

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Giana Blume Corssac

**EFEITOS DO SULFORAFANO EM PARÂMETROS DE ESTRESSE
OXIDATIVO EM CULTURA DE CARDIOMIÓCITOS ADULTOS**

Porto Alegre

2017

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Giana Blume Corssac

**EFEITOS DO SULFORAFANO EM PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CULTURA DE CARDIOMIÓCITOS ADULTOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas - Fisiologia.

Orientadora: Professora Doutora Adriane Belló-Klein

Co-orientador: Professor Doutor Rafael Oliveira Fernandes

Porto Alegre

2017

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família – meus pais Vera e Paulo, e meus irmãos Caio e Carol – por todo o apoio, amor, risadas e companheirismo. Agradeço, principalmente, por me incentivarem e oferecerem todo o suporte para que eu siga estudando e aperfeiçoando minha formação.

Agradeço à professora Adriane Belló Klein, minha orientadora desde a iniciação científica, por todos esses anos de orientação, onde pude crescer profissionalmente e pessoalmente. Muito obrigada pelos ensinamentos, incentivos, compreensão e disponibilidade de tempo, e pelo exemplo de professora, orientadora e pessoa maravilhosa que és.

Ao meu co-orientador, Rafael Oliveira Fernandes, obrigada pelo auxílio, principalmente no início dos experimentos, para entender, montar o aparelho e iniciar os testes de padronização da técnica de cultura primária de cardiomiócitos adultos.

Aos professores Alex Sander da Rosa Araújo e Paulo Cavalheiro Schenkel, pelo aprendizado, auxílio, incentivos e trocas de ideias. Obrigada, também, por serem exemplos de professores e orientadores, além de excelentes pessoas.

Agradeço à técnica de laboratório Tânia Regina Gatelli Fernandes, sempre torcendo por mim e disposta a ajudar na realização dos experimentos.

Agradeço aos colegas e amigos do laboratório, que sempre tornaram mais divertidas as horas passadas entre experimentos. Um especial agradecimento aos colegas que me auxiliaram na realização dos experimentos: Alexandre, Cristina, Patrick e Denise.

Aos demais amigos, obrigada pelo apoio, incentivo e compreensão nos momentos de ausência. Agradeço por fazerem parte da minha vida há muitos anos e, especialmente, por tornarem estes dois anos de mestrado mais fáceis de encarar. Obrigada, Ricardo, Rafaela, Paula, Leonardo, Eduardo, Maria Eduarda, Luana, Andréia e Patrícia.

Agradeço, por fim, a todos os professores, alunos e funcionários do Programa de Pós-graduação, e aos funcionários da UFRGS, pela contribuição na minha formação.

RESUMO

O sulforafano (SFN) é um composto natural que possui propriedades antioxidantes, estimulando, principalmente, o sistema antioxidante endógeno celular. Este composto está associado a uma via clássica de ativação, a via do fator eritroide nuclear tipo 2 (Nrf2). Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado que a ação do SFN também pode se dar pela via do coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α). A diferença da via de ativação pelo SFN parece ter relação com o tempo de exposição das células a este composto. Visto que o SFN é uma importante estratégia terapêutica no combate ao estresse oxidativo, que está relacionado ao desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares, a investigação do seu mecanismo de ação é necessária. A análise *in vitro* é uma ferramenta importante para a investigação das vias e tempos de incubação envolvidos na ação antioxidante do SFN. Sendo assim, a cultura primária de cardiomiócitos de ratos adultos é um dos modelos que pode ser utilizado, sendo a sua principal vantagem, o fato da fisiologia destas células se aproximar mais das condições fisiológicas *in vivo*. O objetivo deste estudo, então, foi analisar a estimulação de defesas antioxidantes feita pelo SFN, através das vias do Nrf2 e do PGC-1 α , em tempos diferentes, utilizando a técnica de cultura de cardiomiócitos adultos. Ratos Wistar machos foram eutanasiados, para que seus corações fossem retirados e submetidos ao processo de isolamento de células cardíacas, em aparelho de Langendorff modificado. As células foram isoladas através da perfusão do coração com solução de Krebs e colagenase tipo II, por um período de 30 minutos. Após isso, as células isoladas foram plaqueadas e mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. Foi realizado o tratamento com 5 μ M de SFN e/ou 5 μ M de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As células foram divididas nos seguintes grupos experimentais: Controle, SFN, H₂O₂ e SFN+H₂O₂. Os grupos foram subdivididos em dois tempos de incubação: 1 e 24 horas. Foram realizadas as análises dos níveis totais de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de lipoperoxidação (LPO); atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona s-transferase (GST); expressão proteica das isoformas citosólica (SOD-1) e mitocondrial (SOD-2) da SOD, e dos fatores Nrf2 e PGC-1 α . Os resultados do trabalho mostram que, em relação ao

tempo de 1 hora, o SFN incubado por 24 horas aumentou em 59% a atividade da SOD, 55% a expressão proteica da SOD-1, 24% a expressão proteica da SOD-2 e 69% a expressão proteica do PGC-1 α . A expressão do Nrf2 foi 17% maior no tempo de 1 hora, em relação a 24 horas. Em relação à atividade da catalase e aos níveis de ROS e de LPO, houve diferença somente nos grupos incubados por 1 hora, nos quais a atividade da CAT foi menor no grupo H₂O₂, os níveis de ROS estavam diminuídos no grupo SFN, e os níveis de LPO estavam maiores no grupo H₂O₂. Não foram encontradas diferenças em relação à atividade da GST. Como conclusão, o SFN demonstrou um papel protetor nos grupos 1 hora, impedindo a geração de ROS e de dano a lipídeos, apesar de não apresentar um efeito expressivo sobre as enzimas antioxidantes. O efeito dos tempos de incubação na expressão do Nrf2 (aumentada em 1 hora) e do PGC-1 α (aumentada em 24 horas) mostrou que realmente há uma relação temporal entre a sinalização destas duas vias, ativadas pelo SFN. Este resultado é instigante para que futuras análises dessa relação temporal das vias do SFN sejam realizadas.

Palavras-chave: cultura primária, cardiomiócitos adultos, sulforafano, Nrf2, PGC-1 α , estresse oxidativo.

ABSTRACT

Sulforaphane (SFN) is a natural compound that has antioxidant properties, mainly stimulating the endogenous cellular antioxidant system. This compound is associated with a classical pathway of activation, the nuclear erythroid factor 2 (Nrf2) pathway. However, more recent studies have shown that the action of SFN can also occur through the peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1-alpha (PGC-1 α). The difference in the pathway of activation by SFN seems to be related to the time of exposure of the cells to this compound. Since SFN is an important therapeutic strategy in the fight against oxidative stress, which is related to the development of various cardiovascular diseases, the investigation of its mechanism of action is necessary. *In vitro* analysis is an important tool for investigating the pathways and incubation times involved in the antioxidant action of SFN. Thus, a primary culture of adult mouse cardiomyocytes is one of the models that can be used, the main advantage being that the physiology of these cells are closer to the physiological conditions *in vivo*. The objective of this study was to use adult cardiomyocyte culture technique to analyze the stimulation of antioxidant defenses by SFN through Nrf2 and PGC-1 α pathways at different times. Male Wistar rats were euthanized, so that their hearts were removed and submitted to the process of isolation of cardiac cells, in modified Langendorff apparatus. Cells were isolated by perfusion of the heart with Krebs solution and type II collagenase for a period of 30 minutes. After that, the isolated cells were plated and incubated at 37°C and 5% CO₂. Treatment was performed with 5 μ M SFN and/or 5 μ M hydrogen peroxide (H₂O₂). Cells were divided into the following experimental groups: Control, SFN, H₂O₂ and SFN+H₂O₂. The groups were subdivided into two incubation times: 1 and 24 hours. Analyzes of total oxygen reactive species (ROS) and lipoperoxidation (LPO) levels were performed; activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione s-transferase (GST); protein expression of cytosolic (SOD-1) and mitochondrial (SOD-2) isoforms of SOD, as well as Nrf2 and PGC-1 α factors. The results of this work show that, compared to 1 hour time, SFN incubated for 24 hours increased SOD activity by 59%, SOD-1 protein expression by 55%, SOD-2 protein expression by 24%, and 69% PGC-1 α protein expression. Expression of Nrf2 was 17% higher at 1 hour, over 24 hours of incubation. Regarding

catalase activity and ROS and LPO levels, there were differences only in the groups incubated for 1 hour, in which the CAT activity was lower in H₂O₂ group, the ROS levels were decreased in SFN group, and levels of LPO were higher in H₂O₂ group. No differences were found in relation to GST activity. In summary, SFN demonstrated a protective role in 1 hour groups, preventing generation of ROS and lipid damage, although it does not present an expressive effect on the expression of antioxidant enzymes. The effect of incubation times on expression of Nrf2 (increased by 1 hour) and PGC-1 α (increased by 24 hours) showed that there is actually a temporal relationship between the signaling of these two pathways, activated by SFN. This result is instigating for future analyzes of this temporal relationship of SFN pathways to be performed.

Keywords: primary culture, adult cardiomyocyte, sulforaphane, Nrf2, PGC-1 α , oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação do SFN.

Figura 2 – Sinalização do Nrf2.

Figura 3 – Regulação do PGC-1 α pela Sirt1.

Figura 4 – Resumo da homeostase redox.

Figura 5 – Células HeLa.

Figura 6 – Células HL-1.

Figura 7 – Células P19 não diferenciadas.

Figura 8 – Células H9c2.

Figura 9 – Cardiomiócitos de ratos neonatos.

Figura 10 – Cardiomiócitos adultos.

Figura 11 – Sistema de isolamento de cardiomiócitos.

Figura 12 – Canulação do coração pela aorta.

Figura 13 – Plaqueamento de cardiomiócitos isolados.

Figura 14 – Cultura de cardiomiócitos adultos.

Figura 15 – Viabilidade celular das células incubadas com H₂O₂.

Figura 16 – Viabilidade celular das células incubadas com SFN.

Figura 17 – Atividade da SOD.

Figura 18 – Atividade da CAT.

Figura 19 – Atividade da GST.

Figura 20 – Níveis de ROS.

Figura 21 – Níveis de lipoperoxidação.

Figura 22 – Expressão proteica da SOD-1.

Figura 23 – Expressão proteica da SOD-2.

Figura 24 – Expressão proteica do PGC-1 α .

Figura 25 – Expressão proteica do Nrf2.

Figura 26 – Resposta hormética do SFN.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MTT	(3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio)
BSA	Albumina de soro bovino
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
CAT	Catalase
PGC-1 α peroxissoma	Co-ativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma
Cul-3	Culina-3
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
CDNB	Dinitroclorobenzeno
ARE	Elemento de resposta antioxidante
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Nrf2	Fator eritroide nuclear tipo 2
GSSG	Glutaciona oxidada
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GST	Glutaciona S-transferase
HO-1	Heme-oxigenase 1
t-BOOH	Hidroperóxido de tert-butil
GCN5	Histona N-acetiltransferase 5
LPO	Lipoperoxidação
NQO1	NADPH quinona oxirredutase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
Keap1	Proteína tipo Kelch associada ao ECH 1
HO ₂ [•]	Radical hidroperoxil
HO [•]	Radical hidroxil

Sirt1	Sirtuína 1
FBS	Soro fetal bovino
SFN	Sulforafano
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1.	Introdução	14
1.1.	Sulforafano	14
1.1.1.	Sulforafano nas doenças cardiovasculares	15
1.2.	Nrf2	16
1.2.1.	Mecanismo de ativação do Nrf2	17
1.2.2.	Nrf2 e a homeostase celular	18
1.3.	PGC-1 α	19
1.3.1.	O PGC-1 α e o metabolismo mitocondrial	19
1.3.2.	Regulação do PGC-1 α	20
1.4.	Estresse oxidativo	21
1.4.1.	Espécies reativas de oxigênio	21
1.4.2.	Defesas antioxidantes	23
1.4.3.	Coração e estresse oxidativo	25
1.5.	Cultura celular	26
1.5.1.	Breve história da cultura de células	26
1.5.2.	Meios de cultura	27
1.5.3.	Tipos celulares	27
1.5.4.	Cultura celular em doenças cardíacas	29
1.5.5.	Cultura primária de cardiomiócitos adultos	33
2.	Hipótese	35
3.	Objetivos	35
3.1.	Objetivo geral	35
3.2.	Objetivos específicos	35
4.	Materiais e métodos	37
4.1.	Animais	37
4.2.	Grupos experimentais	37
4.3.	Procedimento de isolamento e cultivo de cardiomiócitos adultos de rato	38
4.4.	Concentração de sulforafano	41
4.5.	Concentração de peróxido de hidrogênio	41
4.6.	Viabilidade celular	41
4.7.	Preparo das células para análise dos parâmetros de estresse oxidativo	42
4.8.	Quantificação de proteínas	42

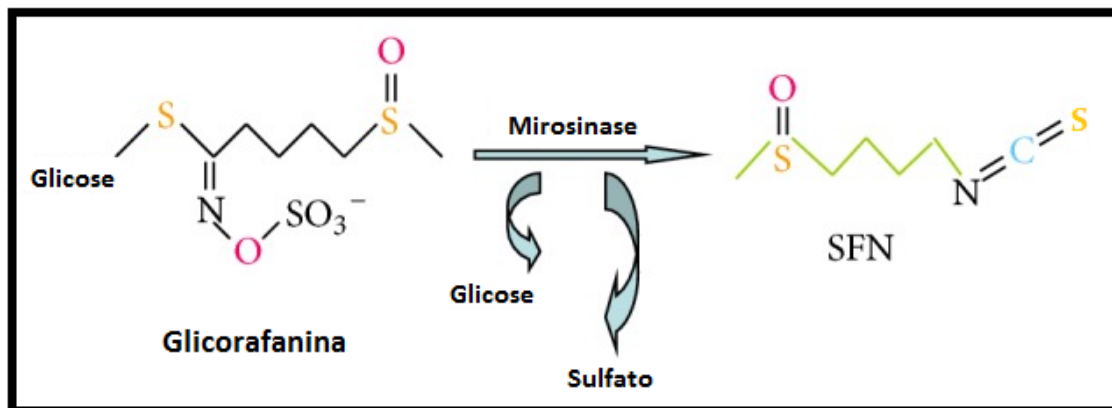
4.9.	Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase.....	43
4.10.	Atividade da enzima antioxidante catalase.....	44
4.11.	Atividade da enzima antioxidante glutaciona S-transferase.....	44
4.12.	Determinação dos níveis de espécies reativas totais.....	43
4.13.	Determinação dos níveis de peroxidação lipídica	43
4.14.	Expressão proteica do Nrf2, do PGC-1 α e de enzimas antioxidantes	44
4.15.	Análise estatística.....	45
4.16.	Descarte de materiais biológicos e químicos.....	45
5.	Resultados.....	46
5.1.	Padronização da técnica de cultura celular primária de cardiomiócitos adultos isolados	46
5.2.	Dose e tempo de incubação com peróxido de hidrogênio.....	47
5.3.	Dose de tratamento com o sulforafano	48
5.4.	Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase.... Erro! Indicador não definido.	
5.5.	Atividade da enzima antioxidante catalase.....	51
5.6.	Atividade da enzima antioxidante glutaciona S-transferase.....	52
5.7.	Níveis de espécies reativas de oxigênio totais	49
5.8.	Níveis de peroxidação lipídica	49
5.9.	Expressão proteica das isoformas da enzima superóxido dismutase	53
5.10.	Expressão proteica do co-ativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α).....	55
5.11.	Expressão proteica do Fator eritroide nuclear tipo 2	56
6.	Discussão	58
7.	Conclusão.....	64
8.	Perspectivas	66
9.	Referências.....	67

1. Introdução

1.1. Sulforafano

O sulforafano (SFN) [(-)-1-isotiocianato-(4R)-(methylsulfinyl)-butane] é um isotiocianato encontrado em vegetais crucíferos (família *Brassicaceae* ou *Cruciferae*), como brócolis, repolho, rabanete e couve-flor (Fimognare et al., 2007; Visalli et al. 2017). Quando ocorre o preparo e a mastigação destes vegetais, há um “dano” às suas células, que leva à ativação da enzima mirosinase, que hidrolisa os glicosinolatos e, assim, origina os isotiocianatos (Guerrero-Beltrán et al., 2012) (figura 1).

Figura 1. Formação do SFN, através da hidrólise da glicorafanina, um dos glicosinolatos mais



presentes no brócolis, pela enzima mirosinase. Adaptado de Bai et al., 2015).

Dados da literatura mostram que esse composto possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais (Hwang et al., 2014). Estudos que analisaram o efeito antioxidante do SFN sugerem que o principal mecanismo pelo qual o SFN protege as células contra o dano oxidativo é através da indução de antioxidantes endógenos, como as enzimas de detoxificação de fase II, mediada pelo fator eritroide nuclear tipo 2 (Nrf2) (Juge et al., 2007). Um estudo conduzido em humanos, mostrou que o consumo de broto de brócolis durante 1 semana diminuiu marcadores de estresse oxidativo e melhorou o metabolismo do colesterol (Murashima et al., 2004). O estudo de Angeloni e colaboradores (2009) mostrou que, na concentração de 5µM, o SFN protegeu células cardíacas de ratos neonatos de danos oxidativos e induziu uma série de antioxidantes e

enzimas de fase II, como a glutathiona reduzida (GSH), glutathiona S-transferase (GST) e NADPH quinona oxidoreductase (NQO1). Além destes, diversos outros trabalhos já demonstraram a ação protetora do SFN, como em modelo de isquemia cerebral (Ping et al., 2010), disfunção de células- β pancreáticas (Carrasco-Pozo et al., 2017), modelo de dano renal (Guerrero-Beltrán et al., 2010) e dano hepático (Baek et al., 2008).

Entretanto, o efeito do SFN é diferente conforme a dose administrada ou ingerida. Esse comportamento é chamado de hormese (Calabrese et al., 2012). Por esse motivo, dizemos que o SFN é utilizado tanto em terapias antioxidantes, como antitumorais, visto que, em baixas concentrações, possui uma resposta de adaptação ao estresse oxidativo e, em altas, possui ação pró-apoptótica, importante propriedade anticâncer (Visalli et al., 2017).

1.1.1. Sulforafano nas doenças cardiovasculares

O tratamento com antioxidantes exógenos é muito utilizado nas doenças cardiovasculares. Entretanto, a ação benéfica deste tratamento tem efeito apenas no início destas doenças, devido à baixa meia-vida dos compostos, que acabam perdendo esse efeito protetor em seguida (Angeloni et al., 2009). Dessa forma, o tratamento com compostos capazes de estimular a produção de defesas antioxidantes endógenas pelo organismo, como o SFN, parece ser uma alternativa para este problema (Bonetto, 2015). Sendo assim, cada vez mais, o SFN tem sido fortemente associado à sua ação cardioprotetora, demonstrada tanto *in vivo*, como *in vitro*, e em diferentes patologias cardíacas (Zhu et al., 2008; Angeloni et al., 2009; Bonetto et al., 2016; Fernandes et al., 2016).

Um estudo que analisou o efeito antioxidante do SFN *in vitro* observou que o composto foi capaz de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e GST em cardiomioblastos (Fernandes et al., 2015). Além disso, nesse estudo, as células tratadas com SFN apresentaram menores níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de peroxidação lipídica, bem como redução da sinalização apoptótica (Fernandes et al., 2015). Essa melhora nos parâmetros de estresse oxidativo, entretanto, parece não ter sido modulada pelo Nrf2, visto que não houve diferença nos níveis desse fator de transcrição entre grupos que foram

tratados com SFN e grupos que não foram. Por outro lado, quando analisado outro fator de transcrição envolvido na regulação antioxidante do co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α), os grupos tratados com SFN apresentaram aumento da expressão desse fator de transcrição, em relação aos grupos não tratados (Fernandes et al, 2015). De fato, a ação do SFN sobre a ativação do PGC-1 α tem sido cada vez mais explorada. Negrette-Guzmán e colaboradores (2013) descrevem a indução da biogênese mitocondrial, através da ativação do PGC-1 α , como um dos efeitos do SFN. Em outro trabalho, a atividade e expressão do PGC-1 α estavam diminuídas em modelo de cardiomiopatia diabética tipo 2, e o SFN foi capaz de restaurar estes níveis, melhorando a função mitocondrial e a capacidade oxidativa (Zhang et al., 2014). Estes dados sugerem que a indução de fatores antioxidantes pelo SFN não é apenas modulada pelo Nrf2, como é visto na maioria dos estudos, mas também pode ser via PGC-1 α , dado ainda pouco explorado na literatura.

1.2. Nrf2

O Nrf2 é um fator de transcrição considerado o maior regulador da resposta antioxidante e do metabolismo de xenobióticos, protegendo as células de agentes estressores, como ROS, substâncias endógenas, radiação e toxinas (Huang et al, 2016). Sua ação ocorre principalmente pela regulação da expressão de genes que codificam enzimas citoprotetoras de fase II e enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT, NQO1, heme-oxigenase 1 (HO-1), glutathiona peroxidase (GPx), tioredoxina (Trx), entre outras.

O Nrf2 é um dos alvos de regulação de diversos compostos fitoquímicos, tais como carotenóides, flavonóides e isotiocianatos, sendo muito importante no efeito preventivo destes compostos contra processos oxidativos e carcinogênicos (Hayes et al, 2010). Muitos estudos mostram que os compostos fitoquímicos podem proteger as células contra danos oxidativos ocasionados por processos inflamatórios, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, e câncer, através de uma resposta dependente do Nrf2 (No et al, 2014; Huang et al, 2016).

1.2.1. Mecanismo de ativação do Nrf2

Em condições de equilíbrio redox, a maior parte do Nrf2 está ligado ao Keap1 (proteína tipo Kelch associada ao ECH 1). A Keap1 é uma proteína rica em cisteína e a principal reguladora negativa de Nrf2 (Lau et al, 2013). Quando não há estímulo de ativação do Nrf2, a atividade da via do Nrf2 está suprimida, pois ele se encontra ligado à Keap1, no citoplasma da célula. A Keap1 promove a degradação do Nrf2 (Bai et al, 2015), pois funciona como uma ponte entre o Nrf2 e uma proteína ligase Culina-3 (Cul-3), que vai levar ao processo de ubiquitinação do fator de transcrição e subsequente degradação proteossomal (Huang et al, 2016).

Um dos estímulos para ativação do Nrf2 é quando há um estado redox mais oxidante, com aumento de estressores oxidativos no meio celular. Além disso, outros fatores, como a indução com alguns fármacos, estimulam a ativação deste fator de transcrição. Estes estímulos inibem a degradação do Nrf2 e promovem o rompimento da sua ligação com a Keap1. Evidências sugerem que isso ocorre, pois, substâncias ativadoras do Nrf2, como o SFN, alteraram a conformação da Keap1 e, dessa forma, bloqueiam a degradação do Nrf2 (Bai et al, 2015). Uma vez desligado da Keap1, o Nrf2 se transloca para o núcleo da célula, onde é heterodimerizado com uma proteína Maf e se liga, no DNA, a uma sequência cis-regulatória do elemento de resposta antioxidante (ARE), resultando na ativação da transcrição de diversos genes relacionados com a maquinaria antioxidante intracelular (Trachootham, et al. 2008; Bai et al, 2015; Huang et al, 2016). Este mecanismo pode ser melhor compreendido na figura 2.

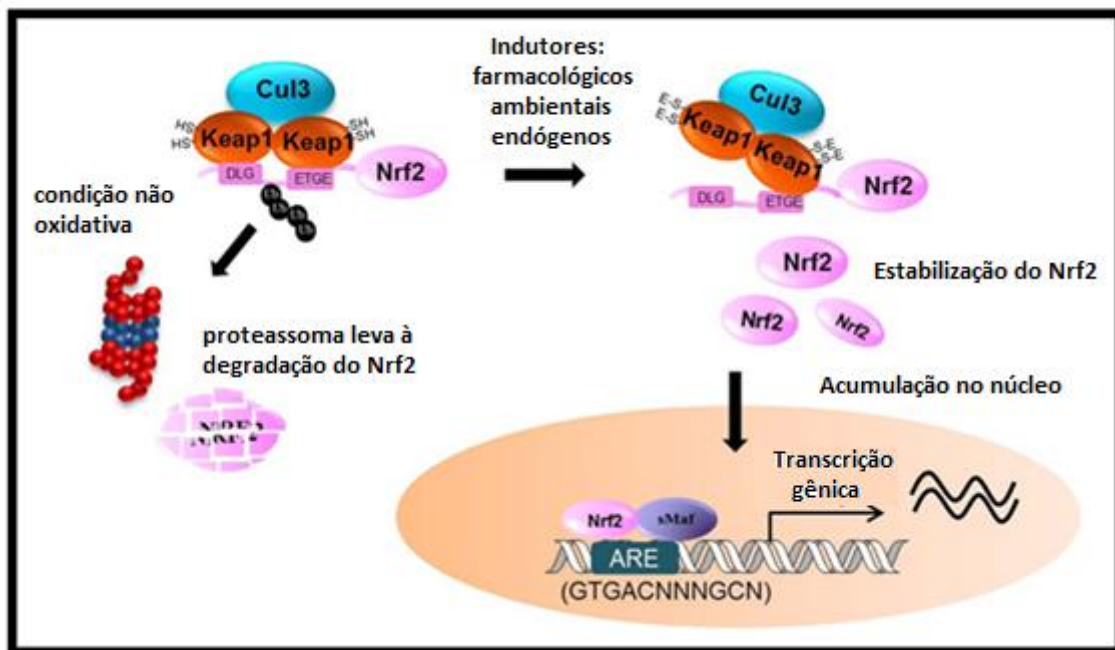


Figura 2. Esquema da via de sinalização do Nrf2. Adaptado de Huang e colaboradores (2016).

1.2.2. Nrf2 e a homeostase celular

O Nrf2 está associado com funções citoprotetoras em diversas condições fisiológicas e patológicas. Este fator de transcrição é descrito como o principal regulador da homeostase redox celular (Dinkova-Kostova e Abramov, 2015). Seus alvos incluem enzimas antioxidantes, proteínas envolvidas no metabolismo de xenobióticos e na proteção contra toxicidade por metais pesados, moléculas envolvidas no processo inflamatório, fatores de crescimento, vias de sobrevivência e metabolismo energético celular (Gao et al, 2014; Holmström et al, 2016). O papel do Nrf2 na homeostase redox, entre outras coisas, está relacionado à sua ação sobre a GSH. Além de participar da biossíntese da GSH, o Nrf2 também participa da regulação da glutatona redutase (GR), mantendo a glutatona no seu estado reduzido, ao invés do oxidado (GSSG) (Dinkova-Kostova e Abramov, 2015).

Além disso, muitos estudos mostram que a ação do SFN sobre a indução de enzimas de fase II ocorre através da via Keap1-Nrf2-ARE, sendo esta uma via clássica de modulação do estado redox pelo SFN. Entretanto, outra via de sinalização tem sido relacionada à ação do SFN nos últimos anos, a via do PGC-1 α .

1.3. PGC-1 α

O PGC-1 α é um coativador transcricional que aumenta a atividade de diversos fatores de transcrição envolvidos no metabolismo celular (Finck e Kelly, 2007). Esta ação se dá através da sua interação com fatores de transcrição ligados ao DNA (que por sua vez irão ativar ou reprimir o processo de transcrição gênica), atuando como um adaptador ou uma “plataforma” para o recrutamento de outros coativadores transcricionais (Finck e Kelly, 2007).

Estudos mostram que o PGC-1 α regula genes envolvidos no metabolismo energético (Liang et al, 2006). Sendo assim, o PGC-1 α é altamente expresso em tecidos com alto metabolismo (onde há abundância de mitocôndrias), como o tecido adiposo marrom, o rim, o músculo esquelético e o tecido cardíaco (Liang et al, 2006). Dessa forma, o PGC-1 α está diretamente envolvido com a biogênese mitocondrial, induzindo a produção de mitocôndrias capazes de converter ácidos graxos, glicose e lactato e produzir energia na forma de ATP (Lehman et al, 2000). Além disso, estudos mostram que a expressão do PGC-1 α é induzida por condições fisiológicas que aumentam a demanda pela produção mitocondrial de ATP, como a exposição a baixas temperaturas, o exercício físico e o jejum (Puigserver et al, 2003; Lehman et al, 2000; Wu et al, 1999).

Ainda, esse coativador parece modular diretamente a maquinaria mitocondrial de detoxificação de ROS. Um estudo mostrou que o PGC-1 α induz a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes em condições tanto normais, como de estresse oxidativo (induzido por glicose), em células endoteliais primárias (Valle et al, 2005). Além disso, nesse mesmo estudo, foi visto que o PGC-1 α foi capaz de proteger as células contra a apoptose induzida por aumento da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) no meio (Valle et al, 2005).

1.3.1. O PGC-1 α e o metabolismo mitocondrial

A mitocôndria é a organela celular onde há a maior produção de energia oxidativa das células eucarióticas (Scarpulla, 2012). O metabolismo mitocondrial está diretamente envolvido na homeostase redox das células, sendo que,

quando há prejuízo nos processos de biogênese mitocondrial e diminuição do potencial de membrana da organela, pode haver consequências, como a geração de ROS (Scarpulla, 2012).

O PGC-1 α é considerado um dos principais reguladores da biogênese e função mitocondrial (Choi et al, 2014). Entre suas ações está a regulação da cadeia respiratória e dos genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, aumento da capacidade respiratória da mitocôndria, bem como o aumento do número de mitocôndrias na célula (Scarpulla et al, 2011).

1.3.2. Regulação do PGC-1 α

O PGC-1 α é regulado, principalmente, pela Sirt1 (sirtuina 1 ou desacetilase NAD-dependente) e pela AMPK (proteína quinase ativada por AMP). O controle do PGC-1 α pode se dar tanto por desacetilação (feita pela Sirt1), quando por fosforilação (feita pela AMPK), em resposta a uma situação onde há falta de nutrientes ou energia na célula (Scarpulla et al, 2011). Em condições normais de energia e nutrição, o PGC-1 α se encontra na forma acetilada, por uma enzima histona N-acetiltransferase 5 (GCN5) (Lerin et al, 2006). Em uma situação de falta de nutrientes, como baixos níveis de glicose, a Sirt1 desacetila o PGC-1 α , que induz a oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias, a fim de manter o estado bioenergético das células (Gerhart-Hines et al, 2007) (figura 3). O PGC-1 α também é substrato da AMPK, pois, em situação de falta de energia, o AMPK fosforila o PGC-1 α , o qual promove sua ação sobre a geração de energia nas mitocôndrias (Scarpulla et al, 2011).

Dessa forma, a diminuição ou prejuízo no controle funcional das mitocôndrias pode alterar o potencial de membrana, favorecendo a produção de ROS. Em associação com um reduzido sistema de defesa antioxidante capaz de reduzir estas espécies reativas, pode ocorrer um estresse oxidativo, o que favorece a disfunção celular, o dano oxidativo e a apoptose.

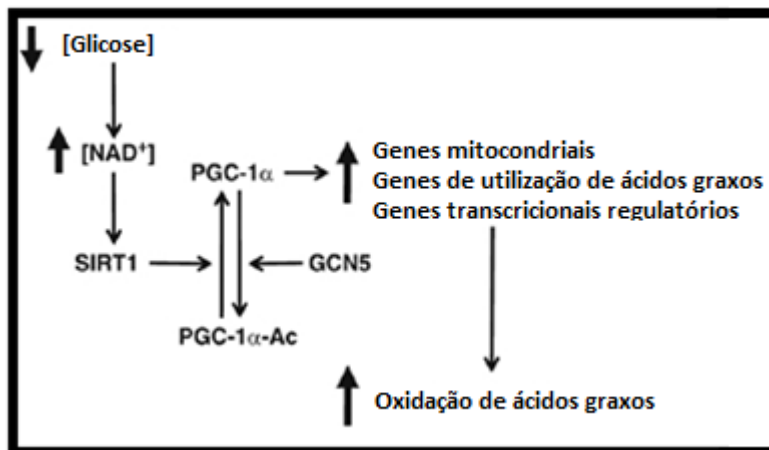


Figura 3. Modelo de regulação do PGC-1 α pela Sirt1, devido à baixa concentração de glicose. Adaptado de Gerhart-Hines et al, 2007.

1.4. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo está envolvido em muitos processos fisiológicos, como o envelhecimento e algumas vias de sinalização, e patológicos, como doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, inflamação e câncer (Baradaran, 2014). As principais moléculas envolvidas nesse processo são as ROS e as espécies reativas de nitrogênio (RNS), e são metabolizadas naturalmente nos tecidos, onde desempenham funções biológicas importantes quando em concentrações baixas ou moderadas. Entretanto, podem ser geradas de forma excessiva, como resultado de uma situação patológica, alterando o estado redox e fazendo com que deixe de haver um equilíbrio entre a sua formação e sua remoção. Nesse contexto, o estado redox está mais oxidante, devido ao desequilíbrio entre a produção de ROS e RNS e os sistemas responsáveis pela sua metabolização, chamados de sistemas de defesas antioxidantes (Baradaran, 2014).

1.4.1. Espécies reativas de oxigênio

As ROS representam um grupo de moléculas onde estão incluídos os radicais livres e as espécies não-radicais. Estas moléculas são produzidas nas próprias células aeróbicas dos seres vivos (Santilli et al, 2015). Os radicais livres são moléculas ou átomos instáveis e reativos, pois possuem um ou mais elétrons

desemparelhados na última camada eletrônica. Nesta classe de espécies reativas estão moléculas como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroperoxil (HO_2^{\bullet}), o radical hidroxil (HO^{\bullet}) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (Li et al, 2015). As espécies reativas não-radicalares, por sua vez, não possuem elétrons livres, sendo, portanto, menos instáveis que os radicais livres. A principal molécula que representa esta classe é o H_2O_2 (Carocho e Ferreira, 2013). As espécies reativas de oxigênio podem ser geradas durante o metabolismo do oxigênio e devido a alguns sistemas enzimáticos, como da NADPH oxidase (fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), da xantina oxidase e da eNOS desacoplada (óxido nítrico sintase endotelial) (Santilli et al, 2015).

A mitocôndria também tem papel importante na geração de ROS. O aumento da atividade mitocondrial e do fluxo de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons pode ocasionar um aumento da produção de $O_2^{\bullet-}$, que pode levar à geração de estresse oxidativo (Valle et al, 2005).

Em condições fisiológicas, baixas concentrações de ROS são importantes para manter a homeostase, estando envolvidas em diversos processos celulares, como vias de sinalização, defesa contra micro-organismos, vias de crescimento celular e processos metabólicos (Finkel e Holbrook, 2000). Entretanto, para que se mantenham em concentrações fisiológicas, é necessário haver um equilíbrio entre a geração e a remoção das ROS; do contrário, pode ocorrer estresse oxidativo (Araujo et al. 2006). O problema de haver uma situação de estresse oxidativo, é que o aumento nos níveis de espécies reativas pode causar danos às células, o que pode desencadear e contribuir para o desenvolvimento de diversas doenças. Os danos causados são, entre outros, a peroxidação lipídica (degradação oxidativa de lipídeos de membranas celulares), a oxidação de aminoácidos (causando danos a proteínas) e danos ao DNA (Li et al, 2015).

As ROS são responsáveis pelos danos que iniciam o processo de peroxidação lipídica, levando à redução da fluidez da membrana celular, aumento da sua permeabilidade e os danos a proteínas, receptores e canais iônicos (Halliwell e Gutteridge, 1990). O dano lipídico acaba por levar a alterações nos grupos tióis presentes em proteínas na membrana interna da mitocôndria. Este processo promove a formação de poros nessa membrana, os

quais estão associados à liberação de fatores pró-apoptóticos, tais como o citocromo C e o fator de indução de apoptose (AIF), presentes nessa organela. Além disso, o aumento de permeabilidade na membrana celular leva à excessiva entrada de íons Ca^{+2} , os quais podem ativar diversas enzimas e vias de sinalização, culminando com a morte celular (Zoratti e Szabo, 1995; Skulachev et al., 1996; Yang et al., 1997; Kim et al., 2003).

1.4.2. Defesas antioxidantes

Para manter a homeostase redox, existem defesas antioxidantes, que agem removendo as espécies reativas em excesso. As defesas antioxidantes existentes são constituídas de elementos enzimáticos e não enzimáticos (Dean e Jones, 2006; Hogg e Kalyanaraman, 1999). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas SOD, CAT, GPx e glutathionas transferase, como a GST. Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não radicais. A enzima SOD é considerada a primeira linha de defesa contra o dano oxidativo. Em animais, há três isoformas dessa enzima: uma isoforma que contém sítios de ligação ao cobre e ao zinco (CuZnSOD ou SOD-1), presente no citosol, uma que contém sítios de ligação ao manganês (MnSOD ou SOD-2), presente na matriz mitocondrial (Fridovich, 1995) e a extracelular, que contém cobre e zinco (EC-SOD ou SOD-3) (Poljsak, 2011). A ação da SOD se dá através da reação de dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ (em pH ácido, esse ânion ganha um próton e se transforma em HO_2^{\bullet} , molécula tóxica à membrana celular) em H_2O_2 , uma espécie mais estável. A CAT e a GPx, por sua vez, agem reduzindo o H_2O_2 em água e O_2 . A concentração de H_2O_2 e o local da célula em que está localizado são determinantes de qual das duas enzimas irá agir. A CAT age em concentrações mais elevadas de H_2O_2 e está mais ativa nos peroxissomas. Quando o H_2O_2 está em concentrações micromolar (μM), há maior atividade da GPx, que está bastante presente no citosol e nas mitocôndrias (Bonetto, 2015). A GST, representante da família das enzimas de detoxificação de fase II, faz parte do grupo de enzimas que inativam compostos exógenos potencialmente danosos e metabólitos endógenos que podem ser tóxicos. Além disso, ela catalisa a reação de conjugação da glutathiona reduzida (GSH) com o radical superóxido. Sendo

assim, a GST tem um papel importante na proteção contra o estresse oxidativo e a toxicidade (Boddupalli et al, 2012).

Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas, o tripeptídeo glutathiona é um dos principais mecanismos de remoção do H_2O_2 e de outras ROS. Essa reação é catabolizada pela GPx, e ocorre conversão da forma reduzida da glutathiona - GSH em GSSG (Brigelius-Flohe, 1999). Além da glutathiona, outras defesas antioxidantes não enzimáticas incluem as vitaminas A, C e E (Smirnoff, 2001; Halliwell, 2001).

Um resumo exemplificado dos processos de equilíbrio e desequilíbrio redox está mostrado na figura 4.

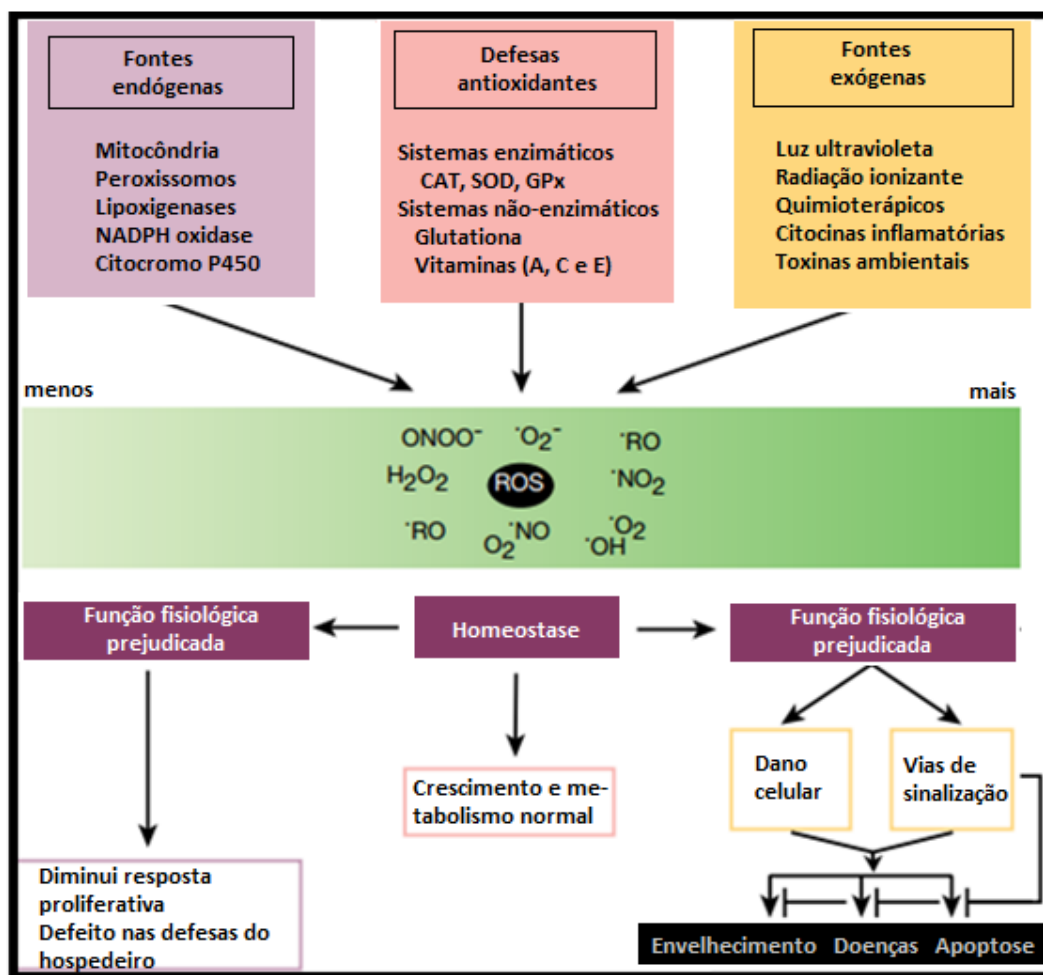


Figura 4. Resumo da homeostase redox. Adaptado de Finkel e Holbrook, 2000.

1.4.3. Coração e estresse oxidativo

Estudos mostram que nas patologias cardíacas, há uma perturbação da biogênese e função mitocondrial, diminuindo o metabolismo oxidativo das mitocôndrias (van Bilsen et al, 2004). Esse processo pode ser adaptativo no início, a fim de diminuir o consumo de oxigênio. Entretanto, a persistência desse quadro leva a um processo mal-adaptativo de insuficiência cardíaca, pela deficiência energética devido à diminuição da capacidade de produzir ATP pelas mitocôndrias (Finck e Kelly, 2007).

O coração é um órgão de alta demanda metabólica, considerando o fato que ele bombeia, aproximadamente, 10 mil litros de sangue (Costa et al. 2013) e gera e utiliza 30kg de adenosina trifosfato (ATP), por dia (Kim et al. 2015). Essa alta carga de trabalho e necessidade de altos níveis de energia requerem um elevado número de mitocôndrias. De fato, aproximadamente 30% da massa do coração é devido às mitocôndrias (Kim et al. 2015). Por esse motivo, a geração de ROS é mais alta, aumentando a suscetibilidade do coração aos danos a proteínas, lipídeos e DNA. Nesse caso, os danos causados pelo desequilíbrio do estado redox estão envolvidos no desenvolvimento de diversas doenças cardíacas, como hipertensão, hipertrofia, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca (Araujo et al. 2006; Kim et al. 2015).

O sistema da glutathiona, da SOD e da CAT são alguns dos principais elementos de defesa antioxidante do coração, contra os prejuízos redox. Em relação à atividade da SOD no coração, mais de 70% da atividade total é através da isoforma mitocondrial, responsável pelo controle dos níveis de $O_2^{\bullet-}$ formados no processo de fosforilação oxidativa (Costa et al. 2013). Nas células cardíacas, há baixa atividade da CAT e ela está em pequenas quantidades, devido ao baixo conteúdo de peroxissomos. A GPx e a GST, por outro lado, têm atividade mais elevada no coração, sendo responsáveis por boa parte do sistema antioxidante (Kuss, 2005).

Dada a importância de estudar os mecanismos redox envolvidos no funcionamento cardíaco, diversas técnicas e metodologias experimentais são utilizadas nesta área. Uma delas é a cultura celular, sendo a cultura primária de cardiomiócitos adultos uma ferramenta cada vez mais comum nos estudos envolvendo metabolismo, regulação e sinalização cardíaca.

1.5. Cultura celular

Em termos gerais, a cultura celular é um método experimental no qual células procariontes ou eucariontes, se desenvolvem, em laboratório, com nutrientes e condições controladas de temperatura, umidade, oxigênio e gás carbônico. Se os nutrientes necessários forem fornecidos corretamente, essas células cultivadas *in vitro* são capazes de crescer e se dividir normalmente, da mesma forma que o seu crescimento *in vivo*. Esse método é considerado uma ferramenta básica essencial para estudos nas áreas biomédicas (Aoki et al, 2016), utilizada para elucidar vias metabólicas, mecanismos de proliferação, senescência e morte de células, e estudar mecanismos envolvendo a sinalização celular, a regulação da expressão de genes e a síntese de proteínas (Halliwell, 2014).

1.5.1. Breve história da cultura de células

O primeiro estudo utilizando a técnica de cultivo de células foi reportado em 1907, por Ross Harrison e colaboradores. O objetivo de Harrison era provar que as fibras nervosas provinham de células nervosas e, para isso, era preciso obter um método onde se pudesse observar o crescimento e desenvolvimento de uma célula animal (nesse caso, uma fibra neuronal de sapo) fora do seu organismo e em um ambiente que mimetizasse as suas necessidades básicas. Mais tarde naquele ano, Henry Wilson fez observações sobre a propriedade de regeneração de esponjas, utilizando um método similar.

Esses primeiros experimentos, e os que surgiram nos anos seguintes, consistiam na fragmentação mecânica dos tecidos estudados em frascos que continham os fluidos do organismo de onde estes tecidos foram retirados (Alves e Guimarães, 2010). A partir de 1907, com Harrison e Wilson confirmando suas hipóteses, muitos outros cientistas começaram a se interessar por esse modelo experimental, e a cultura de tecidos começou a ser introduzida nas pesquisas científicas. Mas foi apenas a partir das décadas de 40 e 50 que a cultura de células começou a se tornar uma ferramenta de pesquisa amplamente disponível (Ryan, 2008).

A introdução do uso de proteases para a digestão das células, do uso de meios de cultura específicos e de antibióticos, na década de 50, tornou a cultura de células uma técnica muito mais acessível (Zhang e Kuhn, 2005). Além disso, em 1951, uma linhagem celular obtida a partir das células do câncer cervical da paciente Henrietta Lacks, fez com que o pesquisador George Gey conseguisse realizar o primeiro cultivo *in vitro* bem-sucedido de células humanas (Rahbari et al, 2009). As células tumorais imortais de Henrietta foram chamadas de células HeLa e são, até hoje, amplamente utilizadas em pesquisas científicas, sendo fundamental para o desenvolvimento da vacina contra a poliomielite, de Jonas Salk, em 1954 (Turner, 2012).

O avanço nos métodos de cultura celular foi grande e, com o tempo, muitas outras linhagens foram desenvolvidas e estabelecidas. Hoje em dia, os estudos com essa técnica têm papel importante em muitos ramos da medicina e das pesquisas biomédicas, desde estudos sobre metabolismo e função celular até o tratamento de doenças degenerativas, chegando aos recentes avanços em terapia celular e pesquisas com células-tronco (Alves e Guimarães, 2010).

1.5.2. Meios de cultura

As células utilizadas em cultura variam em sua origem e tipo e, com isso, suas necessidades nutritivas e a forma de manuseio também variam. A nutrição das células é feita através de um meio de cultura, que é uma solução rica em aminoácidos, sais inorgânicos, açúcares, vitaminas e algum tipo de suplemento nutritivo, como o soro fetal bovino (FBS) (Hartung, 2002). O meio de cultura também pode conter antibióticos e antifúngicos, necessários para impedir a contaminação das células com estes micro-organismos.

1.5.3. Tipos celulares

Apesar de todas as vantagens do cultivo de células, como o controle do ambiente e a possibilidade de obter uma amostra homogênea, este ainda é um método que pode gerar resultados contraditórios dos encontrados *in vivo* (Alves e Guimarães, 2010). Dessa forma, é importante reconhecer e escolher o tipo adequado de célula a ser utilizado, levando em conta o objetivo do trabalho.

As células contínuas, também chamadas de linhagem celular, são um tipo de célula muito utilizado em pesquisa. Essa cultura celular é constituída de células de um único tipo e podem ser mantidas por um grande período de tempo. Essas células podem ser imortalizadas, apresentam um crescimento rápido e uma proliferação limitada (a um alto número de divisões celulares) ou ilimitada (Alves e Guimarães, 2010). Um exemplo desse tipo celular são as células tumorais, como a linhagem HeLa (figura 5).

Uma desvantagem de utilizar cultura de células de linhagem é que esta é o tipo com mais diferenças em relação aos processos *in vivo*. Um dos motivos para isso ocorrer é devido à diferença de desenvolvimento da célula quando em cultura, pois há uma grande dificuldade em reproduzir um ambiente artificial no qual as células se comportem da mesma maneira que o ambiente fisiológico natural (Aoki, 2016). Por exemplo, a matriz extracelular normal - que tem influência na morfologia e função da célula - está ausente na cultura, bem como outros tipos de células que podem estar em volta e se comunicam com a célula em questão (um exemplo é a interação das células da glia com os neurônios) (Halliwell, 2014). Uma preocupação encontrada por Schaffer e colaboradores, em 2014, foi a diferença do genótipo de proteínas de células de linhagem e o genótipo já bem caracterizado da mesma proteína, em humanos. Esse estudo e muitos outros descritos na literatura (efeitos de fármacos terapêuticos encontrados em linhagens, mas com resultados decepcionantes *in vivo*, por exemplo) mostram o senso crítico que se deve ter para comparar um resultado encontrado nesse tipo de metodologia, com os processos fisiológicas *in vivo*, principalmente no que se refere aos estudos de vias metabólicas e de sinalização (Halliwell, 2013).

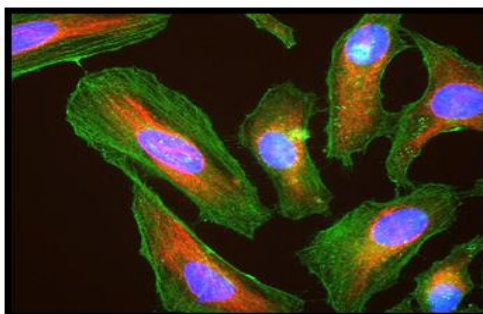


Figura 5. Células HeLa contrastadas com anticorpos para actina (verde), vimentina (vermelho) e DNA (azul). Fotografia retirada do site da empresa EnCorBiotechnology Inc.

Outro tipo celular utilizado em cultura e uma alternativa para as desvantagens do uso de células de linhagem, é a cultura primária. As células de cultura primária são oriundas diretamente de um tecido para a placa de cultura, e são obtidas por técnicas de isolamento de células por degradação mecânica ou enzimática (Alves e Guimarães, 2010). Além disso, são mais relevantes, por exemplo, aos estudos em fisiologia, por possuírem características mais semelhantes ao fenótipo e genótipo do organismo vivo (Louch, 2012), embora o procedimento de isolamento e a mudança de ambiente possam gerar um estresse, causando diferenças na expressão de alguns genes e na atividade de proteínas (Halliwell, 2014).

A desvantagem do uso de cultura primária é o tempo de vida curto das células, sua sensibilidade e maior propensão a morrer a cada etapa do experimento, gerando, ao final do protocolo, um número muito menor de células do que havia no início (ao contrário do que ocorre nas células de linhagem, onde há um aumento exponencial no número de células a cada dia em cultura).

Algumas células, ainda, podem ser do tipo transformadas, quando uma célula derivada de um tecido vivo é exposta a um agente químico ou a um processo estressor e se transforma em uma célula diferente das células do tecido original (Alves e Guimarães, 2010).

Uma característica importante para os dois tipos de células é a aderência à placa de cultura. Dependendo da célula – tanto do tipo de linhagem como do tipo de cultura primária – pode ser aderente ou não-aderente, ou seja, ou elas ficarão aderidas ao fundo da placa ou garrafa de cultivo, ou ficarão suspensas no meio de cultura (Freshney, 2010).

1.5.4. Cultura celular em doenças cardíacas

Há muito tempo que os modelos animais são usados como principal ferramenta de estudos de doenças e na fisiologia cardiovascular. Entretanto, devido à necessidade de se investigar mecanismos de maneira mais pontual e direta e, além disso, com mais controle do ambiente de desenvolvimento da célula, a cultura celular torna-se um importante meio de investigação na área cardiovascular. Para isso, já existem alguns modelos de experimentação *in vitro*,

tanto com células de linhagem, como com cultura primária, que serão abordados a seguir:

- Células HL-1 (células derivadas de uma linhagem de tumor atrial de camundongos transgênicos): são uma linhagem celular, muito usadas em estudos que investigam os mecanismos de hipertrofia do miocárdio. É importante nesse contexto, principalmente pela presença de proteínas como a cadeia pesada alfa da miosina (α -MHC), a α -actina cardíaca e a conexina 43. As células HL-1 (figura 6) possuem atividade contrátil espontânea e capacidade de proliferação ilimitada (Peter et al, 2016).

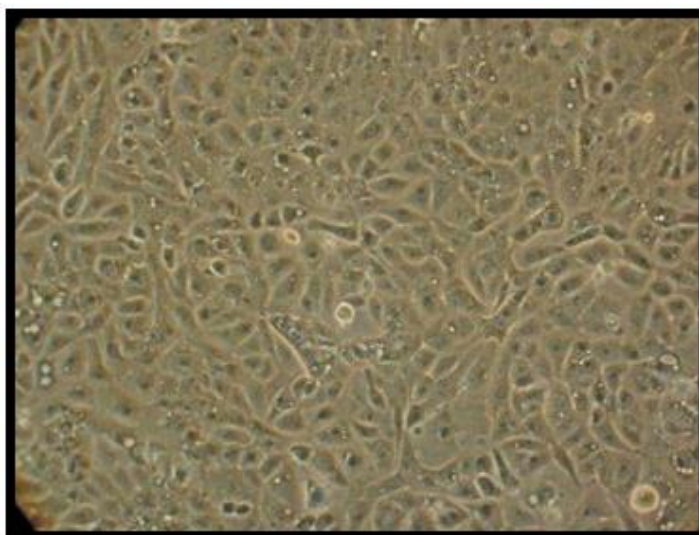


Figura 6. Células HL-1 em cultura. Claycomb, 2013.

- Cardiomiócitos derivados de células P19: são células do tipo transformadas, pois as células P19 (figura 7) são células de carcinoma embrionário de camundongo, que, quando expostas ao DMSO, podem se transformar em cardiomiócitos. Estas células são diferenciadas, porém não são consideradas células adultas. Possuem como principais características a presença de marcadores cardíacos, presença de receptor β -adrenérgico, canais de cálcio tipo L rápidos e atividade contrátil (Peter et al., 2016).

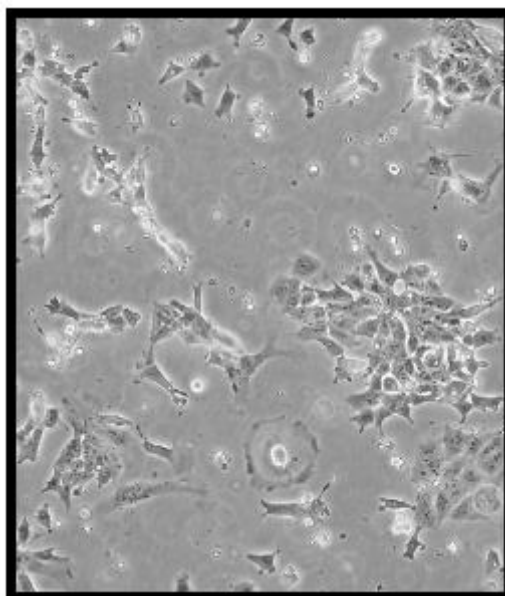


Figura 7. Células P19 não diferenciadas. ATCC® CRL-1825™.

- **Cardiomiócitos derivados de células-tronco embrionárias:** as células-tronco oriundas da massa celular interna de embriões pré-implantados podem ser facilmente diferenciadas em diversos tipos de células, uma delas são os cardiomiócitos. Além de serem muito utilizadas em estudos toxicológicos, alguns autores falam que este é um modelo promissor para estudos de tratamento de doenças cardíacas. Além disso, as próprias células também podem ser utilizadas como intervenção terapêutica em corações não saudáveis (Peter et al, 2016).
- **Linhagem celular H9c2:** como o próprio nome diz, são células do tipo linhagem, provindas de células de ventrículos de ratos BDIX. Possuem diversos marcadores cardíacos, porém não são totalmente diferenciadas em cardiomiócitos adultos. Estas células (figura 8) são multinucleadas, não possuem atividade contrátil e o meio precisa ser suplementado com um fator de diferenciação atrial para que elas se diferenciem em cardiomiócitos. A vantagem desse modelo é a sua fácil manipulação e a capacidade que as células têm de se proliferar ilimitadamente (Peter et al, 2016).

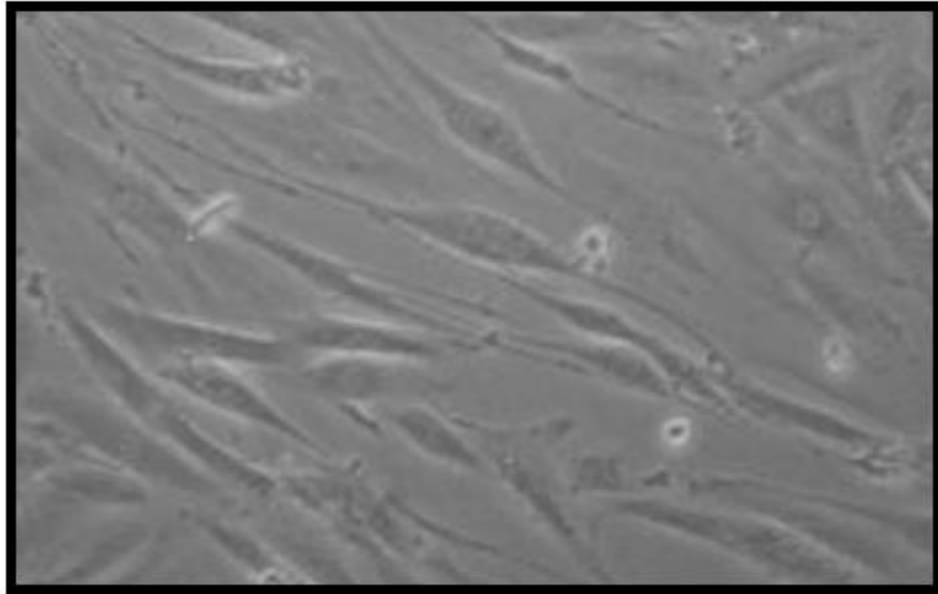


Figura 8. Células de linhagem H9c2 em cultura. Branco, 2012.

- **Cardiomiócitos neonatos:** células derivadas de ratos neonatos (3-4 dias de vida). É um tipo de cultura primária muito utilizada em estudos de parâmetros morfológicos e bioquímicos, e em mecanismos de hipertrofia de células musculares cardíacas. Não são células totalmente diferenciadas e não possuem capacidade de se proliferar infinitamente em cultura (Peter et al, 2016). Este modelo é um dos mais utilizados em cultura de cardiomiócitos, por possuir facilidade de isolamento das células, por degradação enzimática, e de manutenção das células em cultura, pois estas não morrem tão fácil como os cardiomiócitos de ratos adultos (Branco, 2012) (figura 9).

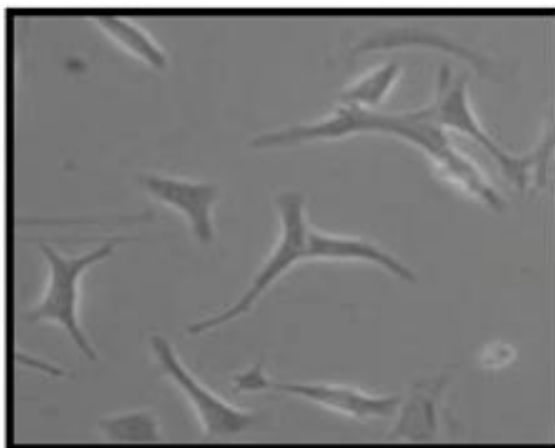


Figura 9. Cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos. Branco, 2012.

- **Cardiomiócitos adultos:** cultura primária de células musculares cardíacas de ratos adultos. É o modelo que possui mais similaridade com a morfologia e comportamento das células do tecido *in vivo*, porém, com o tempo de cultura, essas características podem se modificar. Em um meio contendo cálcio, estas células podem apresentar atividade contrátil, mas não possuem atividade contrátil espontânea em cultura. Uma das principais desvantagens é o fato que as células podem ser mantidas somente por um curto período de tempo em cultura, após o isolamento (Peter et al, 2016) (figura 10).



Figura 10. Cultura de cardiomiócitos adultos isolados. Fotografia produzida neste estudo.

1.5.5. Cultura primária de cardiomiócitos adultos

Devido às características desse modelo, sua utilização é muito vantajosa para estudos relacionados à regulação, metabolismo, função, sinalização celular e mecanismos de ação de agentes terapêuticos ou cardiotoxicos. A utilização desta técnica vem se tornando cada vez mais frequente, devido a versatilidade e conveniência desta metodologia, comparado com os experimentos *in vivo* (Parameswaran et al. 2013). Além disso, o modelo *in vitro* permite um maior

controle das condições experimentais. Há, também, a redução da influência de outros tipos de células, como fibroblastos e células endoteliais, por ser uma amostra quase inteiramente composta apenas por cardiomiócitos (Parameswaran et al. 2013).

Com base no exposto e no fato de que um estudo prévio demonstrou o efeito citoprotetor do SFN em linhagem de cardiomioblastos (H9c2), sem alterar a expressão do Nrf2, mas aumentando a expressão do PGC-1 α (Fernandes et al, 2015), torna-se importante estudar como se dá esse efeito em isolado de cardiomiócitos adultos, uma vez que a resposta antioxidante nesses dois tipos celulares pode ser diferente. Além disso, dados da literatura mostram que a ativação do Nrf2 e do PGC-1 α muitas vezes não é contínua, ou seja, sofre variações conforme o tempo que são induzidos (Wang et al, 2011; Granado-Serrano et al, 2012; Yu et al, 2012). Sendo assim, a análise destes fatores de transcrição e de fatores do estado redox, em cultura de cardiomiócitos adultos isolados, pode ajudar a elucidar melhor a atividade do SFN nestas vias.

2. Hipótese

A aumentada concentração de H₂O₂ no meio de cultura promove estresse oxidativo e leva a um dano celular. O SFN protege os cardiomiócitos adultos contra este estresse através da ativação das vias de sinalização do fator de transcrição Nrf2 e do coativador transcricional PGC-1 α , em diferentes tempos de incubação. A ativação do Nrf2 e do PGC-1 α pelo SFN leva ao aumento da expressão e atividade de proteínas envolvidas na defesa antioxidante das células cardíacas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Estudar o efeito cardioprotetor do sulforafano em cultura celular primária de cardiomiócitos adultos, através de avaliações de parâmetros de estresse oxidativo e defesas antioxidantes, assim como vias envolvidas no mecanismo de ação deste composto, em distintos tempos e condições não-oxidante e oxidante com peróxido de hidrogênio.

3.2. Objetivos específicos

- Padronizar a técnica de cultura celular primária de cardiomiócitos adultos isolados, no laboratório;
- Padronizar o modelo de estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, em cultura primária de cardiomiócitos adultos, através de avaliação de concentração e tempo de incubação, analisado por viabilidade celular;
- Determinar a concentração de incubação das células com o sulforafano, através da avaliação da viabilidade celular;
- Incubar os cardiomiócitos adultos com sulforafano, em diferentes tempos: 1 (efeito agudo) e 24 horas (efeito a longo prazo);

- Avaliar marcadores de estresse oxidativo em cardiomiócitos adultos após os tempos de incubação com sulforafano:
 - Níveis de espécies reativas de oxigênio;
 - Níveis de dano oxidativo a lipídeos;
 - Atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase e glutathione s-transferase;
 - Expressão proteica das isoformas citosólica e mitocondrial da superóxido dismutase;
- Avaliar o papel do sulforafano na estimulação da expressão proteica do Nrf-2 em diferentes tempos de incubação, em cultura celular de cardiomiócitos adultos;
- Avaliar o papel do sulforafano na estimulação da expressão proteica do PGC-1 α em diferentes tempos de incubação em cultura celular de cardiomiócitos adultos.

4. Materiais e métodos

Todos os procedimentos experimentais desenvolvidos no presente estudo seguiram a Lei 11.794 e as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) do CONCEA. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), com o número 28583.

4.1. Animais

Para a realização do modelo experimental de cultura primária de cardiomiócitos, foram utilizados ratos Wistar adultos, machos, pesando entre 200 e 250g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal da UFRGS (CREAL-UFRGS). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, agrupados ($n = 4/\text{caixa}$) em caixas de polipropileno (33x17x40 cm), sob condições de iluminação claro/escuro de 12 horas, temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade (55%) controladas, com livre acesso a água e alimento.

4.2. Grupos experimentais

Foram estabelecidos 4 grupos experimentais de cardiomiócitos adultos isolados em cultivo:

- Grupo Controle: células cardíacas adultas foram mantidas com meio de cultura 199, contendo 0,5% de FBS.
- Grupo SFN: células cardíacas adultas foram mantidas em meio de cultura 199, contendo 0,5% de FBS e $5\mu\text{M}$ de sulforafano.
- Grupo H_2O_2 : células cardíacas adultas foram mantidas em meio de cultura 199, contendo 0,5% de FBS e submetidos a incubação com $5\mu\text{M}$ de H_2O_2 , por 15 minutos.

- Grupo SFN+H₂O₂: células cardíacas adultas foram mantidas em meio de cultura 199, contendo 0,5% de FBS, 5 µM de sulforafano e submetidos a incubação com 5µM de H₂O₂, por 15 minutos.

Os grupos ainda foram subdivididos nos diferentes tempos de incubação com o SFN (1 e 24 horas).

Para as análises de viabilidade celular, os grupos foram subdivididos em grupos de diferentes doses de sulforafano e/ou peróxido de hidrogênio.

4.3. Procedimento de isolamento e cultivo de cardiomiócitos adultos de rato

O isolamento dos cardiomiócitos adultos foi realizado através da desagregação enzimática do tecido fibroso cardíaco, como descrito por Lou et al. (2006).

Primeiramente, foi administrado heparina (5000UI) intraperitonealmente, no animal. Poucos minutos depois, o animal foi eutanasiado, para a retirada do coração, com administração intraperitoneal de tiopental (120 mg/Kg) misturado com lidocaína (10 mg/ml, anestésico local). O coração foi retirado do animal e imediatamente colocado em um sistema modificado de Langendorff (figura 11), através da canulação pela aorta, de forma que a saída da cânula ficasse na altura dos óstios das artérias coronárias (figura 12). Primeiramente, o coração foi perfundido com uma solução aquecida (37°C) de Krebs modificada, por 4-5 minutos (fluxo: 3 mL/min) (Ludke et al, 2012), sem recirculação, com o objetivo de remover as células sanguíneas das coronárias e do tecido cardíaco.

A solução de Krebs modificada é composta, em mmol/L, por: NaCl 110, KCl 2,6, KH₂PO₄ 1,2, MgSO₄.7H₂O 1,2, NaHCO₃ 25, Taurina 30,4 e Glucose 20. Os reagentes eram diluídos em água destilada autoclavada até o volume estabelecido. A solução era borbulhada com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂), por 20 minutos, para equilibrar o pH em 7,4.

Passados os minutos de perfusão para limpeza do tecido, o coração foi perfundido com solução de Krebs contendo Colagenase tipo II (enzima responsável por degradar as fibras intercelulares do tecido, promovendo, assim,

o isolamento das células), por 30 minutos (fluxo constante de 4mL/min, à 37°C), com a solução de colagenase recirculando no sistema. A solução de colagenase foi composta por: colagenase tipo II (270Ucoll/mL), albumina de soro bovino (BSA) (1mg/mL), CaCl₂ (100mM) e solução de Krebs modificada até completar o volume desejado.

Na sequência, o coração – nesse momento já com as células cardíacas isoladas – foi levado, em solução aquecida de colagenase tipo II (135Ucoll/mL), para o fluxo laminar. No fluxo, o tecido foi gentilmente separado por pinças cirúrgicas e ressuspendido com pipetas de pontas com diâmetros cada vez menores, facilitando a liberação das células cardíacas do tecido fibroso digerido. A solução contendo as células isoladas foi filtrada, através de um filtro de 200µm, e permaneceu em repouso por 10 minutos em falcon 50mL, a fim de formar um pellet de células. Após isso, o pellet de células foi ressuspendido mais 2 vezes em soluções sem colagenase e com concentrações crescentes de CaCl₂ diluído em 15 mL de solução de Krebs modificada (solução C: 150mg de BSA e Ca⁺⁺ 240µmol/L; solução D: 300mg de BSA e Ca⁺⁺ 1200 µmol/L). O pellet formado foi, por fim, ressuspendido em meio de cultura 199 contendo 5% FBS, 0,1% de antibiótico (gentamicina) e 0,2% de antifúngico (anfotericina B). Uma alíquota da solução foi retirada para fazer a contagem do número de células em câmara de Neubauer, a fim de chegar a uma quantidade de aproximadamente 500 mil células plaqueadas por poço. As células foram, enfim, plaqueadas nas placas de cultura (previamente recobertas com laminina 20µg/ml – Sigma-Aldrich) (figura 13) e mantidas em uma incubadora com 5% de CO₂, à 37°C. Três horas após o plaqueamento, o meio de cultura foi trocado, a fim de remover células mortas não aderidas, e as células viáveis foram incubadas com meio de cultura 199, com 0,5% de FBS, overnight, para que se estabilizassem ao novo ambiente, a fim de proceder com os testes experimentais. No dia posterior, foi colocado meio de cultura novo e realizado o tratamento das células com SFN (5µM) e/ou H₂O₂ (5µM).

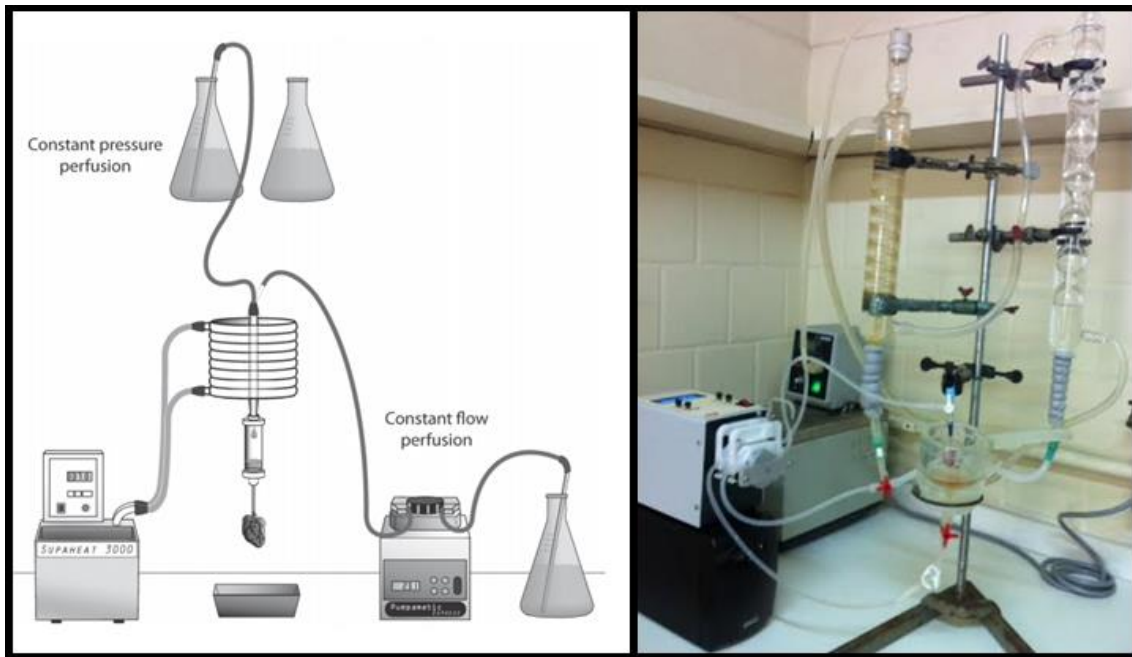


Figura 11. Desenho mostrando o sistema de perfusão para isolamento dos cardiomiócitos (Louch et al, 2012). Fotografia produzida neste estudo, mostrando o aparelho de perfusão utilizado.

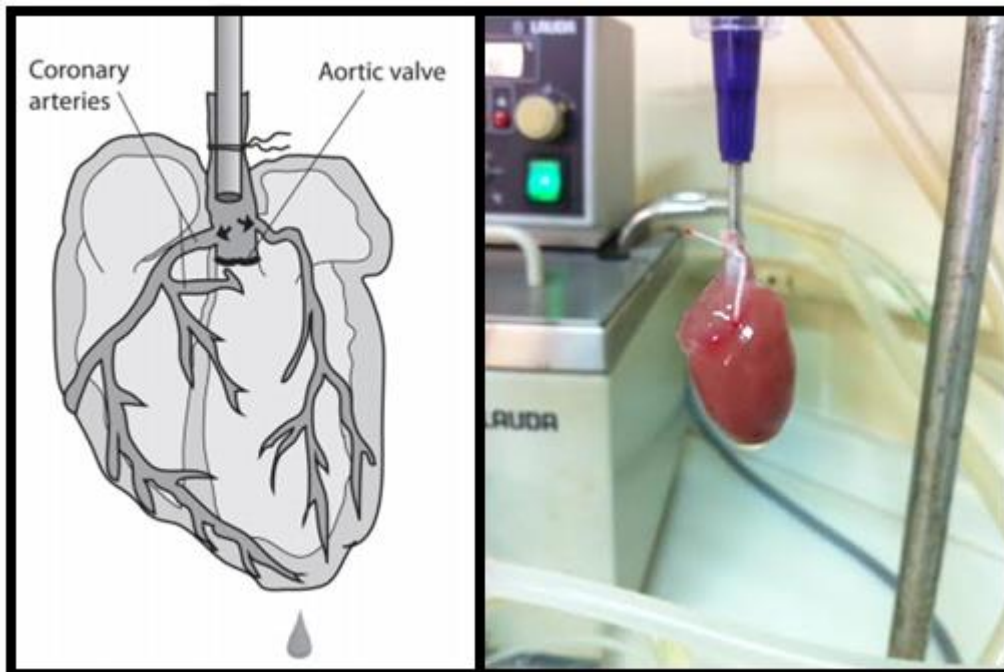


Figura 12. Desenho mostrando a canulação do coração pela aorta e a posição correta da cânula (Louch et al, 2012). Fotografia produzida neste estudo, mostrando um coração canulado através da aorta ascendente, em aparelho de Langendorff modificado.



Figura 13. Fotografia produzida neste estudo de plaqueamento de cardiomiócitos isolados. Imagens observadas em microscópio invertido, em aumentos de 4x, 10x e 20x, respectivamente.

4.4. Concentração de sulforafano

Foi realizado um estudo piloto a fim de determinar uma concentração adequada e não tóxica do SFN para tratamento das células. Para avaliar o efeito das concentrações de SFN na viabilidade das células, as seguintes concentrações foram testadas: 5 e 10 μM (Angeloni et al, 2009). As células foram incubadas com o SFN por 24 horas e, em seguida, o teste de viabilidade celular foi realizado.

4.5. Concentração de peróxido de hidrogênio

A técnica de avaliação de viabilidade celular também foi utilizada para testar a concentração e o tempo de incubação ideal com o H_2O_2 . Foram testadas as concentrações de 5 e 10 μM , nos tempos de 10 e 15 minutos de incubação com H_2O_2 . Após estes tempos, o meio contendo H_2O_2 foi trocado e as células permaneceram incubadas com meio de cultura, sem H_2O_2 , por 24 horas.

4.6. Viabilidade celular

A viabilidade celular dos cardiomiócitos adultos foi avaliada através da técnica do MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio) (Mosmann, 1983), adaptado para este modelo de cultura. Os cardiomiócitos adultos foram distribuídos em placas de 96 poços numa densidade de 2×10^4 células/poço, seguindo o mesmo procedimento de aderência na placa e

tratamento dos grupos descrito no item 4.3. Após o tratamento com SFN, 5mg/mL de MTT foi adicionado ao meio de cultura em cada poço e, após, as placas foram incubadas a 37°C por 4 horas. Após a incubação, o meio foi retirado e foi adicionado 0,05 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço. O DMSO lisou as células e reagiu com o MTT, dissolvendo os cristais formados pela reação das células com o MTT e formando uma solução de coloração violeta. A absorbância foi quantificada a 570 nm (650 nm comprimento de onda de correção) em leitora Zenyth 200rt (BiochromInc, UK) (Ludke et al, 2012). Os dados apresentados foram expressos como porcentagem do controle, assim como descrito por Bryan et al, em 2011.

4.7. Preparo das células para análise dos parâmetros de estresse oxidativo

Após os respectivos tempos de incubação das células (1 hora e 24 horas), o meio de cultura foi gentilmente removido dos poços. As placas, então, foram lavadas com tampão fosfato aquecido, que foi removido após a lavagem. Com a placa sobre o gelo, foi adicionada, em cada poço, solução tampão de Cell Lysis Buffer 10x (Cell Signaling Technology, EUA), seguindo as orientações do fabricante do produto. As células foram raspadas e coletadas da placa. As amostras foram sonicadas (banho sonicador Ultrasonic Cleaner) com 4 pulsos de 30 segundos e, após isso, centrifugadas a 8000 x g por 10 minutos, à 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e as amostras foram mantidas em freezer - 80°C, para futuras análises.

4.8. Quantificação de proteínas

A concentração de proteína em cada amostra foi quantificada pelo método de Lowry (Lowry et al, 1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão de curva (1mg/mL). Foi utilizado 50 mL do reativo A (bicarbonato de sódio - NaHCO₃ 2% (p/v) em hidróxido de sódio - NaOH 0,1 N), 0,5mL do reativo B1 (sulfato de cobre - CuSO₄.5H₂O 1% (p/v)) e 0,5 mL do reativo B2 (tartarato de sódio e potássio - KNaC₄H₄O₆.4H₂O 2% (p/v)), para compor o reativo C, onde a

amostra foi adicionada. O reativo de Folin Ciocalteu foi adicionado às amostras na placa e, após 30 minutos, a leitura foi efetuada em espectrofotômetro (Anthos Zenyth 200rt) a 635 nm.

4.9. Determinação dos níveis de espécies reativas totais

A determinação dos níveis de espécies reativas totais (ROS) foi realizada através da emissão de fluorescência do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, EUA), técnica descrita por Lebel et al, em 1992. Em contato com espécies reativas de oxigênio, o DCFH-DA é oxidado em 2,7-diclorofluoresceína (DCF), molécula que irá emitir a fluorescência. As amostras foram incubadas com tampão fosfato 20 mM + KCl (cloreto de potássio) 140 mM (pH 7,4) e 2',7'-DCFH-DA 100 µM por 30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente. A reação foi medida em espectrofotômetro fluorescente, no qual as amostras foram excitadas a 488nm e a emissão de fluorescência foi coletada a 525nm. Os resultados foram expressos em nmoles de DCF formado/mg proteína.

4.10. Determinação dos níveis de peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden). As amostras foram colocadas em viais contendo baixo potássio, numa concentração de 0,5 mg/mL, num meio de reação que consiste em tampão fosfato 30 mmol/L e 120 mmol/L de KCl (pH = 7,4). Os níveis de dano a lipídeos foram determinados pela reação de quimiluminescência iniciada por hidroperóxido de tert-butil (t-BOOH). Os resultados foram expressos em contagens/s/mg proteína (Gonzalez-Flecha et al, 1991).

4.11. Atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase

A atividade da SOD foi baseada inibição da reação do radical superóxido, gerado pela auto-oxidação do pirogalol em meio básico, com o pirogalol, como descrito por Marklund, em 1985. Foram utilizadas as seguintes soluções: solução tampão (Tris-base 50mmol/L + EDTA 1mmol/L, pH 8,2), solução de catalase (30 µmol/L), solução de SOD (volume adequado à concentração desejada) e pirogalol 24mmol/L (diluído em ácido clorídrico 10 mM).

As concentrações de 0; 0,25; 0,5 e 1 unidade de SOD (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) foram utilizadas para a realização de uma curva padrão, de onde foi obtido o fator de correção utilizado no cálculo de conversão da porcentagem de inibição da auto oxidação do pirogalol, em unidades de SOD. A reação foi medida em espectrofotômetro a 420nm, e a atividade da enzima foi expressa em U/mg proteína (Marklund, 1985).

4.12. Atividade da enzima antioxidante catalase

A atividade da CAT foi quantificada baseado no fato que a sua atividade é diretamente proporcional à taxa de decomposição do H₂O₂. Foi utilizada uma solução tampão de fosfatos de sódio de 50 mM, em pH 7,4 e H₂O₂ 0,3 mol/L. A reação foi medida em espectrofotômetro a 240nm e os resultados foram expressos em nmoles/min/mg proteína (Aebi, 1985).

4.13. Atividade da enzima antioxidante glutathione S-transferase

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi quantificada pela reação de GST com cloro dinitro-benzeno (CDNB), que gera um composto que é conjugado com a GSH, formando um produto corado dinitro-fenil-glutathione. Para medir a reação, foi utilizada uma solução tampão de fosfato 0,2 mol/L (pH 6,5), GSH 20 mmol/L, CDNB 20 mmol/L e a amostra. A reação foi medida em espectrofotômetro a 340nm, e os resultados foram expressos em nmoles/min/mg proteína (Mannervik e Gluthenberg, 1981).

4.14. Expressão proteica do Nrf2, do PGC-1α e de enzimas antioxidantes

A preparação das células, eletroforese e transferência de proteínas para análise da expressão proteica do Nrf2, do PGC-1 α e das enzimas antioxidantes SOD-1 e SOD-2 foram realizadas conforme descrito anteriormente (Laemmli, 1970; Araujo et al., 2006). As membranas foram processadas para a imunodeteção utilizando os seguintes anticorpos primários: Nrf-2 (57 kDa), PGC-1 α (91 kDa), SOD-1 (23kDa) e SOD-2 (25kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA ou Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Os anticorpos primários foram detectados utilizando-se anticorpos secundários de acordo com a origem dos primários (anti-rabbit, anti-mouse ou anti-goat), e as membranas foram reveladas por quimiluminescência.

4.15. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Teste de normalidade Shapiro-Wilk foi realizado para determinação da distribuição dos dados. Para os resultados paramétricos foi utilizada Análise de Variância (ANOVA de 2 vias), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Foi utilizado teste de Pearson para as análises de correlação. As análises que apresentaram $P < 0,05$ foram aceitas como estatisticamente significativas.

4.16. Descarte de materiais biológicos e químicos

As carcaças dos animais mortos e os demais resíduos biológicos foram identificados e acondicionados em sacos brancos, em freezer específico para acondicionamento de carcaças. Após, em dia marcado, os sacos brancos foram levados ao tonel do qual a empresa especializada no serviço de coleta de materiais biológicos da UFRGS faz o recolhimento desses sacos. 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 e luva cirúrgica, respeitando os devidos cuidados para proteção tanto dos animais como do pesquisador.

5. Resultados

5.1. Padronização da técnica de cultura celular primária de cardiomiócitos adultos isolados

Após diversos testes e aprendizados, a técnica de isolar e cultivar células cardíacas de ratos adultas foi padronizada com êxito. O isolamento das células foi considerado bem-sucedido quando houve maior proporção de células vivas (células em formato alongado) do que mortas (células em formato oval). Como pode ser observado na figura 14, a maior porcentagem das células mostradas está em formato alongado.

O protocolo descrito pelo grupo do Dr. Pawan Singal (Institute of Cardiovascular Sciences, Saint Boniface Research Center, Winnipeg – CA), publicado em Ludke et al, em 2012 foi adaptado para as condições disponíveis para o presente estudo. Durante os testes, foi observado que a perfusão com a colagenase deve ser feita durante 30 minutos. Tentativas nas quais esse tempo foi menor, resultaram em muitos grumos de células, que morriam quando eram separadas mecanicamente. Por outro lado, um tempo maior de exposição à colagenase também levava à diminuição na concentração de células vivas.



Figura 14. Células cardíacas em cultivo. Os cardiomiócitos vivos são as células de forma alongada, já os cardiomiócitos mortos são as células de forma oval. Imagem observada em microscópio invertido, com aumento de 10x. Fotografia produzida neste estudo.

5.2. Concentração e tempo de incubação com peróxido de hidrogênio

O teste de viabilidade celular realizado com as concentrações de 5 μ M e 10 μ M de H₂O₂, nos tempos de 10 e 15 minutos de incubação, está mostrado na figura 15. As células incubadas com 5 μ M de H₂O₂, por 10 minutos não obtiveram viabilidade diferente do controle. Já as células incubadas com 10 μ M, por 10 minutos, e as células incubadas com 5 μ M, por 15 minutos, estavam com viabilidade diminuída em relação ao controle. A concentração aumentada de H₂O₂ (10 μ M) mostrou-se muito agressiva para as células, resultando em muitas células mortas. Foi determinado, então, que a concentração e o tempo utilizados neste estudo, para gerar um modelo de estresse oxidativo, seriam de 5 μ M de H₂O₂, com 15 minutos de incubação.

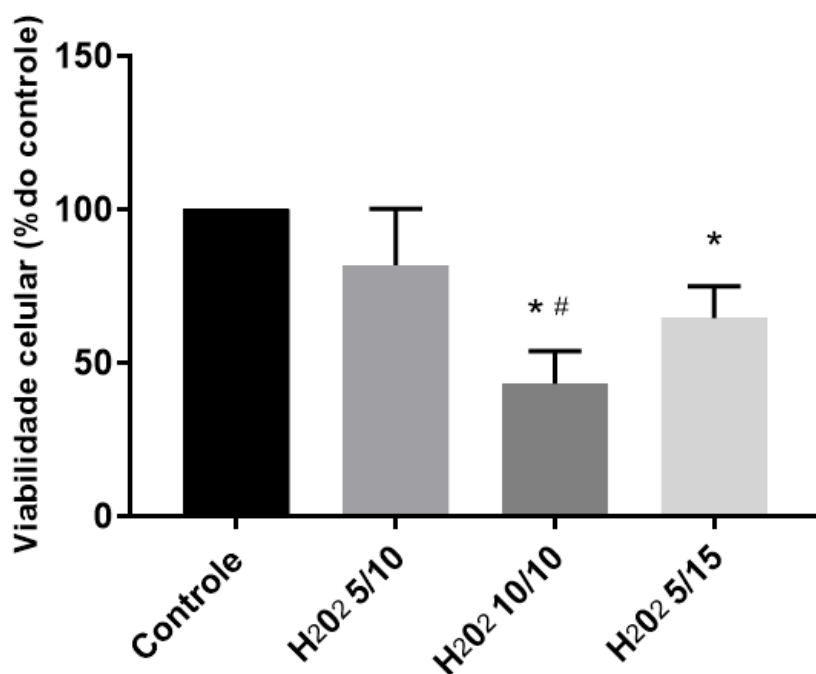


Figura 15. Viabilidade celular das células incubadas com diferentes tempos e doses de H₂O₂. H₂O₂ 5/10 (peróxido de hidrogênio 5 μ M, por 10 minutos), H₂O₂ 10/10 (peróxido de hidrogênio 10 μ M, por 10 minutos), H₂O₂ 5/15 (peróxido de hidrogênio 5 μ M, por 15 minutos). Os resultados

estão mostrados com média \pm desvio padrão, e $P < 0,05$ para as diferenças encontradas. 10 poços por grupo. * diferente comparado ao grupo controle; # diferente comparado ao grupo H_2O_2 5/10.

5.3. Concentração de incubação com o sulforafano

O teste de viabilidade celular realizado com as doses de $5\mu M$ e $10\mu M$ de SFN está mostrado na figura 16. A incubação com as diferentes concentrações de SFN foi realizada tanto em meio de cultura, como em meio de cultura contendo $5\mu M$ de H_2O_2 . As células incubadas com dose de $5\mu M$ de SFN tiveram viabilidade próxima à do grupo controle, não mostrando diferença significativa para o controle tanto no grupo SFN5, como no grupo SFN5 + H_2O_2 . Entretanto, as células incubadas com dose de $10\mu M$ de SFN obtiveram viabilidade celular diminuída em relação ao controle ($P < 0,05$) e próximas ao grupo incubado somente com H_2O_2 . Dessa forma, foi decidido que a dose de $5\mu M$ de SFN seria utilizada para as análises deste estudo.

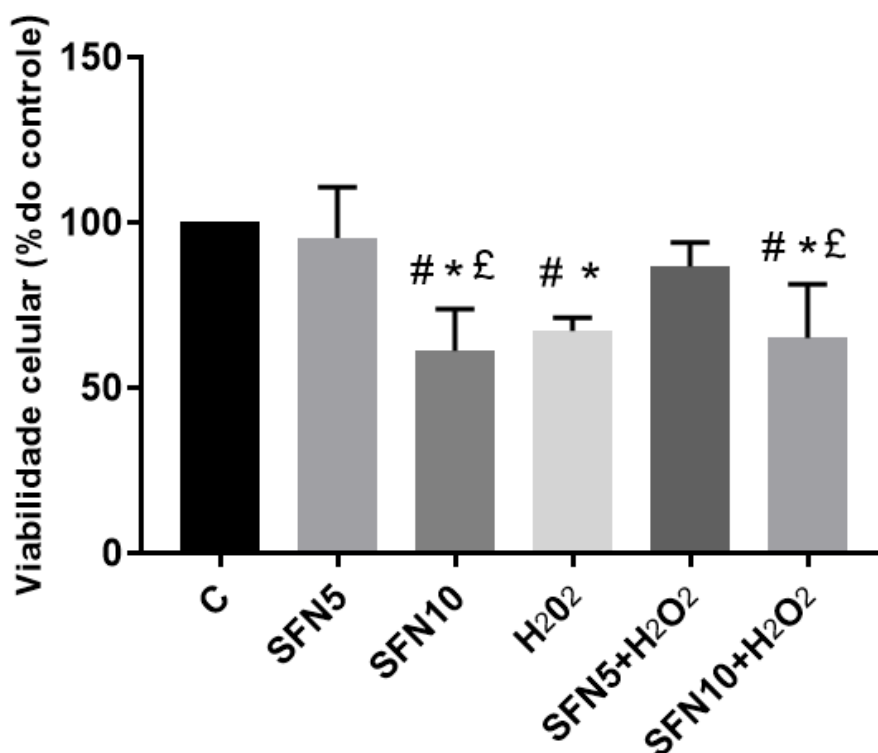


Figura 16. Viabilidade celular de células tratadas com diferentes doses de SFN. C (controle), SFN5 (sulforafano dose $5\mu M$), SFN10 (sulforafano dose $10\mu M$), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), SFN+ H_2O_2 (sulforafano $5\mu M$ com peróxido de hidrogênio) e SFN10+ H_2O_2 (sulforafano $10\mu M$ com

peróxido de hidrogênio). Os resultados estão mostrados com média \pm desvio padrão, e $P < 0,05$ para as diferenças encontradas. 10 poços por grupo. # diferente comparado ao grupo controle; * diferente comparado ao grupo SFN5; £ diferente comparado ao grupo SFN5+H₂O₂.

5.4. Níveis de espécies reativas de oxigênio totais

Apesar de mostrar uma tendência a menores níveis de ROS nos grupos SFN e SFN+H₂O₂, nos dois tempos de incubação, houve diferença significativa apenas entre o grupo SFN e o grupo controle (40%), no tempo de 1 hora de incubação. Os resultados estão demonstrados na figura 17.

5.5. Níveis de peroxidação lipídica

Os níveis de oxidação de lipídeos, estão demonstrados na figura 18. Não houve diferença significativa entre os tempos de incubação com SFN. Foram encontradas diferenças significativas apenas entre os grupos experimentais com 1 hora de incubação. Neste tempo, o grupo H₂O₂ apresentou maiores níveis de LPO. Houve diferença do grupo H₂O₂ quando comparado ao grupo controle (63%), bem como diferença entre os grupos incubados com sulforafano (SFN e SFN+ H₂O₂) e o grupo H₂O₂ (45% e 44%, respectivamente).

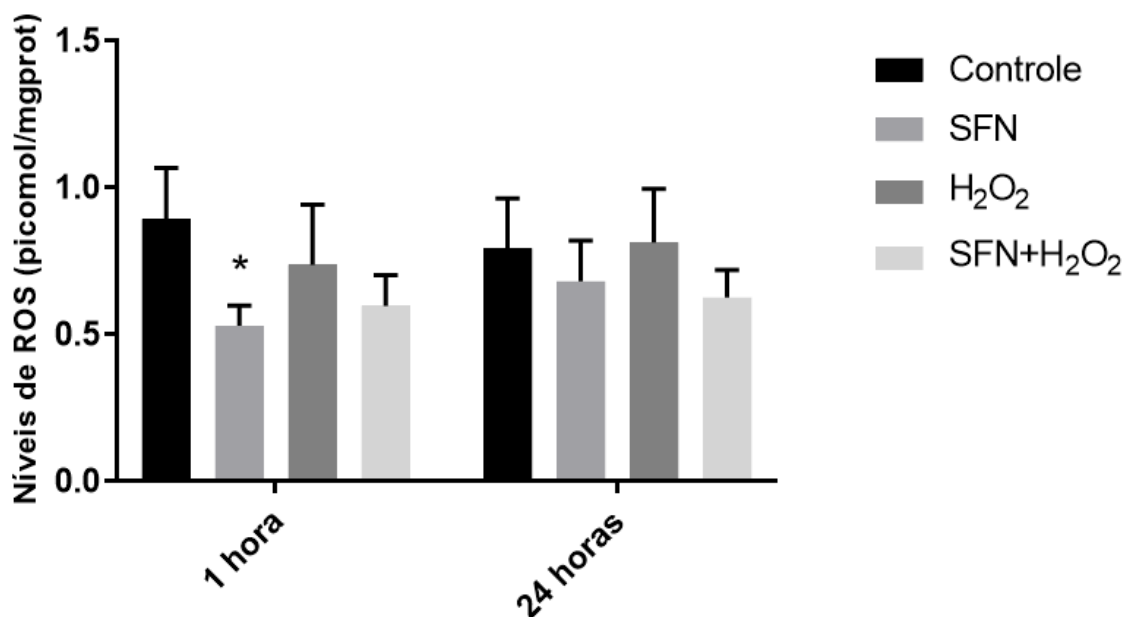


Figura 17. Níveis de espécies reativas de oxigênio totais (ROS), medidos por DCFHDA, em cardiomiócitos de ratos adultos, isolados e cultivados *in vitro*. Os resultados estão mostrados com média \pm desvio padrão e $P < 0,05$ para as diferenças encontradas. 6-8 animais por grupo. * diferente em relação ao controle.

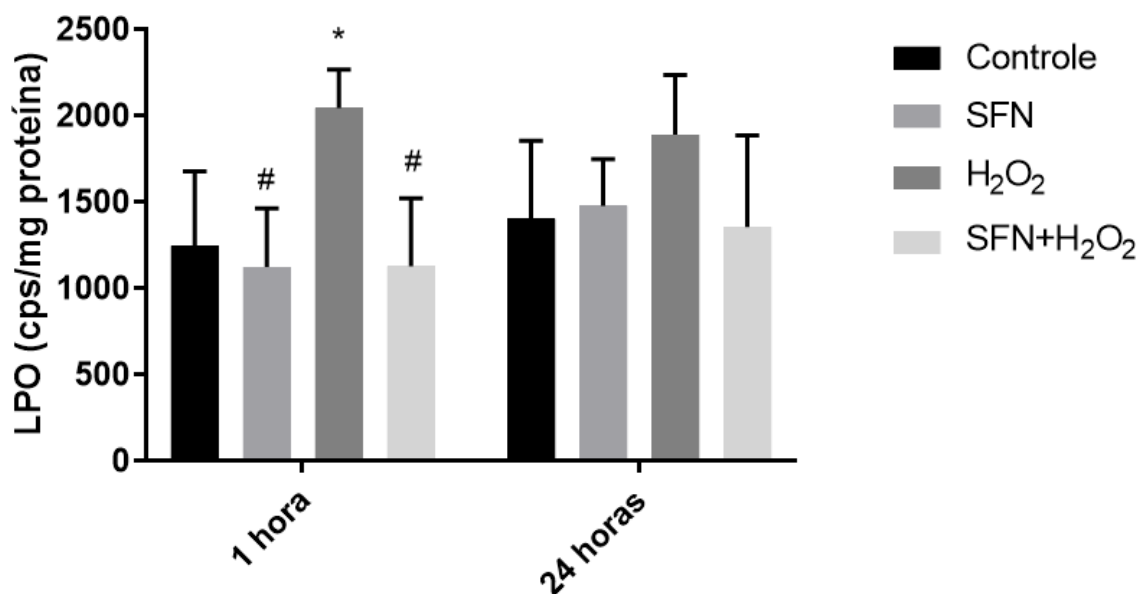


Figura 18. Níveis de peroxidação lipídica (LPO), medidos por QL, em cardiomiócitos de ratos adultos, isolados e cultivados *in vitro*. Os resultados estão mostrados com média \pm desvio padrão e $P < 0,05$ para as diferenças encontradas. 7-8 animais por grupo. * diferente em relação ao controle; # diferente em relação ao grupo H₂O₂.

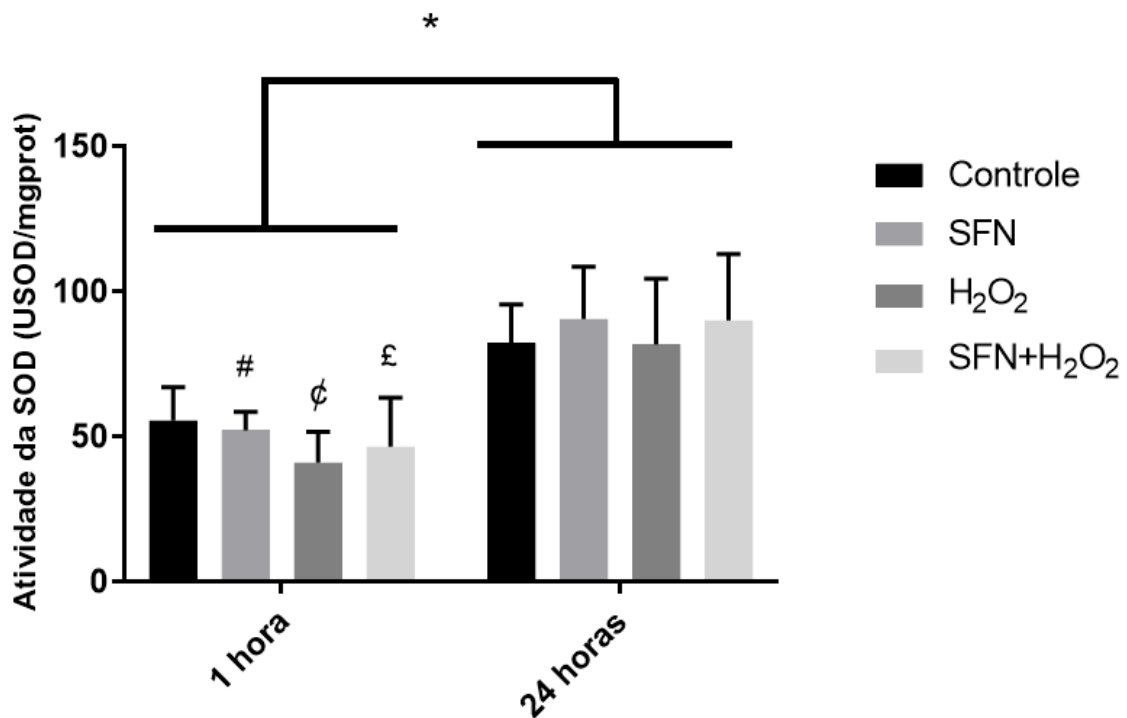


Figura 19. Atividade da superóxido dismutase (SOD) em cardiomiócitos de ratos adultos, isolados e cultivados *in vitro*. Os resultados estão mostrados com média \pm desvio padrão, e $P < 0,05$ para as diferenças encontradas. 6-8 animais por grupo. * diferença entre os diferentes tempos de tratamento (1 hora e 24 horas); # diferente em relação ao SFN 24 horas; ¢ diferente em relação ao H₂O₂ 24 horas; £ diferente em relação ao SFN+H₂O₂ 24 horas.

5.6. Atividade da enzima antioxidante catalase

A figura 20 mostra a atividade da CAT em cardiomiócitos tratados com SFN, por 1 e 24 horas. Não houve diferença significativa entre os tempos de incubação com SFN. Em relação aos grupos tratados por 1 hora, o grupo H₂O₂ mostrou atividade da CAT significativamente menor (38%), quando comparado ao grupo controle.

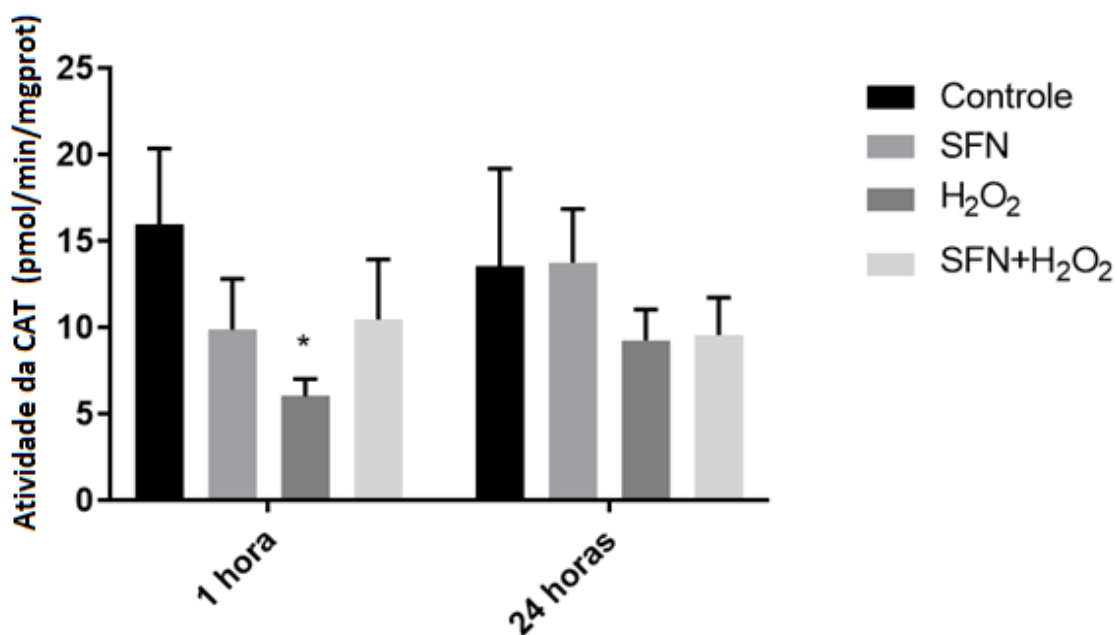


Figura 20. Atividade da catalase (CAT) em cardiomiócitos de ratos adultos, isolados e cultivados *in vitro*. Os resultados estão mostrados com média \pm desvio padrão, e $P < 0,05$ para as diferenças encontradas. 6 animais por grupo. * diferença em relação ao controle do mesmo tempo de incubação.

5.7. Atividade da enzima antioxidante glutathiona S-transferase

A figura 21 mostra a atividade da GST em cardiomiócitos tratados com SFN, por 1 e 24 horas. Não houve diferença significativa entre os tempos de incubação com SFN e também não houve diferença na atividade da GST entre os grupos experimentais.

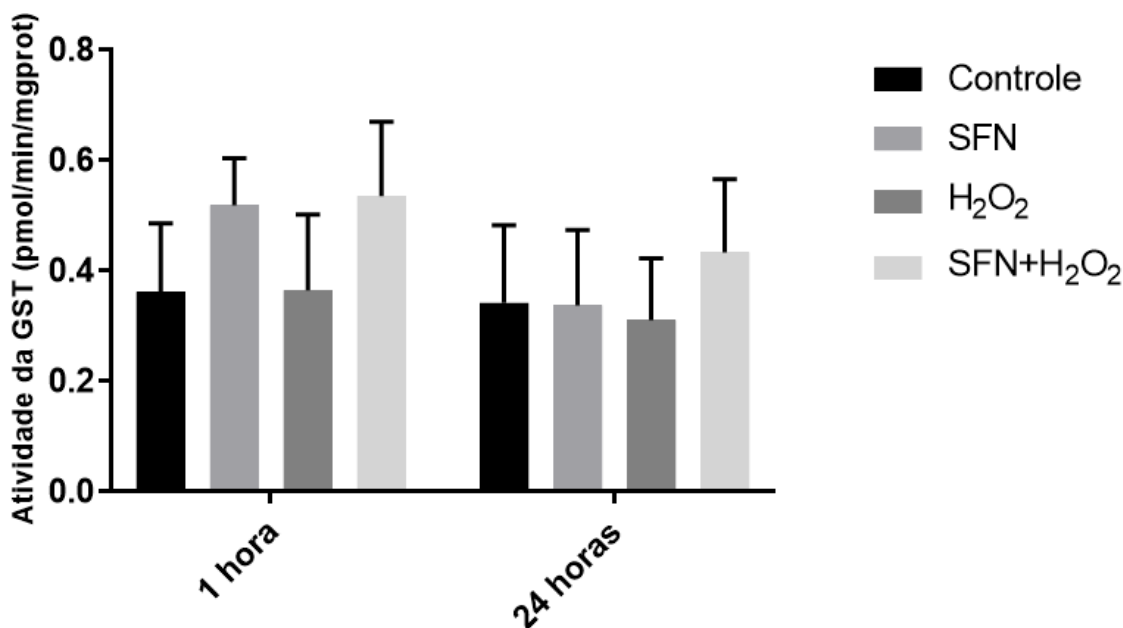


Figura 21. Atividade da glutatona S-transferase (GST) em cardiomiócitos de ratos adultos, isolados e cultivados *in vitro*. Os resultados estão mostrados com média \pm desvio padrão. 6-7 animais por grupo.

5.8. Expressão proteica das isoformas da enzima superóxido dismutase

A análise da expressão proteica das isoformas da SOD, citosólica (SOD-1) e mitocondrial (SOD-2) estão mostradas nas figuras 22 e 23. Na figura 22, pode-se observar que a expressão proteica da SOD-1 estava 55% maior nos grupos incubados por 24 horas. Além disso, com exceção do grupo controle, cada grupo experimental tratado por 1 hora, individualmente mostrou significativamente menor expressão proteica da SOD-1, quando comparado ao mesmo grupo tratado por 24 horas (SFN: 27%; H₂O₂: 32%; SFN+H₂O₂: 33%).

Na figura 23, está demonstrada a expressão proteica da SOD-2. Em relação aos tempos de incubação, os grupos incubados por 24 horas apresentaram 24% mais expressão proteica de SOD-2, em relação aos grupos incubados por 1 hora. Não houve diferença significativa individualmente entre os grupos.

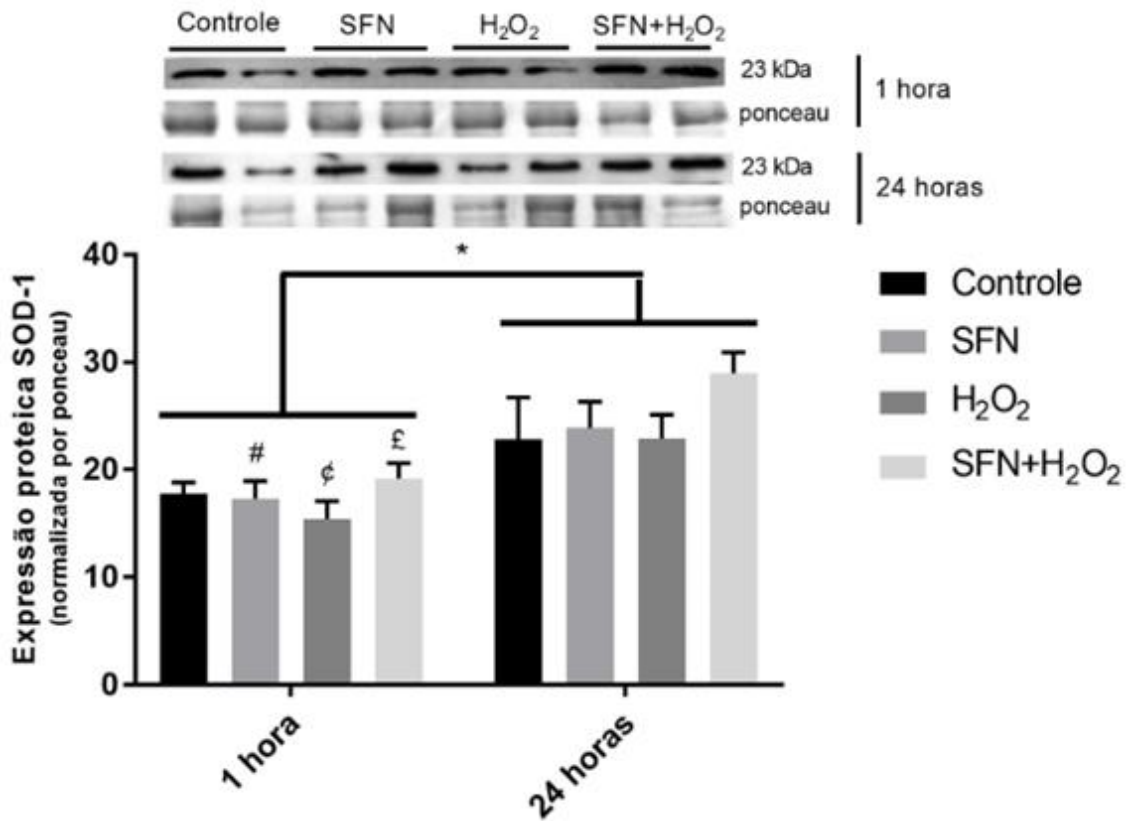


Figura 22. Expressão proteica da SOD-1, em cardiomiócitos de ratos adultos, isolados e cultivados *in vitro*. Os resultados estão mostrados com média \pm desvio padrão, e $P < 0,05$ para as diferenças encontradas. 3-4 animais por grupo. Gel representativo de experimentos de Western Blot, mostrando 2 bandas para cada grupo experimental. * diferença entre os diferentes tempos de tratamento (1 hora e 24 horas); # diferente em relação ao SFN 24 horas; ç diferente em relação ao H₂O₂ 24 horas; £ diferente em relação ao SFN+H₂O₂ 24 horas.

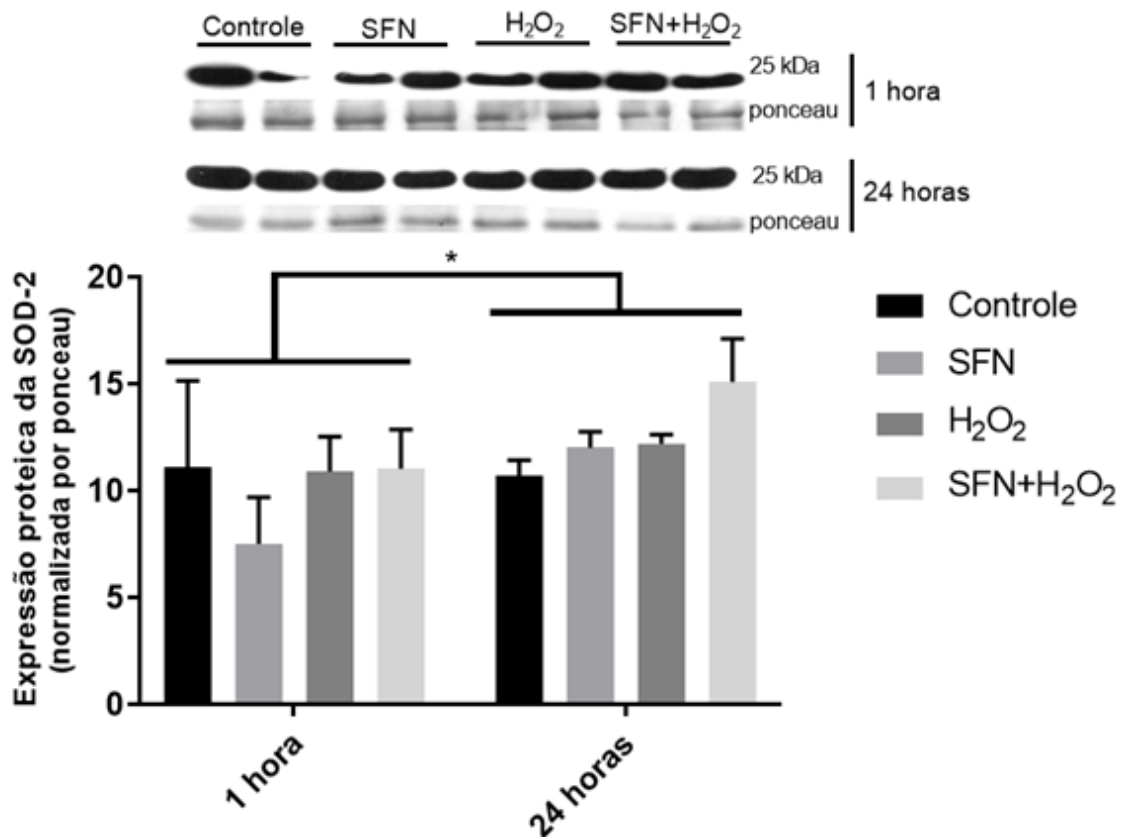


Figura 23. Expressão proteica da SOD-2, em cardiomiócitos de ratos adultos, isolados e cultivados *in vitro*. Os resultados estão mostrados com média \pm desvio padrão, e $P < 0,05$ para as diferenças encontradas. 3-4 animais por grupo. Gel representativo de experimentos de Western Blot, mostrando 2 bandas para cada grupo experimental. * diferença entre os diferentes tempos de tratamento (1 hora e 24 horas);

5.9. Expressão proteica do co-ativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α)

A expressão proteica do coativador transcricional PGC 1 α está mostrada na figura 24. Houve diferença significativa entre os tempos de incubação, sendo que os grupos incubados por 24 horas apresentaram maior expressão proteica do PGC 1 α (69%). Houve, também, uma diminuição significativamente diferente entre cada grupo 1 hora, com o mesmo grupo incubado por 24 horas, com exceção dos grupos controle (SFN: 52%; H₂O₂: 42%; SFN+H₂O₂: 49%). Em relação aos grupos 24 horas, os grupos SFN e SFN+H₂O₂ estavam aumentados em relação ao controle (32% e 33%, respectivamente), e o grupo SFN+H₂O₂ estava aumentado (21%), em relação ao grupo H₂O₂. Além disso, houve uma

correlação positiva ($r = 0,74$, $P < 0,05$) entre a expressão proteica do PGC 1 α e a atividade total da SOD.

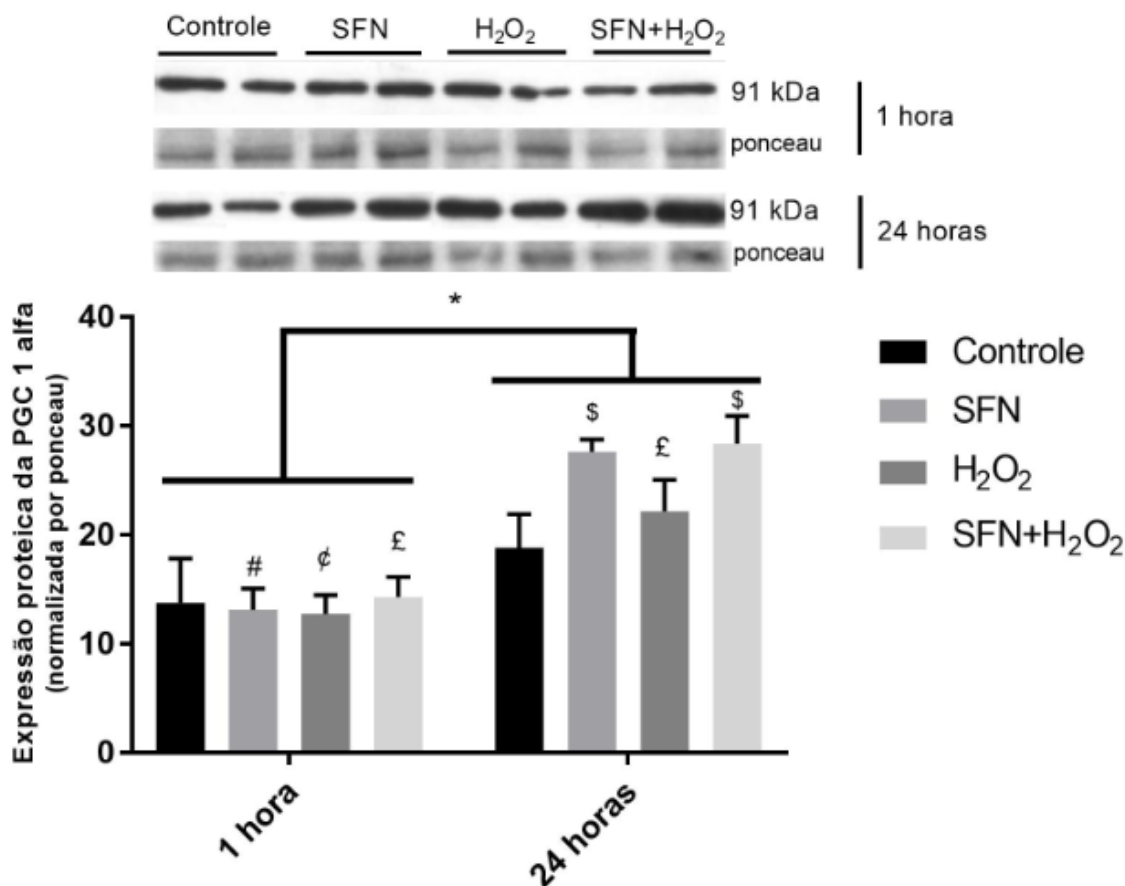


Figura 24. Expressão proteica do co-ativador-1 alfa do receptor ativado porproliferadordo peroxissoma (PGC-1 α), em cardiomiócitos de ratos adultos, isolados e cultivados *in vitro*. Os resultados estão mostrados com média \pm desvio padrão, e $P < 0,05$ para as diferenças encontradas. 4 animais por grupo. Gel representativo de experimentos de Western Blot, mostrando 2 bandas para cada grupo experimental. * diferença entre os diferentes tempos de tratamento (1 hora e 24 horas); # diferente em relação ao SFN 24 horas; ϕ diferente em relação ao H₂O₂ 24 horas; ξ diferente em relação ao SFN+H₂O₂ 24 horas; $\$$ diferente em relação ao Controle 24 horas;

5.10. Expressão proteica do Fator eritroide nuclear tipo 2

O Nrf2 apresentou 17% maior expressão proteica no tempo de 1 hora de incubação, em relação aos grupos com 24 horas de incubação. Não houve diferença significativa entre os grupos incubados por 24 horas. Entretanto, nos

grupos incubados por 1 hora, houve aumento da expressão do Nrf2 no grupo SFN+H₂O₂ em relação ao grupo controle (40%) (figura 25).

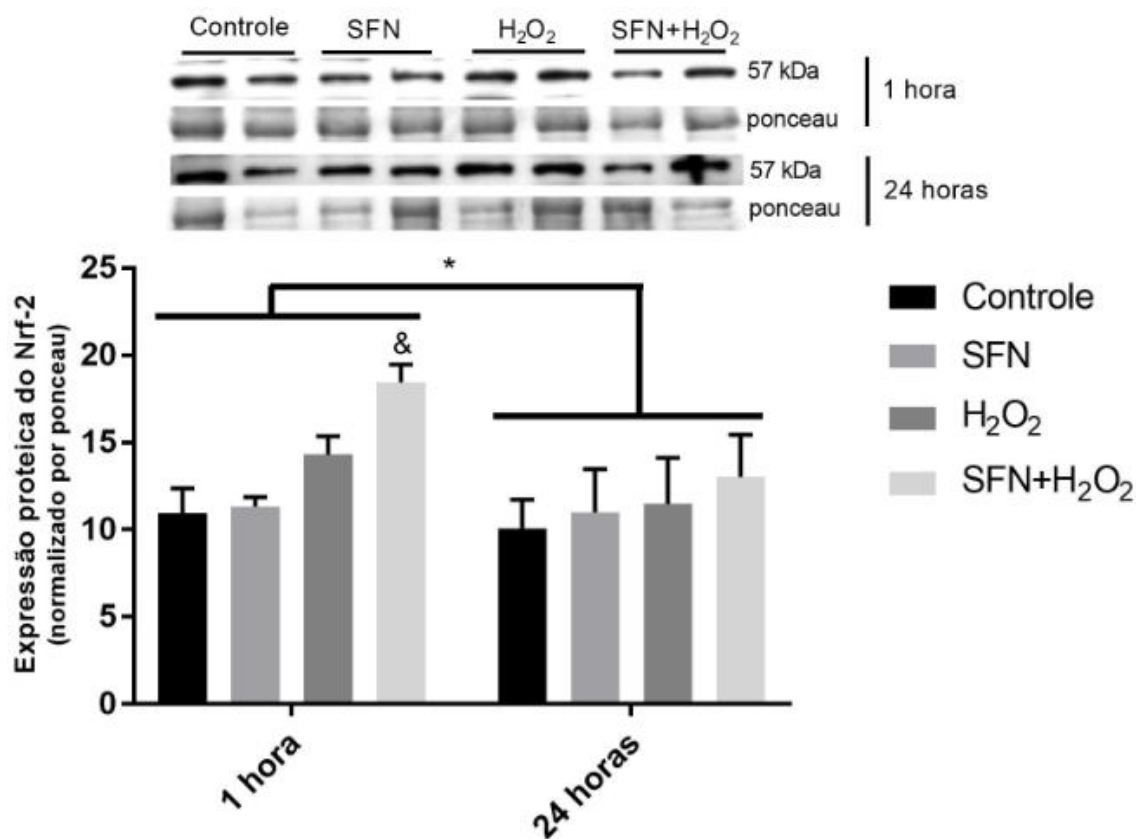


Figura 25. Expressão proteica do fator eritroide nuclear tipo 2 (Nrf2), em cardiomiócitos de ratos adultos, isolados e cultivados *in vitro*. Os resultados estão mostrados com média \pm desvio padrão, e $P < 0,05$ para as diferenças encontradas. 3-4 animais por grupo. Gel representativo de experimentos de Western Blot, mostrando 2 bandas para cada grupo experimental. * diferença entre os diferentes tempos de tratamento (1 hora e 24 horas); & diferente em relação ao grupo Controle 1 hora.

6. Discussão

O principal objetivo deste trabalho foi a padronização da técnica de isolamento e cultura de cardiomiócitos adultos, adaptando às condições disponíveis no laboratório. A padronização foi eficiente, uma vez que foi possível obter uma boa proporção de células viáveis, após o isolamento, e esse resultado foi reproduzido para as amostras seguintes. Como descrito por Louch e colaboradores, em 2012, esta é uma técnica dispendiosa e, embora seja realizada há muitos anos, por diversos cientistas, não existe um único método universal usado para produzir uma grande quantidade de células viáveis, e cada local pode precisar fazer ajustes no seu protocolo.

O grande desafio da técnica é a realização de um isolamento eficiente das células, uma vez que diversos fatores, mesmo os mais simples - como a qualidade da água - podem interferir no resultado final. Durante os testes realizados, foram observados diversos destes fatores, como a idade dos animais, sendo que corações de ratos mais velhos (acima de 300g) não resultavam em muitas células viáveis. Uma explicação para isso é o fato de que a concentração de colágeno no miocárdio, principalmente as fibras de colágeno do tipo I, aumenta com a idade (de Souza, 2002). Além disso, os fatores como a qualidade, pH e esterilização da água, bem como a limpeza correta dos equipamentos e instrumentos, e a temperatura das soluções de perfusão (37°C) são essenciais para o procedimento e foi necessário monitorá-los constantemente. O tempo de perfusão com a solução de colagenase do tipo II (Worthington Biochemical) também foi essencial. Louch e colaboradores (2012) descreveram que a escolha da enzima para digestão das fibras de colágeno é determinante para o sucesso do isolamento de cardiomiócitos. A colagenase tipo II da Worthington Biochemical é uma das enzimas mais utilizadas para esse tipo de célula. Entretanto, sua atividade pode variar entre os lotes (Wolska e Solaro, 1996), e, neste estudo, foi preciso reavaliar a concentração e o tempo de perfusão com a colagenase, após a chegada de um novo lote da enzima. Dessa forma, a maior dificuldade do método é ajustar todos os parâmetros e, caso o resultado não seja adequado, encontrar a causa do problema, entre tantos passos do protocolo de isolamento de células musculares cardíacas.

A dose de incubação com H₂O₂, bem como o tempo dessa incubação também foi um fator importante para o trabalho. O objetivo foi criar um ambiente de estresse oxidativo para as células. Dessa forma, foram testadas as doses de 5µM e 10µM, por 10 e 15 minutos de incubação, nos cardiomiócitos adultos isolados. As doses testadas foram baseadas no estudo de Couto e colaboradores, em 2016, no qual células de linhagem H9c2 foram incubadas com 6,66µM de H₂O₂, por 10 minutos. Para produzir o resultado esperado, foi importante aplicar o H₂O₂ numa concentração e tempo que causasse um estresse, caracterizado pela diminuição da viabilidade celular, em relação ao controle. Isso não aconteceu com a dose de 5µM de H₂O₂, com incubação por 10 minutos, pois este grupo não mostrou diferença de viabilidade em relação ao grupo controle. Nos grupos em que as células foram incubadas com 10µM de H₂O₂, por 10 minutos, e com 5µM de H₂O₂, por 15 minutos, houve diferença de viabilidade em relação ao controle. Entretanto, o grupo com maior dose de H₂O₂ (10µM) apresentou viabilidade celular muito reduzida, o que não era o objetivo do experimento. Sendo assim, a dose de 5µM, com incubação de 15 minutos foi a ideal para estabelecimento deste modelo.

Para o tratamento com o SFN, foram testadas as doses de 5µM e 10µM. O tratamento com estas doses de SFN foi testado em células de linhagem H9c2, como descrito no estudo de Fernandes e colaboradores, em 2015, que utilizou a dose de 5µM de SFN. No presente estudo, os cardiomiócitos tratados com 5µM de SFN, tanto em meio previamente incubado com H₂O₂ como em meio sem H₂O₂, não apresentaram diferença significativa de viabilidade celular em relação ao controle. Segundo Angeloni e colaboradores (2009), esta concentração de SFN é próxima à encontrada em plasma de ratos e humanos após a ingestão de uma dose de broto de brócolis. Além disso, o estudo de Visalli e colaboradores (2017) mostrou que 5µM de SFN é a dose na qual obtém-se o máximo benefício deste composto. Segundo os autores, esta dose é o ponto máximo da zona hormética de resposta adaptativa do SFN a agentes estressores e, a partir deste ponto, a curva de resposta benéfica tende a declinar, até chegar a doses consideradas tóxicas para as células (figura 26). A dose de 10µM de SFN, independentemente da presença ou não de H₂O₂ no meio de cultura, entretanto, reduziu a viabilidade celular a valores próximos ao encontrado no grupo incubado apenas com H₂O₂. Isso ocorre devido a uma ação antagônica do SFN,

que, em baixas concentrações (menor que $10\mu\text{M}$), não altera a viabilidade de células, mas, em concentrações maiores, tem ação pró-apoptótica, inclusive sendo utilizado em terapias anticarcinogênicas (Negrette-Guzmán, 2017). No estudo de Li e colaboradores (2010), a dose de $10\mu\text{M}$ de SFN induziu a apoptose de células de câncer de mama, resultando na diminuição da viabilidade das células e na ativação da caspase-3, molécula envolvida na via do processo de apoptose. Outro estudo, utilizando 4 linhagens de células de câncer de mama, mostrou que o SFN inibiu o crescimento e proliferação de todas as linhagens, de uma maneira dose-dependente, onde a dose de $5\mu\text{M}$ teve crescimento próximo ao controle, e as doses de $15\mu\text{M}$ e $25\mu\text{M}$ reduziram consideravelmente o número de células (Pledge-Tracy et al, 2007).

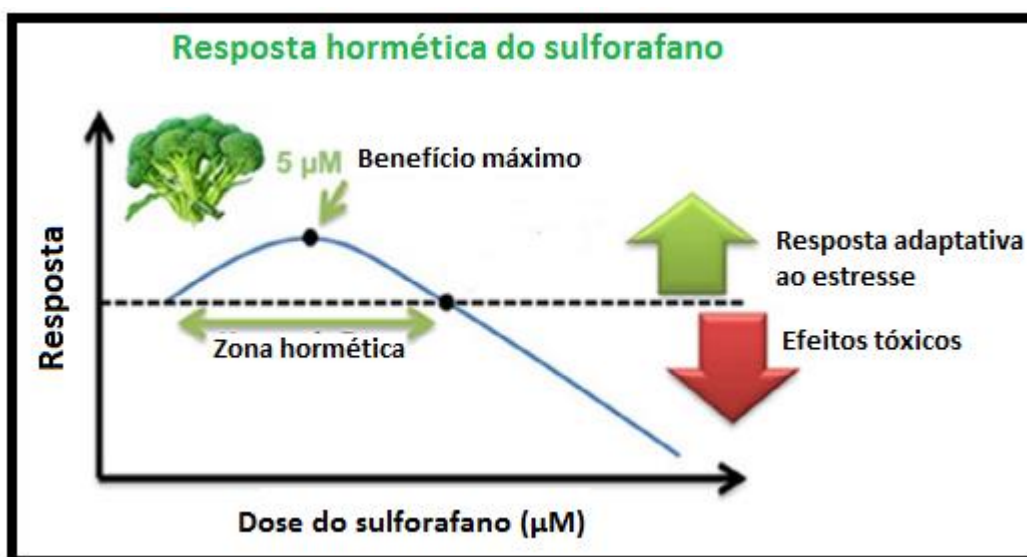


Figura 26. Resposta hormética do SFN ao estado redox oxidante. Curva de resposta em relação à dose do SFN. Adaptado de Visalli et al., 2017.

Após o estabelecimento do modelo experimental e a coleta das amostras, as análises do efeito do SFN nos parâmetros de estresse oxidativo, como o nível de ROS, dano oxidativo a lipídeos e a atividade e expressão de enzimas antioxidantes, em células musculares cardíacas isoladas de ratos adultos, começaram a ser realizadas.

Na análise de níveis totais de espécies reativas de oxigênio e de dano oxidativo a lipídeos, o fator tempo não influenciou no resultado. Nos grupos tratados por 1 hora, apesar de somente o grupo SFN ter sido significativamente menor em relação ao controle, parece haver uma tendência a ter menores níveis

de ROS em ambos os grupos tratados com SFN. Entretanto, mesmo não havendo diferença nos níveis de ROS, o dano oxidativo a lipídeos foi muito maior no grupo H₂O₂ do que nos grupos tratados com SFN. Sabe-se que o H₂O₂ é uma das espécies reativas que, na presença de metais de transição, pode gerar o radical hidroxil. Esse radical livre altamente oxidante é um dos principais iniciadores da peroxidação de lipídeos, sendo o provável causador do aumento desse dano no grupo incubado apenas com H₂O₂ (Kaul et al, 1993). Uma limitação deste estudo foi não haver análise dos níveis de radical hidroxil, a fim de elucidar melhor este resultado. Nessas condições, mesmo na presença do H₂O₂, o SFN apresentou um papel protetor contra o dano oxidativo aos lipídeos, com nível de dano semelhante entre os grupos SFN e SFN+H₂O₂. O fato de não ter havido diferença nos níveis de ROS e de dano a lipídeos nos grupos incubados por 24 horas pode ser explicado devido a uma adaptação das células (por exemplo, através do aumento das defesas antioxidantes), ao desequilíbrio do estado redox causado pelo H₂O₂. Entretanto, o tempo de 1 hora de incubação parece ser insuficiente para que ocorra essa adaptação, elevando os níveis de ROS e de peroxidação lipídica nestes grupos.

Dados da literatura mostram os efeitos dose-dependentes, em concentrações de SFN até 10µM, no aumento da atividade de diversas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a catalase, as enzimas da família das glutathionas, como glutathiona peroxidase, glutathiona redutase e glutathiona s-transferase, e a NADPH quinona oxirredutase (Zhu et al, 2008).

Neste estudo, foi realizada a análise da atividade total da SOD, bem como a expressão proteica de duas isoformas da enzima encontradas em organismos eucariotos (SOD-1 e SOD-2). Tanto a atividade como a expressão proteica da SOD tiveram um efeito dependente do tempo, com aumento destes parâmetros no tempo de 24 horas, em relação à incubação por 1 hora. Estudos apontam para o importante papel do SFN na indução desta enzima (Carrasco-Pozo et al, 2015; Zhu et al, 2008), principalmente no aumento da atividade e expressão da SOD-2 mitocondrial (Cekauskas et al, 2013). Em relação à catalase, o tempo de incubação não parece ser determinante para modificar a atividade desta enzima, ou seja, não houve diferença entre os tempos de 1 e 24 horas. No tempo de 1 hora, entretanto, a atividade da catalase estava reduzida no grupo H₂O₂ em relação ao controle. Sabe-se que o H₂O₂ é metabolizado principalmente pela

ação das enzimas catalase e glutathione peroxidase (GPx). Porém, estudos encontrados na literatura mostram que a GPx possui uma alta afinidade pelo H_2O_2 , ao contrário da catalase, e atua em baixas concentrações de peróxido de hidrogênio. A catalase, por sua vez, é recrutada somente quando há maiores níveis de H_2O_2 , em altas concentrações (Baud et al, 2004). Além disso, parece haver uma maior vulnerabilidade à inativação da catalase decorrente de um aumento agudo nos níveis de H_2O_2 (Baud et al, 2004; Jallali et al, 2005). Sendo assim, o SFN parece ter protegido as células desta inativação. A atividade da glutathione S-transferase também não foi alterada devido ao tempo de incubação. E, além disso, não houve diferença significativa entre os grupos incubados com SFN e os não incubados, diferente do que ocorreu em outros estudos (Zhu et al, 2008; Gao et al, 2010).

É bem descrito na literatura a ação do SFN na indução de enzimas antioxidantes, através da ativação do Nrf2. Dessa forma, a análise da expressão proteica deste fator de transcrição foi realizada. Assim como encontrado por Fernandes e colaboradores (2015), em cardiomioblastos em cultura (células H9c2), não houve diferença na expressão do Nrf2 entre os grupos tratados por 24 horas. No entanto, no presente estudo, quando feita a comparação entre os tempos, houve maiores níveis de expressão proteica de Nrf2 nos grupos tratados por 1 hora, em relação aos grupos tratados por 24 horas. Em 1 hora de incubação, a expressão do Nrf2 no grupo incubado somente com SFN não foi diferente do controle, mas, ao colocar um agente estressor no meio, esse resultado foi diferente. De fato, o SFN, na presença de H_2O_2 , levou a um aumento da expressão proteica do Nrf2, no tempo de 1 hora.

Quando analisada a expressão proteica do PGC-1 α , ao contrário do que ocorreu com o Nrf2, houve aumento da sua expressão no tempo de 24 horas de incubação, em relação aos grupos incubados por 1 hora. O aumento da expressão do PGC-1 α em todos os grupos incubados por 24 horas pode ser explicado devido à diminuição de nutrientes que ocorre com aumento do tempo de incubação em cultura, considerando que não houve troca de meio de cultura nessas 24 horas. Como falado anteriormente neste trabalho, a privação de nutrientes leva à ativação do PGC-1 α , que age sobre a geração de energia nas mitocôndrias. Com 24 horas de incubação, ambos os grupos tratados com SFN apresentaram maior expressão proteica do PGC-1 α , tanto em relação ao

controle, como em relação ao seu grupo afim tratado por 1 hora. Esse resultado é semelhante ao encontrado em células de linhagem H9c2, incubadas com SFN por 24 horas (Fernandes et al, 2015) e células β pancreáticas, incubadas com SFN por 20 horas (Carrasco-Pozo, 2017).

Com base nos resultados encontrados neste estudo, parece haver uma diferença temporal no mecanismo de ação do SFN, em cardiomiócitos adultos. A ação antioxidante via Nrf2 parece ser a primeira linha de defesa do SFN, sendo altamente ativada quando na presença de um forte agente estressor. Entretanto, o SFN sem o estímulo, não foi capaz de aumentar a expressão deste fator de transcrição neste curto tempo e, tão pouco, após 24 horas de incubação. Sendo assim, parece haver um período entre estes tempos onde há maior ativação do Nrf2 pelo SFN. Leoncini e colaboradores (2011) analisaram o efeito da dose de 5 μ M de SFN em cardiomiócitos neonatos, em diferentes tempos. No estudo, foi encontrado um aumento dependente do tempo em relação à ativação do Nrf2 pelo SFN (observada pela ligação do Nrf2 na sequência ARE), com pico no tempo de 12 horas, decaindo após isso, até o tempo de 24 horas.

Por outro lado, a ação do SFN via PGC-1 α parece se dar mais tardiamente. O coativador transcricional PGC-1 α é um dos maiores reguladores do metabolismo energético (Whitman et al, 2013) e, embora já se saiba do seu papel regulador nas vias de equilíbrio redox e em cardiomiócitos (Chen et al, 2010; Patten e Arany, 2012; Birket et al, 2013), a ação do SFN sobre ele ainda é pouco descrita na literatura. Neste estudo, é feita, pela primeira vez, uma comparação temporal da ação do SFN sobre o PGC-1 α , em cultura primária de cardiomiócitos adultos, mostrando que a indução dessa via parece não ocorrer em curtos períodos de tratamento. Estudos apontam que o SFN melhora a resposta antioxidante e a função mitocondrial através da preservação da via da AMPK e da Sirt1, que, por sua vez, aumentam a regulação do PGC-1 α (Zhang et al, 2014; Carrasco-Pozo et al, 2017). Uma perspectiva deste estudo é analisar toda a via de regulação do PGC-1 α e do metabolismo mitocondrial, em cultura de cardiomiócitos adultos, a fim de elucidar melhor como o SFN age nessa via, para preservar função mitocondrial e regular a homeostase redox.

Com base nestes resultados, é possível notar a importância de estabelecer uma linha temporal do mecanismo de ação do SFN, visto que parece haver uma diferença na via de indução das defesas antioxidantes, baseado no tempo. Além

disso, é importante investigar a relação do Nrf2 com o PGC-1 α . Whitman e colaboradores (2013) descrevem que a expressão do PGC-1 α parece ser afetada pelos níveis de Nrf2, sugerindo uma relação entre as duas vias. No presente estudo, essa relação pode ser explicada devido ao tempo, uma vez que a indução do Nrf2 precede a do PGC-1 α . Dessa forma, pode-se considerar se a ação do SFN sobre o PGC-1 α pode ocorrer também através da ativação da via do Nrf2.

7. Conclusão

A cultura primária de cardiomiócitos adultos, apesar de ser uma técnica mais complexa, acaba sendo uma ferramenta muito importante para estudos em fisiologia. A incubação destas células com SFN em diferentes tempos foi importante para entender melhor como ocorre a indução de defesas antioxidantes por este composto. Com base nos resultados apresentados, foi possível observar que o objetivo de induzir uma condição oxidativa para as células foi alcançado, uma vez que houve maior nível de ROS e dano a lipídeos no grupo H₂O₂. O SFN, então, teve ação protetora contra esse dano e contra o aumento dos níveis de ROS, mas não teve efeito sobre as enzimas antioxidantes analisadas. Por outro lado, a ação do SFN foi mais presente na expressão proteica do fator de transcrição Nrf2 e do coativador transcricional PGC-1 α , levando à hipótese de que a atividade das enzimas antioxidantes poderia estar alterada num maior tempo de incubação. Além disso, a diferença de resposta, em relação ao tempo de incubação, na expressão do Nrf2 e do PGC-1 α torna importante a realização de novos estudos para estabelecer essa relação de tempo de indução com SFN e influência do Nrf2 sobre a atividade e expressão do PGC-1 α .

8. Perspectivas

O trabalho apresentado deixou muitas perguntas em relação às vias induzidas pelo SFN. Uma das perspectivas deste trabalho é a avaliação da ativação do Nrf2 pelo SFN, em tempos intermediários em relação aos realizados neste estudo. Além disso, realizar uma investigação mais completa da ação do SFN sobre a via do PGC-1 α e sobre a rota de regulação da atividade mitocondrial seria muito importante, visto que ainda há poucos dados na literatura sobre esta modulação. Por fim, a consolidação da técnica de isolamento e cultivo de cardiomiócitos adultos no laboratório, para que seja uma ferramenta importante para futuras análises em fisiologia cardiovascular.

9. Referências

- AEBI H,. Catalase in vitro. *Meth Enzymol*, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALVES EA, GUIMARÃES ACR. *Cultivo celular*. v. 2, cap. 5, p. 4. 2010.
- 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*. 57(12):5615-22. 2009.
- AOKI S, TAKEZAWA T, SUGIHARA H, TODA S. Progress in cell culture systems for pathological research. *Pathol Int*. 66(10):554-562. 2016.
- ARAUJO AS, RIBEIRO MF, ENZVEILER A, SCHENKEL P, FERNANDES TR, PARTATA WA, IRIGOYEN MC, et al. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrinol*. 249: 133-139. 2006.
- BAEK SH, PARK M, SUH JH, CHOI HS. Protective effects of an extract of young radish (*Raphanus sativus* L) cultivated with sulfur (sulfur-radish extract) and of sulforaphane on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Biosci Biotechnol Biochem*. 72(5):1176-82. 2008.
- BARADARAN A, NASRI H, RAFIEIAN-KOPAEI M. Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *J Res Med Sci*. 19(4):358-67. 2014.
- BAUD O, GREENE AE, LI J, WANG H, VOLPE JJ, ROSENBERG PA. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci*. 18;24(7):1531-40. 2004.
- BIRKET MJ, CASINI S, KOSMIDIS G, ELLIOTT DA, GERENCSEER AA, BAARTSCHEER A, SCHUMACHER C, MASTROBERARDINO PG, ELEFANTY AG, STANLEY EG, MUMMERY CL. PGC-1 α and reactive oxygen species regulate human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte function. *Stem Cell Reports*. 1(6):560-74. 2013.
- BODDUPALLI S, MEIN JR, LAKKANNA S, JAMES DR. Induction of phase 2 antioxidant enzymes by broccoli sulforaphane: perspectives in maintaining the antioxidant activity of vitamins A, C, and E. *Front Genet*. 24;3:7. 2012.
- BONETTO J, FERNANDES R, SEOLIN B, MÜLLER D, TEIXEIRA R, ARAUJO A, VASSALLO D, et al. Sulforaphane improves oxidative status without attenuating the inflammatory response or cardiac impairment induced by ischemia-reperfusion in rats. *ed. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2016.
- BONETTO JHP. Efeitos do sulforafano sobre a função mecânica e parâmetros de estresse oxidativo de corações isolados de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. *Dissertação de mestrado. UFRGS*. 2015.

BRANCO AFR. Impact of H9c2 Cardiomyoblast Differentiation on Isoproterenol Toxicity: Different Modulation of Signaling Pathways. Tese de doutorado. Universidade de Coimbra. 2012.

BRIGELIUS-FLOHE R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad Biol Med.* 27:951–965. 1999.

BRYAN S, YANG G, WANG R, KHAPER N. Cystathionine gamma-lyase-deficient smooth muscle cells exhibit redox imbalance and apoptosis under hypoxic stress conditions. *Exp Clin Cardiol* 16(4):e36–e41. 2011.

CALABRESE EJ, IAVICOLI I, CALABRESE V. Hormesis: its impact on medicine and health. *Hum Exp Toxicol.* 32(2):120-52. 2012.

CARRASCO-POZO C, TAN KN, GOTTELAND M, BORGES K. Sulforaphane Protects against High Cholesterol-Induced Mitochondrial Bioenergetics Impairments, Inflammation, and Oxidative Stress and Preserves Pancreatic β -Cells Function. *Oxid Med Cell Longev.* 2017:3839756. 2017.

CEKAUSKAS A, BRUNS H, MANIKAS M, HERR I, GROSS ML, ZORN M, JANKEVICIUS F, STRUPAS K, SCHEMMER P. Sulforaphane decreases kidney injury after transplantation in rats: role of mitochondrial damage. *Ann Transplant.* 18;18:488-96. 2013.

CHEN M, WANG Y, QU A. PGC-1 alpha accelerates cytosolic Ca²⁺ clearance without disturbing Ca²⁺ homeostasis in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 396(4):894-900. 2010.

CHOI J, CHANDRASEKARAN K, INOUE T, MURAGUNDLA A, RUSSELL JW. PGC-1 α regulation of mitochondrial degeneration in experimental diabetic neuropathy. *Neurobiol Dis.* 64:118-30. 2014.

COSTA VM, CARVALHO F, DUARTE JA, BASTOS MDE L, REMIÃO F. The heart as a target for xenobiotic toxicity: the cardiac susceptibility to oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 16;26(9):1285-311. 2013.

COUTO G. Impacto do pterostilbeno em cardiomioblastos e tecido cardíaco submetidos ao estresse oxidativo. Dissertação de mestrado. UFRGS. 2016.

DE SOUZA RR. Aging of myocardial collagen *Biogerontology.* 3(6):325-35. 2002.

DEAN P., JONES. Redefining Oxidative Stress. *Antiox Redox Signal.* 8:1865–1879. 2006.

DINKOVA-KOSTOVA AT, ABRAMOV AY. The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med.* 88(Pt B):179-88. 2015.

FERNANDES RO, BONETTO JH, BAREGZAY B, DE CASTRO AL, PUUKILA S, FORSYTH H, SCHENKEL PC, LLESUY SF, BRUM IS, ARAUJO AS, KHAPER N, BELLÓ-KLEIN A. Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1 α stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts. *Mol Cell Biochem.* v. 401, p. 61-70, 2015.

FERNANDES RO. DE CASTRO AL, BONETTO JH, ORTIZ VD, MÜLLER DD, CAMPOS-CARRARO C, BARBOSA S, NEVES LT, XAVIER LL, SCHENKEL PC, SINGAL P, KHAPER N, DA ROSA ARAUJO AS, BELLÓ-KLEIN A. Sulforaphane effects on postinfarction cardiac remodeling in rats: modulation of redox-sensitive prosurvival and proapoptotic proteins. *J Nutr Biochem.* 34:106-17. 2016.

FIMOGNARI C, HRELIA P. Sulforaphane as a promising molecule for fighting cancer. *Mutat Res.* 635(2-3):90-104. 2007.

FINCK BN, KELLY DP. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 (PGC-1) Regulatory Cascade in Cardiac Physiology and Disease. *Circulation.* 115:2540-2548. 2007.

FINKEL T, HOLBROOK NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408(6809):239-47. 2000.

FRESHNEY RI. Database of misidentified cell lines *Int J Cancer.* 1;126(1):302. 2010.

FRIDOVICH I. Superoxide radical and sods. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:97–112.

Gao B, Doan A, Hybertson BM. The clinical potential of influencing Nrf2 signaling in degenerative and immunological disorders. *Clin Pharmacol: Adv Applic.* 6:19-34. 2014.

GAO SS, CHEN XY, ZHU RZ, CHOI BM, KIM BR. Sulforaphane induces glutathione S-transferase isozymes which detoxify aflatoxin B(1)-8,9-epoxide in AML 12 cells. *Biofactors.* 36(4):289-96. 2010.

GERHART-HINES Z, RODGERS JT, BARE O, LERIN C, KIM SH, MOSTOSLAVSKY R, ALT FW, WU Z, PUIGSERVER P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *EMBO J.* 26(7):1913-23. 2007.

GONZALEZ-FLECHA B, LLESUY S, BOVERIS A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radic Biol Med* 10: 93–100. 1991.

GRANADO-SERRANO AB, MARTÍN MA, BRAVO L, GOYA L, RAMOS S. Quercetin modulates Nrf2 and glutathione-related defenses in HepG2 cells: Involvement of p38. *Chem Biol Interact.* 195(2):154-64. 2012.

Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Tapia E, Medina Campos ON, SANCHEZ-GONZALEZ DJ, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ CM, ORTIZ-VEGA KM, FRANCO M, PEDRAZA-CHAVERRI J. Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 192(3):278–285. 2010.

GUERRERO-BELTRÁN CE, CALDERÓN-OLIVER M, PEDRAZA-CHAVERRI J, CHIRINO YI. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp Toxicol Pathol.* 64(5):503-8. 2010.

HALLIWELL B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J.* 37(3):99-105. 2014.

HALLIWELL B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol.* 75(3):637-44. 2013.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85. 1990.

HALLIWELL B. Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res.* 18;475(1-2):29-35. 2001.

HARTUNG T, BALLS M, BARDOUILLE C, BLANCK O, COECKE S, GSTRANTHALER G, LEWIS D; ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force. Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. *Altern Lab Anim.* 30(4):407-14. 2002.

HAYES JD, MCMAHON M, CHOWDHRY S, DINKOVA-KOSTOVA AT. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway. *Antioxid Redox Signal.* 13(11):1713-48. 2010.

HOGG N, KALYANARAMAN B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 1411(2-3):378-84. 1999.

HOLMSTRÖM KM, KOSTOV RV, DINKOVA-KOSTOVA AT. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr Opin Toxicol.* 1:80-91. 2016.

HWANG JH, LIM SB. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Broccoli Florets in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. *Prev Nutr Food Sci.* 19(2): 89–97. 2014.

HYOUNG KYU KIM, BERND NILIUS, NARI KIM, KYUNG SOO KO, BYOUNG DOO RHEE, AND JIN HAN. *Cardiac Response to Oxidative Stress Induced by Mitochondrial Dysfunction* Rev Physiol Biochem Pharmacol. Springer International Publishing Switzerland. 2016.

JALLALI N, RIDHA H, THRASIVOULOU C, UNDERWOOD C, BUTLER PE, COWEN T. Vulnerability to ROS-induced cell death in ageing articular cartilage: the role of antioxidant enzyme activity. *Osteoarthritis Cartilage.* 13(7):614-22. 2005.

JUGE N, MITHEN RF, TRAKA M. Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cell Mol Life Sci.* 64(9): 1105-1127. 2007.

KAUL N, SIVESKI-ILISKOVIC N, HILL M, SLEZAK J, SINGAL PK. Free radicals and the heart. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 30(2):55-67. 1993.

KIM G., CHUN Y., PARK J., KIM M. Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia–reperfusion. *Bioch Biophys Res Commun.* 309: 619–624. 2003.

KUSS F. Agentes oxidantes e antioxidantes. *Bioquímica do tecido animal. PPG Ciências Veterinárias. UFRGS.* 2005.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. 1970.

LAU A, WHITMAN SA, JARAMILLO MC, ZHANG DD. Arsenic-mediated activation of the Nrf2-Keap1 antioxidant pathway. *J Biochem Mol Toxicol.* 27(2):99-105. 2012.

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.* 5(2):227-31. 1992.

LEHMAN JJ, BARGER PM, KOVACS A, SAFFITZ JE, MEDEIROS DM, KELLY DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest.* 106:847–856. 2000.

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* 76(7):H175–H181. 2011.

LERIN C, RODGERS JT, KALUME DE, KIM SH, PANDEY A, PUIGSERVER P. GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha. *Cell Metab.* 3(6):429-38. 2006.

LI S, TAN HY, WANG N, ZHANG ZJ, LAO L, WONG CW, FENG Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int J Mol Sci.* 16(11):26087-124. 2015.

LIANG H, WARD WF. PGC-1 α : a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ Publish.* 30(4):145-151. 2006.

LOU H, KAUR K, SHARMA AK, SINGAL PK. Adriamycin-induced oxidative stress, activation of MAP kinases and apoptosis in isolated cardiomyocytes. *Pathophysiology.* 13(2):103-9. 2006.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1): 265–275. 1951.

LUDKE A, SHARMA AK, AKOLKAR G, BAJPAI G, SINGAL PK. Downregulation of vitamin C transporter SVCT-2 in doxorubicin-induced cardiomyocyte injury. *Am J Physiol Cell Physiol.* 303(6):C645-53. 2012.

LUDKE A, SHARMA AK, BAGCHI AK, SINGAL PK. Subcellular basis of vitamin C protection against doxorubicin-induced changes in rat cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem.* 360:215-224. 2012.

MANNERVIK B, GUTHENBERG C. Glutathione transferase. *Methods Enzymol* 77:231–235.1981.

MARKLUND S. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research.* CRC Press, Boca Raton, pp 243–247. 1985.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65(1-2):55-63. 1983.

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.* 22(1-4):271-5. 2004.

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.* 22(1-4):271-5. 2004.

NEGRETTE-GUZMÁN M, 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* 65:1078–1089. 2013.

NEGRETTE-GUZMÁN M, HUERTA-YEPEZ S, VEGA MI, LEÓN-CONTRERAS JC, HERNÁNDEZ-PANDO R, MEDINA-CAMPOS ON, RODRÍGUEZ E, TAPIA E, PEDRAZA-CHAVERRI J. Sulforaphane induces differential modulation of mitochondrial biogenesis and dynamics in normal cells and tumor cells. *Food Chem Toxicol.* 100:90-102. 2017.

NO JH, KIM Y-B, SONG YS. Targeting Nrf2 Signaling to Combat Chemoresistance. *J Cancer Prevent.* 19(2):111-117. 2014.

PARAMESWARAN S, KUMAR S, VERMA RS, SHARMA RK. Cardiomyocyte culture - an update on the in vitro cardiovascular model and future challenges. *Can J Physiol Pharmacol.* 91(12):985-98. 2013.

PATTEN IS, ARANY Z. PGC-1 coactivators in the cardiovascular system. *Trends Endocrinol Metab.* 23(2):90-7. 2011.

PETER AK, BJERKE MA, LEINWAND LA. Biology of the cardiac myocyte in heart disease. *Mol Biol Cell.* 15;27(14):2149-60. 2016.

PLEDGIE-TRACY A, SOBOLEWSKI MD, DAVIDSON NE. Sulforaphane induces cell type-specific apoptosis in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer Ther.* 6(3):1013-21. 2007.

POLJSAK B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2011:194586. 2011.

PUIGSERVER P, SPIEGELMAN BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*. 24(1):78-90. 2003.

RAHBARI R, SHEAHAN T, MODES V, COLLIER P, MACFARLANE C, BADGE RM. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques*. 46(4):277-84. 2009.

SANTILLI F, D'ARDES D, DAVÌ G. Oxidative stress in chronic vascular disease: From prediction to prevention. *Vascul Pharmacol*. 74:23-37. 2015.

SCARPULLA RC, VEGA RB, KELLY DP. Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab*. 23(9):459-66. 2012.

SCARPULLA RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*. 1813(7):1269-78. 2010.

SCHAFFER S, LAM VY, ERNST IM, HUEBBE P, RIMBACH G, HALLIWELL B. Variability in APOE genotype status in human-derived cell lines: a cause for concern in cell culture studies? *Genes Nutr*. 9(1):364. 2013.

SIHUI ZHANG e JEFFREY R. KUHN. Cell isolation and culture WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology [Internet]. Pasadena (CA): WormBook; 2005.

SKULACHEV V.P. Why are mitochondria involved in apoptosis. Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell. *FEBS Letters*. 397: 7–10. 1996.

SMIRNOFF N. L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam Horm*. 61: 241–266. 2001.

TRACHOOTHAM D, LU W, OGASAWARA MA, NILSA RD, HUANG P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*. 10(8):1343-74. 2008.

TURNER T. Development of the polio vaccine: a historical perspective of Tuskegee University's role in mass production and distribution of HeLa cells. *J Health Care Poor Underserved*. 23(4Suppl):5-10. 2012.

VALLE I, ALVAREZ-BARRIENTOS A, ARZA E, LAMAS S, MONSALVE M. PGC-1a regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 66:562 – 573. 2005.

VALLE I, ALVAREZ-BARRIENTOS A, ARZA E, LAMAS S, MONSALVE M. PGC-1alpha regulates the mitochondria antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 66(3):562–573. 2005.

VAN BILSEN M, SMEETS PJ, GILDE AJ, VAN DER VUSSE GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc Res*. 61:218–226. 2004.

VISALLI G, FACCIOLÀ A, BERTUCCIO MP, PICERNO I, DI PIETRO A. In vitro assessment of the indirect antioxidant activity of Sulforaphane in redox imbalance vanadium-induced. *Nat Prod Res*. 8:0. [Epub ahead of print]. 2017.

WANG X, LIU JZ, HU JX, WU H, LI YL, CHEN HL, BAI H, HAI CX. ROS-activated p38 MAPK/ERK-Akt cascade plays a central role in palmitic acid-stimulated hepatocyte proliferation. *Free Radic Biol Med*. 51(2):539-51. 2011.

WHITMAN SA, LONG M, WONDRAK GT, ZHENG H, ZHANG DD. Nrf2 modulates contractile and metabolic properties of skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic atrophy. *Exp Cell Res*. 319(17):2673-83. 2013.

WILLIAM E. LOUCH, KATHERINE A. SHEEHAN, AND BEATA M. WOLSKA. Methods in Cardiomyocyte Isolation, Culture, and Gene Transfer *J Mol Cell Cardiol*. 51(3): 288–298. 2011.

WOLSKA BM, SOLARO RJ. Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry. *Am J Physiol*. 271(3 Pt 2):H1250-5. 1996.

WU Z, PUIGSERVER P, ANDERSSON U, ZHANG C, ADELMANT G, MOOTHA V, TROY A, CINTI S, LOWELL B, SCARPULLA RC, SPIEGELMAN BM. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 98:115–124. 1999.

YANG J., LIU X., BHALLA K., KIM C.N., IBRADO A.M., CAI J.Y. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 275: 1129–1132. 1997.

YANYAN LI, TAO ZHANG, HASAN KORKAYA, SULING LIU, HSIU-FANG LEE, BRYAN NEWMAN, YANKE YU, SHAWN G. CLOUTHIER, STEVEN J. SCHWARTZ, MAX S. WICHA AND DUXIN SUN. Sulforaphane, a Dietary Component of Broccoli/Broccoli Sprouts, Inhibits Breast Cancer Stem Cells *Clin Cancer Res*. 1; 16(9): 2580–2590. 2010.

YU M, GE C, ZENG W, MI Y, ZHANG C. Retinoic acid promotes proliferation of chicken primordial germ cells via activation of PI3K/Akt-mediated NF-κB signalling cascade. *Cell Biol Int*. 36(8):705-12. 2012.

ZHANG Z, WANG S, ZHOU S, YAN X, WANG Y, CHEN J, MELLEN N, et al. 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*. 77: 42-52. 2014.

ZHU H, ZHENQUAN JIA, JEANNINE S. STROBL, MARION EHRICH, HARA P. MISRA, YUNBO LI. Potent Induction of Total Cellular and Mitochondrial Antioxidants and Phase 2 Enzymes by Cruciferous Sulforaphane in Rat Aortic Smooth Muscle Cells:

Cytoprotection Against Oxidative and Electrophilic Stress *Cardiovasc Toxicol.* 8:115–125. 2008.

ZHU H, JIA Z, STROBL JS, EHRICH M, MISRA HP, LI Y. Potent induction of total cellular and mitochondrial antioxidants and phase 2 enzymes by cruciferous sulforaphane in rat aortic smooth muscle cells: cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Cardiovasc Toxicol.* 8(3):115-25. 2008.

ZORATTI M., SZABO I. The mitochondrial permeability transition. *Bioch Biophys Acta.* 1241:139–176. 1995.