

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Jéssica Hellen Poletto Bonetto

**EFEITOS DO SULFORAFANO SOBRE A FUNÇÃO MECÂNICA E PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO DE CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO**

Porto Alegre

2015

Jéssica Hellen Poletto Bonetto

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas Fisiologia

**EFEITOS DO SULFORAFANO SOBRE A FUNÇÃO MECÂNICA E PARÂMETROS
DE ESTRESSE OXIDATIVO DE CORAÇÕES ISOLADOS DE RATOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO**

Orientadora: Professora Doutora Adriane Belló-Klein

Co-orientador: Professor Doutor Paulo Cavalheiro Schenkel

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.

Porto Alegre

2015

“A resposta certa não importa nada: o essencial é que as perguntas estejam certas.”

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS

Gostaria de primeiramente agradecer à minha família – **meus pais Jane e Jorge e minha vó Selvina**- por terem me dado suporte, por entenderem minha ausência, por sempre acreditarem no meu potencial (quando nem eu mesma acreditava) e por terem sempre me incentivado nessa caminhada.

Rafael, obrigada por ser mais que um namorado. Obrigada por ser um super colega, melhor amigo. Obrigada por todos teus ensinamentos no laboratório, pela parceria, pela paciência, pelos conselhos, por estar sempre ao meu lado mesmo de longe. Tu foste essencial para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho e nesta etapa da minha formação.

Agradeço também a toda **família do Rafael**, que me recebem como filha e nos incentivam e valorizam nosso trabalho.

Agradeço a minha orientadora, professora **Adriane Belló-Klein**, por ter me recebido como aluna, ter me confiado um trabalho desafiador e por tudo que me proporcionou nestes dois anos, desde o desenvolvimento do trabalho até oportunidades de viagens e conhecimento de pesquisadores de referência. Professora, a senhora é um grande exemplo para todos nós, não só pela excelente profissional, mas pela pessoa maravilhosa que és.

Ao meu co-orientador, **Paulo Cavalheiro Schenkel**, obrigada pelos ensinamentos no Langendorff, pela paciência, pelos conselhos, pelas discussões de resultados e por se fazer sempre presente mesmo morando em outra cidade.

Ao professor **Alex Sander da Rosa Araújo**, muito obrigada pelas trocas de ideias, ensinamentos, incentivo, compreensão e apoio. Tu és um grande exemplo de pesquisador e amigo.

A todos os colegas do laboratório de Fisiologia Cardiovascular muito obrigada pela ajuda, trocas de ideias e ensinamentos. Agradeço também pela parceria em diversos momentos e pela amizade que construímos, principalmente aos “ociosos”. Em especial gostaria de agradecer a aqueles que tiveram fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho e que “pegaram junto” comigo inclusive em vários finais de semana – **Rafael, Dalvana, Bruna, Rayane**.

Agradeço aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação pela grande contribuição na minha formação.

Aos demais amigos, obrigada pelo apoio, incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

RESUMO

A isquemia seguida de reperfusão está associada com a ativação de uma cascata de eventos danosos intimamente relacionados ao estresse oxidativo. Durante a isquemia, ocorre o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que durante a reperfusão, é favorecida pelo restabelecimento da tensão de oxigênio. Uma vez que a utilização de antioxidantes exógenos parece exercer efeitos benéficos apenas nas fases iniciais das doenças cardiovasculares, o sulforafano (SFN) é uma nova estratégia terapêutica que atua estimulando a produção da maquinaria antioxidante endógena. Este composto é um isotiocianato natural encontrado em vegetais crucíferos, como o broto de brócolis, que demonstra ter um efeito cardioprotetor associado a sua ação estimulatória sobre a reserva antioxidante endógena. Poucos estudos até o momento evidenciaram o potencial cardioprotetor do SFN na isquemia e reperfusão miocárdica. O objetivo deste estudo, portanto, foi testar a hipótese de que o pré-tratamento com SFN poderia modular a função ventricular pós-isquêmica, atenuando o estresse oxidativo de corações isolados de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Ratos Wistar machos pesando entre 250 – 300g foram tratados por três dias com SFN (10mg/kg/dia i.p.) ou veículo. Vinte e quatro horas após a última injeção, os ratos foram mortos e seus corações foram retirados rapidamente e submetidos à isquemia global em aparelho do tipo Langendorff. Os corações foram perfundidos com solução Krebs-Henseleit por um período pré-isquêmico de 20 minutos (estabilização), seguido por isquemia global normotérmica de 20 minutos e 20 minutos de reperfusão. Foram avaliados os seguintes parâmetros: frequência cardíaca (FC), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), índice de contratilidade (+dP/dt), índice de relaxamento (-dP/dt) e pressão de perfusão coronariana (PP). Ao final do protocolo, os corações foram pesados e congelados a -80°C para posteriores análises bioquímicas e moleculares. Foram analisadas a expressão da SOD, CAT, GPx e heme oxigenase-1 (HO-1) e atividade da SOD, CAT, GPx, TrxR, Grx e GST, bem como a produção de EROs totais e lipoperoxidação evidenciada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em homogeneizados dos corações pós isquêmicos. Os resultados deste trabalho mostram que o SFN foi capaz de estimular a

maquinaria antioxidante intracelular através do aumento significativo de 66% da expressão de ambas as enzimas SOD e HO-1. Ainda, foi capaz de diminuir a produção de EROs totais em 7%. Entretanto, não foi capaz de estimular a expressão de enzimas como a CAT e a GPx. As atividades destas enzimas, bem como das enzimas TrxR, Grx e GST também não apresentaram diferença significativa entre os grupos. Não foram encontradas diferenças entre os grupos também na lipoperoxidação. Quanto à mecânica cardíaca, o SFN não foi capaz de modular a função ventricular pós isquêmica no regime de tratamento utilizado.

Como conclusão, o pré tratamento com SFN na dose de 10 mg/kg/dia foi capaz de estimular a expressão de antioxidantes endógenos importantes, tais como a HO-1 e a SOD. Entretanto, o aumento na expressão não repercutiu em suas atividades enzimáticas e, dessa forma, não se observou modificação na função ventricular pós-isquêmica dos corações submetidos à isquemia-reperusão.

Palavras-chave: isquemia-reperusão, mecânica cardíaca, sulforafano, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Ischemia followed by reperfusion activates a cascade of injurious events closely related to oxidative stress. During ischemia, generation of reactive oxygen species increases and even more in reperfusion with the reestablishment of oxygen tension. Once exogenous antioxidants seem to exert beneficial effects only in initial phases of cardiovascular diseases, sulforaphane (SFN) is a new therapeutic strategy which acts stimulating endogenous antioxidant machinery. This compound is a natural occurring isothiocyanate, found in cruciferous vegetables as broccoli sprouts, which demonstrates a cardioprotective capacity associated with its capacity of stimulating the antioxidant endogenous reserve. There are few studies until the moment evidencing the cardioprotective role of SFN on ischemia-reperfusion. The aim of this study was to test the hypothesis that pre-treatment with SFN could modulate the post-ischemic ventricular function, attenuating oxidative stress in isolated hearts submitted to ischemia-reperfusion. Male Wistar rats weighing between 250 – 300g were treated for three days with SFN (10mg/kg/day i.p.) or vehicle. Twenty four hours after the last injection, rats were decapitated and their hearts were rapidly excised and submitted to global ischemia in a Langendorff's apparatus. Hearts were perfused with a Krebs-Henseleit solution for a pre-ischemic period of 20 minutes (stabilization), followed by normotermic global ischemia of 20 minutes and 20 minutes of reperfusion. The following parameters were evaluated: heart rate (HR), left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), contractility index (+dP/dt), relaxation index (-dP/dt) and coronary perfusion pressure (PP). At the end of protocol, hearts were weighed and frozen at -80°C for posterior biochemical and molecular analysis. The expression of SOD, CAT, GPx and heme oxygenase-1 (HO-1) and activity of SOD, CAT, GPx, TrxR, Grx and GST, as well as total reactive oxygen species production and lipid peroxidation evidenced by thiobarbituric reactive substances analysis were performed in homogenates of post-ischemic hearts. The results of the present study show that SFN was capable to stimulate the antioxidant intracellular machinery due to a significant increase of 66% in the expression of both SOD and HO-1 enzymes. Moreover, it was capable to reduce ROS production by about 7%. Although, it was not capable to induce CAT and GPx expression. The activities of these enzymes, as well as TrxR, Grx and GST did not present significant differences between groups.

No differences between groups were found in lipid peroxidation. Regarding to mechanical function, SFN was not capable to modulate post-ischemic ventricular function with the treatment regimen used.

In summary, pre-treatment with 10 mg/kg/day SFN was capable to stimulate the expression of important endogenous antioxidants, such as HO-1 and SOD. However, the increase on the expression did not reflect in its enzymatic activities and, thereby, no modification on post-ischemic ventricular function of the hearts submitted to ischemia-reperfusion was observed.

Keywords: ischemia-reperfusion, mechanical function, sulforaphane, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Redução mono e tetravalente do oxigênio molecular.

Figura 2 - Sistemas Tiorredoxina e Peroxirredoxina.

Figura 3 - Sistema Glutarredoxina.

Figura 4 - Geração de EROs pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

Figura 5 - Esquema mostrando o sistema de perfusão tipo Langendorff.

Figura 6 - Coração isolado canulado em aparelho do tipo Langendorff através da aorta ascendente e com balonete inserido no ventrículo esquerdo.

Figura 7 - Registro típico do sistema Isoheart (*Hugo Sachs Elektronik*).

Figura 8 - Tempo em minutos do protocolo de perfusão do coração isolado.

Figura 9 - Análise temporal da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) nos diferentes períodos de perfusão do coração isolado submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 10 - Análise temporal da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) nos diferentes períodos de perfusão do coração isolado submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 11 - Análise temporal do índice de contratilidade (+dP/dt) nos diferentes períodos de perfusão do coração isolado submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 12 - Análise temporal do índice de relaxamento (-dP/dt) nos diferentes períodos de perfusão do coração isolado submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 13 - Análise temporal da pressão de perfusão coronariana (PP) nos diferentes períodos de perfusão do coração isolado submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 14 - Imunoconteúdo da Cu-Zn Superóxido Dismutase (SOD) (A) e determinação da atividade da SOD total (B) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 15 - Imunoconteúdo (A) e determinação da atividade (B) da catalase (CAT) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 16 - Imunoconteúdo (A) e determinação da atividade (B) da glutationala peroxidase (GPx) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 17 - Determinação da atividade da glutarredoxina (Grx) no homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 18 - Determinação da atividade da enzima tiorredoxina redutase (TrxR) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido a isquemia e reperfusão.

Figura 19 - Determinação da atividade da glutationala S-transferase (GST) no homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 20 - Imunoconteúdo da proteína HO-1 (heme-oxygenase-1) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 21 - Determinação da concentração das espécies reativas totais (EROs) pelo método de emissão de fluorescência pelo 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido a isquemia e reperfusão.

Figura 22 - Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão.

Figura 23 - Fenômenos de contratura isquêmica, hipercontratura e “myocardium stunning” verificados através das oscilações das pressões ventriculares ao longo da perfusão do coração isolado.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Final da estabilização durante a perfusão do coração isolado.

Tabela 2 - Final da reperfusão durante a perfusão do coração isolado.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$O_2^{\cdot-}$	Ânion Superóxido
CAT	Catalase
CTL	Controle
DCV	Doenças Cardiovasculares
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Nrf-2	Fator relacionado ao NF-E2
FC	Frequência Cardíaca
GPx	Glutathione Peroxidase
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
GST	Glutathione S-transferase
HO-1	Heme Oxigenase-1
+dP/dt	Índice de contratilidade
-dP/dt	Índice de relaxamento
PD	Pressão Desenvolvida pelo Ventrículo
PDFVE	Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo
PP	Pressão de Perfusão
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
Prx	Peroxirredoxina
PSVE	Pressão Sistólica do Ventrículo Esquerdo
OH^{\cdot}	Radical Hidroxil
RL	Radicais Livres
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
SFN	Sulforafano
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina Redutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Doenças cardiovasculares	15
1.2 Isquemia e reperfusão miocárdica.....	16
1.3 Envolvimento do estresse oxidativo na isquemia–reperfusão.....	18
1.3.1 Estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidante	18
1.3.2 Fontes de EROs na isquemia-reperfusão	23
1.4 Sulforafano.....	25
2 JUSTIFICATIVA.....	28
2.1 Problema de pesquisa.....	28
2.2 Hipótese	28
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Animais	30
4.2 Grupos experimentais	31
4.3 Sequência experimental	31
4.3.1 Administração do Sulforafano ou Veículo	31
4.3.2 Solução de perfusão	31
4.3.3 Perfusão dos Corações Isolados	32
4.3.4 Critérios de exclusão	35
4.3.5 Protocolo Experimental.....	35
4.4 Homogeneização do tecido cardíaco.....	35
4.5 Quantificação de proteínas.....	36
4.6 Atividade das enzimas antioxidantes.....	37
4.6.1 Superóxido Dismutase (SOD).....	37
4.6.2 Catalase (CAT)	37
4.6.3 Glutathiona Peroxidase (GPx)	38
4.6.4 Glutarredoxina (Grx)	38
4.6.5 Tiorredoxina Redutase (TrxR).....	39
4.6.6 Glutathiona-S-Transferase (GST)	39
4.7 Concentração de espécies reativas totais	39
4.8 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	40

4.9 Expressão de proteínas por Western Blot	40
4.10 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Perfusão do coração isolado	42
5.2 Enzimas antioxidantes.....	47
5.3 Concentração de espécies reativas totais	53
5.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	54
6 DISCUSSÃO.....	55
7 CONCLUSÃO	63
8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO	64
9 PERSPECTIVAS	66
10 REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) compreendem um grupo de doenças de diferentes etiologias que são responsáveis por altas taxas de mortalidade e morbidade. Os indicadores e dados básicos mais atuais são referentes ano de 2011 e apontam que, no Brasil, as DCV representam em torno de 30% da mortalidade total, atingindo mais de 5% de pessoas com 35 anos ou mais (Moura et al., 2012; Ministério da Saúde). Nos últimos anos, as taxas de mortalidade por insuficiência cardíaca vêm decrescendo no país em todas suas grandes regiões geoeconômicas. Em regiões como Centro-oeste, Sul e Sudeste, houve estabilização ou queda da mortalidade por doenças do aparelho circulatório, apresentando forte correlação com redução da mortalidade infantil, elevação do produto interno bruto (PIB) per capita e aumento na escolaridade (Gauí et al., 2014; Soares et al., 2013). Apenas as taxas de mortalidade por doenças isquêmicas agudas elevaram-se nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, principalmente a partir de 2005 (Gauí et al., 2014).

Dentre estas DCV, a doença coronariana aguda é a manifestação mais prevalente (Hamm et al., 2011) e a causa mais comum de insuficiência cardíaca em países desenvolvidos (Lala e Desai, 2014). É uma doença inflamatória crônica complexa, caracterizada pelo remodelamento e estreitamento das artérias coronárias que fornecem oxigênio ao coração. Dessa maneira, reduz-se o fluxo sanguíneo para as regiões subjacentes, levando à isquemia miocárdica e hipóxia tecidual. Tem etiopatogênese complexa, com origem multifatorial influenciada por fatores como a dieta, fumo e atividade física, bem como por fatores genéticos. No caso de aterosclerose, que ocorre em 90% dos casos, há interação de inúmeros tipos de células, como células endoteliais, leucócitos, plaquetas e miócitos, levando à formação de uma placa aterosclerótica primária típica (Sayols-Baixeras et al., 2014). Dentre as manifestações clínicas se encontram isquemia silenciosa, angina estável, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e morte súbita, sendo esta última, principalmente relacionada à aterosclerose (Sayols-Baixeras et al., 2014; Jaskanwal et al., 2014).

Quando ocorre isquemia seguida de reperfusão, os efeitos são complexos e deletérios, e apesar de bem caracterizados, continuam sendo alvos de intenso estudo.

1.2 Isquemia e reperfusão miocárdica

A isquemia seguida de reperfusão está frequentemente associada com a ativação de uma cascata de eventos danosos que podem ocorrer em doenças e situações como, por exemplo, a doença arterial coronariana, cirurgias com circulação extracorpórea e transplante cardíaco (Rodrigo et al., 2013).

Durante a isquemia, ocorre depleção de O_2 e ATP, o que interfere na maquinaria da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, levando ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Ainda, ocorre o remodelamento metabólico, que consiste na troca do metabolismo de ácidos graxos através da beta oxidação pelo metabolismo de carboidratos através de glicólise anaeróbica, o que gera acidose intracelular, resultante do acúmulo de lactato (Cokkinos et al., 2006; Raedschelders et al., 2012). Os cardiomiócitos acabam reestabelecendo sua demanda energética diminuindo a contratilidade; porém a homeostase iônica depende da energia proveniente do ATP, uma vez que a energia potencial utilizada pelos trocadores iônicos depende da atividade das ATPases. Ocorre, portanto a perda da homeostasia iônica. O acúmulo de prótons leva a um aumento na troca Na^+/H^+ por este trocador, gerando um aumento na concentração de Na^+ intracelular, alterando também a atividade do trocador Na^+/Ca^{++} . Há um aumento na expulsão de Na^+ e na captação de Ca^{++} , produzindo dessa forma, juntamente com a acidose miocárdica, modificações no metabolismo do Ca^{++} e, portanto contraturas e arritmias cardíacas (Sanada et al., 2011; Raedschelders et al., 2012; Minamino, 2012).

Apesar de poder salvar o miocárdio após uma longa isquemia, a reperfusão por si, paradoxalmente, induz dano miocárdico (dano por reperfusão) (Minamino, 2012). Ocorre a rápida restauração de substratos essenciais para geração de ATP como glicose, ácidos graxos livres, O_2 e a rápida normalização do pH extracelular, fatores esses, cruciais para prevenção do dano isquêmico e restauração da homeostase celular (Sanada et al., 2011). Entretanto, o reestabelecimento da tensão de O_2 na reperfusão leva a uma super produção de espécies reativas, tanto de oxigênio como de nitrogênio, levando à piora da função cardíaca (Rodrigo et al., 2013). A grande quantidade dessas espécies produzidas na reperfusão excede a capacidade antioxidante endógena, levando ao estresse oxidativo. As EROs reagem com as biomoléculas celulares ativando metaloproteinases da matriz extracelular, enzimas proteolíticas que levam ao prejuízo da função mecânica. Ainda, as EROs

promovem a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, localizado na membrana interna da mitocôndria. Esses eventos podem levar à morte por necrose dependendo do tempo de isquemia (Raedschelders et al., 2012).

O estresse oxidativo em conjunto com a rápida normalização do pH levam à alteração da função das proteínas relacionadas ao metabolismo do Ca^{++} . O aumento na geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) leva à modificação na contratilidade miocárdica decorrente da modificação das concentrações de Ca^{++} (Greensmith et al., 2010). Essa disfunção pós-isquêmica na contratilidade, é conhecida como “stunned myocardium” (miocárdio atordoado), uma disfunção mecânica que persiste no miocárdio reperfundido após uma isquemia reversível (McCord, 1987). Mesmo com uma isquemia reversível, a disfunção contrátil pode persistir por horas, dias e até semanas, mesmo com o reestabelecimento da perfusão normal (Bolli, 1988; Canty Jr. e Suzuki, 2012).

A isquemia é considerada reversível se a reperfusão do tecido for realizada prontamente. A disfunção miocárdica reversível em modelos animais é melhor representada com tempo de isquemia de até 20 minutos (Palmer et al., 2004). Estudos com ratos, utilizando modelos de isquemia-reperfusão do coração isolado, demonstraram os efeitos de diferentes tempos de isquemia sobre a mecânica cardíaca. Palmer et al. (2004) observaram que existe um decréscimo de 15% na contratilidade, 30% de declínio na pressão desenvolvida (PD) e um pequeno aumento na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) no período de 15 a 20 minutos de isquemia. Em contraste, uma isquemia global de 25 a 30 min apresenta depressão severa na função de bomba do ventrículo esquerdo, com uma redução progressiva na recuperação da pressão desenvolvida (PD), no índice de contratilidade (+dP/dt) e na PDFVE. A isquemia com duração maior que 20 – 30 minutos leva a um estado de dano tecidual irreversível, caracterizado como necrose (Rodrigo et al., 2013).

1.3 Envolvimento do estresse oxidativo na isquemia–reperfusão

1.3.1 Estresse oxidativo e sistemas de defesa antioxidante

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

A ação catalítica de enzimas e processos de transferência de elétrons ocorrem normalmente no metabolismo celular e levam à produção de radicais livres (RL) (Kaul et al., 1993). RL é qualquer espécie química (átomo ou molécula) capaz de existir independentemente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados, em qualquer orbital, normalmente no mais externo (Halliwell e Gutteridge, 1999). São, portanto reativos e capazes de iniciar reações em cadeia por extrair um elétron de moléculas próximas e completar seus próprios orbitais (Grieve et al., 2004). Sua interação com moléculas biológicas como aminoácidos, carboidratos, lipídios e DNA pode levar a danos irreversíveis a essas estruturas (Jones, 2008).

O oxigênio molecular apresenta dois elétrons de spins paralelos no seu orbital mais externo, que o torna um RL pouco reativo. Dessa forma, o oxigênio pode receber um elétron e se tornar um forte agente oxidante. Por outro lado, para sua completa redução, deve receber quatro elétrons todos de uma vez, o que ocorre com 95% do oxigênio consumido, envolvendo, portanto, a redução tetravalente do oxigênio. O oxigênio restante (menos que 5%) é reduzido de forma monovalente gerando intermediários altamente reativos conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs) (Kaul et al., 1993).

A redução monovalente do oxigênio molecular leva à formação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este radical possui uma meia vida relativamente curta e limitada capacidade de difusão. Em pH ácido este ânion é protonado na forma de (HO_2^{\bullet}) que é mais tóxica às membranas devido a sua grande lipofilicidade. A enzima superóxido dismutase (SOD) atua dismutando o $O_2^{\bullet-}$ em um não radical, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em mamíferos, existem 3 isoformas da SOD: a mitocondrial que contém Mn (Mn-SOD), a citosólica que contém Cu-Zn (Cu/Zn-SOD) e a extracelular que também contém Cu-Zn (EC-SOD) (Poljsak, 2011).

O H_2O_2 tem meia vida relativamente longa e pode atravessar as membranas celulares e percorrer distâncias consideráveis, causando danos em alvos distantes de sua origem (Kaul et al., 1993). É reduzido pela catalase (CAT) ou por peroxidases, como a glutathiona peroxidase (GPx) (Grieve et al., 2004; Murphy et al., 2011). O que determina qual das enzimas estará mais ativa é a concentração de H_2O_2 e o local. A CAT está presente principalmente nos peroxissomas e age em concentrações nanomolar (nM) de H_2O_2 . Já a GPx atua em concentrações micromolar (μM) de H_2O_2 (Ascensão, 2003). A GPx utiliza a GSH como um agente redutor para levar o H_2O_2 à água, sendo a GSH modificada para sua forma oxidada (GSSG). Na simples presença de metais de transição como Fe^+ e Cu^{++} , o H_2O_2 é reduzido à radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$) e íon hidroxil (OH^-). O $\text{OH}\cdot$ é altamente reativo, com tempo de meia vida muito curto e apresenta limitada capacidade de difusão. Dessa forma, modifica estruturas próximas ao seu sítio de geração, principalmente por abstração de hidrogênios de ligações insaturadas. A adição de um quarto elétron juntamente com um próton leva à formação de H_2O (Kaul et al., 1993). A sequência de reações de redução do oxigênio pode ser melhor visualizada na figura 1.

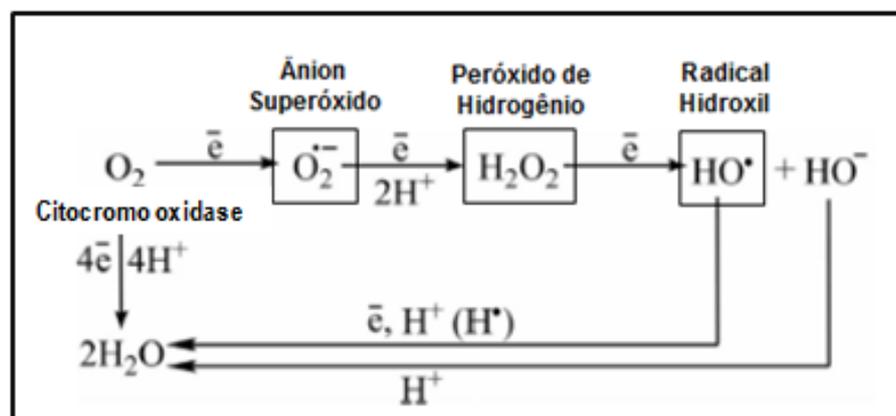


Figura 1: Redução mono e tetravalente do oxigênio molecular. Adaptado de Lushchak, 2014.

Em baixas concentrações, EROs são moléculas de sinalização, porém sua produção excessiva ou anormal leva ao estresse oxidativo (Lee et al., 2012). As maiores fontes intracelulares geradoras de EROs são a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial *in vivo*, as NADPH oxidases (Nox), a xantina oxidase e a óxido nítrico sintase desacoplada (desacoplada-NOS) (Afanas'ev, 2011; Poljsak, 2011).

Em células de mamíferos, existem dois principais sistemas antioxidantes tiol-dependentes, o sistema Trx e o sistema antioxidante glutathiona (GSH).

O sistema tiorredoxina é o principal sistema estresse-induzível que reduz a ligação dissulfeto de diversas proteínas e também as glutathionas oxidadas em grupamentos tióis. Compreende o NADPH, a tiorredoxina redutase (TrxR) e a tiorredoxina (Trx). Juntamente com a GSH, realiza o “tamponamento redox” intracelular. As células de mamíferos possuem dois sistemas Trx, o citosólico (Trx-1) e o mitocondrial (Trx-2). A atividade do sistema Trx é principalmente mostrada através da transferência de elétrons para as peroxirredoxinas (Prxs) entre outras redutases. Além de fornecer elétrons às enzimas antioxidantes, o sistema Trx está envolvido na sinalização redox, regulando diversos fatores de transcrição (Gaté et al., 1999; Lu e Holmgren, 2013). A Trx1 é regulada por hipóxia e por condições oxidativas através da ligação do Nrf-2 (nuclear factor E2-related factor 2) à região promotora no elemento responsivo a antioxidantes do gene da Trx (Hanschmann et al., 2013).

As Prxs são também um grupo de peroxidases que catalisa a redução do H_2O_2 (Golbidi et al., 2012). Até o momento, foram identificadas pelo menos 6 isoformas, distribuídas em várias organelas nas células de mamíferos e atuam com a GPx para reduzir o H_2O_2 localmente e controlando a transdução de sinais. São divididas em três grupos baseados em sua estrutura e mecanismo catalítico: 2-Cys Prx (Prx1–4), a atípica 2-Cys Prx (Prx5) e uma 1-Cys Prx (Prx6). Considerando que o sistema Prx é um dos mais abundantes nas células de mamíferos, este deve ser um sistema chave para remoção de EROs e para a defesa contra o estresse oxidativo (Lu e Holmgren, 2013).

Ambos os sistemas Trx e Prx podem ser observados na figura 2.

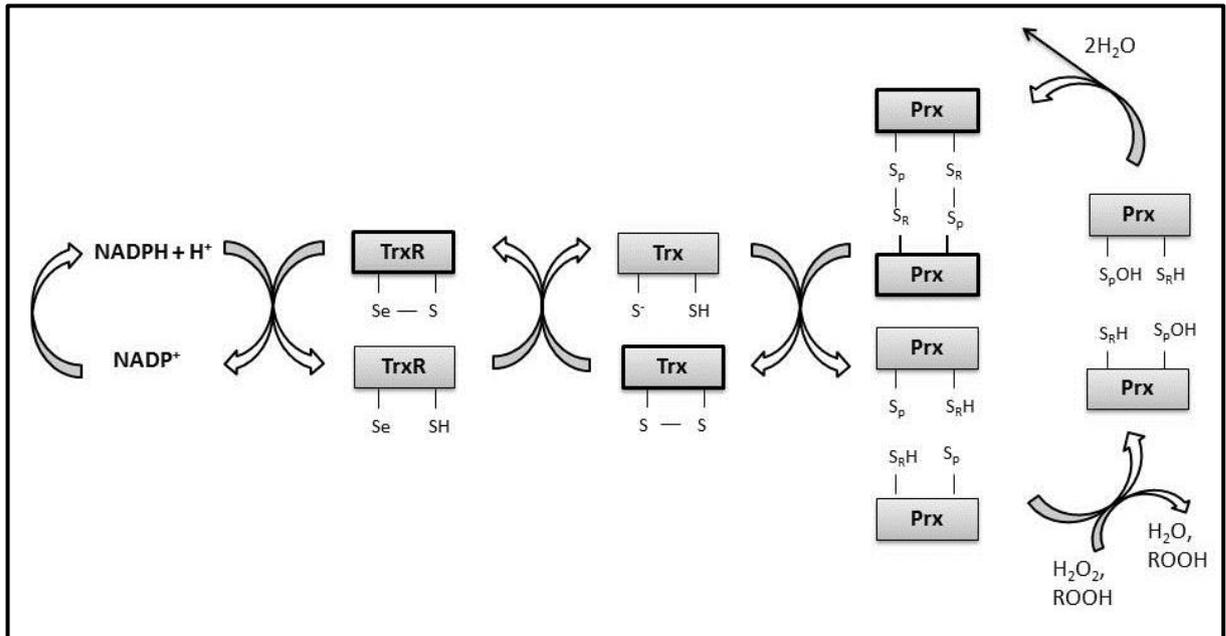


Figura 2: Sistemas Tiorredoxina e Peroxirredoxina. TrxR, Tiorredoxina Redutase; Trx, Tiorredoxina; Prx, Peroxirredoxina. Baseado em Lu e Holmgren, 2014.

O mecanismo de ação do sistema glutarredoxina é similar ao da Trx via Prxs, sendo composto pela glutarredoxina (Grx), glutarredoxina redutase (GrxR) também sendo necessário NADPH e GSH (Gaté et al., 1999). A Grx oxidada é reduzida pelo NADPH via glutathiona redutase (GR) e pela GSH (figura 3). Quatro subtipos foram identificadas em mamíferos: Grx1, Grx2, Grx3 e Grx5 (Hanschmann et al., 2013).

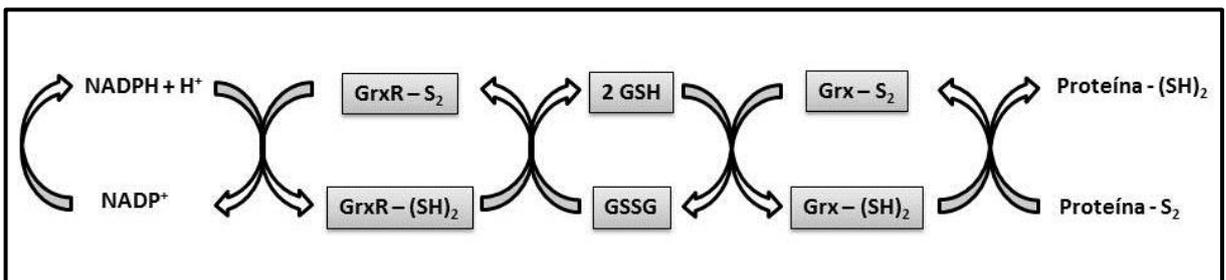


Figura 3: Sistema Glutarredoxina. GrxR, Glutarredoxina Redutase; Grx, Glutarredoxina; GSH, Glutathiona Reduzida; GSSG, Glutathiona Oxidada. Baseado em Gaté et al., 1999.

Além dos antioxidantes enzimáticos clássicos, algumas enzimas podem atuar atenuando o estresse oxidativo, através de sua própria ação ou da ação de seus subprodutos.

A heme oxigenase (HO) tem um papel essencial na regulação dos níveis do grupo heme intracelular, uma vez que catalisa a degradação oxidativa do grupo heme em biliverdina, ferro livre e monóxido de carbono (CO). Através da enzima biliverdina redutase, a biliverdina é rapidamente metabolizada à bilirrubina e o ferro livre é prontamente sequestrado pela ferritina (Paine et al., 2010).

Existem três isoformas da HO; a HO-1, HO-2 e HO-3, sendo apenas as duas primeiras expressas em humanos. A HO-1 é denominada induzível, com baixa expressão basal e sua expressão é estimulada por diversos indutores como metais pesados, citocinas, hipóxia, oxidantes e compostos vaso-ativos (Barbagallo et al., 2013; Kim et al., 2011). A HO-1 também é conhecida como a heat shock protein-32 (HSP-32) (Barbagallo et al., 2013). A isoforma HO-2 é expressa de forma constitutiva e não induzível e está presente em altas concentrações no cérebro e testículos, por exemplo (Paine et al., 2010; Kim et al., 2011).

A HO previne a ação altamente oxidativa do grupo heme, que por sua vez, aumenta a susceptibilidade celular ao dano mediado por oxidantes e à geração de EROs. Ainda, a HO-1 pode ter papel na sinalização intracelular, estimulando a expressão de antioxidantes. A expressão aumentada de ferritina combinada à expressão de HO-1 pode contribuir para uma proteção adicional contra o ferro ferroso liberado durante a quebra do grupo heme (Kim et al., 2011; Lin et al., 2007).

Os subprodutos CO e bilirrubina podem mediar efeitos protetores quando em determinadas concentrações, visto que seu acúmulo causa toxicidade. A biliverdina e a bilirrubina são consideradas potentes antioxidantes, uma vez que podem diretamente tamponar EROs e interagir com o óxido nítrico (NO) e com o peroxinitrito (ONOO⁻). A bilirrubina também apresenta ação potente, suprimindo a ação pró-oxidante da NADPH oxidase (Kim et al., 2011).

Enzimas de detoxificação de fase II têm um papel importante na biotransformação de moléculas, inativando substratos potencialmente danosos, aumentando sua solubilidade e facilitando sua excreção. A maioria dessas enzimas são transferases e entre elas se encontram as glutatona S-transferases (GSTs). As glutatona S-transferases são um grupo de enzimas multifuncionais que catalisam reações de conjugação de glutatona (GSH) com vários grupos de substratos como

metabólitos tóxicos endógenos, compostos químicos exógenos e radicais superóxido, apresentando assim, um importante papel na proteção contra toxicidade e estresse oxidativo. A manutenção da GSH em diferentes compartimentos celulares também é regulada pelas GSTs (Boddupalli et al., 2012; Raza, 2011).

1.3.2 Fontes de EROs na isquemia-reperfusão

As principais fontes de EROs na IR são a xantina oxidase e a mitocôndria, uma vez que o tecido cardíaco é rico em mitocôndrias e há aumento no vazamento de elétrons da cadeia respiratória (McCord 1987; Raedschelders et al., 2012).

Em uma situação de normóxia, quando a cadeia respiratória funciona normalmente, o transporte de elétrons é iniciado através da oxidação do NADH (oriundo do ciclo do ácido tricarboxílico) pelo complexo NADH desidrogenase e resulta na completa redução do oxigênio molecular à água no complexo citocromo oxidase. O ATP é gerado através da energia potencial estocada no gradiente eletroquímico de prótons. Apenas de 1 – 2 % dos elétrons que passam pela cadeia de transporte resultam na produção de ânion superóxido em condições fisiológicas. Devido a esse pequeno vazamento e consequente formação de EROs, se atribui um papel fisiológico para as mesmas como intermediários da sinalização intracelular (Raedschelders et al., 2012).

Durante a isquemia, ocorre um desequilíbrio relacionado aos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, que se encontram predominantemente na forma reduzida. A redução parcial do oxigênio molecular à água é favorecida, uma vez que existe a inibição isquêmica do fluxo de elétrons para além do complexo III e uma diminuição da razão NADH/NAD. Como resultado, há um aumento no estado reduzido e na depleção do citocromo C e um modesto aumento na produção de ânion superóxido (Raedschelders et al., 2012).

Na reperfusão, ocorre a reativação do ciclo do ácido tricarboxílico, reestabelecendo os intermediários do ciclo juntamente com a tensão de O₂. Entretanto, a inibição do fluxo de elétrons para além do complexo III é mantida, aumentando dessa forma a geração de ânion superóxido no complexo III. O bombeamento de prótons nos complexos I e III fracamente reestabelecem a força motora protônica, permitindo assim a síntese de ATP em baixos níveis. As

consequências do dano mitocondrial persistente por abertura do poro de permeabilidade mitocondrial podem ser observadas no trabalho cardíaco, que nem com a normalização da tensão e consumo de oxigênio ou com a normalização do ciclo do ácido cítrico, volta a se recuperar (Raedschelders et al., 2012). O mecanismo de geração de EROs pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial durante a isquemia e na reperfusão podem ser melhor observados na figura 4.

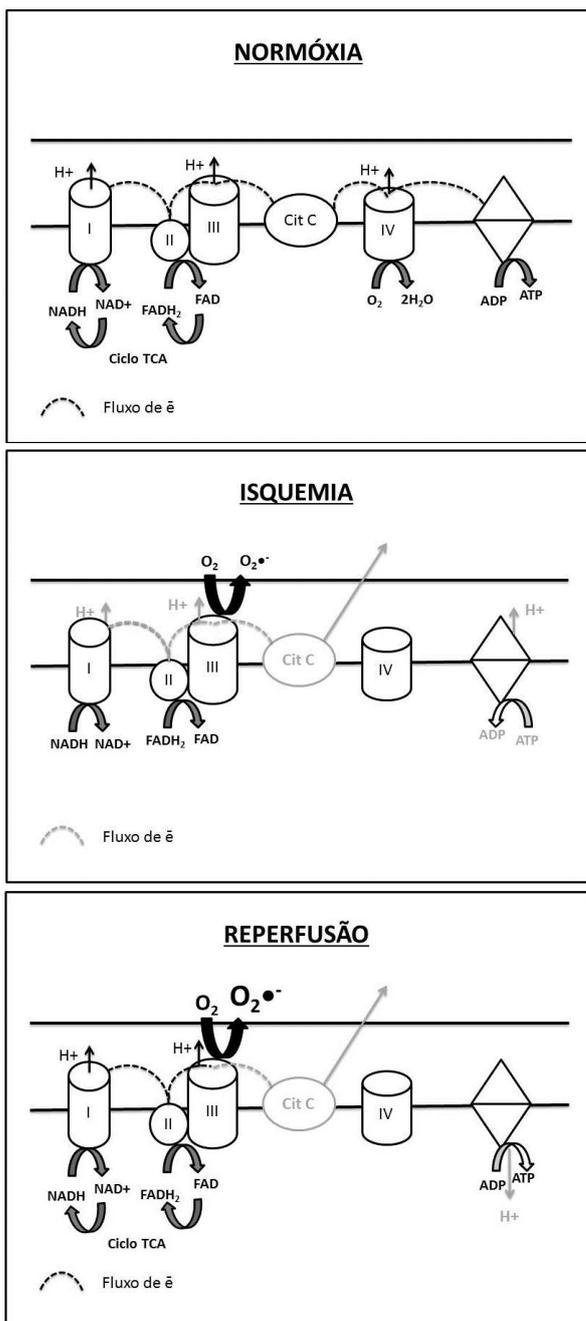


Figura 4: Geração de EROs pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (complexos I, II, III e IV, Citocromo C e ATP sintetase). Fluxo de elétrons normal representado pela cor preta. Fluxo de elétrons diminuído representado pela cor cinza. Baseado em Raedschelders et al., 2012.

A segunda maior fonte de EROs na isquemia-reperfusão é a enzima xantina oxidase. A forma nativa dessa enzima é a xantina desidrogenase, que não atua reduzindo o oxigênio molecular e, dessa maneira, não forma o $O_2^{\bullet-}$. A xantina desidrogenase participa do metabolismo das purinas, catalisando a oxidação da hipoxantina em xantina e desta última em ácido úrico, sendo esta reação acoplada com a redução de NAD à NADH. Os tecidos saudáveis possuem apenas 10% do total da enzima na forma de oxidase. Durante a isquemia, existe uma conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase, através da modificação de um grupo sulfidril ou por clivagem proteolítica. A xantina oxidase ainda é capaz de catalisar a reação da hipoxantina em ácido úrico, mas em acoplamento com a redução parcial do oxigênio molecular (Raedschelders et al., 2012; McCord, 1987).

A fim de atenuar os efeitos da isquemia e reperfusão, muitos compostos, principalmente com ação antioxidante, vêm sendo estudados (Jiang et al., 2014; Hardy et al., 2015). Um destes compostos, o sulforafano, ainda pouco estudado no sistema cardiovascular, é uma estratégia interessante por suas ações como antioxidante indireto.

1.4 Sulforafano

Uma vez que a utilização de antioxidantes exógenos parece exercer efeitos benéficos apenas nas fases iniciais das doenças cardiovasculares, com perda posterior dessa capacidade (Araújo et al. 2006), é interessante que se encontrem alternativas para o tratamento dessas doenças.

Uma alternativa é a utilização de compostos capazes de estimular o organismo a produzir defesas antioxidantes endógenas. Um grupo importante de compostos que têm esta propriedade são os compostos organosulfurados, como os isotiocianatos que ocorrem como glicosinolatos em uma variedade de vegetais crucíferos (Ye et al., 2002). Estudos epidemiológicos inicialmente demonstraram que o consumo de vegetais crucíferos estava associado com uma menor incidência de câncer (Lee, 1989; Mehta, 1995). Posteriormente, descobriu-se que esses efeitos anticarcinogênicos estavam intimamente associados com sua capacidade de induzir enzimas de detoxificação de fase II e inibição de enzimas de fase I, importantes para a ativação dos carcinógenos, como a citocromo P450 (Morimitsu, 2002).

Em estudos com isotiocianatos, o sulforafano (1-isotiocianato-(4R)-(metilsulfenil)butano) foi isolado do brócolis no início dos anos 90 como o maior indutor das enzimas de fase II com propriedades quimioprotetoras *in vivo* (Zhang et al., 1992, 1994). É um composto de fácil acesso à população, encontrado em abundância no broto de brócolis, couve-flor, repolho, agrião, rabanete, mostarda, entre outros vegetais crucíferos do gênero *Brassica* (Guerrero-Beltrán et al., 2012). Quando as células desses vegetais são “danificadas” fisicamente como, por exemplo, no preparo e na mastigação, há a ativação da enzima mirosinase e os glicosinolatos são hidrolisados dando origem aos isotiocianatos (Ye, et al., 2002; Guerrero-Beltrán et al., 2012).

Muitos estudos têm demonstrado que esse composto induz a transcrição de enzimas de fase II e antioxidantes intracelulares através da via Keap1/Nrf-2/ARE. Em situações basais, a Keap1 (Kelch-like ECH association protein 1) sequestra o Nrf-2 (NF-E2-related factor 2), formando um complexo com a Culina 3, uma ligase sinalizadora para degradação proteossomal por ubiquitinação do Nrf-2. O sulforafano (SFN) interage especificamente com resíduos de cisteína da Keap1 levando à dissociação do complexo Keap1/Nrf-2/Cul3. Dessa forma o Nrf-2 fica livre para translocar ao núcleo e se ligar ao ARE (elemento responsivo a antioxidantes) (Guerrero-Beltrán et al., 2012; Hybertson et al., 2011; Boddupalli, 2012).

Com relação ao sistema cardiovascular, um estudo desenvolvido pelo nosso grupo com cardiomioblastos de linhagem mostrou que, em condições normais, o tratamento com SFN foi capaz de estimular a maquinaria antioxidante intracelular, diminuir o dano lipídico além de diminuir a sinalização para morte celular (Fernandes et al., 2015).

Um estudo com ratos tratados com extrato de brócolis por 30 dias por gavagem, que tiveram seus corações isolados e submetidos à isquemia-reperfusão, demonstrou diversos efeitos cardioprotetores (Mukherjee et al., 2008). O efeito cardioprotetor foi evidenciado pela melhora na função ventricular pós-isquêmica associada ao aumento da expressão ou preservação da expressão de Trx-1, Trx-2, TrxR, Grx-1, HO-1, SOD e Nrf-2 entre outras proteínas de sinalização (Mukherjee et al., 2008, 2010).

Piao e cols. (2013) administraram SFN intraperitonealmente em ratos, e demonstraram efeitos protetores através da redução da PDFVE pós-isquêmica, além de um decréscimo nos níveis de LDH durante a reperfusão. Ainda, este estudo

evidenciou a preservação da expressão de alguns antioxidantes endógenos como a catalase, Mn-SOD e HO-1 (Piao et al., 2013).

Visto que o SFN é um composto natural que atua estimulando a reserva antioxidante celular, é interessante que se façam estudos com doses e protocolos de tratamento diversos. Desta forma, os mecanismos e sua ação podem ser explorados e elucidados no intuito de que este composto possa atuar como coadjuvante em doenças como, por exemplo, a doença isquêmica cardíaca.

2 JUSTIFICATIVA

2.1 Problema de pesquisa

Qual o efeito da administração de sulforafano sobre a função mecânica e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo do coração isolado de ratos Wistar no modelo de isquemia-reperusão?

2.2 Hipótese

Baseado nos achados que foram abordados na revisão de literatura, este estudo sugere como hipótese que, através do aumento da reserva antioxidante endógena, o sulforafano administrado previamente ao dano celular cardíaco, atenua o estresse oxidativo e modula a função ventricular de corações isolados de ratos submetidos à isquemia-reperusão.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel do sulforafano na indução da reserva antioxidante endógena, bem como em parâmetros da mecânica cardíaca no coração isolado de ratos após isquemia-reperfusão.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as alterações do tônus coronariano nos ratos tratados com sulforafano ou veículo através da pressão de perfusão (PP) do coração isolado pelo método de Langendorff;
- Avaliar as alterações de pressão intracardíaca (pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), índice de contratilidade (+dP/dt), índice de relaxamento (-dP/dt) e frequência cardíaca (FC) nos grupos experimentais;
- Avaliar temporalmente, ao longo da reperfusão, as variações de pressão intracardíaca (pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), índice de contratilidade (+dP/dt), índice de relaxamento (-dP/dt) e frequência cardíaca (FC) nos grupos experimentais;
- Quantificar a expressão de enzimas antioxidantes endógenas como SOD, CAT, GPx e HO-1 em homogeneizados de tecido cardíaco de ambos os grupos;
- Determinar as atividades enzimáticas da SOD, CAT, GPx, GST, TrxR e Grx em homogeneizados de tecido cardíaco dos diferentes grupos experimentais;
- Verificar as concentrações de espécies reativas do oxigênio (EROs) totais do homogeneizado de tecido cardíaco dos grupos experimentais;
- Medir a lipoperoxidação por TBARS em homogeneizados de tecido cardíaco.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300 g, adquiridos do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório, órgão Auxiliar do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia.

O cálculo do tamanho amostral foi efetuado através do programa *Sigma Plot 11.0*. No cálculo do tamanho da amostra foram considerados, probabilidade de erro $\alpha = 0.05$ e poder do teste estatístico ($1 - \beta$ probabilidade de erro) = 0.90. O n calculado foi de 14 amostras por grupo, totalizando 28 amostras para dois grupos (Maslov *et al.*, 2012). Considerando a estimativa de perda de 30% dos corações no período de estabilização (Schenkel, 2006; Oliveira, 2009), e a necessidade de realização de um projeto piloto experimental com o aparelho Langendorff, foram adicionados 29 animais ao tamanho amostral. O número total de animais utilizados foi de 57 ratos, porém o número final de animais do estudo foi de 25 animais, uma vez que 20 animais foram utilizados em um projeto piloto e os demais foram perdidos durante o período de estabilização ou foram excluídos do estudo, conforme os critérios de exclusão citados mais adiante neste estudo.

Os animais foram aleatoriamente divididos em caixas plásticas de 270 x 260x 310 mm de 3 a 4 animais por caixa. Durante todo o tratamento, os animais tiveram acesso à água e ração comercial (*Nuvilab CR-1 marca Nuvital*) “*ad libitum*”. A temperatura ambiente foi em média 23°C, com controle cíclico de 12 horas de luz/escuridão. Os animais permaneceram 72 horas em ambientação, e após este período o tratamento com o composto sulforafano ou com veículo foi realizado intraperitonealmente, uma vez por dia, durante três dias (Piao *et al.*, 2010).

Os procedimentos experimentais realizados nos animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS (projeto número 24771). Todos os procedimentos experimentais desenvolvidos no presente estudo estiveram de acordo com a Lei 11.794 e as Diretrizes para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA) do CONCEA.

4.2 Grupos experimentais

Para o desenvolvimento do presente estudo, dois grupos experimentais foram estabelecidos:

- **Controle (CTL)** - animais que receberam injeções intraperitoneais de veículo e tiveram seus corações isolados e submetidos à isquemia e reperfusão.
- **Sulforafano (SFN)** - animais que receberam injeções intraperitoneais de sulforafano e tiveram seus corações isolados e submetidos à isquemia e reperfusão.

4.3 Sequência experimental

4.3.1 Administração do Sulforafano ou Veículo

Os animais dos grupos controle e sulforafano (*R,S-Sulforaphane LKT laboratories*) receberam respectivamente injeções via intraperitoneal de veículo (NaCl 0,9% + DMSO 0,5%) ou sulforafano (10 mg/Kg/dia) diluído em DMSO com volume final de administração de no máximo 0,5 mL. As injeções foram administradas por três dias consecutivos antes da perfusão do coração isolado.

4.3.2 Solução de perfusão

A solução utilizada para a perfusão dos corações isolados foi a de Krebs-Henseleit (K-H) modificada, composta por, em mmol/L: NaCl 120; KCl 5,4; CaCl₂ 1,25; MgCl₂ 1,8; NaHCO₃ 27; NaH₂PO₄ 2; Na₂SO₄ 1,8 e glicose 11,1.

Foram preparadas três soluções estoque, com concentração 20 vezes maior do que a utilizada nas perfusões e armazenadas sob refrigeração à 4°C:

- Solução 1: Cloretos (NaCl, KCl, MgCl₂);
- Solução 2: Sódios (NaHCO₃, NaH₂PO₄, Na₂SO₄);
- Solução 3: Cálcio (CaCl₂).

Para obter a solução de perfusão se misturava 50 mL da solução 1; 50 mL da solução 2; 12,5 mL da solução 3; 2 g de D-glicose e água destilada até completar 1 litro. A solução era borbulhada com carbogênio (95% de O₂ – 5% de CO₂) para equilibrar o pH (7,4) e filtrada através de uma membrana de nitrocelulose de 0,45 µm (*Merck Millipore, Alemanha*), com o objetivo de remover qualquer partícula capaz de provocar microembolia no coração.

4.3.3 Perfusão dos Corações Isolados

Os animais foram trazidos ao laboratório do biotério setorial momentos antes de começar a perfusão. Eles foram heparinizados e mortos por decapitação sem anestesia prévia. O sangue troncular foi coletado em tubos tipo Eppendorff com heparina e foram centrifugados a 3000 RPM por 15 minutos em centrífuga refrigerada (*Modelo Mikro 220R, Hettich Zentrifugen*). Aliquotas de plasma e eritrócitos foram armazenadas em tubos tipo Eppendorff a -80°C para posteriores análises.

Os animais tiveram seu tórax aberto com o auxílio de uma tesoura para a retirada do coração, que foi imediatamente fixado à canula do aparelho de perfusão do tipo Langendorff (*Hugo Sachs Elektronik, Alemanha, 1895*), através da artéria aorta ascendente (figura 5).

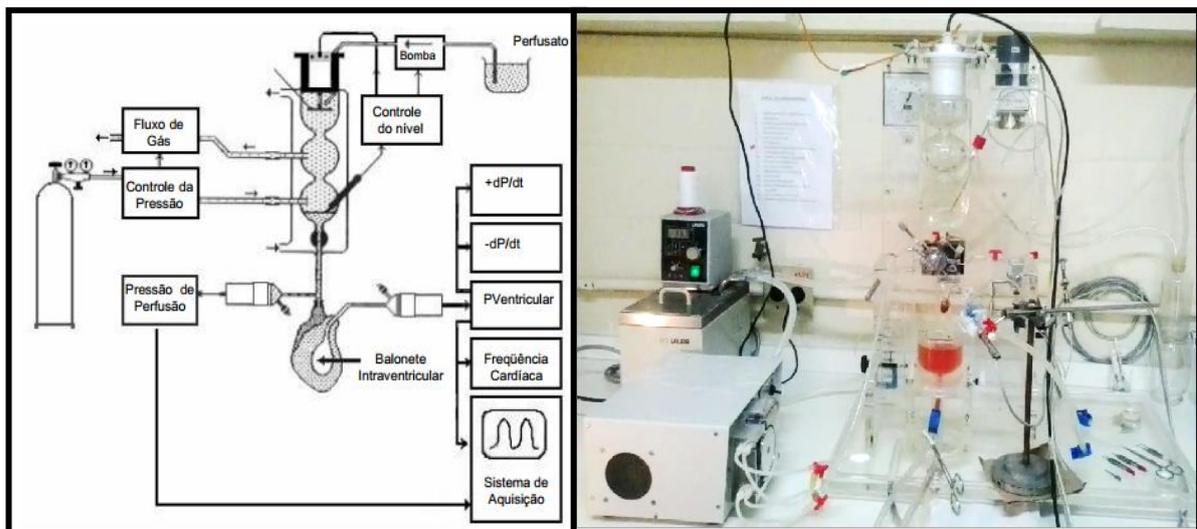


Figura 5: Esquema mostrando o sistema de perfusão Langendorff. Fotografia produzida neste estudo.

A perfusão do coração isolado foi realizada retrogradamente através da aorta com fluxo constante (10 mL/min) mantido por uma bomba peristáltica (*Modelo BP-600.04, Milan*). A retroperfusão aórtica provoca a abertura dos óstios coronários, promovendo a perfusão das artérias coronárias. O átrio direito foi mantido intacto para que a frequência espontânea a partir do nodo sinoatrial fosse utilizada.

A solução foi gaseificada durante todo o procedimento experimental com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) para manter o pH em 7,4. A pressão de carbogênio que chegava ao oxigenador (bulbo de vidro do aparelho perfusor onde a solução era oxigenada) foi controlada por uma válvula Gotlliebe (*Hugo Sachs Elektronik*), registrada no manômetro (*Boso – Alemanha*) do aparelho de perfusão e mantida entre 10 – 15 mmHg. A temperatura da água que circulava ao redor dos compartimentos que continham a solução de perfusão, bem como ao redor da câmara que alojava o líquido no qual os corações ficavam submersos, foi mantida à 37°C durante todo o protocolo experimental por uma bomba circuladora de água com aquecedor e termostato (*Modelo M3 Lauda, Hugo Sachs Elektronik*).

Com o auxílio de uma tesoura, abria-se um orifício pequeno no átrio esquerdo, e, através deste e da valva mitral, um balonete de borracha de látex vulcanizada preenchido com água e conectado a um transdutor de pressão era inserido no ventrículo esquerdo (figura 6). Esse sistema era verificado sempre ao início da perfusão de cada coração, a fim de eliminar a presença de qualquer bolha de ar que pudesse atenuar o sinal mecânico da contração. O volume do balonete intraventricular foi ajustado durante a estabilização com uma seringa equipada com um micrômetro para proporcionar uma pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) em torno de 10 mmHg. Esse ajuste era realizado somente durante o período de estabilização.



Figura 6: Coração isolado canulado em aparelho do tipo Langendorff através da aorta ascendente e com balonete inserido no ventrículo esquerdo. Fotografia produzida neste estudo.

Os registros foram efetuados através de dois transdutores de pressão (*TPS-2, São Paulo, Brasil*). O transdutor acoplado à cânula aórtica detectou as variações de pressão de perfusão coronariana média (PP). Através do outro transdutor, acoplado ao balonete intraventricular, detectou-se as variações de frequência cardíaca (FC), pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), os índices de contratilidade (+dP/dt) e de relaxamento (-dP/dt) e, a partir destes dados, pôde ser calculada a pressão desenvolvida ($PD = PSVE - PDFVE$). Os sinais emitidos pelos transdutores foram amplificados e registrados por um sistema de aquisição e análise de dados (*Isoheart, Hugo Sachs Elektronik, Alemanha*). A taxa de amostragem do sistema era de 2 kHz (figura 7).

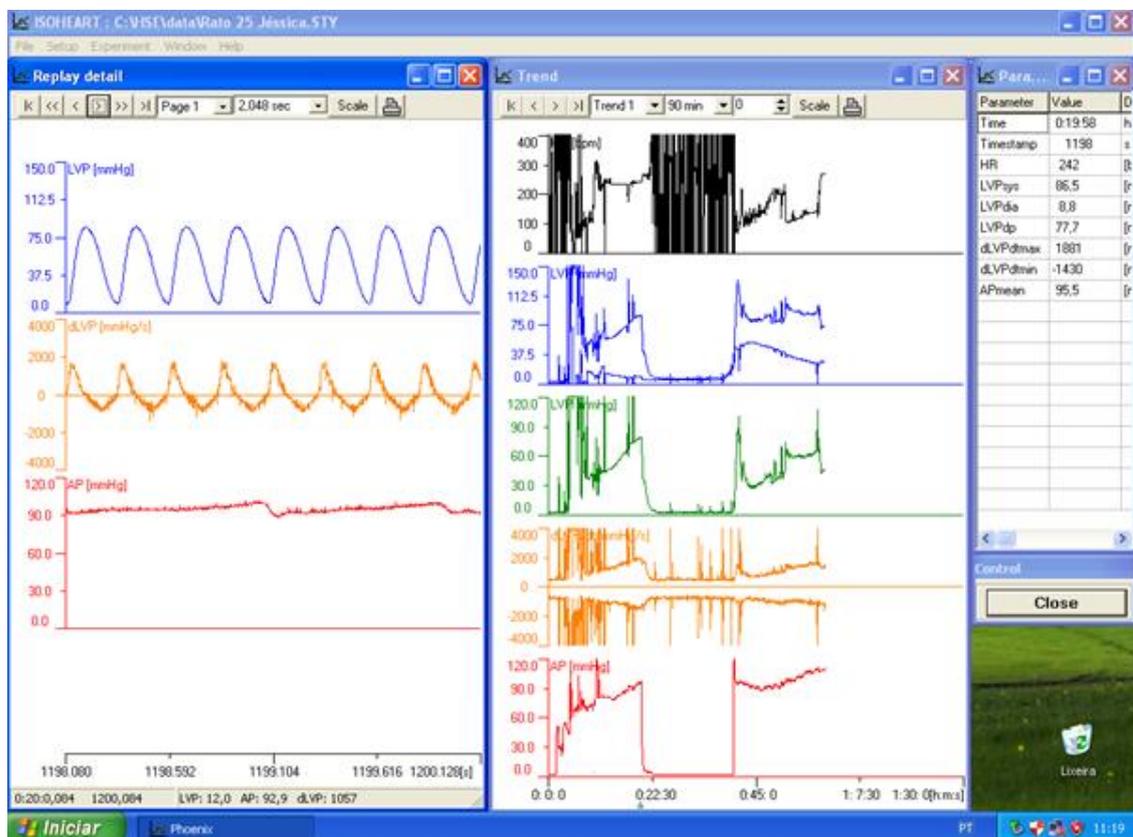


Figura 7: Registro típico do sistema Isoheart (*Hugo Sachs Elektronik*). Variação em tempo real e temporal incluindo os períodos de estabilização (20 min), isquemia (20 min) e reperfusão (20 min) da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), os índices de contratilidade (+dP/dt) e de relaxamento (-dP/dt), pressão de perfusão coronariana média (PP), frequência cardíaca (FC) e pressão desenvolvida (PD).

4.3.4 Critérios de exclusão

Com o objetivo de assegurar o funcionamento mais próximo do fisiológico, os corações que não apresentaram PP de 60 à 100 mmHg, PSVE de 60 à 100 mmHg e FC de 200 à 300 bpm ao final da estabilização, foram considerados inadequados e foram excluídos do estudo.

4.3.5 Protocolo Experimental

Os animais de ambos os grupos tiveram seus corações perfundidos com a solução de K-H modificada por um período de estabilização de 20 minutos (com PDFVE controlada de aproximadamente 10 mmHg), seguido pelo desligamento da bomba perfusora para geração de isquemia global normotérmica por 20 minutos. Em seguida os corações foram reperfundidos por um período de 20 minutos (figura 8) (Schenkel, 2006; Palmer *et al.*, 2004).

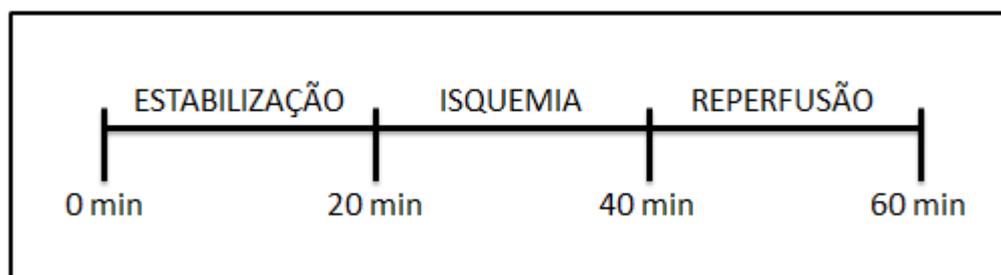


Figura 8: Tempo em minutos do protocolo de perfusão do coração isolado

Ao término do protocolo de perfusão, cada coração isolado foi retirado da cânula, teve seus átrios removidos rapidamente e foi fatiado transversalmente em 4 porções. Estas últimas foram pesadas e armazenadas em tubos tipo Eppendorff e congeladas em nitrogênio líquido, para posteriormente serem armazenadas à -80°C.

4.4 Homogeneização do tecido cardíaco

Para a realização das análises de estresse oxidativo, as fatias de coração foram homogeneizadas durante 40 segundos em Ultra-turrax com KCl 1,15% (5 mL por grama de tecido) e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) na concentração de

100 mmol/L em isopropanol (10µL por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases que impede a degradação das enzimas cuja atividade foi determinada. Em seguida os homogeneizados foram centrifugados por 20 minutos a 3000 rpm em centrífuga refrigerada à 4°C (*Modelo Mikro 220R, Hettich Zentrifugen*) e os sobrenadantes foram separados em tubos tipo Eppendorff e congelados em freezer -80°C para posteriores análises (Llesuy et al., 1985).

Para a realização das análises por western blot, as fatias de coração foram homogeneizadas por 40 segundos em Ultra-turrax, utilizando PMSF 100 mmol/L e Cell-lysis buffer ou tampão PIK (NaCl 150 mM, TRIS 20mM, EDTA 5 mM, Glicerol 10%, NP40 1%). Os homogeneizados foram centrifugados a 8000 g por 10 minutos em centrífuga refrigerada à 4°C (*Modelo Mikro 220R, Hettich Zentrifugen*) e os sobrenadantes foram separados em tubos tipo Eppendorff.

4.5 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. Reagentes utilizados: Reativo de Folin Ciocalteau, diluído em água destilada na proporção 1:3, e Reativo C, que é composto por 50 mL do reativo A, 0,5 mL do reativo B1 e 0,5 mL do reativo B2, onde os reativos A, B1 e B2 são, respectivamente:

- NaHCO₃ (bicarbonato de sódio) 2% (p/v) em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1 N;
- CuSO₄.5H₂O (sulfato de cobre) 1% (p/v);
- KNaC₄H₄O₆.4H₂O (tartarato de sódio e potássio) 2% (p/v).

Em tubos de ensaio, foram adicionados a amostra, água destilada e reativo C preparado a fresco. Após 10 minutos, adicionou-se o reativo de Folin Ciocalteau. Após 30 minutos, a leitura foi efetuada em espectrofotômetro de placa (*Anthos Zenyth, 200rt*) a 625 nm. Um cálculo foi realizado utilizando um fator de correção médio obtido através da curva de calibração com a solução padrão de albumina bovina e os resultados expressos em mg de proteína/mL.

4.6 Atividade das enzimas antioxidantes

4.6.1 Superóxido Dismutase (SOD)

A superóxido dismutase catalisa a reação de dois ânions superóxido, com a consequente formação de peróxido de hidrogênio. A técnica utilizada neste trabalho para determinação da SOD foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra em estudo compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado.

Os reagentes utilizados para a realização da técnica foram: solução tampão (Tris-base 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L, pH 8,2), solução de catalase (30 μ mol/L), volumes adequados das soluções de SOD e pirogalol 24 mmol/L (em ácido clorídrico a 10 mM), obtendo-se as concentrações desejadas.

Primeiramente, foi feita uma curva padrão utilizando as concentrações de 0; 0,25; 0,5 e 1 unidade de SOD (*Sigma Chemical Co., St Louis, MO*), através da qual pode ser obtido o fator de correção para converter a percentagem de inibição da autooxidação em unidades de enzima.

No ensaio, a oxidação máxima do pirogalol foi determinada, possibilitando assim calcular a percentagem de inibição causada pela SOD das amostras. A reação leva à formação de um produto de cor detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da enzima foi expressa em U SOD/mg de proteína (Marklund, 1985).

4.6.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma hemoproteína que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água. Desta forma, o consumo de H₂O₂ pode ser utilizado como uma medida de atividade da enzima CAT. O ensaio consiste em medir a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, comprimento de onda onde há maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Utilizam-se cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda no qual as medidas são realizadas.

Para a realização das medidas utilizou-se uma solução tampão de fosfatos de sódio a 50 mM em pH 7,4 e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L. Os resultados foram expressos em pmoles/mg de proteína (Aebi, 1985).

4.6.3 Glutathione Peroxidase (GPx)

A GPx catalisa a reação de hidroperóxidos com glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Dessa forma, a atividade da enzima pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx.

A amostra foi preparada adicionando-se uma mistura de cianetos (cianeto de potássio - KCN - 9 mmol/L e ferrocianeto de potássio - $K_3[Fe(CN)_6]$ - 0,9 mmol/L) para inibir a atividade pseudo-peroxidase da hemoglobina, a fim de que esta não interferisse no ensaio.

Os reagentes utilizados foram tampão de fosfato 143 mmol/L e EDTA 1 mmol/L (pH 7,5), NADPH (0,24 mmol/L), azida sódica (1 mmol/L) para inibir a atividade da catalase, GSH (5 mmol/L), glutathione redutase (GR) 0,25 U/mL e hidroperóxido de tert-butila (0,5 mmol/L). Os resultados foram expressos em nmoles/min/mg de proteína (Flohé e Gunzler, 1984).

4.6.4 Glutarredoxina (Grx)

As Grx usam a energia redutora da glutathione (GSH) para catalisar reduções de dissulfetos mistos entre um resíduo de cisteína protéico e uma glutathione, além de catalisar a formação de dissulfetos mistos, um processo conhecido como glutathionilação.

Para avaliar a atividade da glutarredoxina utilizou-se o protocolo estabelecido por Holmgren e Åslund (1995). À glutathione reduzida (1 μ M) foi adicionado o hidroximetildissulfeto (HED, 15 mM) em 100 mM de tampão Tris/HCL (pH 7,8) contendo 1 mM de EDTA e albumina (0,1 mg/mL).

A quantidade de GSSG produzida foi medida a partir da adição de NADPH (0,2 mM) e glutathione redutase de levedura (6 μ g/mL) a 340 nm. A atividade foi expressa em mmol/mg de proteína (Holmgren & Åslund, 1995).

4.6.5 Tiorredoxina Redutase (TrxR)

A função antioxidante da TrxR está associada à sua propriedade de reduzir diretamente o H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos e indiretamente por fornecer Trx reduzida como doador de elétrons para as enzimas peroxirredoxinas (Prxs), as quais atuam na remoção de peróxidos.

A atividade da TrxR foi determinada a partir da redução do 5'5-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) à TNB. A TrxR ao reagir com o NADPH e com o DTNB, gera um produto de cor amarela, o TNB, que é detectado a 412 nm. Para determinar a atividade da isoforma citosólica da Trx (TrxR-1), utilizou-se uma mistura de reagentes contendo DTNB (25 mg/mL de etanol 99,5%), albumina (20 mg/mL de água destilada), NADPH (40 mg/mL de tampão fosfato), EDTA 0,2 mol/L. Os dados foram expressos em nmol/min/mg proteína (Holmgren and Bjornstedt, 1995).

4.6.6 Glutathione-S-Transferase (GST)

As glutathione transferases são um grupo de enzimas que catalisam reações de conjugação de glutathione (GSH) com vários grupos de substratos, apresentando assim, um importante papel na detoxificação de agentes alquilantes. Todas as transferases são ativas com o composto cloro-dinitro-benzeno (CDNB), sendo a conjugação deste com GSH, utilizada para determinar sua atividade. A formação do composto corado dinitro-fenil-glutathione foi medida espectrofotometricamente a 340 nm (Mannervik e Gluthenberg, 1981).

A atividade da GST foi medida acompanhando-se a reação de formação do DNP-SG A 340 nm em um meio de reação contendo tampão fosfato 0,2 mol/L (pH 6,5), GSH 20 mmol/L, CDNB 20 mmol/L e homogeneizado de tecido cardíaco. Atividade da GST foi expressa em nmoles/minuto/mg proteína.

4.7 Concentração de espécies reativas totais

Para a detecção da formação de espécies reativas totais intracelulares se utilizou o método da oxidação do 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). O DCFH-DA é permeável na célula e, após a sua entrada na mesma, é clivado por

esterases intracelulares à 2',7'- diclorofluoresceína (DCFH). Este fica aprisionado no interior das células e é oxidado à molécula fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) por uma variedade de espécies reativas.

O DCFH-DA é considerado um indicador geral de espécies reativas, reagindo com H_2O_2 , $ONOO^-$, hidroperóxidos lipídicos e em menor extensão com $O_2^{\bullet-}$. Uma vez que o H_2O_2 é um produto secundário do $O_2^{\bullet-}$, a fluorescência a partir do DCF têm sido utilizada para estimar a produção de $O_2^{\bullet-}$.

No ensaio, amostra de homogeneizado cardíaco foram incubados por 30 minutos á 37°C na ausência de luz, com tampão fosfato 20 mM, KCl 140 mM (pH 7,4) e 2',7'-DCFH-DA 100 μ M em uma placa de 96 poços. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de excitação (480 nm) e emissão de (535 nm). Os resultados foram expressos em pmol de DCF formado / mg de proteína (Lebel et al., 1992).

4.8 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

Radicais livres reagem com lipídios de membrana causando lipoperoxidação, com conseqüente formação de malondialdeído. Essa substância aquecida, em presença de ácido tiobarbitúrico (TBA), forma um composto corado que pode ser medido espectrofotometricamente a 532 nm. O meio de reação continha homogeneizado de tecido cardíaco, SDS 8,1%, ácido acético 20% e TBA 0,8% (Buege e Aust, 1978).

4.9 Expressão de proteínas por Western Blot

As proteínas foram quantificadas de acordo com a técnica descrita por (Lowry e cols., 1951) e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína das amostras cardíacas. Trinta microgramas de proteína foram incubados com tampão de Laemmli (Tris 0,5 mol/L; SDS 10%; Glicerol 20%; Azul de bromofenol 0,05%; 2-betamercaptoetanol 6%) à 95°C por 2 minutos e, em seguida, foram expostos à eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membranas PVDF (*Immobilon – P Milipore*) usando tampão contendo Tris base

48 mmol/L, glicina 39 mmol/L, metanol 10%, pH 8,9. As membranas foram então bloqueadas por uma hora em leite desnatado 1% em tampão TBS-tween (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 0,05%). As membranas foram processadas por imunodeteccção, usando-se os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal IgG para SOD-1, CAT, GPx, Heme Oxigenase-1 (HO-1). O GAPDH foi utilizado como como normalizador (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA*). Os anticorpos primários foram detectados usando anticorpos secundários de acordo com a origem dos primários (*Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA e Amersham Pharmacia Biotech do Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil*). As membranas foram expostas a um filme de RX (*Hyperfilm – Amersham, UK*) durante 30-60 segundos utilizando-se um Kit-ECL. Após esse período, o filme foi revelado e fixado. As bandas imurreativas foram quantitativamente analisadas no densitômetro de imagem (*Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences, Europe, IT*) (Laemmli, 1970; Klein, 1995).

4.10 Análise estatística

A análise temporal dos resultados de mecânica cardíaca foi realizada através de ANOVA de medidas repetidas de duas vias, seguida por pós teste de Student-Newman-Keuls (SNK). Na análise temporal, os resultados tiveram distribuição não paramétrica, e dessa forma, para uma melhor visualização, foram expressos como mediana e intervalo interquartil.

Para a análise de resultados de ensaios enzimáticos e expressão proteica se utilizou, no caso de resultados paramétricos, o Teste *t* de Student. Quando os dados tiveram distribuição não paramétrica, as diferenças foram verificadas através do Teste *U* de Mann-Whitney.

Para todas as análises, considerou-se significativa a diferença quando o $P < 0,05$. O Software *Sigma Plot* 12.0 foi utilizado como ferramenta para a análise dos dados.

5 RESULTADOS

5.1 Perfusão do coração isolado

Ao final do período de estabilização, não houve diferença significativa entre os grupos CTL e SFN nos parâmetros aferidos, demonstrando que todos os corações perfundidos tinham função cardiovascular basal semelhante antes da isquemia (tabela 1).

Tabela 1. Final da estabilização. Frequência cardíaca (FC), Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), Índice de contratilidade (+dP/dt), Índice de relaxamento (-dP/dt) e Pressão de perfusão coronariana (PP) entre os diferentes grupos experimentais.

Grupos	FC (bpm)	PSVE (mmHg)	PDFVE (mmHg)	+ dP/dt (mmHg/s)	- dP/dt (mmHg/s)	PP (mmHg)
CTL	239 ± 18	79 ± 12	10 ± 2	2061 ± 675	1717 ± 592	77 ± 10
SFN	239 ± 15	83 ± 13	9 ± 1	1955 ± 206	1604 ± 134	75 ± 10

Valores representam média ± D.P. de 12-13 animais por grupo. CTL = ratos tratados com veículo; SFN = ratos tratados com sulforafano (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

No período final de reperfusão, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros aferidos (tabela 2). O mesmo foi observado durante os períodos iniciais da reperfusão mostrados temporalmente nos próximos gráficos.

Tabela 2. Final da reperfusão. Frequência cardíaca (FC), Pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), Pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), Índice de contratilidade (+dP/dt), Índice de relaxamento (-dP/dt) e Pressão de perfusão coronariana (PP) entre os diferentes grupos experimentais.

Grupos	FC (bpm)	PSVE (mmHg)	PDFVE (mmHg)	+ dP/dt (mmHg/s)	- dP/dt (mmHg/s)	PP (mmHg)
CTL	215 ± 17	99 ± 15	34 ± 19	2105 ± 1493	1690 ± 922	78 ± 8
SFN	207 ± 22	93 ± 8	36 ± 16	2053 ± 1018	1982 ± 1129	79 ± 14

Valores representam média ± D.P. de 12-13 animais por grupo. CTL = ratos tratados com veículo; SFN = ratos tratados com sulforafano (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

Quando analisados temporalmente, os dados apresentam diferenças significativas apenas dentro do mesmo grupo ao longo dos diferentes períodos do protocolo experimental. Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos estudados.

No grupo CTL, a PSVE foi significativamente maior em todos os tempos de reperfusão, em relação ao basal (final da estabilização) (figura 9).

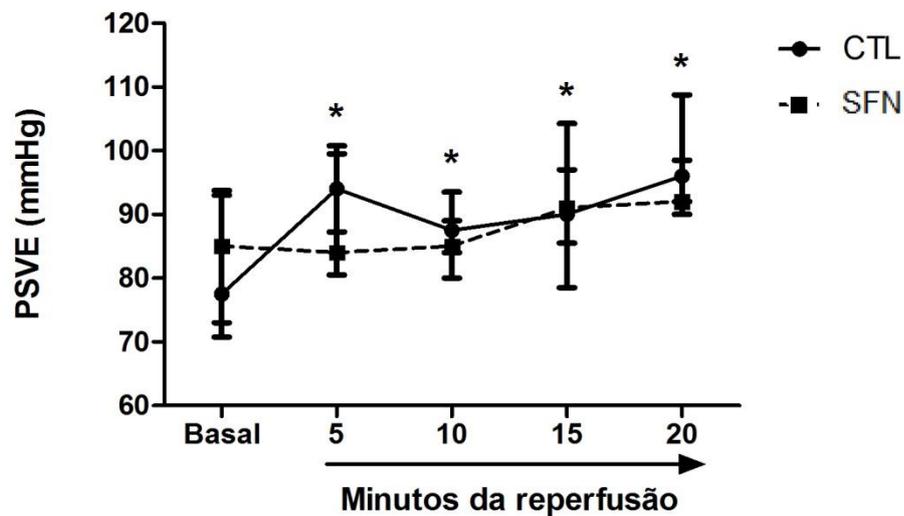


Figura 9: Análise temporal da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) nos diferentes períodos de perfusão do coração isolado submetido à isquemia e reperfusão. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil com 12 e 13 animais por grupo. ANOVA de medidas repetidas de duas vias. Basal, final da estabilização. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com SFN (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

* Diferença significativa vs final da estabilização apenas para o grupo CTL, $P < 0,05$.

Quando analisada temporalmente, a PDFVE apresentou um aumento significativo quando comparados todos os tempos de reperfusão com o basal, para ambos os grupos. Os tempos de 15 e 20 minutos de reperfusão também foram significativamente diferentes dos 5 minutos de reperfusão para ambos os grupos (figura 10).

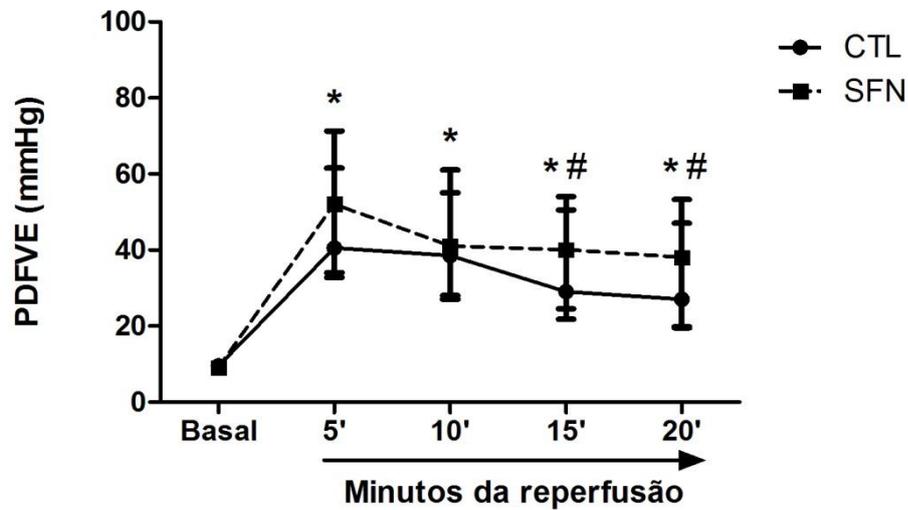


Figura 10: Análise temporal da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) nos diferentes períodos de perfusão do coração isolado submetido à isquemia e reperfusão. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil com 12 e 13 animais por grupo. ANOVA de medidas repetidas de duas vias. Basal, final da estabilização. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com SFN (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

* Diferença significativa vs final da estabilização em ambos os grupos experimentais, $P < 0,05$;

Diferença significativa vs 5 minutos de reperfusão em ambos os grupos experimentais, $P < 0,05$.

Com relação ao índice de contratilidade (+dP/dt), apenas o grupo SFN apresentou uma diminuição significativa nos 5, 10 e 15 minutos de reperfusão em relação ao basal. Ainda, apenas para o grupo SFN, houve um aumento significativo quando comparou-se o tempo de 20 minutos aos 15 minutos de reperfusão. Para ambos os grupos foi encontrado um aumento significativo no índice de contratilidade, quando se comparou os 20 minutos aos 5 e 10 minutos de reperfusão (figura 11). Para ambos os grupos, portanto, houve uma queda no índice de contratilidade durante os primeiros minutos de reperfusão. Entretanto, aos 20 minutos de reperfusão, se observa uma recuperação neste índice com valores próximos ao basal para ambos os grupos experimentais.

O índice de relaxamento foi maior aos 20 minutos de reperfusão, quando comparado a todos os demais tempos, apenas para o grupo SFN (figura 12).

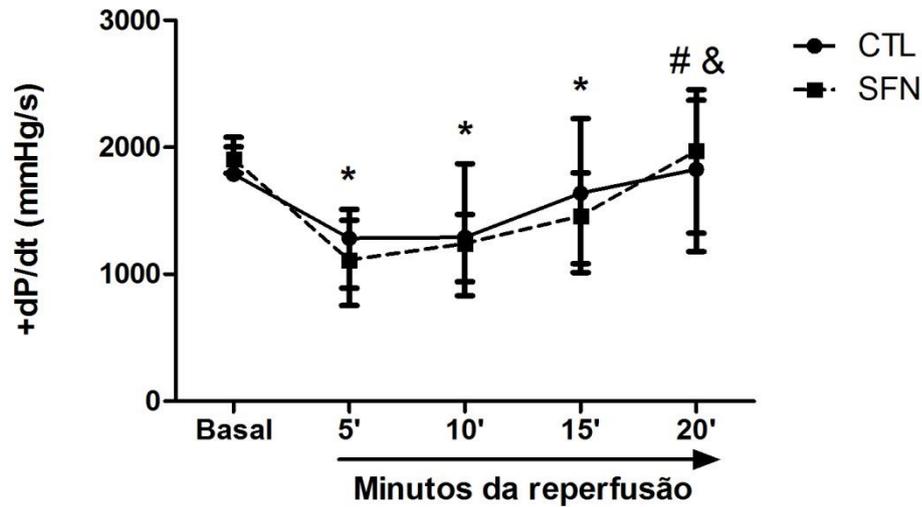


Figura 11: Análise temporal do índice de contratilidade (+dP/dt) nos diferentes períodos de perfusão do coração isolado submetido à isquemia e reperfusão. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil com 12 e 13 animais por grupo. ANOVA de medidas repetidas de duas vias. Basal, final da estabilização. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com SFN (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

* Diferença significativa vs final da estabilização apenas para o grupo SFN, $P < 0,05$;

Diferença significativa vs 5 e 10 minutos de reperfusão para ambos os grupos experimentais, $P < 0,05$;

& Diferença significativa vs 15 minutos de reperfusão apenas para o grupo SFN, $P < 0,05$.

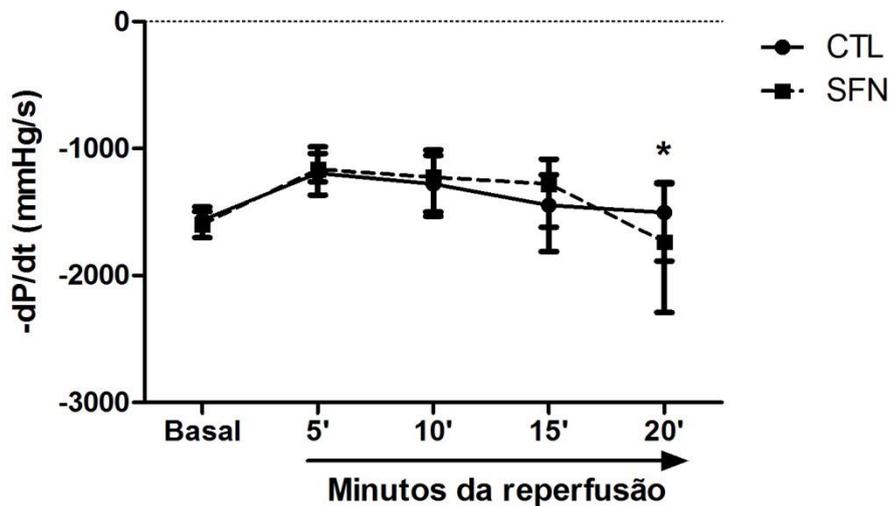


Figura 12: Análise temporal do índice de relaxamento (-dP/dt) nos diferentes períodos de perfusão do coração isolado submetido à isquemia e reperfusão. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil com 12 e 13 animais por grupo. ANOVA de medidas repetidas de duas vias. Basal, final da estabilização. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com SFN (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

* Diferença significativa vs todos os demais tempos, apenas para o grupo SFN, $P < 0,05$.

A pressão de perfusão coronariana média foi significativamente menor em relação ao basal aos 10 minutos de reperfusão para ambos os grupos experimentais. Aos 15 minutos de reperfusão, apenas o grupo CTL apresentou PP significativamente menor quando comparado ao basal. Ainda, aos 10 minutos de reperfusão, o grupo CTL apresentou diferença significativa quando comparado aos 5 minutos de reperfusão. Aos 20 minutos de reperfusão, apenas o grupo SFN apresentou diferença significativa ao ser comparado aos 5 minutos de reperfusão. Ambos os grupos experimentais apresentaram PP significativamente maior quando se comparou os 20 aos 10 e 15 minutos de reperfusão. Em outras palavras, apesar de ambos os grupos terem uma queda na PP e ambos se recuperarem aos 20 minutos de reperfusão, o grupo SFN se apresentou mais estável em relação ao basal (figura 13).

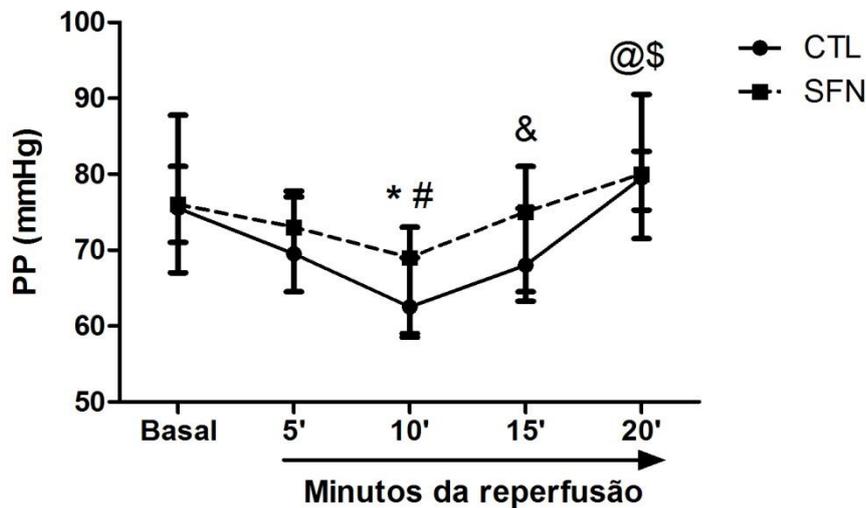


Figura 13: Análise temporal da pressão de perfusão coronariana (PP) nos diferentes períodos de perfusão do coração isolado submetido à isquemia e reperfusão. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil com 12 e 13 animais por grupo. ANOVA de medidas repetidas de duas vias. Basal, final da estabilização. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com SFN (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

* Diferença significativa vs final da estabilização para ambos os grupos experimentais, $P < 0,05$;

Diferença significativa vs 5 minutos de reperfusão apenas para o grupo CTL, $P < 0,05$;

& Diferença significativa vs final da estabilização apenas para o grupo CTL, $P < 0,05$;

@ Diferença significativa vs 5 minutos da reperfusão apenas para o grupo SFN, $P < 0,05$.

\$ Diferença significativa vs 10 e 15 minutos da reperfusão para ambos os grupos experimentais, $P < 0,05$;

5.2 Enzimas antioxidantes

A figura 14 mostra a expressão (A) e a atividade (B) da SOD em corações expostos a 20 minutos de isquemia global, seguidos por 20 minutos de reperfusão. Os corações de ratos tratados com SFN apresentaram significativamente maior expressão da SOD quando comparados aos corações de ratos do grupo CTL (66%). Porém, ao se analisar a atividade desta enzima, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

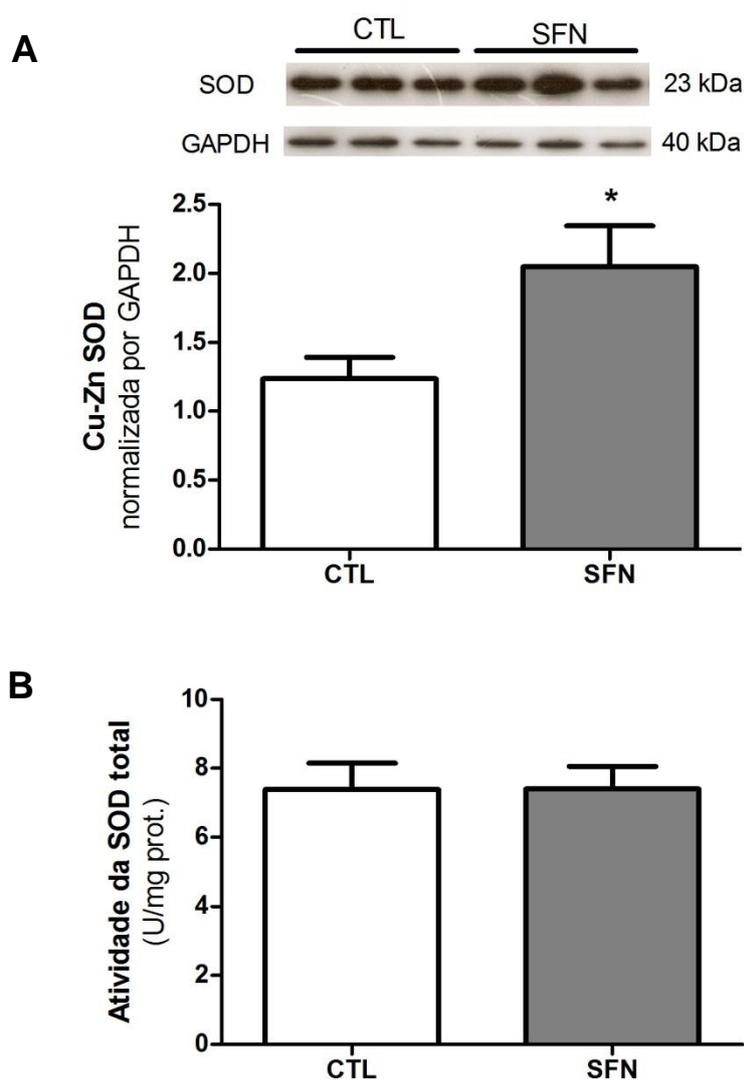


Figura 14: Imunoconteúdo da Cu-Zn Superóxido Dismutase (SOD) (A) e determinação da atividade da SOD total (B) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão. GAPDH foi usado como normalizador. Valores expressos como média \pm D.P. Análises por Western blot: de 4 a 5 animais por grupo (um gel representativo de experimentos por Western blot mostrando 3 bandas para cada grupo experimental). Ensaio de atividade enzimática: 11 a 12 animais por grupo. Teste *t* de Student. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com sulforafano (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

* Diferença significativa vs CTL, $P < 0,05$.

Tanto a expressão proteica quanto a atividade enzimática da CAT em homogeneizados de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão, não apresentaram diferença significativa entre os grupos (figura 15).

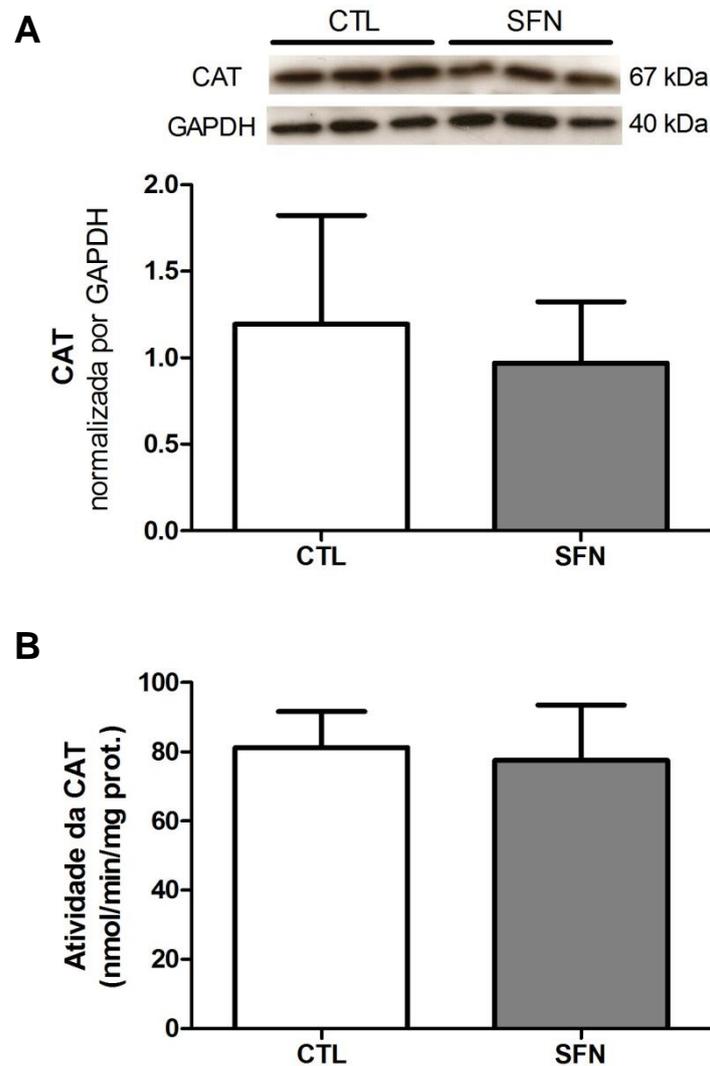


Figura 15: Imunoconteúdo (A) e determinação da atividade (B) da catalase (CAT) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão. GAPDH foi usado como normalizador. Valores expressos como média \pm D.P. Análises por Western blot: de 4 a 5 animais por grupo (um gel representativo de experimentos por Western blot mostrando 3 bandas para cada grupo experimental). Ensaio de atividade enzimática: 11 a 13 animais por grupo. Teste *t* de Student. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com sulforafano (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

Quando se analisou a expressão proteica e atividade da enzima GPx em homogeneizados de tecido cardíaco, não se verificou diferença significativa entre os grupos (figura 16).

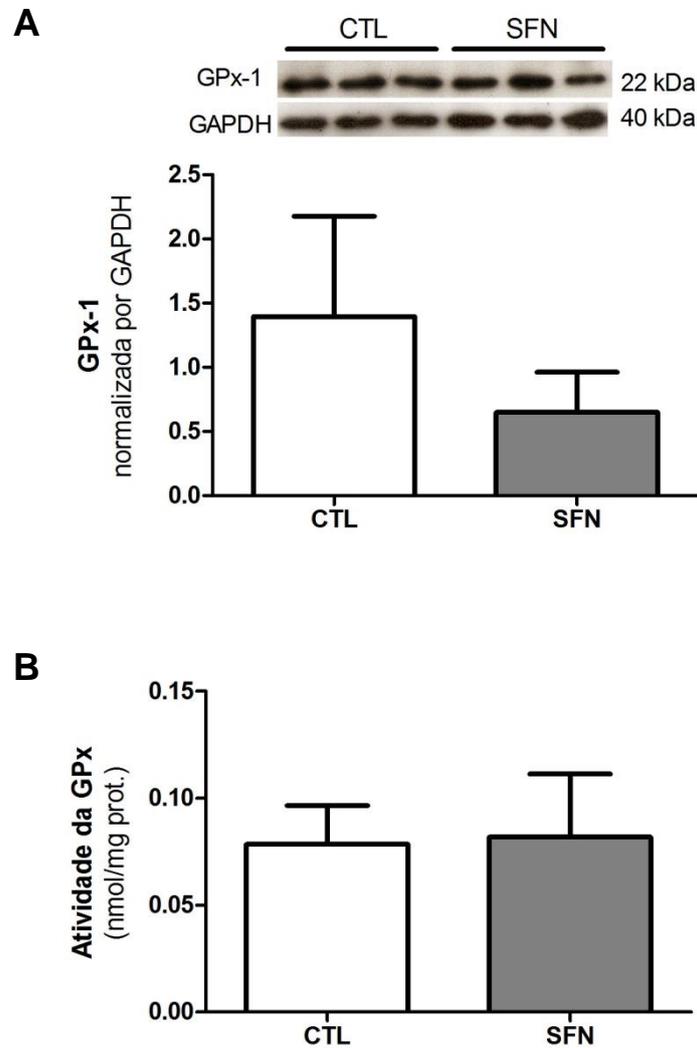


Figura 16: Imunoconteúdo (A) e determinação da atividade (B) da glutathiona peroxidase (GPx) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão. GAPDH foi usado como normalizador. Valores expressos como média \pm D.P. Análises por Western blot: de 4 a 5 animais por grupo (um gel representativo de experimentos por Western blot mostrando 3 bandas para cada grupo experimental). Ensaio de atividade enzimática: 11 a 12 animais por grupo. Teste *t* de Student. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com sulforafano (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

As atividades das enzimas Grx (figura 17) e TrxR (figura 18) em homogeneizados de tecido cardíaco submetido ao protocolo de isquemia e reperfusão, não apresentaram diferença significativa ao se comparar o grupo SFN com o grupo CTL.

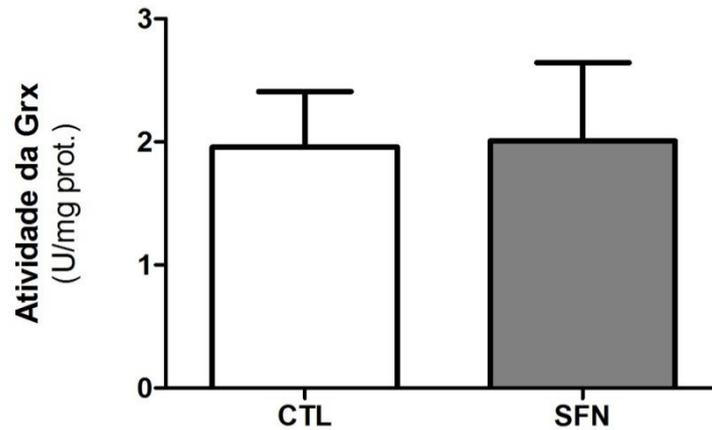


Figura 17: Determinação da atividade da glutarredoxina (Grx) no homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão. Valores expressos como média \pm D.P. com 10 a 12 animais por grupo. Teste *t* de Student. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com sulforafano (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

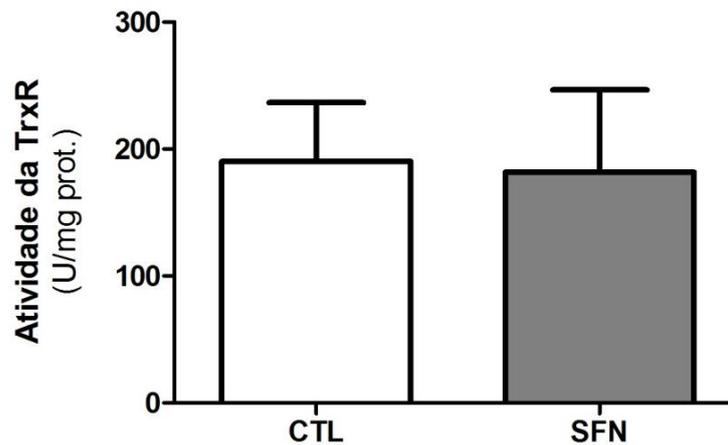


Figura 18: Determinação da atividade da enzima tiorredoxina redutase (TrxR) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido a isquemia e reperfusão. Valores expressos como média \pm D.P. com 8 a 10 animais por grupo. Teste *t* de Student. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com sulforafano (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

A figura 19 representa a atividade da enzima GST do tecido cardíaco pós isquemia e reperfusão. Quando comparado ao grupo CTL, o grupo SFN não apresentou diferença significativa quanto à atividade desta enzima.

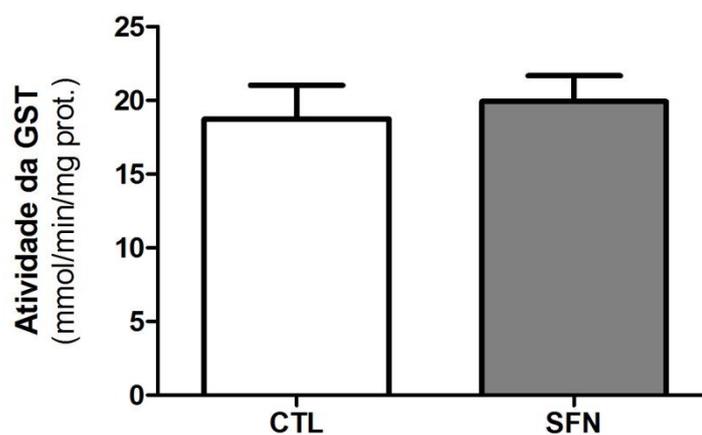


Figura 19: Determinação da atividade da glutathione S-transferase (GST) no homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão. Valores expressos como média \pm D.P. com 7 a 9 animais por grupo. Teste *t* de Student. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com sulforafano (10 mg/Kg/dia).

Com relação à expressão da enzima HO-1, o tratamento com SFN foi capaz de aumentar significativamente a expressão desta proteína em 66% quando comparado ao grupo CTL (figura 20).

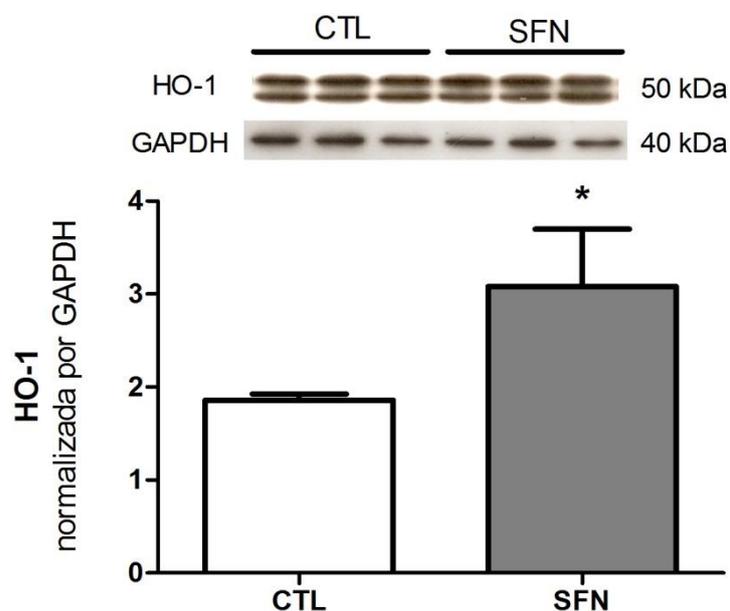


Figura 20: Imunoconteúdo da proteína HO-1 (heme-oxygenase-1) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão. GAPDH foi utilizado como normalizador. Valores expressos como média \pm D.P. com 4 e 5 animais por grupo (um gel representativo de experimentos por Western blot mostrando 3 bandas para cada grupo experimental). Teste *t* de Student. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com sulforafano (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

* Diferença significativa vs CTL, $P < 0,05$.

5.3 Concentração de espécies reativas totais

Com relação à concentração de espécies reativas totais (EROs), o tratamento com SFN foi capaz de reduzir significativamente as mesmas em 7% quando comparado ao tratamento com veículo (CTL) (figura 21).

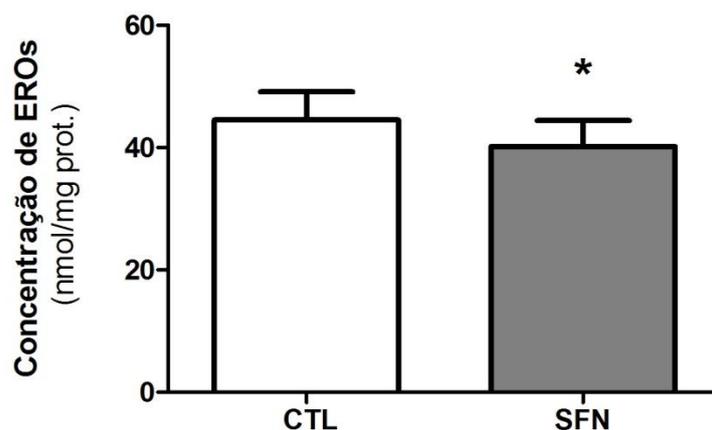


Figura 21: Determinação da concentração das espécies reativas totais (EROs) pelo método de emissão de fluorescência pelo 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido a isquemia e reperfusão. Valores expressos como média \pm D.P. com 11 a 12 animais por grupo. Teste *t* de Student. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com sulforafano (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

* Diferença significativa vs CTL, $P < 0,05$.

5.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS)

Com o regime de tratamento utilizado não foram observadas diferenças significativas com relação ao dano lipídico, representado pelas TBA-RS, quando comparou-se o grupo SFN com o grupo CTL (figura 22).

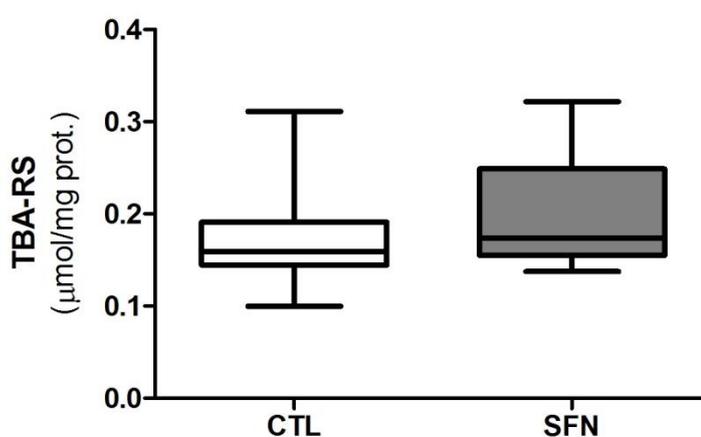


Figura 22: Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em homogeneizado de tecido cardíaco submetido à isquemia e reperfusão. Valores expressos como mediana (P_{25} , P_{75}) com 11 animais por grupo. Teste U de Mann-Whitney. CTL, ratos tratados com veículo; SFN, ratos tratados com sulforafano (10 mg/Kg/dia por 3 dias).

6 DISCUSSÃO

Diferentes métodos experimentais têm sido utilizados com o intuito de estudar os mecanismos e danos causados pela isquemia-reperfusão. O modelo de perfusão do coração isolado, em aparelho do tipo Langendorff, é uma excelente estratégia para o estudo dos efeitos agudos da isquemia-reperfusão sobre a função mecânica do coração. É um modelo *ex vivo*, livre de inervação e de componentes sanguíneos ou fatores humorais circulantes que podem ser considerados fatores de confusão em determinados estudos. Cabe destacar, que as condições experimentais podem ser moduladas conforme o objetivo do pesquisador, como, por exemplo, a utilização de fluxo ou pressão de perfusão constante, determinação da pré-carga ventricular, utilização ou não de frequência fixa, composição do perfusato, utilização de fármacos, entre diversos outros fatores (Cokkinos et al., 2006).

A combinação das condições experimentais é o que determinará o dano miocárdico. A extensão da lesão depende da severidade da isquemia (isquemia de fluxo zero ou fluxo baixo), da duração da isquemia, da sequência temporal da isquemia (curto período seguido por longo período), de mudanças físicas e/ou metabólicas no ambiente (hipotermia, normotermia, conteúdo de glicogênio miocárdico pré-isquêmico, composição do perfusato), do retorno adequado do fluxo coronariano e da resposta inflamatória (Kloner e Jennings, 2001; Cokkinos et al., 2006).

Já está bem estabelecido que um período de 20 minutos de isquemia leva a um estado de dano tecidual reversível, não ocorrendo, portanto, morte tecidual por necrose (Raedschelders et al., 2012). No presente estudo, optou-se por utilizar o tempo de isquemia de 20 minutos, para que dessa forma, fosse possível a observação dos efeitos cardioprotetores do SFN na lesão miocárdica reversível.

O SFN vem sendo estudado desde a década de 1980 devido às suas propriedades quimioterápicas, das quais podem ser destacadas as anti-proliferativas e anti-angiogênicas. Recentemente, estudos têm focado nos efeitos deste composto sobre diferentes órgãos como cérebro, rins e fígado bem como sobre condições patológicas de importância, como a hiperglicemia (Guerrero-Beltrán et al., 2012). Ainda existem poucos estudos utilizando o tratamento com SFN na doença cardiovascular. No que diz respeito à isquemia-reperfusão, um estudo de 2013, utilizando uma dose de SFN de 0,5 mg/kg/dia por 3 dias de tratamento, verificou que

o composto foi capaz de inibir o aumento da PDFVE pós-isquêmica, além de aumentar a PD, o índice de contratilidade e o fluxo coronariano (Piao et al., 2013). No presente estudo, com o regime de tratamento e dose de SFN utilizados, não se observaram melhoras funcionais cardíacas ao final do período de reperfusão estabelecido.

Os estudos de Mukherjee et al. (2008, 2010) demonstram resultados semelhantes aos de Piao e cols (2013) no que diz respeito à função ventricular pós-isquêmica. Cabe destacar, que neste estudo, os ratos foram tratados com extrato de brócolis por um período de 30 dias antes que seus corações fossem submetidos ao protocolo de isquemia e reperfusão. Ainda, os pesquisadores utilizaram um período mais longo de isquemia (30 minutos).

Dependendo da duração e severidade da isquemia, eventos característicos como a contratatura isquêmica, a hipercontratura e o “stunning myocardium” são observados. A figura 23, produzida neste estudo, exemplifica estes fenômenos.

A contratatura isquêmica pode se desenvolver em severos e/ou longos períodos isquêmicos, nos quais a forte interação entre as cabeças de miosina e actina é mantida, visto que ocorre um grande consumo de ATP. Associado a isso, o ADP formado atua aumentando a atividade ATPase miosínica, fomentando ainda mais o consumo do ATP. Em modelos de perfusão do coração, o desenvolvimento de contratatura isquêmica, tem sido correlacionado com o conteúdo de glicogênio miocárdico pré-isquêmico. O tempo para o desenvolvimento de contratatura parece coincidir com o decréscimo na disponibilidade do ATP correspondente à depleção total de glicogênio (Cokkinos et al., 2006).

Um segundo evento característico que ocorre é a hipercontratura. Esta, por sua vez, se desenvolve imediatamente no início da reperfusão. Pode estar relacionada tanto ao acúmulo intracelular de Ca^{++} , decorrente da atividade reversa do trocador Na^+/Ca^{++} , quanto à contratatura isquêmica decorrente dos baixos níveis de ATP. Após 30 a 60 minutos de reperfusão ocorre uma lenta e gradual recuperação na excreção e na recaptção de Ca^{++} pelo retículo sarcoplasmático (Sanada et al., 2011). No caso de isquemias prolongadas, a hipercontratura parece ser a principal causa de necrose tecidual. Ainda, em decorrência da disfunção vascular, a reperfusão pode causar o fenômeno conhecido como “stone heart”, no qual se observa rigidez e palidez miocárdica, resultante da hipercontratura (Cokkinos et al., 2006; Sanada et al., 2011).

Um fenômeno clássico que ocorre tanto após isquemias breves quanto em isquemias severas é o “stunned myocardium”. Este evento pode ser caracterizado como uma disfunção pós-isquêmica prolongada do tecido viável salvo pela reperfusão. Mesmo durante uma isquemia breve, ocorrem anormalidades no tecido que deixa de ser perfundido, uma vez que os miócitos passam a não contrair dentro de alguns segundos. Depois da isquemia, o miocárdio pós-isquêmico, mas ainda viável, leva de horas a dias para recuperar totalmente sua função (Kloner e Jennings, 2001). Existem duas principais hipóteses para explicar este fenômeno: uma relacionada às EROs e outra ao acúmulo de Ca^{++} que ocorre durante a reperfusão (Cokkinos et al., 2006). Estudos prévios realizados pelo nosso grupo demonstraram que o H_2O_2 está relacionado com o desenvolvimento do “stunned heart” (Bianchini e Belló, 1988). A hipótese do Ca^{++} postula que o acúmulo deste íon secundário ao acúmulo de Na^+ , que ocorre no início da reperfusão, pode estar relacionado, ou ainda, que o Ca^{++} pode estar implicado na ativação de proteases Ca^{++} dependentes. As proteases poderiam clivar os miofilamentos contráteis e assim diminuir a responsividade ao Ca^{++} . É interessante o fato de que esse atordoamento do miocárdio pode, ainda, desencadear a expressão de diferentes genes de proteínas relacionadas à citoproteção, sobrevivência e crescimento celular (Cokkinos et al., 2006; Kloner e Jennings, 2001).

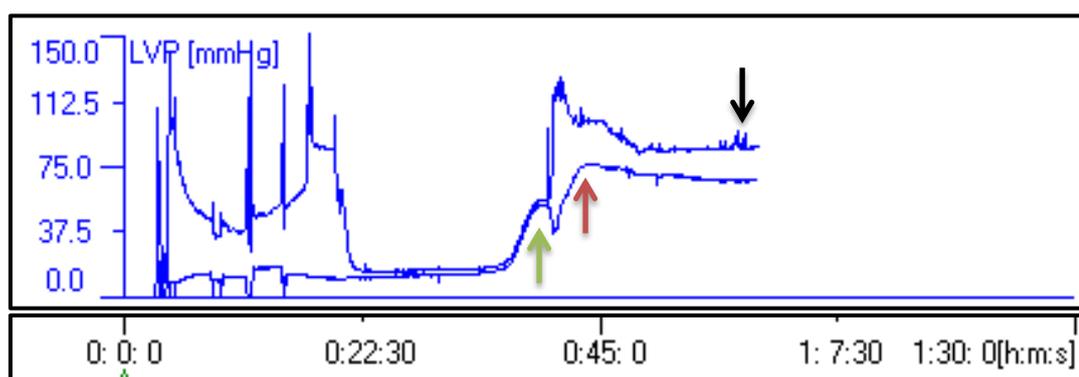


Figura 23: Fenômenos de contratura isquêmica (verde), hipercontratura (vermelho) e “myocardium stunning” (preto) verificados através das oscilações das pressões ventriculares ao longo da perfusão do coração isolado. Figura produzida neste estudo.

Quando os resultados deste estudo foram analisados temporalmente, alguns padrões se tornaram evidentes. Ambos os grupos tiveram aumento na PDFVE, caracterizando a contratatura pós-isquêmica. O tratamento com SFN não foi capaz de diminuir a contratatura isquêmica provocada pela isquemia reversível até os 20 minutos de reperfusão.

Apesar de não apresentar diferença significativa quando comparado ao grupo CTL, a PSVE do grupo SFN, aparentemente, apresentou ao longo do tempo valores próximos ao da estabilização. Ainda, houve um aumento significativo no relaxamento, aos 20 minutos da reperfusão, quando comparado ao final da estabilização apenas para o grupo SFN. Houve recuperação na contratilidade aos valores basais aos 20 minutos de reperfusão para ambos os grupos. Sugere-se que, possivelmente, em tempos maiores de reperfusão, poder-se-ia evidenciar alguma diferença na função mecânica dos corações do grupo SFN.

A PP diminuiu até os primeiros 10 minutos de reperfusão e aumentou a partir dos 15 minutos para ambos os grupos. A relação entre pressão, fluxo e resistência é expressa pela equação simplificada da Lei de Poiseuille ($P = F \times R$), onde P é a pressão no tubo, F é o fluxo e R, a resistência. Uma vez que no presente estudo utilizou-se fluxo constante de 10 mL/min, quaisquer modificações na pressão de perfusão se deram em função de alterações na resistência coronariana. Dessa forma, a queda na pressão de perfusão nos primeiros 10 minutos de reperfusão, pode ser explicada pela diminuição na resistência coronariana decorrente da ação de metabólitos vasodilatadores acumulados durante a isquemia. O aumento na pressão de perfusão observado nos períodos seguintes é decorrente da remoção desses metabólitos previamente acumulados e do reestabelecimento da tensão de oxigênio e ATP. Assim, a restauração do fluxo arterial coronariano leva ao desenvolvimento de hiperemia reativa, atingindo um pico durante os primeiros 5 minutos e depois decai. O fluxo arterial retorna aos seus valores basais em torno dos 15 a 20 minutos de reperfusão (Kloner e Jennings, 2001). A partir desse período poderiam começar a aparecer diferenças devido à estabilização da pressão de perfusão, caracterizando, portanto, uma limitação do nosso estudo.

Estudos recentes têm evidenciado que a ação quimioprotetora do SFN está associada principalmente à sua ação pró-apoptótica em altas doses (Sakao e Singh, 201; Suppipat et al., 2012; Chen et al., 2013). Já ação cardioprotetora do SFN está relacionada à sua capacidade em induzir a transcrição de enzimas de detoxificação

de fase II e enzimas antioxidantes em baixas doses de tratamento. Dessa forma, o SFN não atua como um antioxidante *per se*, mas sim, estimulando a maquinaria celular a aumentar sua própria reserva antioxidante endógena. Testes realizados com o SFN em nosso laboratório confirmam estes fatos (dados não mostrados neste trabalho).

Já está bem estabelecido que o SFN é capaz de induzir tanto a expressão como a atividade de enzimas antioxidantes como SOD, CAT, GPx (Zhu et al., 2008). Um estudo realizado pelo nosso grupo corrobora essas evidências, uma vez que o tratamento de cardiomioblastos de linhagem por 24 horas com o SFN foi capaz de aumentar a atividade da SOD, CAT e GST (Fernandes et al., 2015). No presente estudo, com o regime de tratamento utilizado, houve uma expressão significativamente maior em 66% da Cu/Zn-SOD, quando comparado ao grupo CTL. No estudo de Mukherjee (2010) o tratamento com extrato de brócolis por 30 dias também preservou a expressão pós-isquêmica de ambas as isoformas da SOD (Mn e Cu/Zn).

Apesar da maior expressão de SOD no grupo tratado não houve, no entanto, aumento na atividade total da enzima no grupo SFN quando comparado do CTL. Sugere-se que a atividade da fração total da enzima mantida inalterada tenha sido influenciada por um decréscimo na atividade na Mn-SOD. Estudos com as isoformas de SOD demonstraram que a deficiência de Mn-SOD gera um déficit pós-isquêmico pior do que na deficiência de CuZn-SOD. Apesar disso, os corações de camundongos *knockout* para SOD 1 (CuZn), apresentaram maior estresse oxidativo e dano pós isquêmico, sugerindo que a SOD citosólica pode também estar envolvida na proteção contra o dano isquêmico, principalmente em casos mais severos (Marczin et al., 2003).

Quanto à expressão das enzimas CAT e GPx, não houve diferença significativa entre os grupos. O mesmo ocorreu para suas atividades. Angeloni e colaboradores (2009), em um estudo com cardiomiócitos de ratos neonatos e diferentes tempos de tratamento com SFN, evidenciaram o mesmo resultado quanto à expressão proteica e atividade enzimática da GPx. Ainda, em um estudo com músculo esquelético de ratos submetidos ao exercício exaustivo, o tratamento com SFN, também não foi capaz de aumentar a expressão e atividade da GPx (Malaguti, 2009). Cabe destacar que os pesquisadores utilizaram uma dose de 25 mg/kg de peso corporal i.p. como pré-tratamento com SFN.

As enzimas TrxR e Grx têm um papel chave na defesa contra o estresse oxidativo através da sua ação de dissulfeto redutase, regulando o equilíbrio ditióis/dissulfeto. Verificou-se neste estudo, o papel do SFN na atividade das enzimas TrxR e Grx após isquemia-reperfusão. Ambas as enzimas não apresentaram diferenças na sua atividade. Malaguti e cols. (2009) também verificaram que o tratamento com uma alta dose de SFN não induziu nem a expressão, nem a atividade da enzima TrxR em músculo esquelético de ratos submetidos a exercício exaustivo.

Ainda, na tentativa de atenuar o estresse oxidativo, as GSTs são uma família de enzimas que catalisam a adição nucleofílica do grupamento tiol de uma GSH a uma variedade de eletrófilos. Existem sete isoformas de GSTs citosólicas. Destas, GSTM1, GSTP1 e GSTT1 têm sido implicadas no metabolismo de isotiocianatos (Boddupalli, 2012). Diversos estudos apontam a capacidade do SFN em induzir a expressão e atividade da GST (Morimistu et al., 2002; Riedl et al., 2009). No nosso estudo, entretanto, não houve diferença na atividade da GST nos corações de ratos tratados com 10 mg/Kg/dia de SFN e submetidos à isquemia-reperfusão. Isso pode ser explicado pelo fato de que a atividade da GST se torna pouco sensível, uma vez que mensura-se a atividade da GST total, incluindo as quatro isoformas que não metabolizam isotiocianatos. Uma forte indução sobre uma subunidade em particular pode ser parcialmente mascarada pela atividade das outras subunidades quando a GST total é mensurada (Yoxall et al., 2005).

Outra proteína com importante papel antioxidante é a HO-1, que atua degradando o pró-oxidante grupo heme à CO, biliverdina (que é posteriormente reduzida à bilirrubina) e ferro. Através destas moléculas biologicamente ativas e sua super expressão em resposta a condições de estresse, a HO-1, associada a outros fatores, pode atenuar o dano ao tecido cardíaco por isquemia-reperfusão através de decréscimo no estresse oxidativo além de atuar contra agentes pró-inflamatórios e apoptóticos (Wu, 2011). Uma vez que existe um padrão regulatório, a indução da expressão da HO-1 é considerada uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo e um mecanismo protetor em resposta a vários estímulos (Barbagallo et al., 2013). Desta forma, a indução dessa enzima responsiva ao estresse tem sido considerada uma importante estratégia terapêutica como proteção contra o estresse oxidativo e processos inflamatórios.

No nosso estudo, o grupo SFN apresentou 66% significativamente maior expressão da HO-1 quando comparado ao grupo CTL. A ação do SFN sobre a indução da enzima HO-1 é clássica, uma vez que diversos estudos demonstram o aumento na expressão da mesma em cultura de células cardíacas (Fernandes et al., 2015), em células das vias aéreas superiores em humanos (Riedl et al., 2009), em tecido cardíaco de animais (Bai et al., 2013), principalmente no que diz respeito à isquemia-reperfusão em variados tecidos (Yoon et al., 2008; Mukherjee et al., 2008; 2010; Zhao et al., 2010; Ping et al., 2010; Alfieri et al., 2013; Piao et al., 2013). Ainda, é importante destacar que o CO, um subproduto da ação da HO-1, além de apresentar efeitos anti-inflamatórios, anti-proliferativos e anti-apoptóticos, exerce um papel importante na isquemia-reperfusão uma vez que promove o relaxamento vascular protetor via GMPc (Kim et al., 2011).

A isquemia seguida de reperfusão gera uma série de eventos danosos relacionados à superprodução de EROs. Essa geração de EROs é diretamente proporcional ao tempo de isquemia, uma vez que a fração danificada dos transportadores de elétrons mitocondriais é maior em isquemias mais severas, influenciando, dessa forma, na redução completa ou parcial do oxigênio molecular (Raedschelders et al., 2012).

No presente estudo, a concentração de EROs foi significativamente menor no grupo SFN, podendo estar relacionada a uma menor geração dessas espécies a partir de suas fontes. Em um estudo desenvolvido por Zhu e cols (2008), o pré-tratamento de células musculares lisas aórticas com SFN preveniu a produção de EROs induzida por xantina oxidase, H_2O_2 , HNE (4-hidroxi-2-nonenal) e acroleína. Resultados semelhantes foram encontrados por Angeloni et al. (2009), que evidenciaram que o SFN foi capaz de diminuir a produção de EROs induzida por H_2O_2 em cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos.

No estudo de Malaguti e cols. (2009), o SFN foi capaz de reduzir significativamente as TBARS no músculo esquelético de ratos, diminuindo, portanto o dano lipídico promovido pelo exercício exaustivo. O mesmo foi observado em dois estudos com IR (Yoon et al., 2008; Ping et al., 2010), porém nenhum no sistema cardiovascular. No nosso estudo não observamos diferenças significativas na peroxidação lipídica verificada através do ensaio das TBARS. É interessante notar que não houve diferença na lipoperoxidação dos corações submetidos à isquemia-reperfusão, mesmo com uma diminuição significativa na geração de EROs totais no

grupo SFN, possivelmente porque esta foi de apenas 7%. Ainda, o fato de a lipoperoxidação não ter sido alterada sugere que não houve diferença significativa na formação de hidroperóxidos lipídicos entre os grupos. Esta hipótese é reforçada pelo fato de a enzima GPx não ter apresentado diferença significativa entre os grupos, uma vez que esta pode metabolizar estes produtos da lipoperoxidação.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que, na dose de 10 mg/kg/dia com protocolo de pré-tratamento por 3 dias, o sulforafano foi eficaz em diminuir a produção de EROs totais no tecido cardíaco após isquemia e reperfusão. Ainda, demonstrou-se eficaz em estimular a expressão da CuZn-SOD e da HO-1. Entretanto, o aumento na expressão de antioxidantes endógenos não repercutiu em suas atividades enzimáticas. Dessa forma, o fato de o sulforafano, neste regime de tratamento, não ter promovido o aumento da atividade enzimática de antioxidantes e não diminuir o dano lipídico vai de encontro aos resultados obtidos referentes à mecânica cardíaca, nos quais não se observou modificação na função ventricular pós-isquêmica.

Estudos com diferentes doses e/ou protocolos de tratamento se fazem necessários, para que dessa forma efeitos cardioprotetores de origem funcional possam ser observados e os mecanismos e sua ação possam ser explorados e elucidados. É possível que, nessas condições, este composto possa ser utilizado como coadjuvante em doenças cardiovasculares.

8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Ao comparar o nosso estudo com os três estudos que tomamos como base, nos quais se utilizou o tratamento com brócolis ou sulforafano e se utilizou o protocolo de isquemia-reperfusão, algumas diferenças metodológicas podem ser destacadas. Quando comparamos nosso estudo ao estudo de Piao e cols. (2013) diferenças como a dose do composto e a utilização de frequência cardíaca fixa podem ser consideradas. A utilização de frequência espontânea a partir do marcapasso cardíaco, no nosso estudo, poderia explicar a grande variabilidade dentro de um mesmo grupo.

Os estudos de Mukherjee et al. (2008, 2010) nos fazem levantar outras hipóteses. Além do regime de tratamento diferente, o tempo de isquemia foi maior, gerando efeitos mais pronunciados de uma isquemia irreversível. Uma possível limitação do nosso estudo pode ter sido a utilização de uma isquemia de 20 minutos, na qual não puderam ser observados efeitos mais pronunciados do composto e assim uma melhora na recuperação. Para tanto, a utilização de um grupo controle sem isquemia, seria necessária, para dessa forma, se observarem também os efeitos da isquemia.

Outra hipótese quanto ao tempo de isquemia pode ser considerada. Um estudo desenvolvido em nosso laboratório comparou diferentes tempos de isquemia. Concluiu-se que 20 minutos de isquemia global é o melhor período para o estudo da disfunção contrátil do miocárdio em um nível que possa ser atenuada ou agravada por drogas testadas em tempo real, durante a reperfusão (Oliveira et al., 2011). Como o efeito dos testes agudos são mais pronunciados, não podemos afirmar que para testar uma droga injetada de forma profilática, não em tempo real durante o experimento, o melhor período de isquemia também seja de 20 minutos.

Em relação ao tempo de reperfusão, utilizamos no nosso estudo o tempo 20 minutos, e quando comparado à literatura, pode ser considerado pouco tempo, uma vez que as possíveis diferenças podem ser ainda muito sutis. Em ambos os estudos de Piao (2013) e Mukherjee (2008) com isquemia-reperfusão, foram utilizados 50 e 120 minutos de reperfusão e se observaram diferenças maiores entre os grupos, para alguns parâmetros, ao final dos períodos de reperfusão estabelecidos (Mukherjee et al 2008; Piao et al., 2013). Ainda, diversos estudos com diferentes tempos de isquemia foram realizados no intuito de verificar o tempo de recuperação

após a reperfusão. No caso de oclusão coronariana de 1 minuto, anormalidades na função sistólica se recuperam e normalizam em 30 minutos. Já para 15 minutos de isquemia, a função ventricular esquerda permanece deprimida por mais de 6 horas de reperfusão (Kloner e Jennings, 2001). Portanto, para protocolos com isquemias de 20 minutos ou mais, um tempo maior de reperfusão pode ser necessário para a visualização de diferenças nos diferentes parâmetros funcionais aferidos.

9 PERSPECTIVAS

Estudos que investigaram o papel do SFN sobre parâmetros inflamatórios evidenciaram um decréscimo na infiltração de macrófagos na camada íntima da artéria aorta, carótida e no endocárdio. Esses efeitos parecem estar associados à diminuição da ativação do NF- κ B (nuclear factor kappa B) (Wu *et al.*, 2004). A ativação da via do NF- κ B promove a indução de apoptose de cardiomiócitos pelo TNF- α (tumor necrosis factor) (Dhingra *et al.*, 2009), que por sua vez, tem papel central em iniciar e sustentar a inflamação e a resposta imune. Existem evidências de que o TNF- α aumenta o estresse oxidativo em cardiomiócitos adultos aumentando a geração de EROs, bem como diminuindo antioxidantes (Kaur *et al.*, 2006a). A IL-10 atua antagonizando o TNF- α , uma vez que inibe a sinalização pelo NF- κ B (Kaur *et al.*, 2009). Além disso, a IL-10 tem um papel antioxidante em situações de aumentos no estresse oxidativo (Kaur *et al.*, 2006a).

Uma vez que já está bem evidenciado que o decréscimo na razão IL-10/TNF- α está correlacionado com a progressão de doenças como o infarto do miocárdio associado a um aumento no estresse oxidativo (Kaur *et al.*, 2006b), verificar o papel do SFN sobre esses e outros parâmetros do sistema inflamatório é a nossa perspectiva quanto ao uso deste composto.

Ainda, verificar o papel do sulforafano sobre diversos mecanismos no modelo de isquemia-reperfusão, utilizando outro regime de tratamento e protocolo de isquemia, são perspectivas a serem avaliadas futuramente.

10 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Meth Enzymol*, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AFANAS'EV, I. ROS and RNS Signaling in Heart Disorders: Could Antioxidant Treatment Be Successful? *Oxid Med Cell Longev*, v. 2011, 13 p., 2011.
- 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*, v. 57, p. 5615–5622, 2009.
- ARAUJO, A.S.; RIBEIRO, M.F.; ENZVEILER, A.; SCHENKEL, P.; FERNANDES, T.R.; PARTATA, W.A.; IRIGOYEN, M.C.; LLESUY, S.; BELLÓ-KLEIN, A. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrinol*. v. 249, n. 1-2, p. 133-139, 2006.
- ASCENSÃO, A.; MAGALHÃES, J.; SOARES, J. Exercício e stress oxidativo cardíaco. *Rev Port Cardiol*. V. 22, n. 5, p. 651 – 78, 2003.
- BAI, Y.; CUI, W.; XIN, Y.; MIAO, X.; BARATI, M.T.; ZHANG, C.; CHEN, Q.; TAN, Y.; CUI, T.; ZHENG, Y.; CAI, L. Prevention by sulforaphane of diabetic cardiomyopathy is associated with up-regulation of Nrf2 expression and transcription activation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 57, p. 82–95, 2013.
- BARBAGALLO, I. et al. Potential Therapeutic Effects of Natural Heme Oxygenase-1 Inducers in Cardiovascular Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 18, n. 5, 2013.
- BIANCHINI A.; BELLÓ, A.A. Hydrogen peroxide effects on the contractile force and the coronary flow of the rat isolated heart. *Med Sci Res*. v. 16, p. 1265 – 1266, 1988.
- BODDUPALLI S.; MEIN, J. R.; LAKKANNA S.; JAMES, D.R. Induction of phase 2 antioxidant enzymes by broccoli sulforaphane: perspectives in maintaining the antioxidant activity of vitamins A,C,and E. *Frontiers in Genetics*. v. 3, n. 7, 2012.
- BOLLI, R. Oxygen-Derived Free Radicals and Postischemic Myocardial Dysfunction (“Stunned Myocardium”). *JACC*. V. 12, n. 1, p. 239 – 249, 1988.
- BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. v. 52,p. 302-10, 1978.
- CANTY JR., J. M.; SUZUKI, G. Myocardial perfusion and contraction in acute ischemia and chronic ischemic heart disease. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. v. 52, p. 822–831, 2012.
- CHEN, H.; LANDEN, C.N.; LI, Y.; ALVAREZ, R.D.; TOLLEFSBOL. Epigallocatechin Gallate and Sulforaphane Combination Treatment Induce Apoptosis in Paclitaxel-Resistant Ovarian Cancer Cells through hTERT and Bcl-2 Down-regulation. *Exp Cell Res*. v. 319, n. 5, p. 697–706, 2013.
- COKKINOS, D.V.; PANTOS, C.; HEUSCH, G.;TAEGETMEYER, H.; Myocardial Ischemia – From Mechanisms to Therapeutic Potentials. 1 ed. New York: *Springer*, 2006.
- FERNANDES, R.O.; BONETTO, J.H.P; BAREGZAY, B.; DE CASTRO, A.L.; PUUKILA, S.; FORSYTH, H.; SCHENKEL, P.C.; LLESUY, S.L.; BRUM, I.S.; ARAUJO, A.S.R.; 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.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, v. 408, n. 6809, p. 239-47, Nov. 2000.

FLOHÉ, L.; GUNZLER W. A. Assay of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology.* v. 105, p. 114-121, 1984.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN BA G.; TEW, K.D.; TAPIERO H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed & Pharmacother.* v. 53, p. 169-80, 1999.

GAUI, E. N.; DE OLIVEIRA G. M. M.; KLEIN, C. H. Mortalidade por Insuficiência Cardíaca e Doença Isquêmica do Coração no Brasil de 1996 a 2011. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* V. 102, n. 6, p. 557-565, 2014.

GOLBIDI, S.; BADRAN, M.; LAHER, I. Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Exercise in Diabetic Patients. *Experimental Diabetes Research*, v. 2012, 2012.

GREENSMITH, D.J.; EISNERA, D.A.; NIRMALAN, M. The effects of hydrogen peroxide on intracellular calcium handling and contractility in the rat ventricular myocyte. *Cell Calcium.* v. 48, p. 341–351, 2010.

GRIEVE, D.J.; BYRNE, J.A.; CAVE, A.C.; SHAH, A. Role of Oxidative Stress in Cardiac Remodelling after Myocardial Infarction. *Heart Lung and Circulation*, v. 13, n. 2, p. 132–138, Jun. 2004.

GUERRERO-BELTRÁN, C. E.; CALDERÓN-OLIVER, M.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; CHIRINO, Y. I. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: Recent advances. *Experimental and Toxicologic Pathology.* v. 64, p. 503– 508, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine.* 3 ed. New York: Oxford, 1999.

HAMM, C.W. et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European Heart Journal* v. 32, p. 2999–3054, 2011.

HANSCHMANN, E. M.; GODOY, J.R.; BERNDT, C.; HUDEMANN, C.; LILLIG, C.H. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins— Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling.* v. 19, n. 13, 2013.

HARDY, N.; VIOLA, H.M.; JOHNSTONE, V.P.A.; CLEMONS, T.D.; SZAPPANOS, H.C.; SINGH, R.; SMITH, N.M.; IYER, K.S.; HOOL., L.C. Nanoparticle-Mediated Dual Delivery of an Antioxidant and a Peptide against the L-Type Ca $^{2+}$ Channel Enables Simultaneous Reduction of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. *ASC Nano.* v. 9, n. 1, p. 279–289, 2015.

HOLMGREN A, ÅSLUND F. “Glutaredoxin”. *Methods in Enzymology*, v. 252, p. 283–292, 1995.

HOLMGREN A, BJÖRNSTEDT M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* . v.252, p. 199-208, 1995.

HYBERTSON, B. M.; GAO, B.; BOSE, S. K.; MCCORD, J.M. Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*. v. 32, p. 234–246, 2011.

JASKANWAL D. S.; MACKRAM F. E.; RAJIV G.; HOLMES JR. D.R. Sudden Cardiac Death From the Perspective of Coronary Artery Disease. *Mayo Clin Proc*. v., 89, n. 12, p. 1685-98, 2014.

JIANG, J.; YUAN, X.; WANG, T.; CHEN, H.; ZHAO, H.;YAN, X.; WANG, Z.; SUN, X.; ZHENG, Q. Antioxidative and Cardioprotective Effects of Total Flavonoids Extracted from *Dracocephalum moldavica* L. Against Acute Ischemia/Reperfusion-Induced Myocardial Injury in Isolated Rat Heart. *Cardiovasc Toxicol*, v. 14, p. 74–82, 2014.

JONES, D.P. Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. Vol. 295, p. 849-68, 2008.

JONES, D.P. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, Set- Out 2006.

KAUL, N.; SIVESKI-ILISKOVIC, N.; HILL, M.; SLEZAK, J., SINGAL, P.K. Free radicals and the heart. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 30, n. 2, p. 55-67, Out. 1993.

KIM, Y-M et al. Heme Oxygenase in the Regulation of Vascular Biology:From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*. v 14, n 1, 2011.

KLEIN, D.; KERN, R.M.; SOKOL, R.Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol*. v. 36, p. 1, 1995.

KLONER, R.A.; JENNINGS, R.B. Consequences of Brief Ischemia: Stunning, Preconditioning, and Their Clinical Implications. *Circulation*. v. 104, p. 2981-2989, 2001.

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

LALA, A.; DESAI, A. S. The Role of Coronary Artery Disease in Heart Failure. *Heart Failure Clin* v. 10, p. 353–365, 2014.

LEBEL, C.P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*.v. 5, n. 2, p. 227-31, 1992.

LEE, H. P., GOURLEY, L., DUFFY, S. W., ESTEVE, J., LEE, J. & DAY, N. E. Colorectal cancer and diet in an Asian population--a case-control study among Singapore Chinese. *Int.J. Cancer*, v. 434, p. 1007–1016, 1989.

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

LIN Q. et al. Heme Oxygenase-1 Protein Localizes to the Nucleus and Activates Transcription Factors Important in Oxidative Stress. *J. Biol. Chem*. v. 282, p. 20621-20633, 2007.

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

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. v.193, p. 265-275, 1951.

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*. v. 66, p. 75–87, 2014.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its Classification. *Chemico-Biological Interactions*. v. 224, p. 164–175, 2014.

MALAGUTI, M.; ANGELONI, C.; GARATACHEA, N.; BALDINI, M.; LEONCINI, E.; COLLADO, P.S.; TETI, G.; FALCONI, M.; GONZALEZ-GALLEGO, J.; HRELIA, S. Sulforaphane treatment protects skeletal muscle against damage induced by exhaustive exercise in rats. *J Appl Physiol*. v. 107, p. 1028–1036, 2009.

MANNERVIK, B.; GLUTHENBERG, C. Glutathione Transferase. *Methods in Enzymology*. v. 77, p. 231 – 235, 1981.

MARCZIN, N.; EL-HABASHI, N.; HOARE, G.S.; BUNDY, R.E.; YACOUB, M. Antioxidants in myocardial ischemia–reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 420, p. 222–236, 2003.

MARKLUND, S. Handbook of methods for oxygen radical research. *Boca Rat CRC Press*, p. 243 – 247, 1985.

MASLOV, L. N.; LASUKOVA, T. V.; LISHMANOV, YU. B. Inotropic and Chronotropic Effects of Ischemic Postconditioning on the Model of Isolated Heart. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. v. 152, n. 6, 2012

McCORD, J.M.; Free radicals and myocardial ischemia: overview and outlook, *Free Radical Biology and Medicine*. v. 4, p. 9 – 14, 1988.

MEHTA, B. G.; LIU, J.; CONSTANTINOU, A.; THOMAS, C. F.; HAWTHORNE, M.; YOU, M.; GERHAUSER, C.; PEZZUTO, J. M.; MOON, R. C. & MORIARTY, R. M. Cancer chemopreventive activity of brassinin, a phytoalexin from cabbage. *Carcinogenesis*. V. 16, p. 399–404, 1995.

MINAMINO, T. Cardioprotection From Ischemia/Reperfusion Injury – Basic and Translational Research. *Circulation Journal*. v. 76, p. 1074 – 1082, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS – Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM. Disponível em: www.datasus.gov.br.

MORIMITSU, Y. et al. A Sulforaphane Analogue That Potently Activates the Nrf2-dependent Detoxification Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 5, p. 3456–3463, 2002.

MOURA, E. C.; PACHECO-SANTOS, L. M.; PETERS, L. R.; SERRUYA, S. J.; GUIMARÃES, R. Research on chronic noncommunicable diseases in Brazil: meeting the challenges of epidemiologic transition. *Revista Panamericana de Salud Publica*. V. 31, n. 3, p. 240 – 245, 2012.

MUKHERJEE, S.; GANGOPADHYAY, H.; DAS, D. K. Broccoli: A Unique Vegetable That Protects Mammalian Hearts through the Redox Cycling of the Thioredoxin Superfamily. *J. Agric. Food Chem.* v. 56, p. 609–617, 2008.

MUKHERJEE, S.; LEKLI, I.; RAY, D.; GANGOPADHYAY, H.; RAYCHAUDHURI, U.; DAS, D. K. Comparison of the protective effects of steamed and cooked broccolis on ischaemia-reperfusion-induced cardiac injury. *British Journal of Nutrition.* v. 103, p. 815–823, 2010.

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

OLIVEIRA, Ubirajara O. *O papel da isquemia e os efeitos da insulina associada a um inibidor do sistema renina-angiotensina sobre os mecanismos de cardioproteção à lesão isquemia-reperusão.* 2009. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia)) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

OLIVEIRA, U. O.; OLIVEIRA, A.R.; KUCHARSKY, L.C.; MACHADO, U.F.; IRIGOYEN, C.; SCHAAN, B. D. Efeitos da Angiotensina-1 e Isquemia na Recuperação Funcional em Corações Isolados. *Arq Bras Cardiol.* v. 97, n. 5, p. 390 – 396, 2011.

PAINE, A.; EIZ-VESPER, B.; BLASCZYK, R.; IMMENSCHUH, S. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochemical Pharmacology.* v. 80, p. 1895–1903, 2010.

PALMER, B.S; HADZIAHMETOVIC, M.; VECI, T.; ANGELOS, M.G. Global ischemic duration and reperfusion function in the isolated perfused rat heart. *Resuscitation.* v. 62, p. 97–106, 2004.

PIAO, C. S.; GAO, S.; LEE, G. H.; KIM, D. S.; PARK, B. H.; CHAE, S. W.; CHAE, H. J.; KIM, S. H. Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial KATP channels. *Pharmacological Research.* v. 61, p. 342–348, 2010.

PINGA, Z.; LIUB, W.; KANGB, Z.; CAIB, J.; WANGA, Q.; CHENGA, N.; WANGA, S.; WANGA, S.; ZHANGC, J.H.; SUN, X. Sulforaphane protects brains against hypoxic-ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Brain Research.* v. 1343, p. 178 – 185, 2010.

POLJSKAK, B. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2011, 194586, 2011.

RAEDSCHELDERS, K.; ANSLEY, D.M.; CHEN, D.D.Y. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology & Therapeutics.* v. 133, p. 230–255, 2012.

RAZA H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *FEBS Journal.* v.278, p. 4243–4251, 2011.

RIEDL, M.; SAXON, A.; DIAZ-SANCHEZ,D. Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. *Clinical Immunology.* v. 130, p. 244–251, 2009.

RODRIGO, R.; PRIETO, J.C.; CASTILLO, R. Cardioprotection against ischaemia/reperfusion by vitamins C and E plus *n*-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications. *Clinical Science.* v. 124, p. 1–15, 2013.

SAKAO, K.; SINGH, S.V. D,L-Sulforaphane-Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cells Is Regulated by the Adapter Protein p66^{Shc}. *J Cell Biochem.* v. 113, n. 2, p. 599–610, 2012.

SANADA, S.; KOMURO I.; KITAKAZE, M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.* v. 301, p. H1723–H1741, 2011.

SAYOLS-BAIXERAS, S.; LLUÍS-GANELLA, C.; LUCAS, G.; ELOSUA, R. Pathogenesis of coronary artery disease: focus on genetic risk factors and identification of genetic variants. *The Application of Clinical Genetics.* v. 7, p. 15–32, 2014.

SCHENKEL, Paulo C. Influência do Óxido Nítrico na resposta a isquemia-reperfusão em ratas sob distintas concentrações estrogênicas. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SOARES, G.P.; BRUM, J.D.; DE OLIVEIRA, G.M.M.; KLEIN, C.H.; SOUZA E SILVA, N. A. Evolução de Indicadores Socioeconômicos e da Mortalidade Cardiovascular em três Estados do Brasil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* v. 100, n. 2, p. 147-156, 2013.

SUPPIPAT, K.; PARK, C.S.; SHEN, Y.; ZHU, X.; LACORAZZA, H.D. Sulforaphane Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *PLoS ONE* v. 7, n. 12, p. e51251.

WU, M.L.; HO, Y.; YET, S.F. A Central Role of Heme Oxygenase-1 in Cardiovascular Protection. *Antioxidants & Redox Signaling.* v. 15, n 7, 2011

YE, L.; DINKOVA-KOSTOVA, A.T.; WADE, K.L.; ZHANG, T.; SHAPIRO, T.A.; TALALAY, P. Quantative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clinica Chimica Acta.* v. 16, p. 43-53, 2002.

YOON, H.; KANG, N.; LEE, H.; JANG, K.Y.; PARK, J.; PARK, B. Sulforaphane protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through induction of the Nrf2-dependent phase 2. *Enzyme Biochemical Pharmacology.* V. 75, p. 2214 – 2223, 2008.

YOXALL,V.; KENTISH, P.; COLDHAM,N.; KUHNERT,N.; SAUER,M. J.; IOANNIDES, C. Modulation of hepatic cytochromes P450 and phase II enzymes by dietary doses of sulforaphane in rats: implications for its chemopreventive activity. *Int. J. Cancer.* v. 117, p. 356 – 362, 2005.

ZHANG, Y.; KENSLER, T.W.; CHO, C,G.; POSNER, G.H.; TALALAY, P. Anticarcinogenic activities of sulforaphane and structurally related synthetic norbornyl isothiocyanates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 91, p. 3147-3150, 1994.

ZHANG, Y.; TALALAY, P.; CHO, C. G.; POSNER, G.H. A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 89, p. 2399-2403, 1992.

ZHAO, H.D.; ZHANG, F.; SHEN, G.; LI, Y.B.; LI, Y.H.; JING, H.R. Sulforaphane protects liver injury induced by intestinal ischemia reperfusion through Nrf2-ARE pathway. *World J Gastroenterol.* v. 16, p.3002–10, 2010.

ZHU, H.; JIA, Z.; STROBL, J.S.; EHRICH, M.; MISRA, H. P.; 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.* v. 8, p. 115–125, 2008.