

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

**PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA SINALIZAÇÃO INTRACELULAR
DURANTE O REMODELAMENTO CARDÍACO PRECOCE E TARDIO PÓS-
INFARTO DO MIOCÁRDIO EM RATOS**

PAULO CAVALHEIRO SCHENKEL

Orientadora: Dra. ADRIANE BELLÓ KLEIN

**Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas,
área de concentração: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências
Biológicas - Fisiologia.**

Porto Alegre

2010

*“Só se vê bem com o coração.
O Essencial é invisível aos olhos.”*

Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

À minha filha Isadora pelas inúmeras alegrias.

**À minha esposa Graziela pelo carinho, compreensão e apoio em todos os
momentos.**

Aos meus pais e irmão pela minha essência.

**À minha orientadora Adriane Belló Klein por gerar novos desafios e por
acreditar no meu trabalho.**

Ao professor Alex Araújo pelas inúmeras contribuições.

**Aos colegas de laboratório pelos agradáveis momentos de trabalho, em
especial ao grande amigo Rafael Oliveira Fernandes.**

À Tânia Regina Fernandes pela parceria nos experimentos.

Ao programa de Pós-Graduação da UFRGS pelas oportunidades.

À professora Maria Flávia Ribeiro pela confiança.

**Ao grupo do Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional da
Universidade de São Paulo por terem me recebido como membro do
mesmo.**

**À professora Maria Luiza Barreto Chaves pelas oportunidades de
pesquisa.**

**A todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste
trabalho.**

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Infarto do Miocárdio	1
1.2. Espécies Ativas de Oxigênio (EAO), Sistemas de Defesa Antioxidante e Estresse Oxidativo	6
1.3. Infarto do Miocárdio e Estresse Oxidativo	12
1.4. Sistema Renina Angiotensina	14
1.5. Sistema Renina Angiotensina e Estresse Oxidativo	15
1.6. Vias de Sinalização Intracelular	16
1.7. Vias de Sinalização Intracelular e Estresse Oxidativo	18
2. HIPÓTESE	23
3. OBJETIVOS	24
Objetivo Geral	24
Objetivos Específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Animais	25
4.2. Grupos e Sequência Experimental	25
4.3. Indução ao Infarto do Miocárdio	26
4.4. Avaliações Funcionais Cardíacas	27
4.4.1. Análise Ecocardiográfica	27
4.4.2. Cateterismo Cardíaco	28
4.5. Eutanásia, Cálculo do Índice de Hipertrofia Cardíaco e Preparo do Tecido	29
4.6. Quantificação das Proteínas	29
4.7. Dosagem da Concentração de Peróxido de Hidrogênio	30
4.8. Determinação da Concentração de Glutathiona Reduzida e Oxidada	30
4.9. Análise do Imunoconteúdo por Western Blot	31
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
6. RESULTADOS	35
6.1 Artigo 1: <i>Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. Mol Cell Biochem 2010;341:1-8)</i>	35

6.2 Artigo 2: <i>The correlation of redox-sensitive proapoptotic proteins and thioredoxin in early and late post-infarction cardiac remodeling.</i> (submetido em outubro de 2010 para J Cardiovasc Pharmacol-----	44
7. DISCUSSÃO CONCLUSIVA-----	72
8. PERSPECTIVAS -----	79
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	80

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Diagrama representativo das artérias coronárias de camundongos, ratos, hamsters e cobaias -----	2
Figura 2. Foto representativa da ligadura coronariana em rato -----	3
Figura 3. Tamanho da área infartada do ventrículo esquerdo de ratos -----	4
Figura 4. Representação esquemática da formação de espécies ativas de oxigênio e da ação de enzimas antioxidantes -----	8
Figura 5. Representação esquemática do sistema da glutathiona -----	9
Figura 6. Representação esquemática do sistema da tioredoxina -----	10
Figura 7. Direcionamento de algumas vias de sinalização intracelular para o crescimento e/ou morte celular-----	17
Figura 8. Eixo esquemático representando os mecanismos destacados neste trabalho -----	76
Tabela 1. Lista de anticorpos primários utilizados neste trabalho -----	78

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	fator de indução à apoptose
Akt	proteína quinase B
AngII	angiotensina II
ASK-1	quinase reguladora do sinal da apoptose
AT1	receptor da angiotensina 1
AT2	receptor da angiotensina 2
CAT	catalase
+dP/dt	índice de contratilidade
-dP/dt	índice de relaxamento
EAO	espécies ativas de oxigênio
EOX	estresse oxidativo
ERK	proteína quinase regulada por sinal extracelular
FE	fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FEnc	fração de encurtamento do ventrículo esquerdo
FC	freqüência cardíaca
GAPDH	gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GSH	glutathiona reduzida
GSHPx	glutathiona peroxidase
GSK-3β	glicogênio sintase quinase
GSSG	glutathiona oxidada
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
IC	insuficiência cardíaca
IM	infarto do miocárdio

JNK	quinase c-Jun N-terminal
MAF	mudança de área fracional
MAPK	proteínas quinase ativadas por mitógenos
mTOR	<i>“mammalian target of rapamycin”</i>
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
O₂^{•-}	ânion radical superóxido
HO[•]	radical hidroxil
PDFVE	pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PSVE	pressão sistólica do ventrículo esquerdo
RC	remodelamento cardíaco
Sham	cirurgia fictícia
SRA	sistema renina angiotensina
SOD	superóxido dismutase
Trx	tiorredoxina
Trx-1	tiorredoxina citosólica
Txnip	<i>“thioredoxin 1 – interacting protein”</i>

RESUMO

O infarto do miocárdio (IM) é definido como um processo de necrose dos cardiomiócitos por inadequado suprimento sanguíneo às suas demandas. Visando a manutenção das funções cardiovasculares, devido à perda de massa ventricular contrátil, modificações estruturais, elétricas e bioquímicas têm sido observadas com o passar do tempo pós-IM. Quando estas se associam com a preservação da função cardíaca, são definidas como remodelamento cardíaco (RC) bem adaptado. Por outro lado, quando associadas com a disfunção ventricular e insuficiência cardíaca, define-se como RC mal adaptado. Apesar destes RC já estarem bem caracterizados, maiores investigações são necessárias para o entendimento de seus mecanismos. Neste sentido, este trabalho tem como objetivo principal avaliar o perfil da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o estado redox celular, além de suas associações com algumas vias de sinalização no RC após o IM.

Para isso, ratos Wistar machos com aproximadamente 60 dias de vida, sob anestesia profunda, foram submetidos à oclusão da artéria coronária descendente anterior para indução do IM ou simulação deste. Feito isso, estes animais foram divididos em 6 grupos experimentais: 3 *sham-operated* (Sham) e 3 infartados (MI), subdivididos de acordo com o tempo em que foram eutanaziados: 2 dias, 7 dias e 28 dias após o procedimento cirúrgico. A função cardíaca foi avaliada pela ecocardiografia e pelo cateterismo do ventrículo esquerdo. Em seguida, ainda sob plano anestésico, os animais foram eutanaziados e o coração preparado para análise da concentração de H_2O_2 , da razão GSH/GSSG e do imunoconteúdo das proteínas Akt, mTOR, GSK3 β , ERK, JNK, AngII, AT1, AT2, AIF, Trx-1 e GAPDH.

Confirmamos uma disfunção cardíaca associada ao desbalanço redox 28 dias pós-IM. Junto a isso, observamos uma correlação positiva entre a concentração de H_2O_2 e proteínas pro-apoptóticas neste tempo. Uma vez caracterizadas estas associações 28 dias pós-IM, período em que conhecidamente são observados sinais de disfunção ventricular em ratos com moderados e grandes infartos, passamos para a avaliação do perfil temporal. Neste caso, observamos um aumento da Trx-1, associado com baixas concentrações de H_2O_2 e menor ativação da JNK, uma conhecida proteína pró-apoptótica, no homogeneizado cardíaco de ratos eutanaziados 2 dias após o procedimento cirúrgico. Além do mais, demonstramos um pronunciado aumento na concentração de H_2O_2 , assim como na ativação da JNK, nos animais infartados, entre o segundo e o sétimo dia. Justamente nesta janela temporal, pudemos observar uma queda brusca na função cardíaca e um pico do imunoconteúdo de angiotensina II.

Em conjunto, estes achados sugerem uma incapacidade da Trx-1 em neutralizar a formação adicional de espécies ativas de oxigênio promovida pela maior ativação do sistema renina angiotensina. Este cenário parece ser propício para a transição do remodelamento cardíaco bem adaptado para o mal adaptado após o IM. Portanto, com o entendimento deste perfil temporal, novas estratégias terapêuticas podem ser sugeridas.

ABSTRACT

Myocardial infarction (MI) is defined as a process of cardiomyocyte necrosis due to inadequate blood supply to their demands. For the maintenance of cardiovascular function after to loss of ventricular contractile mass, structural, electrical and biochemical changes have been observed over time after MI. When these are associated with the preservation of cardiac function, are defined as adaptative cardiac remodeling (CR). Moreover, when associated with ventricular dysfunction and heart failure is defined as maladaptative CR. Despite these CR are already well characterized, further investigations are necessary to understand its mechanisms. Thus, in the present study, we investigated the profile of the concentration of hydrogen peroxide (H_2O_2) and cellular redox state, as well as their associations with some signaling pathways in CR post-MI.

For this purpose, male Wistar rats (± 60 days), under deep anesthesia, were submitted to occlusion of the left anterior descending coronary artery to induce MI or sham-operation. The animals were divided into six groups: three sham-operated (Sham) and 3 infarcted (MI), subdivided in 2 days, 7 days and 28 days after surgery. Cardiac function was assessed by echocardiography and catheterization of the left ventricle. Then, still under anesthesia, the animals were euthanized and the heart prepared for analysis of the concentration of H_2O_2 , the GSH/GSSG and immunocontent protein Akt, mTOR, GSK-3 β , ERK, JNK, AngII, AT1, AT2, AIF, Trx-1 and GAPDH.

We confirm a cardiac dysfunction associated with redox imbalance 28 days post-MI. Moreover, we observed a positive correlation between the concentration of H_2O_2 and pro-apoptotic proteins at this time. Once characterized these associations 28 days post-MI, period which notoriously are observed signs of ventricular dysfunction in rats with moderate and large infarcts, we to evaluate the temporal profile. In this case, we observed an increase of Trx-1 that was associated with low concentrations of H_2O_2 as well as with a decreased activation of JNK, a known pro-apoptotic protein, in heart homogenates of rats euthanized 2 days after surgery. Furthermore, we demonstrate a pronounced increase in the concentration of H_2O_2 , as well as in the activation of JNK in infarcted animals, between the second and seventh days. In this period, we also could see a sharp decline in cardiac function and a peak immunocontent of angiotensin II.

Taken together, our results suggest an inability of Trx-1 in counter-regulated the formation of additional reactive oxygen species promoted by increased activation of the renin angiotensin system. This scenario seems to be favorable to the transition of adaptative to maladaptative CR post-MI. Therefore, with the understanding of this temporal profile, new therapeutic strategies can be suggested.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infarto do Miocárdio

Classicamente a hipóxia e a isquemia miocárdica caracterizam-se por uma desproporção entre a oferta e a demanda de oxigênio aos cardiomiócitos. Enquanto a hipóxia é uma diminuição parcial da oxigenação, a isquemia é uma redução total desta, principalmente pela obstrução do fluxo sanguíneo coronariano. As células isquemiadas sofrem processo de necrose, caracterizando o que é conhecido como infarto agudo do miocárdio (IM). Dentre outras causas de IM, uma fissura ou ruptura da placa aterosclerótica coronariana destaca-se por desencadear a formação do trombo coronariano, obstruindo a luz desse vaso. Segundo dados do DATASUS, no ano de 2006, 32% do total de mortes no Brasil foram conseqüência de doenças cardiovasculares, e dessas, quase a metade (48,5%), causadas pelo IM. Além do mais, tem sido observada uma disfunção contrátil precoce pós-IM pela perda da integridade de cardiomiócitos viáveis que pode evoluir para insuficiência cardíaca (IC) (Pfeffer et al., 1990). Ou seja, os pacientes que sobrevivem ao IM acabam internando mais vezes por complicações decorrentes desse evento isquêmico. Nesse sentido, tendo em vista a relevância do IM na saúde pública, o entendimento da fisiopatologia desta doença é fundamental para uma intervenção terapêutica adequada. Buscando este entendimento, vários trabalhos foram desenvolvidos para padronizar um modelo animal que reproduzisse o IM observado nos humanos. Até o início da década de 40, priorizava-se a utilização de cães devido à semelhança de sua circulação coronariana com a dos humanos. Com este modelo, além de

dificuldades no manuseio, na reprodução e do alto custo para manter estes animais, a reprodutibilidade do IM era muito pequena, o que dificultava sua utilização. Visando solucionar estes problemas, em 1946, Heimburger tornou-se pioneiro ao induzir o IM em ratos pela ligadura de artérias coronárias (Heimburger, 1946). Oito anos depois, Johns e Olson, após operarem aproximadamente 514 animais de pequeno porte, para o mapeamento de suas artérias coronárias (Figura 1), destacaram uma maior reprodutibilidade do IM induzido pela ligadura da artéria coronária descendente anterior em ratos (Figura 2) (Johns & Olson, 1954).

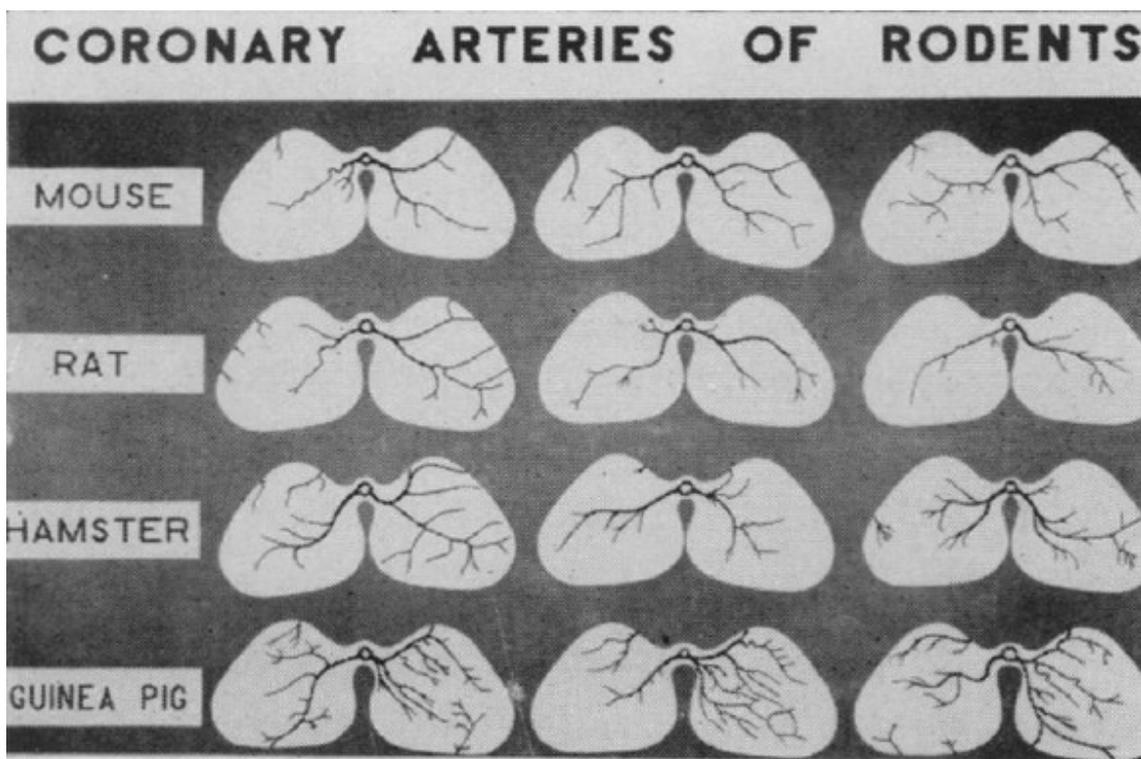


Figura 1. Diagrama representativo do padrão das artérias coronárias em camundongos, ratos, hamsters e cobaias (Johns & Olson, 1954).

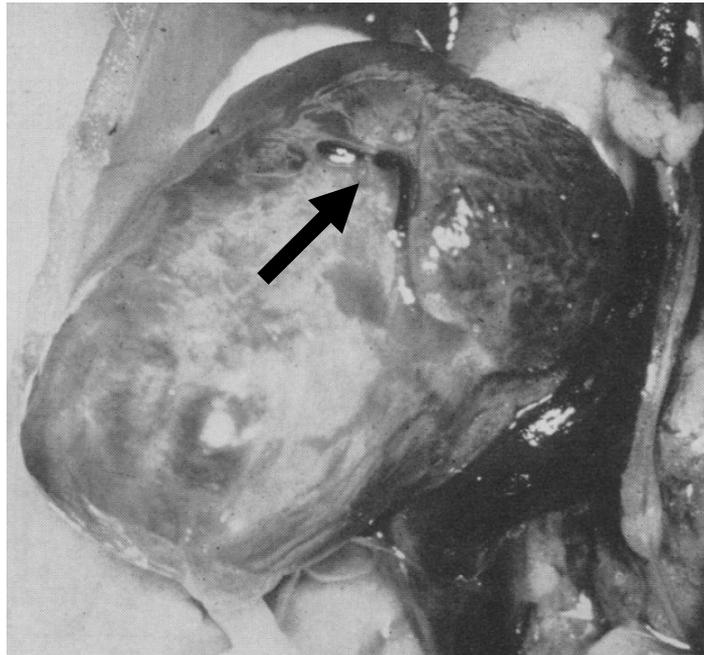


Figura 2. Foto representativa da indução do infarto do miocárdio em ratos pela oclusão do fluxo coronariano da artéria descendente anterior (seta) através da ligadura desse vaso (Johns & Olson, 1954).

No entanto, a utilização desta técnica apresenta grande dispersão no tamanho da área infartada. Assim como Heimbürger, Johns e Olson destacaram-se pelo pioneirismo nesse tipo de procedimento, Pfeffer et al., num trabalho clássico publicado em 1979, classificaram o tamanho da área infartada como pequena (4-30%) (Figura 3B) média (31-46%) e grande (47-59%) (Figura 3C) e estabeleceram uma relação inversa entre o tamanho do infarto e a função cardíaca. (Pfeffer et al., 1979). Os autores mostraram que um comprometimento do ventrículo esquerdo maior que 59% deprime tanto a função contrátil ventricular que não é compatível com a vida (Pfeffer et al., 1979). Ou seja, quanto maior o tamanho do infarto, pior é a função cardíaca. Técnica cirúrgica semelhante vem sendo utilizada até os dias de hoje, mas com

algumas adaptações, principalmente no suporte ventilatório, que facilitam a manipulação do coração durante o procedimento.

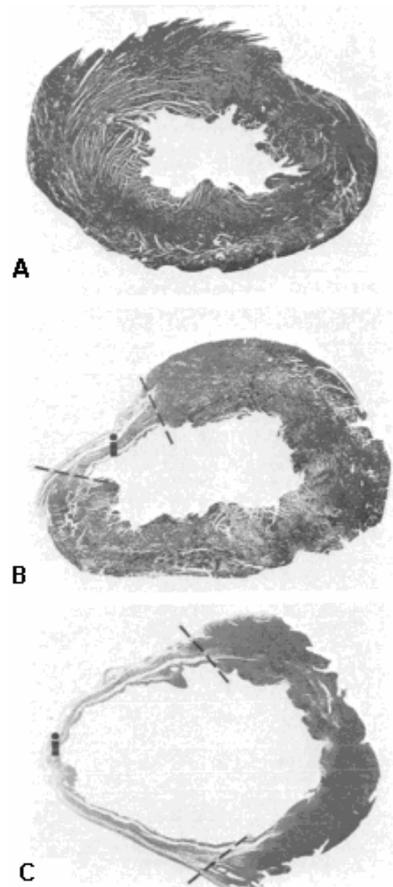


Figura 3. Corte transversal do ventrículo esquerdo de ratos não infartados (A), com 20% de infarto (B) e 50% de infarto (C) (Pfeffer et al., 1979)

Visando a mensuração funcional, dentre outros métodos, a ecocardiografia tem sido muito utilizada. Análises ecocardiográficas do coração de ratos infartados mostram que sua função cardíaca se correlaciona negativamente tanto com o tamanho da área lesada quanto com o tempo decorrido pós-IM. Embora mecanismos compensatórios tentem suprir a perda de função dos cardiomiócitos infartados logo após a ligadura coronariana, tem sido mostrado uma disfunção ventricular associada com a perda de massa

contrátil durante o processo do remodelamento cardíaco (RC) pós-IM (Rabald et al., 2007; Pons et al., 2003).

O RC caracteriza-se por alterações elétricas, bioquímicas e estruturais complexas que começam a se estabelecer imediatamente após a oclusão coronariana e modificam-se com o passar do tempo após o dano isquêmico (Pfeffer et al., 1990). Apesar de sustentar a função ventricular precocemente, o RC é um importante fator de morbidade e mortalidade, uma vez que está associado com a IC em tempos mais tardios (Mosterd et al., 2001). Ou seja, existe um período de transição entre o estabelecimento do IM e a IC, no qual mecanismos compensatórios tentam manter a função cardíaca. No RC bem adaptado verifica-se a eficácia destes mecanismos na manutenção da função cardíaca. Entretanto, com o passar do tempo, estes mecanismos compensatórios tornam-se insuficientes e a função cardíaca piora, o que caracteriza o RC mal adaptado (Figura 4). Durante o RC mal adaptado tem sido observado um aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), um parâmetro de insuficiência ventricular. Aumentando a PDFVE, a diferença de pressão no sistema circulatório ficará reduzida e culminará, ao longo do tempo, com uma estase retrógrada e suas complicações. Os mecanismos responsáveis pela transição do RC bem adaptado para o RC mal adaptado ainda não são completamente entendidos e merecem maiores investigações.

A oclusão do fluxo coronariano, particularmente quando induz lesões transmuralis de grandes proporções, desencadeia alterações hemodinâmicas que parecem estar envolvidas com a formação de espécies ativas de oxigênio (EAO) pós-IM.

1.2 Espécies Ativas de Oxigênio (EAO), Sistemas de Defesa Antioxidante e Estresse Oxidativo

O músculo cardíaco é um tecido predominantemente aeróbio e, portanto, não produz energia suficiente em condições hipóxicas. Uma vez que requer um aporte adequado de oxigênio, uma redução do fluxo coronariano acaba comprometendo a função dessas células hipoperfundidas. No metabolismo aeróbio, a redução completa de uma molécula de oxigênio na cadeia de transporte de elétrons requer a adição de quatro elétrons. Devido a sua conformação eletrônica, o oxigênio tem forte tendência de receber um elétron de cada vez (redução monovalente), e assim, formar uma série de intermediários tóxicos e reativos que são as espécies ativas de oxigênio (EAO) como, por exemplo, o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}) (Figura 4) (Llesuy, 2002). Estas EAO são muito importantes para diversas funções celulares, podendo exercer tanto efeitos benéficos como maléficos. Dentre as fontes de EAO nos cardiomiócitos destacam-se: cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, xantina oxidase, autooxidação das catecolaminas, desacoplamento da óxido nítrico sintase e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (Grieve et al., 2004). Em condições fisiológicas, aproximadamente 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria forma EAO durante sua redução monovalente na cadeia de transporte de elétrons (Misra et al., 2009). Neste caso, em menores concentrações, estas espécies atuam como segundos mensageiros de funções celulares vitais. Por outro lado, em condições patológicas como, por exemplo, no IM, há um grande aumento na formação de EAO. Nesta situação, verificam-

se danos celulares importantes como, por exemplo, comprometimento da membrana plasmática pela peroxidação de lipídios, inativação de enzimas fundamentais, por modificar oxidativamente algumas proteínas, assim como pode comprometer a expressão gênica por oxidação do DNA (Giordano, 2005).

Para que não predominem os efeitos deletérios desencadeados pelas altas concentrações de EAO, existem sistemas de defesa antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos, que estabilizam essas espécies. Em condições fisiológicas, as concentrações de EAO são controladas predominantemente pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) (figura 5) e glutathiona peroxidase (GSHPx). A SOD age dismutando o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , enquanto que a CAT e a GSHPx atuam na redução do H_2O_2 . (Figura 4). Além de seu potencial para formação de HO^{\cdot} , pelas reações de Fenton e Haber-Weiss (Figura 4), o H_2O_2 parece agir como molécula chave na sinalização intracelular (Kwon et al., 2003).

Já em condições em que há formação adicional de EAO, salienta-se a importância de sistemas antioxidantes não enzimáticos, que atuam em cooperação com as enzimas antioxidantes. Quanto maior a disponibilidade e a atividade dessas enzimas antioxidantes, maior a capacidade da célula em manter o ambiente celular reduzido. Distúrbios que alterem essa homeostase propiciam o desenvolvimento do estado de estresse oxidativo (EOX), que classicamente tem sido relatado como um aumento nas concentrações dos pró-oxidantes acima dos níveis fisiológicos e/ou diminuição das defesas antioxidantes (Kaul et al., 1993).

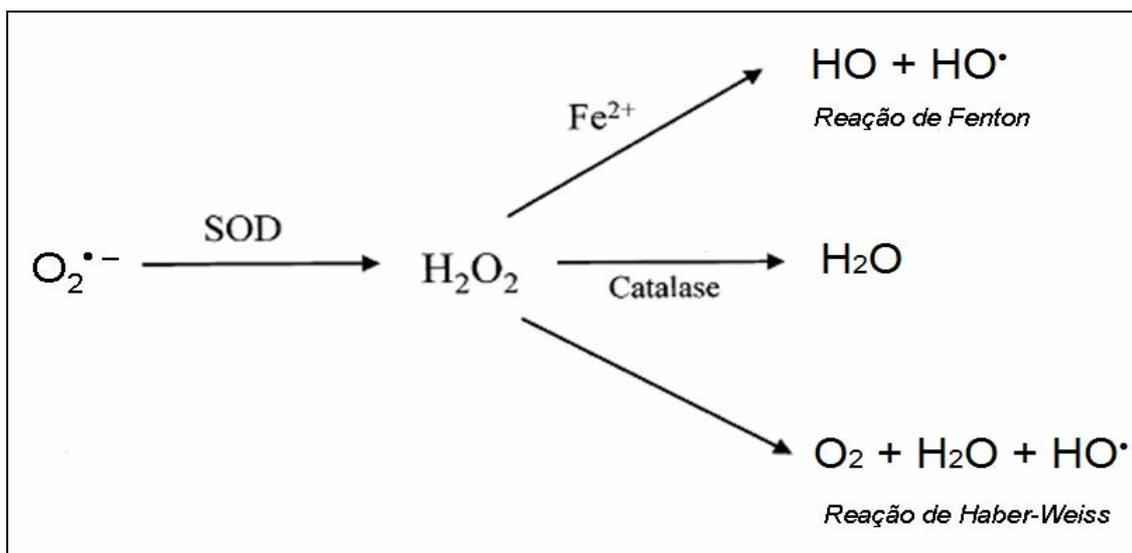


Figura 4. Representação esquemática da formação de EAO e da ação antioxidante enzimática (Grieve et al., 2004).

Dentre estes sistemas antioxidantes, destacam-se a glutathione e a tiorredoxina (Trx). A glutathione reduzida (GSH) é um tripeptídeo essencial que controla processos celulares redox-sensíveis. Além do mais, sua utilização pela célula é capaz de neutralizar alguns radicais livres através da atividade da glutathione peroxidase. Nesta reação, a glutathione torna-se oxidada (GSSG) e, em seguida, pode ser regenerada pela atividade da GSHPx (Figura 5).

A relação entre a glutathione reduzida (GSH) e a glutathione oxidada (GSSG), GSH/GSSG tem sido bastante utilizada como parâmetro do estado redox celular (Qin et al., 2005; Singh et al., 1995).

Assim como a glutathione, o sistema antioxidante da tiorredoxina (Trx) tem merecido destaque por desempenhar importantes ações na modulação do estado redox celular. Esse sistema é formado pela tiorredoxina, tiorredoxina redutase e pelo cofator NADPH e atua como importante antioxidante pela

interação das proteínas oxidadas com seu centro redox ativo (cys-gly-pro-cys) (World et al., 2006).

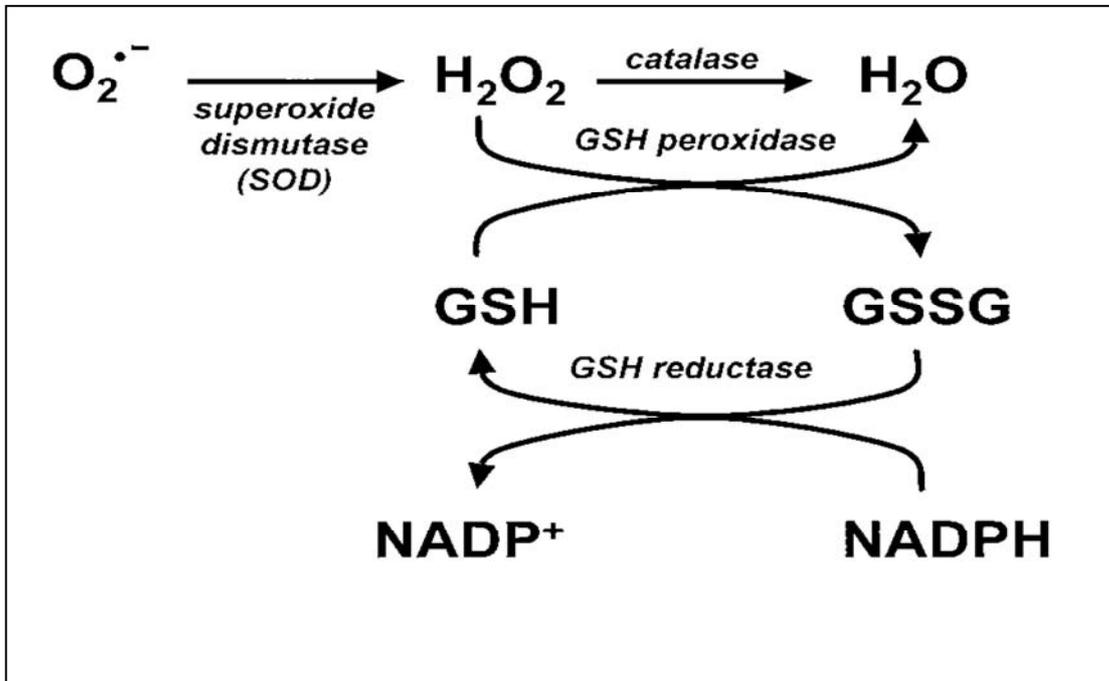


Figura 5. Sistema da glutatona (Dröge, 2002).

Quando isso ocorre, observa-se a formação de um ligante dissulfeto que pode voltar a ser reduzido pela Trx redutase e NADPH (Figura 6). Nesta reação, a Trx torna-se oxidada e é regenerada para sua forma reduzida com auxílio da enzima Trx redutase. *Thioredoxin 1-interacting protein* (Txnip) é um inibidor endógeno da Trx que só é capaz de ligar-se na forma reduzida da mesma (World et al., 2006). Tanto a Trx encontrada predominantemente no citosol (Trx-1) quanto aquela encontrada na fração mitocondrial (Trx-2) têm mostrado forte capacidade antioxidante por atuarem como varredores de EAO, em especial o H_2O_2 (Ago et al., 2006).

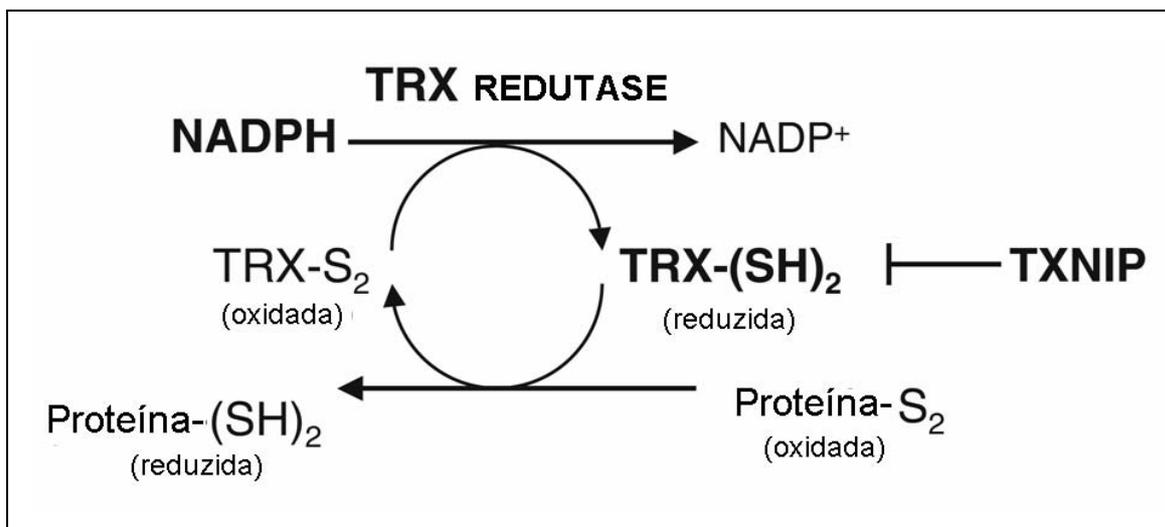


Figura 6. Representação esquemática do sistema da tiorredoxina (World et al., 2006).

Vários estudos têm mostrado que o estado redox celular influencia diretamente as funções do sistema da Trx (Maulik & Das, 2008; Yoshioka et al., 2004; Ebrahimian et al., 2008). Sabe-se que este sistema evita o RC mal adaptado do coração lesado por estímulos como, por exemplo, o IM, tratamento antitumoral com adriamicina, angiotensina II (AngII), entre outros (Hori & Nishida, 2009; Ebrahimian et al., 2008; Shioji et al., 2002). Shioji et al., 2002 mostraram uma redução na formação de EAO associada ao aumento na expressão de Trx-1 quando foi administrada adriamicina, uma quinona antitumoral que tem sérios efeitos colaterais cardíacos, o que mais uma vez reforça a influência da Trx como moduladora do estado redox celular. O RC bem adaptado está relacionado com o aumento da expressão da Trx, tanto pela interação direta, como por modular a transcrição gênica de algumas proteínas sinalizadoras. Estas respostas só são observadas quando o meio intracelular encontra-se predominantemente reduzido (Ago et al., 2006). Por outro lado, num ambiente oxidado, observa-se um padrão inverso nestas

influências da Trx. Txnip, também chamada de *vitamin D3-upregulated gene 1* (VDUP1), ou *thioredoxin-binding protein 2* (TBP-2) está presente no citoplasma e age regulando negativamente a atividade da Trx por evitar sua translocação para o núcleo. A Trx e a Txnip parecem agir em cooperação durante o RC. Uma queda na expressão do Txnip é observada no RC bem adaptado e, por outro lado, sua superexpressão acaba retardando este (Ago et al., 2006). Ou seja, a Txnip parece atuar tanto como modulador negativo do RC bem adaptado, quanto modulador positivo do RC mal adaptado. Apesar de ser conhecido que a Txnip liga-se diretamente no centro regulador da Trx, seu mecanismo de ação ainda é desconhecido. Além destas propriedades antioxidantes que auxiliam no controle do estado redox celular, a Trx também influencia diferentes vias de sinalização intracelular por modular quinases e fatores de transcrição envolvidos tanto no crescimento, como na morte celular programada, através de interação proteína-proteína (World et al., 2006; Ago et al., 2006).

O comprometimento de estruturas importantes para um adequado funcionamento celular por danos oxidativos induzidos pelo desbalanço redox, tem sido classicamente relatado pós-IM. Embora a modulação das concentrações de EAO e dos sistemas antioxidantes estejam diretamente envolvidas com estes danos, sua influência no direcionamento das vias de sinalização intracelular emerge como um conceito mais contemporâneo de estresse oxidativo (Jones, 2006).

1.3 Infarto do Miocárdio e Estresse Oxidativo

As EAO podem gerar danos em diversos sistemas biológicos, incluindo o coração. Estas podem comprometer o ideal funcionamento de algumas proteínas cardíacas fundamentais como, por exemplo, canais iônicos, bombas de cálcio e proteínas contráteis envolvidas no mecanismo de excitação contração (Misra et al., 2009). Um aumento na produção de EAO e o estado de EOX têm sido relatados tanto em modelos animais de IM quanto em humanos com IC decorrente do insulto isquêmico (Singh et al., 1995). Logo após a oclusão coronariana, observam-se modificações estruturais cardíacas como, por exemplo, a degradação da rede de colágeno no local do infarto, pelo aumento da atividade de metaloproteinases, a perda de cardiomiócitos, por necrose, assim como o aumento na formação de EAO, por diversas fontes, conforme comentado previamente (Holmes et al., 2005).

Um aumento na capacidade antioxidante também tem sido observado precocemente pós-IM visando estabilizar o maior número de EAO. Contudo, ao longo do tempo, este mecanismo de defesa torna-se exaurido e/ou sobrepujado pela grande concentração de EAO, culminando com o estado de EOX (Dröge, 2002). Pacientes com IC têm mostrado um aumento na atividade da enzima NADPH oxidase, uma grande fonte geradora de $O_2^{\bullet-}$. Embora evidências mostrem que a formação de EAO decorrente da maior ativação da NADPH oxidase seja importante para determinar o balanço redox em condições fisiológicas, têm sido mostrado aumentos pronunciados de EAO geradas por essa enzima em condições patológicas como o IM. Esta doença está associada com a maior ativação do sistema renina angiotensina (SRA)

que acaba, concomitantemente, aumentando a atividade da NADPH oxidase e levando ao estado de EOX. Corroborando esses achados, tem sido mostrada a depleção de GSH e o acúmulo de GSSG no tecido cardíaco ao longo do tempo pós-IM (Qin et al., 2005). Hill & Singal, 1996 mostraram um aumento da relação GSH/GSSH ao final da primeira semana pós-IM, mas que foi diminuindo de forma gradativa até tornar-se significativamente reduzida depois de 16 semanas, quando os animais apresentaram sinais claros de IC congestiva (Hill & Singal, 1996). Nesse mesmo estudo, verificou-se um aumento gradual da oxidação de lipídios ao longo do tempo (Hill & Singal, 1996).

Uma vez que tem sido evidenciada uma associação entre elevadas concentrações de EAO e o IM, terapias com antioxidantes estão sendo propostas (Misra et al., 2009). O pré-tratamento de ratos infartados com vitamina E, um poderoso antioxidante não enzimático, além de aumentar sua reserva em diversos tecidos, mostrou uma melhora na função hemodinâmica desses animais (Palace et al., 1999). Uma redução significativa da área de infarto associada com a preservação funcional ventricular também foi mostrada em ratos com superexpressão da enzima antioxidante SOD (Chen et al., 1996). Outro importante antioxidante que vem recebendo grande atenção nos últimos anos, é a Trx. Esta parece estar diretamente associada com a modulação do estado redox celular pós-IM. Neste sentido, Samuel et al., 2010 verificaram que a terapia gênica com Trx reduz o EOX e a morte dos cardiomiócitos de ratos diabéticos infartados (Samuel et al., 2010).

Assim como as adaptações hemodinâmicas, modificações neurohumorais, como a ativação do SRA, também estão envolvidas com a formação de EAO e, conseqüentemente, com o RC pós-IM.

1.4 Sistema Renina Angiotensina

O SRA é classicamente conhecido como um importante regulador hormonal envolvido na manutenção da homeostase do sistema cardiovascular, em especial no controle da pressão arterial a longo prazo (Beevers et al., 2001). Nesse caso, durante hipotensão e/ou hipovolemia, a renina, uma enzima proteolítica sintetizada e armazenada nas células justaglomerulares, é secretada na corrente sanguínea. A renina é capaz de acelerar a conversão do angiotensinogênio, uma proteína sintetizada e secretada principalmente pelo fígado, em angiotensina I, um decapeptídeo com baixa ação biológica. Ao entrar em contato com as células epiteliais, em especial nos vasos sanguíneos pulmonares, a angiotensina I é convertida em angiotensina II (AngII), um octapeptídeo com efeitos biológicos importantes, pela ação da enzima conversora da angiotensina (ECA).

A AngII desempenha seu papel crucial nessa regulação a longo prazo por ligar-se aos seus receptores acoplados à proteína G do tipo 1 (AT1) e do tipo 2 (AT2) que estão localizados na membrana plasmática de diversos tecidos, inclusive o coração (Das et al., 2004; Awan & Mason, 1996). Esses dois tipos de receptores são os mais estudados e promovem respostas antagônicas em resposta à ligação da AngII. Enquanto o receptor AT1 está relacionado com efeitos hipertróficos sobre o coração, o receptor AT2, com papel não completamente entendido, promove resposta anti-hipertrófica (Ferrario, 2006; Sales et al., 2005).

Além da clássica resposta hormonal, tem sido descrita a existência de SRA locais que também parecem exercer efeitos reguladores importantes na

função cardíaca, complementando as respostas sistêmicas. No coração, tanto os SRA parácrinos, autócrinos e até mesmo intrácrinos, apresentam grande importância uma vez que provêm aproximadamente 90% da angiotensina I e 75% da angiotensina II neste órgão (Kumar & Boim, 2009; Van Kats et al., 1998).

1.5 Sistema Renina Angiotensina e Estresse Oxidativo

Concomitantemente às demais fontes geradoras de EAO pós-IM, tem sido observado uma maior ativação do SRA. Ao ligar-se em seus receptores acoplados à proteína G, a AngII aumenta a geração de EAO, ao promover maior ativação da NADPH oxidase, uma grande formadora de $O_2^{\cdot-}$ no coração (Dhalla et al., 2009; Sun, 2007; Awan & Mason, 1996). Corroborando estes achados, outros estudos mostram um aumento na expressão gênica e protéica da gp91-phox, uma subunidade essencial do complexo da NADPH oxidase, no tecido infartado (Lu et al., 2004; Fukui et al., 2001; Yamagishi et al., 1993). No mesmo sentido, Sun Y, 2007 também verificou uma elevação da gp91-phox no tecido infartado do coração de ratos Wistar, o que sugere maior formação de EAO neste local. Reforçando estes achados, Zhu et al., 2003 verificaram que uma atenuação na ativação do SRA, quer seja por inibidores da ECA e/ou por bloqueadores dos receptores AT1, diminuiu significativamente os efeitos biológicos da AngII e a produção de EAO. Além do mais, outros estudos têm mostrado que a administração de antioxidantes exógenos diminui significativamente as resposta geradas pela AngII, o que mais uma vez sugere

a participação das EAO nesta resposta (Delbosc et al., 2002; Singal et al., 1999; Singal et al., 1998; Nakamura et al., 1998).

Uma vez que o SRA encontra-se mais ativo pós-IM, além de estar associado com a formação de EAO, este parece estar envolvido na transição do RC bem adaptado para o RC mal adaptado. Sendo assim, o entendimento do seu papel nesta transição possibilitará futuras estratégias terapêuticas.

1.6 Vias de Sinalização Intracelular

As vias de sinalização intracelular direcionam o RC por influenciarem o tipo de resposta a ser desencadeada. Estas podem direcionar para o RC bem adaptado, com integridade celular e sem perda de contratilidade, ou mal adaptado, com apoptose associada à disfunção cardíaca. Entre diversas vias, destacam-se a proteína quinase B (PKB/Akt ou Akt) e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (figura 7).

A Akt pertence à família das quinases serina/treonina que consiste em 3 isoformas, Akt1, Akt2 e Akt3, estimuladas pelos receptores tirosina quinases, mediadas pela ação da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (Cai et al., 2003). Quando fosforilada, portanto em seu estado ativo, a Akt promove um RC bem adaptado por estimular a sobrevivência de cardiomiócitos e inibir morte celular. Ela pode induzir o crescimento da massa cardíaca através da ativação da via de crescimento *mammalian target of rapamycin* (mTOR), além de suprimir a apoptose pela fosforilação da glicogênio sintase quinase (GSK-3 β) (Walsh, 2003). Quando está em sua forma ativa, não fosforilada, a GSK-3 β promove apoptose. Antos et al., 2001 verificaram que camundongos transgênicos que

expressam continuamente a forma ativa da GSK-3 β têm diminuída a hipertrofia cardíaca estimulada por agonistas β -adrenérgicos e por sobrecarga de pressão.

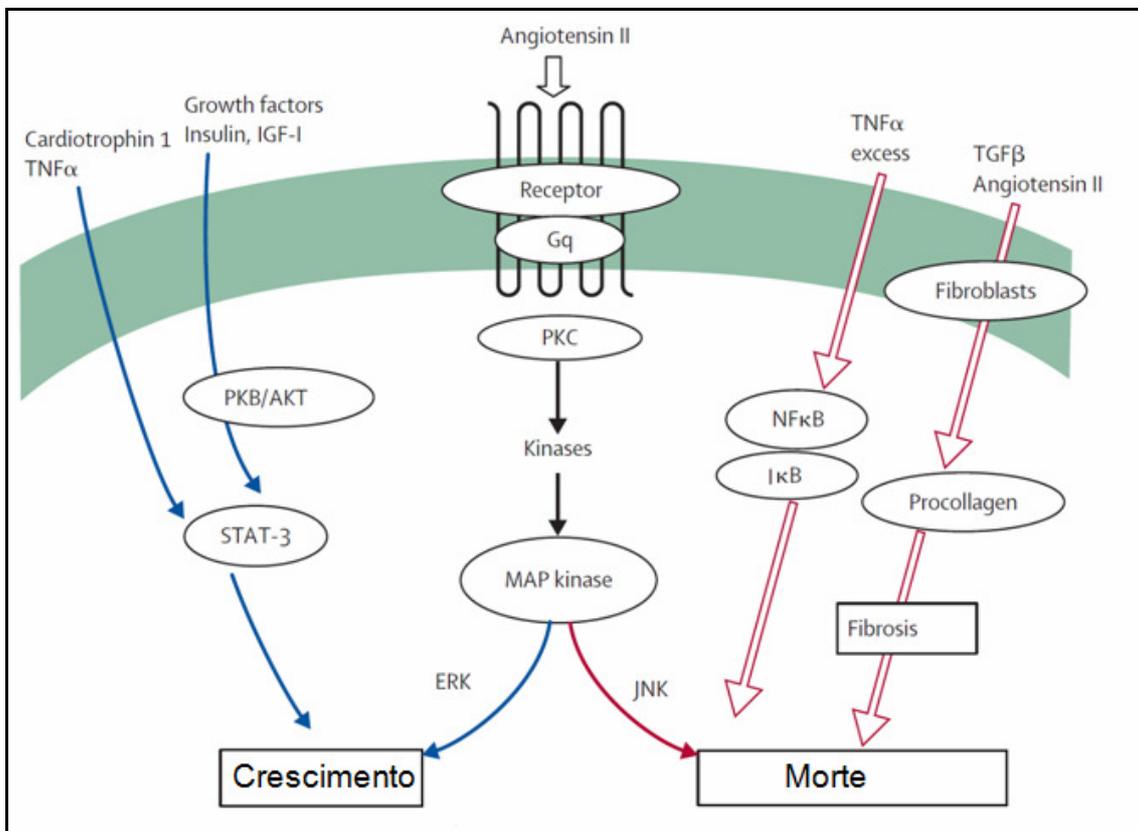


Figura 7. Direcionamento de algumas vias de sinalização intracelular para o crescimento e/ou morte celular

As MAPKs, assim como a Akt, podem induzir tanto a sobrevivência quanto a morte celular. A proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) está associada com a diferenciação e o crescimento celular, enquanto que a quinase c-Jun N-terminal (JNK1 e JNK2) e a p38 estimulam a morte celular (Heineke & Molkenin, 2006). A quinase reguladora do sinal de apoptose (ASK-1) é uma proteína redox-sensível que desempenha um papel chave no

direcionamento para morte celular por estimular a JNK e p38, culminando com um RC mal adaptado (Ichijo et al., 1997).

O aumento na atividade das MAPK e da Akt também parece estar relacionado com a modulação de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais. Dentre outras, o fator de indução a apoptose (AIF) vem sendo bastante estudado. O AIF é uma flavoproteína com propriedade oxidorreductase e que normalmente encontra-se confinada na mitocôndria. Durante estímulos estressantes, como o insulto isquêmico, o AIF é translocado para o núcleo onde induz a apoptose por causar condensação da cromatina e fragmentar o núcleo em grandes porções (Susin et al., 1999).

Tendo em vista, que algumas vias de sinalização intracelular são constituídas por proteínas reguladas pelo estado redox, tem sido postulado uma associação entre estas na transição do IM para IC.

1.7 Vias de Sinalização Intracelular e Estresse Oxidativo

A ativação de algumas vias de sinalização intracelular envolvidas no RC pós-IM parece ser modulada pelo estado redox celular, assim como pelas concentrações de algumas EAO, como o H_2O_2 (Fiorillo et al., 2005). Neste sentido, tendo em vista que o H_2O_2 é formado tanto em condições fisiológicas quanto patológicas, tem sido postulado que sua influência no direcionamento de vias de sinalização parece depender principalmente de sua concentração (Seedon et al., 2007; Kwon et al., 2003). Enquanto que, por um lado, observa-se a maior ativação de proteínas redox-sensíveis envolvidas com a sobrevivência celular quando os níveis de H_2O_2 encontram-se reduzidos, por

outro, verifica-se a maior ativação de proteínas pró-apoptóticas quando as concentrações de H₂O₂ elevam-se pronunciadamente (Kwon et al., 2003). Além desta influência exercida pelas concentrações, o tempo de exposição ao H₂O₂ e ao desbalanço redox celular também parecem ter um papel significativo no direcionamento de vias durante o RC. Fiorillo et al. 2005 verificaram uma associação do EOX, ativação da via da JNK e sinais de apoptose nos cardiomiócitos, 48 horas após induzirem sobrecarga cardíaca de volume em porcos por *shunt* arteriovenoso. Utilizando o mesmo protocolo, estes autores verificaram uma atenuação do EOX associado com hipertrofia dos cardiomiócitos e maior ativação da ERK após 96 horas (Fiorillo et al., 2005). Ou seja, parece que a via da JNK induz a apoptose dos cardiomiócitos, enquanto que a via da ERK induz a hipertrofia dos mesmos, nesse modelo de sobrecarga cardíaca de volume (Fiorillo et al., 2005). Desempenhando papel importante na regulação da JNK em diferentes estados redox celular está a quinase reguladora do sinal de apoptose (ASK-1). A maior ativação da JNK é estimulada pela ASK-1 num ambiente celular predominantemente oxidado (Hori & Nishida, 2009). Contra-regulando esse estímulo, atuam os sistemas antioxidantes, em especial a Trx. Além de sua capacidade antioxidante, a Trx pode alterar a atividade enzimática ou a localização de proteínas vizinhas, o que acaba afetando várias funções celulares, dentre elas a ASK-1. Nesse caso, a Trx age como um inibidor fisiológico por ligar-se diretamente na porção N-terminal da ASK-1 (Hori & Nishida, 2009). Essa interação Trx-ASK-1 sugere um possível mecanismo desta via de transdução, o qual parece ser iniciado pela oxidação da Trx pelo acúmulo de EAO. Desta forma, no desbalanço redox, verifica-se a dissociação entre essas duas proteínas que culmina na maior

ativação da ASK-1. Por ser observada predominantemente num meio intracelular reduzido, acredita-se que a inibição da ASK-1 dependa quase que exclusivamente das propriedades redox-sensíveis da Trx e não de uma interação direta proteína-proteína, o que não é totalmente descartado e exige estudos mais detalhados (Saitoh et al., 1998). Neste sentido, Izumiya et al., 2003 utilizaram ratos *knockout* para ASK-1 com o intuito de analisar as vias de sinalização intracelular durante a indução da hipertrofia cardíaca pela infusão de AngII. Foi verificada uma atenuação significativa em algumas proteínas associadas ao RC mal adaptado e morte celular no coração hipertrofiado (Izumiya et al., 2003). Corroborando estes achados, Ebrahimian et al., 2008 também mostraram uma relação inversa da expressão da Trx e da ASK-1 em ratas, infundidas com AngII, em situação de menopausa. Utilizando um modelo de RC induzido pelo hipertireoidismo, nosso grupo verificou um aumento da gp91-phox no homogeneizado cardíaco desses ratos, que apresentavam sinais claros de disfunção ventricular e hipertrofia cardíaca (dados não publicados). O aumento dessa subunidade da NADPH oxidase está associado com a maior formação de EAO que, por sua vez, parecem ser as responsáveis pelo direcionamento das vias de sinalização intracelular. Corroborando com esses achados, outros trabalhos mostram que o aumento da expressão gênica e protéica da gp91-phox, assim como na geração de EAO, é atenuado por bloqueadores dos receptores da AngII e/ou pela administração de antioxidantes como a vitamina E (Lu et al., 2004; Khaper & Singal, 2001; Palace et al., 1999). Esses achados reforçam outros estudos que propõem ação fundamental das EAO nos efeitos causados pela ativação do SRA.

Assim como as MAPK, a via da Akt também é modulada pelas concentrações de H_2O_2 e pelo estado redox celular. Sua ativação promove a supressão da morte celular e, conseqüentemente, do RC mal adaptado (DeBosch et al., 2006). As proteínas ativadas pela Akt fosforilam uma grande variedade de substratos intracelulares que regulam o metabolismo e a sobrevivência celular. Um aumento moderado e de curta duração da concentração de H_2O_2 associa-se com a maior fosforilação (ativação) da Akt e, por conseqüência, da sobrevivência celular (Cai et al., 2003). Entretanto, persistindo o estímulo por períodos prolongados e, principalmente, quando as concentrações de H_2O_2 tornam-se muito elevadas, ocorre um padrão inverso na modulação dessa via pela menor a ativação da Akt/mTOR e maior a ativação da proteína pró-apoptótica GSK-3 β (Shiojima et al., 2005). A inibição da GSK-3 β está associada com a proteção celular uma vez que é acompanhada pela inibição da JNK (Beurel & Jope, 2006). Ou seja, parece ocorrer uma modulação sinérgica entre essas proteínas por conversas-cruzadas entre duas vias de sinalização intracelular. Outra importante proteína sinalizadora envolvida com o direcionamento para a morte celular é o AIF. Esta se localiza em proximidade do complexo I da mitocôndria, mantendo seu funcionamento e também atuando no combate as EAO formadas nesse local. Além do mais, quando o AIF é liberado da mitocôndria por estímulos pró-apoptóticos e translocado para o núcleo, regula a morte celular por ativar enzimas de fragmentação do DNA (Yeste-Velasco et al., 2008; Lorenzo & Susin, 2007; Kim et al., 2003). Adicionalmente, na presença de altas concentrações de H_2O_2 e com o desbalanço redox celular, o AIF promove a

maior ativação de algumas proteínas pró-apoptóticas como, por exemplo, as caspases e as pertencentes à família da Bcl2 (Lorenzo & Susin, 2007).

Portanto, a maior formação de EAO pós-IM tem sido associada com o aumento do SRA e diminuição das defesas antioxidantes. Dentre estas EAO, destaca-se o H_2O_2 , uma molécula envolvida com o direcionamento de vias de sinalização intracelular durante o RC pós-IM. Desta forma, as adaptações do sistema antioxidante endógeno durante a transição do IM para a IC, em especial da Trx, poderiam ter um papel central neste processo.

2. HIPÓTESE

A ativação de proteínas redox-sensíveis durante o processo de remodelamento cardíaco induzido pelo infarto do miocárdio é modulada pela concentração de peróxido de hidrogênio e pelo estado redox celular.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil da concentração de peróxido de hidrogênio e o estado redox celular, além de suas associações com algumas vias de sinalização envolvidas no remodelamento cardíaco após o infarto do miocárdio.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar a função ventricular e o remodelamento cardíaco precoce e tardio induzido pelo infarto do miocárdio, determinando no ventrículo esquerdo:

- A concentração de H_2O_2 ;
- Os níveis de Trx-1
- O balanço redox celular;
- A atividade do sistema renina angiotensina;
- A ativação de proteínas redox-sensíveis (Akt, mTOR, GSK-3 β , ERK, JNK e AIF) envolvidas com a sobrevivência e morte celular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 52 ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS. Os animais foram mantidos em caixas plásticas, sendo 4 por caixa, e receberam ração e água à vontade, em ambiente com períodos de 12 horas luz/12 horas escuro e temperatura controlada ($\pm 22^{\circ}\text{C}$). Todos os protocolos realizados seguiram as normas e foram devidamente aprovados (número 2007673) pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2 Grupos e Sequência Experimental

Inicialmente, os animais foram anestesiados com quetamina (90 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) para análise ecocardiográfica basal da função cardíaca. Em seguida, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para indução do infarto do miocárdio pela oclusão da artéria coronária descendente anterior ou simulação dessa. Ao término da cirurgia, os animais ficaram em observação durante dois, sete ou vinte e oito dias. Ao término destes períodos, os animais foram anestesiados para uma nova avaliação ecocardiográfica, assim como para avaliação hemodinâmica por cateterismo intracardíaco seguida de eutanásia por exsanguinação. Portanto, os animais foram divididos em 6 grupos de acordo com o procedimento cirúrgico e o tempo de pós-operatório:

- 1) Cirurgia fictícia – 2 dias (2d-Sham), n=9:** animais que foram avaliados dois dias após a cirurgia fictícia;
- 2) Infarto do miocárdio – 2 dias (2d-MI), n=9:** animais que foram avaliados dois dias após a oclusão coronariana;
- 3) Cirurgia fictícia – 7 dias (7d-Sham), n=8:** animais que foram avaliados sete dias após a cirurgia fictícia;
- 4) Infarto do miocárdio – 7 dias (7d-MI), n=8:** animais que foram avaliados sete dias após a oclusão coronariana;
- 5) Cirurgia fictícia – 28 dias (28d-Sham), n=9:** animais que foram avaliados vinte e oito dias após a cirurgia fictícia;
- 6) Infarto do miocárdio – 28 dias (28d-MI), n=9:** animais que foram avaliados vinte e oito dias após a oclusão coronariana.

4.3 Indução do Infarto do Miocárdio

O infarto do miocárdio (IM) foi realizado por um método adaptado ao descrito por Johns e Olson em 1954 (Johns & Olson, 1954). Esse consistiu numa ligadura com fio monofilamentar 6.0 que promoveu uma oclusão total da artéria coronária descendente anterior. Para isso os animais foram anestesiados com dose única de quetamina (90 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) injetada intraperitonealmente, e tricotomizados na região anterior do hemitórax, à esquerda. Uma vez abolido o reflexo doloroso de retirada, foi feita uma intubação orotraqueal com cateter venoso periférico 14 para ventilação mecânica com volume de 10 mL/kg numa frequência de aproximadamente 80 ciclos por minuto. Feito isso, uma incisão foi efetuada no quarto espaço

intercostal esquerdo para visualização da artéria coronária descendente anterior. Em seguida, o pericárdio foi removido e a ligadura efetuada no terço médio dessa artéria coronária a aproximadamente 3 milímetros de sua origem entre o átrio esquerdo e a artéria tronco pulmonar. A eficácia da oclusão foi verificada pela mudança da coloração do miocárdio isquemiado. Em seguida, o tórax foi suturado e o pneumotórax drenado com uma seringa de 10 mL. Os animais controles foram submetidos à cirurgia fictícia que consistiu dos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da oclusão coronariana.

4.4 Avaliações Funcionais Cardíacas

4.4.1 Análise Ecocardiográfica

Sob efeito anestésico, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo (45°) para obtenção das imagens cardíacas. Foi utilizado o sistema EnVisor Philips (Andover, MA, USA), com um transdutor de alta frequência e alta resolução (12-13 MHz). As medidas foram efetuadas sempre por um operador treinado e experiente para análises ecocardiográficas em ratos.

O tamanho da área infartada foi mensurado no final da diástole num plano transversal basal (nos folhetos da valva mitral), médio (nos músculos papilares) e apical (distal aos músculos papilares, mas antes da curva da cavidade ventricular). Este foi estimado como uma porcentagem do perímetro endocárdico que apresentou acinesia e/ou hipocinesia (Peron et al., 2006).

Os diâmetros ventriculares, sistólico e diastólico, foram mensurados nos planos basal, medial e apical utilizando o módulo M. Uma média dos 3 planos

foi calculada e expressa em centímetros (cm). Já as áreas ventriculares foram obtidas pelo traçado da borda endocárdica nos 3 planos citados anteriormente. Uma média destes planos foi calculada e expressa em cm^2 (Nozawa et al., 2006).

A função sistólica do ventrículo esquerdo foi analisada por 3 parâmetros:

- 1) Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE) calculada pela fórmula de Simpson (Mercier et al., 1982) (volume diastólico final – volume sistólico final / volume diastólico final) e expressa em porcentagem (%);
- 2) fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FEnc) calculada pela fórmula (diâmetro diastólico – diâmetro sistólico / diâmetro sistólico) e expressa em porcentagem (%);
- 3) mudança de área fracional (MAF) calculada pela fórmula (área diastólica – área sistólica / área diastólica) e expressa em porcentagem (%).

4.4.2 Cateterismo Cardíaco

O cateterismo cardíaco foi realizado sem o conhecimento prévio dos grupos experimentais com o objetivo de registrar a pressão sistólica do ventrículo esquerdo ventricular (PSVE), pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE), índice de contratilidade (+dP/dt), índice de relaxamento (-dP/dt) e frequência cardíaca (FC). Os animais foram anestesiados e uma cânula, confeccionada em tubos tygon PE-50 (Clay/Adams, USA), preenchida com NaCl 0,9% (p/v) e heparina sódica (Liquemine-Roche, 5000U) foi implantada na câmara ventricular esquerda via artéria carótida comum direita. Em seguida a cânula foi conectada a um transdutor eletromagnético de

pressão (Strain-Gauge-Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) acoplado a um pré-amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8805C). Os sinais obtidos foram gravados em um microcomputador equipado com um sistema de aquisição de dados (AT/MCA CODAS-DATAQ instruments, Akron, OH, EUA) com taxa de amostragem de 2000 Hz por canal. Foram realizados registros pressóricos aórticos previamente e após a canulação ventricular para certificação de uma possível lesão da valva semilunar aórtica (Araujo et al., 2008).

4.5 Sacrifício, Cálculo do Índice de Hipertrofia Cardíaco e Preparo do Tecido

Imediatamente após o registro intraventricular, ainda sob efeito anestésico, os animais foram mortos por deslocamento cervical. O coração foi rapidamente retirado e pesado para o cálculo do índice de hipertrofia cardíaco pela razão do peso em miligrama de tecido cardíaco por grama de peso corporal (Araujo et al., 2008). Feto isso, o ventrículo esquerdo foi dissecado e fatiado longitudinalmente. Essas amostras ventriculares foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no freezer -80°C até a realização das dosagens teciduais.

4.6 Quantificação das Proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Bradford (Bradford, 1976) que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na

concentração de 1 mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL.

4.7 Dosagem da Concentração de Peróxido de Hidrogênio

O método está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete (HRPO), resultando num produto que absorve em 610 nm. Fatias do tecido cardíaco foram incubadas por 60 minutos a 37°C em tampão fosfato 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L). Após, os sobrenadantes foram coletados e incubados com solução de vermelho de fenol 0,28 mmol/L e HRPO 8,5 U/mL. Após 5 minutos, adicionou-se NaOH 1mol/L e realizou-se a leitura a 610 nm. O resultados foram expressos em nmoles de H₂O₂ por grama de tecido (Pick & Keisari, 1980).

4.8 Determinação da Concentração de Glutathiona Reduzida e Oxidada

A razão entre a concentração de glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) foi determinada no homogeneizado de tecido cardíaco (100 mg) conforme descrito por Akerboom e Sies (Akerboom & Sies, 1981). Para isso, as amostras foram desproteinizadas com ácido perclórico 2 mol/L, centrifugada por 10 minutos 1000xg e o sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O ensaio foi realizado adicionando às amostras uma solução de tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,2), nicotinamida dinucleotídeo fosfato 2 mmol/L, glutathiona redutase 0,2 U/mL, ácido 5,5' ditiobis (2-nitro benzóico) 70

$\mu\text{mol/L}$. Para determinar a glutationa oxidada adicionou-se ao sobrenadante 20 mmol/L de N-etilmaleimida (NEM) e, após, as amostras também foram neutralizadas com hidróxido de potássio 2 mol/L. A leitura foi feita com o comprimento de onda de 412 nm e os valores obtidos foram expressos em mmol por grama de tecido.

4.9 Análise do Imunoconteúdo por Western Blot

As amostras de tecido foram descongeladas em tampão Tris-EDTA gelado (Tris HCl 100 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, pH=7,4) e homogeneizadas usando um homogenizador Politron em dois pulsos de 15s com intervalo de 10s. Foi adicionado ao tampão, aprotinina (10 $\mu\text{g/mL}$), leupepsina (10 $\mu\text{g/mL}$), pepstatina A (10 $\mu\text{g/mL}$) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (20 $\mu\text{mol/L}$), para prevenir a degradação protéica. As concentrações de proteína foram analisadas e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína (Klein et al., 1995). Cem microgramas de proteína foram expostos à eletroforese de gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) num sistema descontínuo usando 15% (p/v) de gel separador e 5% (w/v) de gel fixador. As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membranas usando tampão Towbin modificado, contendo Tris 20 mmol/L, glicina 150 mmol/L, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH= 8,3) numa unidade de transferência Bio-Rad resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados por 1h em incubação com solução bloqueadora (5% (p/v) de leite desnatado) em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. As

membranas foram processadas por imunodeteção, usando-se os anticorpos primários listados na tabela 1.

Tabela 1. Lista de anticorpos primários utilizados neste trabalho.

Anticorpo	Peso molecular (kDa)
Fosfo Akt e Akt total	60
Fosfo mTOR e mTOR total	289
Fosfo GSK-3 β e GSK-3 β total	46
Fosfo ERK e ERK total	42-44
Fosfo JNK e JNK total	46-54
AngII	60
AT1	43
AT2	44
AIF	57
Trx-1	12
GAPDH	35

Akt, proteína quinase B; mTOR, *mammalian target of rapamycin*; GSK-3 β , glicogênio sintase quinase; ERK, proteína quinase regulada por sinal extracelular; JNK, quinase c-Jun N-terminal; AngII, angiotensina II; AT1, receptor da angiotensina 1; AT2, receptor da angiotensina 2; AIF, fator de indução à apoptose; Trx-1, tioredoxina 1; GAPDH, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase.

Como anticorpos secundários foram utilizados os anticorpos anti-coelho, anti-cabra e anti-camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). As membranas foram incubadas com solução de ECL adaptada do kit comercial (Amersham Biosciences) e reveladas por quimiluminescência. Os filmes autoradiográficos foram analisados e quantificados através de um densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT) e os resultados foram expressos em unidades arbitrárias de pixels. Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados utilizando como referência um padrão de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados foram normalizados pelo imunocnteúdo do GAPDH (Diniz et al., 2009).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Os testes utilizados foram: test t de Student para amostras não pareadas ao compararmos 2 grupos (artigo I); ANOVA de duas vias complementado pelo teste de Student-Newmann-Keuls ao compararmos 6 grupos e considerando dois fatores de influência (artigo II); correlação de Pearson's para realizarmos as associações entre os diferentes parâmetros obtidos. O software SigmaStat 3.5 foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo foram apresentados na forma de dois artigos para a submissão em revistas internacionais. O primeiro artigo intitulado “*Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats*” foi publicado em 30/03/2010 na revista *Molecular and Cellular Biochemistry*. Já o segundo artigo intitulado “*The correlation of redox-sensitive proapoptotic proteins and thioredoxin in early and late post-infarction cardiac remodeling*” foi submetido em 11/10/2010 para o *Journal of Cardiovascular Pharmacology* e encontra-se em processo de avaliação.

6.1 Artigo I: *Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats.*

Neste artigo foi demonstrada uma associação entre os níveis de peróxido de hidrogênio e o desbalanço redox com uma disfunção ventricular 28 dias após a indução do infarto do miocárdio em ratos, quando observamos o direcionamento de algumas proteínas redox-sensíveis para uma hipertrofia cardíaca mal adaptada.

Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats

Paulo Cavalheiro Schenkel · Angela Maria Vicente Tavares ·
Rafael Oliveira Fernandes · Gabriela Placoná Diniz · Mariane Bertagnolli ·
Alex Sander da Rosa Araujo · Maria Luiza Barreto-Chaves ·
Maria Flavia Marques Ribeiro · Nadine Clausell · Adriane Belló-Klein

Received: 20 November 2009 / Accepted: 26 February 2010
© Springer Science+Business Media, LLC. 2010

Abstract In this study, we investigated the oxidative stress influence in some prosurvival and proapoptotic proteins after myocardial infarction (MI). Male Wistar rats were divided in two groups: Sham-operated (control) and MI. MI was induced by left coronary artery occlusion. 28-days after surgery, echocardiographic, morphometric, and hemodynamic parameters were evaluated. Redox status (reduced to oxidized glutathione ratio, GSH/GSSG) and hydrogen peroxide levels (H_2O_2) were measured in heart tissue. The p-ERK/ERK, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR and p-GSK-3 β /GSK-3 β ratios, as well as apoptosis-inducing factor (AIF) myocardial protein expression were quantified by Western blot. MI group showed an increase in cardiac hypertrophy (23%) associated with a decrease in ejection fraction (38%) and increase in left ventricular end-diastolic pressure (82%) when compared to control, characterizing ventricular dysfunction. Redox status imbalance was seen in MI animals, as evidenced by the decrease in the GSH/GSSG ratio (30%) and increased levels of H_2O_2 (45%). This group also showed an increase in the ERK phosphorylation and a reduction of Akt and mTOR phosphorylation when compared to control. Moreover, we showed a

reduction in the GSK-3 β phosphorylation and an increase in AIF protein expression in MI group. Taken together, our results show increased H_2O_2 levels and cellular redox imbalance associated to a higher p-ERK and AIF immunocent, which would contribute to a maladaptive hypertrophy phenotype.

Keywords Akt · ERK · GSH/GSSG ·
Hydrogen peroxide · Myocardial infarction ·
Oxidative stress

Introduction

Many evidences suggest that cardiac remodeling post-myocardial infarction (MI) leads to cardiomyocyte hypertrophy, apoptosis, and ventricular dysfunction [1–4]. However, cardiac remodeling is not limited to changes in ventricular morphology. Several studies have reported biochemical and electrical changes in the heart after MI [2–5]. Although the initial hypertrophic response after MI may be beneficial, sustained stimuli induce pathological cardiac hypertrophy, promoting the transition to heart failure [6]. The hypertrophic response appears to be influenced by the nature of the signaling stimulus. The cardiomyocyte can either survive, leading to beneficial hypertrophy, or undergo apoptosis, which promotes ventricular failure and dilation [7, 8]. Recent reports demonstrate that reactive oxygen species (ROS) regulate the cardiomyocyte phenotypes [1, 9]. Considering that ROS are formed under both physiological and pathological conditions in mammalian tissue, the intracellular signaling pathways appear to be related to the type of ROS, the site of its production and its concentration [9, 10]. Recent investigations have proposed an important role for the

P. C. Schenkel · R. O. Fernandes · M. Bertagnolli ·
A. S. da Rosa Araujo · M. F. M. Ribeiro · A. Belló-Klein (✉)
Physiology Department, Federal University of Rio Grande do
Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, RS CEP 90050-170,
Brazil
e-mail: belklein@ufrgs.br; pcschenkel@yahoo.com.br

A. M. V. Tavares · N. Clausell
Cardiovascular Research Laboratory, Clinical Hospital of Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

G. P. Diniz · M. L. Barreto-Chaves
Laboratory of Cellular Biology and Functional Anatomy,
University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Published online: 30 March 2010

 Springer

redox status and hydrogen peroxide (H_2O_2) as signaling agents [10–12]. Reduced glutathione (GSH), the most abundant antioxidant in mammalian cells, helps to maintain the intracellular environment constantly reduced. In MI, the ratio between GSH and oxidized glutathione (GSSG), GSH/GSSG, may decrease significantly, evidencing redox imbalance [4, 13]. ROS, including H_2O_2 , can either participate in regulating survival pathways or inducing irreversible cellular damage and death post-MI. Depending on H_2O_2 concentration, different signaling pathways are modulated by changes in the activity of redox-sensitive phosphatases and kinases, leading to subsequent modifications in gene transcription and cell phenotype [10]. Although signal transduction pathways are complex and abundant, the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and protein kinase B (Akt/PKB) pathways, which require an extensive cascade of intracellular events, have been shown as hypertrophic pathways [8, 14, 15]. ERK is a mitogen-activated protein kinase (MAPK) stress-activated that can activate physiologic hypertrophy and/or maladaptive hypertrophy, depending on the cellular redox status and H_2O_2 concentration [16]. Kwon et al. [10] showed that low levels of H_2O_2 increase the activation of ERK 1/2 and promote cardiac hypertrophy in the absence of apoptosis. Conversely, a higher level of H_2O_2 , while still activating ERK1/2, induces cell death [10]. As cited before, Akt pathway is also involved in cell growth. Akt/PKB is a serine/threonine kinase family that consists of three isoforms, Akt1, Akt2, and Akt3. When activated, these proteins stimulate prosurvival and inactivate proapoptotic substrates, leading to a beneficial cardiac remodeling [17]. Among others, mammalian target of rapamycin (mTOR) and glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) are known downstream effectors of the Akt. While mTOR is associated with beneficial cardiac remodeling, the GSK-3 β is a critical negative modulator of cardiomyocyte hypertrophy [18]. When GSK-3 β is dephosphorylated (activate state), it promotes cell death in response to many stimuli, such as oxidative stress [18]. In addition, the inhibition of GSK-3 β has been found to be protective against apoptosis in many circumstances, although its molecular basis is not fully understood [14, 18]. Moreover, the increase in the activity of ERK and Akt proteins can also inactivate other proapoptotic substrates such as apoptosis-inducing factor (AIF) [19, 20]. AIF, a proapoptotic signal transduction molecule, is released into the cytoplasm and translocates to the nucleus, where it digests chromatin into 50-kbp DNA fragments by activating a nuclear DNase [21, 22]. Furthermore, AIF can also act in the mitochondria, triggering the release of potentially toxic mitochondrial proteins under high ROS levels, such as H_2O_2 [21].

Besides the evidences showing the involvement of oxidative stress in post-MI cardiac remodeling, its influence

on prosurvival and/or proapoptotic proteins involved in this process has not been completely explored, justifying the need of more studies. Thus, the main objective of this study was to determine if redox status and H_2O_2 levels would activate selectively such proteins 28 days post-MI in rats.

Materials and methods

Animals

Nineteen male Wistar rats (200 ± 20 g) were obtained from the Central Animal House of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Animals were housed in plastic cages and received water and pelleted food ad libitum. They were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21°C, 12 h light/dark cycle). They were divided into two groups: sham-operated (control; $n = 9$) and MI (MI; $n = 9$). It was observed a 10% mortality index post-MI. All animal protocols were in accordance with the Guidelines for Ethical Care of Experimental Animals from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Surgical procedure

In brief, rats were anesthetized (ketamine 90 mg/kg; xylazine 20 mg/kg, i.p.), and MI was induced according to a technique described previously [23]. The animals were submitted to a surgical procedure of ligation of the descending anterior left coronary artery, or to a sham operation in which all surgical procedures were performed, except the suture around the coronary artery. Surviving rats were assessed 28 days after coronary occlusion.

Echocardiographic analysis

Animals were placed in left lateral decubitus position (45°) to obtain cardiac images. EnVisor Philips system (Andover, MA, USA) was used, with a 12–13 MHz transducer, at 2-cm depth and fundamental and harmonic imaging. Images were captured by a trained operator with experience in animal echocardiography.

MI size

On each echocardiographic transverse plane (basal, middle, and apical) the arc corresponding to the infarcted segments (akinetic and/or hypokinetic region—AHR) and to the total endocardial perimeter (EP) were measured at the end-diastole. Infarction size (IS) was estimated as %IS using the following formula: $IS = (AHR/EP) \times 100$ [24]. *Left ventricular function*—fractional area change (FAC) was

calculated as follows: (FAC = diastolic area – systolic area/ diastolic area \times 100). Left ventricular ejection fraction (LVEF) was calculated as: (end-diastolic volume – end-systolic volume/end-diastolic volume) \times 100; end-diastolic and end-systolic cavity volumes were calculated using Simpson's rule [25]. Left ventricular fractional shortening (LVFS) was obtained by the equation: $LVFS = Dd - Sd/Dd \times 100$ (diastolic diameter—Dd; systolic diameter—Sd). *Left ventricular dimensions*—the end-diastolic and end-systolic transverse areas (cm²) were obtained by tracing the endocardial border at three levels: basal (at the tip of the mitral valve leaflets), middle (at the papillary muscle level), and apical (distal from the papillary muscle but before the final curve cavity) [26]. The left ventricular end-systolic diameter (LVESD) and left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) were also measured in the three planes using the M-Mode. The final value for each animal was taken as the mean of all the three planes and expressed in centimeters. The final volume values to all calculations for each animal were based on three transverse planes. Two-dimensional images were recorded in CD for later review and off-line analysis.

Hemodynamic measurements and cardiac hypertrophy development

Cardiac hemodynamics was assessed 28 days after surgical procedure of the ligation of the left coronary artery or sham operation. In brief, rats were anesthetized (ketamine 90 mg/kg; xylazine 20 mg/kg, i.p.) and the right carotid artery was cannulated with a PE 50 catheter connected to a strain gauge transducer (Narco Biosystem Pulse Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) linked to a pressure amplifier (HP 8805C, Hewlett Packard, USA). Pressure readings were taken in a microcomputer equipped with an analogue-to-digital conversion board (Biopac 1 kHz sampling frequency, Biopac Systems, Inc., Goleta, California, USA). The catheter was advanced into the left ventricle (LV) to record the heart rate (HR, bpm), the left ventricular systolic pressure (LVSP, mmHg), the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP, mmHg), and its positive and negative derivatives ($dP/dt_{\max/\min}$, mmHg/s).

Tissue preparation

Immediately after hemodynamic measurements, rats were euthanized by cervical dislocation and the hearts were rapidly excised and weighed to assess cardiac hypertrophy by heart weight (in mg) to body weight (in g) ratio. Cardiac tissue samples were removed and frozen at -80°C for the evaluation of GSH/GSSG ratio, hydrogen peroxide content, and protein expression by Western blot.

Determination of reduced and oxidized glutathione

To determine reduced and oxidized glutathione concentration, tissue was deproteinized with 2 mol/l perchloric acid, centrifuged for 10 min at $1,000\times g$, and the supernatant was neutralized with 2 mol/l potassium hydroxide. The reaction medium contained 100 mmol/l phosphate buffer (pH 7.2), 2 mmol/l nicotinamide dinucleotide phosphate acid, 0.2 U/ml glutathione reductase, and 70 mmol/l 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). To determine reduced glutathione, the supernatant was neutralized with 2 mol/l potassium hydroxide, to react with 70 mmol/l 5,5'-dithiobis (2-nitro benzoic acid), and the absorbance values were measured at 420 nm [27].

Hydrogen peroxide steady-state concentration

The assay was based in horseradish peroxidase (HRPO)-mediated oxidation of phenol red by hydrogen peroxide, leading to the formation of a compound that absorbs at 610 nm. Slices of fresh tissue from ventricle were incubated for 30 min at 37°C in phosphate buffer 10 mmol/l (NaCl 140 mmol/l and dextrose 5 mmol/l). The supernatants were transferred to tubes with phenol red 0.28 mmol/l and 8.5 U/ml HRPO. After 5-min incubation, NaOH 1 mol/l was added and it was read at 610 nm. The results were expressed in nanomoles $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g}$ tissue [28].

Western blot analysis

Tissue homogenization, electrophoresis, and protein transference were performed as described elsewhere [29, 30]. The membranes were processed for immunodetection using rabbit anti-total ERK1/2 polyclonal antibody, mouse anti-phospho monoclonal ERK 1/2 (42/44 kDa), goat anti-total Akt polyclonal antibody, rabbit anti-phospho Akt (60 kDa), rabbit anti-total mTOR polyclonal antibody, rabbit anti-phospho mTOR (289 kDa), rabbit anti-total GSK-3 β polyclonal antibody, rabbit anti-phospho GSK-3 β (47 kDa), rabbit anti-AIF polyclonal antibody (57 kDa), and mouse anti-GAPDH monoclonal antibody (35 kDa) as primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA or Cell Signaling Technology, Beverly, MA). The bound primary antibodies were detected using rabbit anti-goat, rabbit anti-mouse, or goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate secondary antibodies and membranes were revealed for chemiluminescence. The autoradiographs generated were quantitatively analyzed with an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad,

CA, USA). The results from each membrane were normalized through Ponceau red method [31].

Determination of protein concentration

Protein was measured by the method of Bradford using BSA as standard [32].

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. To compare groups, we used Student's *t* test. The correlation between two variables was analyzed by Pearson's correlation. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Echocardiographic analysis

Table 1 shows that the mean infarction size in surviving rats was 42% of the left ventricle. Corroborating with these findings, infarcted animals have shown a decrease in the ventricular contractile function evidenced by the reduction in LVEF, FAC, and LVFS when compared to the controls (Table 1). These animals have also shown increased ventricular diameters and areas during the systole and diastole (Table 1). This feature can be observed in Fig. 1, where a typical echocardiographic record shows the reduced wall kinesis. No changes were observed in the heart rate.

Hemodynamic and morphometric evaluations

MI has induced cardiac hypertrophy as detected by the heart to body weight ratio (mg/g), which was 28% higher in the infarcted group than control (Table 1). The cardiac hypertrophy was accompanied by hemodynamic changes: increased (82%) left ventricular end diastolic pressure (LVEDP), decreased left ventricular systolic pressure (LVSP), and pressure derivatives ($dP/dt_{\max/\min}$) by 8%, 31%, and 40%, respectively. These findings are typical signals of heart failure (Table 1).

Myocardial redox status and hydrogen peroxide levels

The redox status was changed in the infarcted animals compared to control (Fig. 2a). The GSH/GSSG ratio was significantly reduced (30%) in infarcted animals and it was positively correlated with FAC ($r = 0.70$, $P < 0.01$) and LVEF ($r = 0.62$, $P < 0.01$). The myocardial hydrogen peroxide (H_2O_2) steady-state concentration was higher (45%) in the MI group when compared to control (Fig. 2b). This parameter was positively correlated with cardiac

Table 1 Morphometric, echocardiographic, and hemodynamic evaluations of the experimental groups 28 days post-MI

Parameters	Control	MI
Morphometric		
<i>n</i>	9	9
Final body weight (g)	342 \pm 8	340 \pm 10
Heart weight/BW (mg/g)	2.94 \pm 0.09	3.61 \pm 1.17*
Echocardiographic		
<i>n</i>	9	9
MI size (%)	–	42 \pm 1
HR (beats/min)	254 \pm 21	261 \pm 15
LVEF (%)	76 \pm 2	47 \pm 3*
LVFS (%)	52 \pm 4	29 \pm 2*
LVESD (cm)	0.33 \pm 0.03	0.59 \pm 0.02*
LVEDD (cm)	0.68 \pm 0.03	0.83 \pm 0.02*
FAC (area%)	70 \pm 2	38 \pm 2*
LVSA (cm ²)	0.12 \pm 0.01	0.40 \pm 0.03*
LVDA (cm ²)	0.39 \pm 0.02	0.64 \pm 0.03*
Hemodynamic		
<i>n</i>	7	9
LVEDP (mmHg)	8.7 \pm 0.2	15.8 \pm 2.0*
LVSP (mmHg)	115 \pm 6.1	106 \pm 3.8*
LV dP/dt_{\max} (mmHg/s)	12144 \pm 1186	8338 \pm 564*
LV dP/dt_{\min} (mmHg/s)	7765 \pm 835	4678 \pm 411*

Values are expressed as mean \pm SEM

BW body weight, HR heart rate, LVEF left ventricular ejection fraction, LVFS left ventricular fraction shortening, FAC fractional area change, LVESD left ventricular end systolic diameter, LVEDD left ventricular end diastolic diameter, LVSA left ventricular systolic area, LVDA left ventricular diastolic area, LVEDP left ventricular end diastolic pressure, LVSP left ventricular systolic pressure, LV dP/dt_{\max} maximal value of the 1st temporal derivate of the left ventricular pressure, LV dP/dt_{\min} minimum value of the 1st temporal derivate of the left ventricular pressure

* Significantly different from control ($P < 0.05$)

hypertrophy ($r = 0.89$, $P < 0.001$), LVEDP ($r = 0.70$, $P < 0.05$), LVESD ($r = 0.58$, $P < 0.05$), and LVEDD ($r = 0.59$, $P < 0.05$).

Protein expression

The MI group showed increase p-ERK/total ERK ratio (63%) when compared to control (Fig. 3), that was positively correlated with cardiac hypertrophy ($r = 0.85$, $P < 0.01$). The p-Akt/total Akt ratio (42%) and p-mTOR/total mTOR ratio (80%) were decreased in MI when compared to control (Fig. 4a, b). p-Akt/total Akt ratio was negatively correlated with LVEDP ($r = -0.96$, $P < 0.006$) and positively correlated with GSH/GSSG ($r = 0.83$, $P < 0.05$). p-mTOR/total mTOR ratio was also positively correlated with GSH/GSSG ($r = 0.92$, $P < 0.01$). p-GSK-3 β /total GSK-3 β ratio decreased by 33% in infarcted

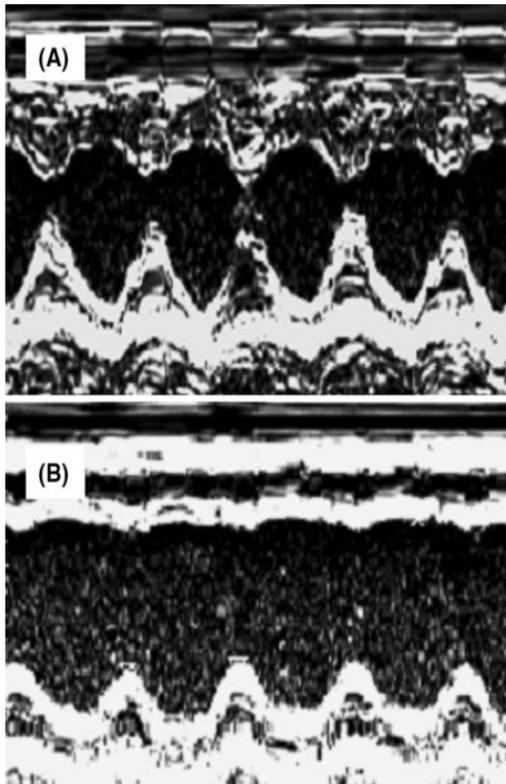


Fig. 1 Representative M-mode echocardiographic record from the basal view of the left ventricle of the control (a) and MI (b) animals. Note the increase of the left ventricular cavity and loss of left ventricle free wall kinesis

animals when compared to control (Fig. 5a). Corroborating these last findings, AIF protein expression, another intracellular target to apoptosis, was significantly higher (66%) in MI group than control (Fig. 5b). There was a negative correlation between AIF protein levels and LVEF ($r = -0.83$, $P < 0.05$) and LVFS ($r = -0.72$, $P < 0.05$).

Discussion

The main findings of this study were a well-characterized cardiac hypertrophy and dysfunction 28 days post-MI, which was associated with an increase in H_2O_2 levels and redox imbalance. Associated with this, our study showed a distinct pattern of ERK and Akt phosphorylation, two proteins associated with myocardial remodeling post-MI; while ERK was increased, Akt and mTOR were reduced. Furthermore, proteins associated with cell death, GSK-3 β and AIF, showed higher activation in infarcted animals.

Left coronary artery ligation in rats has been used as a MI model to study ventricular dysfunction [23, 33]. In this study, the low mortality and the similarity among the infarcted areas exhibited in all animals are indicative of

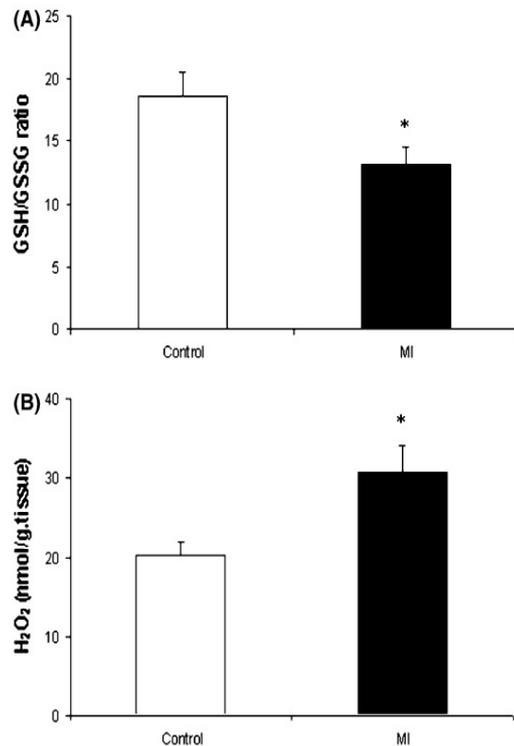


Fig. 2 Myocardial redox status (GSH/GSSG) (a) and hydrogen peroxide steady-state concentration (b) 28 days after myocardial infarction (MI). Values are expressed as mean \pm SEM from 4 to 6 animals per group. * Significantly different from control ($P < 0.05$)

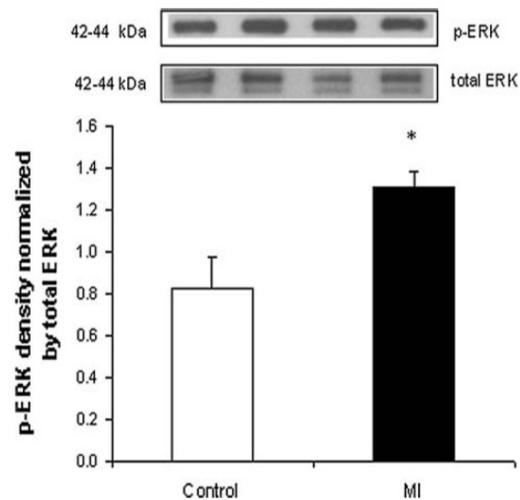


Fig. 3 Western blot analysis in cardiac homogenates using p-ERK and total ERK antibodies. Values are expressed as mean \pm SEM from four animals per group (one representative gel of Western blot experiments showing two bands for each experimental group). * Significantly different from control ($P < 0.05$)

the effectiveness of the method used and the good management of surgical procedures. The increase in diameters and areas of the left ventricular chamber during systole and

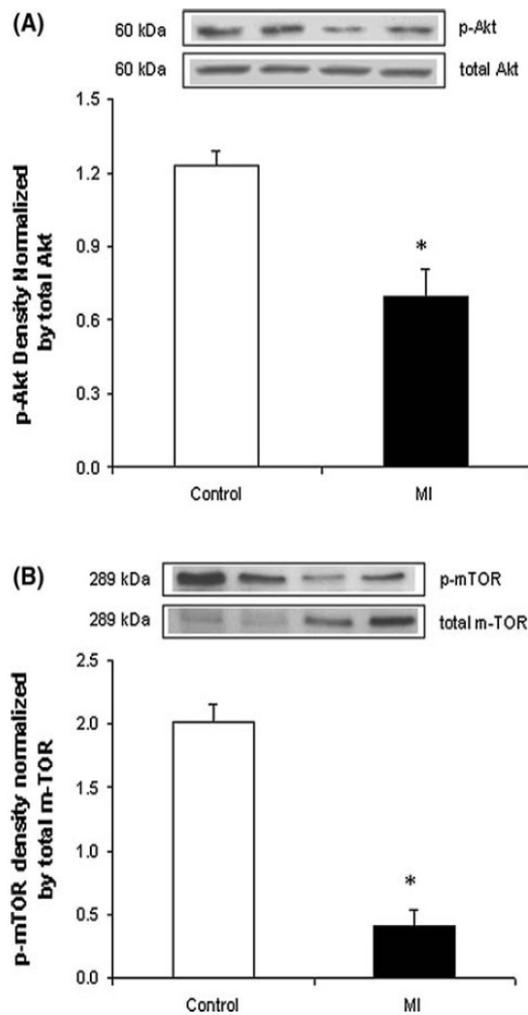


Fig. 4 Western blot analysis in cardiac homogenates using p-Akt and total Akt antibodies (a), p-mTOR and total mTOR antibodies (b). Values are expressed as mean \pm SEM from four animals per group (one representative gel of western blot experiments showing two bands for each experimental group). * Significantly different from control ($P < 0.05$)

diastole, 28 days after coronary occlusion, characterize the loss of systolic function and cardiac dilation, respectively. Moreover, the decrease in ejection fraction (LVEF), fractional shortening (LVFS) and FAC, indicators of cardiac contractile function, characterize ventricular dysfunction in the infarcted animals. In addition to the echocardiographic findings, hemodynamic data, such as the LVEDP increase and the LVSP and $dP/dt_{\max/\min}$ decrease demonstrated ventricular dysfunction in MI group. These changes are similar to those previously reported [6, 8], indicating a development of maladaptive cardiac hypertrophy toward to heart failure.

The hypertrophic response of cardiomyocytes after MI aims to maintain cardiac output and wall stress. In a short

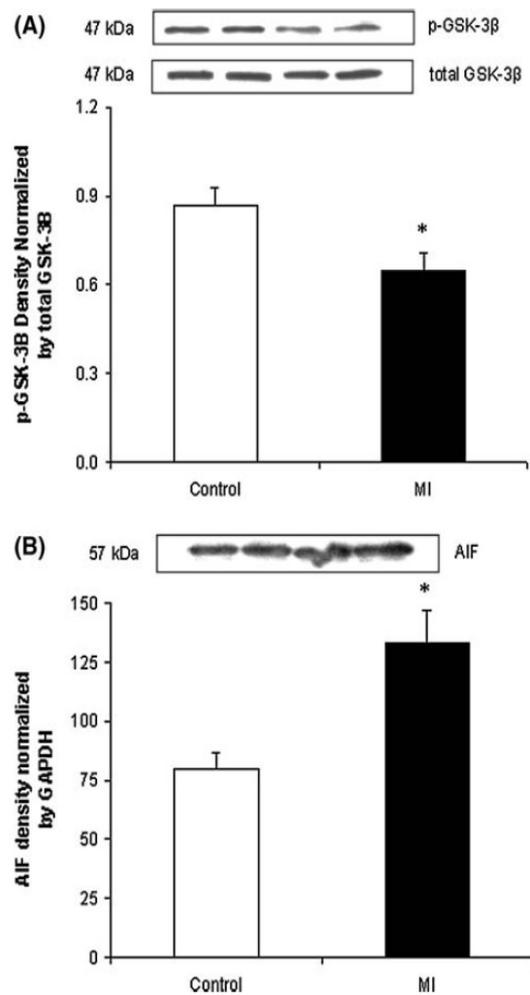


Fig. 5 Western blot analysis in cardiac homogenates using p-GSK-3 β and total GSK-3 β antibodies (a), AIF antibody (b). Values are expressed as mean \pm SEM from four animals per group (one representative gel of western blot experiments showing two bands for each experimental group). * Significantly different from control ($P < 0.05$)

term, cardiomyocyte hypertrophy has been considered to be an adaptive response, since it normalizes the increase in wall stress induced by mechanical overload [2, 3]. However, it has been observed that long-term cardiac hypertrophy predisposes to ventricular dysfunction and leads to heart failure [33]. Many influences may determine the progression from hypertrophy to failure, such as the time after coronary occlusion, infarct size, neurohumoral stimulation, among others that may contribute to oxidative stress establishment. Evidences in literature indicate that, in the compensatory stage, antioxidant reserve is increased, while in the decompensate/failing stage, antioxidants are reduced and free radicals production is increased, characterizing an oxidative stress condition [34].

We found a positive correlation between GSH/GSSG ratio, FAC, and LVEF, suggesting an association between oxidative stress and ventricular dysfunction post-MI. A reduced GSH/GSSG ratio has been shown in many different models of heart failure [4, 8, 29, 35]. Stone et al. [11] reported that severe oxidative stress is characterized by a significant oxidation of GSH that occurs under high levels of H₂O₂. H₂O₂ have multiple potential action sites within cardiovascular tissues and can exert beneficial or deleterious effects, depending on its levels [36]. It has previously demonstrated that high levels of H₂O₂ are associated with a necrotic phenotype and low levels may promote cardiomyocyte hypertrophy [10]. In our study, H₂O₂ was positively correlated with hypertrophy, LVESD, LVEDD, and LVEDP, suggesting that this ROS may have a role in the transition from hypertrophy to ventricular dysfunction and heart failure [37].

In parallel with the classic concept of oxidative stress, emerge a more contemporary one, where ROS are seen as molecules capable to modulate redox-sensitive signaling pathways, determining cellular function [38]. Some evidence is provided in the literature demonstrating the direct involvement of H₂O₂ in intracellular signaling pathways that mediate hypertrophy (Akt pathway) and its progression to myocardial dysfunction and heart failure (ERK pathway) [37, 39–41]. Since ERK activation is related to a maladaptive cardiac remodeling, this protein may be one of the responsible mechanisms leading to the progression from cardiac hypertrophy to heart failure in our study. In fact, we have observed a positive correlation between cardiac hypertrophy and ERK phosphorylation. Furthermore, our data have shown a decrease in Akt and mTOR phosphorylation further suggesting that these proteins are not associated with the hypertrophy observed in the MI group. In this group, redox imbalance (given by a reduced GSH/GSSG ratio) was seen and it was negatively correlated to prosurvival proteins (Akt/mTOR). Other studies have shown similar associations in cell culture. A long-term exposure to high concentrations of H₂O₂ in endothelial cultured cells can induce Akt inactivation with decompensate hypertrophy and apoptosis pathways activation [40, 41]. Nair et al. [17] have also reported a strong correlation between cell death and less Akt activation in neuronal cell culture. Our study corroborates these findings, since the lower Akt phosphorylation was associated to increased proapoptotic proteins (GSK-3 β and AIF). GSK-3 β is a downstream target of the Akt signaling pathway and plays a major role in mediating cell death induced by oxidative stress [17]. It was observed in our study that it was less phosphorylated, suggesting its lower inhibition. AIF was found to be released only in the reperfusion phase during myocardial ischemia–reperfusion, probably triggered by factors produced during the reperfusion, such as

ROS [22]. In our study, the increased H₂O₂ levels and cellular redox imbalance in MI group would contribute to triggering the release of AIF from mitochondria by increasing mitochondrial membrane permeability. The drop in LVEF 28 days post-MI and its negative correlation with AIF protein expression characterize an association between cell death and heart dysfunction. Thus, it is probable that the activation of the proapoptotic proteins evaluated in this study would contribute to the progression to a decompensate cardiac function 28 days post-MI.

In conclusion, our data strongly suggest that the increased H₂O₂ levels and cellular redox imbalance play an important influence in the selective activation of proteins involved in myocardial remodeling 28 days post-MI. H₂O₂ concentrations directly, or secondarily redox imbalance levels, could alter protein conformation, modifying its susceptibility to phosphorylation and/or its activation. In this scenario, increased ERK phosphorylation and decreased Akt and mTOR would culminate in the development of cardiac hypertrophy, but with a worsening of heart function in infarcted animals. These findings, as well as the increased activation of proapoptotic proteins (GSK-3 β and AIF), reinforce the indicative of ROS influence in maladaptive hypertrophy 28 days post-MI.

Acknowledgments This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (SCT-RS).

References

1. Fiorillo C, Nediani C, Ponziani V et al (2005) Cardiac volume overload rapidly induces oxidative stress-mediated myocyte apoptosis and hypertrophy. *Biochim Biophys Acta* 1741:173–182
2. Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB (2001) Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R1734–R1745
3. Opie LH, Commerford PJ, Gersh B, Pfeffer MA (2006) Controversies in ventricular remodeling. *Lancet* 367:356–367
4. Qin F, Liang MC, Liang C (2005) Progressive left ventricular remodeling, myocyte apoptosis, and protein signaling cascades after myocardial infarction in rabbits. *Biochim Biophys Acta* 1740:499–513
5. Heineke J, Molkentin JD (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:589–600
6. Pons S, Fornes P, Hagege AA, Heudes D, Giudicelli J, Richer C (2003) Survival, haemodynamics and cardiac remodeling follow up in mice after myocardial infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 30:25–30
7. Baines CP, Molkentin JD (2005) Stress signaling pathway that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 38: 47–62
8. Li X, Ma Y, Yang Y et al (2009) Downregulation of survival signaling pathways and increased apoptosis in the transition of pressure overload-induced cardiac Hypertrophy towards to heart

- failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. doi:10.1111/j.1440-1681.2009.05243.x
9. Seeton M, Looi YH, Shah AM (2007) Oxidative stress and redox signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 93: 903–907
 10. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS (2003) H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct pathways. *J Mol Cell Cardiol* 35:615–621
 11. Stone JR, Yang S (2006) Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 8:243–270
 12. Veal EA, Day AM, Morgan BA (2007) Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol Cell* 26:1–14
 13. Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK (1995) Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem* 147:77–81
 14. Matsui T, Rosenzweig A (2005) Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI3-kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol* 38:63–71
 15. Manning BD, Cantley LD (2007) Akt/Pkb signaling: navigating downstream. *Cell* 129:1261–1274
 16. Muslin AJ (2008) MAPK signaling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond)* 115:203–218
 17. Nair VD, Olanow CW (2008) Differential modulation of Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathway regulates apoptotic and cytoprotective signaling responses. *J Biol Chem* 283:15469–15478
 18. Haq S, Choukroum G, Kang ZB et al (2000) Glycogen synthase kinase-3 β is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *J Cell Biol* 151:117–129
 19. Kin NH, Kin K, Park WS, Son HS, Bae Y (2007) PKB/Akt inhibits ceramide-induced apoptosis in neuroblastoma cells by blocking apoptosis-inducing factor (AIF) translocation. *J Cell Biochem* 102:1160–1170
 20. Song G, Ouyang G, Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9:59–71
 21. Lorenzo HK, Susin SA (2007) Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resist Updat* 10:235–255
 22. Kim G, Chun Y, Park J, Kim M (2003) Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 309:619–624
 23. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P (1979) Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44:503–512
 24. Peron AP, Saraiva RM, Antonio EL, Tucci PJ (2006) Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction—despite congestive heart failure. *Arq Bras Cardiol* 86:105–112
 25. Mercier JC, DiSessa TG, Jarmakani JM et al (1982) Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular volumes and ejection fraction in children. *Circulation* 65:962–969
 26. Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N et al (2006) Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res* 39:687–695
 27. Akerboom T, Sies H (1981) Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77:373–382
 28. Pick E, Keisari Y (1980) A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38:161–170
 29. Araujo ASR, Ribeiro MFM, Schenkel P et al (2006) Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrinol* 249:133–139
 30. Laemmli V (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
 31. Klein D, Kern RM, Sokol RZ (1995) A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol* 36:59–66
 32. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
 33. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P (1985) Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 72:406–412
 34. Singal PK, Khaper N, Belló-Klein A et al (1999) Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure. *Heart Fail Rev* 4:353–360
 35. Dincer Y, Akca T, Alademir Z, Ilkova H (2002) Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 51:1360–1362
 36. Suzuki YJ, Ford GD (1999) Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 31:345–353
 37. Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA (2003) Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal* 5:731–740
 38. Jones DP (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8:1865–1879
 39. Araujo AS, Schenkel P, Enzweiler AT et al (2008) The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol* 41:423–430
 40. Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, Harrison DG, Dudley SC (2003) Akt dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 63:325–331
 41. Ruffels J, Griffin M, Dickenson JM (2004) Activation of Erk 1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of Erk 1/2 in H₂O₂-induced cell death. *Eur J Pharmacol* 483:163–173

6.2 Artigo II: *The correlation of redox-sensitive proapoptotic proteins and thioredoxin in early and late post-infarction cardiac remodeling.*

Neste artigo foi demonstrado um perfil temporal da influência do H_2O_2 em algumas proteínas sinalizadoras redox-sensíveis envolvidas no remodelamento cardíaco pós-infarto. Além do mais, também foi verificada a participação do sistema renina angiotensina e da tiorredoxina-1 nesse processo de transição do infarto do miocárdio para insuficiência cardíaca.

CARDIAC

**The correlation of redox-sensitive proapoptotic proteins and thioredoxin in early
and late post-infarction cardiac remodeling**

Paulo Cavalheiro Schenkel¹; Angela Maria Vicente Tavares¹; Rafael Oliveira
Fernandes¹; Gabriela Placoná Dimiz²; Ana R. Lehenbauer Ludke³; Maria Flavia
Marques Ribeiro¹; Alex Sander da Rosa Araujo¹; Maria Luiza Barreto-Chaves²;
Adriane Belló-Klein¹.

¹ Physiology Department at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre –
Brazil.

² Laboratory of Cellular Biology and Functional Anatomy at University of São Paulo –
Brazil.

³ St. Boniface General Hospital Research Centre, Faculty of Medicine, University of
Manitoba, Winnipeg, Canada

Short Running Title: Thioredoxin and apoptotic signaling post-MI

Corresponding author: Dr. Adriane Belló-Klein

Rua Sarmiento Leite, 500.

CEP: 90050-170 - Porto Alegre - RS - Brasil

Email: belklein@ufrgs.br

Telephone: 552151 33083621 Fax: 552151 33083656

Abstract

In this study, we investigated the correlation between thioredoxin-1 and hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration and this association in some prosurvival and proapoptotic proteins during the early and late cardiac remodeling post-myocardial infarction (MI). Male Wistar rats were divided into 6 groups: 3 Sham-operated and 3 MI: 2 days, 7days and 28 days post surgical procedure. Cardiac function was analyzed by echocardiography, the concentration of H₂O₂ was measured spectrophotometrically, and thioredoxin-1, angiotensin II, AT1 receptor, AT2 receptor, p-JNK/JNK, p-ERK/ERK, p-Akt/Akt, p-mTOR/mTOR and p-GSK3β/ GSK3β myocardial immunocontent was evaluated by western blot. Our results show that thioredoxin-1 appears to be important to keep H₂O₂ at low concentrations and avoid the activation of some proapoptotic proteins in early cardiac remodeling post-MI. However, thioredoxin-1 decreases over 28 days post-MI and this finding is associated with an increase in the renin-angiotensin system, when there is targeting to cell death and ventricular dysfunction is transitioning from the ischemic insult to heart failure. Our findings present an insight on the mechanisms involved in the endogenous adaptation to the ischemic injury which can be useful for the design of therapeutic strategies targeting oxidative stress post-MI.

Key words: myocardial infarction; thioredoxin; JNK; hydrogen peroxide; oxidative stress; renin-angiotensin system.

Introduction

The process of cardiac remodeling was already described to be initiated by both haemodynamic and neurohumoral changes that occur in the post-myocardial infarction (MI) period [1,2]. In this process, the ischemic insult may also cause an excess in reactive oxygen species (ROS) from many sources: xanthine oxidase, autooxidation of catecholamines, uncoupling of nitric oxide synthase, disturbances in the electron transport chain and increased activation of NADPH oxidase [3]. Among the neurohumoral changes highlight should be given to the renin-angiotensin system (RAS), known to be more active post-MI, which also influences the cellular redox status by inducing increased activation of NADPH oxidase, a cellular enzyme that generates ROS [4,5].

Furthermore, although redox imbalance post-MI has a role in the transition from myocardial infarction to heart failure, the mechanisms involved are not well understood [3,6,7]. There is increasing evidence that the cellular redox state and some ROS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), can modulate redox-sensitive signaling pathways [8,9]. This involvement emerges as a more recent concept of oxidative stress [10]. In this regard, studies have shown that H_2O_2 can influence both cell survival, in low concentrations, as well as cell death, in high concentrations [11]. Among the numerous intracellular signaling pathways stimulated post-MI, the kinases activated by inositol 3-phosphate (PI3K) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) stand out. The main survival pathway activated by PI3K is protein kinase B (Akt) that, when phosphorylated, in its active state, promotes cell survival for stimulating greater activation of mammalian target of rapamycin (mTOR) and inhibits glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) its known effector proteins [12]. In the other hand, when dephosphorylated, these redox-

sensitive proteins decrease prosurvival signaling (Akt/mTOR) and increase proapoptotic signaling (GSK3 β) [13].

MAPKs, as well as PI3K, can induce both cell survival and cell death [14]. The extracellular signal-regulated kinase protein (ERK 1/2) is a MAPK associated with hypertrophy, whereas the c-Jun N-terminal kinase (JNK1 and JNK2), as well as p38 are associated with cell death [1].

Since ROS levels may determine the direction of such signaling pathways, the control of its concentration by the antioxidant systems can play a key role in this process. Antioxidant systems modulate some of these redox-sensitive proteins by controlling ROS concentration [15]. Among others, thioredoxin (Trx) system, formed by thioredoxin, thioredoxin reductase and the cofactor NADPH, acts as an important antioxidant for the interaction of oxidized proteins with their redox active center (Cys-Gly-Pro-Cys) [16]. Moreover, Trx can also directly affect some intracellular signaling pathways, modulating kinases and transcription factors involved in both cell growth and programmed cell death through protein-protein interaction [16,17]. The two well known forms of Trx, Trx-1 and Trx-2, are involved in the modulation of the concentration of ROS. While Trx-1 plays an important role in oxireduction reactions and protein interactions with several signaling proteins in the cytosol, Trx-2 exerts a strong influence on the neutralization of ROS produced in the electron transport chain in mitochondria [15].

In myocardial infarction, there is increase in the production of ROS and activation of RAS, which in turn, additionally increases the concentration of ROS, such as H₂O₂. All these changes can influence the direction of cell signaling pathways involved in cardiac remodeling post-MI. Thus, in the present study, we have examined the correlation between Trx and H₂O₂ concentration in the heart and its repercussion in

some intracellular signaling pathways during the early and late cardiac remodeling post-MI.

Methods

Animals

Thirty four male Wistar rats (300 ± 30 g) were obtained from the Central Animal House of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Animals were housed in plastic cages and received water and pelleted food ad libitum. They were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21 °C, 12 h light/dark cycle). They were allocated into 6 groups: 3 Sham-operated and 3 MI: 2 days, 7days and 28 days post surgical procedure. The mortality rate after surgery and before the echocardiography analysis was 10%. One animal 2d-Sham group, two 2d-MI and one 7d-MI died during echocardiography analysis. All animal protocols were in accordance with and approved by the Guidelines for Ethical Care of Experimental Animals from the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Surgical procedure

In brief, rats were anesthetized (ketamine 90 mg/kg; xylazine 20 mg/kg, i.p.), and myocardial infarctions (MI) were produced by a method similar to that previously described [16]. The animals were submitted to a surgical procedure of ligation of the descending anterior branches of the left coronary artery, or to a sham-operation in which all surgical procedures were performed, except the suture around the coronary artery. Surviving rats were assessed before the surgical procedure (basal), 2, 7 and 28 days after coronary occlusion.

Echocardiographic analysis

Cardiac function was analyzed by echocardiography. Animals were anesthetized (ketamine 90 mg/kg; xylazine 20 mg/kg, i.p.) and placed in left lateral decubitus position (45°) to obtain cardiac images. EnVisor Philips system (Andover, MA, USA) was used, with a 12-13 MHz transducer, by a trained operator with experience in small animal echocardiography. Left ventricular function and dimensions were performed before the surgery (basal) and after 2 days, 7 days or 28 days as described elsewhere [8].

Tissue preparation

Immediately after echocardiography analysis, rats were euthanized by cervical dislocation and the hearts were rapidly excised and frozen at -80 °C for the evaluation of H₂O₂ content and protein expression by western blot.

Hydrogen peroxide concentration

The assay was based in horseradish peroxidase (HRPO)-mediated oxidation of phenol red by H₂O₂, leading to the formation of a compound that absorbs at 610 nm. Slices of fresh tissue from ventricle were incubated for 30 min. at 37°C in phosphate buffer 10 mmol/L (NaCl 140 mmol/L and dextrose 5 mmol/L). The supernatants were transferred to tubes with phenol red 0.28 mmol/L and 8.5 U/mL HRPO. After 5 min incubation, NaOH 1 mol/L was added and it was read at 610 nm. The results were expressed in nmoles H₂O₂/g tissue [19].

Western blot analysis

Tissue homogenization, electrophoresis, and protein transference were performed as described elsewhere [20,21]. The membranes were processed for

immunodetection using the following primary antibodies: mouse anti-thioredoxin-1 (12 kDa), rabbit anti-angiotensin II (60 kDa), rabbit anti AT1 (43 kDa), rabbit anti AT2 (44 kDa), rabbit anti-ERK1/2 (42/44 kDa), mouse anti-phospho-ERK 1/2 (42/44 kDa), rabbit anti-JNK (46/54 kDa), rabbit anti-phospho-JNK (46/54 kDa), goat anti-Akt (60 kDa), rabbit anti-phospho-Akt (60 kDa), rabbit anti-mTOR (289 kDa), rabbit anti-phospho-mTOR (289 kDa), rabbit anti-GSK-3 β (47 kDa), rabbit anti-phospho-GSK-3 β (47 kDa), and mouse anti-GAPDH (35 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA or Cell Signaling Technology, Beverly, MA). The bound primary antibodies were detected using rabbit anti-goat, rabbit anti-mouse or goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugate secondary antibodies and membranes were developed using chemiluminescence detection reagents. The autoradiographs generated were quantitatively analyzed with an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). The results from each membrane were normalized by GAPDH immunocontent.

Determination of protein concentration

Protein was measured by the method of Bradford using BSA as standard [22].

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm S.E.M. Two way ANOVA with post-hoc Student-Newmann-Keuls was used to compare multiple groups. The correlation between two variables was analyzed by Pearson's correlation. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Echocardiographic analysis

There was no significant difference in the size of infarct area ($47 \pm 5\%$ and $53 \pm 7\%$) between 2d-MI and 7d-MI groups, respectively. In a previous study [8], using the same experimental model, we had observed similar infarct area ($42 \pm 5\%$) in 28d-MI. Figure 1 shows the echocardiographic measurements obtained from the groups of rats studied at different time-points. A significant worsening in the contractile function after coronary artery occlusion can be observed. The 2d-MI group showed a decrease in left ventricle ejection fraction (LVEF) and fractional area change (FAC), 16% and 18%, respectively, when compared with 2d-Sham group (Figure 1A and 1C). No significant changes were observed in left ventricular fractional shortening (LVFS) between these groups (Figure 1B). 7d-MI group showed a marked decrease (40%) in LVEF accompanied by a decrease of both LVFS as well as FAC, 50% and 42%, respectively, when compared to the 7d-Sham (Figure 1A, 1B and 1C). Infarcted animals have shown a marked decrease in ventricular contractile function (18% in the LVEF, 33% in the LVFS and 18% in the FAC) on the second day when compared to basal (Figure 1A, 1B and 1C). The contractile function worsening was observed until the seventh day as can be evidenced by the significant decrease in LVEF and the FAC, 25% and 29%, respectively, in the 7d-MI group when compared to 2d-MI (Figure 1A and 1C). No additional changes were found in the echocardiographic parameters between these animals from 7 to 28 days post-surgery [8].

Hydrogen peroxide concentration

The H_2O_2 concentration was significantly reduced (48%) in 2d-MI group in relation to 2d-Sham (Figure 2A). Although no significant difference was found between

the 7 day groups, we observed a pronounced increase (140%) in the concentration of H₂O₂ between 2 days and 7 days post-MI animals. The concentration of H₂O₂ in the 28d-MI group was similar to the group 7d-MI and higher (87%) than group 2d-MI. A decrease (37%) in the levels of H₂O₂ was observed in 28d-Sham group when compared to 7d-Sham (Figure 2A).

Thioredoxin immunocontent

Thioredoxin immunocontent (Trx-1) was increased in 2d-MI and 7d-MI groups by 122% and 47%, respectively, when compared with their controls. Trx-1 was not significantly different between 28 day groups, but the levels were higher in infarcted animals in the other time-points than in 28d-MI group (Figure 2B). Sham-operated groups 7 and 28 days showed higher Trx-1 immunocontent than 2d-Sham. We observed a negative correlation between Trx-1 immunocontent and H₂O₂ levels in animals studied 2 days after the surgery ($r = -0.87$, $P < 0.05$).

Renin angiotensin system (RAS)

The angiotensin II immunocontent was similar between the 2 days groups, however, its content was significantly increased (103%) in the 7d-MI group in relation to 7d-Sham, and was not significantly different between the 28 day groups (Figure 3A). Angiotensin II immunocontent was negatively correlated with LVEF ($r = -0.69$, $P < 0.05$) 7 days post-surgery. No significant changes were observed in AT1 and AT2 receptors immunocontent (Figure 3B and 3C).

MAP Kinases (JNK and ERK)

p-JNK/total JNK ratio was significantly lower (80%) in 2d-MI than 2d-Sham group and no changes were observed between sham-operated and myocardial infarction groups 7 and 28 days post-surgery (Figure 4A). A sharp increase (214%) was found in JNK ratio between 2d-MI and 7d-MI. In the 28d-MI group this ratio was higher (42%) than 2d-MI (Figure 4A). Sham-operated groups showed a reduction (42% and 77%) in p-JNK/total JNK ratio in 7 and 28 days, respectively, when compared to 2d-Sham group (Figure 4A). No changes were observed in ERK immunocontent between the groups (Figure 4B).

AKT/mTOR/GSK3 β

Myocardial infarction and sham-operation surgery did not affect p-Akt/total Akt and p-mTOR/total mTOR ratios in the second and the seventh days of study (Figure 5). In a previous study [8], we have already reported a significant reduction of these ratios in the 28d-MI group when compared with 28d-Sham. The p-GSK3 β /total GSK3 β ratio was reduced (50%) in 7d-MI when compared to 7d-Sham (Figure 5), and this reduction had already been demonstrated between the 28d-Sham and 28d-MI groups in our previous study [8].

Discussion

In spite of significant improvements in the comprehension of the mechanisms involved in the cardiac remodeling process post-MI [2,5], understanding how H₂O₂ can influence the redox-sensitive signaling pathways in this process is an emerging field of research. In this study, we were able to demonstrate an increase in thioredoxin-1 (Trx-1) immunocontent associated with low concentrations of H₂O₂ and reduced p-JNK/total JNK ratio, a known proapoptotic protein of the MAPK pathway, in the cardiac

homogenate of infarcted rats 2 days post-surgery. Moreover, our results demonstrated a pronounced increase in the concentration of H_2O_2 as well as in p-JNK/total JNK ratio in infarcted animals from second to seventh day, when ventricular contractile dysfunction is taking place and angiotensin II immunocontent reaches its peak.

It is important to point out that all infarcted animals showed signs of regional ischemia after coronary occlusion visualized by the rapid change in color of the myocardium, and a worsening in ventricular function can be noticed over time. The signs of worsening (especially the fall in LVEF) could be seen as early as 2 days post-MI, being more pronounced in 7d-MI animals. In agreement with our findings, a significant reduction in LVEF was already described 6 hours post-MI, characterizing early functional deterioration reported by the decrease in both ventricular systolic and diastolic function soon after coronary occlusion [23]. In our study, although we found significant difference in LVEF and FAC between the 2 day post-surgery groups, the LVFS was similar in them. LVFS was lower in both groups 2 days post-surgery compared to baseline echocardiography, following a distinct profile between sham-operated and myocardial infarction groups with the time course. Possibly a temporary stunning of the heart occurred due to the surgical stress in sham operated animals. On the other hand, in the MI model, it has been reported that the coronary occlusion promotes early remodeling by increasing ROS generation, as well as an increase of metalloproteinase activation and there are stimulus for necrosis as early as in the first day post-MI [24,25].

Despite the pronounced ventricular dysfunction that seems to reach its peak 7 days post-MI, signs of heart failure have been described 21 days after coronary occlusion [26, 27,28]. Our findings corroborate with previous studies, showing a pronounced drop in LVEF until the seventh day post-MI which declines thereafter only

slightly over time [23,26]. This provides support to our data where we have found no significant differences in cardiac function by echocardiography analysis between groups 7d-MI and 28d-MI, and it has been already described that deterioration of cardiac function and heart failure is noticed in later times post-MI [23]. Interestingly, other studies observed an increase in left ventricle end diastolic pressure, pulmonary and hepatic congestion associated with dyspnea and ascites, and cardiac hypertrophy in infarcted rats when studied 21 days or more post-MI [8,23,27,28,29].

In addition, in our results, we observed a pronounced increase in the concentration of H_2O_2 in the 7d-MI group. Other studies have already demonstrated that concurrently with the functional cardiac deterioration, MI has been associated with an increase in the concentrations of H_2O_2 that may influence cardiac adaptations [7,8,30]. Furthermore, we found that angiotensin II (AngII) immunocontent is also associated with significant ventricular dysfunction observed 7 days after infarction, a strong indicative of increased RAS activation. Supporting the present data, Busato et al. 1997 [31] observed an increase in activity of angiotensin converting enzyme (ACE) in the rat heart 7 days post-MI, indicating higher concentrations of AngII. As mentioned earlier, both the ischemic insult as well as the increased activation of the RAS can induce the formation of high levels of H_2O_2 [3,5]. The interaction of AngII with its receptor promotes greater activation of NADPH oxidase and, consequently, production of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), which is converted to H_2O_2 by monovalent reduction [30]. This increased activity of NADPH oxidase has already been reported post-MI as an increase in gene expression and/or protein subunits of the enzyme [5,32,33]. In our study, nonsignificant changes were observed in both AngII receptors, although AT1 immunocontent showed an opposite profile than AngII.

There is increasing evidence showing that H_2O_2 per se is involved not only in the genesis, but also in the progression of heart failure, by regulating some intracellular signaling pathways [8,34,35,36]. Thus, modulation of the concentrations of H_2O_2 can be a determining factor in this progression. In this study, we found a strong positive correlation between the low concentration of H_2O_2 as well as low JNK immunocent 2 days post-surgery. On the other hand, the extracellular signal-regulated kinase protein (ERK), as well as Akt/mTOR/GSK3 β , showed no significant difference between the different groups 2 days post-surgery. It has already been described that H_2O_2 can activate members of the mitogen-activated protein kinase (ERK/JNK) and kinases activated by inositol 3-phosphate (Akt/mTOR/GSK3 β) families, depending on the concentration of H_2O_2 [11]. It is generally accepted that ERK, Akt and mTOR activation promote cell hypertrophy, whereas activation of JNK and GSK3 β are associated with cell death [14]. Studies have shown that JNK is readily activated by H_2O_2 and its suppression by either genetic or pharmacological approaches offers significant protection against apoptosis induced by this ROS [37]. It is likely that very early post-MI, even before 2 days, there was an increase in H_2O_2 formation that may have exerted a strong influence on the generation of some antioxidants by inducing a counter-regulatory mechanism. In this regard, we observed a negative correlation between Trx-1 and H_2O_2 concentration 2 days post-surgery. Among other antioxidant systems, Trx-1 contains dithiol within its conserved oxiredutase active site that plays an important role in reducing ROS, particularly H_2O_2 [16]. In our study, we also found an association in the expression of Trx-1 and JNK between the experimental groups 2 days post-surgery. Thus, one can speculate that 2 days post-MI Trx-1 neutralizes the H_2O_2 generated and therefore promotes a lower activation of JNK and sustains cardiac function. Furthermore, besides its antioxidant action, Trx-1 was previously described to interact

directly with some proteins, such as the apoptosis signal-regulated kinase 1 (ASK-1), in a reduced environment [37,38]. However, in the presence of an oxidized environment, this interaction is broken and ASK-1 is free to exert its proapoptotic effects, among them stimulate JNK. The negative correlation between Trx-1 and JNK observed in our study is in agreement with these findings in the literature.

Interestingly, our data shows that Trx-1 appears to reduce the H₂O₂ concentration 2 days post-MI, however it does not seem to sustain this effect over 28 days. In addition, we observed a similar Trx-1 immunocontent in the 2d-MI and 7d-MI groups, but a sharp variation in H₂O₂ concentration in this period which can be a consequence of the increased activation of the RAS post-MI found in our results and already described [39]. Therefore, even though the Trx-1 immunocontent is maintained high in 7d-MI animals, it seems that, 7 days after the insult, the antioxidant capacity is inadequate to modulate this abrupt change in the concentration of H₂O₂. Moreover, we found, at this time-point, a pronounced increase in the activation of JNK, as well as in GSK3 β , associated with a significant deterioration in cardiac function. In support of the importance of Trx-1 post-MI, Samuel et al. 2010 [40] found that gene therapy by intramyocardial administration of an adenoviral vector encoding thioredoxin-1 in diabetic rats reduced oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis signaling, 4 weeks post-MI. This therapy decreased JNK immunocontent associated with an improvement in cardiac function [40].

The increased activation of proapoptotic protein JNK seen in the present study, as well as GSK-3 β reported in our previous study [8] verified 28 days post-MI, suggest an important role of these proapoptotic proteins in cardiac remodeling post-MI. Moreover, we had observed previously [8], in the same experimental model of MI, an increase in maladaptive hypertrophy by increased ERK immunocontent in 28d-MI

group, possibly stimulated by H₂O₂. In the same study [8] the proteins of the PI3K pathway involved in cell survival (Akt/mTOR) were less active in the 28d-MI group compared to 28d-Sham. Furthermore, the significant reduction in Trx-1 immunocontent 28 days post-MI in this study could have contributed to the maintenance of high concentrations of H₂O₂, suggesting a pronounced involvement of ROS driving the signaling pathways for cell death in the transition from MI to heart failure.

Conclusion

Taken together, our data suggest that the early activation of thioredoxin system in cardiac remodeling post-MI appears to be able to maintain low levels of H₂O₂, when there is no activation of the proapoptotic pathways analyzed in this study. However, in the progression of cardiac remodeling, RAS is more active, thioredoxin system capacity is decreased, and finally, the prevalence of cell death pathways become more evident, being associated to the progression of ventricular dysfunction to heart failure. Our findings give support for a better understanding on the endogenous adaptation to the ischemic injury, being of great importance for the proposition of therapeutic strategies targeting oxidative stress post-MI.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgments

This work was supported by the Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, CNPq, CAPES and FAPERGS, Brazilian Research Agencies. We would like also to thank Mrs. Tania R.G. Fernandes for her technical assistance.

References

1. Opie LH, Commerford PJ, Gersh B et al. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet* 2006;367:356-67.
2. Holt E, Tonnessen T, Lunde PK et al. Mechanisms of Cardiomyocyte Dysfunction in Heart Failure Following Myocardial Infarction in Rats. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1581-93.
3. Mak S & Newton GE. The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure. *Chest* 2001;120:2035-46.
4. Awan NA & Mason DT. Direct selective blockade of the vascular angiotensin II receptors in therapy for hypertension and severe congestive heart failure. *Am Heart J* 1996;131:177-85.
5. Sun Y. Oxidative stress and cardiac repair/remodeling following infarction. *Am J Med Sci* 2007;334:197-205.
6. Khaper N & Singal PK. Effects of afterload-reducing drugs on pathogenesis of antioxidant changes and congestive heart failure in rats. *JACC* 1997;29:856-61.
7. Valko M, Leibfritz D, Moncol J et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
8. Schenkel PC, Tavares AMV, Fernandes RO et al. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 2010;341:1-8.
9. Araujo AS, Schenkel P, Enzweiler AT et al. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol* 2008;41:423-30.
10. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antiox Redox Signal* 2006;8:1865-79.

11. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A et al. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:615-21.
12. Cai H, Li Z, Davis ME et al. Akt dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase ½ cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 2003;63:325–31.
13. Nair VD, Olanow CW. Differential modulation of Akt/glycogen synthase kinase-3β pathway regulates apoptotic and cytoprotective signaling responses. *J Biol Chem* 2008;283:15469–78.
14. Heineke J & Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:589-600.
15. Koráryová M & Kollárová M. Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen Physiol Biophys* 2008;27:71-84.
16. World CJ & Yamawaki H. Thioredoxin in the cardiovascular system. *J Mol Med* 2006;84:997-1003.
17. Ago T & Sadoshima J. Thioredoxin and ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:762-73.
18. Johns TNP & Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 1954;140:675-82.
19. Pick E & Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980;38:161-70.

20. Araujo ASR, Ribeiro MFM, Schenkel P et al. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrinol* 2006;249:133–39.
21. Laemmli V. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–85.
22. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
23. Rabald S, Hagebdorff A, Pfeiffer D et al. Contrast enhanced echocardiographic follow-up of cardiac remodeling and function after myocardial infarction in rats. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:1561-71.
24. Holmes JW, Borg TK, Cowel JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarction. *Ann Rev Biomed Eng* 2005;7:223-53.
25. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest* 1978;73:843-9.
26. Pabis FC, Miyague NI, Francisco JC et al. Echocardiographic assessment of myocardial infarction evolution in young and adult rats. *Arq Braz Cardiol* 2008;91:321-6.
27. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979;44:503-12.
28. Hill MF & Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol* 1996;148:291-300.

29. Hagen MK, Lehenbauer-Lüdke AR, Paludo AC et al. Diet with isolated soy protein reduces oxidative stress and preserves ventricular function in rats with myocardial infarction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;19:91-7.
30. Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P et al. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 2009;15:209-19.
31. Busatto VCW, Cicilini MA, Mill JG. Increased angiotensin-converting enzyme activity in the left ventricle after infarction. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:679-87.
32. Lu L, Quinn MT, Sun Y. Oxidative stress in the infarcted heart: role of de novo angiotensin II production. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:943-51.
33. Fukui T, Yoshiyama M, Hanatani A et al. Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:1200-6.
34. Stone JR & Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:243-70.
35. Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA. Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:731-40.
36. Suzuki YJ & Ford GD. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:345-53.
37. Shen HM & Liu ZG. JNK signaling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 2006;40:928-39.
38. Hori M & Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2009;81:457-64.

39. Anavekar NS & Solomon SD. Angiotensin II receptor blockade and ventricular remodeling. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 1999;6:43-8.
40. Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV et al. Thioredoxin-1 gene therapy enhances angiogenic signaling and reduces ventricular remodeling in infarcted myocardium of diabetic rats. *Circulation* 2010;121:1244-55.

Captions to Figures

Figure 1 –Left ventricle ejection fraction (LVFE) (A), left ventricle fractional shortening (LVFS) (B) and fractional area change (FAC) (C) assessed by echocardiography in sham-operated (Sham) and myocardial infarction (MI) rats before the surgical procedure (basal), 2, 7 and 28 days post-surgery. Values are expressed as mean \pm S.E.M. from 8-10 animals per group.

* Significantly different from 2d-Sham group ($P < 0.05$);

Significantly different from 2d-MI group ($P < 0.05$);

** Significantly different from 7d-Sham group ($P < 0.05$);

*** Significantly different from 28d-Sham group ($P < 0.05$);

† Significantly different from Basal-MI group ($P < 0.05$);

†† Significantly different from Basal-Sham group ($P < 0.05$).

Figure 2 – Hydrogen peroxide concentration (A) and Thioredoxin-1 immunocontent (B) in cardiac homogenates 2, 7 and 28 days post-surgery.

Values are expressed as mean \pm S.E.M. from 4-6 animals per group. One representative gel of western blot experiments showing two bands for each experimental group.

* Significantly different from 2d-Sham group ($P < 0.05$);

Significantly different from 2d-MI group ($P < 0.05$);

** Significantly different from 7d-Sham group ($P < 0.05$);

Ψ Significantly different from 7d-MI group ($P < 0.05$);

Figure 3 – Angiotensin II immunocontent (A), AT1 receptor (B) and AT2 receptor (C) in cardiac homogenates 2, 7 and 28 days post-surgery.

Values are expressed as mean \pm S.E.M. from 4 animals per group (one representative gel of western blot experiments showing two bands for each experimental group).

** Significantly different from 7d-Sham group ($P < 0.05$).

Figure 4 - p-JNK/total JNK immunocontent (A) in cardiac homogenates 2, 7 and 28 days post-surgery and p-ERK/total ERK immunocontent (B) 2 and 7 days post-surgery.

Values are expressed as mean \pm S.E.M. from 4 animals per group (one representative gel of western blot experiments showing two bands for each experimental group).

* Significantly different from 2d-Sham group ($P < 0.05$);

Significantly different from 2d-MI group ($P < 0.05$);

Figure 5 – p-Akt, total Akt, p-mTOR, total mTOR, p-GSK-3 β and total GSK-3 β immunocontent in cardiac homogenates 2 and 7 days post-surgery.

Values are expressed as mean \pm S.E.M. from 4 animals per group (one representative gel of western blot experiments showing two bands for each experimental group).

** Significantly different from 7d-Sham group ($P < 0.05$).

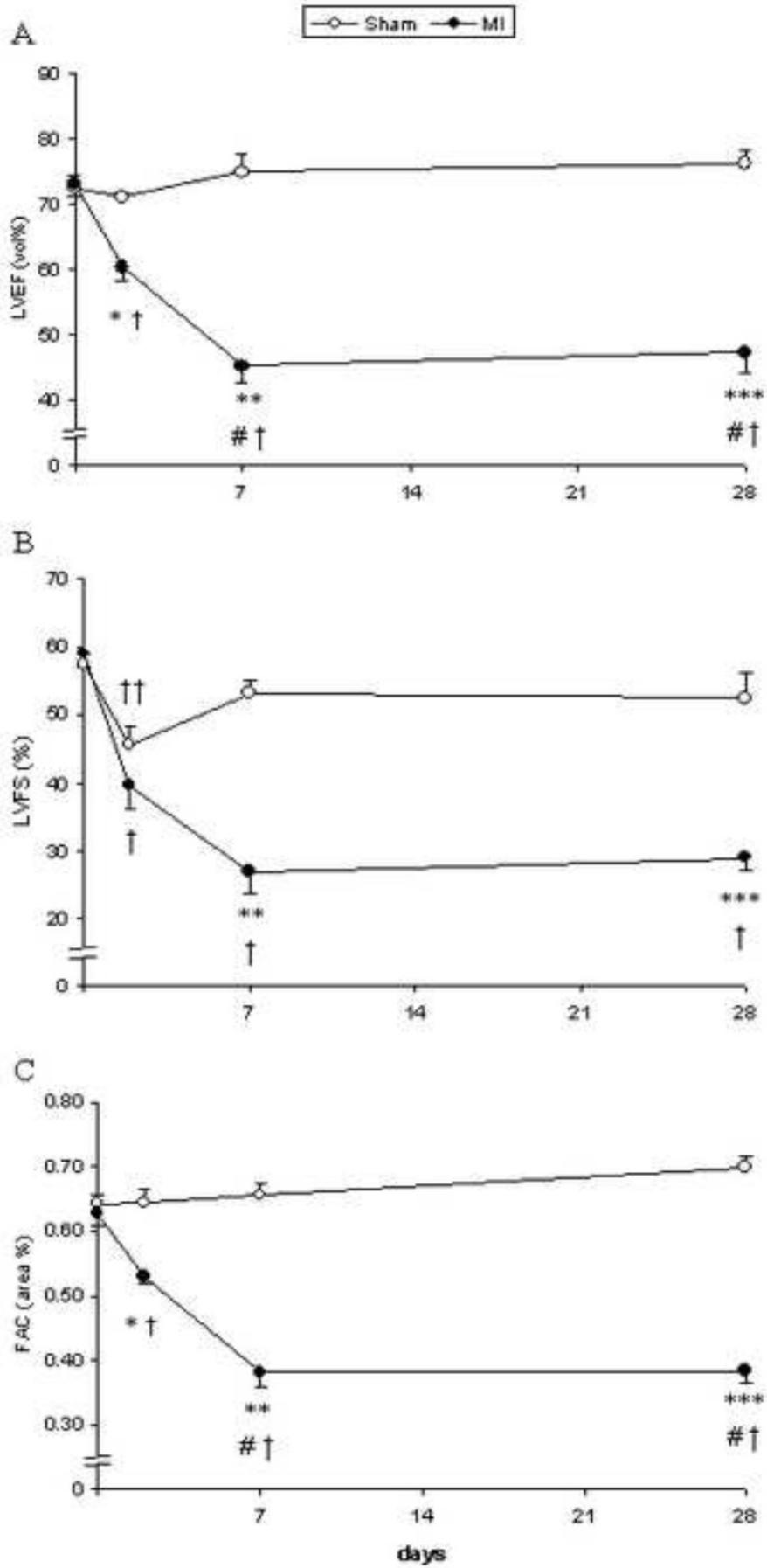


Figure 1.

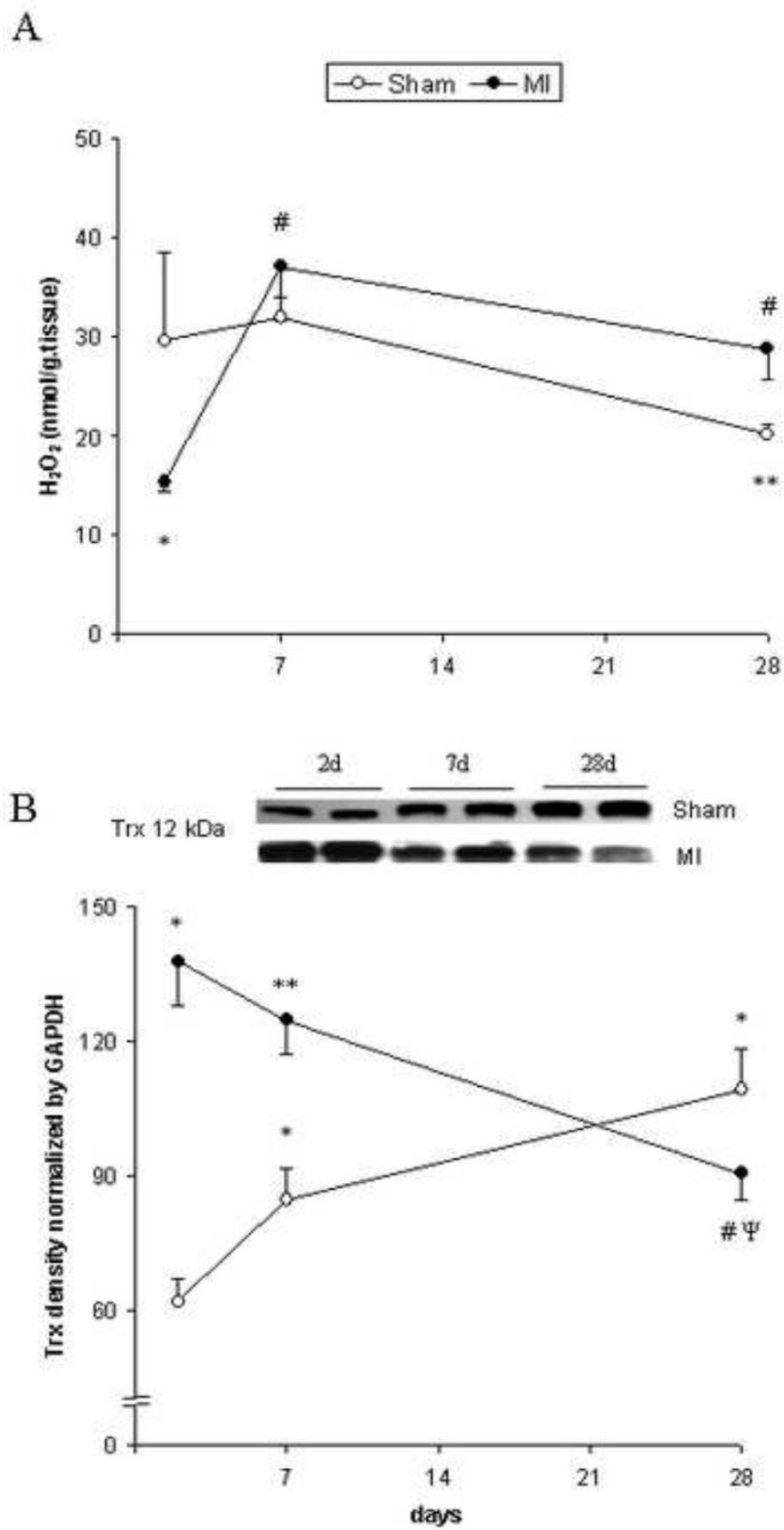


Figure 2.

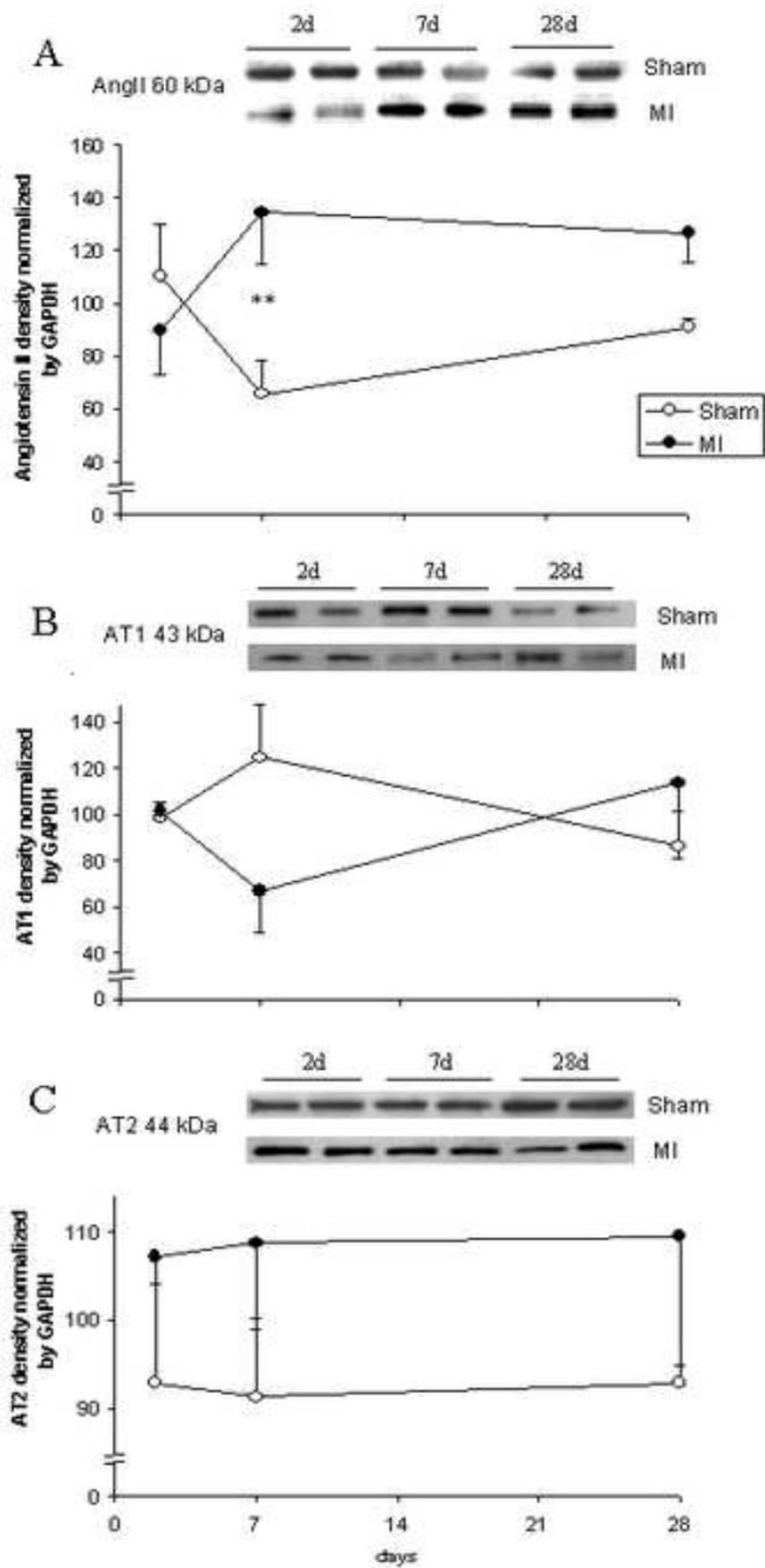


Figure 3.

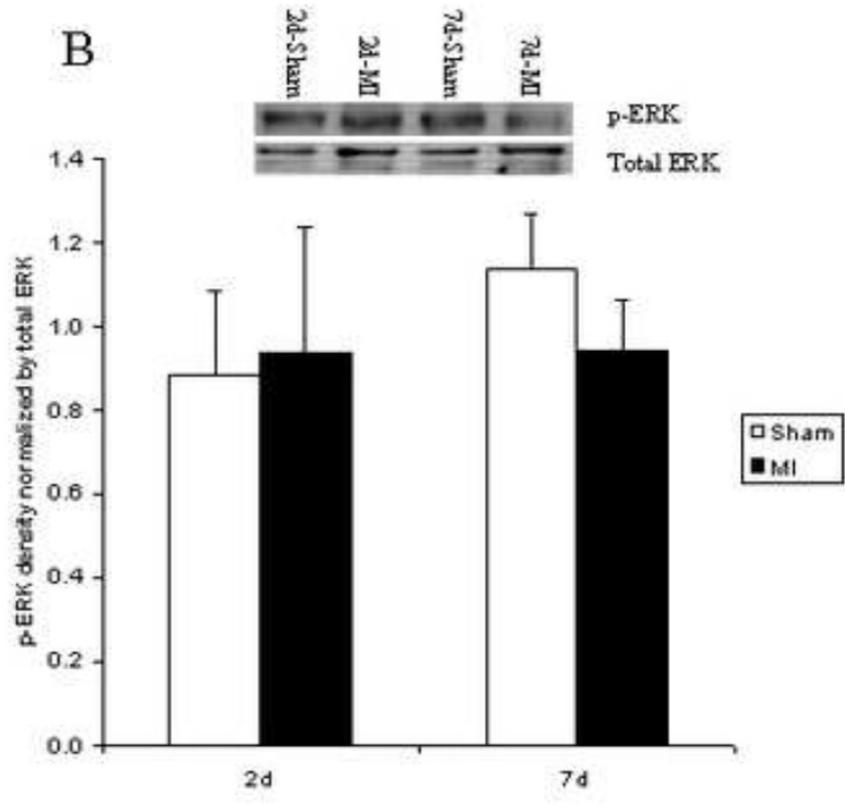
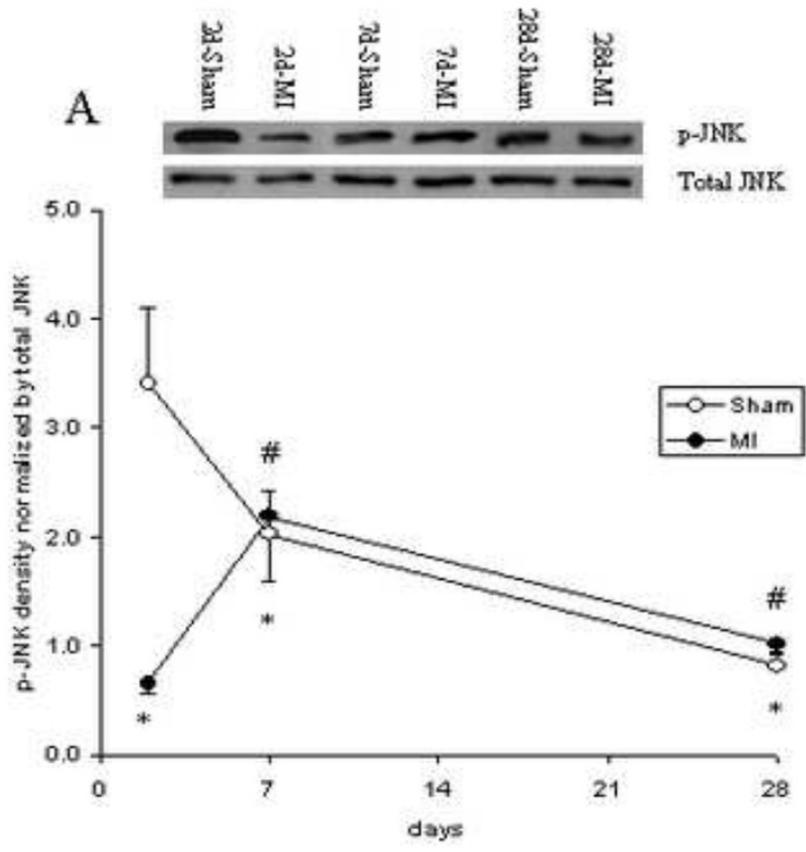


Figure 4.

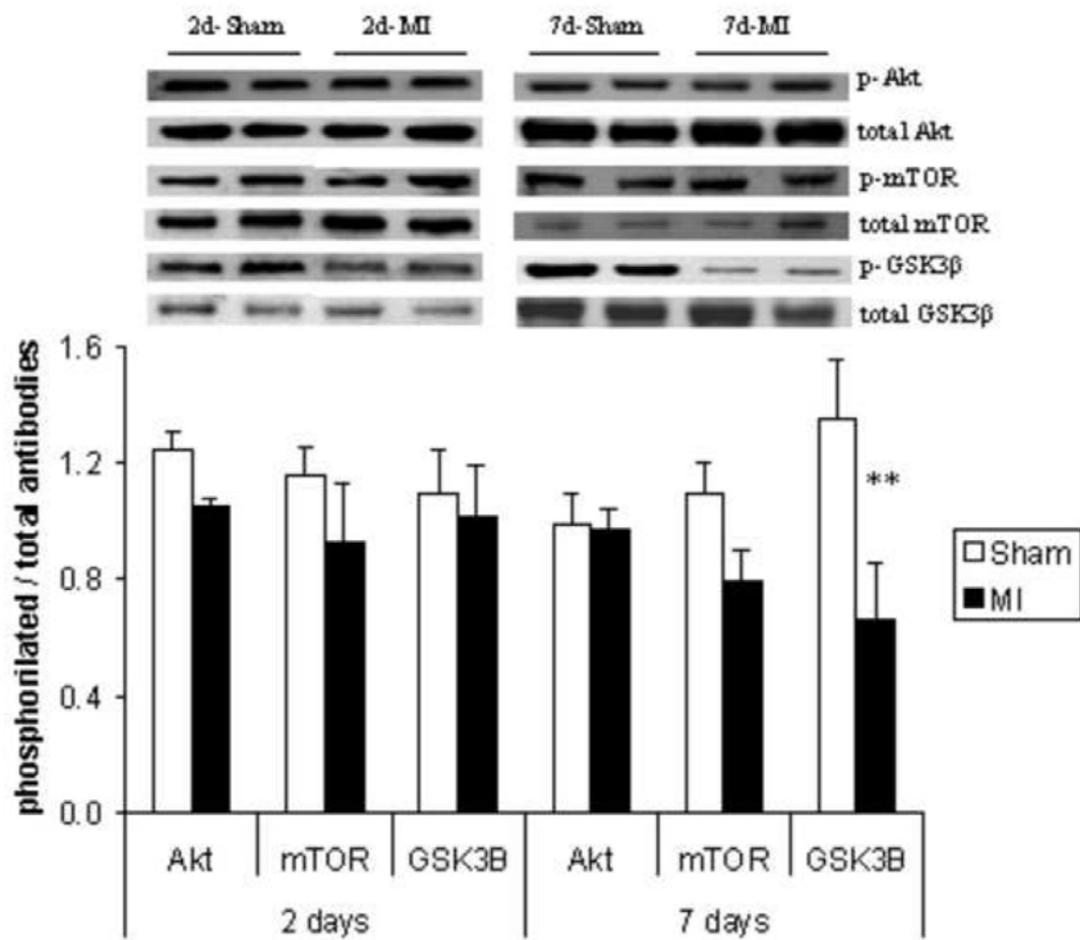


Figure 5.

7. DISCUSSÃO CONCLUSIVA

As modificações cardíacas que caracterizam o remodelamento após o infarto do miocárdio (IM) estão sob diferentes estímulos ao longo desse processo. O estresse oxidativo (EOX) e o sistema renina angiotensina (SRA) exercem influências no padrão de remodelamento cardíaco (RC) com o passar do tempo. Desta forma, torna-se fundamental caracterizar o perfil temporal destas influências durante a transição do IM para insuficiência cardíaca (IC), com o intuito de identificar oportunidades terapêuticas.

Para isso, diversos modelos animais têm sido utilizados para a indução do IM e para mimetização dos acontecimentos pós-IM em humanos. Dentre estes, destaca-se o modelo da oclusão coronariana por ligadura. Classicamente, a oclusão da artéria coronária descendente anterior tem sido utilizada para o estudo do RC e da IC (Pfeffer et al., 1979). Com este intuito, o Laboratório de Fisiologia Cardiovascular e Espécies Ativas de Oxigênio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul passou a utilizar este modelo animal. Apesar de exigir uma técnica cirúrgica apurada, o modelo tem sido reproduzido e pode ser utilizado para o estudo da disfunção ventricular e insuficiência cardíaca, observadas com o passar do tempo após o IM. Assim, no primeiro artigo foi caracterizado o estado redox e a atividade da Akt, mTOR, GSK-3 β , ERK e AIF, proteínas redox-sensíveis envolvidas com a sinalização intracelular, durante o RC 28 dias pós-IM. Feito isso, partimos para verificação do perfil destas proteínas e da sua modulação pelo H₂O₂, assim como da influência do sistema renina angiotensina neste processo dois, sete e vinte e oito dias pós-IM (Artigo II).

A moderada área de infarto e o baixo índice de mortalidade evidenciam a eficácia da técnica cirúrgica e a boa padronização da mesma neste trabalho. Logo após a oclusão coronariana, foi observada uma alteração na coloração do miocárdio comprometido, o que evidencia uma isquemia tecidual localizada. Tanto os animais infartados (MI) quanto os controles (Sham) apresentaram uma redução significativa na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FEnc) 2 dias após o procedimento cirúrgico (Artigo II). O estresse cirúrgico pela manipulação do coração pode gerar um atordoamento cardíaco e até mesmo causar o óbito, principalmente por provocar arritmias (Zornoff et al., 2009). Tendo em vista que ambos os grupos foram expostos ao mesmo estresse cirúrgico, com exceção da ligadura coronariana, a diminuição na FEnc pode ser uma conseqüência desta manipulação. Contudo, enquanto os mecanismos compensatórios foram eficazes em restabelecer a função cardíaca nos animais Sham, ao longo dos 28 dias de pós-operatório, os infartados tiveram piora ainda mais significativa com o passar do tempo (Artigo II), principalmente entre o segundo e o sétimo dia de estudo. Neste intervalo, os animais infartados mostraram uma redução significativa tanto na FEnc quanto na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FE) e na mudança de área fracional (MAF). Apesar de haver alterações morfométricas e hemodinâmicas, os parâmetros ecocardiográficos dos animais 7 dias persistem aos 28 dias, o que evidencia importantes modificações funcionais na primeira semana pós-IM. Nossos achados corroboram com estudos prévios que destacaram uma queda mais pronunciada da função cardíaca 7 dias após a oclusão coronariana, e sendo esta mais suave ao longo de 16 semanas (Rabald et al., 2007). Entretanto, apesar da semelhança na análise ecocardiográfica, sinais de IC

congestiva geralmente começam a ficar mais nítidos na terceira semana pós-MI, quando os mecanismos compensatórios tornam-se ineficazes (Pfeffer et al., 1990). De fato, verificamos no primeiro artigo um aumento na ativação da ERK associada com a hipertrofia cardíaca mal adaptada 28 dias pós-IM. Nossos dados corroboram os achados de Ruffels et al., 2004 que observaram o envolvimento da ERK com a morte celular (Ruffels et al., 2004). Adicionalmente, observamos uma elevada pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) nestes animais, um indicativo do estabelecimento da IC (Artigo I). O aumento da PDFVE nesta transição geralmente é acompanhado pela diminuição da pressão sistólica e dos índices de contratilidade (+dP/dt) e relaxamento (-dP/dt) do ventrículo esquerdo de animais com IC pós-IM (Rabald et al., 2007; Francis et al., 2001). Além do mais, o estado de EOX parece estar envolvido nesta transição.

Vários estímulos como, por exemplo, o tempo após a oclusão coronariana, o tamanho do infarto e respostas neurohumorais parecem influenciar fontes geradoras de espécies ativas de oxigênio (EAO) nesta progressão. Dentre outras EAO, tem sido postulado que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apresenta certa influência em adaptações cardiovasculares durante o RC, tendo em vista a sua estabilidade e baixa reatividade (Forman, 2007; Stone, 2006). Verificamos um pronunciado aumento na concentração de H_2O_2 associado com uma disfunção ventricular nos animais 7d-MI (Artigo II). Justamente nesse tempo, foi observado um aumento no imunoconteúdo de angiotensina II (AngII), corroborando os achados de Busatto et al., 1997 que indicam uma maior ativação do SRA, pelo aumento da atividade da enzima conversora da angiotensina, 7 dias pós-IM. Muitos dos efeitos desencadeados

pelo SRA ocorrem pela interação da AngII com seu receptor de membrana e parecem depender da formação de EAO pela enzima NADPH oxidase (Mak & Newton, 2001). Ou seja, possivelmente a maior ativação do SRA nos animais 7d-MI estimule a formação exagerada de EAO, de maneira que os sistemas de defesa antioxidante não conseguem estabilizá-las. Evidências da literatura indicam um aumento das reservas antioxidantes nos cardiomiócitos durante o RC bem adaptado pós-IM e uma associação entre disfunção ventricular e o estado de EOX durante o RC mal adaptado (Singal et al., 1999). Sendo assim, nossos achados sugerem um período de estabelecimento da IC 28 dias pós-IM, uma vez que observamos uma correlação positiva entre a disfunção cardíaca e o desbalanço redox celular (Artigo I), assim como uma menor ativação de proteínas sinalizadoras da sobrevivência celular (Akt/mTOR) e um aumento de outras proapoptóticas (GSK-3 β e AIF).

Neste tempo de estudo, as concentrações de H₂O₂ mostraram correlação positiva com parâmetros de disfunção cardíaca como, por exemplo, a PDFVE. Tem sido mostrado que o H₂O₂ pode estar envolvido nos diferentes estágios de transição do IM para IC, modulando a ativação de proteínas redox-sensíveis como a proteína quinase B (Akt) e as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). (Forman, 2007; Stone & Yang, 2006; Kwon et al., 2003).

Destacamos, no segundo artigo, uma correlação positiva entre as concentrações de H₂O₂ e o imunoconteúdo da JNK, uma proteína envolvida com a sinalização para morte celular e com o RC mal adaptado. Possivelmente as concentrações de EAO tenham aumentado previamente ao segundo dia pós-IM e, por mecanismo contra-regulatório, promoveu o aumento das defesas antioxidantes. Dentre outros antioxidantes, destacamos a importância da

tioredoxina-1 (Trx-1) na estabilização do H_2O_2 (World & Yamawaki, 2006). Verificamos um grande aumento no imunocontéudo da Trx-1 no homogeneizado cardíaco do grupo 2d-MI que correlacionou-se negativamente com a concentração de H_2O_2 . Ou seja, este antioxidante parece exercer forte influência na estabilização dessa EAO neste período pós-IM, o que acaba sustentando o RC bem adaptado, uma vez que a JNK mostrou-se bastante diminuída. Embora a função cardíaca já tenha se mostrado diminuída 2 dias pós-IM, como comentado previamente, esta queda foi mais pronunciada após 7 dias, justamente quando observamos uma súbita elevação nas concentrações de H_2O_2 e no imunocontéudo da AngII e da JNK. Possivelmente a maior ativação do SRA, com adicional formação de EAO, culmine com a elevação da concentração de H_2O_2 e, conseqüentemente, direcionando a sinalização intracelular para morte. Neste sentido, Lu et al., 2004 mostraram que o tratamento com losartan, um bloqueador específico do receptor AT1 da AngII, suprimiu significativamente tanto a expressão gênica quanto protéica da gp91-phox no coração de ratos 7 dias pós-IM. Utilizando outro modelo de RC, nosso grupo tem observado a participação do SRA na produção de EAO, e no aumento da expressão protéica da gp91-phox (dados ainda não publicados). Ou seja, parece que a AngII aumenta a atividade da NADPH oxidase que, por sua vez, produz mais ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Como a expressão protéica e a atividade da SOD mostraram-se elevadas, é possível que essa enzima antioxidante tenha dismutado maior quantidade de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , como pôde ser evidenciado pelos altos níveis dessa espécie.

Verificamos, no presente estudo, uma maior ativação da GSK-3 β nos grupos 7d-MI e 28d-MI. Ou seja, por direcionar a sinalização para morte

celular, parece que uma elevação brusca na concentração de H_2O_2 determina a transição do RC bem adaptado para o RC mal adaptado.

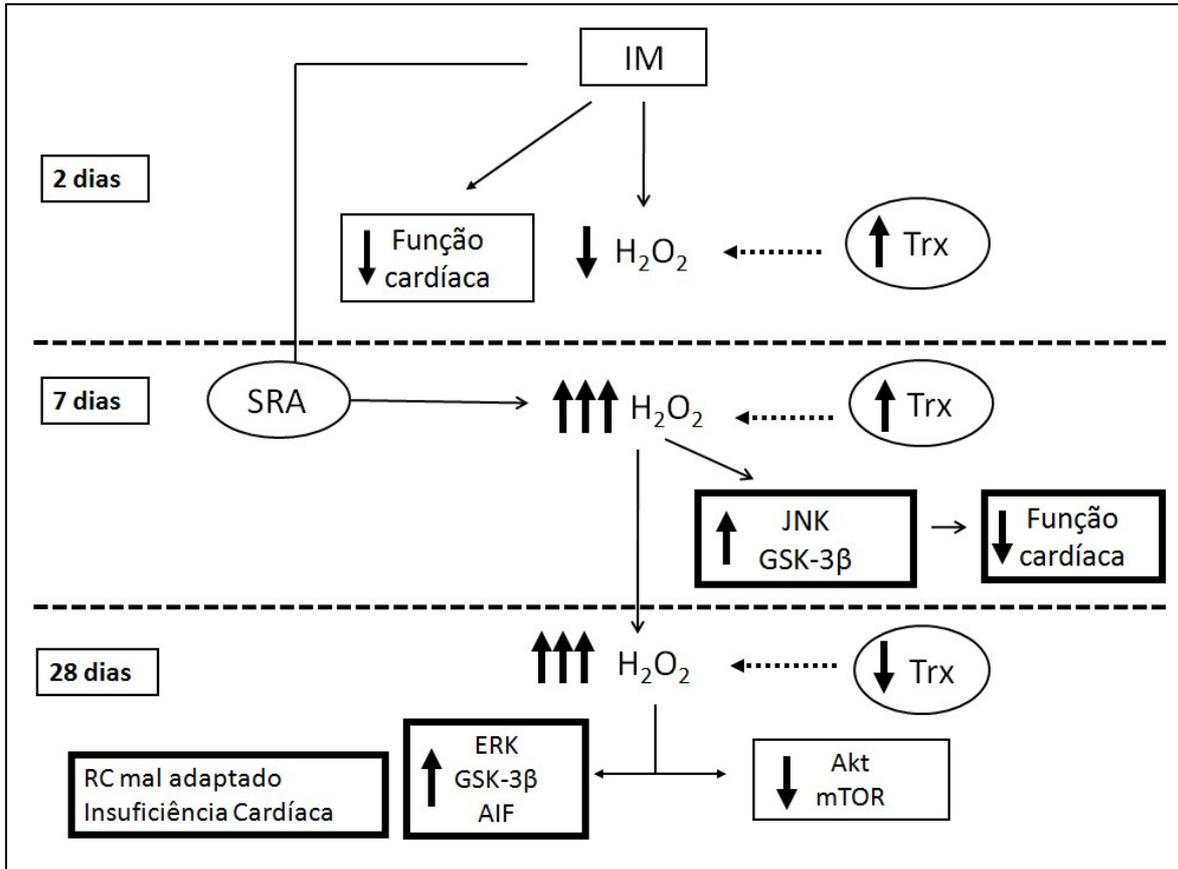


Figura 8. Esquema representativo dos principais achados deste trabalho.

Na figura 8, é sugerido um mecanismo para explicar a participação do H_2O_2 na modulação de algumas vias sinalizadoras durante o processo de RC pós-IM em ratos. O RC adverso é conseqüente da ativação de proteína pró-apoptóticas (JNK, GSK-3 β), quando as concentrações de H_2O_2 encontram-se elevadas. Na progressão deste processo, o SRA encontra-se mais ativo, o que propicia uma adicional formação de EAO, culminando com piora da função cardíaca. Neste contexto, a Trx-1 tem um papel central, inibindo o RC adverso, tendo em vista sua ação no controle dos níveis de H_2O_2 e por inibição direta de

proteínas pró-apoptóticas, assim como também parece estar envolvida na ativação de proteínas associadas com a sobrevivência celular (Akt/mTOR). Ou seja, desta forma, baixos níveis de H_2O_2 levam à sinalização intracelular para um RC bem adaptado.

Em conclusão, o entendimento das adaptações antioxidantes endógenas, decorrentes do insulto isquêmico, e suas influências na sinalização celular ao longo do processo de RC pós-IM é de fundamental importância na identificação de janelas de oportunidade terapêutica.

8. PERSPECTIVAS

Seria interessante avaliar tempos intermediários ao longo do processo de remodelamento cardíaco, com o intuito de ampliar a visão dos parâmetros avaliados no presente estudo.

Poderia ser avaliado o envolvimento de outras proteínas redox-sensíveis envolvidas no processo de remodelamento cardíaco pós-IM como, por exemplo, a p38, ASK-1, caspases e família da Bcl-2.

A determinação do nível de influência da Trx-1 nos processos avaliados poderia ser confirmada através de silenciamento gênico e/ou de sua super-expressão. Nestas situações, a determinação do impacto funcional seria relevante.

Uma visão mais completa do sistema tiorredoxina seria possível por meio da avaliação de outras proteínas envolvidas no controle das concentrações de EAO, tais como peroxirredoxina e glutarredoxina.

Para determinar a participação relativa do SRA nos fenômenos estudados, uma sugestão seria a inibição deste.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ago T & Sadoshima J. Thioredoxin and ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2006;41:762-73.

Akerboom T & Sies H. Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981;77:373–82.

Antos CL, Frey N, Marx SO, et al. Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res* 2001;89:997-1004.

Araujo AS, Schenkel P, Enzweiler AT, et al. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol* 2008;41:423-30.

Awan NA & Mason DT. Direct selective blockade of the vascular angiotensin II receptors in therapy for hypertension and severe congestive heart failure. *Am Heart J* 1996;131:177-85.

Beevers D, Lip GH, O'Brien E. ABC of hypertension – the pathophysiology of hypertension. *Br Med J* 2001;322:912-6.

Beurel E & Jope RA. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 2006;79:173-89.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.

Busatto VCW, Cicilini MA, Mill JG. Increased angiotensin-converting enzyme activity in the left ventricle after infarction. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:679-87.

Cai H, Li Z, Davis ME, Kanner W, et al. Akt dependent phosphorylation of serine 1179 and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 cooperatively mediate activation of the endothelial nitric-oxide synthase by hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 2003;63:325–31.

Chen EP, Bittner HB, Davis RD, et al. Extracellular superoxide dismutase transgene overexpression preserves post-ischemic myocardial function in isolated murine hearts. *Circulation* 1996;94:412-17.

Das DK, Maulik M, Engelman RM, et al. Redox regulation of angiotensin II signaling in the heart. *J Cell Mol Med* 2004;8:144-52.

DATASUS – Banco de dados do Sistema Único de Saúde. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/d>. DATASUS – Banco de dados do Sistema Único de Saúde. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/d.php?area=359A1B379C6D0E0F359G23H0I1Jd6L26M0N&VInclude=../site/infsaude.php&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?ibge/cnv/pop>. Acesso em: 15 de setembro de 2010.

DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, et al. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 2006;113:2097:104.

Delbosc S, Cristol JP, Descomps B, et al. Simvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac alteration and oxidative stress. *Hypertension* 2002;40:142–7.

Dhalla NS, Saini-Chohan HK, Rodriguez-Layva D, et al. Subcellular remodelling may induce cardiac dysfunction in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2009;81:429-38.

Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves MLM. Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK3 β /mTOR signaling pathway. *Basic Res Cardiol* 2009;104:653-67.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.

Ebrahimian T, Sairam MR, Schiffrin EL, et al. Cardiac hypertrophy is associated with altered thioredoxin and ASK-1 signaling in a mouse model of menopause. *Am J Physiol Heart Physiol* 2008;295:H1481-8.

Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease: Therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2006;7:3-14.

Fiorillo C, Nediani C, Ponziani V et al. Cardiac volume overload rapidly induces oxidative stress-mediated myocyte apoptosis and hypertrophy. *Biochim Biophys Acta* 2005;1741:173–82.

Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest* 1978;73:843-9.

Forman HJ. Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2007;42:926-32.

Francis J, Weiss RM, Wei SG, et al. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001;281:R1734–45.

Fukui T, Yoshiyama M, Hanatani A, et al. Expression of p22-phox and gp91-phox, essential components of NADPH oxidase, increases after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:1200-6.

Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:500-8.

Grieve DJ, Byrne JA, Cave AC, et al. Role of oxidative stress in cardiac remodeling after myocardial infarction. *Heart Lung Cir* 2004;13:132-38.

Heimburger ER. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg* 1946;652:67.

Heineke J & Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signaling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:589-600.

Hill MF & Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Am J Pathol* 1996;148:291-300.

Holmes JW, Borg TK, Cowel JW. Structure and mechanics of healing myocardial infarction. *Ann Rev Biomed Eng* 2005;7:223-53.

Hori M & Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2009;81:457-64.

Ichijo H, Nishida E, Irie K, et al. Induction of apoptosis by ASK-1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997;275:90-4.

Izumiya Y, Kim S, Izumi Y, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 plays a pivotal role in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodeling. *Circ Res* 2003;93:874-83.

Johns TNP & Olson BJ. Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 1954;140:675-82.

Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antiox Redox Signal* 2006;8:1865-79.

Kaul N, Siveski-liskovic N, Hill M et al. Free Radicals and the heart. *J Pharmacol Toxicol* 1993;30:55-67.

Khaper N & Singal PK. Modulation of oxidative stress by a selective inhibition of angiotensin II type 1 receptors in MI rats. *JACC* 2001;37:1461-6.

Kim G, Chun Y, Park J, et al. Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia–reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:619–24.

Kishimoto C, Shioji K, Nakamura H, et al. Serum thioredoxin (TRX) levels in patients with heart failure. *Jpn Circ J* 2001;65:491–4.

Klein D, Kern RM, Sokol RZ. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol* 1995;36:59-66.

Kumar R & Boim MA. Diversity of pathways for intracellular angiotensin II synthesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18:33-9.

Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, et al. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:615-21.

Llesuy SF. Introducción y especies activas de oxígeno. In: Marroni, N.P. Estresse oxidativo e antioxidantes, Porto Alegre, Ulbra, 2002. p. 21-32.

Lorenzo HK & Susin SA. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. *Drug Resist Updat* 2007;10:235-55.

Lu L, Quinn MT, Sun Y. Oxidative stress in the infarcted heart: role of de novo angiotensin II production. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:943-51.

Mak S & Newton GE. The oxidative stress hypothesis of congestive heart failure. *Chest* 2001;120:2035-46.

Maulik N & Das DK. Emerging potential of thioredoxin and thioredoxin interacting proteins in various disease conditions. *Biochim et Biophys Acta* 2008;1780:1368-82.

Mercier JC, DiSessa TG, Jarmakani JM et al. Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular volumes and ejection fraction in children. *Circulation* 1982;65:962-9.

Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, et al. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 2009;15:209-19.

Mosterd A, Cost B, Hoes AW, et al. The prognosis of heart failure in the general population: The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 2001;22:1318-27.

Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, et. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation*. 1998;98:794-99.

Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:687-95.

Palace VP, Hill MF, Farahmand F, et al. Mobilization of antioxidant vitamin pools and hemodynamic function after myocardial infarction. *Circulation* 1999;99:121-6.

Peron AP, Saraiva RM, Antonio EL, et al. Mechanical function is normal in remanescent myocardium during the healing period of myocardial infarction--despite congestive heart failure. *Arq Bras Cardiol* 2006;86:105-12.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979;44:503-12.

Pfeffer MA & Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161-72.

Pick E & Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980;38:161-70.

Pons S, Fornes P, Hagege AA, et al. Survival, haemodynamics and cardiac remodeling follow up in mice after myocardial infarction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:25-30.

Qin F, Liang MC, Liang C, et al. Progressive left ventricular remodeling, myocyte apoptosis, and protein signaling cascades after myocardial infarction in rabbits. *Biochim Biophys Acta* 2005;1740:499– 513.

Rabald S, Hagebdorff A, Pfeiffer D et al. Contrast enhanced echocardiographic follow-up of cardiac remodeling and function after myocardial infarction in rats. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:1561-71

Ruffels J, Griffin M, Dickenson JM. Activation of Erk 1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: role of Erk 1/2 in H₂O₂-induced cell death. *Eur J Pharmacol* 2004;483:163-73.

Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* 1998;17:2596-606.

Sales VL, Sukhova GK, Lopez-Illasaca MA, et al. Angiotensin type 2 receptor is expressed in murine atherosclerotic lesions and modulates lesion evolution. *Circulation* 2005;112:3328-36.

Samuel SM, Thirunavukkarasu M, Penumathsa SV, et al. Thioredoxin-1 gene therapy enhances angiogenic signaling and reduces ventricular remodeling in infarcted myocardium of diabetic rats. *Circulation* 2010;121:1244-55.

Seedon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signaling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 2007;93:903-7.

Shioji K, Kishimoto C, Nakamura H, et al. Overexpression of thioredoxin-1 in transgenic mice attenuates adriamycin-induced cardiotoxicity. *Circulation* 2002;106:1403-9.

Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, et al. Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 2005;115:2108-18.

Singal PK, Khaper N, Belló-Klein A, et al. Bhayana M. Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure. *Heart Failure Reviews* 1999;4:353-60.

Singal PK, Khaper N, Palace V, et al. The role of oxidative stress in the Genesis of heart disease. *Cardiovasc Res* 1998;40:426-32.

Singh N & Dhalla AK, Seneviratne C, et al. Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem* 1995;147:77-81.

Stone JR & Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:243-70.

Sun Y. Oxidative stress and cardiac repair/remodeling following infarction. *Am J Med Sci* 2007;334:197-205.

Susin AS, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-6.

Van-Kats JP, Dansen AH, van Meegen, et al. Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusion. *Circulation* 1998;98:73-81.

Walsh K. Akt signaling and growth of the heart. *Circulation* 2003;113:2032-34

World CJ & Yamawaki H. Thioredoxin in the cardiovascular system. *J Mol Med* 2006;84:997-1003.

Yamagishi H, Kim S, Nishikimi T. et al., Contribution of cardiac renin-angiotensin system to ventricular remodelling in myocardial infarcted rats. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:1369-80.

Yeste-Velasco M, Folch J, Jiménez A, et al. GSK-3 β inhibition and prevention of mitochondrial apoptosis inducing factor release are not involved in the antioxidant properties of SB-415286. *Eur J Pharmacol* 2008;588:239-43.

Yoshioka J, Schulze PC, Cupesi M et al. Thioredoxin-interacting protein controls cardiac hypertrophy through regulation of thioredoxin activity. *Circulation* 2004;109:2581-86.

Zhu Y, Zhu Y, Lu N, et al. Role of angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodeling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:911-8.

Zornoff LAM, Paiva SAR, Minicucci MF, et al. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol* 2009;93:403-8.