, maintaining and restoring a proper intracellular

redox homeostasis, is the Keap1-Nrf-2 pathway, considered a master regulator of antioxidant genes (Baird L et al., 2011). Besides that, another target is PGC-1 $\alpha$ , which has been demonstrated to activate mitochondria, as well as cytosolic antioxidant defenses (Valle I et al., 2005; Lu Z et al., 2010; Fernandes RO et al., 2015).

Besides of the direct oxidative damage in intracellular components, organelles and membranes that oxidative stress causes contributing to cardiac remodeling, it is also associated to activation of mitogen-activated protein kinase (MAPKs - ERK 1/2, p38 and JNK), proteins that coordinate important cardiomyocyte responses, such hypertrophy and, mainly, cellular death during the cardiac remodeling (Qin F et al., 2005). Cardiomyocyte death is one of the main events that is associated with the severity of pathological cardiac remodeling (Abbate A & Narula J, 2012). Increased ROS and oxidative damage have been related to the activation of death mechanisms, such as apoptosis, necrosis, and autophagy (Dorn GW II, 2009; Chung SD et al., 2012). Reduction of oxidative stress was associated to reduce cardiac cell death (Qin F et al., 2005). Differently from necrosis, which is a traditional example of unregulated cell death, apoptosis is regulated and coordinated by intrinsic and extrinsic pathways, been considered the intrinsic pathway with a more relevant role (Whelan R et al, 2009). In the central process of this pathway is the mitochondria, where a balance of pro- and anti-apoptotic Bcl-2 family proteins regulate the permeability of mitochondrial membrane, which can be controlled by oxidative stress and kinase proteins (Trachootam D et al., 2008). This organelle keep apoptogenic proteins, that once in the cytosol, activates proteolytic caspase responsible for the apoptosis execution process (Abbate A & Narula J, 2012). Apoptosis can also be initiated by a disruption of the autophagy's homeostasis. Autophagy is a cellular mechanism that degrades non-functional organelles and modified proteins, which is considered a pro-survival response of cardiomyocytes exposed to diverse forms of environmental insults (Lavandero S et al, 2013). Autophagy is coordinated by AMP-activated protein kinase (AMPK), a protein that senses the energy status of the cell and that coordinates a global metabolic response, as well as controlled by microtubule-associated protein-1 light chain 3 (LC3). Failure in autophagy has been associated to cardiomyopathy in experimental and clinical studies (Kanamori H et al., 2010; Zhu H et al., 2009). Also, oxidative intracellular waste can cause an additional protein and organelle damage, being autophagy a critical process to avoid a vicious circle, leading to cardiac cell dysfunction (Shih H et al., 2011).

Recent strategies to activate endogenous antioxidants demonstrate the ability to reduce oxidative stress-associated apoptosis signaling (Chung SD et al, 2012; Wang Y et al, 2014;

Fernandes RO et al., 2015). Sulforaphane, an organosulfur compound found in cruciferous vegetables, such as broccoli sprouts, has the capacity to stimulate intracellular antioxidants and phase II detoxification enzymes (Angeloni C et al., 2009; Fahey JW & Talalay P, 1999). The use of sulforaphane (0.5 mg/Kg/16 weeks) has been demonstrated to prevent cardiac dysfunction in animal models of diabetic cardiomyopathy (Bai Y et al., 2013; Zhang Z et al., 2014), as well as in acquired immune deficiency syndrome (AIDS) (0.2 mg/Kg/16 weeks) (Ho JN et al., 2012). Also, sulforaphane can preserve transplanted cardiac tissue, increasing surveillance, protecting heart against the ischemia-reperfusion injury (Wu W et al., 2013; Li Z et al, 2013). However, the role of sulforaphane in myocardial infarction (MI), a major cause of death and disability worldwide, that culminates in the main clinical and public health challenge – heart failure (Heusch G et al., 2014), has never been investigated before.

Therefore, the present study investigated the role of sulforaphane as a therapeutic strategy to modulate oxidative stress and cell death pathways involved in myocardium post-infarction remodeling.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Animals and experimental design**

Male Wistar rats ( $347 \pm 18$  g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Rats were housed in plastic cages with free access to water and pelleted food, maintained under standard laboratory conditions (temperature of 21°C, 12 h light/dark cycle). All animal experiments were performed in accordance with the institutional animal care committee guidelines. The animals were randomly divided into 4 groups: untreated Sham (SHAM), untreated acute myocardial infarcted (MI), sham treated with sulforaphane (SHAM+SFN), and acute myocardial infarction treated with sulforaphane (MI+SFN).

Initial cardiac function was measured by echocardiography at day 3 post sham and coronary artery ligation surgery. Subsequently, sulforaphane (R,S-Sulforaphane, purchased from LKT Laboratories) was administered daily at a dose of 5 mg/Kg, intraperitoneal, for 25 days. Sulforaphane was prepared in 0.9% NaCl containing 0.5% (v/v) dimethyl sulfoxide. Untreated rats received the same solution without sulforaphane. Animals were monitored daily and body weight was recorded every 3 days. At the end of the treatment period (28

days), cardiac function was measured again prior to sacrificing animals and collecting tissues for further analysis.

## **2.2. Surgical procedure for myocardial infarction**

Myocardial infarction was induced according to a procedure described in the literature and adapted in our laboratory (Schenkel PC et al., 2010; de Castro A et al, 2014). Briefly, animals were anesthetized (ketamine 90 mg/kg plus xylazine 20 mg/kg, i.p.), intubated and ventilated via a tracheal cannula using a constant-volume rodent ventilator. Left thoracotomy was performed in the fifth intercostal space followed by pericardiotomy, without heart exteriorization. The left coronary artery was identified and permanently occluded with a 6.0 nylon monofilament suture. Fibrillation and ischemia of the left ventricular wall confirmed the infarction. Subsequently, the thoracic cavity was closed and pneumothorax was reduced by aspirating the existing air using a syringe, and the skin was sutured. Sham-operated rats were subjected to the same procedure without ligation of the coronary artery. Following surgery, an opioid analgesia (tramadol chlorhydrate - 5 mg/kg, 8-8h, i.p.) was administered to rats to relieve pain and discomfort. The mortality rate was approximately 10% at 24 h following the surgical procedure and remained unchanged during the treatment period.

## **2.3. Echocardiographic analysis**

For echocardiographic analysis, rats were anesthetized (ketamine 90 mg/kg plus xylazine 20 mg/kg, i.p.) and placed in left lateral decubitus position to obtain cardiac images. Acquisition of echocardiographic images was achieved using a Philips HD7 XE ultrasound system with a L12-13 MHz transducer. Images were evaluated by experienced operators, blinded to the experimental groups. Left ventricular end diastolic diameter (LVEDD, cm) and end systolic diameter (LVESD, cm), left ventricular posterior wall thickness during diastole (LVPWD, cm) and systole (LVPWS, cm), and heart rate (beats/min) were measured using the M-Mode, in the basal, middle, and apical planes, as previously described by our group and others (Nozawa E et al., 2006). Wall tension index was calculated as:  $WTI = LVEDD/2 \times LVPWD$ , to determine mechanical compensation. Also, left ventricular ejection fraction (EF %), calculated as:  $EF = (\text{end-diastolic volume} - \text{end systolic volume}/\text{end-diastolic volume}) \times 100$ , and fractional area change (%), measured as:  $FAC = (\text{diastolic area} - \text{systolic area}/\text{diastolic area}) \times 100$ , were used to determine, respectively, contractile function and left ventricular systolic function (Nozawa et al., 2006). Infarct size (IS) was estimated as  $IS\% =$

$(I/EP) \times 100$ , where I represents the measurement of transverse plane of the arch corresponding to the segments with infarction and EP represents the total endocardial perimeter (EP), measured at end-diastole (Tavares AM et al., 2010).

#### **2.4. Morphometric analysis**

While under the influence of anesthesia, blood sample was collected, and then the rats were sacrificed by cervical dislocation. Heart, lungs, and liver were rapidly excised and hearts were washed in phosphate buffer (PBS, pH 7.4), and weighed. For histologic analysis, a slice of approximately 5 mm from the central portion of the heart was separated and immediately submerged in saturated Bouin's solution. The remaining viable cardiac muscle, was immediately frozen in liquid nitrogen for biochemical and molecular biology analysis. Livers and lungs were blotted, weighed and then placed in a heated chamber (60°C) until a stable dry weight was obtained.

Cardiac hypertrophy was evaluated by calculating the heart weight (mg) to body weight (g) ratio. Liver and lung congestion were evaluated by calculating the wet to dry weight (g/g) ratio.

#### **2.5. Serum liver enzymes**

Arterial blood was centrifuged (1000 x g, 10 min, 4° C), and serum was collected to measure liver enzymes, such as aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), purchased from Kovalent Ltda, and, alkaline phosphatase (ALP), purchased from Labtest Diagnóstica S.A. (Brazil), according to manufacturer's protocol.

#### **2.6. Histological analysis for measurement of total collagen content**

Transverse slices from the central portion of the heart (0.5 cm) were fixed in saturated Bouin's solution (12 hours, room temperature), cryopreserved using sucrose solution (15% and 30%, 24 hours each, 4°C), and embedded in Tissue Tek OCT compound for cryosections (10 µm). Histological sections were stained with 0.1% Sirius Red (Direct Red 80, purchased from Sigma Aldrich), for 30 seconds at room temperature, washed once with water, counterstained with Harris hematoxylin (15 min, room temperature), dehydrated, and covered with Canada Balsam. In order to estimate cardiac collagen content, histological sections were digitized using a Olympus BX 50 microscope coupled to an Opton video camera and Image Pro Plus 6.0 software (Image Pro-Plus 6.1, Media Cybernetics, Silver Spring, USA) was utilized. The area occupied by these tissues was estimated using the point counting method



(Weibel ER, 1979; Zacharová G & Kubinová L, 1995; De Paula S et al, 2009; Rodrigues FS et al., 2013; Alvarez PS et al., 2014). Two histological images of the left ventricle from each animal were digitized and a point test system, composed by equidistant crosses, was laid over the images. When the upper right quadrant of the cross hits images of cardiac muscle, collagen or blood vessels it was counted. The percentage of area occupied by each tissue was obtained using the following equation:

Percentage of area occupied by the tissue = (number of crosses counted in the tissue image/total number of crosses counted in the image) X 100. The crosses located in histological artifacts were not counted, as observed in figure 3.

## **2.7. Tissue preparation**

For oxidative stress markers, cardiac tissues were homogenated in a solution containing 1,15% KCl + PMSF 20mmol/L, in Ultra-Turrax homogenator. The suspension was centrifuged at 1000 x g for 10 minutes at 4°C, and the supernatant was used for analyses. For protein expression analyses, cardiac tissues were homogenate with Cell Lyses buffer (Cell Signaling Tech.), according to manufacturer's instructions.

## **2.8. Determination of protein concentration**

Protein content was determined by the method of Lowry (Lowry et al., 1951) and DC™ Protein Assay (Bio-Rad), using bovine serum albumin as the standard.

## **2.9. Determination of ROS and lipid peroxidation levels**

To measure reactive oxygen species ROS levels, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence emission (Sigma-Aldrich, USA) was used. DCFH-DA is permeable membrane and is rapidly oxidized to the highly fluorescent 2,7-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of intracellular ROS. The solution assay were excited at 488 nm and emission was collected with a 525 nm long pass filter. Results were expressed as nmols per milligram of protein (Lebel et al., 1992).

Lipid peroxidation was measured using tert-butyl-hydroperoxide (tBOOH)-initiated chemiluminescence in a liquid scintillation counter (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB, Produkter AB, Sweden). Homogenates were placed in low-potassium vials in a reaction medium consisting of 120 mmol/L KCl, 20 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4). Measurements were initiated by the addition 3 mmol/L tBOOH. Data were expressed as counts per minute per milligram protein (cpm/min) (Gonzalez et al., 1991).

## 2.10. Determination of antioxidant enzymatic activity

Glutathione peroxidase (GPx) activity was based on the consumption of NADPH and was measured at 340 nm. The activity was expressed as nmoles of peroxide/hydroperoxide reduced per minute per milligram of protein (Flohé L & Gunzler WA, 1984). Superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated on the basis of the inhibition of the superoxide radical reaction with pyrogallol and was measured at 420 nm. It was expressed as units per milligram of protein (Marklumb S, 1985). Catalase activity was measured by following the decrease in hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) absorbance at 240 nm. It was expressed as nmoles of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced per minute per milligram of protein (Aebi H, 1985).

## 2.11. Protein expression analysis

Western blot was used to analyze the immunocontent of different proteins. Electrophoresis was done with a 8-15% bis-acrylamide gel, according to the size of interest proteins, loading 30 µg of proteins in a mini vertical gel system (Bio-Rad). Proteins were transferred to a PVDF membrane (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore) in a mini trans-blot electrophoretic tank or Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Transfer Cell. Membranes were blocked in 5% non-fat milk prepared in TBS-T (tris buffer saline - 20 mmmo/L Tris, 137 mmol/l NaCl, pH 7.4, with 0.1% Tween-20). Membranes were probed overnight with the following primary antibodies, prepared in TBS-T 5% milk: CuZn-SOD, HO-1, Bax, Bcl-2, phospho-p38 (Thr180), p38, and PGC-1, purchased from Santa Cruz Biotechnology; GPx purchased from Abcam; caspase-3, phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204), ERK 1/2, phospho-AMPK (Thr172), AMPK, and LC3B, purchased from Cell Signaling; Mn-SOD (Millipore) and catalase (Sigma Aldrich). Bound primary antibodies were detected using anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies prepared in TBS-T 5% milk (1:1000-1:5000), incubated for 2 hours at room temperature. Membranes were developed using chemiluminescent reagent, in two different systems. Some western blots assay were detected using ECL hyper films, revealed in a manual prepared system using a radiographic revelator and Kodak fixative, prepared as per manufacturer's instruction. Images from hyper films were captured in ImageQuant 350 (GE Healthcare Biosciences). While others, the fluorescent images, were captured using ChemiDoc MP (BioRad). Data were expressed as mean of optical density quantified by the Quantity One software. The loading control for normalization used were anti-β-actin (Santa Cruz Bio.) and ponceau red.

## **2.12. Statistical analysis**

Data were expressed as mean  $\pm$  SD. All results were analyzed by Two way ANOVA, excepted for the temporal cardiac function data that were analyzed by paired Student's t test. Student Newman Keuls was used as a pos hoc test. Values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## **3. RESULTS**

### **3.1. Body weight and morphometric analysis**

There was no statistical difference in the final body weight in all the four groups at 28 days post-surgery (Table 1). However, with respect to body weight gain during the period of the experiment, rats treated with sulforaphane exhibited a trend to increase ( $P=0.065$ ) the area under the curve when compared to their respective untreated groups can be observed (area under the curve: SHAM:  $28.985\pm 1.653$ ; MI:  $28041\pm 1.260$ ; SHAM+SFN:  $30294\pm 1.655$ ; MI+SFN:  $29009\pm 1.831$ ) (Figure 1G). It can be observed that MI+SFN group exhibited similar weight gain to the SHAM group. Cardiac hypertrophy as measured by heart weight to body weight ratio was significantly increased in MI (14.3%) and MI+SFN (14.7%) compared to their respective SHAM groups (Table 1). The lung and liver wet to dry weight ratios remained unchanged in MI and MI+SFN groups as compared to its respective SHAM groups, indicating absence of lung and liver congestion (Table 1).

### **3.2. Serum liver enzymes**

Serum AST and ALT levels remained unchanged in the MI group, as compared to SHAM (Table 1). There was an increase in ALP levels in the MI and MI+SFN groups, without any difference between them. However, it was observed a significant difference between MI+SFN with SHAM+SFN (Table 1). Treatment with sulforaphane did not increase AST, ALT, and ALP as compared to the untreated groups. However, ALT levels were reduced in SHAM+SFN when compared to SHAM group (Table 1).

### **3.3. Echocardiographic parameters**

Table 1 shows echocardiographic measurements at 28 days post-myocardial infarction. Infarct size (%) did not differ between MI ( $57 \pm 9$ ) and MI+SFN ( $52 \pm 8$ ) groups. Myocardial

infarction induced cardiac dysfunction, which was evident by a significant increase in LVEDD and LVESD, and a significant decrease in ejection fraction (EF %) and fractional area change (FAC) when compared to SHAM. Treatment with sulforaphane was unable to restore these parameters in the MI group as compared to the respective untreated group (Table 1). Wall tension index increased significantly (44%) in the MI group when compared to SHAM group (Table 1). However, the wall tension index, in MI+SFN group, did not differ from SHAM+SFN group, indicating a modest cardiac mechanical compensation.

Figure 1 shows echocardiographic analysis at day 3 and day 28 post-myocardial infarction, demonstrating a time-course profile of the cardiac parameters in infarcted groups. At the initial day, chamber diameter, contractility index and heart rate were not statistically different between MI and MI+SFN groups, indicating homogeneity of the experimental model. However, as the time progressed, the MI group demonstrated a significant increase in LVESD (22%), LVEDD (20%), a non-significant increase in wall tension index (36%), and a significant decrease in EF (20%) and FAC (24%), indicating progressive worsening of cardiac dysfunction at the end of the day 28. On the other hand, these echocardiographic analyses were not statically different at the end of day 28<sup>th</sup>, in MI+SFN group, when compared to the initial day 3. Interestingly, MI+SFN group demonstrated a significantly reduction in heart rate at the end of day 28 when compared to initial 3 day analysis (Figure 1).

#### **3.4. Histological analyses of total collagen content and cardiac muscle mass**

Area of total collagen content in the viable myocardium, as measured by picrosirius red staining, was significantly increased in the MI group (an occupied area of 77%) when compared to SHAM group (Figure 2). Sulforaphane treatment in the MI group significantly reduced the collagen content (an occupied area of 26%) when compared to MI group (Figure 2). In accordance with this, the remained cardiac area from MI+SFN group presented a significant increase in muscle content compared to MI group (Figure 2).

#### **3.5. Cardiac oxidative stress markers**

The total ROS and lipid peroxidation levels were measured in cardiac tissue. Total ROS levels remained unchanged in the MI group as compared to the SHAM group (Figure 3A). Sulforaphane treatment reduced significantly total ROS in the MI+SFN group as compared to MI and SHAM+SFN groups (12.0 % and 16.3 %, respectively) (Figure 3A). Lipid peroxidation increased significantly (38.5%) in the MI group when compared to SHAM

(Figure 3B). MI+SFN group presented lipid peroxidation values similar to SHAM group, while SHAM+SFN group exhibited increased total ROS and lipid peroxidation (16.5 %) when compared to SHAM group (Figure 3B).

### **3.6. Cardiac antioxidant enzymes and heme oxygenase-1**

Antioxidant protein expression and enzyme activities of glutathione peroxidase (GPx) was significantly increased in the MI group when compared to SHAM group (Figures 4A and 4B). Treatment with sulforaphane did not affect on the enzyme activity or protein expression, maintaining this peroxidase at the same levels of SHAM group (Figure 4A and 4B). CuZn-SOD (cytosolic) expression increased in the MI (88%) and in the SHAM+SFN (165%) groups as compared to SHAM. CuZn-SOD levels in MI+SFN were similar to SHAM+SFN (Figure 4C). By the other side, Mn-SOD (mitochondrial) protein expression does not change among the groups (Figure 4D). The total SOD enzyme activity remained unchanged in all groups (Figure 4E). Protein expression and enzyme activity of catalase remained unchanged in the treated and untreated MI groups compared to its respective SHAM groups (Figure 4F and 4G). Treatment with sulforaphane significantly increased heme oxygenase-1 (HO-1) protein expression in both SHAM+SFN (44%) and MI+SFN (38.5%) groups, when compared to its respective untreated groups (Figure 5).

### **3.7. Profile of MAPK signaling proteins**

ERK 1/2 and p-38 MAPKs activity was measured by assessing the ratio of total and phosphorylated proteins. *p*-ERK 1/2/ERK 1/2 ratio increased in MI (46%) and MI+SFN (82%) groups when compared to their respective SHAM groups (Figure 6A). The increase observed in MI+SFN group was also statistically significant (69%) when compared to MI group (Figure 6A). On the other side, phosphorylation levels of p-38 increased only in the MI group (28%) when compared to SHAM group (Figure 6B). Sulforaphane treatment in the MI group decreased the *p*-p38/p38 ratio when compared to MI group, maintaining this kinase activity similar to the SHAM groups (Figure 6B).

### **3.8. Profile of apoptosis and autophagy proteins**

Pro-apoptotic Bax protein expression reduced significantly (33%) in SHAM+SFN group when compared to untreated SHAM group, as well in the MI+SFN (35%) when compared to MI group (Figure 7A). Anti-apoptotic Bcl-2 protein was reduced in

SHAM+SFN group compared to SHAM group, and its expression returned to a similar profile of untreated groups in MI+SFN group (Figure 7B). The Bax/Bcl-2 ratio was used as an apoptotic index. The ratio remained unchanged in the MI group when compared to SHAM. However, the MI+SFN group showed a significant reduction (44%) in Bax/Bcl2 ratio when compared to the untreated MI group (Figure 7C). Caspase-3 protein expression was not different among groups (Figure 7D).

Autophagy-related signaling proteins were also determined. Phosphorylation levels of AMPK, represented by p-AMPK/AMPK ratio, decreased significantly (33%) in MI group when compared to SHAM group (Figure 8A). Similar response was observed in LC3-II/LC3-I ratio, an indicative of autophagy activation, that reduced significantly (33%) when compare to SHAM (Figure 8B). On the other hand, sulforaphane preserved autophagic process in MI+SFN group as observed by non-statistical difference with SHAM+SFN group (Figure 8A, 8B).

### **3.9. Total transcriptional factors Nrf-2 and PGC-1 alpha**

The expression of transcriptional factors Nrf-2 and PGC1-alpha was not different among groups, in the present study, as observed in Figure 9A and 9B, respectively.

## **4. Discussion**

The present study demonstrated that sulforaphane can mitigate the progression of cardiac dysfunction post-myocardial infarction, by reducing collagen content, maintaining cardiac muscle, and avoiding contractile function deterioration. These effects were associated with a positive balance for cardiomyocytes surveillance induced by sulforaphane, since this isothiocyanate seem to reduce oxidative stress, through the induction of HO-1 protein expression in viable cardiac tissue post-infarction. This redox environment, consequent to sulforaphane's action, leads not only to an ERK 1/2 activation, but also to a reduction of cell death signaling proteins, such as pro-apoptotic Bax and p38 kinase. Furthermore, sulforaphane may preserve autophagy process in cardiac tissue, contributing to protect cardiomyocytes against cell death and dysfunction.

The similarity amongst initial echocardiographic parameters 3 days post-myocardial infarction indicates the reproducibility of surgical procedure and a homogeneous model prior therapeutic intervention. In addition, the procedure presented low mortality rate in the first 24

hours (10%), and the cardiac function findings were similar to those previously described by our group (Schenkel PC et al. 2010; de Castro A et al. 2014). After myocardial infarction model establishment, treatment with sulforaphane was started 72 hours post surgery. Administration of this isothiocyanate was not performed immediately after myocardial infarction due to its anti-inflammatory properties (Nguyen B, et al. 2014; Nallasamy P et al., 2014). Anti-inflammatory effects can prejudice healing, as well as the compensated initial phase of the cardiac remodeling (Frangogiannis NG, 2008). Use of anti-inflammatory early after acute myocardial infarction has been associated to scar thinning, and cardiac dilatation, compromising cardiac adaptation (Hammerman H et al, 1983). Another important point to be observed is the toxicity of sulforaphane. Serum analysis of hepatic enzymes demonstrates that a chronic intervention with sulforaphane (5 mg/Kg) did not induce liver damage. Moreover, sulforaphane treated groups demonstrated an increase ( $P < 0.06$ ) in area under the curve of body weight gain, suggesting a better health condition of the rats. In addition, morphometric and functional parameters were evaluated in this model.

In the present study, MI and MI+SFN rats developed cardiac hypertrophy and signals of cardiac dysfunction when compared to sham groups. Although hypertrophic phenotype seems to be an adaptive and compensatory condition of cardiac tissue, it is considered a risk factor for the development of heart failure (McMullen JR & Jennings GL et al, 2007). Nevertheless, in the day 28 of experiment, it was not observed development of congestive heart failure, as indicated by the absence of lung and liver congestion. Likewise, treatment with sulforaphane was not able to reduce cardiac hypertrophy. Previous studies have shown that sulforaphane was capable to reduce cardiac hypertrophy induced by isoproterenol (sympathomimetic) (Kee HJ et al., 2015), and diabetes-induced cardiac hypertrophy (Bai Y et al., 2013). Indeed, considering that the infarction areas achieved around 52% of the total left ventricle mass, a reduction of the hypertrophic response could favor an additional dysfunction to infarcted rats in the present study. It was observed, in MI and MI+SFN groups, chamber dilatation evidenced by increased systolic and diastolic diameters as compared to SHAM and SHAM+SFN groups, respectively. Moreover, MI and MI+SFN group presented significant contractility dysfunction observed by a significant reduction in EF% and FAC. However, in the wall tension index, that was increased significantly in MI group compared to SHAM, sulforaphane was capable to prevent this increase in MI+SFN group. It indicates that sulforaphane induced an improvement in the balance between cardiac hypertrophy and chamber dilatation, favoring a compensated mechanical function (Opie LH et al, 2006). Decreasing ventricular wall stress is relevant to cardiac function, since this reduction prevents

unnecessary energy expenditure, which can play unfavorable effects on cardiac hemodynamics (Pantos et al, 2007).

In a time-course analyses, comparing period pre and post-treatment (3 days and 28 days, respectively), MI group presented significant deterioration in all parameters related to ventricular chamber dilatation, as well contractility dysfunction. However, in MI+SFN group, sulforaphane maintained similar left ventricular chamber dilatation and contractile function, comparing 3 day to 28 day, suggesting that sulforaphane may play an important role to improve cardiac remodeling post-myocardial infarction during the course of the disease.

Many histological alterations can explain these structural and functional disturbs involved with ischemic-induced cardiac remodeling, such as deposition of collagen (fibrosis) and shape and size change of cardiomyocytes. In the present study, infarction-induced cardiac collagen deposition was elevated in MI group, and treatment with sulforaphane was able to reduce deposition of collagen in the viable myocardium. This reduction in collagen content maybe related to the attenuation of cardiac remodeling progression, as observed in the temporal analysis. In diabetic cardiomyopathy, it was seen that sulforaphane reduced levels of collagen which was associated to preservation of cardiac function (Bai et al, 2013; Zhang et al, 2014). In the pathological cardiac remodeling, an important target to be controlled is the diffuse interstitial and perivascular fibrosis (reactive fibrosis), once it is an independent and predictive risk factor to heart failure development (González A et al, 2011). Moreover, there is no therapeutic strategy specific to reduce it (Burchfield JS et al, 2013). Reduction of myocardial fibrosis is associated to improved left ventricular diastolic function (González et al, 2011). Moreover, some human clinical trials have already proved that reduction of fibrosis improved cardiac function (Brilla et al, 2000).

Besides histological impairment involved in cardiac remodeling post-myocardial infarction, it has been reported the pivotal role of oxidative stress in its progression to heart failure. This process has been associated to an increased cardiac oxidative stress and decrease of antioxidant reserve (Hill et al 1996). The worsening pathological cardiac remodeling, observed in MI group, may be associated to increased oxidative stress in cardiac tissue, as indicated by increased lipid peroxidation. Moreover, up-regulation of GPx and CuZn-SOD antioxidant enzymes can be activated in response to increased lipid peroxidation, suggesting a more oxidative cellular environment (Hill et al., 2005; Khaper N et al., 2003; de Castro A, 2014). In fact, SHAM+SFN group, which also demonstrated elevation of ROS and lipid peroxidation levels, presented an increased immuno content of CuZn-SOD and HO-1, suggesting a relationship between ROS production and counter-regulatory antioxidant



response. In parallel, infarcted rats treated with sulforaphane (MI+SFN) demonstrated decreased ROS and lipid peroxidation levels, besides a normalization of GPx and CuZn-SOD immunocontent. A plausible explanation for the fact, it could be enhanced HO-1 protein expression in these rat hearts, leading adaptive antioxidant protection provided by sulforaphane. Overexpression of HO-1 has been responsible to cardioprotection and anti-apoptotic effect in pathological cardiac remodeling (Wang G et al, 2010). By-products of HO-1 activity, as carbon monoxide and biliverdin, have been considered responsible for citoprotection, anti-apoptotic, anti-inflammatory, and antioxidant response (Kim YM et al, 2011; Foo et al., 2006, Wang WC et al., 2010, Piantadosi CA et al., 2008).

In order to provide an appropriate antioxidant response, a modulation of redox-sensitive proteins, signaling pathways and transcriptional factors seems to be important. Indeed, MAPK pathways differential activation seems to be involved in both myocardial infarction development and sulforaphane action. In this study, MI group demonstrated enhanced ERK1/2 and p38 activation. ERK 1/2 is considered a redox-sensitive and cardioprotective protein and it is associated with protective effects against reperfusion injury, mainly by its anti-apoptotic effects (Heusch G et al., 2014). Previous studies have demonstrated that ERK 1/2 was activated 28 days post-infarction, in similar morphometric and functional conditions to this study, without showing signals of congestive heart failure (Schenkel PC, et al, 2010). On the other hand, p38 is a redox-sensitive protein involved with maladaptive hypertrophy, fibrosis development and death of cardiomyocytes, determining reduction of cardiac muscle content, mainly in an oxidized cellular environment (Lips DJ et al., 2002; Qin F et al., 2005). In this context, association of both ERK1/2 and p38 activation seems to drive cardiac remodeling to a maladaptive condition (Ren J et al., 2005). Nevertheless, when infarcted rats were treated with sulforaphane, there was enhanced activation of ERK 1/2 and decreased p38 activation, this situation was associated to improvement cellular redox state (Qin F et al., 2005). This process may be a pivotal mechanism by which sulforaphane preserve cardiac function for a longer period, contributing to cardiac function maintenance, and avoiding congestive heart failure development. Besides the survival pathways activation, pro-apoptotic proteins could be also involved in the cardiac remodeling post myocardial infarction.

In the present study, myocardial infarction seems to induce a significant reduction in Bax protein expression. However, Bax/Bcl-2 ratio in MI group showed to be the same level as SHAM group. On the other hand, apoptotic signaling in MI+SFN group was not similar as that observed in MI group. Infarcted rats treated with sulforaphane showed decreased Bax, reducing Bax/Bcl2 ratio, suggesting an important protective situation against apoptosis (Qin F

et al., 2005; Trachootam DA et al., 2008). In this scenario, treatment with sulforaphane in cardiac remodeling may present positive outcomes to reduce cardiac cell death, mainly through the control over cellular redox status. Nevertheless, it should be noted that sulforaphane administration to healthy rats could be detrimental, since there is a diminished Bcl2 protein expression in SHAM+SFN group. In parallel, the expression of caspase-3, a downstream component from many apoptotic pathways, had no change in the MI groups compared to SHAM groups (Whelan R et al., 2009).

Contributing to reduce incidence of apoptosis, autophagy is a survival mechanism involved in the basal state and in response to hemodynamic stress, mainly controlled by AMPK/LC3 pathway, also investigated in the present study. The significant decrease of AMPK phosphorylation and LC3II/I ratio (an established indicator of autophagy turnover) demonstrated a reduction in autophagy in MI group when compared to SHAM. It has been reported that reduction in the autophagy process triggers apoptosis in cell lines (Boya P et al., 2005). Also, under pathological condition, the lack of AMPK favors the transition to heart failure (Zhang P, et al, 2008; Beauloye C, et al, 2011). On the other side, the autophagy pathway in sulforaphane-treated MI did not differ from SHAM+SFN, indicating that maybe sulforaphane is preserving autophagic activity. In a model of diabetic cardiomyopathy, chronic treatment with 0.5 mg/Kg of sulforaphane stimulated AMPK/LC3B pathway, which was associated to a better cardiac function (Zhang Z, et al. 2014). Moreover, autophagy is still controversial, whether it is protective or detrimental in the case of myocardial infarction (González A et. al. 2011). However, up-regulation of autophagy in failing hearts has been shown to be an adaptative response for protecting from hemodynamic stress and antagonizing disease progression (Nakai A, et al, 2007; Rothermel BA et al., 2008, Kanamori H et al., 2001).

Sulforaphane-associated citoprotective effects has been related to its capacity to stimulate transcriptional factors that increase the expression of antioxidant and detoxification enzymes, such Nrf-2 and PGC-1 $\alpha$  (Zhang Z et al, 2014, Lu Z et al., 2010, Fernandes RO et al., 2015). To investigate the action mechanism associated to sulforaphane in the present study, total Nrf-2 and PGC-1 $\alpha$  protein content was performed. It was observed no difference in the expression of these transcriptional factors after myocardial infarction and sulforaphane treatment. It suggests that in this period of time, sulforaphane is not stimulating the expression of these transcriptional factors. Corroborating with PGC-1 $\alpha$  data, its downstream target Mn-SOD was also not stimulated (Lu Z et al, 2010).

## 5. Conclusion

Sulforaphane presented positive responses in a model of myocardial infarction, contributing to reduce fibrosis and to preserve cardiac muscle in the pathological cardiac remodeling. It also avoided further deterioration of cardiac function, along the progression to heart failure. It is suggested that HO-1 induction by sulforaphane can reduce oxidative stress, favoring survival signaling and decreasing proteins involved in apoptosis activation. Moreover, sulforaphane appears to maintain autophagic function, contributing to mitigate pathological cardiac remodeling.

## 6. References

- Abbate A, Narula J. Role of apoptosis in adverse ventricular remodeling. *Heart Fail Clin.* (2012) 8(1):79
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v.105, p.121-126; 1984.
- Alvarez, P.S., Simão, F., Hemb, M., Xavier, L.L., Nunes, M.L. Effects of undernourishment, recurrent seizures and enriched environment during early life in hippocampal morphology. *International Journal of Developmental Neuroscience* (2014) 33: 81-87
- Anestopoulos I, Kavou A, Tentis I, Kortsaris A, Panayiotidis M, Lazou A, Pappa A. Silibinin protects H9c2 cardiac cells from oxidative stress and inhibits phenylephrine-induced hypertrophy: potential mechanisms. *J Nutr Biochem.* (2013) 24(3):586-94.
- Angeloni C, Leoncini E, Malaguti M, Angelini S, Hrelia P, Hrelia S. Modulation of phase II enzymes by sulforaphane: implications for its cardioprotective potential. *J Agric Food Chem.* (2009) Jun 24;57(12):5615-22.
- Bai Y, Cui W, Xin Y, Miao X, Barati MT, Zhang C, Chen Q, Tan Y, Cui T, Zheng Y, Cai L. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Apr;57:82-95
- Baird L, Dinkova-Kostova AT. Arch Toxicol. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. 2011 Apr;85(4):241-72.
- Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G. . Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2005 Feb;25(3):1025-40.
- Burchfield JS<sup>1</sup>, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation.* 2013 Jul 23;128(4):388-400
- Chung SD<sup>1</sup>, Lai TY, Chien CT, Yu HJ. Activating Nrf-2 signaling depresses unilateral ureteral obstruction-evoked mitochondrial stress-related autophagy, apoptosis and pyroptosis in kidney. *PLoS One.* 2012;7(10):e47299.

de Castro AL, Tavares AV, Campos C, Fernandes RO, Siqueira R, Conzatti A, Bicca AM, Fernandes TR<sup>1</sup>, Sartório CL, Schenkel PC, Belló-Klein A, da Rosa Araujo AS. Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. *Mol Cell Endocrinol.* 2014 Jun 25;391(1-2):22-9.

De Paula, S., Vitola, A.S., Greccio, S., De Paula, D., Mello, P.B., Mistrelo, J.L., Xavier, L.L., Fiori, H., Dacosta, J.C. Hemispheric Brain Injury and Behavioral Deficits Induced by Severe Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rats Are Not Attenuated by Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Cells. *Pediatric Research* 65: 631-635 (2009).

Dorn GW 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009 Feb 15;81(3):465-73.

Foo RS<sup>1</sup>, Siow RC, Brown MJ, Bennett MR. Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits angiotensin II-mediated rat cardiac myocyte apoptosis but not hypertrophy. *J Cell Physiol.* 2006 Oct;209(1):1-7.

Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008 Aug;58(2):88-111.

González A<sup>1</sup>, Ravassa S, Beaumont J, López B, Díez J. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Oct 25;58(18):1833-43.

Gonzalez Flecha .B., Llesuy S., Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Radicals in Biology and Medicine*, v.10, p.41-47, 1991.

Hafstad AD<sup>1</sup>, Nabeebaccus AA, Shah AM. Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Fahey Basic Res Cardiol.* 2013 Jul;108(4):359.

Hammerman H, Kloner RA, Schoen FJ, Brown EJ Jr, Hale S, Braunwald E. Indomethacin-induced scar thinning after experimental myocardial infarction. *Circulation.* 1983 Jun;67(6):1290-5.

Heusch G<sup>1</sup>, Libby P<sup>2</sup>, Gersh B<sup>3</sup>, Yellon D<sup>4</sup>, Böhm M<sup>5</sup>, Lopaschuk G<sup>6</sup>, Opie L<sup>7</sup>. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet.* 2014 May 31;383(9932):1933-43

Hill MF<sup>1</sup>, Palace VP, Kaur K, Kumar D, Khaper N, Singal PK. Reduction in oxidative stress and modulation of heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Exp Clin Cardiol.* 2005 Fall;10(3):146-53.

Ho JN<sup>1</sup>, Yoon HG, Park CS, Kim S, Jun W, Choue R, Lee J. Isothiocyanates ameliorate the symptom of heart dysfunction and mortality in a murine AIDS model by inhibiting apoptosis in the left ventricle. *J Med Food.* 2012 Sep;15(9):781-7

Hockenbery DM<sup>1</sup>, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993 Oct 22;75(2):241-51

Hori M<sup>1</sup>, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2009 Feb 15;81(3):457-64.

Juge N<sup>1</sup>, Mithen RF, Traka M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 2007 May;64(9):1105-27.

Kanamori H<sup>1</sup>, Takemura G, Goto K, Maruyama R, Tsujimoto A, Ogino A, Takeyama T, Kawaguchi T, Watanabe T, Fujiwara T, Fujiwara H, Seishima M, Minatoguchi S.

The role of autophagy emerging in postinfarction cardiac remodelling. *Cardiovasc Res.* 2011 Jul 15;91(2):330-9.

Kee HJ<sup>1</sup>, Kim GR, Kim IK, Jeong MH. Sulforaphane suppresses cardiac hypertrophy by inhibiting GATA4/GATA6 expression and MAPK signaling pathways. *Mol Nutr Food Res.* 2015 Feb;59(2):221-30

Khaper N<sup>1</sup>, Kaur K, Li T, Farahmand F, Singal PK. Antioxidant enzyme gene expression in congestive heart failure following myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 2003 Sep;251(1-2):9-15.

Khaper N1, Singal PK. Modulation of oxidative stress by a selective inhibition of angiotensin II type 1 receptors in MI rats. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Apr;37(5):1461-6.

Kim YM<sup>1</sup>, Pae HO, Park JE, Lee YC, Woo JM, Kim NH, Choi YK, Lee BS, Kim SR, Chung HT. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Jan 1;14(1):137-67.

Lavandro S<sup>1</sup>, Troncoso R<sup>2</sup>, Rothermel BA<sup>3</sup>, Martinet W<sup>4</sup>, Sadoshima J<sup>5</sup>, Hill JA<sup>3</sup>. Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives. *Autophagy.* 2013 Oct;9(10):1455-66.

Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* (1992) 5:227-231.

Lee, J.; Giordano, S.; Zhang, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. *The Biochemical Journal*, v. 441, n. 2, p. 523–540, Jan. 2012.

Leoncini E, Malaguti M, Angeloni C, Motori E, Fabbri D, Hrelia S Cruciferous vegetable phytochemical sulforaphane affects phase II enzyme expression and activity in rat cardiomyocytes through modulation of Akt signaling pathway. *J Food Sci.* (2011) 76(7):H175-81.

Li Z<sup>1</sup>, Galli U, Becker LE, Bruns H, Nickkolgh A, Hoffmann K, Karck M, Schemmer P. Sulforaphane protects hearts from early injury after experimental transplantation. *Ann Transplant.* 2013 Oct 15;18:558-66.

Lips DJ<sup>1</sup>, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J.* 2003 May;24(10):883-96.

Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W. Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2002;55:396–405.

Llesuy, S.F.; Milei, J.; Molina, H.; Boveris, A.; Milei, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori.* V. 71, p. 241-249, 1985.

Lowry O.H., Rosebrough A.L., Farr A.L., Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265–275, 1951.

Lu Z, Xu X, Hu X, Fassett J, Zhu G, Tao Y, Li J, Huang Y, Zhang P, Zhao B, Chen Y PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal.* (2010) 13(7):1011-22.

Marklund S. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton. CRC. Press. 243-247, 1985.

Matsuzawa A<sup>1</sup>, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Mar-Apr;7(3-4):472-81.

McMullen JR<sup>1</sup>, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Apr;34(4):255-62..

Mill JG, Santos ISL and Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. *Braz J Med Biol Res*, September 2011, Volume 44(9) 890-898

Murashima M<sup>1</sup>, Watanabe S, Zhuo XG, Uehara M, Kurashige A. Phase 1 study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts. *Biofactors*. 2004;22(1-4):271-5.

Murphy, M. P.; Holmgren, A. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. *Cell Metabolism*, v. 13, n. 4, p. 361-366, Abr. 2011.

Muslin AJ. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond)*. 115(7):203-18.

Nakai A<sup>1</sup>, Yamaguchi O, Takeda T, Higu(2008) chi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*. 2007 May;13(5):619-24

Nallasamy P<sup>1</sup>, Si H<sup>2</sup>, Babu PV<sup>3</sup>, Pan D<sup>4</sup>, Fu Y<sup>5</sup>, Brooke EA<sup>1</sup>, Shah H<sup>1</sup>, Zhen W<sup>5</sup>, Zhu H<sup>6</sup>, Liu D<sup>7</sup>, Li Y<sup>8</sup>, Jia Z<sup>9</sup>. Sulforaphane reduces vascular inflammation in mice and prevents TNF- $\alpha$ -induced monocyte adhesion to primary endothelial cells through interfering with the NF- $\kappa$ B pathway. *J Nutr Biochem*. 2014 Aug;25(8):824-33.

González A, Ravassa S, Beaumont J, López B, Díez J. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Oct 25;58(18):1833-43

Nguyen B<sup>1</sup>, Luong L<sup>2</sup>, Naase H<sup>1</sup>, Vives M<sup>3</sup>, Jakaj G<sup>1</sup>, Finch J<sup>1</sup>, Boyle J<sup>1</sup>, Mulholland JW<sup>4</sup>, Kwak JH<sup>5</sup>, Pyo S<sup>5</sup>, de Luca A<sup>1</sup>, Athanasiou T<sup>6</sup>, Angelini G<sup>6</sup>, Anderson J<sup>6</sup>, Haskard DO<sup>1</sup>, Evans PC. Sulforaphane pretreatment prevents systemic inflammation and renal injury in response to cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014 Aug;148(2):690-697.e3

Nozawa E<sup>1</sup>, Kanashiro RM, Murad N, Carvalho AC, Cravo SL, Campos O, Tucci PJ, Moises VA. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2006 May;39(5):687-95.

Opie LH<sup>1</sup>, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet*. 2006 Jan 28;367(9507):356-67.

Piantadosi CA<sup>1</sup>, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1232-40.

Qin F<sup>1</sup>, Liang MC, Liang CS. Progressive left ventricular remodeling, myocyte apoptosis, and protein signaling cascades after myocardial infarction in rabbits. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jun 10;1740(3):499-513.

Ren J, Zhang S, Kovacs A, Wang Y, Muslin AJ. Role of p38alpha MAPK in cardiac apoptosis and remodeling after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Apr;38(4):617-23.

Rodrigues, F.S., Souza, M.A., Magni, D.V., Ferreira, A.P.O., Mota, B.C., Cardoso, A.M., Paim, M., Xavier, L.L., Ferreira, J., Schetinger, M.R.C., Dacosta, J.C., Royes, L.F., Figuera, M.R. N-Acetylcysteine Prevents Spatial Memory Impairment Induced by Chronic Early Postnatal Glutaric Acid and Lipopolysaccharide in Rat Pups. *Plos One* 8: p. e78332 (2013).

Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in load-induced heart disease. *Circ Res.* 2008 Dec 5;103(12):1363-9.

Schenkel P.C., Tavares A., Fernandes R., Diniz G.P., Bertagnolli M., Araujo A.S.R., Barreto-Chaves M.L., Ribeiro M.F.M, Clausell N., Bello-Klein A. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.341, p.1-8, 2010.

Schenkel PC<sup>1</sup>, Tavares AM, Fernandes RO, Diniz GP, Bertagnolli M, da Rosa Araujo AS, Barreto-Chaves ML, Ribeiro MF, Clausell N, Belló-Klein A. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Mol Cell Biochem.* 2010 Aug;341(1-2):1-8.

Shih H<sup>1</sup>, Lee B, Lee RJ, Boyle AJ. The aging heart and post-infarction left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Jan 4;57(1):9-17.

Singal P.K., Khaper N., Bello-Klein A., Bhayana M. Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure. *Heart Failure Reviews*, v.4, p.353–360, 1999

Takimoto E<sup>1</sup>, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension.* 2007 Feb;49(2):241-8.

Tavares AM<sup>1</sup>, da Rosa Araújo AS, Baldo G, Matte U, Khaper N, Belló-Klein A, Rohde LE, Clausell N. Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci.* 2010 Dec 18;87(23-26):699-706.

Trachootham D, Lu W, Ogasawara Ma, Nilsa Rd, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008 Aug;10(8):1343-74.

Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M (2005). PGC-1alpha regulates the mitochondria antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 66(3):562-73.

Voehringer DW<sup>1</sup>, Meyn RE. Redox aspects of Bcl-2 function. *Antioxid Redox Signal.* 2000 Fall;2(3):537-50.

Wang G, Hamid T, Keith RJ, Zhou G, Partridge CR, Xiang X, Kingery JR, Lewis RK, Li Q, Rokosh DG, Ford R, Spinale FG, Riggs DW, Srivastava S, Bhatnagar A, Bolli R, Prabhu SD. Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. *Circulation.* 2010 May 4;121(17):1912-25.

Wang P, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC, Zweier JL. Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Apr 14;95(8):4556-60.

Wang Y, Zhang Z, Guo W, Sun W, Miao X, Wu H, Cong X, Wintergerst KA, Kong X, Cai L. Sulforaphane reduction of testicular apoptotic cell death in diabetic mice is associated with the upregulation of Nrf2 expression and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014 Jul 1;307(1):E14-23.

Weibel, E.R. Stereological methods. Practical methods for biological morphometry. Vol 1. London Academic Press (1979).

Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:19-44.

Wu W1, Qiu Q, Wang H, Whitman SA, Fang D, Lian F, Zhang DD. Nrf2 is crucial to graft survival in a rodent model of heart transplantation. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:919313.

Ye Y, Li J, Yuan Z. Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One.* (2013) 8(2):e56803.

Zacharová, G., Kubínová, L. Stereological methods based on point counting and unbiased counting frames for two-dimensional measurements in muscles: comparison with manual and image analysis methods. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* (1995) 16: 295-302

Zhang P<sup>1</sup>, Hu X, Xu X, Fassett J, Zhu G, Viollet B, Xu W, Wiczer B, Bernlohr DA, Bache RJ, Chen Y. AMP activated protein kinase- $\alpha$ 2 deficiency exacerbates pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *Hypertension.* 2008 Nov;52(5):918-24.

Zhang Z, Wang S, Zhou S, Yan X, Wang Y, Chen J, Mellen N, Kong M, Gu J, Tan Y, Zheng Y, Cai L. Sulforaphane prevents the development of cardiomyopathy in type 2 diabetic mice probably by reversing oxidative stress-induced inhibition of LKB1/AMPK pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Dec;77:42-52.

Zhu H, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in load-induced heart disease. *Methods Enzymol.* 2009; 453:343-63.



**Table 1: Morphometric, echocardiographic parameters, and serum liver enzymes 28 days post-myocardial infarction with and without sulforaphane treatment**

Parameters	Untreated		Sulforaphane (SFN)	
	SHAM	MI	SHAM	MI
N	8	8	7	5
<b>Morphometric data</b>				
Final body weight (g)	380 ± 25	376 ± 19	397 ± 22	378 ± 20
Heart mass (g)	0.90 ± 0.05	1.02 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.03	1.03 ± 0.08 <sup>b</sup>
Heart mass/BW (mg/g)	2.37 ± 0.18	2.71 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.38 ± 0.13	2.73 ± 0.09 <sup>b</sup>
Liver wet/dry weight (g/g)	3.52 ± 0.07	3.61 ± 0.13	3.47 ± 0.07	3.50 ± 0.06
Lung wet/dry weight (g/g)	4.73 ± 0.10	4.67 ± 0.20	4.50 ± 0.13	4.60 ± 0.19
<b>Echocardiographic data</b>				
Infarct size (%)	-	57.3 ± 8.8	-	52.9 ± 7.5
HR (beats/min)	210 ± 17	227 ± 15	226 ± 20	211 ± 5
LVEDD (cm)	0.69 ± 0.04	0.87 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.68 ± 0.05	0.84 ± 0.05 <sup>b</sup>
LVESD (cm)	0.33 ± 0.05	0.69 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.07	0.64 ± 0.05 <sup>b</sup>
LVPWd (cm)	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.03
LVPWs (cm)	0.28 ± 0.02	0.24 ± 0.05	0.29 ± 0.06	0.27 ± 0.04
Wall Tension Index	2.02 ± 0.17	2.92 ± 0.78 <sup>a</sup>	2.16 ± 0.50	2.41 ± 0.38
Ejection Fraction (EF%)	51.6 ± 7.2	29.5 ± 4.5 <sup>a</sup>	52.1 ± 9.2	30.5 ± 4.8 <sup>b</sup>
FAC (%)	41.1 ± 9.0	18.1 ± 5.0 <sup>a</sup>	40.9 ± 9.0	21.5 ± 2.0 <sup>b</sup>
<b>Serum liver enzymes</b>				
AST (U/L)	90.6 ± 22.5	86.4 ± 18.8	75.1 ± 7.3	94.8 ± 35.9
ALT (U/L)	49.4 ± 5.7	50.4 ± 7.7	39.4 ± 5.6 <sup>a</sup>	52.8 ± 8.3 <sup>b</sup>
ALP (U/L)	109.2 ± 28.1	144.4 ± 35.6	105.6 ± 27.9	163.2 ± 50.7 <sup>b</sup>

AST aspartate aminotransferase, ALT alanine aminotransferase, ALP alkaline phosphatase, LVEDD left ventricular end diastolic diameter, LVESD left ventricular end systolic diameter, LVPWd left ventricular posterior wall thickness at diastole, LVPWs left ventricular posterior wall thickness at systole, FAC (%) fractional area change. Values expressed as mean ± SD. <sup>a</sup> significant difference from SHAM (P<0.05); <sup>b</sup> significant difference from SHAM+SFN (P<0.05).

**Figure 1:** Echocardiographic parameters at 3 day post-myocardial infarction and percentage variation 28 days later (paired test t). Data collection in 3 day from each MI and MI+SFN group were considered 100%. Sulforaphane (5 mg/Kg, i.p.) was administered from the 3 day post-myocardial infarction and continued for the duration of the study. (A) Left ventricle end systolic diameter, (B) Left ventricle end diastolic diameter, (C) Ejection fraction (D) Fractional area change, (E) Wall tension Index, (F) heart rate, and (G) Body weight gain. Values are expressed as mean  $\pm$  SD from 5-8 animals per group. <sup>d</sup> significant difference between 28 day and 3 day in MI group (P<0.05); <sup>e</sup> significant difference between 28 day and 3 day in MI+SFN group (P<0.05).

**Figure 2:** (A) Representative transverse cardiac cross section images from experimental groups - hearts 28 days post-surgery; (B-E) Digitized images of cardiac tissue showing the percentage of muscle fibers, collagen and blood vessels. The estimation of percentage of area occupied by cardiac muscle, collagen and blood vessels was made using the point counting method (Zacharova and Kubinova, 1995). In these histological sections cardiac muscle is stained in purple (yellow crosses) and collagen is stained in red (blue crosses); blood vessels were recognized by their morphology (Orange crosses); black crosses represents histological artifacts and were not counted (B) SHAM group; (C) MI group; (D) SHAM+SFN group; and (E) MI+SFN group. Calibration bars 0.5 mm and 100 $\mu$ m. (F) Total collagen content and (G) muscle content in viable cardiac tissue. Values are expressed as mean  $\pm$  SD from 3-5 animals per group. <sup>a</sup> significant difference from SHAM (P<0.05); <sup>b</sup> significant difference from SHAM+SFN (P<0.05); <sup>c</sup> significant difference from MI (P<0.05).

**Figure 3:** Total reactive oxygen species (ROS) (A) and lipid peroxidation (B) in cardiac tissue at 28 days post myocardial infarction with and without sulforaphane treatment (5mg/Kg/day).  $\beta$ -actin was used as load control. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. from 5-8 per group. <sup>a</sup> significant difference from SHAM (P<0.05); <sup>b</sup> significant difference from SHAM+SFN (P<0.05); <sup>c</sup> significant difference from MI (P<0.05).

**Figure 4:** Protein expression and enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPx) (A, B); cytosolic superoxide dismutase (CuZn-SOD), mitochondrial superoxide dismutase (Mn-SOD), and enzymatic activity of total SOD (C, D, E); protein expression and enzyme activity of catalase (F, G) in cardiac tissue at 28 days post-myocardial infarction with and without sulforaphane treatment (5 mg/Kg/day).  $\beta$ -actin and ponceau red were used as load control. Western blot analysis from 4 per group. Activity enzymatic assay from 5-8 per group. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. <sup>a</sup> significant difference from SHAM (P<0.05).

**Figure 5:** Protein expression of heme oxygenase-1 (HO-1) in cardiac tissue at 28 days post-myocardial infarction with and without sulforaphane treatment (5mg/Kg/day).  $\beta$ -actin was used as load control. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. from 4 per group. <sup>a</sup> significant difference from SHAM (P<0.05); <sup>b</sup> significant difference from SHAM+SFN (P<0.05); <sup>c</sup> significant difference from MI (P<0.05).

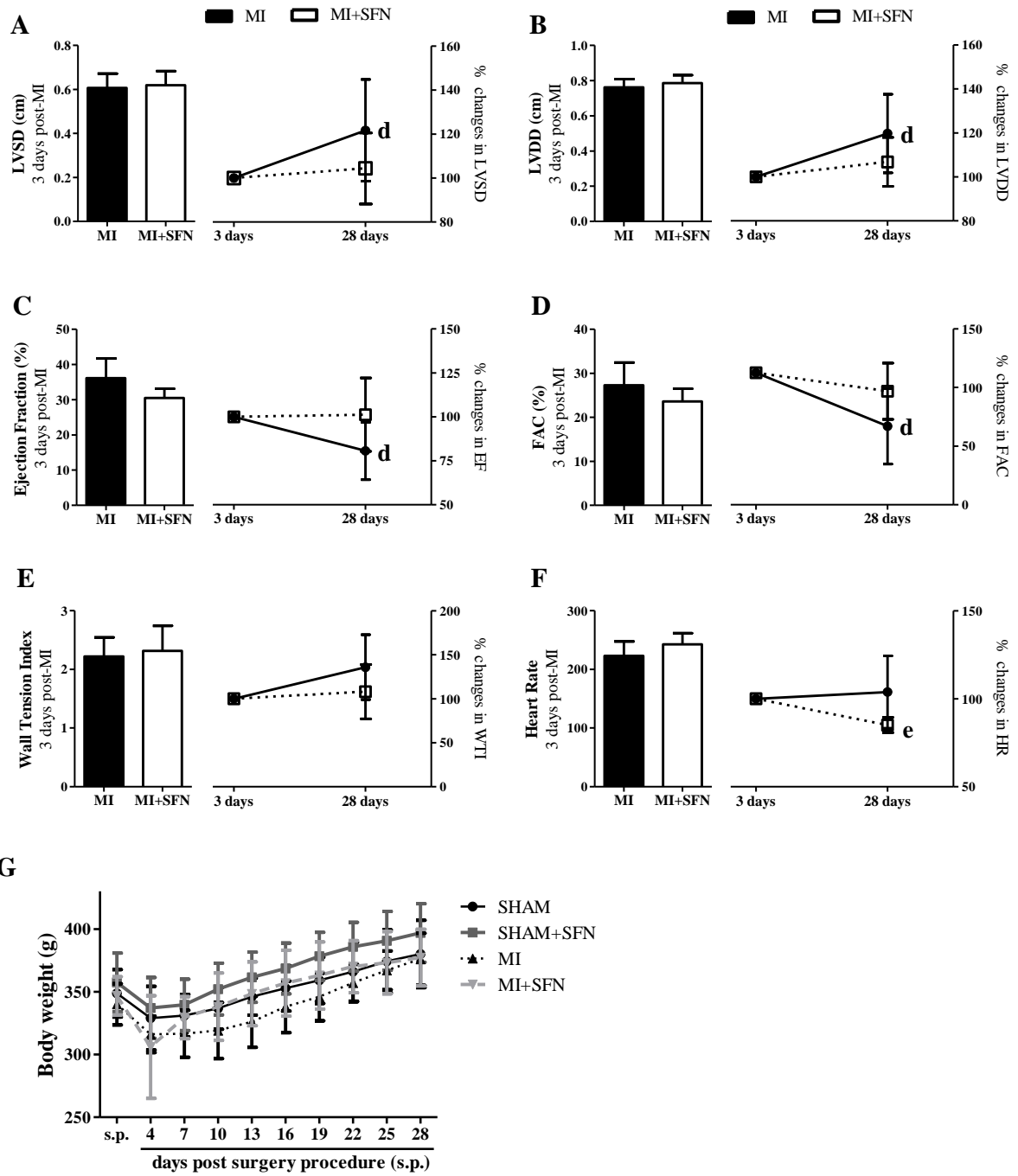
**Figure 6:** Protein expression of MAPK proteins: *p*-ERK 1//ERK 1/2 ratio (A) and *p*-p38 /p38 $\alpha$  (B) in cardiac tissue post-acute myocardial infarction followed by treatment with or without sulforaphane (5 mg/Kg) during 25 days. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. from 5-6 per group. . <sup>a</sup> significant difference from SHAM (P<0.05); <sup>b</sup> significant difference from SHAM+SFN (P<0.05); <sup>c</sup> significant difference from MI (P<0.05).

**Figure 7:** Protein expression of pro-apoptotic Bax (A), anti-apoptotic Bcl-2 (B), Bax/Bcl-2 ratio (C), and caspase-3 (D) in cardiac tissue post-myocardial infarction followed by treatment with or without sulforaphane (5 mg/Kg) during 25 days.  $\beta$ -actin was used as load control. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. from 4-5 per group. <sup>a</sup> significant difference from SHAM (P<0.05); <sup>b</sup> significant difference from SHAM+SFN (P<0.05); <sup>c</sup> significant difference from MI (P<0.05).

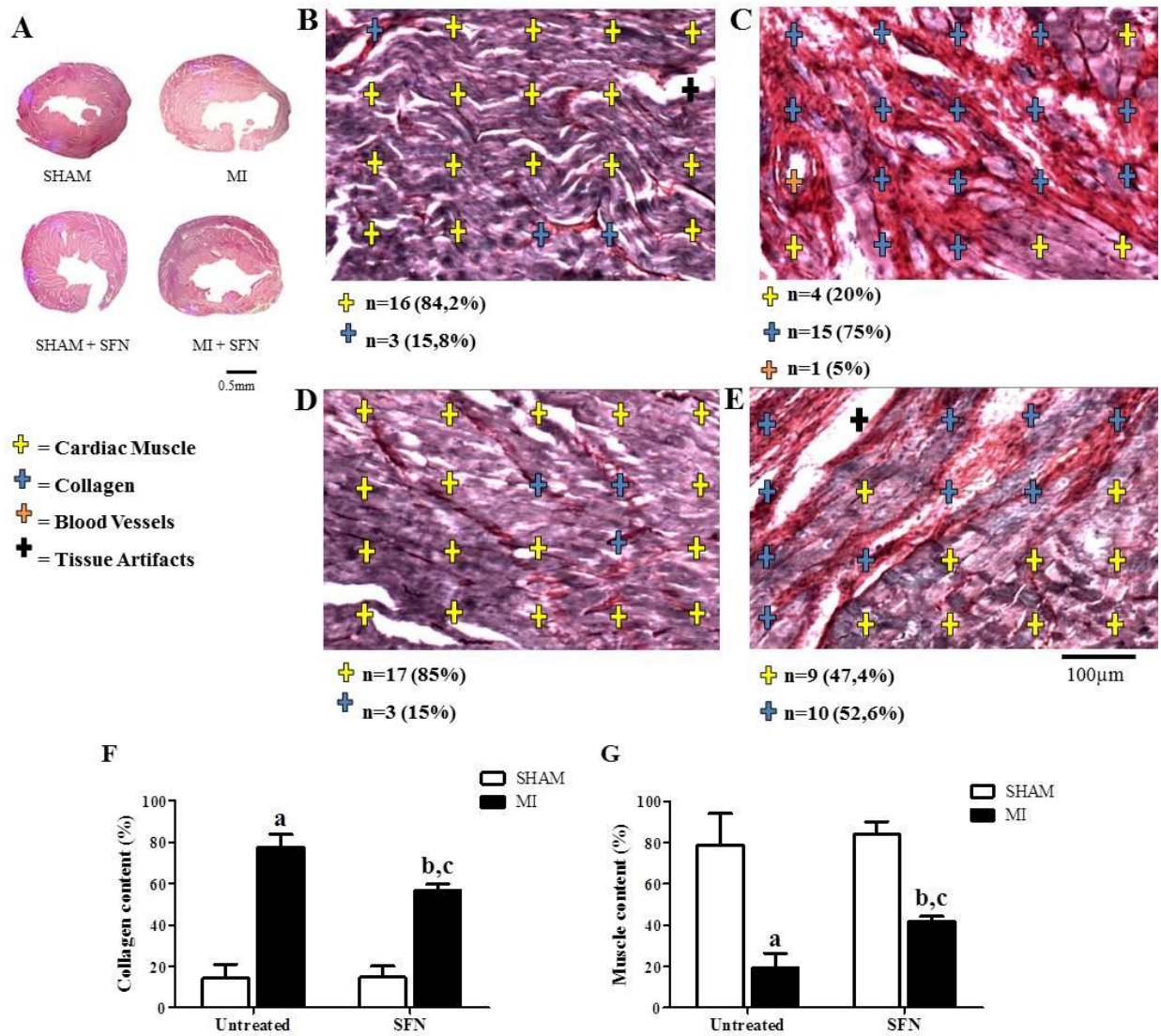
**Figure 8:** Protein expression protein related to autophagy: ratio *phospho*-AMPK $\alpha$  (Thr 172)/ total AMPK $\alpha$  (A) and LC3B (Light Chain isoform B), represented by LC3-II/ LC3-I ratio (B), in cardiac tissue post-myocardial infarction followed by treatment with sulforaphane (5 mg/Kg) during 25 days.  $\beta$ -actin was used as load control. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. from 4 per group. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. from 5-8 per group. . <sup>a</sup> significant difference from SHAM (P<0.05).

**Figure 9:** Protein expression of Nrf-2 (A) and PGC-1 $\alpha$  (B) in cardiac tissue after acute myocardial infarction followed by treatment with sulforaphane (5 mg/Kg) during 25 days. Ponceuu or  $\beta$ -actin were used as load control. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. from N=4 per group. Values are expressed as mean  $\pm$  S.D. from 5-8 per group.

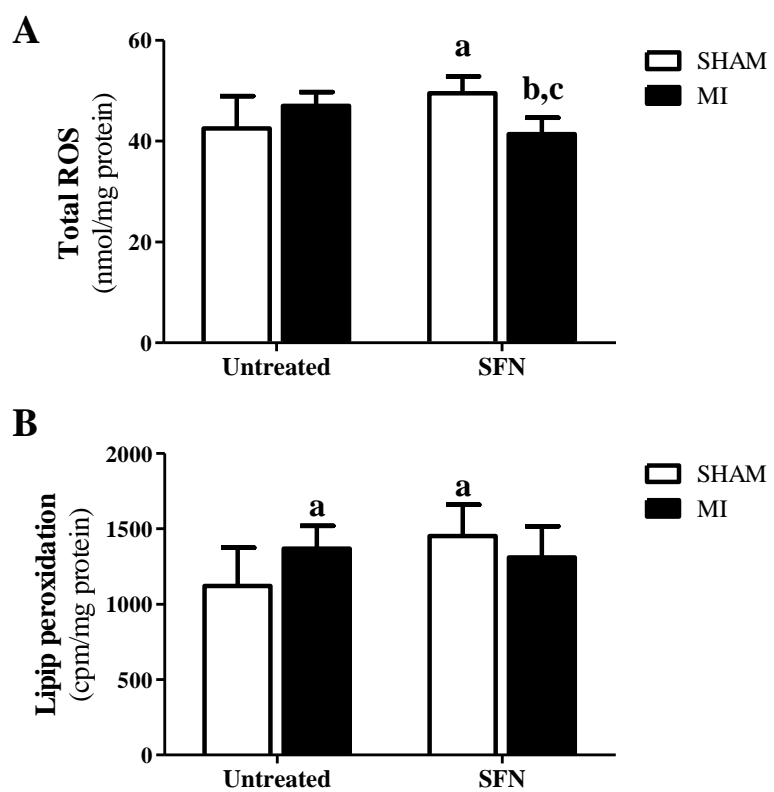
**Figure 1:**



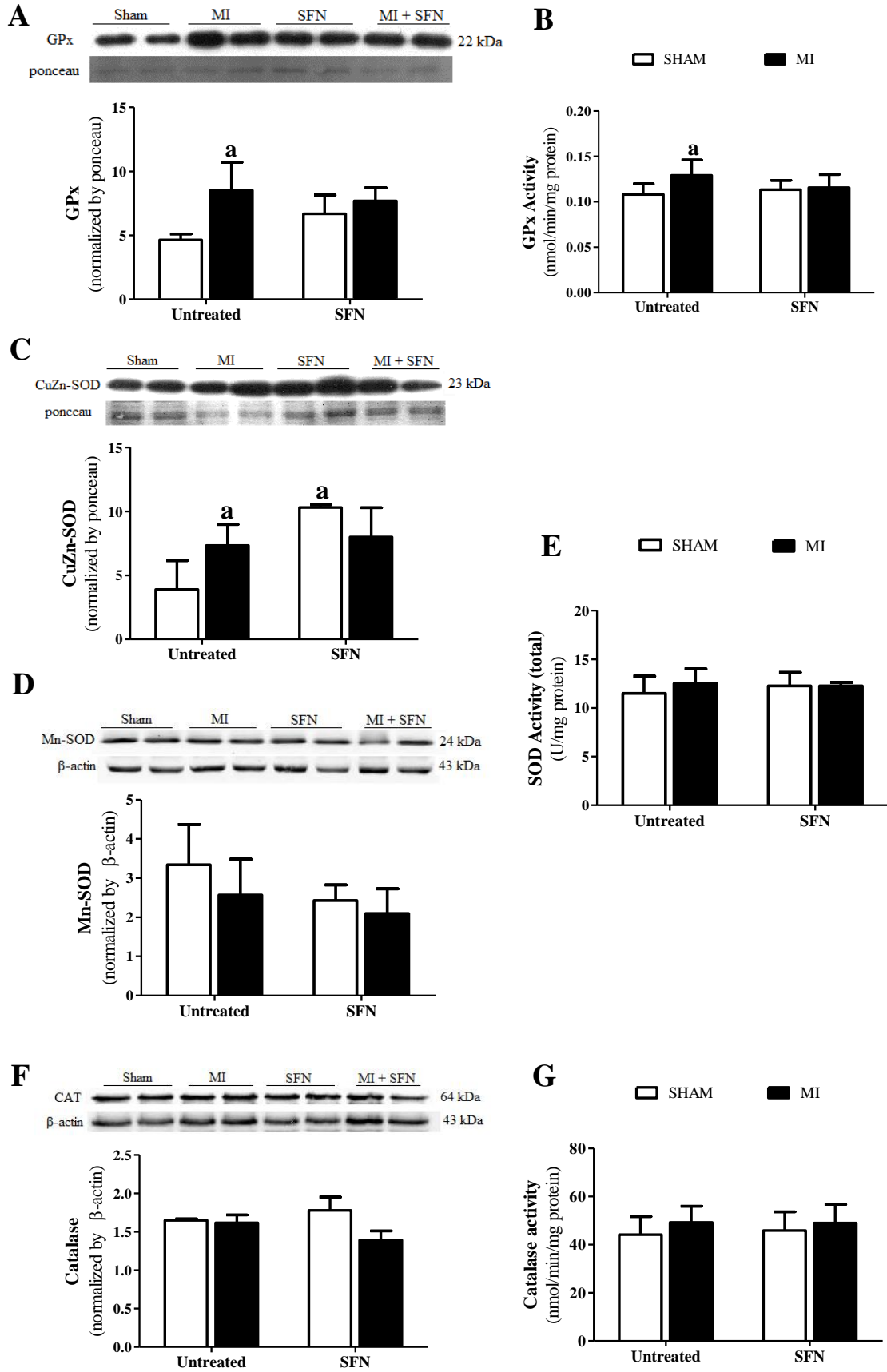
**Figure 2:**



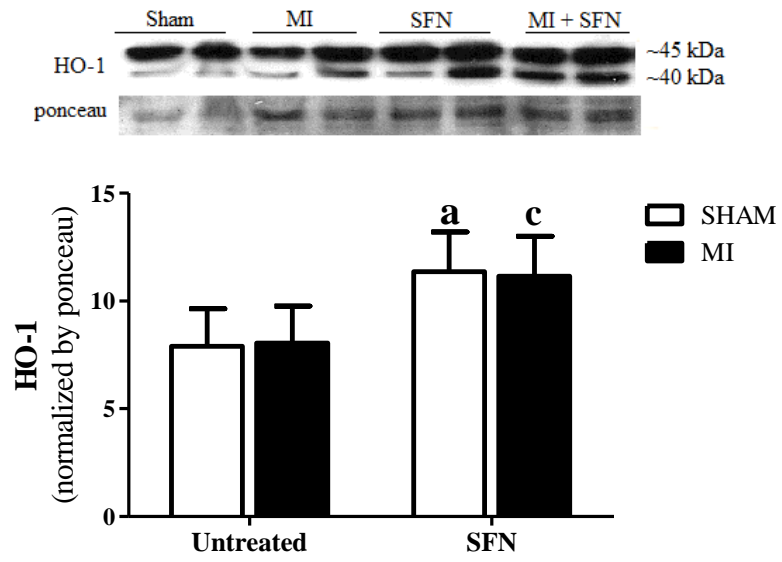
**Figure 3:**



**Figure 4:**

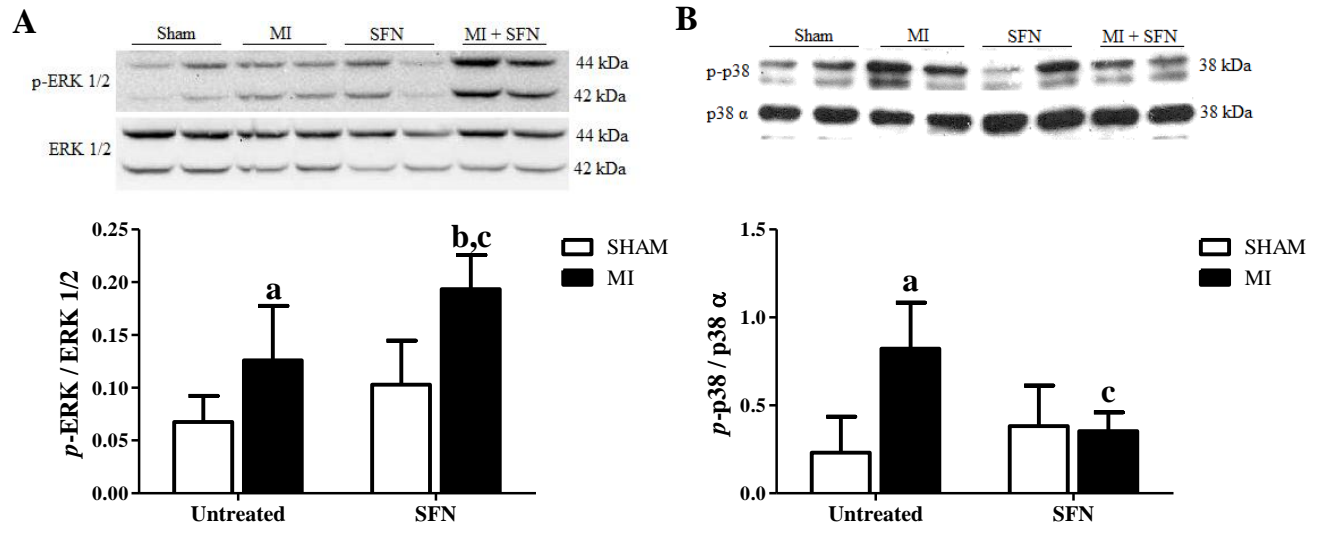


**Figure 5:**

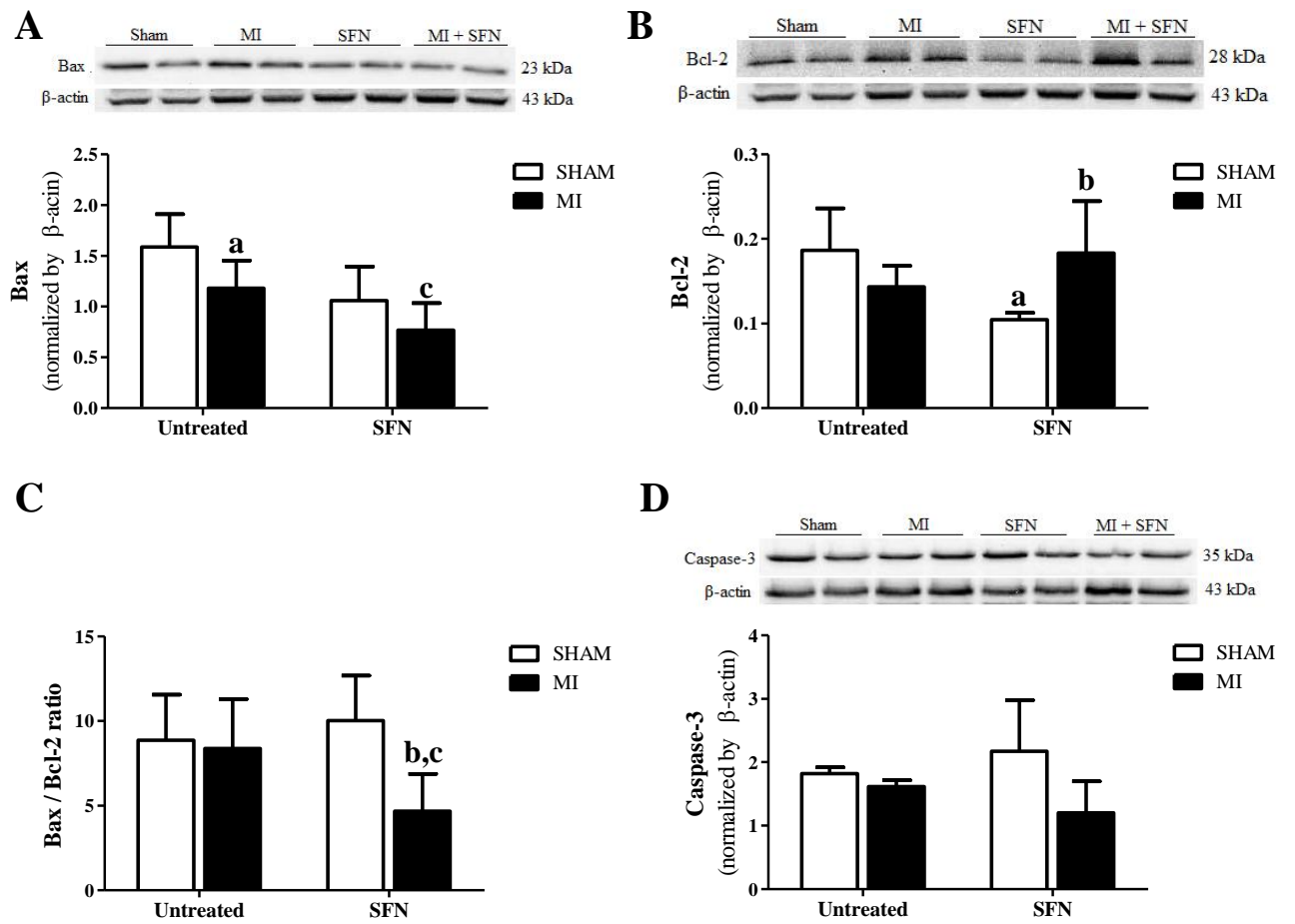




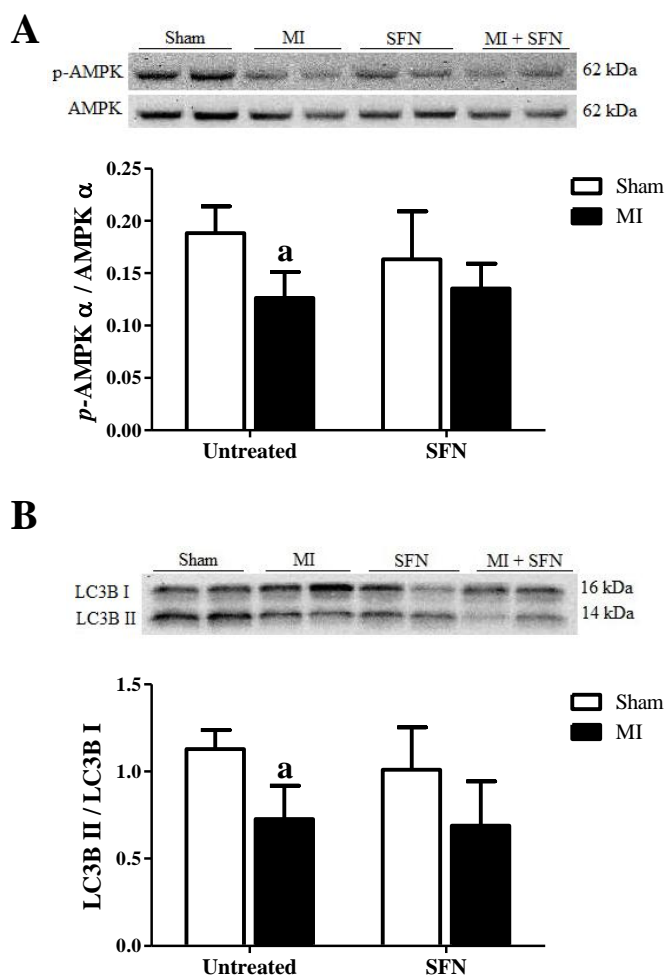
**Figure 6:**



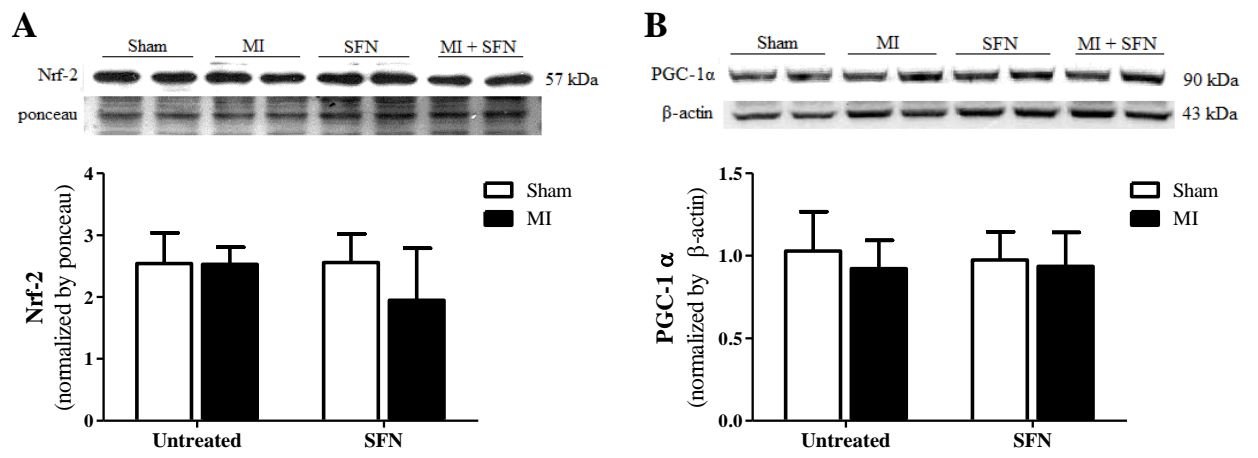
**Figure 7:**



**Figure 8:**



**Figure 9:**



## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o uso do composto sulforafano apresenta efeitos protetores sobre cultura de células cardíacas e sobre o coração de ratos em processo de remodelamento cardíaco patológico após infarto do miocárdio. O estudo *in vitro*, utilizando mioblastos cardíacos, demonstrou que o sulforafano pode atuar como agente anti-apoptótico, agindo sobre a via intrínseca da apoptose (razão Bax/Bcl-2 e caspase 3/7), quando utilizado em baixas concentrações. Esse efeito citoprotetor foi relacionado com a capacidade deste isotiocianato de modular o estado redox intracelular, aumentar as defesas antioxidantes (SOD, CAT e HO-1) e reduzir os oxidantes (EROs e peroxidação lipídica). Sugere-se que este efeito seja via modulação do fator de transcrição PGC-1 $\alpha$ . O estudo *in vivo* demonstrou que o uso do sulforafano, como intervenção terapêutica, foi capaz de atenuar o remodelamento cardíaco patológico. Esse efeito foi associado a menor concentração de EROs, assim como à proteção antioxidante adaptativa pelo aumento da expressão da HO-1. Esse balanço pró-oxidante/antioxidante, contribuindo para um estado redox menos oxidado, foi relacionado a um balanço positivo de sinalização para sobrevivência celular evidenciado através das MAPKs (ERK 1/2 e p38), redução da via intrínseca de apoptose (razão Bax/Bcl-2) e manutenção da função autofágica (via AMPK/LC3). Estes achados sugerem um papel cardioprotetor do sulforafano, por atuar sobre principais eventos envolvido no remodelamento cardíaco patológico, como estresse oxidativo e apoptose, reduzindo a progressão para a insuficiência cardíaca.

O efeito deste composto é bastante evidenciado como um agente anticarcinogênico e anti-proliferativo (Dinkova-Kostova AT & y, 2008; Jude N et al., 2007; Kensler TW et, 2013). Diversos estudos demonstram que, o uso de sulforafano em altas concentrações, ativa processos de morte celular, como a apoptose, em células cancerígenas *in vitro*, assim como em modelos experimentais (Jude N et al., 2007). O sulforafano é considerado um antioxidante indireto, pois este atua estimulando as defesas antioxidantes intracelulares e proteínas detoxificadoras, via ativação de fatores de transcrição. O mecanismo de ação melhor descrito, até então, é através da via Keap-1/Nrf-2/ARE (Dinkova-Kostova AT & Talalay P, 2008). Os achados em estudos experimentais suportam os recentes estudos desenvolvidos com fontes ricas em sulforafano, como é o caso do broto de brócolis, em pesquisas clínicas com pacientes com diabetes tipo 2, populações expostas a agentes carcinogênicos, pacientes com autismo, assim como em indivíduos hígidos para observar o uso deste composto como agente terapêutico (Bahadoran Z et al., 2011; Kensler TW et al., 2012; Singh K et al., 2014; Riedl

MA et al., 2009). O mecanismo de ação do sulforafano pode ser também benéfico sobre os eventos que ocorrem sobre o tecido cardíaco após dano. No entanto, não há fortes evidências do uso deste composto em células cardíacas e em estudos experimentais, em relação a concentrações, doses e terapias de intervenção sobre o sistema cardiovascular.

Sendo assim, o estudo *in vitro* foi desenvolvido com dois objetivos principais: analisar a viabilidade das células cardíacas em resposta à incubação com sulforafano, assim como seu efeito sobre vias de sinalização para morte celular nestes cardiomioblastos. Foi observado que apenas baixas concentrações preservaram a viabilidade celular. A partir destes achados, foi estabelecida a dose a ser utilizada nas demais análises *in vitro*. Inicialmente, não se observou associação entre o aumento das defesas antioxidantes e a expressão do fator de transcrição Nrf-2. No entanto, esta resposta foi relacionada com o aumento da expressão do co-fator PGC-1 $\alpha$ . O PGC-1 $\alpha$  apresenta efeitos sobre a transcrição de genes envolvidos na resposta antioxidante no tecido cardíaco (Lu Z et al., 2010). Além disso, um estudo com fibroblastos humanos demonstrou que o sulforafano é capaz de estimular o PGC-1 $\alpha$  (Brose RD et al., 2012). Com isso, o presente estudo com cultura de cardiomioblastos, sugere que o sulforafano estimulou a atividade da SOD, CAT e GST, assim como a expressão da proteína citoprotetora HO-1, podendo ser via estimulação da PGC-1 $\alpha$ . Associado a isso, o aumento das defesas antioxidantes foi relacionado com a redução do estresse oxidativo e dano oxidativo a lipídeos, indicando um ambiente redox mais reduzido.

A redução do estresse oxidativo está relacionada com a diminuição na sinalização da via intrínseca pró-apoptótica em cardiomiócitos (Whelan RS et al., 2010). O presente estudo *in vitro*, demonstrou que o sulforafano estimulou a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, contribuindo para a redução da razão Bax/Bcl-2. A redução desta razão indica um melhor controle da permeabilidade da membrana mitocondrial, evitando que proteínas apoptogênicas mitocondriais se desloquem para o citoplasma, ativando, por fim, a família das caspases. Somado a isso, foi observada redução das caspases 3/7 ativadas, as quais são proteases executoras do processo da via intrínseca de morte celular (Whelan RS et al., 2010).

Vias de sinalização redox sensíveis relacionadas com a modulação de morte celular e de sobrevivência foram também investigadas neste estudo. Observou-se redução da fosforilação da MAPK JNK1/2 após incubação com sulforafano. A JNK 1/2, no tecido cardíaco, está principalmente relacionada com disfunção celular e ativação de morte celular. Esta proteína é também classificada como SAPK, uma vez que é ativada por estresse (Trachootam D et al., 2008). Por outro lado, o sulforafano não ativou a via redox sensível de sobrevivência

PI3K/Akt. Estes resultados reforçam a ideia de que o ambiente redox intracelular destas células cardíacas está mais reduzido.

Estes achados sobre a ação citoprotetora do sulforafano, reduzindo o estresse oxidativo e vias apoptóticas em cultura de células cardíacas, estimulou sua investigação como estratégia terapêutica sobre o remodelamento cardíaco patológico após infarto do miocárdio. Uma vez que a morte celular e o estresse oxidativo são eventos-chave no processo de transição da resposta cardíaca compensada para a descompensada, a interrupção desses é fundamental para a redução do processo de transição para insuficiência cardíaca (González A et al., 2011).

Desta forma, buscou-se estabelecer a dose terapêutica a ser utilizada no estudo in vivo. Em experimento prévio do laboratório, utilizando modelo de isquemia-reperfusão cardíaca, com a administração de sulforafano na dose de 0,5 mg/Kg (i.p), durante 3 dias antes do protocolo experimental (Piao CS et al., 2010), não foi observada melhora funcional. Portanto, optou-se por utilizar uma dose 10 vezes maior de sulforafano, com o intuito de verificar se haveria cardioproteção, com ausência de toxicidade. O modelo de infarto do miocárdio foi desenvolvido com sucesso. Inicialmente, os ratos dos grupos *MI* e *MI+SFN*, distribuídos de forma randomizada, apresentaram parâmetros morfométricos e funcionais iguais, indicando semelhança entre os grupos experimentais antes da intervenção com sulforafano. O remodelamento cardíaco patológico foi observado pela dilatação das câmaras ventriculares, hipertrofia cardíaca, disfunção contrátil e aumento de fibrose no miocárdio remanescente nos grupos infartados comparados aos não-infartados (*SHAM*), no 28º dia pós-cirúrgico. Após o período de tratamento, a análise ecocardiográfica final entre os grupos *MI* e *MI+SFN* apresentaram resultados semelhantes em relação à dilatação ventricular na sístole e na diástole, fração de ejeção (*EF%*) e mudança na área fracional (*FAC*). Ao analisar o índice de estresse de parede (*WTI – wall tension index*), o grupo *MI* apresentou este índice aumentado quando comparado ao seu controle *SHAM*. No entanto, este índice foi preservado no grupo *MI+SFN*, mantendo-se similar ao seu controle *SHAM+SFN*. O índice de tensão de parede representa o balanço entre a dilatação da câmara cardíaca com a resposta compensatória da hipertrofia do músculo cardíaco. A redução no valor deste índice representa uma melhor função mecânica do coração (Opie LH et al, 2006).

Quando comparou-se a progressão do remodelamento cardíaco temporalmente, através das análises ecocardiográficas inicial (3º dia) com a final (28º dia), foi observada progressão da dilatação das câmaras ventriculares e, piora dos índices de contratilidade cardíaca (*EF%* e *FAC*), no grupo *MI*. Por outro lado, o tratamento com sulforafano foi capaz de manter estáveis estes parâmetros durante o curso da doença no grupo *MI+SFN*.

Somado a estes efeitos positivos sobre a estrutura e função do coração, o tratamento com sulforafano dos ratos do grupo *MI+SFN* reduziu, significativamente, a deposição de colágeno na musculatura cardíaca viável, em comparação com o grupo *MI*. Estes achados demonstram o papel cardioprotetor do sulforafano, uma vez que este atenua a progressão do remodelamento cardíaco patológico, pela redução da fibrose intersticial, a qual é considerada um fator de risco independente para a insuficiência cardíaca (González A et al, 2011).

É importante ressaltar que todos os ratos infartados, apesar de apresentarem disfunção cardíaca, não alcançaram o estágio de insuficiência cardíaca congestiva. Esta constatação baseia-se nos dados de congestão hepática e pulmonar, os quais não apresentaram diferenças entre os grupos infartados e controles. Estes achados sugerem que os corações poderiam estar em uma fase compensatória do processo de transição para a insuficiência cardíaca.

Com relação aos aspectos bioquímicos e moleculares, os ratos do grupo *MI* apresentaram maior dano oxidativo, observado pelo aumento da peroxidação lipídica quando comparados aos ratos do grupo *SHAM*. Além disso, em resposta a um ambiente com maior dano oxidativo, o sistema de defesa antioxidante apresentou-se elevado neste grupo *MI*, observado pelo aumento da atividade e expressão da GPx e da expressão da CuZn-SOD. Por outro lado, o sulforafano reduziu o estresse oxidativo, evidenciado pela diminuição dos níveis de EROs. Uma explicação plausível para este efeito do sulforafano, combatendo o estresse oxidativo no grupo *MI+SFN*, foi através do aumento da expressão da HO-1, associado à manutenção de níveis elevados da expressão da CuZn-SOD. Sugere-se que o ambiente redox resultante desta ação antioxidante do sulforafano prescinde do aumento da atividade da GPx.

Ao mesmo tempo em que se sugere um ambiente intracelular mais oxidado no tecido cardíaco do grupo *MI*, esses achados vão ao encontro da estimulação das cinases redox sensíveis, corroborando o entendimento do que foi observado ao nível funcional. O aumento da fosforilação da ERK 1/2, proteína relacionada principalmente com resposta hipertrófica e sobrevivência celular, pode estar contrabalançando a elevada ativação da p38 no grupo *MI*. Assim como a JNK 1/2 (no estudo *in vitro*), a p38 também é classificada como SAPKs e, sua atividade elevada, pode estar associada ao estado mais oxidado do tecido cardíaco dos ratos *MI*. A p38 é uma cinase envolvida com ativação de morte celular, sendo uma proteína que favorece a disfunção cardíaca (Muslin AJ, 2008). No grupo *MI+SFN*, a fosforilação das MAPKs apresentou diferente resposta quando comparado ao grupo *MI*. Foi observada pronunciada elevação da fosforilação da ERK 1/2 no grupo *MI+SFN*, quando comparada ao grupo *MI*. Por outro lado, observou-se uma redução da fosforilação da p38 no grupo *MI+SFN* quando comparado ao *MI*. Este padrão observado, de elevação da cinase de sobrevivência e



redução da cinase relacionada à morte e disfunção cardíaca, foi associado ao estado redox reduzido no grupo *MI+SFN* (Qin F et al., 2005).

Segundo a literatura, a ativação das SAPKs, por variações do estado redox associada à elevação das EROs, relaciona-se com ativação das vias de morte celular em cardiomiócitos (Matsuzawa A & Ichijo H, 2005; Trachootam DA et al, 2008). Além disso, a morte celular está relacionada com a progressão para a insuficiência cardíaca (Burchfield JS et al., 2013). No presente estudo, observou-se que a razão Bax/Bcl-2 e a expressão da caspase 3 apresentaram-se iguais no grupo *MI* quando comparadas ao *SHAM*. Esses achados sugerem que há um balanço entre o estado redox e as MAPKs, contribuindo para a estabilização da sinalização apoptótica (Trachootam D et al. 2008; Tullio F et al., 2013). Além de uma maior atividade de vias relacionadas com sobrevivência celular no grupo *MI+SFN*, o tratamento com sulforafano foi capaz de reduzir a razão Bax/Bcl-2, quando comparado ao grupo *MI*. Esta resposta ocorreu uma vez que houve importante redução da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, sendo esta relacionada com elevada ativação da ERK1/2 e reduzida da p38. Mesmo não observada a redução da caspase-3, estes dados apontam para um efeito anti-apoptótico exercido pelo sulforafano.

Cabe ressaltar que a proteína anti-apoptótica Bcl-2 foi reduzida, significativamente, no grupo *SHAM+SFN* comparado com o grupo *SHAM*. Além de exercer ação anti-apoptótica, estudos indicam que a Bcl-2 também atua inibindo a apoptose via ação antioxidante, controlando o estado redox celular (Voehringer DW & Meyn RE, 2000; Hockenbery DM et al., 1993). Essa redução da Bcl-2 pode, também, estar associada com a elevação dos níveis de EROs e dano oxidativo lipídico, observado no grupo *SHAM+SFN*. No entanto, a administração crônica de sulforafano em animais saudáveis (5 mg/Kg), não promoveu alterações sugestivas de toxicidade.

O processo apoptótico está também relacionado à autofagia (Boya P et al, 2005), a qual contribui, enormemente, para a progressão do remodelamento cardíaco (Kanamori H et al., 2011). A autofagia, avaliada pela via de sinalização da AMPK/LC3, apresentou redução significativa no grupo *MI* quando comparado ao grupo *SHAM*. A razão LC3-II/LC3-I é um estabelecido indicador da ativação do processo autofágico, uma vez que a LC3-II está correlacionada com a extensão da formação do autofagossoma (Kabeya Y et al., 2000). O tratamento com sulforafano no grupo *MI+SFN* manteve a função autofágica semelhante quando comparada ao grupo *SHAM+SFN*. Este resultado pode estar contribuindo para uma melhor manutenção do tecido cardíaco observado no grupo *MI+SFN*.

## 7. CONCLUSÃO

A partir do estudo *in vitro*, com cardiomioblastos, estabeleceu-se que a concentração de 5  $\mu\text{mol/L}$  de sulforafano foi capaz de aumentar as defesas antioxidantes, em especial a expressão da heme oxigenase-1. Este efeito foi associado com redução de estresse oxidativo e atenuação da via intrínseca do processo de apoptose celular.

No estudo *in vivo*, utilizando o modelo de infarto do miocárdio para gerar remodelamento cardíaco patológico, foi observado que o sulforafano atenuou eventos críticos para a manutenção da função cardíaca, tais como redução do conteúdo de colágeno e preservação da musculatura cardíaca. Estes efeitos benéficos foram associados a um aumento da expressão da heme oxigenase-1, com consequente redução de espécies reativas de oxigênio. Estas adaptações do ambiente redox celular foram associadas com a modulação da sinalização celular em direção à sobrevivência, com preservação da função autofágica.

O conjunto de resultados apresentados nesta tese, analisando o efeito cardioprotetor do sulforafano, aponta para a ativação da heme oxigenase-1 como um mecanismo central envolvido na modulação de vias de morte e sobrevivência celular, culminando com um remodelamento cardíaco mais favorável.

Desta forma, estes achados suportam o uso do sulforafano como estratégia terapêutica coadjuvante para intervenção clínica, a fim de limitar o processo de remodelamento cardíaco patológico, evitando sua progressão para a insuficiência cardíaca.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Abbate A, Narula J. Role of apoptosis in adverse ventricular remodeling. *Heart Fail Clin.* 2012, 8(1):79

Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev.* 2008 Mar;60(1):79-127.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v.105, p.121-126; 1984.

Afanas'ev, I. ROS and RNS Signaling in Heart Disorders: Could Antioxidant Treatment Be Successful? *Oxid Med Cell Longev*, v. 2011, 13 p., 2011.

Alvarez, P.S., Simão, F., Hemb, M., Xavier, L.L., Nunes, M.L. Effects of undernourishment, recurrent seizures and enriched environment during early life in hippocampal morphology. *International Journal of Developmental Neuroscience* (2014) 33: 81-87.

Anestopoulos I, Kavou A, Tentes I, Kortsaris A, Panayiotidis M, Lazou A, Pappa A (2013) Silibinin protects H9c2 cardiac cells from oxidative stress and inhibits phenylephrine-induced hypertrophy: potential mechanisms. *J Nutr Biochem.* 24(3):586-94.

Angeloni C, Leoncini E, Malaguti M, Angelini S, Hrelia P, Hrelia S. Modulation of phase II enzymes by sulforaphane: implications for its cardioprotective potential. *J Agric Food Chem.* 2009 Jun 24;57(12):5615-22.

Anzai T. Post-infarction inflammation and left ventricular remodeling: a double-edged sword. *Circ J.* 2013;77(3):580-7.

Asrih M, Mach F, Nencioni A, Dallegri F, Quercioli A, Montecucco F. Role of mitogen-activated protein kinase pathways in multifactorial adverse cardiac remodeling associated with metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013:367245.

Bai Y, Cui W, Xin Y, Miao X, Barati MT, Zhang C, Chen Q, Tan Y, Cui T, Zheng Y, Cai L. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 57:82-95

Baines C.P., Molkenkin J.D. Stress signaling pathway that modulate cardiac myocyte apoptosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v.38, p.47-62, 2005.

Baird L, Dinkova-Kostova AT. Arch Toxicol. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. 2011 Apr; 85(4):241-72.

Beauloye C, Bertrand L, Horman S, Hue L. AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure. *Cardiovasc Res.* 2011 May 1; 90(2):224-33.

Bahadoran Z, Mirmiran P, Hosseinpanah F, Hedayati M, Hosseinpour-Niazi S, Azizi F. Broccoli sprouts reduce oxidative stress in type 2 diabetes: a randomized double-blind clinical trial. *Eur J Clin Nutr.* 2011 Aug;65(8):972-7

Bharucha AE, Choi KM, Saw JJ, Gibbons SJ, Farrugia GF, Carlson DA, Zinsmeister AR. Effects of aspirin & simvastatin and aspirin, simvastatin, & lipoic acid on heme oxygenase-1 in healthy human subjects. *Neurogastroenterol Motil.* 2014 Oct; 26(10):1437-42.

Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, e cols. Sociedade Brasileira de Cardiologia. III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. Arq Bras Cardiol 2009; 93(1 supl.1):1-71

Boddupalli S.; Mein, J. R.; Lakkanna S.; James, D.R. Induction of phase 2 antioxidant enzymes by broccoli sulforaphane: perspectives in maintaining the antioxidant activity of vitamins A,C,and E. *Frontiers in Genetics*. v. 3, n. 7, 2012.

Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G. . Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2005 Feb; 25(3):1025-40

Brose RD, Shin G, McGuinness MC, Schneidereith T, Purvis S, Dong GX, Keefer J, Spencer F, Smith KD (2012) Activation of the stress proteome as a mechanism for small molecule therapeutics. *Hum Mol Genet*. 21(19):4237-52.

Bryan S, Yang G, Wang R, Khaper N (2011) Cystathionine gamma-lyase-deficient smooth muscle cells exhibit redox imbalance and apoptosis under hypoxic stress conditions. *Exp Clin Cardiol*. 16(4):e36-41.

Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *EMBO J*. 2000 Dec 1; 19(23):6341-50.

Burchfield JS, Xie M, Hill JA. Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation*. 2013 Jul 23; 128(4):388-400.

Chung SD, Lai TY, Chien CT, Yu HJ. Activating Nrf-2 signaling depresses unilateral ureteral obstruction-evoked mitochondrial stress-related autophagy, apoptosis and pyroptosis in kidney. *PLoS One*. 2012; 7(10):e47299.

Conzatti A, Fróes FC<sup>2</sup>, Schweigert Perry ID<sup>3</sup>, Souza CG<sup>4</sup>. Clinical and molecular evidence of the consumption of broccoli, glucoraphanin and sulforaphane in humans. *Nutr Hosp*. 2014 Nov 30; 31(2):559-69.

DATASUS - Ministério Da Saúde/Svs – Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM. Disponível em: [www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br).

de Castro AL, Tavares AV, Campos C, Fernandes RO, Siqueira R<sup>1</sup>, Conzatti A<sup>1</sup>, Bicca AM, Fernandes TR, Sartório CL<sup>1</sup>, Schenkel PC<sup>2</sup>, Belló-Klein A<sup>1</sup>, da Rosa Araujo AS<sup>3</sup>. Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jun 25; 391(1-2):22-9.

De Paula, S., Vitola, A.S., Greccio, S., De Paula, D., Mello, P.B., Mistrelo, J.L., Xavier, L.L., Fiori, H., Dacosta, J.C. Hemispheric Brain Injury and Behavioral Deficits Induced by Severe Neonatal Hypoxia-Ischemia in Rats Are Not Attenuated by Intravenous Administration of Human Umbilical Cord Blood Cells. *Pediatric Research* (2009) 65: 631-635.

DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, Courtois M, Muslin AJ. Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *J Biol Chem*. 2006 Oct 27; 281(43):32841-51.

Díez J, Querejeta R, López B, González A, Larman M, Martínez Ubago JL. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation*. 2002 May 28; 105(21):2512-7.

- Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res.* (2008). 52 Suppl 1:S128-38.
- Distefano G, Sciacca P (2012) Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure. *Ital J Pediatr.* 38:41.
- Doberer D, Haschemi A, Andreas M, Zapf TC, Clive B, Jeitler M, Heinzl H, Wagner O, Wolzt M, Bilban M. Haem arginate infusion stimulates haem oxygenase-1 expression in healthy subjects. *Br J Pharmacol.* 2010 Dec; 161(8):1751-62.
- Dorn G.W. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*, v.49, p.962–970, 2007.
- Dorn GW 2nd. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodelling. *Cardiovasc Res.* 2009 Feb 15; 81(3):465-73.
- Eifer Møller J, Singh D Enalapril suppresses ventricular remodeling after acute myocardial infarction more effectively than losartan. *Evid Based Cardiovasc Med.* 2006 Mar; 10(1):32-4.
- Evans Pc. The influence of sulforaphane on vascular health and its relevance to nutritional approaches to prevent cardiovascular disease. *EPMA J.* 2011 Mar; 2(1):9-14.
- Fahey JW, Talalay P. Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol.* 1999 Sep-Oct; 37(9-10):973-9.
- Fernandes RO, Dreher GJ, Schenkel PC, Fernandes TR, Ribeiro MF, Araujo AS, Belló-Klein A. Redox status and pro-survival/pro-apoptotic protein expression in the early cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *Cell Biochem Funct.* 2011 Oct; 29(7):617-23.
- Fink BN, Kelly DP (2006) PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.* 116(3):615-22.
- Flohé L., Gunzler W.A. Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, v.105, p.14–121, 1984.
- Foo RS, Siow RC, Brown MJ, Bennett MR. Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits angiotensin II-mediated rat cardiac myocyte apoptosis but not hypertrophy. *J Cell Physiol.* 2006 Oct; 209(1):1-7.
- Francis J., Weiss R.M., Wei S.G., Johnson A.K., Felder R.B. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 281, p.1734–1745, 2001.
- Frangogiannis NG. The immune system and cardiac repair. *Pharmacol Res.* 2008 Aug; 58(2):88-111.
- Golbidi, S.; Badran,M.; Laher, I. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects Of Exercise In Diabetic Patients. *Experimental Diabetes Research, Exp Diabetes Res.* 2012; 2012:941868.
- González A, Ravassa S, Beaumont J, López B, Díez J. New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Oct 25;58(18):1833-43.
- Gonzalez Flecha .B., Llesuy S., Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Radicals in Biology and Medicine*, v.10, p.41–47, 1991.

- Grabellus F, Schmid C, Levkau B, Breukelmann D, Halloran PF, August C, Takeda N, Takeda A, Wilhelm M, Deng MC, Baba HA. Reduction of hypoxia-inducible heme oxygenase-1 in the myocardium after left ventricular mechanical support. *J Pathol.* 2002 Jun; 197(2):230-7.
- Grieve, D.J.; Byrne, J.A.; Cave, A.C.; Shah, A. Role of Oxidative Stress in Cardiac Remodelling after Myocardial Infarction. *Heart Lung and Circulation*, v. 13, n. 2, p. 132–138, Jun. 2004.
- Guerrero-Beltrán, C. E.; Calderón-Oliver, M.; Pedraza-Chaverri, J.; Chirino, Y. I. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: Recent advances. *Experimental and Toxicologic Pathology*. v. 64, p. 503– 508, 2012.
- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 899:136-47.
- Hafstad AD, Nabeebaccus AA, Shah AM. Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Fahey Basic Res Cardiol.* 2013 Jul; 108(4):359.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006.
- Hammerman H, Kloner RA, Schoen FJ, Brown EJ Jr, Hale S, Braunwald E. Indomethacin-induced scar thinning after experimental myocardial infarction. *Circulation.* 1983 Jun; 67(6):1290-5.
- Heber D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. *J Postgrad Med.* 2004 Apr-Jun; 50(2):145-9.
- Heusch G, Libby P, Gersh B<sup>3</sup>, Yellon D, Böhm M<sup>5</sup>, Lopaschuk G, Opie L. Cardiovascular remodelling in coronary artery disease and heart failure. *Lancet.* 2014 May 31;383(9932):1933-43.
- Hill MF, Palace VP, Kaur K, Kumar D, Khaper N, Singal PK. Reduction in oxidative stress and modulation of heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Exp Clin Cardiol.* 2005 Fall; 10(3):146-53.
- Ho JN, Yoon HG, Park CS, Kim S, Jun W, Choue R, Lee J. Isothiocyanates ameliorate the symptom of heart dysfunction and mortality in a murine AIDS model by inhibiting apoptosis in the left ventricle. *J Med Food.* 2012 Sep; 15(9):781-7.
- Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell.* 1993 Oct 22; 75(2):241-51
- Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2009 Feb 15;81(3):457-64.
- Hybertson, B. M.; Gao, B.; Bose, S. K.; Mccord, J.M. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*. v. 32, p. 234–246, 2011. *Hypertension.* 2008 Nov; 52(5):918-24
- Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006 Sep-Oct;8(9-10):1865-79.
- Juge N, Mithen RF, Traka M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 2007 May; 64(9):1105-27.
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000 Nov 1;19(21):5720-8.

Kanamori H, Takemura G, Goto K, Maruyama R, Tsujimoto A, Ogino A, Takeyama T, Kawaguchi T, Watanabe T, Fujiwara T, Fujiwara H, Seishima M, Minatoguchi S. The role of autophagy emerging in postinfarction cardiac remodelling. *Cardiovasc Res*. 2011 Jul 15; 91(2):330-9.

Kaul, N.; Siveski-Iliskovic, N.; Hill, M.; Slezak, J., Singal, P.K. Free radicals and the heart. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 30, n. 2, p. 55-67, Oct. 1993.

Kee HJ, Kim GR, Kim IK, Jeong MH. Sulforaphane suppresses cardiac hypertrophy by inhibiting GATA4/GATA6 expression and MAPK signaling pathways. *Mol Nutr Food Res*. 2015 Feb; 59(2):221-30.

Kensler TW, Ng D, Carmella SG, Chen M, Jacobson LP, Muñoz A, Egner PA, Chen JG, Qian GS, Chen TY, Fahey JW, Talalay P, Groopman JD, Yuan JM, Hecht SS. Modulation of the metabolism of airborne pollutants by glucoraphanin-rich and sulforaphane-rich broccoli sprout beverages in Qidong, China. *Carcinogenesis*. 2012 Jan;33(1):101-7.

Khaper N, Kaur K, Li T, Farahmand F, Singal PK. Antioxidant enzyme gene expression in congestive heart failure following myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 2003 Sep;251(1-2):9-15.

Khaper N1, Singal PK. Modulation of oxidative stress by a selective inhibition of angiotensin II type 1 receptors in MI rats. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Apr;37(5):1461-6.

Kim YM, Pae HO, Park JE, Lee YC, Woo JM, Kim NH, Choi YK, Lee BS, Kim SR, Chung HT. Heme oxygenase in the regulation of vascular biology: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Jan 1;14(1):137-67.

Klein D., Kern R.M., Sokol R.Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.36, p.59-66, 1995.

Klickovic U, Doberer D, Gouya G, Aschauer S<sup>1</sup>, Weisshaar S<sup>1</sup>, Storcka A<sup>1</sup>, Bilban M<sup>3</sup>, Wolzt M<sup>1</sup>. Human pharmacokinetics of high dose oral curcumin and its effect on heme oxygenase-1 expression in healthy male subjects. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:458592.

Laemmli, V. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, p. 680 – 685, 1970;

Lavandero S<sup>1</sup>, Troncoso R<sup>2</sup>, Rothermel BA<sup>3</sup>, Martinet W<sup>4</sup>, Sadoshima J<sup>5</sup>, Hill JA<sup>3</sup>. Cardiovascular autophagy: concepts, controversies, and perspectives. *Autophagy*. 2013 Oct; 9(10):1455-66.

Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-231.

Lee, J.; Giordano, S.; Zhang, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signaling. *The Biochemical Journal*, v. 441, n. 2, p. 523–540, Jan. 2012.

Leoncini E, Malaguti M, Angeloni C, Motori E, Fabbri D, Hrelia S (2011) Cruciferous vegetable phytochemical sulforaphane affects phase II enzyme expression and activity in rat cardiomyocytes through modulation of Akt signaling pathway. *J Food Sci*. 76(7):H175-81.

Li Z, Galli U, Becker LE, Bruns H, Nickkolgh A, Hoffmann K, Karck M, Schemmer P. Sulforaphane protects hearts from early injury after experimental transplantation. *Ann Transplant*. 2013 Oct 15; 18:558-66.

Lips DJ, deWindt LJ, van Kraaij DJ, Doevendans PA. Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy. *Eur Heart J*. 2003 May; 24(10):883-96.

Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W. Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2002; 55:396–405.

Llesuy, S.F.; Milei, J.; Molina, H.; Boveris, A.; Milei, S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori*. V. 71, p. 241-249, 1985.

Lowry O.H., Rosebrough A.L., Farr A.L., Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265–275, 1951.

Lu Z, Xu X, Hu X, Fassett J, Zhu G, Tao Y, Li J, Huang Y, Zhang P, Zhao B, Chen Y (2010) PGC-1 alpha regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal*. 13(7):1011-22.

Mallik A, Bryan S, Puukila S, Chen A, Khaper N (2011) Efficacy of Pt-modified TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cardiac cells. *Exp Clin Cardiol*. 16(1):6-10.

Mannervik B., Gluthenberg C. Glutathione Transferase. *Methods in Enzymology*, v.77, p.231-235, 1981.

Marklund S. Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton. CRC. Press. 243-247, 1985.

Matsushima S., Ide T., Yamato M., Matsusaka H., Hattori F., Ikeuchi M., Kubota T., Sunagawa K., Hasegawa Y., Kurihara T., Oikawa S., Kinugawa S., Tsutsui H. Remodeling and Failure After Myocardial Infarction in Mice Overexpression of Mitochondrial Peroxiredoxin-3 Prevents Left Ventricular. *Circulation*, v.113, p.1779-1786, 2006.

Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI 3-kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Jan; 38(1):63-71.

Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Mar-Apr; 7(3-4):472-81.

McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep-Oct; 8(9-10):1775-89.

McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Apr; 34(4):255-62..

Mill JG, Stefanon I, dos Santos L, Baldo M.P. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. *Braz J Med Biol Res*, September 2011, Volume 44(9) 890-898

Murashima M, Watanabe S, Zhuo XG, Uehara M, Kurashige A. Phase 1 study of multiple biomarkers for metabolism and oxidative stress after one-week intake of broccoli sprouts. *Biofactors*. 2004; 22(1-4):271-5.

Murphy, M. P.; Holmgren, A. Unraveling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species. *Cell Metabolism*, v. 13, n. 4, p. 361-366, Abr. 2011.



Muslin AJ (2008) MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond)*. 115(7):203-18.

Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*. 2007 May; 13(5):619-24.

Nallasamy P, Si H<sup>2</sup>, Babu PV, Pan D, Fu Y, Brooke EA, Shah H, Zhen W, Zhu H, Liu D, Li Y, Jia Z. Sulforaphane reduces vascular inflammation in mice and prevents TNF- $\alpha$ -induced monocyte adhesion to primary endothelial cells through interfering with the NF- $\kappa$ B pathway. *J Nutr Biochem*. 2014 Aug;25(8):824-33.

Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med*. 2007 May; 13(5):619-24.

Negrette-Guzmán M<sup>1</sup>, Huerta-Yepez S, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Modulation of mitochondrial functions by the indirect antioxidant sulforaphane: a seemingly contradictory dual role and an integrative hypothesis. *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec; 65:1078-89.

New targets to treat the structural remodeling of the myocardium. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Oct 25; 58(18):1833-43.

Nguyen B, Luong L, Naase H, Vives M, Jakaj G, Finch J, Boyle J, Mulholland JW, Kwak JH, Pyo S, de Luca A<sup>1</sup>, Athanasiou T<sup>6</sup>, Angelini G<sup>6</sup>, Anderson J<sup>6</sup>, Haskard DO<sup>1</sup>, Evans PC Sulforaphane pretreatment prevents systemic inflammation and renal injury in response to cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014, 148(2):690-697.e3

Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N, Carvalho AC, Cravo SL, Campos O, Tucci PJ, Moises VA. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2006 May; 39(5):687-95.

O'Neill BT, Abel ED. Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe? *J Clin Invest*. 2005 Aug; 115(8):2059-64

Onodera H, Matsunaga T, Tamura Y, Maeda N, Higuma T, Sasaki S, Mori Y, Yoshimachi F, Ishizaka H, Hanada H, Osanai T, Okumura K. Enalapril suppresses ventricular remodeling more effectively than losartan in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2005 Oct; 150(4):689.

Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. *Lancet*. . Controversies in ventricular remodelling. 2006 Jan 28; 367(9507):356-67.

Paine, A.; Eiz-Vesper, B.; Blasczyk, R.; Immenschuh, S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochemical Pharmacology*. v. 80, p. 1895–1903, 2010.

Pfeffer M.A., Pfeffer J.M., Steinberg C., Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*, v.72, p.406–412, 1985.

Piao CS, Gao S, Lee GH, Kim do S, Park BH, Chae SW, Chae HJ, Kim SH. Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K(ATP) channels. *Pharmacol Res*. 2010 Apr;61(4):342-8.

Piantadosi CA, Carraway MS, Babiker A, Suliman HB. Heme oxygenase-1 regulates cardiac mitochondrial biogenesis via Nrf2-mediated transcriptional control of nuclear respiratory factor-1. *Circ Res*. 2008 Nov 21; 103(11):1232-40.

- Poljsak, B. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2011, 194586, 2011.
- Qin F, Liang MC, Liang CS. Progressive left ventricular remodeling, myocyte apoptosis, and protein signaling cascades after myocardial infarction in rabbits. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jun 10; 1740(3):499-513.
- Raza H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *FEBS Journal*. v.278, p. 4243–4251, 2011.
- Ren J, Zhang S, Kovacs A, Wang Y, Muslin AJ. Role of p38alpha MAPK in cardiac apoptosis and remodeling after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2005 Apr; 38(4):617-23.
- Riedl MA, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. *Clin Immunol*. 2009 Mar;130(3):244-51.
- Rodrigues, F.S., Souza, M.A., Magni, D.V., Ferreira, A.P.O., Mota, B.C., Cardoso, A.M., Paim, M., Xavier, L.L., Ferreira, J., Schetinger, M.R.C., Dacosta, J.C., Royes, L.F., Figuera, M.R. N-Acetylcysteine Prevents Spatial Memory Impairment Induced by Chronic Early Postnatal Glutaric Acid and Lipopolysaccharide in Rat Pups. *Plos One* (2013). 8: p. e78332.
- Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in load-induced heart disease. *Circ Res*. 2008 Dec 5; 103(12):1363-9.
- Santos Rp, Mazzanti A, Beckmann Dv, Aiello G, Brum Gs, Leme Junior Pt, Rippingler A, Neto Dp, Miranda Tf. Temperatura de polimerização da resina acrílica odontológica na medula espinhal de ratos Wistar. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2012. v.64, n.4, p.865-872.
- Schenkel P.C., Tavares A., Fernandes R.O., Diniz G.P., Ludke A.R.L., Ribeiro M.F.M., Araujo A.S.R., Barreto-Chaves M.L., Bello-Klein A. Time profile of hydrogen peroxide/ thioredoxin balance and its influence in the intracellular signaling post-myocardial infarction. *Experimental Physiology*, 2012 *Exp Physiol*. 2012 Jun; 97(6):741-9
- Schenkel PC, Tavares AM, Fernandes RO, Diniz GP, Bertagnolli M, da Rosa Araujo AS, Barreto-Chaves ML, Ribeiro MF, Clausell N, Belló-Klein A. Redox-sensitive pro-survival and pro-apoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Mol Cell Biochem*. 2010 Aug; 341(1-2):1-8.
- Shewchuk LJ, Bryan S, Ulanova M, Khaper N (2010) Integrin  $\beta_3$  prevents apoptosis of HL-1 cardiomyocytes under conditions of oxidative stress. *Can J Physiol Pharmacol*. 88(3):324-30.
- Shih H, Lee B, Lee RJ, Boyle AJ. . The aging heart and post-infarction left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Jan 4; 57(1):9-17.
- Silva Dar, Mateus Costa Mm, Vargas Ac, Alievi Mm Schossler Jew, Silva Tr. O gluconato de clorexidina ou o álcool-iodo-álcool na anti-sepsia de campos operatórios em cães. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 431-437, 2000.
- Singh K, Connors SL, Macklin EA, Smith KD<sup>4</sup>, Fahey JW<sup>5</sup>, Talalay P<sup>6</sup>, Zimmerman AW. Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Oct 28;111(43):15550-5.

- Singal P.K., Khaper N., Bello-Klein A., Bhayana M. Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure. *Heart Failure Reviews*, v.4, p.353–360, 1999.
- Takimoto E, Kass DA. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*. 2007 Feb; 49(2):241-8.
- Tavares AM, da Rosa Araújo AS, Baldo G, Matte U, Khaper N, Belló-Klein A, Rohde LE, Clausell N. Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci*. 2010 Dec 18; 87(23-26):699-706.
- Trachootham D, Lu W, Ogasawara Ma, Nilsa Rd, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Aug; 10(8):1343-74.
- Tullio F, Angotti C, Perrelli MG, Penna C, Pagliaro P. Redox balance and cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2013 Nov; 108(6):392.
- Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M (2005). PGC-1alpha regulates the mitochondria antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 66(3):562-73.
- Voehringer DW, Meyn RE. Redox aspects of Bcl-2 function. *Antioxid Redox Signal*. 2000 Fall; 2(3):537-50.
- Wang CY, Chau LY, Gung C. Heme Oxygenase-1 in Cardiovascular Diseases: Molecular Mechanisms and Clinical Perspectives. The influence of sulforaphane on vascular health and its relevance to nutritional approaches to prevent cardiovascular disease. *Med J* 2010; 33:13-24.
- Wang G, Hamid T, Keith RJ, Zhou G, Partridge CR, Xiang X, Kingery JR, Lewis RK, Li Q, Rokosh DG, Ford R, Spinale FG, Riggs DW, Srivastava S, Bhatnagar A, Bolli R, Prabhu SD. Cardioprotective and antiapoptotic effects of heme oxygenase-1 in the failing heart. *Circulation*. 2010 May 4; 121(17):1912-25.
- Wang P, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC, Zweier JL. Overexpression of human copper, zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Apr 14;95(8):4556-60.
- Wang Y, Zhang Z, Guo W, Sun W, Miao X, Wu H, Cong X, Wintergerst KA, Kong X, Cai L. Sulforaphane reduction of testicular apoptotic cell death in diabetic mice is associated with the upregulation of Nrf2 expression and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Jul 1;307(1):E14-23.
- Weibel, E.R. Stereological methods. Practical methods for biological morphometry. Vol 1. London Academic Press (1979).
- Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72:19-44.
- Wu QQ, Zong J, Gao L, Dai J, Yang Z, Xu M, Fang Y, Ma ZG, Tang QZ. Sulforaphane protects H9c2 cardiomyocytes from angiotensin II-induced hypertrophy. *Herz*. 2014; 39(3):390-6.
- Wu W, Qiu Q, Wang H, Whitman SA, Fang D, Lian F, Zhang DD. Nrf2 is crucial to graft survival in a rodent model of heart transplantation. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:919313.
- Xia WF, Liu Y, Zhou QS, Tang QZ, Zou HD. Comparison of the effects of propofol and midazolam on inflammation and oxidase stress in children with congenital heart disease undergoing cardiac surgery. *Yonsei Med J*. 2011 Mar; 52(2):326-32.

Ye Y, Li J, Yuan Z. Effect of antioxidant vitamin supplementation on cardiovascular outcomes: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*. (2013) 8(2):e56803.

Yeh CH, Chen TP, Wang YC, Lin YM, Lin PJ. HO-1 activation can attenuate cardiomyocytic apoptosis via inhibition of NF-kappaB and AP-1 translocation following cardiac global ischemia and reperfusion. *J Surg Res*. 2009 Jul; 155 (1):147-56.

Zacharová, G., Kubínová, L. Stereological methods based on point counting and unbiased counting frames for two-dimensional measurements in muscles: comparison with manual and image analysis methods. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* (1995) 16: 295-302.

Zhang P, Hu X, Xu X, Fassett J, Zhu G, Viollet B, Xu W, Wiczer B, Bernlohr DA, Bache RJ, Chen YAMP activated protein kinase-alpha2 deficiency exacerbates pressure-overload-induced left ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *Hypertension*. 2008 Nov; 52(5):918-24.

Zhang Z, Wang S, Zhou S, Yan X, Wang Y, Chen J, Mellen N, Kong M, Gu J, Tan Y, Zheng Y, Cai L. Sulforaphane prevents the development of cardiomyopathy in type 2 diabetic mice probably by reversing oxidative stress-induced inhibition of LKB1/AMPK pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2014 Dec; 77:42-52.

Zhang Y, Talalay P, Cho CG, Posner GH. *Proc Natl Acad Sci U S A*. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure. 1992 Mar 15; 89(6):2399-403.

Zhu H, Rothermel BA, Hill JA. Autophagy in load-induced heart disease. *Methods Enzymol*. 2009; 453:343-63.