

Paula Felipe Martinez

**Estresse oxidativo e sinalização pelas
vias MAPK e NF- κ B no músculo sóleo de
ratos com insuficiência cardíaca crônica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Fisiopatologia em Clínica Médica, da Faculdade
de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do
título de Doutor.

Orientadora: Profa. Adj. *Marina Politi Okoshi*

Botucatu
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Martinez, Paula Felipe.

Estresse oxidativo e sinalização pelas vias MAPK e NF- κ B no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca crônica / Paula Felipe Martinez. – Botucatu : [s.n.], 2012

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Marina Politi Okoshi

Capes: 40101002

1. Pernas – Músculos.
2. Stress oxidativo.
3. Infarto do miocárdio.
4. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Infarto do miocárdio; Insuficiência cardíaca; Músculo esquelético; Ratos; Sinalização intracelular.

Epígrafe

“A sorte favorece a mente bem preparada.”

(Louis Pasteur)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, PAULO e LILIAN, e ao meu marido, SILVIO.

Agradecimento Especial

À minha orientadora Prof.^a Adjunta Dra. MARINA POLITI OKOSHI, pela competência na orientação, pela confiança no meu trabalho e na minha capacidade, pela dedicação, respeito e amizade e por contribuir de forma tão decisiva para o meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP processos nº 2007/59500-1 e nº 2010/50461-6) e ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq processo nº 476576/2008-3) pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Adjunto Dr. KATASHI OKOSHI, pela realização da avaliação ecocardiográfica dos animais, pelo apoio durante todo o curso de pós-graduação, pelo respeito e pela amizade.

Ao Prof. Adjunto Dr. LEONARDO ANTÔNIO MAMEDE ZORNOFF, pela realização da cirurgia para indução do infarto do miocárdio nos animais, pela atenção e pela colaboração para meu crescimento profissional.

Ao Prof. Titular Dr. LUIZ SHIGUERO MATSUBARA, pelo auxílio na interpretação dos dados da tese e por esclarecer minhas dúvidas sempre com muita paciência.

Ao Prof. Titular Dr. CARLOS ROBERTO PADOVANI, pelo auxílio com a análise estatística no artigo do cluster, por compartilhar sua experiência pessoal e profissional sempre com palavras muito sábias e pela acolhida em sua casa.

Ao Prof. Titular Dr. ANTÔNIO CARLOS CICOGNA, à Prof.^a Adjunta Dra. MAELI DAL PAI SILVA, Prof. Adjunto Dr. SERGIO ALBERTO RUPP DE PAIVA e ao Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci, pelo incentivo e pela colaboração durante todo o curso de pós-graduação.

Aos professores Dra. PAULA SCHMIDT DE AZEVEDO GAIOLLA e Dr. ROBSON FRANCISCO CARVALHO, pelas valiosas sugestões proferidas no exame de qualificação.

À Prof.^a Titular Dra. ETHEL LOURENZI BARBOSA NOVELLI e ao Dr. FÁBIO SEIVA pela análise das enzimas antioxidantes, realizada no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP.

Ao Prof. Adjunto Dr. FRANCISCO RAFAEL MARTINS LAURINDO, do Departamento de Cardio-Pneumologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, à pesquisadora Dra. DENISE DE CASTRO FERNANDES e à técnica do laboratório MARIA BERTOLINE pela análise da atividade da NADPH oxidase.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, ANA MARIA MENGUE, ALEXANDRE LUIS LOUREIRO, BRUNO JOSÉ FAJIOLLI, ELISÂNGELA APARECIDA DA SILVA, LAURA ANDRADE CÂMARA, MÁRIO AUGUSTO DALLAQUA, RENATO BORGES PEREIRA, pela atenção e pela gentileza com que sempre me ajudaram.

Aos funcionários do Laboratório Experimental, em especial à CAMILA RENATA CORRÊA, JOSÉ CARLOS GEORGETE, MÁRIO BAPTISTA BRUNO e VÍTOR MARCOS SOUZA, por colaborarem efetivamente para a realização deste trabalho.

Aos FUNCIONÁRIOS DA SECÃO DE PÓS-GRADUACÃO, pela disponibilidade e eficiência para resolver problemas.

Aos pós-graduandos do grupo CAMILINHA, CAMILA GIMENES, GABRIEL, NATASHA E RODRIGO, aos alunos de iniciação científica e a todos os demais colegas do laboratório pela boa convivência e pelo respeito.

Aos meus queridos amigos e grandes companheiros ALINE, CAMILA BONOMO, DANIELE, DIJON, LUANA, MARCELO, PRISCILA e RICARDO, pessoas que, além de imprescindíveis para a realização deste trabalho, sempre me trataram com muito carinho e respeito e tornaram minha jornada muito mais alegre e divertida.

À minha irmã REJANE, ao meu cunhado LUIZÃO e aos meus sobrinhos LARA e LUIGGI, por compreenderem a minha ausência e por encherem meu coração de alegria todas as vezes que nos encontrávamos em Prudente.

Aos meus pais, PAULO e LILIAN, grandes incentivadores desta minha empreitada, que me deixaram “sair do ninho” e “voar”, mas continuarão sendo sempre meu porto seguro, minha referência. “Dê a quem você ama asas para voar, raízes para voltar e motivos para ficar.” (Dalai Lama)

Ao meu marido SILVIO, por ter suportado a distância e a saudade e por partilhar comigo sua vida e seus sonhos. “Amar não é olhar um para o outro, é olhar juntos na mesma direção.” (Antonie de Saint-Exupéry).

A DEUS, por me dar perseverança e saúde. “É o espírito que conduz o mundo e não a inteligência.” (Antonie de Saint-Exupéry).

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	5
Introdução	9
Objetivos	16
Material e Métodos.....	18
Resultados	31
Discussão.....	46
Conclusão	59
Referências Bibliográficas.....	61
Atividades Desenvolvidas no Curso de Pós-Graduação	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência de sinais clínico e patológicos de insuficiência cardíaca nos ratos infartados.....	37
Tabela 2. Variáveis anatômicas	38
Tabela 3. Análise ecocardiográfica de variáveis estruturais do coração.....	39
Tabela 4. Análise ecocardiográfica de variáveis funcionais do coração	40
Tabela 5. Expressão gênica das subunidades da enzima NADPH oxidase no músculo sóleo	41
Tabela 6. Expressão proteica das MAPK no músculo sóleo.....	41
Tabela 7. Expressão de proteínas da via NF- κ B no músculo sóleo.....	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (Cat) no músculo sóleo; IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína. Resultados expressos em média \pm desvio padrão; ANOVA e teste de Bonferroni; * $p < 0,05$ versus Sham; # $p < 0,05$ versus IM-C 42
- Figura 2.** Concentração tecidual de hidroperóxido de lipídeo (LOOH) e 3-nitrotirosina no músculo sóleo. IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína. Resultados expressos em média \pm desvio padrão; ANOVA e teste de Bonferroni; # $p < 0,05$ versus IM-C.. 43
- Figura 3.** Concentração sérica de malondialdeído (MDA) e 3-nitrotirosina; IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína. Resultados expressos em média \pm desvio padrão; ANOVA e teste de Bonferroni; * $p < 0,05$ versus Sham; # $p < 0,05$ versus IM-C 44
- Figura 4.** Atividade da enzima NADPH oxidase do músculo sóleo. A e B: Quantificação dos compostos fluorescentes derivados da oxidação do dihidroetídio (DHE) por HPLC: razões 2-hidroxi-etídio/dihidroetídio consumido (EOH/DHE) e etídio/dihidroetídio consumido (E/DHE). C: Produção de H_2O_2 em fração de membrana estimulada com NADPH em ensaio com Amplex Red, IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína. Resultados expressos em média \pm desvio padrão; ANOVA e teste de Bonferroni; # $p < 0,05$ versus IM-C 45
- Figura 5.** Representação esquemática dos achados referentes às vias de Sinalização intracelular do músculo sóleo. As variáveis analisadas neste estudo estão em destaque nas formas com preenchimento colorido..... 58

LISTA DE ABREVIATURAS

BHT – hidroxitolueno butilado
Cat – catalase
DHE - dihidroetidina, hidroetidina, dihidroetídio
DNA – ácido desoxirribonucleico
DTPA – ácido dietileno triamino pentacético
E/DHE – razão etídio/DHE consumido
EOH – 2-hidroxietídio
EOH/DHE – razão 2-hidroxietídio/DHE consumido
EROs – espécies reativas de oxigênio
GAPDH – gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH – glutationa reduzida
GSSG – glutationa oxidada
GSH-Px – glutationa peroxidase
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IM – infarto do miocárdio
IkB – inibidor do NF-κB
LOOH – hidroperóxido de lipídeo
MAPK – proteínas quinases ativadas por mitógeno
MDA – malondialdeído
MyHC – cadeia pesada de miosina
mRNA – ácido ribonucleico mensageiro
MRF – fatores de regulação miogênica
MSK1 – quinase-1 ativada por mitógeno e estresse
NAC – *N*-acetilcisteína
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB – fator nuclear-kappaB
p65 – subunidade do NF-κB
rpm – rotações por minuto
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa
Ser – aminoácido serina
SOD – superóxido dismutase
Src – família de tirosina quinases
TNF-α – fator de necrose tumoral-alfa

RESUMO

Introdução: A insuficiência cardíaca caracteriza-se por intolerância aos exercícios físicos com o aparecimento precoce de fadiga e dispneia. Anormalidades intrínsecas da musculatura têm sido frequentemente descritas em músculos esqueléticos durante a insuficiência cardíaca e implicadas na fisiopatogenia dos sintomas. Os fatores responsáveis pelas alterações da musculatura esquelética na insuficiência cardíaca ainda não estão completamente definidos. Há substancial evidência que o estresse oxidativo está aumentado na insuficiência cardíaca e que possa estar envolvido nas alterações musculares. Entretanto, as fontes de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) na musculatura esquelética e suas vias de sinalização intracelular durante a insuficiência cardíaca ainda não estão completamente esclarecidas. Há poucos trabalhos sobre o complexo NADPH oxidase, importante fonte geradora de EROs, na insuficiência cardíaca. Estudos realizados em diversos modelos experimentais sugerem que as vias das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e do fator nuclear- κ B (NF- κ B) possam estar envolvidas nos mecanismos de resposta ao estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi verificar a participação das vias das MAPK e do NF- κ B na resposta muscular ao estresse oxidativo em ratos com insuficiência cardíaca crônica induzida por infarto do miocárdio (IM). **Métodos:** IM foi induzido por oclusão da artéria coronária esquerda. Quatro meses após a cirurgia, foram constituídos três grupos de animais: sham (n=24), IM-C (sem tratamento, n=24) e IM-NAC (IM tratado com o antioxidante *N*-acetilcisteína, 120 mg/kg/dia, n=24). Seis meses após a cirurgia, os animais foram submetidos a avaliação ecocardiográfica e, posteriormente, eutanasiados. O tamanho do IM foi avaliado por análise histológica; animais com infarto menor que 30% foram excluídos do estudo. A área seccional transversa das fibras do músculo sóleo foi mensurada em cortes corados com hematoxilina-eosina. A atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase e a concentração muscular de hidroperóxido de lipídeo foram avaliadas por espectrofotometria no músculo sóleo. A concentração sérica e muscular de 3-nitrotirosina e a concentração sérica de malondialdeído foram determinadas por ELISA e HPLC, respectivamente. A atividade da NADPH oxidase foi avaliada pela quantificação de produtos fluorescentes derivados da oxidação de dihidroxi-etídio por HPLC para avaliar a produção de superóxido e por ensaio com AmplexRed® para avaliar a produção de H₂O₂ no músculo sóleo. A

expressão gênica dos fatores de regulação miogênica (MyoD, miogenina e MRF4) e das subunidades do complexo NADPH oxidase (NOX2, NOX4, p22^{phox} e p47^{phox}) foi analisada por RT-PCR em tempo real no músculo sóleo. A expressão proteica dos fatores de regulação miogênica e de proteínas das vias das MAPK e do NF-κB foi avaliada por Western blot no músculo sóleo. A comparação entre os grupos foi realizada por análise de variância de uma via complementada com teste de Bonferroni (comparações: Sham x IM-C, IM-C x IM-NAC), exceto para avaliação do tamanho do infarto (teste *t* de Student). **Resultados:** O tamanho do IM foi semelhante entre os grupos IM e IM-NAC (IM-C: 47,6 ± 5,9%; IM-NAC: 47,7 ± 8,3%; *P* > 0,05). À avaliação ecocardiográfica, o grupo IM-C apresentou dilatação das câmaras cardíacas esquerdas associada a disfunção sistólica e diastólica. O tratamento com NAC atenuou a disfunção diastólica, verificada pela menor relação E/A no grupo IM-NAC em relação ao grupo IM-C. Quanto à análise da musculatura esquelética, ocorreu diminuição da atividade das enzimas antioxidantes glutationala peroxidase e superóxido dismutase no músculo sóleo de ratos com infarto do miocárdio e o tratamento com NAC não restaurou a atividade destas enzimas e reduziu a atividade da enzima catalase. A produção de superóxido e de H₂O₂ pela NADPH oxidase, em fração de membrana estimulada com NADPH, não se mostrou alterada no músculo sóleo dos ratos infartados. A atividade da NADPH oxidase foi menor no grupo IM-NAC em relação ao grupo IM-C, constatada pela menor produção de superóxido, porém sem alteração da produção de H₂O₂. A expressão das subunidades NOX2, NOX4 e a p22^{phox} não se alterou nos animais do grupo IM-C, porém a expressão da p47^{phox} foi menor neste grupo em relação ao Sham. A administração de NAC promoveu redução na expressão de NOX4 e p22^{phox} e não atenuou a redução da p47^{phox} no músculo sóleo dos ratos infartados. Em relação aos marcadores de estresse oxidativo no músculo sóleo, não houve diferença significativa entre os grupos quanto à concentração tecidual de hidroperóxido de lipídeo. A concentração muscular de 3-nitrotirosina foi semelhante entre os grupos Sham e IM-C e menor no grupo IM-NAC quando comparado ao IM-C (Sham 2,89 ± 0,80; IM-C 3,33 ± 0,95; IM-NAC 2,1 ± 0,96 nM/mg proteína; *P* = 0,039). Quanto à concentração sérica, houve aumento significativo de malondialdeído no grupo IM-C quando comparado ao Sham, mas não houve diferença significativa entre os grupos IM-C e

IM-NAC (Sham $0,98 \pm 0,22$; IM-C $1,24 \pm 0,11$; IM-NAC $1,35 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/mL}$; $P < 0,001$). A concentração sérica de 3-nitrotirosina foi semelhante entre os grupos IM-C e Sham e menor no grupo IM-NAC que no IM-C. A expressão gênica e protéica dos fatores de regulação miogênica foi semelhante entre os grupos Sham e IM-C. Nos animais infartados tratados com NAC, ocorreu apenas aumento da expressão gênica do MRF4, porém não acompanhada de alteração em sua expressão proteica. Considerando a expressão de proteínas das vias das MAPK, verificamos que os animais do grupo IM-C apresentaram aumento da fosforilação da JNK1/2 e redução da expressão de p38 MAPK total e ERK1/2 fosforilada e total no músculo sóleo. Verificamos também redução da expressão de MSK1 total e preservação da expressão de Src. Nos ratos infartados, o tratamento com NAC restaurou a expressão de ERK1/2 total e não alterou a fosforilação da JNK e da ERK e a expressão de p38 MAPK total e MSK1 total. Entretanto, a expressão de Src total foi reduzida no grupo IM-NAC. Quanto à via do NF- κ B, observamos redução da expressão da subunidade p65 do NF- κ B total associada a aumento da fosforilação em Ser276, sem alteração da fosforilação em Ser536, e aumento da fosforilação do I κ B. O tratamento com NAC não alterou a expressão da subunidade p65 do NF- κ B total, mas promoveu redução da fosforilação tanto em Ser276 quanto em Ser536 desta proteína. Já a fosforilação do I κ B foi semelhante entre os grupos IM-C e IM-NAC. **Conclusão:** Aumento do estresse oxidativo está associado com ativação das vias MAPK e do NF- κ B no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca. A administração de *N*-acetilcisteína resulta em atenuação do estresse oxidativo sistêmico e no músculo sóleo.

ABSTRACT

Introduction: Heart failure is characterized by decreased exercise tolerance with early exacerbation of symptoms, such as muscle fatigue and dyspnea. Intrinsic skeletal muscle abnormalities have been suggested to play a role in reduced physical capacity during heart failure. Nevertheless, causal or contributing factors responsible for cardiac failure-induced muscle alterations have not been completely defined. There is substantial evidence that increased oxidative stress in heart failure can contribute to skeletal muscle changes. However, source of reactive oxygen species (ROS) generation and signaling pathways in skeletal muscle during heart failure are still unclear. There are few studies on heart failure evaluating NADPH oxidase, an important ROS source, in skeletal muscle. Several experimental studies have suggested that mitogen-activated protein kinase (MAPK) and nuclear factor-kappaB (NF- κ B) can be involved in skeletal muscle response to oxidative stress. This study aimed to evaluate the participation of MAPK and NF- κ B signaling pathways in soleus muscle response to oxidative stress in rats with myocardial infarction-induced chronic heart failure.

Methods: Myocardial infarction (MI) was induced by left coronary occlusion. Sham-operated animals were used as controls. Four months later, rats were assigned to three groups: Sham (n=24), MI-C (MI without treatment, n=24), and MI-NAC (MI treated with the antioxidant *N*-acetylcysteine, 120 mg/kg/day, n=24). Six months after surgery, rats were subjected to echocardiographic evaluation and euthanized. Infarct size was measured by histological analysis; rats with small MI (< 30%) were excluded. Soleus muscle fibers cross-sectional areas were measured in hematoxylin and eosin stained sections. Activity of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase (Cat), and muscle concentration of lipid hydroperoxide were assessed by spectrophotometry. 3-Nitrotyrosine concentration was determined by ELISA in both serum and soleus muscle. Malondialdehyde (MDA) serum concentration was evaluated by HPLC. NADPH oxidase activity was assessed by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation fluorescent products to evaluate superoxide generation and by AmplexRed[®] assay to evaluate hydrogen peroxide production in soleus muscle. Gene expression of myogenic regulatory factors (MyoD, myogenin, and MRF4) and subunits of NADPH oxidase complex (NOX2, NOX4, p22^{phox} e p47^{phox}) was evaluated by real time RT-PCR in soleus muscle. Protein levels of myogenic regulatory factors and total and phosphorylated

forms of MAPK and NF- κ B pathways proteins were analyzed by Western blot in soleus muscle. For statistical analysis, one-way analysis of variance and Bonferroni test were performed to evaluate all the variables (comparisons: Sham \times MI-C, MI-C \times MI-NAC), but MI size (Student's t test). **Results:** MI size did not differ between MI-C and MI-NAC groups (MI-C $47.6 \pm 5.9\%$; MI-NAC $47.7 \pm 8.3\%$; $P > 0.05$). In echocardiographic evaluation, MI-C group presented dilation of left cardiac chambers combined with systolic and diastolic dysfunction. NAC treatment attenuated diastolic dysfunction, verified by a reduced E/A ratio in MI-NAC group compared to MI-C group. In skeletal muscle, activity of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutase was decreased in the MI-C group; NAC did not restore these enzymes activity and reduced catalase activity. Superoxide and hydrogen peroxide generation by NADPH oxidase, in NADPH-stimulated enriched membrane fraction, was not changed in soleus muscle of infarcted rats. NADPH oxidase activity was lower in MI-NAC compared to MI-C group, as superoxide production was reduced and hydrogen peroxide generation was unchanged. Gene expression of NOX2, NOX4, and p22^{phox} subunits did not differ between Sham and MI-C groups; p47^{phox} expression was lower in MI-C compared to Sham. NAC treatment decreased NOX4 e p22^{phox} gene expression, but did not attenuate the reduction in p47^{phox} expression in the soleus muscle of infarcted rats. Muscle concentration of lipid hydroperoxide did not differ between groups; 3-Nitrotyrosine was lower in MI-NAC than MI-C and similar between MI-C and Sham groups (Sham 2.89 ± 0.80 ; MI-C 3.33 ± 0.95 ; MI-NAC 2.1 ± 0.96 nM/mg protein; $P = 0.039$). MDA serum concentration was higher in MI-C than Sham, with no difference between MI-C and MI-NAC groups (Sham 0.98 ± 0.22 ; MI 1.24 ± 0.11 ; MI/NAC 1.35 ± 0.16 μ mol/mL serum; $P < 0.001$). 3-Nitrotyrosine serum concentration was similar in MI-C and Sham groups and lower in MI-NAC than MI-C. Gene expression and protein levels of myogenic regulatory factors did not differ between Sham and MI-C groups. In infarcted rats treated with NAC, MRF4 gene expression was increased, while protein levels did not change. Considering protein levels of MAPK pathway, we detected increase in phosphorylated JNK1/2 and decrease in total p38, and total and phosphorylated ERK1/2 in soleus muscle of infarcted rats. Furthermore, total MSK1 was reduced and Src was preserved. NAC treatment restored the level of total ERK1/2, but did not change JNK and ERK phosphorylation

and total p38 and MSK1 levels. Protein levels of total Src was lower in MI-NAC than in MI-C group. Concerning to NF- κ B pathway, we observed reduction of total NF- κ B p65 subunit combined with increased phosphorylation of both Ser276 residue in p65 and I κ B, and unchanged Ser536 phosphorylation. Treatment with NAC did not modify I κ B phosphorylation and total NF- κ B p65 subunit, but decreased Ser276 and Ser536 residues phosphorylation. **Conclusion:** Increased oxidative stress is associated to MAPK and NF- κ B pathways changes in soleus muscle of rats with heart failure. Treatment with *N*-acetylcysteine attenuates systemic and muscular oxidative stress.

INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca crônica caracteriza-se por redução da tolerância aos exercícios físicos com ocorrência precoce de fadiga e dispneia. Embora os mecanismos responsáveis por esses sintomas venham sendo estudados nas últimas décadas, sua fisiopatogenia ainda é pobremente entendida ¹. Inicialmente, considerava-se que a capacidade reduzida para exercícios e a ocorrência prematura de sintomas fossem causadas por diminuição da capacidade funcional do coração com consequente congestão pulmonar e redução da perfusão e oxigenação tecidual. Posteriormente, foi observado que há fraca associação entre variáveis hemodinâmicas e de função ventricular em repouso e tolerância ao exercício em pacientes com insuficiência cardíaca ²⁻⁴. Como não foi confirmada a suposição inicial de que a capacidade para exercícios fosse diretamente relacionada ao grau de disfunção ventricular, foi levantada a hipótese que alterações intrínsecas na musculatura esquelética periférica pudessem ter papel na tolerância reduzida aos exercícios físicos⁵.

A partir de 1990, diversas anormalidades passaram a ser descritas em músculos esqueléticos durante a insuficiência cardíaca. Atrofia muscular foi detectada em 68% dos pacientes com insuficiência cardíaca crônica ⁶, principalmente em músculos dos membros inferiores ⁷. Aumento de fibrose e redução da densidade capilar foram observados em músculos de ratos com insuficiência cardíaca ⁸. Além das alterações morfológicas, também foram descritas anormalidades metabólicas, enzimáticas e bioquímicas. Diminuição da atividade de enzimas oxidativas como citrato sintase, 3-hidroxiacil-CoA-desidrogenase e citocromo-c oxidase foi observada na musculatura esquelética periférica tanto de animais ⁹⁻¹² como de pacientes com insuficiência cardíaca ^{13,14}. Alterações no padrão das fibras musculares esqueléticas, com aumento das fibras tipo II, rápidas, e redução das fibras tipo I, lentas, têm sido frequentemente encontradas na insuficiência cardíaca ¹⁵. Em estudo prévio, verificamos que ratos com estenose aórtica apresentam alteração da composição das cadeias pesadas de miosina do músculo sóleo, com diminuição das fibras do tipo I e das cadeias pesadas de miosina (MyHC) I e aumento das fibras do tipo IIa e MyHC IIa¹⁶. Interessantemente, esta alteração foi observada tanto na fase de hipertrofia ventricular compensada, como na fase de insuficiência cardíaca estabelecida, o que sugere que as modificações da musculatura esquelética possam ser decorrentes não

somente da piora hemodinâmica característica da insuficiência cardíaca, mas também de anormalidades bioquímicas e/ou neuro-hormonais associadas ao quadro de injúria do coração.

Os fatores responsáveis pelas alterações da musculatura esquelética na insuficiência cardíaca ainda não estão completamente definidos. Também não são conhecidos os mecanismos moleculares e as vias sinalizadoras que controlam as alterações dos músculos esqueléticos durante a insuficiência cardíaca.

Há substancial evidência que o estresse oxidativo está aumentado na insuficiência cardíaca, tanto no miocárdio como em nível sistêmico¹⁷. Recentemente, também foi observado aumento do estresse oxidativo na musculatura esquelética durante insuficiência cardíaca^{18,19}. Em biópsias do músculo vasto lateral de pacientes, foram verificados aumento da nitrotirosina e lipoperoxidação com redução dos níveis de mRNA e da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e catalase (Cat)¹⁹. Em camundongos com infarto do miocárdio, foi observado aumento da peroxidação lipídica associado a aumento da geração de espécies reativas de oxigênio, porém sem alteração na atividade de enzimas antioxidantes²⁰.

Embora já esteja bem estabelecido que ocorre aumento do estresse oxidativo na musculatura esquelética durante a insuficiência cardíaca, as fontes de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) ainda não estão completamente esclarecidas. O complexo NADPH oxidase (NOX) constitui importante fonte geradora de EROs^{21,22}. A classe de proteínas NADPH oxidases constitui um grupo de enzimas cuja função é produzir espécies reativas de oxigênio. Durante muito tempo, considerou-se que apenas fagócitos pudessem produzir superóxido a partir da NADPH oxidase. Entretanto, nos últimos anos, seis homólogos da subunidade NOX2 (gp91^{phox}) de fagócitos foram descritos e identificados em vários tecidos. Essas enzimas compartilham a capacidade de gerar superóxido e outras espécies reativas de oxigênio²³. No músculo esquelético, são expressas duas isoformas, NOX2 e NOX4^{21,24,25}.

Apesar destas similaridades, as proteínas NOX diferem entre si quanto ao modo de ativação, à interação com a pequena proteína transmembrana p22^{phox} e à necessidade adicional de fatores de maturação e ativação. A NOX2 forma complexo

com a p22^{phox}, cuja ativação depende da ligação com as subunidades regulatórias citosólicas p47^{phox} e p67^{phox} ²³. Diferentemente das outras isoformas, a NOX4 é constitutivamente ativa e independente de proteínas citosólicas regulatórias ou ativadoras. Outra diferença importante entre a NOX2 e NOX4 é que a NOX2 tem como produto primário o ânion radical superóxido e como secundário o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), derivado da dismutação do superóxido pela enzima SOD ²², enquanto a NOX4 pode gerar diretamente H₂O₂ ²⁶.

Na insuficiência cardíaca, Ohta e cols. ²⁷ verificaram, por ensaio quimiluminescente com lucigenina, aumento da atividade da NADPH oxidase na musculatura esquelética de camundongos infartados. Entretanto, não avaliaram a expressão das subunidades do complexo NADPH oxidase e também não verificaram a produção de H₂O₂ estimulada com NADPH.

Outro fator que ainda não está completamente esclarecido na fisiopatogenia da miopatia associada à insuficiência cardíaca refere-se às vias de sinalização pelas quais o estresse oxidativo leva às alterações da musculatura esquelética. Estudos realizados em diversos modelos experimentais sugerem que as vias das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e do fator nuclear-κB (NF-κB) possam estar envolvidas nestes mecanismos de resposta ²⁸⁻³⁰.

As MAPK incluem quatro subfamílias, das quais três já estão bem caracterizadas, ERKs, JNKs e p38-MAPK. As ERKs estão envolvidas, principalmente, em processos anabólicos como divisão celular, crescimento e diferenciação, enquanto as JNKs e p38-MAPK estão mais associadas com respostas celulares a diversos tipos de estresse ^{28,29}. Há relatos que, após aumento do estresse oxidativo, a ativação das MAPKs, em especial JNK e ERK, é decorrente de estimulação por quinases da família Src ^{31,32}. Outros estudos, entretanto, implicam as proteínas tioredoxina (Trx) e quinase 1 reguladora do sinal de apoptose (ASK1) na ativação de MAPKs ^{33,34}. Mais especificamente, as espécies reativas de oxigênio induzem a dimerização de Trx e sua dissociação da ASK1 que, então, se torna ativada. A seguir, a ASK1 ativada promove a estimulação da p38-MAPK e da JNK ^{35,36}. Estudos recentes mostraram que a p38-MAPK pode ter papel dual na miogênese ³⁷. Enquanto nos estágios iniciais da miogênese, a p38 induz diferenciação celular, em estágios mais avançados, sua

atividade deve ser suprimida para permitir alongamento, polarização, agregação e fusão das células diferenciadas ³⁷.

Adicionalmente, as MAPK estão envolvidas na modulação dos fatores de regulação miogênica (MRF) miogenina, MyoD e MRF4. Lluís et al. ³⁸ mostraram que a p38 fosforila a proteína E47 em serina 140 e induz a associação MyoD/E47 e a ativação da transcrição de genes músculo-específicos. Por outro lado, a p38 também pode inibir a atividade transcricional do MRF4 por meio de fosforilação de dois resíduos de serina ³⁹. A miogenina também pode ser influenciada pela p38. Chen et al. ⁴⁰ mostraram que a ativação da p38 induzida por baixas concentrações de TNF- α , como ocorre em condições fisiológicas, estimula a expressão da miogenina. Por outro lado, em situações de altas concentrações de TNF- α , há maior ativação da p38 e, nessa condição, ocorre redução da quantidade de miogenina nas células musculares.

Enquanto há vários estudos mostrando a participação da p38 na regulação da miogênese, pouco é conhecido sobre o papel das ERKs e JNKs neste processo. A JNK, assim como a p38, está associada à atrofia muscular induzida por citocinas ^{41,42}. Por outro lado, a sinalização da ERK está envolvida na sinalização dos efeitos hipertróficos do IGF-1 ⁴³ e dos agonistas do receptor β -adrenérgico ⁴⁴.

Outra via sinalizadora que pode ser ativada pelo acúmulo das espécies reativas de oxigênio é a via NF- κ B. A ativação do NF- κ B, especialmente em sua forma mais comum, dímero p50-p65, depende da fosforilação do seu inibidor endógeno I κ B por meio da ação das I κ B quinases (IKKs). Este processo leva à ubiquitinação do I κ B e sua subsequente degradação proteossomal, permitindo a translocação do heterodímero de NF- κ B para o núcleo, onde ele ativa genes alvos específicos ^{45,46}. Recentemente, vários trabalhos indicaram que modificações pós-traducionais do NF- κ B, particularmente fosforilação e acetilação, desempenham papel adicional significativo na ativação do fator transcricional. Quatro diferentes resíduos de serina da subunidade p65 (também conhecida como RelA) podem ser fosforilados. Entre eles, Ser276 e Ser536 podem ser fosforilados pela quinase-1 ativada por mitógeno e estresse (MSK1) ⁴⁷ ou pela quinase-1 S6 ribossômica (RSK1), respectivamente ⁴⁸. Uma vez que membros da família das MAPK ativam estas quinases, elas representam um ponto de interação em potencial entre as duas vias. Finalmente, é importante salientar que, em determinadas condições experimentais, as EROs podem também

inibir a ativação do fator NF- κ B^{30,49,50}, como verificado em cultura de linfócitos T^{49,50}. Não identificamos, porém, estudos em músculo esquelético que tenham mostrado inibição da via NF- κ B decorrente de aumento do estresse oxidativo.

O papel do NF- κ B na diferenciação muscular ainda é controverso. Enquanto alguns estudos sugerem que a atividade transcricional do NF- κ B é necessária para o processo de diferenciação⁵¹⁻⁵³, outros apontam o NF- κ B como um regulador negativo da miogênese cuja ativação crônica está associada à perda de massa muscular⁵⁴. Os trabalhos favoráveis à participação do NF- κ B na diferenciação muscular sugerem que sua atividade transcricional é mediada pela p38 e pode levar a aumento na expressão da MyoD⁵¹⁻⁵³.

Diante do exposto, há substancial evidência que as MAPK e o NF- κ B podem desempenhar papel importante na miogênese por meio da modulação tanto da transcrição como da ativação dos fatores de regulação miogênica. Os fatores de regulação miogênica MyoD, miogenina, Myf5 e MRF4 atuam como reguladores da expressão de proteínas musculares e do metabolismo celular⁵⁵⁻⁵⁸. São fatores transcpcionais que ativam a expressão de genes específicos do músculo por meio de ligação a elementos de controle no DNA, conhecidos como E-box, presentes na região promotora de vários genes músculo-específicos. A MyoD é expressa em maior quantidade que a miogenina em músculos rápidos, enquanto o oposto ocorre em músculos lentos^{55,56}. A MyoD encontra-se aumentada em situações de ativação e proliferação de células satélites, que são precursoras das fibras musculares e responsáveis pela regeneração dos músculos esqueléticos^{59,60}. A miogenina, por sua vez, encontra-se frequentemente associada à expressão de enzimas oxidativas e parece ter papel fundamental na caracterização do metabolismo muscular^{61,62}. Finalmente, o MRF4 parece estar envolvido na regulação do fenótipo muscular e sua expressão ocorre, predominantemente, em fibras lentas, oxidativas⁶³. Em nosso laboratório, em modelo de insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos, observamos aumento da expressão gênica da MyoD e redução da expressão proteica de miogenina no músculo esquelético sóleo⁶⁴. Entretanto, não identificamos estudos sobre insuficiência cardíaca avaliando, especificamente, a relação entre aumento do estresse oxidativo, MRF e vias das MAPK e do NF- κ B na musculatura esquelética.

Finalmente, para demonstrar o papel do estresse oxidativo nas alterações musculares associadas à insuficiência cardíaca, é importante a realização de interferência funcional com fármaco com potencial para proteger células musculares contra o estresse oxidativo e, conseqüentemente, impedir o desenvolvimento das alterações musculares. O tripeptídeo glutathione (L-glutamyl-cysteinyl-glycine) participa de várias funções metabólicas celulares e desempenha papel importante na defesa celular contra o estresse oxidativo ⁶⁵. Na insuficiência cardíaca crônica, foram verificadas alterações do estado redox da glutathione ⁶⁶ e diminuição da concentração de glutathione total ⁶⁷ no tecido cardíaco. Recentemente, foi observado que a administração oral de *N*-acetilcisteína (NAC), um precursor da glutathione, pode restabelecer os níveis de glutathione total no coração de ratos infartados e reduzir significativamente marcadores de estresse oxidativo, como hidróperóxido de lipídeo e peróxido de hidrogênio ^{67,68}.

Neste trabalho testamos a hipótese que as vias das MAPK e do NF-κB estão envolvidas na resposta muscular ao aumento do estresse oxidativo durante a insuficiência cardíaca e que o tratamento com *N*-acetilcisteína pode atenuar as alterações nestas vias sinalizadoras.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar a participação das vias das MAPK e do NF- κ B na resposta muscular ao estresse oxidativo em ratos com insuficiência cardíaca crônica induzida por infarto do miocárdio.

Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes e quantificar marcadores de estresse oxidativo na musculatura esquelética de ratos com insuficiência cardíaca crônica. Elucidar a fonte de espécies reativas de oxigênio por meio da análise da atividade da NADPH oxidase.
2. Analisar a expressão gênica das subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase;
3. Quantificar proteínas das vias das MAPK e do NF- κ B;
4. Mensurar a área seccional transversa das fibras;
5. Determinar a expressão gênica e proteica dos fatores de regulação miogênica na musculatura esquelética;
6. Verificar se o tratamento com o precursor da glutatona *N*-acetilcisteína atenua ou previne as alterações musculares e se este potencial efeito benéfico é mediado pelas vias estudadas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Grupos experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso corporal entre 200 e 250 g, provenientes do Biotério do Campus de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com quatro ratos por caixa, em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C), com ciclos de luminosidade de 12 h e alimentados com ração comercial Purina e água *ad libitum* (aprovado em 27/11/2008 pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Protocolo nº 707).

O infarto agudo do miocárdio foi produzido de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório ^{69,70}. Em resumo, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60 mg/kg) e submetidos a toracotomia lateral esquerda. Após exteriorização do coração, o átrio esquerdo foi afastado e a artéria coronária esquerda ligada com fio mononylon 5.0 entre a saída da artéria pulmonar e o átrio esquerdo. A seguir, o coração foi recolocado no tórax, os pulmões foram inflados com pressão positiva e o tórax fechado por sutura com algodão 10. Os animais pertencentes ao grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligação da artéria coronária, responsável pela produção do infarto. Foram constituídos dois grupos de animais: Sham e infarto do miocárdio (IM).

Após a indução de infarto do miocárdio, o desenvolvimento de insuficiência cardíaca ocorre, habitualmente, em ratos com infartos moderados ou grandes, que acometem porcentagem equivalente ou superior a 30% da massa do ventrículo esquerdo ^{69,71}. Portanto, três semanas após a indução do infarto, foi realizado ecocardiograma transtorácico para avaliação do tamanho do infarto. Ratos com infartos pequenos (< 30%) ⁷² foram descartados do presente estudo. Quatro meses após a indução do infarto do miocárdio, o grupo com IM foi subdividido em dois grupos: IM não tratado (IM-C) e IM tratado com NAC adicionada à ração (IM-NAC; dose: 120 mg/kg/dia) ⁶⁷. Para certificar que os ratos infartados apresentavam o mesmo grau de comprometimento cardíaco antes do tratamento com NAC, foi realizado ecocardiograma transtorácico antes do início do tratamento medicamentoso.

Seis meses após o procedimento cirúrgico para ligação da artéria coronária, foi novamente realizado ecocardiograma transtorácico. No dia subsequente, os animais foram avaliados por dois examinadores para verificação do sinal clínico de insuficiência cardíaca taquipnéia/respiração laboriosa e, a seguir, eutanasiados para coleta de sangue e obtenção de tecidos. No exame *post mortem*, foram pesquisados sinais patológicos para confirmação do diagnóstico de insuficiência cardíaca como ascite, congestão hepática, derrame pleural e pericárdico, trombo em átrio esquerdo, hipertrofia do ventrículo direito (relação peso do ventrículo direito em mg/peso corporal em g > 0,8) e congestão pulmonar (relação peso dos pulmões/peso corporal > 2 desvios padrão acima da média do grupo Sham)^{69,70}.

Conforme referido anteriormente, em nosso laboratório foram realizados estudos prévios da musculatura esquelética de ratos para avaliar alterações associadas à insuficiência cardíaca. Para análises morfológicas e moleculares dos músculos esqueléticos, a inclusão de sete a dez animais por grupo foi suficiente para mostrar diferenças estatisticamente significantes nas variáveis estudadas^{16,64,70,73}. Assim, para cada análise, foram avaliados oito animais por grupo experimental.

2. Avaliação estrutural e funcional do coração pelo ecocardiograma

Quatro e seis meses após o procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (60 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg), por via intraperitoneal para o estudo ecocardiográfico. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma utilizando-se equipamento Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5 a 11,5 MHz. A avaliação do fluxo transvalvar mitral foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. As variáveis morfológicas e funcionais do coração foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita em nosso laboratório⁷⁴. Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro de precisão, de acordo com

as recomendações da American Society of Echocardiography ⁷⁵ já validadas no modelo de ratos infartados ⁷⁶. As estruturas cardíacas foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos.

O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), a área diastólica da cavidade ventricular esquerda, a espessura diastólica da parede posterior (EDPP) e a espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV) foram mensurados no momento do ciclo cardíaco correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico (DSVE) e a área sistólica da cavidade do ventrículo esquerdo foram obtidos no momento em que a cavidade apresentava o diâmetro mínimo. Foram mensurados também os diâmetros do átrio esquerdo (AE) e da aorta (AO). A função sistólica do VE foi avaliada pelo cálculo da porcentagem de encurtamento endocárdico ($\Delta D = (DDVE - DSVE) / DDVE \times 100$), pela velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP) e pela porcentagem de variação de área ($\Delta \text{Área}$). O fluxo diastólico transmitral foi obtido com o transdutor colocado na posição apical quatro câmaras, permitindo as medidas da onda E (E), onda A (A) e do tempo de desaceleração da onda E (TDE). O tempo entre o final da ejeção e o início do enchimento diastólico ventricular, correspondente ao tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), foi também mensurado. A frequência cardíaca (FC) foi calculada pelo intervalo de tempo entre dois batimentos consecutivos.

3. Coleta da musculatura esquelética e de outros tecidos para análise

A coleta do material foi realizada no Laboratório Experimental da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Um dia após a realização do ecocardiograma, os animais foram pesados e, a seguir, anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Após coleta do sangue, o coração foi retirado por toracotomia mediana. Os átrios, o ventrículo direito (VD) e o ventrículo esquerdo (VE), incluindo o septo, foram dissecados e pesados separadamente. O sangue foi centrifugado a 4 °C; amostras do soro foram separadas e armazenadas a -80 °C até o momento das dosagens.

A seguir, foram dissecados os músculos sóleos dos membros pélvicos direito e esquerdo. O tecido epitelial do membro pélvico foi removido e o músculo gastrocnêmio rebatido, possibilitando a retirada do músculo sóleo. Imediatamente após a dissecação, as amostras musculares foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e conservadas a -80 °C. O peso dos pulmões foi utilizado para avaliação do grau de congestão pulmonar. Fragmentos de pulmão e fígado foram pesados antes e após desidratação em estufa a 65 °C por 72 horas para avaliar o grau de edema dos tecidos.

4. Análise histológica do coração

Amostras anelares do VE foram fixadas em solução de formol a 10% por período de 24 horas e, a seguir, lavadas em água corrente e transferidas para solução com etanol 70%, de acordo com o método previamente descrito ⁷⁷. Para cálculo do tamanho do infarto, foi realizado corte do VE na distância de 5 a 6 mm do ápice. Os valores obtidos nesta região correspondem à média dos valores obtidos em cortes de todo o coração ⁷⁸. Os cortes histológicos foram corados em lâmina com Picrosirius Red e examinados em microscópio Leica DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado do programa Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). O tamanho do infarto foi determinado pela razão entre a soma dos comprimentos epicárdico e endocárdico do segmento infartado e a soma das circunferências epicárdica e endocárdica totais ⁷⁷. O valor foi expresso em porcentagem do VE.

5. Análise histológica da musculatura esquelética

Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras de tecido foram transferidas para câmara de micrótomo criostato (-20 °C), onde permaneceram por 20 a 30 min para estabelecimento do equilíbrio térmico. Os blocos de tecido muscular foram, então, fixados em suportes metálicos do criostato (JUNG CM 1800 - Leica) por pequenas quantidades de adesivo (OCT - Tissue Tek Compound) e orientados de modo que os cortes fossem feitos transversalmente à direção das

fibras. Os cortes foram corados pelo método hematoxilina e eosina. A área seccional das fibras musculares foi avaliada no sistema de análise por imagem computadorizada utilizando a técnica de Pearse modificada por Dubowitz ⁷⁹. Para cada animal, foram medidos, em média, 15 campos, totalizando 150 a 200 fibras.

6. Quantificação do estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi analisado por meio da quantificação de marcadores de lipoperoxidação (hidroperóxido no músculo sóleo e malonaldeído no soro) e nitração proteica (3-nitrotirosina, no músculo sóleo e no soro). Para elucidar a fonte de EROs, a atividade da NADPH oxidase foi avaliada no músculo sóleo. Também foi analisada a atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase, superóxido dismutase e catalase.

6.1. Análise da atividade de enzimas antioxidantes e dosagem de hidroperóxido de lipídeo

As amostras de músculo esquelético (200 mg) foram descongeladas e homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0. Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinação de proteínas totais ⁸⁰, análise da atividade das enzimas antioxidantes e dosagem de hidroperóxido de lipídeo. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II, England) e em leitor de microplaca (µQuant-MQX 200 com Kcjunior software, Bio-Tec Instruments, USA). Todos os reagentes foram de procedência da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9) foi determinada por meio da oxidação da glutathiona em presença de peróxido de hidrogênio e cumene hidroperóxido ⁸¹. A atividade da superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) foi determinada pela alteração na redução do nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura NADH (nicotinamida adenina

dinucleotídeo reduzido) e fenazina metassulfato em pH fisiológico ⁸². A atividade enzimática da catalase (Cat, E.C. 1.11.1.6) foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 12,5 dL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 240 nm ⁸³.

A concentração de hidroperóxido de lipídio (LOOH) foi determinada pela oxidação do Fe²⁺ (sulfato ferroso amoniacal). O Fe³⁺ formado reage com alaranjado de xilenol formando composto colorido. Leituras foram realizadas a 560 nm ⁸⁴.

As análises descritas nesta seção foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, sob orientação da Prof. Titular Dra. Ethel Lourenzi Barbosa Novelli.

6.2. Quantificação de malondialdeído

A peroxidação lipídica foi também avaliada pela dosagem de malondialdeído (MDA) utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ⁸⁵. Resumidamente, 100 µL de soro foram tratados com butil hidroxitolueno (5% em etanol), seguido por precipitação de proteína utilizando ácido tricloroacético (10% massa/volume), a 95 °C por 20 min. A seguir, a amostra foi resfriada em gelo por 5 min e centrifugada a 14.000 rpm por 10 min para precipitação do material insolúvel. Aliquota do sobrenadante (300 µL) foi acrescida de 650 µL ácido tiobarbitúrico (0,4% massa/volume, em tampão acetato, pH 3,5) e 50 µL de KOH 3,065 M e aquecida novamente a 95 °C por 45 min, seguido de resfriamento em gelo por 5 min. Posteriormente, 50 µL da amostra foram injetados no cromatógrafo e analisados utilizando-se Coluna C18 (0,46 x 8,3 cm) e detector de fluorescência (Waters 2475), com excitação 515 nm e emissão 553 nm. A fase móvel do HPLC foi constituída por tampão fosfato 20 mM e acetonitrila (80:20, por volume) e o fluxo foi estabelecido em 0,8 mL/min. O tempo de corrida foi de 20 min. A quantificação do MDA foi realizada por comparação das integrais das áreas dos picos correspondentes com as integrais obtidas com padrões autênticos submetidos às mesmas condições cromatográficas.

6.3. Quantificação de 3-nitrotirosina

A concentração de 3-nitrotirosina foi quantificada no soro e em extrato proteico do músculo sóleo utilizando-se *OxiSelect™ Nitrotyrosine ELISA Kit* (STA-305, Cell Biolabs, San Diego, CA, EUA), de acordo com protocolo preconizado pelo fabricante. Em resumo, 50 µL de amostra ou solução padrão (fornecida pelo kit) foram pipetados nos poços da placa e incubados por 10 min, em temperatura ambiente, no agitador orbital. A seguir, foram acrescentados 50 µL de anticorpo anti-nitrotirosina e realizada incubação por 1 h em temperatura ambiente sob agitação. Após este período, foram realizadas três lavagens com 250 µL de tampão de lavagem 1X para cada poço. Foram acrescentados 100 µL de anticorpo secundário conjugado a enzima e foi realizada incubação por 1 h a temperatura ambiente sob agitação. A seguir, foi efetuada outra lavagem, como descrito anteriormente, seguida de acréscimo de 100 µL de *Substrate Solution* e incubação por 15 min sob agitação no escuro. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de *Stop Solution* para cada poço. A leitura foi imediatamente realizada em espectrofotômetro com leitor de microplaca utilizando 450 nm como primeiro comprimento de onda e 620 nm como comprimento de onda de referência.

6.4. Avaliação da atividade da NADPH oxidase

A atividade da NADPH oxidase foi avaliada em frações enriquecidas de membrana celular pela quantificação dos compostos fluorescentes 2-hidroxi-etídio (EOH) e etídio (E) derivados da oxidação do dihidroetídio (DHE), detectada por meio de HPLC ^{86,87}. O EOH é gerado especificamente pela oxidação do DHE pela ação do ânion superóxido ⁸⁸, enquanto a formação de etídio está associada, principalmente, a vias envolvendo peróxido de hidrogênio e sistemas oxidativos baseados em metais, como hemeoproteínas e peroxidases ^{89,90}.

As frações de membrana celular também foram utilizadas em ensaio de microplaca contendo o reagente Amplex Red® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); neste caso, a atividade da NADPH oxidase foi medida pelo acúmulo de H₂O₂.

O músculo sóleo foi cuidadosamente lavado em PBS para remoção de coágulos sanguíneos e trombos. Fragmentos de músculo (~200 mg) foram homogeneizados com auxílio de um Polytron, em gelo, com 1 mL de tampão de lise contendo Tris 50 mM (pH 7,4), DTPA 100mM, β-mercaptoetanol 0,1% e inibidores de protease. A seguir, as amostras foram submetidas a sonicação (3 ciclos de 10 s a 8 Watts) e centrifugação a 1.000 g, por 3 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e centrifugado a 18.000g, por 10 min, a 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi transferido para tubo de ultra-centrífuga e submetido a centrifugação a 100.000 g, por 45 min a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado (*pellet*) ressuspenso em 100 µL de tampão de lise, obtendo-se, assim, a fração enriquecida de membrana⁸⁷. A quantificação de proteínas totais foi realizada, então, pelo método de Bradford⁹¹.

Posteriormente, foram incubados 20 µg de fração enriquecida de membrana em 100 µL de solução tampão fosfato (50 mM, pH 7,4, com DTPA 0,1 mM) contendo DHE (50 µM) e NADPH (300 µM), por 30 min, a 37 °C, em banho-maria e protegido da luz. Após adição de 40 µL de ácido tricloroacético 10%, as amostras foram mantidas em gelo, protegidas da luz, por 10 min. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e analisado em HPLC para quantificação de produtos de fluorescência derivados do DHE, de acordo com o método previamente descrito por Laurindo e cols.^{86,87}. A quantificação dos compostos foi realizada por comparação das integrais das áreas dos picos correspondentes com as integrais obtidas com padrões autênticos submetidos às mesmas condições cromatográficas. Os resultados foram expressos pelas razões 2-hidroietídio/dihidroetídio consumido (EOH/DHE) e etídio/dihidroetídio consumido (E/DHE). O DHE consumido foi calculado como a diferença entre a concentração inicial adicionada às amostras e o DHE remanescente quantificado por HPLC.

Para o ensaio com Amplex Red®, fração de membrana (20 µg) foi incubada com NADPH (250 µM) em solução tampão fosfato (50 mM, pH 7,4, com DTPA 0,1 mM) na presença de HRP (peroxidase de rabanete, 0,2 U/µL) e reagente Amplex Red® (140 µM), a 37 °C, no escuro, em microplaca de 96 poços (volume final

de 120 µL). A absorbância foi acompanhada a 575 nm por 60 min em leitor de ELISA (Spectramax 340, Molecular Devices) ²⁶.

As análises descritas nesta seção foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Prof. Adjunto Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo, do Departamento de Cardio-Pneumologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob orientação da pesquisadora Dra. Denise de Castro Fernandes.

7. Avaliação da expressão gênica dos fatores de regulação miogênica por RT-PCR em tempo real

A análise de mRNAs das subunidades da enzima NADPH oxidase (NOX2, NOX4, p22^{phox} e p47^{phox}), dos fatores de regulação miogênica (MyoD, miogenina e MRF4), e dos genes constitutivos ciclofilina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi realizada por reação em cadeia da polimerase em tempo real após transcrição reversa (RT-PCR).

A extração de RNA total do músculo esquelético sóleo foi realizada utilizando-se TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), de acordo com método previamente descrito ^{64,73}. Resumidamente, o fragmento muscular congelado foi mecanicamente homogeneizado em gelo com TRIzol (1 mL de TRIzol/50-100 mg de tecido) e incubado por 5 min à temperatura ambiente. A seguir, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol utilizado, homogeneizado vigorosamente e incubado por 3 min à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 12.000 g por 15 min a 4 °C. A fase aquosa formada após a centrifugação foi separada, acrescida de 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e incubada por 10 min à temperatura ambiente para precipitação do RNA. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4 °C. O sedimento formado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a 7.500 g por 5 min a 4 °C. O sedimento de RNA foi submetido a secagem por 10 min à temperatura ambiente e ressuspenso em solução 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) e incubado a 60 °C, por 10 min. Para remover qualquer contaminação de DNA, as amostras foram incubadas com DNase I (#18068-015, Invitrogen Life Technologies, CA, USA).

Posteriormente, foi realizada a quantificação de RNA por espectrofotometria a 260 nm, utilizando-se o fator de correção próprio para o RNA (40). A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão entre as densidades ópticas a 260 e 280 nm foi de aproximadamente 2,0.

Um micrograma de RNA foi submetido a RT utilizando-se o *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (#4387406, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para um volume total de reação de 20 µL, de acordo com método recomendado pelo fabricante. Alíquotas de 2,5 µL (10-100 ng) do produto da RT, contendo DNA complementar (cDNA), foram submetidas à PCR em tempo real utilizando-se 10 µL 2X TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 1 µL de ensaio (20X) contendo oligonucleotídeos iniciadores (primers) senso e antisenso e sonda Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) específicos para cada gene: miogenina (Taqman assay Rn00567418_m1; Ref. seq. Genbank NM_017115.2), MyoD (Taqman assay Rn00598571_m1; Ref. seq. Genbank NM_176079.1), MRF4 (Taqman assay Rn00565920_m1; Ref. seq. Genbank NM_013172.1), NOX2 (Taqman assay Rn00576710_m1; Ref. seq. Genbank NM_023965.1), NOX4 (Taqman assay Rn00585380_m1; Ref. seq. Genbank NM_053524.1), p22^{phox} (Taqman assay Rn00577357_m1; Ref. seq. Genbank NM_024160.1) e p47^{phox} (Taqman assay Rn00586945_m1; Ref. seq. Genbank NM_053734.2). A amplificação e a análise foram realizadas utilizando o Step One Plus™ Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados de expressão gênica dos genes alvo foram normalizados pela expressão dos genes de referência ciclofilina (Taqman assay Rn00690933_m1; Ref. seq. Genbank NM_017101.1) e GAPDH (Taqman assay Rn01775763_g1 Ref. Seq. Genbank NM_058704.1). As reações foram feitas em triplicata e a expressão gênica foi calculada pelo método do C_T (*critical threshold cycle*) comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$)⁹².

8. Quantificação dos fatores de regulação miogênica, da via das MAPK e da via do NF-κB por Western blot

A expressão proteica dos fatores de regulação miogênica (MyoD, miogenina e MRF4), e as formas total e fosforilada de proteínas da via das MAPK

(JNK, ERK e p38-MAPK) e do NF-κB (IκB e subunidade p65 do NF-κB), e da Src e MSK1 foram avaliadas pela técnica de Western blot ^{64,93,94}.

Resumidamente, fragmento do músculo sóleo (80-100 mg) foi homogeneizado com 800 µL de tampão RIPA, contendo inibidores de protease e fosfatase. A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 min, a 12.000 rpm, a 4 °C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, as quais foram armazenadas a -80 °C. Uma das alíquotas foi utilizada para quantificação de proteína pelo método de Bradford ⁹¹. Para cada proteína alvo, foi realizada eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida a 4 °C (30 min a 50 V e 2 h a 120 V). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema de transferência úmido por 90 min a 120 V, a 4 °C. A seguir, a membrana foi incubada em solução de leite desnatado 5% em temperatura ambiente por 2 h (bloqueio) para prevenir ligações inespecíficas com os anticorpos primário e secundário. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST (tampão contendo Tris, NaCl e Tween 20) e incubada durante a noite, a 4 °C, com anticorpo primário específico para cada proteína. No dia subsequente, a membrana foi lavada com TBST e incubada à temperatura ambiente por 90 min com anticorpo secundário (conjugado a peroxidase) adequado para ligação com o anticorpo primário utilizado, de acordo com recomendação do fabricante. A seguir, após incubação da membrana com Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para detecção do anticorpo ligado à membrana, foi obtida a autorradiografia.

Após obtenção do filme com as bandas referentes à proteína alvo, a membrana foi incubada com Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) para remoção dos anticorpos ligados à membrana. A seguir, foi realizado novamente o processo de bloqueio e a membrana foi incubada durante a noite, a 4 °C, com anticorpo primário para a proteína constitutiva GAPDH. O procedimento prosseguiu da mesma forma como descrito anteriormente até a detecção do sinal e obtenção da autorradiografia.

Os filmes foram digitalizados e as bandas quantificadas por densitometria utilizando-se o programa Gel Pro 3.1. Os resultados obtidos para as proteínas alvo foram normalizados pelos resultados da proteína constitutiva GAPDH.

Anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology Inc., Califórnia, EUA): MyoD (sc-760), miogenina (sc-576), MRF4 (sc-301), p-JNK (sc-6254), JNK total (sc-137019), p-ERK (sc-16982), ERK total (sc-93), p-p38-MAPK (sc-17852), p38-MAPK total (sc-7972), p-I κ B- α (sc-101713), I κ B- α total (sc-1643), Ser 276 p-p65 NF- κ B (sc-101749), Ser 536 p-p65 NF- κ B (sc-33020), p65 NF- κ B total (sc-7151), p-Src (sc-101802), Src total (sc-5266), p-MSK1 (sc-130205), MSK1 total (sc-25417) e GAPDH (sc-32233).

Anticorpos secundários (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA): anti-mouse (sc-2005) e anti-rabbit (sc-2004).

9. Análise estatística

A comparação entre os grupos foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via complementada pelo teste de Bonferroni (comparações efetuadas: Sham versus IM-C, IM-NAC versus IM-C). O teste *t* de Student foi utilizado para comparação entre os grupos IM-C e IM-NAC quanto ao tamanho do infarto do miocárdio. O nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

1. Caracterização dos grupos experimentais e variáveis anatômicas

No momento da eutanásia, foram verificados sinais de insuficiência cardíaca, cuja incidência é apresentada na Tabela 1. O grupo controle (Sham, n=24) foi constituído por animais que não tiveram a artéria coronária obstruída durante o procedimento cirúrgico e, conseqüentemente, não apresentaram infarto do miocárdio. Neste grupo, nenhum rato apresentou qualquer evidência de insuficiência cardíaca.

As variáveis anatômicas dos animais estão apresentadas na Tabela 2. O peso corporal (PC) e o peso do VE foram semelhantes entre os grupos. O peso do VD, dos átrios e dos pulmões foi maior no grupo IM-C quando comparado ao Sham e semelhante entre os grupos infartados. As relações VE/PC, VD/PC, átrios/PC e pulmões/PC foram maiores no grupo IM-C em relação ao Sham e não diferiram entre os grupos IM-C e IM-NAC. A relação entre peso úmido e peso seco para pulmões e fígado não foram diferentes entre os grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os três grupos estudados para o peso do músculo sóleo esquerdo e para a relação peso do sóleo esquerdo/PC.

O tamanho do infarto, avaliado por análise histológica do ventrículo esquerdo, mostrou-se semelhante entre os grupos IM-C ($47,6 \pm 5,9\%$) e IM-NAC ($47,7 \pm 8,3\%$; $p>0,05$).

2. Avaliação ecocardiográfica

As estruturas cardíacas e a função do ventrículo esquerdo foram analisadas por meio de ecocardiograma transtorácico. Antes do tratamento com NAC, todas as variáveis ecocardiográficas analisadas foram semelhantes entre os grupos IM-C e IM-NAC (dados não mostrados). As variáveis estruturais, avaliadas ao final do período experimental, são apresentadas na Tabela 3 e os resultados da avaliação funcional do ventrículo esquerdo estão expostos na Tabela 4.

3. Análise histológica do músculo sóleo

As áreas seccionais das fibras do músculo sóleo, mensuradas em cortes histológicos corados por hematoxilina-eosina, não foram estatisticamente diferentes entre os grupos (Sham 3.408 ± 381 ; IM-C: 3.775 ± 490 ; IM-NAC: $3.784 \pm 513 \mu\text{m}^2$; $P > 0,05$).

4. Avaliação do estresse oxidativo

4.1. Análise da atividade de enzimas antioxidantes

As atividades das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (Cat) foram avaliadas no músculo sóleo (Figura 1). Constatou-se redução significativa da atividade das enzimas glutathiona peroxidase e superóxido dismutase no grupo IM-C quando comparado ao Sham, mas não se verificou diferença significativa entre os grupos IM-C e IM-NAC (GSH-Px: Sham 214 ± 24 ; IM-C 183 ± 14 ; IM-NAC 180 ± 20 nmol/mg proteína; $P = 0,005$; SOD: Sham 877 ± 80 ; IM-C 769 ± 62 ; IM-NAC 716 ± 51 nmol/g proteína; $P < 0,001$). A atividade da enzima catalase foi semelhante entre os grupos Sham e IM-C e menor no grupo IM-NAC quando comparado ao IM-C (Cat: Sham $61,1 \pm 19,8$; IM-C $49,3 \pm 20,8$; IM-NAC $27,7 \pm 9,4$ nmol/g proteína; $P = 0,003$).

4.2. Marcadores de estresse oxidativo

Os marcadores de estresse oxidativo hidroperóxido de lipídeo (HP), malondialdeído (MDA) e 3-nitrotirosina foram analisados, respectivamente, por espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência e ELISA. No músculo sóleo, não houve diferença significativa entre os grupos quanto à concentração tecidual de hidroperóxido de lipídeo (Sham 248 ± 13 ; IM-C 261 ± 29 ; IM-NAC 249 ± 25 nmol/g tecido; $P = 0,469$; Figura 2). A concentração de 3-nitrotirosina foi semelhante entre os grupos Sham e IM-C e menor no grupo IM-NAC quando

comparado ao IM-C (Sham $2,89 \pm 0,80$; IM-C $3,33 \pm 0,95$; IM-NAC $2,1 \pm 0,96$ nM/mg proteína; $P = 0,039$; Figura 2).

Quanto à concentração sérica dos marcadores de estresse oxidativo, houve aumento significativo da concentração de malondialdeído no grupo IM-C quando comparado ao Sham, mas não houve diferença significativa entre os grupos IM-C e IM-NAC (Sham $0,98 \pm 0,22$; IM-C $1,24 \pm 0,11$; IM-NAC $1,35 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/mL}$; $P < 0,001$). A concentração de 3-nitrotirosina foi semelhante entre os grupos IM-C e Sham e menor no grupo IM-NAC que no IM-C (Sham $115,2 \pm 60,0$; IM-C $170,9 \pm 51,7$; IM-NAC $88,2 \pm 56,2$ nM; $P < 0,045$; Figura 3).

4.3. Atividade da enzima NADPH oxidase

A atividade da enzima NADPH oxidase do músculo sóleo foi avaliada pela quantificação de 2-hidroxietídio e etídio por HPLC e por meio de ensaio com Amplex Red® (Figura 4). Considerando-se a relação EOH/DHE (Sham $30,9 \pm 11,2$; IM-C $35,9 \pm 8,7$; IM-NAC $22,1 \pm 6,4$ nmol/ μmol ; $P = 0,019$), a produção de superóxido foi estatisticamente similar entre os grupos Sham e IM-C e diminuída no grupo IM-NAC quando comparado ao IM-C. Quanto à razão E/DHE (Sham $17,4 \pm 5,4$; IM-C $19,5 \pm 6,1$; IM-NAC $18,8 \pm 9,8$ nmol/ μmol ; $P > 0,05$), os grupos foram estatisticamente semelhantes, mostrando que não houve interferência de outros sistemas oxidantes nesta análise. Quanto à produção de H_2O_2 em fração de membrana estimulada com NADPH em ensaio com Amplex Red®, não houve diferença estatística entre os grupos estudados (Sham 100 ± 41 ; IM-C 146 ± 59 ; IM-NAC 130 ± 61 %; $P > 0,05$).

5. Expressão gênica dos fatores de regulação miogênica e das subunidades da enzima NADPH oxidase

A expressão gênica dos fatores de regulação miogênica MyoD (Sham $1,00 \pm 0,38$; IM-C $0,78 \pm 0,33$; IM-NAC $0,77 \pm 0,26$ unidades arbitrárias; $P > 0,05$) e miogenina (Sham $1,00 \pm 0,25$; IM-C $0,91 \pm 0,15$; IM-NAC $0,98 \pm 0,17$ unidades arbitrárias; $P > 0,05$) foi semelhante entre os grupos de estudo. Para o MRF4, a expressão gênica foi semelhante entre os grupos Sham e IM-C e maior no grupo IM-

NAC em relação ao IM-C (Sham $1,00 \pm 0,25$; IM-C $1,00 \pm 0,16$; IM-NAC $1,33 \pm 0,27$ unidades arbitrárias; $P = 0,01$).

Na Tabela 5, são apresentados os valores da expressão de mRNA para as subunidades do complexo enzimático NADPH oxidase. No grupo IM-C, somente a expressão gênica de p47^{phox} foi estatisticamente menor quando comparado ao grupo Sham; a expressão das demais subunidades foi semelhante entre os grupos IM-C e Sham. No grupo infartado tratado com *N*-acetilcisteína, a expressão de NOX4 e p22^{phox} foi menor e a expressão de NOX2 e p47^{phox} foi semelhante em relação ao grupo IM-C.

6. Expressão proteica dos fatores de regulação miogênica, da via das MAPK e da via do NF- κ B

Os resultados da expressão das proteínas MAPK estão apresentados na Tabela 6. O grupo IM-C redução de p-ERK, ERK total e p38 MAPK total, acompanhado de maior expressão de p-JNK em comparação ao grupo Sham. No grupo tratado com *N*-acetilcisteína, a expressão de ERK total foi maior quando comparado ao grupo IM-C.

Os resultados sobre a expressão de proteínas da via NF- κ B estão apresentados na Tabela 7. Quando comparado ao grupo Sham, o grupo IM-C apresentou maiores valores de Ser 276 NF- κ B e p-I κ B, acompanhados de reduzida expressão de NF- κ B total. A administração de *N*-acetilcisteína acarretou diminuição das expressões de Ser 276 NF- κ B e Ser 536 NF- κ B no grupo IM-NAC quando comparado ao grupo IM-C.

A expressão proteica de Src (Sham $1,00 \pm 0,10$; IM-C $1,02 \pm 0,24$; IM-NAC $0,78 \pm 0,22$ unidades arbitrárias; $P < 0,05$) foi semelhante entre os grupos Sham e IM-C e estatisticamente reduzida no grupo IM-NAC quando comparado ao IM-C. Os valores de MSK1 (Sham $1,00 \pm 0,26$; IM-C $0,53 \pm 0,14$; IM-NAC $0,43 \pm 0,09$ unidades arbitrárias; $P < 0,05$) foram estatisticamente menores no grupo IM-C quando comparado ao grupo Sham e semelhantes entre os grupos infartados IM-C e IM-NAC. Contudo, a expressão de p-Src (Sham $1,00 \pm 0,20$; IM-C $1,25 \pm 0,42$; IM-NAC $1,37 \pm 0,67$ unidades arbitrárias; $P > 0,05$) bem como de p-MSK1 (Sham $1,00 \pm 0,37$; IM-C

1,08 ± 0,40; IM-NAC 0,97 ± 0,61 unidades arbitrárias; $P > 0,05$) mantiveram-se estatisticamente similares entre os grupos experimentais.

Quanto aos MRF, não houve diferença significativa entre os grupos para expressão proteica de MyoD (Sham 1,00 ± 0,38; IM-C 0,70 ± 0,38; IM-NAC 0,75 ± 0,33 unidades arbitrárias; $P > 0,05$), miogenina (Sham 1,00 ± 0,21; IM-C 1,55 ± 0,59; IM-NAC 2,12 ± 1,44 unidades arbitrárias; $P > 0,05$) e MRF4 (Sham 1,00 ± 0,10; IM-C 0,86 ± 0,39; IM-NAC 1,07 ± 0,46 unidades arbitrárias; $P > 0,05$).

Tabela 1. Incidência de sinais clínico e patológicos de insuficiência cardíaca nos ratos infartados

Sinais clínico e patológicos de insuficiência cardíaca	Incidência (%)	
	IM-C (n=24)	IM-NAC (n=24)
Taquipnéia/respiração laboriosa	54,2	41,7
Congestão hepática	8,3	8,3
Trombo em átrio esquerdo	8,3	20,8
Ascite	33,3	25,0
Efusão pleuropericárdica	79,2	66,7
Congestão pulmonar	75,0	58,3
Hipertrofia do ventrículo direito	75,0	66,7

IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína (120 mg/kg/dia); n: número de animais.

Tabela 2. Variáveis anatômicas

Variáveis	Sham (n=24)	IM-C (n=24)	IM-NAC (n=24)
PC (g)	502 ± 47	487 ± 71	482 ± 55
VE (g)	0,900 ± 0,090	0,936 ± 0,132	0,946 ± 0,122
VD (g)	0,269 ± 0,033	0,489 ± 0,149*	0,454 ± 0,156
Átrios (g)	0,117 ± 0,019	0,284 ± 0,099*	0,261 ± 0,100
Pulmões (g)	2,082 ± 0,268	3,128 ± 0,860*	2,854 ± 0,699
VE/PC (mg/g)	1,798 ± 0,126	1,929 ± 0,156*	1,970 ± 0,185
VD/PC (mg/g)	0,537 ± 0,055	1,003 ± 0,276*	0,941 ± 0,307
Átrios/PC (mg/g)	0,214 ± 0,034	0,579 ± 0,175*	0,543 ± 0,202
Pulmões/PC (mg/g)	4,169 ± 0,532	6,439 ± 1,614*	5,973 ± 1,531
Pulmão úmido/seco	4,873 ± 0,694	4,807 ± 0,262	4,808 ± 0,494
Fígado úmido/seco	3,176 ± 0,117	3,305 ± 0,330	3,214 ± 0,279
Sóleo esquerdo (g)	0,237 ± 0,031	0,236 ± 0,042	0,226 ± 0,033
Sóleo esquerdo/PC (mg/g)	0,476 ± 0,065	0,485 ± 0,052	0,471 ± 0,066

Resultados expressos em média ± desvio-padrão; IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína (120 mg/kg/dia); n: número de animais; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; ANOVA e teste de Bonferroni; * p<0,05 versus Sham.

Tabela 3. Análise ecocardiográfica de variáveis estruturais do coração

Variáveis	Sham (n=24)	IM-C (n=24)	IM-NAC (n=24)
DDVE (mm)	8,83 ± 0,51	11,32 ± 1,39*	10,86 ± 0,93
DDVE/PC (mm/kg)	17,05 ± 1,53	22,62 ± 2,75*	21,88 ± 2,18
DSVE (mm)	4,43 ± 0,63	9,06 ± 1,45*	8,73 ± 1,23
EDPP (mm)	1,51 ± 0,12	1,85 ± 0,30*	1,76 ± 0,35
AO (mm)	4,0 ± 0,2	3,7 ± 0,2*	3,8 ± 0,2
AE (mm)	6,1 ± 0,5	8,5 ± 1,0*	8,3 ± 1,2
AE/AO	1,52 ± 0,14	2,29 ± 0,27*	2,20 ± 0,32
AE/PC (mm/kg)	11,68 ± 1,31	17,08 ± 2,11*	16,81 ± 2,57

Resultados expressos em média ± desvio padrão; IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína (120 mg/kg/dia); n: número de animais; DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE); PC: peso corporal; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; AO: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; ANOVA e teste de Bonferroni; * p<0,05 versus Sham.

Tabela 4. Análise ecocardiográfica de variáveis funcionais do coração

Variáveis	Sham (n=24)	IM-C (n=24)	IM-NAC (n=24)
FC (bpm)	281 ± 41	285 ± 56	265 ± 34
ΔD (%)	49,9 ± 5,6	20,3 ± 4,6*	19,9 ± 5,6
ΔÁrea (%)	67,5 ± 5,5	24,9 ± 5,9*	25,0 ± 5,9
VEPP (mm/s)	36,9 ± 3,1	21,6 ± 3,9*	21,3 ± 4,7
Onda E	82,0 ± 10,4	105,0 ± 20,6*	96,5 ± 13,7
Onda A	57,9 ± 10,6	26,3 ± 16,4*	33,5 ± 19,8
E/A	1,44 ± 0,17	5,21 ± 2,44*	3,91 ± 2,13#
TDE (ms)	48,9 ± 6,0	36,5 ± 8,8*	39,9 ± 10,2
TRIV (ms)	27,0 ± 4,3	32,8 ± 7,0*	32,6 ± 7,5
TRIV/R-R	58,2 ± 9,3	70,6 ± 13,9*	68,0 ± 14,2

Resultados expressos em média ± desvio padrão; IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína (120 mg/kg/dia); n: número de animais; FC: frequência cardíaca; ΔD: encurtamento endocárdico; ΔÁrea: porcentagem de variação de área do ventrículo esquerdo (VE); VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; E/A: razão entre picos de velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; TRIV/R-R: tempo de relaxamento isovolumétrico do VE normalizado pela frequência cardíaca; ANOVA e teste de Bonferroni; * p<0,05 versus Sham, # p<0,05 versus IM-C.

Tabela 5. Expressão gênica das subunidades da enzima NADPH oxidase no músculo sóleo

mRNA	Sham (n=8)	IM-C (n=8)	IM-NAC (n=8)
NOX2	1,00 ± 0,53	0,85 ± 0,26	0,60 ± 0,26
NOX4	1,00 ± 0,30	1,09 ± 0,12	0,79 ± 0,17#
p22^{phox}	1,00 ± 0,21	1,09 ± 0,13	0,79 ± 0,19#
p47^{phox}	1,00 ± 0,13	0,83 ± 0,08*	0,81 ± 0,20

IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína (120 mg/kg/dia); n: número de animais. Dados expressos em média ± desvio padrão. ANOVA e Bonferroni. * p<0,05 vs. Sham; # p<0,05 vs. IM-C.

Tabela 6. Expressão proteica das MAPK no músculo sóleo

Proteínas	Sham (n=8)	IM-C (n=8)	IM-NAC (n=8)
p-ERK/GAPDH	1,00 ± 0,32	0,57 ± 0,11*	0,82 ± 0,35
ERK/GAPDH	1,00 ± 0,12	0,63 ± 0,19*	1,15 ± 0,47#
p-JNK/GAPDH	1,00 ± 0,31	3,12 ± 1,54*	2,15 ± 1,31
JNK/GAPDH	1,00 ± 0,32	1,38 ± 0,52	1,48 ± 0,47
p-p38 MAPK/GAPDH	1,00 ± 0,34	0,88 ± 0,25	1,13 ± 0,55
p38 MAPK total/GAPDH	1,00 ± 0,27	0,65 ± 0,18*	0,64 ± 0,11

Resultados expressos em média ± desvio padrão; IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína (120 mg/kg/dia); n: número de animais; ANOVA e teste de Bonferroni. * p<0,05 versus Sham; # p<0,05 versus IM-C.

Tabela 7. Expressão de proteínas da via NF-κB no músculo sóleo

Proteínas	Sham (n=8)	IM-C (n=8)	IM-NAC (n=8)
Ser 276 NF-κB/GAPDH	1,00 ± 0,45	1,40 ± 0,25*	0,95 ± 0,25#
Ser 536 NF-κB/ GAPDH	1,00 ± 0,16	0,85 ± 0,11	0,46 ± 0,17#
NF-κB total/GAPDH	1,00 ± 0,25	0,73 ± 0,10*	0,68 ± 0,18
p-IκB/GAPDH	1,00 ± 0,49	1,71 ± 0,89*	2,10 ± 0,54
IκB total/GAPDH	1,00 ± 0,46	1,06 ± 0,46	1,18 ± 0,85

Resultados expressos em média ± desvio padrão. IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína (120 mg/kg/dia); n: número de animais. ANOVA e teste de Bonferroni. * p<0,05 versus Sham; # p<0,05 versus IM-C.

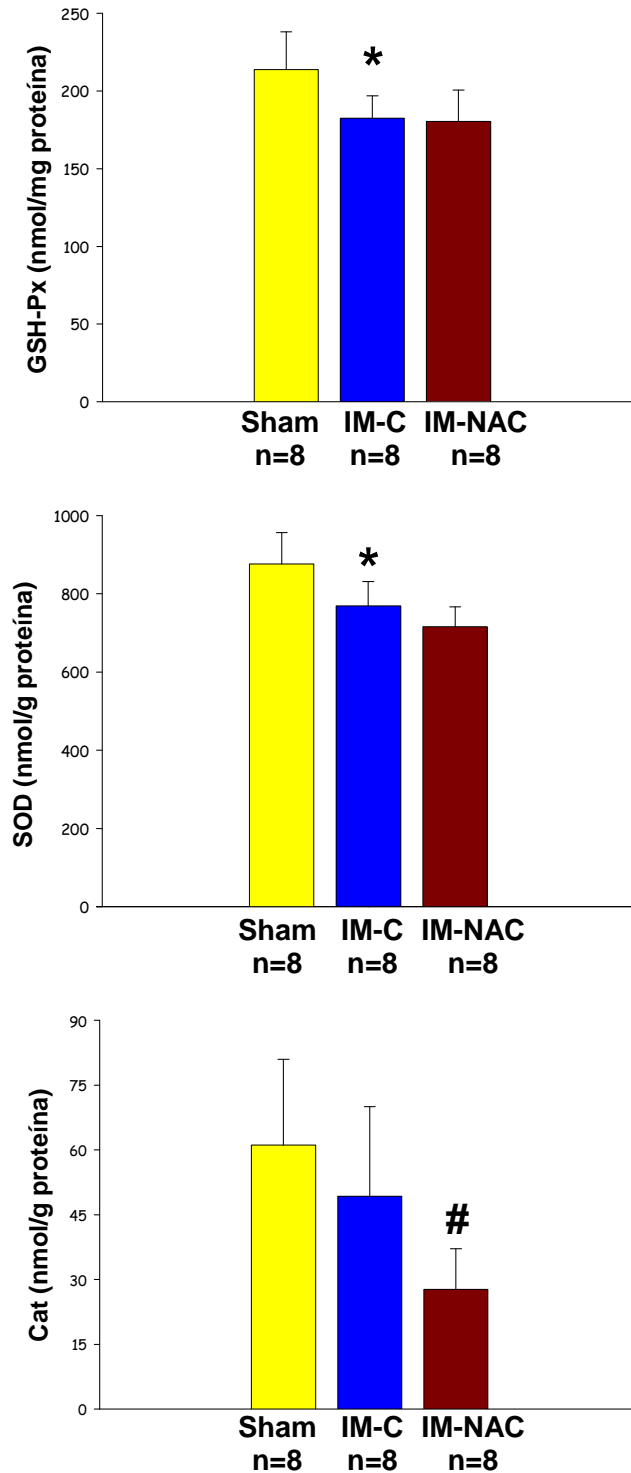


Figura 1. Atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (Cat) no músculo sóleo; IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína. Resultados expressos em média \pm desvio padrão; ANOVA e teste de Bonferroni; * $p < 0,05$ versus Sham; # $p < 0,05$ versus IM-C.

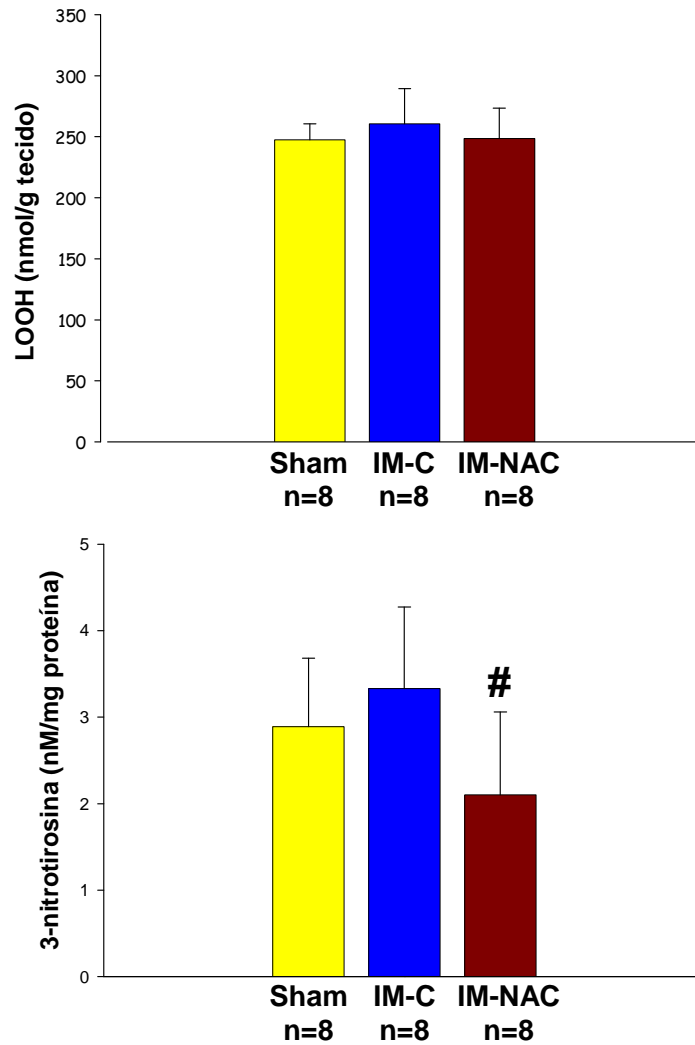


Figura 2. Concentração tecidual de hidroperóxido de lipídeo (LOOH) e 3-nitrotirosina no músculo sóleo. IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína. Resultados expressos em média \pm desvio padrão; ANOVA e teste de Bonferroni; # $p < 0,05$ versus IM-C.

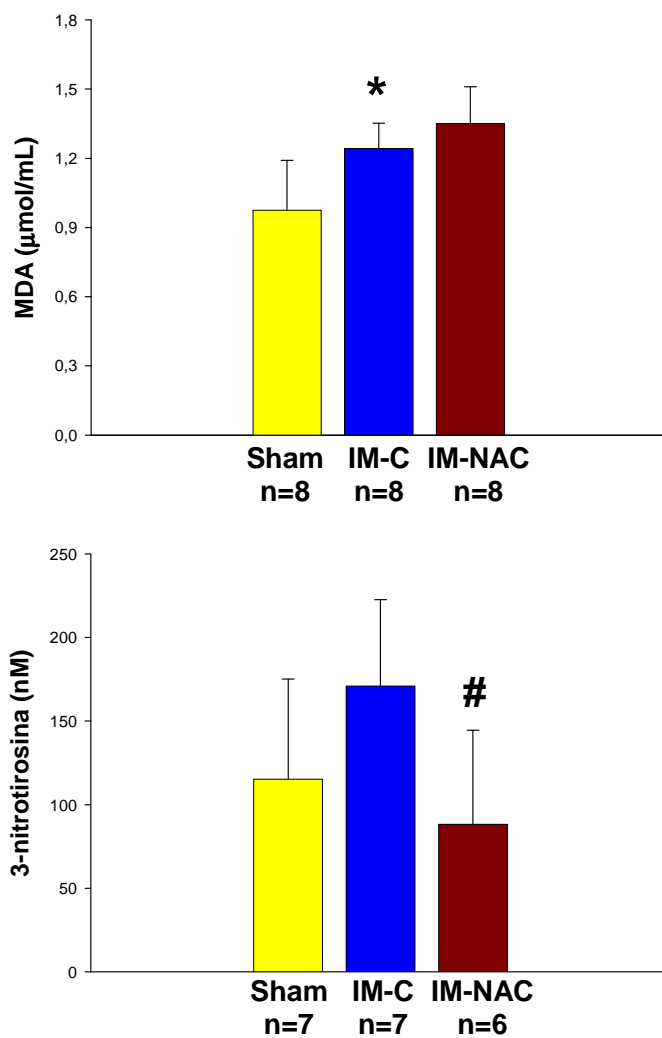


Figura 3. Concentração sérica de malondialdeído (MDA) e 3-nitrotirosina; IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína. Resultados expressos em média \pm desvio padrão; ANOVA e teste de Bonferroni; * $p < 0,05$ versus Sham; # $p < 0,05$ versus IM-C.

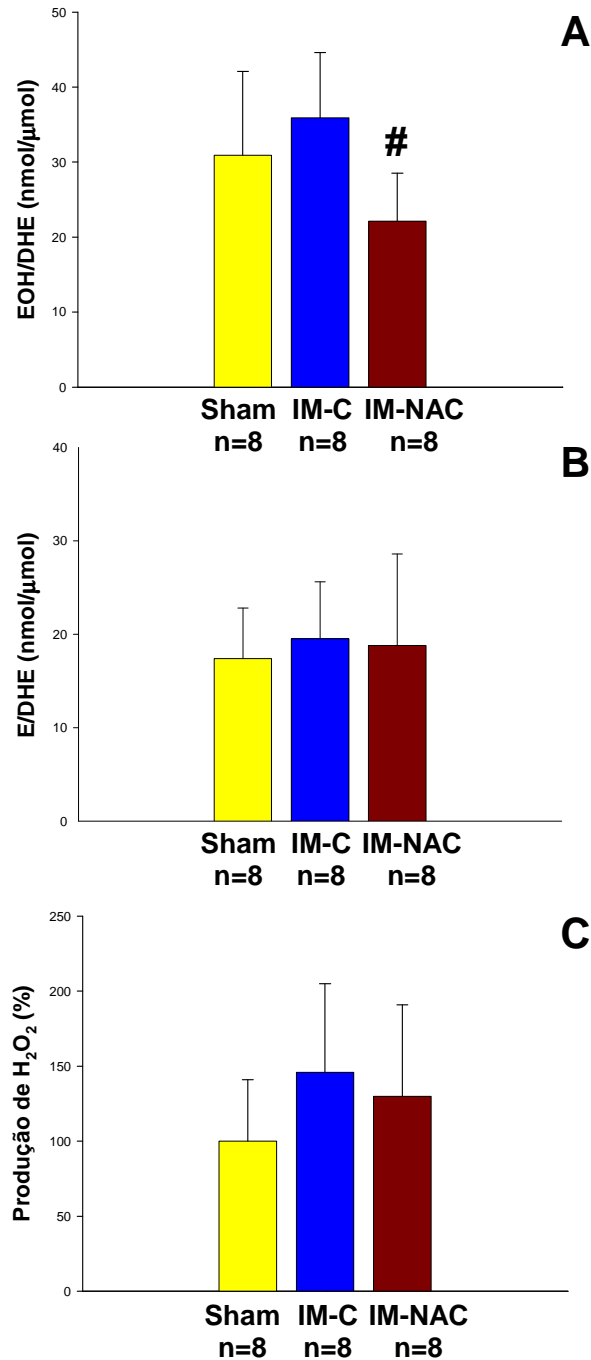


Figura 4. Atividade da enzima NADPH oxidase do músculo sóleo. *A e B:* Quantificação dos compostos fluorescentes derivados da oxidação do dihidroetídio (DHE) por HPLC: razões 2-hidroxi-etídio/dihidroetídio consumido (EOH/DHE) e etídio/dihidroetídio consumido (E/DHE). *C:* Produção de H₂O₂ em fração de membrana estimulada com NADPH em ensaio com Amplex Red, IM-C: animais com infarto do miocárdio sem tratamento; IM-NAC: animais com infarto do miocárdio tratados com *N*-acetilcisteína. Resultados expressos em média ± desvio padrão; ANOVA e teste de Bonferroni; # *p*<0,05 versus IM-C.

DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos, pela primeira vez, a participação das vias das MAPK e do NF- κ B na resposta do tecido muscular esquelético ao estresse oxidativo em ratos com insuficiência cardíaca crônica. Adicionalmente, analisamos a influência da *N*-acetilcisteína sobre as vias sinalizadoras e os marcadores de estresse oxidativo.

A insuficiência cardíaca foi induzida por infarto do miocárdio decorrente de ligadura da artéria coronária esquerda. O modelo experimental de infarto é muito utilizado porque é prático e mimetiza causas frequentes de insuficiência cardíaca em humanos, a isquemia e o infarto, e apresenta boa reprodutibilidade dos resultados quando comparados aos estudos clínicos subsequentes^{71,95}. Além disso, cursa com o desenvolvimento de insuficiência cardíaca esquerda de lenta evolução, semelhantemente ao que se observa em humanos.

O diagnóstico da insuficiência foi baseado na observação de sinais clínicos e/ou anátomo-patológicos avaliados *in vivo*, como taquipnéia/dispnéia, ou *post mortem*, como ascite, derrame pleuropericárdico, congestão hepática, trombo em átrio esquerdo, hipertrofia do ventrículo direito e congestão pulmonar^{69,96-99}. O tamanho do infarto do miocárdio é fator determinante para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca pós-infarto, tanto em humanos como em animais de experimentação. No modelo experimental, apenas ratos com infarto de tamanho moderado a grande desenvolvem insuficiência cardíaca. Animais com infarto pequeno habitualmente apresentam disfunção ventricular, porém sem sinais de insuficiência cardíaca. Assim, ratos com infartos pequenos, à avaliação ecocardiográfica inicial, foram excluídos do presente estudo. Posteriormente, animais com infarto menor que 30%, mensurado por análise histológica do ventrículo esquerdo, também foram excluídos do estudo. Os grupos IM-C e IM-NAC apresentaram tamanho do infarto do miocárdio semelhante. Esse fato foi importante para assegurar que os ratos infartados, com e sem tratamento com NAC, tivessem o mesmo grau de injúria cardíaca. Confirmando a presença de insuficiência cardíaca, os pesos do ventrículo direito, átrios e pulmões normalizados pelo peso corporal foram estatisticamente maiores no grupo IM-C que no Sham. Os valores destas variáveis foram semelhantes entre os grupos IM-C.

A análise ecocardiográfica permite analisar variáveis estruturais cardíacas e funcionais do ventrículo esquerdo e determinar o grau de injúria causado

pelo infarto do miocárdio e pelo decorrente processo de remodelação. Com a realização do ecocardiograma quatro meses após o infarto, foi possível obter dois grupos de animais infartados, IM-C e IM-NAC, que foram constituídos por animais com tamanho de infarto e grau de comprometimento cardíaco semelhantes antes do tratamento com N-acetilcisteína (dados não apresentados).

Ao final do período experimental, seis meses após a indução do infarto e com dois meses de tratamento, foi realizada novamente avaliação ecocardiográfica. Observamos que os ratos do grupo IM-C apresentaram dilatação das câmaras cardíacas esquerdas acompanhada de disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, quando comparados aos do grupo Sham. Por exemplo, o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, em valores absolutos ou normalizados pelo peso corporal, e o diâmetro do átrio esquerdo, em valores absolutos ou normalizados pelo diâmetro da aorta ou pelo peso corporal, foram maiores no grupo IM-C que no grupo Sham. Da mesma forma, os índices de função sistólica porcentagem de encurtamento endocárdico, velocidade de encurtamento da parede posterior e porcentagem de variação de fração de área do ventrículo esquerdo foram reduzidos no grupo IM-C em relação do Sham. Quanto à avaliação da função diastólica, o grupo IM-C apresentou aumento dos valores da onda E mitral e da razão E/A e redução dos valores da onda A em comparação com o grupo Sham, caracterizando a presença de disfunção diastólica severa ⁶⁹.

A N-acetilcisteína, molécula com propriedades antioxidantes, reage tanto direta quanto indiretamente com vários tipos de espécies reativas de oxigênio ¹⁰⁰. Como ação antioxidante direta, a NAC pode inativar eletrófilos por meio de reações de redução ou conjugação. Indiretamente, por conter um grupo sulfidril, serve como importante fonte de cisteína para a síntese de glutathiona, molécula endógena que desempenha importante papel na defesa celular contra o estresse oxidativo ¹⁰¹.

Em nosso estudo, o tratamento com N-acetilcisteína, iniciado tardiamente após o infarto do miocárdio, não atenuou as alterações estruturais cardíacas ou a disfunção sistólica ventricular, porém promoveu melhora discreta da função diastólica, verificada pela menor relação E/A no grupo IM-NAC em relação ao grupo IM-C. Recentemente, alguns autores avaliaram o efeito do tratamento com NAC nas alterações cardíacas de ratos com infarto do miocárdio ^{67,72}. Lee et al. ⁷²

mostraram que o tratamento com 250 mg/kg/dia de NAC iniciado 24 horas após a indução do infarto em ratos, por quatro semanas, melhora a fração de encurtamento endocárdico e atenua o aumento dos diâmetros sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo. No estudo de Lee et al. ⁷², como em nosso trabalho, ratos com infarto menor que 30% do ventrículo esquerdo, avaliado por histologia, foram excluídos das análises. Adamy et al. ⁶⁷ trataram ratos com infarto do miocárdio com NAC durante um mês e, apesar de administração de dose menor (120 mg/kg/dia), e início mais tardio do tratamento (dois meses após a indução do infarto), também verificaram melhora da fração de encurtamento endocárdico e do débito cardíaco. No presente estudo, utilizamos dose de 120 mg/kg/dia de NAC, porém com período de tratamento mais longo, de dois meses, e não observamos melhora da função sistólica à avaliação ecocardiográfica. Como o início do tratamento foi mais tardio que nos demais estudos (quatro meses após infarto), é possível que os ratos já apresentassem grau avançado de dilatação das câmaras cardíacas esquerdas e disfunção ventricular, dificultando a reversão ou atenuação do processo. O fato do tratamento com NAC não ter atenuado as alterações cardíacas mostra que seus efeitos na musculatura esquelética são independentes de melhora da função cardíaca e da perfusão tecidual e diretamente relacionados às suas propriedades antioxidantes. Este dado revelou-se importante considerando que o principal foco do estudo é verificar a participação do estresse na modulação das alterações musculares associadas à insuficiência cardíaca.

A avaliação da musculatura esquelética foi realizada no músculo sóleo porque estudos prévios de nosso grupo mostraram que este músculo é sensível às alterações induzidas pela insuficiência cardíaca aguda ^{73,102} ou crônica ^{16,64,70}.

No presente trabalho, verificamos que ocorre diminuição da atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e superóxido dismutase no músculo sóleo de ratos com infarto do miocárdio. Redução da atividade das enzimas antioxidantes na musculatura esquelética após infarto do miocárdio e durante insuficiência cardíaca já havia sido demonstrada em estudo clínico ¹⁹. Os efeitos adversos das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são controlados por complexo sistema antioxidante endógeno, composto pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase. A superóxido dismutase catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em H₂O₂ e O₂ em presença de íon H⁺. A

catalase, por sua vez, catalisa a formação de água e oxigênio a partir de H_2O_2 formado pela reação da superóxido dismutase. Já a atividade da glutathione peroxidase é dependente da concentração de glutathione. A glutathione é um tripeptídeo contendo um grupo sulfidril presente na cisteína, que confere a esta molécula grande capacidade redutora ¹⁰³. Ela pode se apresentar na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). A concentração da forma reduzida da glutathione é mantida estável por ação da enzima glutathione reductase, que catalisa a redução da glutathione oxidada ¹⁰⁴. A atividade antioxidante da glutathione pode ser associada a sua capacidade de reagir com H_2O_2 e peróxidos orgânicos pela oxidação da GSH a GSSG, por meio da ação da glutathione peroxidase ¹⁰⁴.

O tratamento com NAC não restaurou a atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase e ainda reduziu a atividade da enzima catalase no músculo sóleo dos animais infartados. Recentemente, tem sido observado que a administração oral de *N*-acetilcisteína pode restabelecer os níveis de glutathione total no coração de ratos infartados e reduzir significativamente a concentração de peróxido de hidrogênio e marcadores de estresse oxidativo, como hidroperóxido de lipídeo ^{67,68}. Entretanto, não encontramos estudos avaliando a influência da administração de *N*-acetilcisteína na musculatura esquelética de ratos com infarto do miocárdio. Em nosso modelo, apesar do tratamento não ter resultado em melhora do sistema enzimático antioxidante na musculatura esquelética, a NAC pode ter contribuído para a redução da concentração de H_2O_2 ¹⁰⁰, substrato da enzima catalase, que teve, assim, sua atividade diminuída no grupo IM-NAC.

Além do sistema enzimático antioxidante, avaliamos também o complexo NADPH oxidase, reconhecidamente uma importante fonte geradora de espécies reativas de oxigênio. Primeiramente, analisamos, no músculo sóleo, a expressão gênica de subunidades do complexo NADPH oxidase: as subunidades transmembranais NOX2, NOX4 e p22^{phox}, além da subunidade citosólica p47^{phox}. A expressão das subunidades NOX2, NOX4 e a p22^{phox} não se alterou nos animais do grupo IM-C, porém a expressão da p47^{phox} foi menor neste grupo em relação ao Sham. Além da expressão gênica, avaliamos também a atividade da NADPH oxidase no músculo sóleo como possível fonte de geração de espécies reativas de oxigênio. A produção de superóxido pela NADPH oxidase, avaliada pela quantificação de 2-hidroxi-etídio, e a

produção de H_2O_2 , em fração de membrana estimulada com NADPH em ensaio com Amplex Red®, não se mostraram alteradas no músculo sóleo dos ratos infartados. A subunidade catalítica NOX2 forma um complexo com a $p22^{phox}$, cuja ativação depende da ligação com as subunidades regulatórias citosólicas $p47^{phox}$ e $p67^{phox}$. Embora tenhamos verificado redução da expressão gênica de $p47^{phox}$ no grupo IM-C, é possível que os níveis proteicos de $p47^{phox}$ (não avaliados neste estudo) ainda estivessem preservados e, por isso, a redução da expressão gênica não se refletiu em alterações na atividade da NADPH oxidase. Por outro lado, a NOX4, apesar de também formar um complexo com a $p22^{phox}$, é constitutivamente ativa e independente de proteínas citosólicas regulatórias ou ativadoras. No presente estudo, não verificamos alteração de mRNA para a subunidade catalítica NOX4 e para a $p22^{phox}$ na musculatura esquelética dos ratos infartados, o que mostrou-se coerente com a atividade preservada da NADPH oxidase.

As informações sobre o papel da NADPH oxidase na miopatia associada à insuficiência cardíaca são escassas. Identificamos apenas um estudo, conduzido por Ohta e cols.²⁷, que, diferentemente do presente trabalho, observaram aumento da atividade da NADPH oxidase na musculatura esquelética de camundongos infartados. Entretanto, os autores²⁷ utilizaram ensaio quimiluminescente com lucigenina para avaliar a atividade da NADPH oxidase. O ânion radical superóxido, produto da atividade da NADPH oxidase, pode ser reduzido ou oxidado. Por isso, existem técnicas indiretas (colorimétricas, quimiluminescentes ou fluorescentes) para a dosagem do superóxido que exploram uma ou outra via. Em geral, as moléculas que são reduzidas pelo superóxido, como a lucigenina, são passíveis de *redox cycling*, isto é, a molécula reduzida é capaz de reagir com o oxigênio dissolvido no meio reacional e gerar superóxido artefactual¹⁰⁵. Por outro lado, existem moléculas suscetíveis à oxidação pelo ânion radical superóxido, como o dihidroxietídio (DHE), que tem se destacado como marcador da produção de superóxido. A oxidação do DHE gera dois compostos fluorescentes, o 2-hidroxietídio (EOH) e o etídio (E). A formação do EOH foi associada à oxidação específica da DHE pelo superóxido, enquanto que a produção de etídio estaria relacionada à oxidação da DHE por outras espécies reativas^{88,90}. Os compostos, EOH e E, podem ser separados e quantificados por HPLC permitindo, assim, maior precisão na quantificação indireta da geração de superóxido por um

determinado sistema oxidante. Em nosso estudo, avaliamos a atividade da NADPH oxidase em fração de membrana estimulada com NADPH em presença de DHE, e os compostos fluorescentes gerados nesta reação foram avaliados por HPLC. A diferença entre os resultados de nosso estudo e aqueles obtidos por Ohta e cols.²⁷ quanto à atividade da NADPH oxidase pode ser decorrente tanto da diferença inerente ao modelo animal utilizado quanto da divergência metodológica para a análise da NADPH oxidase.

Em nosso estudo, a preservação da atividade da NADPH oxidase associada à redução da atividade das enzimas antioxidantes sugere que há aumento do estresse oxidativo no músculo sóleo dos ratos infartados.

A administração de *N*-acetilcisteína promoveu redução na expressão de NOX4 e p22^{phox} e não atenuou a redução da p47^{phox} no músculo sóleo dos ratos infartados. Além disso, a atividade da NADPH oxidase foi menor no grupo IM-NAC em relação ao grupo IM-C, constatada pela menor produção de superóxido, porém sem alteração da produção de H₂O₂. A atividade do complexo enzimático NADPH oxidase gera como produto primário o ânion radical superóxido e como produto secundário H₂O₂, derivado da dismutação do superóxido pela enzima SOD. Entretanto, estudos recentes mostram que a NOX4, uma das isoformas expressas no músculo esquelético, produz H₂O₂. Assim, apesar da expressão gênica da subunidade catalítica NOX2 não ter se alterado, a reduzida expressão das subunidades auxiliares p22^{phox} e p47^{phox} alterou a atividade da NADPH com conseqüente redução da produção de superóxido. Por outro lado, esperava-se que também houvesse diminuição significativa da produção de H₂O₂, uma vez que, com a menor geração do superóxido, produto primário da NOX2, também ocorresse menor geração do produto secundário H₂O₂. Podemos sugerir que, embora ocorra menor formação de superóxido, a dismutação deste radical em H₂O₂ pela enzima antioxidante SOD também está ocorrendo em taxas menores e, por isso, não se observa alteração na produção de H₂O₂. Da mesma forma, a menor expressão de NOX4 e p22^{phox} também poderia resultar em atividade diminuída da NOX4 e menor produção do seu produto primário H₂O₂. Porém isto não se confirmou, provavelmente, pelo fato de não haver alteração da expressão gênica destas subunidades, o que poderia preservar a atividade da NOX4.

Neste trabalho, verificamos que há aumento dos níveis circulantes de MDA, marcador de lipoperoxidação, nos ratos com infarto do miocárdio. Adicionalmente, observamos que o tratamento com NAC reduziu a quantidade de 3-nitrotirosina no soro e no músculo esquelético dos animais infartados. Entretanto, o tratamento com NAC não teve efeito sobre a concentração sérica de MDA. A peroxidação lipídica é causada pela agressão de uma espécie reativa (geralmente radical hidroxil), que abstrai um átomo de hidrogênio do ácido graxo insaturado e deixa um elétron desemparelhado no carbono, caracterizando a etapa de iniciação do processo de lipoperoxidação. A seguir, ocorre a fase de propagação, na qual ocorre a formação do radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$) que é capaz de retirar um átomo de H^+ do ácido graxo adjacente gerando o hidroperóxido de lipídeo (LOOH). O radical peroxil pode também formar peróxidos cíclicos, que são clivados em aldeídos, como o malondialdeído, um produto secundário da lipoperoxidação ^{104,106}.

A 3-nitrotirosina representa modificação pós-traducional de proteínas e peptídeos com importante papel na sinalização celular, no *turnover* proteico e na proliferação celular, entre outros. Recentemente, tem sido mostrado que a 3-nitrotirosina correlaciona-se com estados patológicos, como inflamação e doenças cardiovasculares ^{107,108}. A transformação de resíduos de tirosina de uma proteína em 3-nitrotirosina tem sido detectada em sistemas biológicos submetidos a estresse oxidativo ¹⁰⁹. A principal via de formação de 3-nitrotirosina decorre da reação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) com o óxido nítrico para formar o radical peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), o qual, por sua vez, reage com resíduos de tirosina formando 3-nitrotirosina ¹⁰⁹. O peroxinitrito, formado pela reação do radical superóxido com óxido nítrico, é instável e apresenta tempo de vida curto, mas é oxidante potente, com propriedades semelhantes às do radical hidroxila. Causa danos a muitas moléculas biológicas, inclusive a grupos sulfidril das proteínas e provoca hidroxilação e nitração de compostos aromáticos. Portanto, a habilidade de quantificar especificamente a presença deste aminoácido nitrado em proteínas pode permitir a quantificação de estresse nitrosativo em tecidos biológicos assim como determinar a importância das proteínas nitradas como marcadores prognósticos de doenças ¹⁰⁹. A detecção de proteínas contendo 3-nitrotirosina tem sido relatada em vários tipos de doença em humanos e em modelo animais ou cultura de células.

Teoricamente, todos os resíduos de tirosina podem ser alvos de nitração; entretanto, a eficiência da nitração de tirosina depende de várias condições biológicas, como a produção local e a concentração de espécies reativas, a existência e disponibilidade de antioxidantes e removedores de radicais livres, o acúmulo de células inflamatórias e a presença de citocinas pró-inflamatórias.

O tratamento com NAC não teve efeito sobre o marcador de lipoperoxidação MDA, mas reduziu os níveis circulantes e musculares de 3-nitrotirosina, marcador de estresse nitrosativo. Como já discutido anteriormente, a NAC diminuiu a produção de superóxido pela NADPH oxidase no músculo sóleo, o que pode ter contribuído para a menor formação de peroxinitrito e, conseqüentemente, reduzida concentração de 3-nitrotirosina. Além disso, é possível que a NAC desempenhe papel específico na produção de óxido nítrico mediada pela óxido nítrico sintase (NOS) a partir de L-arginina, como já descrito em outros tecidos ^{110,111}. Por outro lado, como a NAC não reduziu a concentração sérica de MDA, é provável que a geração de espécies reativas de oxigênio ainda estivesse elevada em nível sistêmico. Adicionalmente, este efeito dual da NAC pode estar relacionado à forma distinta como a GSH atua na defesa de proteínas e lipídeos contra o ataque de EROs. Diversas proteínas possuem grupos sulfidríla cuja oxidação pode levar à perda de função da proteína. A GSH é capaz de proteger e até mesmo regenerar estes grupos sulfidríla contra o ataque de EROS e, assim, reverter algumas reações de oxidação que levam à inativação de proteínas. Quanto ao processo de peroxidação de lipídeos, a ação direta da GSH é pouco eficiente, uma vez que a GSH está presente em compartimentos aquosos da célula, o que a torna menos acessível ao compartimento lipossolúvel da membrana. Assim, a GSH depende da ação da enzima glutationa peroxidase para remover produtos de lipoperoxidação ¹¹². Em nosso trabalho, a atividade da glutationa peroxidase não foi restaurada com o tratamento com NAC e pode ter contribuído para a manutenção da concentração sérica elevada de MDA.

O aumento do estresse oxidativo culmina com a ativação de várias vias sinalizadoras intracelulares, entre elas as vias das MAPK e do NF-κB. Neste estudo mostramos, pela primeira vez, que ratos com infarto do miocárdio apresentam aumento da fosforilação da JNK1/2 e redução da expressão de p38 MAPK total e ERK1/2 fosforilada e total no músculo sóleo. Além disso, verificamos redução da

expressão de MSK1 total e preservação da expressão de Src. Quanto à via do NF-κB, observamos redução da expressão da subunidade p65 do NF-κB total associada a aumento da fosforilação em Ser276, sem alteração da fosforilação em Ser536, e aumento da fosforilação do IκB.

Nos ratos infartados, o tratamento com NAC restaurou a expressão de ERK1/2 total e fosforilada e não alterou a fosforilação da JNK nem a expressão de p38 MAPK total e MSK1 total. Entretanto, a expressão de Src total foi reduzida no grupo IM-NAC. Além disso, a expressão da subunidade p65 do NF-κB total não se alterou com o tratamento, mas houve redução da fosforilação tanto em Ser276 quanto em Ser536 desta proteína. Já a fosforilação do IκB foi semelhante entre os grupos IM-C e IM-NAC.

Há relatos que, após aumento do estresse oxidativo, a ativação das MAPKs, em especial JNKs e ERKs, é decorrente de estimulação por quinases da família Src^{31,32}. Além disso, ativação da proteína quinase Src culmina em ativação da JNK e fosforilação do resíduo Ser276 da subunidade p65 do NF-κB, de forma dependente da ativação da via ERK/MSK1, e em fosforilação do resíduo Ser536, de forma independente da ativação da ERK¹¹³. No presente trabalho, verificamos que a fosforilação do resíduo Ser536 da subunidade p65 do NF-κB apresenta comportamento semelhante ao da expressão de Src, mostrando-se preservada no grupo IM-C e reduzida no grupo tratado com NAC. Por outro lado, o comportamento da JNK e da fosforilação do resíduo Ser276 da subunidade p65 do NF-κB assemelha-se mais ao padrão de resposta frente à ativação crônica por TNF-α. Jamaluddin e cols.¹¹⁴ mostraram, em cultura de monócitos humanos, que o TNF-α promove ativação das três MAPK e de MSK1 de forma aguda. Porém, cronicamente, apenas a ativação de JNK é mantida com a estimulação por TNF-α. Além disso, estes autores mostraram que a ativação da JNK é necessária para a produção de EROs induzida pelo TNF-α e que as EROs funcionam como segundo mensageiro para a interação entre JNK e NF-κB. Sob estimulação com TNF-α, a intervenção com antioxidante não atenuou a ativação de JNK, mas reduziu a fosforilação do NF-κB no resíduo Ser276¹¹⁴. A redução da fosforilação em Ser276 é mediada por proteína quinase A dependente de AMP cíclico (PKAc) e não relacionada com MSK1¹¹⁴.

A sinalização da ERK 1/2 tem sido associada também a efeitos hipertróficos promovidos por IGF-1. Considerando-se que há redução do eixo IGF-1/GH na insuficiência cardíaca ^{1,115}, é provável que ocorra inibição da sinalização da ERK. Por outro lado, a inibição concomitante da ERK e da p38 MAPK associada à ativação da JNK nos animais infartados pode ser resultante da ação de MAPK fosfatases específicas, como a DUSP2/PAC1, por mecanismos ainda pouco conhecidos. Estudos mostram que a DUSP2/PAC1 inibe ERK e p38 MAPK, sem influência sobre a ativação da JNK ¹¹⁶. Além disso, em células musculares, a inibição da ERK, modulada por outra MAPK fosfatase, a MPK-1, foi associada a redução no tamanho de miotubos e aumento na degradação protéica, tanto por ativação da via ubiquitina-proteossoma quanto por ativação do NF-κB ¹¹⁷. Em nosso estudo, o tratamento com NAC restaurou apenas a expressão de ERK total, provavelmente em decorrência de atenuação da degradação protéica mediada por inibição do NF-κB.

A p38 MAPK participa da miogênese modulando tanto a transcrição quanto a ativação de fatores transcricionais músculo-específicos ^{39,40}. Em nosso modelo, apesar da redução na expressão de p38 MAPK no músculo esquelético dos animais infartados, não verificamos alteração na expressão gênica e protéica dos fatores de regulação miogênica. Nos animais infartados tratados com NAC, ocorreu apenas aumento da expressão gênica do MRF4, porém não acompanhada de alteração em sua expressão proteica. A expressão proteica preservada dos fatores de regulação miogênica, apesar da alteração na p38 MAPK, é coerente com a manutenção da massa muscular e da área seccional transversa das fibras que verificamos no músculo sóleo.

Em trabalho recente de nosso laboratório, utilizando o mesmo modelo experimental de insuficiência cardíaca, detectamos atrofia de fibras no músculo sóleo acompanhada de alteração na expressão gênica e proteica dos MRFs ⁶⁴. Esta diferença pode ser explicada pela gravidade da doença nos ratos utilizados nos dois estudos. No trabalho anterior, identificamos sinais de insuficiência cardíaca em todos os animais infartados avaliados, que apresentaram peso corporal menor que o grupo Sham, resposta indicativa de presença de caquexia. No presente trabalho, apesar do comprometimento cardíaco bastante importante, os sinais de insuficiência cardíaca

não foram detectados em todos os animais dos grupos IM-C ou IM-NAC e também não houve diferença quanto ao peso corporal dos animais.

Por fim, em nosso estudo, a ativação do NF- κ B no músculo sóleo dos animais infartados parece ser apenas parcialmente dependente do estresse oxidativo. Verificamos que a fosforilação aumentada do I κ B nos animais infartados não foi alterada pelo tratamento com NAC, indicando que a translocação do NF- κ B para o núcleo também está aumentada. Esta resposta não parece ser dependente diretamente do estresse oxidativo e pode estar relacionada ao aumento de TNF- α circulante, alteração comumente encontrada na insuficiência cardíaca. No entanto, a fosforilação do NF- κ B em diferentes resíduos de serina parece ser dependente, pelo menos em parte, do estresse oxidativo. Como discutido anteriormente, a ativação da proteína quinase Src pelo estresse oxidativo culmina em fosforilação do resíduo Ser276 da subunidade p65 do NF- κ B, de forma dependente da ativação da via ERK/MSK1, e em fosforilação do resíduo Ser536, de forma independente da ativação de ERK ¹¹³. A fosforilação em Ser536 e a expressão de Src, apesar de não estarem alteradas nos animais do grupo IM-C, diminuíram com a administração de NAC, mostrando que são responsivas ao estresse oxidativo. Já a fosforilação em Ser276 foi aumentada no grupo IM-C e diminuída no grupo IM-NAC, comportamento não compatível com a resposta da proteína quinase Src e da via ERK/MSK1. Entretanto, o padrão de fosforilação do NF- κ B no resíduo Ser276 assemelha-se ao mecanismo estudado por Jamaluddin e cols. ¹¹⁴, no qual, sob estimulação com TNF- α , a intervenção com antioxidante reduziu a fosforilação do NF- κ B no resíduo Ser276 de forma dependente da PKAc.

Em resumo, os principais resultados deste estudo referentes às vias de sinalização intracelular do músculo sóleo estão ilustrados na figura 5.

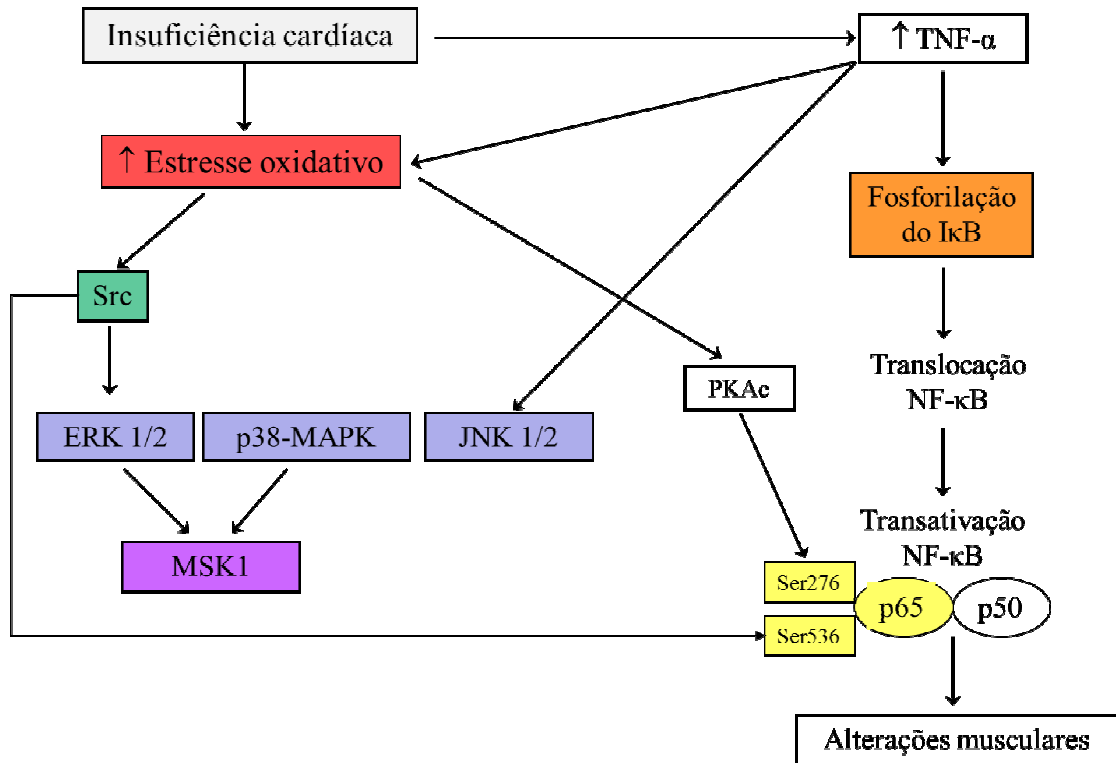


Figura 5. Representação esquemática dos achados referentes às vias de sinalização intracelular do músculo sóleo. As variáveis analisadas neste estudo estão em destaque nas formas com preenchimento colorido.

CONCLUSÃO

Aumento do estresse oxidativo está associado com ativação das vias MAPK e do NF- κ B no músculo sóleo de ratos com insuficiência cardíaca. A administração de *N*-acetilcisteína resulta em atenuação do estresse oxidativo sistêmico e no músculo sóleo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Strassburg S, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in cardiac cachexia. *Intern J Biochem Cell Biol.* 2005;37:1938-1947.
2. Wilson JR, Mancini D, Dunkman B. Exertional fatigue due to intrinsic skeletal muscle dysfunction in patients with heart failure. *Circulation.* 1993;87:470-475.
3. Wilson JR, Rayos G, Yeoh TK, Gothard P, Bak K. Dissociation between exertional symptoms and circulatory function in patients with heart failure. *Circulation.* 1995;92:47-53.
4. Harrington D, Anker SD, Coats AJS. Preservation of exercise capacity and lack of peripheral changes in asymptomatic patients with severely impaired left ventricular function. *Eur Heart J.* 2001;22:392-399.
5. Harrington D, Anker SD, Chua TP, Webb-Peploe KM, Ponikowski PP, Poole-Wilson PA, Coats AJS. Skeletal muscle function and its relation to exercise tolerance in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:1758-1764.
6. Mancini DM, Walter G, Reichel N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL, Wilson JR. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation.* 1992;85:1364-1373.
7. Anker SD, Chua TP, Ponikowski P, Harrington D, Swan JW, Kox WJ, Poole-Wilson PA, Coats AJS. Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia. *Circulation.* 1997;96:526-534.
8. Schieffer B, Wollert KC, Berchtold M, Saal K, Schieffer E, Hornig B, Riede UN, Drexler H. Development and prevention of skeletal muscle structural alterations after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol.* 1995;269:1507-1513.
9. De Sousa E, Veksler V, Bigard X, Mateo P, Ventura-Clapier R. Heart failure affects mitochondrial but not myofibrillar intrinsic properties of skeletal muscle. *Circulation.* 2000;102:1847-1853.
10. Arnolda L, Brosnan J, Rajagopalan B, Radda GK. Skeletal muscle metabolism in heart failure in rats. *Am J Physiol Heart Cell Physiol.* 1991;261:H434-H442.

11. Zoll J, Monassier L, Garnier A, N'Guessan B, Mettauer B, Veksler V, Piquard F, Ventura-Clapier R, Geny B. ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *J Appl Physiol*. 2006;101:385-391.
12. Pfeifer C, Musch TI, Mcallister RM. Skeletal muscle oxidative capacity and exercise tolerance in rats with heart failure. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33:542-548.
13. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation*. 1990;81:518-527.
14. Drexler H, Riede U, Münzel T, König H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation*. 1992;85:1751-1759.
15. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Altered skeletal muscle metabolic response to exercise in chronic heart failure. Relation to skeletal muscle aerobic enzyme activity. *Circulation*. 1991;84:1597-1607.
16. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Assis JMF, Padovani CR, Okoshi MP, Dal Pai-Silva M. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. *Int J Exp Path*. 2003;84:201-206.
17. Mann DL. Management of heart failure patients with reduced ejection fraction. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, eds. *Braunwald's Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine*. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008:611-640.
18. Coirault C, Guellich A, Barbry T, Samuel JL, Riou B, Lecarpentier Y. Oxidative stress of myosin contributes to skeletal muscle dysfunction in rats with chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1009-H1017.
19. Linke A, Adams V, Schulze PC, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, Mobius-Winkler S, Schubert A, Schuler G, Hambrecht R. Antioxidative effects of exercise training in

- patients with chronic heart failure: increase in radical scavenger enzyme activity in skeletal muscle. *Circulation*. 2005;111:1763-1770.
20. Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, Suematsu N, Shiomi T, Wen J, Nakamura K, Ichikawa K, Utsumi H, Takeshita A. Enhanced generation of reactive oxygen species in the limb skeletal muscles from a murine infarct model of heart failure. *Circulation*. 2001;104:134-136.
 21. Javesghani D, Magder SA, Barreiro E, Quinn MT, Hussain SN. Molecular characterization of a superoxide-generating NAD(P)H oxidase in the ventilatory muscles. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:412-418.
 22. Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2006;71:216-225.
 23. Bedard K, Krause K-H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007;87:245-313.
 24. Sullivan-Gunn M, Campbell-O'Sullivan S, Tisdale MJ, Lewandowski PA. Decreased NADPH oxidase expression and antioxidant activity in cachectic skeletal muscle. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011;2:181-188.
 25. Mofarrahi M, Brandes RP, Gorlach A, Hanze J, Terada LS, Quinn MT, Mayaki D, Petrof B, Hussain SN. Regulation of proliferation of skeletal muscle precursor cells by NADPH oxidase. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2008;10:559-574.
 26. Takac I, Schroder K, Zhang L, Lardy B, Anilkumar N, Lambeth JD, Shah AM, Morel F, Brandes RP. The E-loop is involved in hydrogen peroxide formation by the NADPH oxidase Nox4. *J Biol Chem*. 2011;286:13304-13313.
 27. Ohta Y, Kinugawa T, Matsushima S, Ono T, Sobirin MA, Inoue N, Yokota T, Hirabayashi K, Tsutsui H. Oxidative stress impairs insulin signal in skeletal muscle and causes insulin resistance in postinfarct heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300:H1637-H1644.
 28. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001;81:807-869.

29. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22:153-183.
30. Byun MS, Jeon KI, Choi JW, Shim JY, Jue DM. Dual effect of oxidative stress on NF-KB activation in HeLa cells. *Exp Mol Med.* 2002;34:332-339.
31. Abe J, Berk BC. Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 1999;274:21003-21010.
32. Yoshizumi M, Abe J, Haendeler J, Huang Q, Berk BC. Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 2000;275:11706-11712.
33. Matsukawa J, Matsuzawa A, Takeda K, Ichijo H. The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *J Biochem.* 2004;136:261-265.
34. Zhang W, Zheng S, Storz P, Min W. Protein kinase D specifically mediates apoptosis signal-regulating kinase 1-JNK signaling induced by H₂O₂ but not tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* 2005;280:19036-19044.
35. Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* 1997;275:90-94.
36. Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 1998;17:2596-2606.
37. Weston AD, Sampaio AV, Ridgeway AG, Underhill TM. Inhibition of p38 MAPK signaling promotes late stages of myogenesis. *J Cell Sci.* 2003;116:2885-2893.
38. Lluís F, Ballestar E, Suelves M, Esteller M, Muñoz-Canoves P. E47 phosphorylation by p38 MAPK promotes MyoD/E47 association and muscle-specific gene transcription. *EMBO J.* 2005;24:974-984.

39. Suelves M, Lluís F, Ruiz V, Nebreda AR, Muñoz-Canoves P. Phosphorylation of MRF4 transactivation domain by p38 mediates repression of specific myogenic genes. *EMBO J.* 2004;23:365-375.
40. Chen S-E, Jin B, Li Y-P. TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C1660-1671.
41. Li Y-P, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, Reid MB. TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J.* 2005;19:362-370.
42. Strle K, Broussard SR, McCusker RH, Shen W-H, LeClerc JM, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, Kelley KW. C-jun N-terminal kinase mediates tumor necrosis factor- α suppression of differentiation in myoblasts. *Endocrinology.* 2006;147:4363-4373.
43. Haddad F, Adams GR. Inhibition of MAP/ERK kinase prevents IGF-1 induced hypertrophy in rat muscles. *J Appl Physiol.* 2004;96.
44. Murgia M, Serrano AL, Calabria E, Pallafacchina G, Lomo T, Schiaffino S. Ras is involved in nerve-activity-dependent regulation of muscle genes. *Nat Cell Biol.* 2000;2:142-147.
45. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune response. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-260.
46. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:621-663.
47. Vermeulen L, De Wilde G, Van Damme P, Vanden Berghe W, Haegeman G. Transcriptional activation of the NF- κ B p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.* 2003;22:1313-1324.
48. Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC. p53 induces NF- κ B activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J Biol Chem.* 2004;279:26115-26125.

49. Ponnappan S, Uken-Trebilcock G, Lindquist M, Ponnappan U. Tyrosine phosphorylation-dependent activation of NF- κ B is compromised in T cells from the elderly. *Exp Gerontol.* 2004;39:559-566.
50. Das R, Ponnappan S, Ponnappan U. Redox regulation of the proteasome in T lymphocytes during aging. *Free Rad Biol Med.* 2007;42:541-551.
51. Baeza-Raja B, Munoz-Canoves P. p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. *Mol Biol Cell.* 2004;15:2013-2026.
52. Conejo R, Valverde AM, Benito M, Lorenzo M. Insulin produces myogenesis in C2C12 myoblasts by induction of NF-kappaB and downregulation of AP-1 activities. *J Cell Physiol.* 2001;186:82-94.
53. Conejo R, Alvaro C, Benito M, Cuadrado A, Lorenzo M. Insulin restores differentiation of Ras-transformed C2C12 myoblasts by inducing NF-kappaB through an AKT/P70S6K/p38-MAPK pathway. *Oncogene.* 2002;21:3739-3753.
54. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid LV, Wang C-Y, Baldwin Jr. AS. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. *Science.* 2000;289:2363-2366.
55. Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA. Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow muscle is controlled by innervation and hormones. *Development.* 1993;118:1137-1147.
56. Hughes SM, Koishi K, Rudnicki M, Maggs AM. MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. *Mech Dev.* 1997;61:151-163.
57. Megeney LA, Rudnicki MA. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochem Cell Biol.* 1995;73:723-732.
58. Murre C, Mccaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Yan JN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, Weintraub H, Baltimore D. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell.* 1989;58:537-544.

59. Dasarathy S, Muc S, Hisamuddin K, Edmison JM, Dodig M, McCullough AJ, Kalhan SC. Altered expression of genes regulating skeletal muscle mass in the portcaval anastomosis rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G1105-G1113.
60. Seward DJ, Haney JC, Rudnick MA, Swoap SJ. bHLH transcription factor MyoD affects pattern in a muscle-specific fashion. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;85:C408-C413.
61. Ekmark M, Gronevik E, Schjerling P, Gundersen K. Myogenin induces higher oxidative capacity in pre-existing mouse muscle fibres after somatic DNA transfer. *J Physiol*. 2003;548:259-269.
62. Hughes SM, Chi MM-Y, Lowry OH, Gundersen K. Myogenin induces a shift of enzyme activity from glycolytic to oxidative metabolism in muscles of transgenic mice. *J Cell Biol*. 1999;145:633-642.
63. Walters EH, Stickland NC, Loughna PT. MRF-4 exhibits fiber type- and muscle-specific pattern of expression in postnatal rat muscle. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2000;287:R1381-R1384.
64. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Jr SA, Lima ARR, Campos DHS, Damatto RL, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and myogenic regulatory factors changes. *Med Sci Monit*. 2010;16:374-383.
65. Fratelli M, Goodwin LO, Orom UA, Lombardi S, Tonelli R, Mengozzi Mea. Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13998-14003.
66. Rozanski GJ, Xu Z. Glutathione and K(+) channel remodeling in post-infarction rat heart. *Am J Physiol Heart Cell Physiol*. 2002;282:H2346-H2355.
67. Adamy C, Mulder P, Khouzami L, Andrieu-abadie N, Defer N, Candiani G, Pavoine C, Caramelle P, Souktani R, Le Corvoisier P, Perier M, Kirsch M, Damy T, Berdeaux A, Levade T, Thuillez C, Hittinger L, Pecker F. Neutral sphingomyelinase inhibition participates to the benefits of N-acetylcysteine

- treatment in post-myocardial infarction failing heart rats. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:344-353.
68. Bourraindeloup M, Adamy C, Candiani G, Cailleret M, Bourin M, Badoual T, Su JB, Adubeiro S, Roudot-Thoraval F, Dubois-Rande J, Hittinger L, Pecker F. N-acetylcysteine treatment normalizes serum tumor necrosis factor-alpha level and hinders the progression of cardiac injury in hypertensive rats. *Circulation.* 2004;110:2003-2009.
 69. Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira Jr SA, Campos DHS, Lima ARR, Damatto RL, Cezar MDM, Bonomo C, Guizoni DM, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *J Appl Physiol.* 2011;111:543-551.
 70. Lima ARR, Martinez PF, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Bonomo C, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. *Int J Exp Path.* 2010;91:54-62.
 71. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res.* 1979;44:503-512.
 72. Lee TM, Lai PY, Chang NC. Effect of N-acetylcysteine on sympathetic hyperinnervation in post-infarcted rat hearts. *Cardiovasc Res.* 2010;85:137-146.
 73. Carvalho RF, Cicogna AC, Campos GER, Lopes FS, Sugisaki MM, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M. Heart failure alters MyoD and MRF4 expressions in rat skeletal muscle. *Int J Exp Path.* 2006;87:219-225.
 74. Okoshi K, Fioretto JR, Okoshi MP, Cicogna AC, Aragon FF, Matsubara LS, Matsubara BB. Food restriction induces in vivo ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive rats without impairment of in vitro myocardial contractility. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37:607-613.

75. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58:1072-1083.
76. Solomon SD, Greaves SC, Ryan M, Finn P, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *J Card Fail*. 1999;5:213-223.
77. Minicucci MF, Azevedo PS, Duarte DR, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva SAR, Zornoff LAM. Comparison of different methods to measure experimental chronic infarction size in the rat model. *Arq Bras Cardiol*. 2007;89:83-87.
78. Oh B-H, Ono S, Rockman HR, Ross J. Myocardial hypertrophy in the ischemic zone induced by exercise in rats after coronary reperfusion. *Circulation*. 1993;87:598-607.
79. Dubowitz V. *Muscle Biopsy: a Practical Approach*. 2nd ed. London: Bailliere Tindall; 1985.
80. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265-275.
81. Nakamura W, Hojoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta*. 1974;358:251-261.
82. Ewing JF, Janero DR. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. *Anal Biochem*. 1995;232:243-248.
83. Aebi H. *Methods of enzymatic analysis*. 2nd ed. New York: Verloy Chemia Weinheim; 1974.
84. Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*. 1991;26:853-856.
85. Li L, Chen C-YO, Aldini G, Johnson EJ, Rasmussen H, Yoshida Y, Niki E, Blumberg JB, Russell RM, Yeum K-J. Supplementation with lutein or lutein plus green tea

- extracts does not change oxidative stress in adequately nourished older adults. *J Nutr Biochem.* 2010;21:544-549.
86. Fernandes DC, Wosniak J, Pescatore LA, Bertoline MA, Liberman M, Laurindo FRM, Santos CXC. Analysis of DHE-derived oxidation products by HPLC in the assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity in vascular systems. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C413-C422.
 87. Laurindo FRM, Fernandes DC, Santos CXC. Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products. *Methods Enzymol.* 2008;441:237-260.
 88. Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Rad Biol Med.* 2003;34.
 89. Papapostolou I, Patsoukis N, Georgiou CD. The fluorescence detection of superoxide radical using hydroethidine could be complicated by the presence of heme proteins. *Anal Biochem.* 2004;332:290-298.
 90. Fink B, Laude K, McCann L, Doughan A, Harrison DG, Dikalov S. Detection of intracellular superoxide formation in endothelial cells and intact tissues using dihydroethidium and an HPLC-based assay. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C895-C902.
 91. 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;72:248-254.
 92. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods.* 2001;25:402-408.
 93. Okoshi K, Nakayama M, Yan X, Okoshi MP, Schuldt AJT, Marchionni MA, Lorell BH. Neuregulins regulate cardiac parasympathetic activity. Muscarinic modulation of beta-adrenergic activity in myocytes from mice with neuregulin-1 gene deletion. *Circulation.* 2004;110:713-717.

94. Okoshi MP, Yan X, Okoshi K, Nakayama M, Schuldt AJT, O'Connell T, Simpson PC, Lorell BH. Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy. *J Card Fail.* 2004;10:511-518.
95. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJJ, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after acute myocardial infarction: results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med.* 1992;327:669-677.
96. Brooks WW, Bing OHL, Robinson KG, Slawsky MT, Chaletsky DM, Conrad CH. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on myocardial fibrosis and function in hypertrophied and failing myocardium from the spontaneously hypertensive rat. *Circulation.* 1997;96:4002-4010.
97. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Singh K, Squire R, Okoshi MP, Bing OHL. Direct effects of colchicine on myocardial function. Studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1999;33:60-65.
98. Bing OHL, Brooks WW, Robinson KG, Slawsky MT, Hayes JA, Litwin SE, Sen S, Conrad CH. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27:383-396.
99. Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OHL. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation.* 1995;91:161-170.
100. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7:355-359.
101. Barreiro E, Galdiz JB, Marín M, Alvarez FJ, Hussain SN, Gea J. Respiratory loading intensity and diaphragm oxidative stress: N-acetyl-cysteine effects. *J Appl Physiol.* 2006;100:555-563.

102. Carvalho RF, Dariolli R, L.A. JJ, Sugizaki MM, Okoshi MP, Cicogna AC, Felisbino SL, Dal Pai-Silva M. Heart failure alters matrix metalloproteinase gene expression and activity in rat skeletal muscle. *Int J Exp Pathol*. 2006;87:437-443.
103. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Bras*. 1997;43:61-68.
104. Novelli EL. Radicais livres e estresse oxidativo. In: Novelli EL, ed. *Nutrição e vida saudável: estresse oxidativo e metabolismo energético*. Ribeirão Preto: Tecmed; 2005:93-113.
105. Janiszewski M, de Sousa HP, Liu X, Pedro MA, Zweier JL, Laurindo FR. Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. *Free Rad Biol Med*. 2002;32:446-453.
106. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2007;30:1323-1338.
107. Eleuteri E, Di Stefano A, Ricciardolo FLM, Magno F, Gnemmi I, Colombo M, Anzalone R, Cappello F, La Rocca G, Genta FT, Zummo G, Giannuzzi P. Increased nitrotyrosine plasma levels in relation to systemic markers of inflammation and myeloperoxidase in chronic heart failure. *Int J Cardiol*. 2009;135:386-390.
108. Rabuel C, Samuel JL, Lortat-Jacob B, Marotte F, Lanone S, Keyser C, Lessana A, Payen D, Mebazaa A. Activation of the ubiquitin proteolytic pathway in human septic heart and diaphragm. *Cardiovasc Pathol*. 2010;19:158-164.
109. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*. 1996;271:C1424-C1437.
110. Majano PL, Medina J, Zubia A, Sunyer L, Lara-Pezzi E, Maldonado-Rodriguez A, Lopez-Cabrera M, Moreno-Otero R. N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes. *J Hepatol*. 2004;40:632-637.

111. Liubisavljevic S, Stojanovic I, Pavlovic D, Sokolovic D, Stevanovic I. Aminoguanidine and N-acetyl-cysteine suppress oxidative and nitrosative stress in EAE rat brains. *Redox Rep.* 2011;16:166-172.
112. Shan X, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmac Ther.* 1990;47:61-71.
113. Kefaloyianni E, Gaitanaki C, Beis I. ERK1/2 and p38-MAPK signaling pathways, through MSK1, are involved in NF-kappaB transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell Signal.* 2006;18:2238-2251.
114. Jamaluddin M, Wang S, Boldogh I, Tian B, Brasier AR. TNF-alpha-induced NF-kappaB/RelA Ser276 phosphorylation and enhanceosome formation is mediated by an ROS-dependent PKAc pathway. *Cell Signal.* 2007;19:1419-1433.
115. Toth MJ, Ades PA, LeWinter MM, Tracy RP, Tchernof A. Skeletal muscle myofibrillar mRNA expression in heart failure: relationship to local and circulating hormones. *J Appl Physiol.* 2006;100:35-41.
116. Chu Y, Solski PA, Khosravi-Far R, Der CJ, Kelly K. The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation. *J Biol Chem.* 1996;271:6497-6501.
117. Shi H, Scheffler JM, Zeng C, Pleitner JM, Hannon KM, Grant AL. Mitogen-activated protein kinase signaling is necessary for the maintenance of skeletal muscle mass. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296:C1040-C1048.

ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Atividades Desenvolvidas no Curso de Pós-Graduação "Fisiopatologia em Clínica Médica" – período de 2006 a 2012

Disciplinas cursadas

Metodologia da Pesquisa Científica

2º semestre de 2005, carga horária: 90 horas-aula.

Seminários de Trabalhos Científicos

2006 a 2010, carga horária: 45 horas-aula por semestre.

Princípios Gerais de Biologia Molecular Aplicada à Clínica Médica

1º semestre de 2006, carga horária: 75 horas-aula.

Estatística Aplicada à Metodologia da Investigação Científica

1º semestre de 2006, carga horária: 60 horas-aula.

Propriedades Mecânicas do Coração

1º semestre de 2007, carga horária: 45 horas-aula.

Captação de Recursos Externos para Pesquisa

2º semestre de 2006, carga horária: 30 horas-aula.

Estrutura e Redação do Trabalho Científico

2º semestre de 2006, carga horária: 30 horas-aula.

Microscopia Eletrônica e Ultraestrutura Celular

2º semestre de 2006, carga horária: 60 horas-aula.

Alterações Metabólicas e Funcionais Induzidas por Estresse Oxidativo. Modelo de Investigação

1º semestre de 2008, carga horária: 60 horas-aula.

Modelos Experimentais para o Estudo da Isquemia Miocárdica

1º semestre de 2008, carga horária: 45 horas-aula.

Insuficiência Cardíaca e Caquexia. Mecanismos Fisiopatológicos, Prevenção e Tratamento.

2º semestre de 2009, carga horária: 60 horas-aula.

Participação em Órgãos Colegiados

Atuou como representante discente no Conselho do Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia em Clínica Médica do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de junho de 2008 a julho de 2009.

Estágio de Docência

Disciplina: Anatomia Aplicada à Enfermagem, Curso de Graduação em Enfermagem da Faculdade de Medicina de Botucatu, carga horária: 120 h, período de 4 de março a 18 de junho de 2009.

Proficiência em Língua Inglesa

TOEIC, Listening and reading test, Score total: 770, realizado em 29 de novembro de 2009.

Participação em Cursos de Curta Duração como Ouvinte

Western Blot

Curso de Curta Duração, III Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP, 21 de setembro de 2007, carga horária: 8 horas-aula.

Avaliação Educacional de Competências Clínicas

Curso de Atualização, Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, 26 a 28 de outubro de 2006, carga horária: 20 horas-aula.

Análise de Expressão Gênica por PCR em Tempo Real

Curso – 16 h, Applied Biosystems do Brasil, São Paulo, 6 e 7 de abril de 2009.

Cursos de Curta Duração Ministrados

PCR em Tempo Real: curso realizado durante o II Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, 1º de dezembro de 2006, carga horária: 8 horas-aula.

Coordenador do curso: Professor Peter Kopp (Northwestern University, Chicago, USA). Ministrou as atividades práticas do curso em conjunto Dra. Renata A. M. Luvizotto.

Western Blot: curso realizado durante o IV Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, no período de 16 a 18 de outubro de 2008. Carga horária: 8 horas-aula. Ministrou o curso em conjunto com a Dra. Ana Paula Lima Leopoldo.

Western Blot: palestra e aula prática ministradas durante 1º Curso de Atualizações em Técnicas Laboratoriais e suas Aplicações, realizado na Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, no período de 23/3/2010 a 17/8/2010. Carga horária: aula teoria – 1 hora-aula; aula prática – 2 horas-aula.

Palestra ministrada

“Aspectos Morfológicos e Histoquímicos do Músculo Estriado”, palestra proferida durante o V Congresso Regional de Histotecnologia, Campus da UNESP/Botucatu, no período de 13 a 15 de novembro de 2010.

Organização de Evento

II Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp, 1 a 3 de dezembro de 2006, Botucatu.

Participou como membro da Comissão Organizadora deste evento, no total de 14 horas-aula.

Participação em Reuniões Científicas

XXVII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo

Realizado em Campos do Jordão-SP, no período de 25 a 27 de maio de 2006.

II Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP

Realizado em Botucatu, no período de 1 a 3 de dezembro de 2006.

XXVIII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo

Realizado em São Paulo-SP, no período de 28 a 30 de abril de 2007.

VI Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca

Realizado em Fortaleza-CE, no período de 28 a 30 de junho de 2007.

III Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Botucatu – UNESP

Realizado em Botucatu, no período de 21 a 23 de setembro de 2007.

II Encontro Nacional de Pós-Graduação na Área de Ciências da Saúde

Realizado em São Pedro, no período de 25 a 27 de setembro de 2008.

World Congress of Cardiology 2008

Realizado em Buenos Aires, Argentina, no período de 18 a 21 de maio de 2008.

IV Encontro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Realizado em Botucatu, no período de 16 a 18 de outubro de 2008.

I Encontro de Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu

Realizado em São Pedro, no período de 21 a 23 de agosto de 2009.

European Society of Cardiology Congress

Realizado em Barcelona, Espanha, no período de 29 de agosto a 2 de setembro de 2009.

64º Congresso da Sociedade Brasileira de Cardiologia

Realizado em Salvador, no período de 12 a 16 de setembro de 2009.

IV Encontro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Realizado em Botucatu, realizado no período de 3 a 5 de dezembro de 2009.

XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo

Realizado em São Paulo, no período de 29 de abril a 1º de maio de 2010.

IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca – GEIC 2010

Realizado em Curitiba, no período de 10 a 12 de junho de 2010.

Experimental Biology – EB 2011

Realizado em Washington D.C., Estados Unidos, no período de 9 a 13 de abril de 2011.

XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo

Realizado em São Paulo-SP, no período de 23 a 25 de junho de 2011.

European Society of Cardiology Congress

Realizado em Paris, França, no período de 27 a 31 de agosto de 2011.

Resumos publicados

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Júnior SA, Campos DHS, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. **Myogenic regulatory factors expression in skeletal muscle changes during heart failure development.** III Encontro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Botucatu – SP, 2007. **Resumo publicado:** The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2007, 13:906.

Iyomasa RM, Silva MB, **Martinez PF**, Campos DHS, Damatto RL, Matsubara LS, Okoshi MP, Okoshi K. Efeitos do bloqueio da aldosterona sobre a remodelação cardíaca de ratos com sobrecarga pressórica persistente. XVI Congresso Médico Acadêmico de Botucatu, Botucatu, 2007. **Resumo publicado:** Anais do Congresso 2007; p34.

Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Padovani CR, Nascimento AF, **Martinez PF**, Nogueira CR, Cicogna AC. Influência da obesidade sobre a expressão gênica das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio miocárdico. 62º Congresso Brasileiro de Cardiologia, São Paulo, 2007. **Resumo publicado:** Arquivos Brasileiros de Cardiologia 2007; 89:7.

Martinez PF, Okoshi K, Campos DHS, Oliveira Júnior SA, Lima ARR, Carvalho RF, Zornoff LAM, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Expressão dos fatores de regulação miogênica no músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca crônica. VI Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, Fortaleza, 2007. **Resumo publicado:** Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2007; 88:13.

Martinez PF, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Júnior SA, Damatto RL, Gosuen GB, Iyomasa RM, Silva MB, Cezar MDM, Okoshi K, Okoshi MP. Caracterização clínica e anátomo-patológica da insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos. VI Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, Fortaleza, 2007. **Resumo publicado:** Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2007; 88:14.

Martinez PF, Okoshi K, Campos DHS, Oliveira Júnior SA, Lima ARR, Carvalho RF, Zornoff LAM, Damatto RL, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. A insuficiência cardíaca altera a expressão gênica dos fatores de regulação miogênica no músculo esquelético de ratos. XXVIII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, São Paulo,

2007. **Resumo publicado:** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo 2007; 17:96.

Costa LCO, Campos DHS, Damatto RL, Gosuen GB, Lima ARR, **Martinez PF**, Okoshi K, Okoshi MP. O bloqueio da aldosterona piora a remodelação cardíaca de ratos com sobrecarga pressórica persistente. 17º Congresso Médico Acadêmico de Botucatu, 2008, Botucatu, SP. **Resumo publicado:** Anais do 17º Congresso Médico Acadêmico de Botucatu, 2008.

Gosuen GB, **Martinez PF**, Lima ARR, Oliveira Júnior SA, Campos DHS, Bonomo C, Damatto, RL, Zornoff LAM, Okoshi K, Okoshi MP. Expressão da miogenina e trofismo no músculo esquelético de ratos com infarto do miocárdio. 17º Congresso Médico Acadêmico de Botucatu, 2008, Botucatu, SP. **Resumo publicado:** Anais do 17º Congresso Médico Acadêmico de Botucatu, 2008.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Júnior SA, Campos DHS, Lima ARR, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Myogenic regulatory factors expression in skeletal muscle changes during ventricular dysfunction and heart failure. XVth World Congress of Cardiology, Buenos Aires, Argentina, 2008. **Resumo publicado:** Circulation, 2008; 117:209-210.

Oliveira Júnior AS, Lima-Leopoldo AP, **Martinez PF**, Campos DHS, Sugizaki MM, Okoshi MO, Okoshi K, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, Cicogna AC. Differential influences of high fat diet on cardiac remodeling from normotensive and spontaneously hypertensive rats. XVIth World Congress of Cardiology, 2008, Buenos Aires, Argentina. **Resumo publicado:** Circulation, 2008; 117:204.

Okoshi MP, **Martinez PF**, Campos DHS, Gosuen GB, Costa LCO, Iyomasa RM, Silva MB, Cezar MDM, Cicogna AC, Okoshi K. The aldosterone blockade worsens cardiac remodeling in rats with ascending aortic stenosis-induced pressure overload. European Society of Cardiology Congress 2008, Munich, Alemanha. **Resumo publicado:** European Heart Journal, 2008; 29:45.

Martinez PF, Lima ARR, Okoshi K, Oliveira Júnior SA, Campos DHS, Gosuen GB, Carvalho RF, Zornoff LAM, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Expressão da miogenina e trofismo do músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca. XXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2008, São Paulo - SP. **Resumo publicado:** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2008; 18:52.

Martinez PF, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Júnior AS, Lima ARR, Gosuen GB, Damatto RL, Cicogna AC, Okoshi K, Okoshi MP. Caracterização da insuficiência cardíaca induzida por infarto do miocárdio em ratos. XXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2008, São Paulo - SP. **Resumo publicado:** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2008; 18:66.

Lima ARR, **Martinez PF**, Okoshi K, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Júnior SA, Cezar MDM, Damatto, RL, Gosuen GB, Paladino Júnior JR, Polin MAM, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Down-regulation of myostatin gene expression in skeletal muscle fo rats with chronic heart failure. IV Encontro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, 2008, Botucatu, SP. **Resumo publicado:** The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 2008; 14:843.

Cezar MDM, Campos DHS, Martinez PF, Guizoni DM, Rosa CM, Bonomo C, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. Bloqueio da aldosterona na remodelação cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos. VII Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2008, Búzios, RJ. **Resumo Publicado:** Anais do Congresso.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvalho RF, Oliveira Junior SA, Campos DHS, Lima ARR, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart failure induces atrophy and myogenin downregulation in rat skeletal muscle. European Society of Cardiology Congress, 2009, Barcelona. **Resumo publicado:** European Heart Journal, 2009; 30:289.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira Jr SA, Campos DHS, Lima ARR, Damatto RL, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. European Society of Cardiology Congress, 2009, Barcelona. **Resumo publicado:** European Heart Journal, 2009; 30:291.

Okoshi K, Polim MAM, Paladino Junior JR, **Martinez PF**, Rodrigues LL, Rosa CM, Bonomo C, Zornoff LAM, Matsubara LS, Okoshi MP. Intermittent fasting reduces mortality and attenuates post-infarction ventricular remodeling in rats. European Society of Cardiology Congress, 2009, Barcelona. **Resumo publicado:** European Heart Journal, 2009;30:282-283.

Okoshi MP, Campos DHS, **Martinez PF**, Lima ARR, Cezar MDM, Matsubara LS, Costa LCO, Guimarães AA, Cicogna AC, Okoshi K. The effects of early aldosterone blockade on myocardial fibrosis and contractility in rats with ascending aortic stenosis. European Society of Cardiology Congress, 2009, Barcelona. **Resumo publicado:** European Heart Journal, 2009; 30:288.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira Jr SA, Campos DHS, Lima ARR, Damatto RL, Cezar MDM, Guizoni DM, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Detecção ecocardiográfica de insuficiência cardíaca congestiva em ratos após infarto do miocárdio. **Resumo publicado:** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2009; 93:142.

Xavier NP, Rosa CM, Campos DHS, Rodrigues LL, Cezar MDM, **Martinez PF**, Damatto RL, Bonomo C, Fernandes AAH, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. Influência do antioxidante quercitina sobre a estrutura e função cardíaca de ratos diabéticos: estudo in vivo e in vitro. VIII Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca - GEIC, 2009, São Paulo, SP. **Resumo publicado:** Anais do Congresso.

Xavier NP, Rosa CM, Campos DHS, Rodrigues LL, Cezar MDM, **Martinez PF**, Damatto RL, Fernandes AAH, Bonomo C, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. Influence of the antioxidant quercetin on cardiac structure and function of diabetic rats: in vivo and in vitro studies. V Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2009, Botucatu/ SP. **Resumo publicado:** Anais do V Encontro de Pós-Graduação da FMB. Botucatu/ SP: FMB/ UNESP, 2009.

Guizoni DM, Lima ARR, **Martinez PF**, Okoshi K, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Junior SA, Bonomo C, Pai-Silva MD, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscle of rats with chronic heart failure. **Resumo publicado:** Anais do 55º Congresso Brasileiro de Genética 2009: 291.

Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, **Martinez PF**, Lima-Leopoldo AP, Campos DHS, Nascimento AF, Leopoldo AS, Padovani CR, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC. Caracterização nutricional e cardiovascular de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos com obesidade induzida por dieta. **Resumo publicado:** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2009; 93:102.

Oliveira Junior SA, Okoshi K, **Martinez PF**, Lima-Leopoldo AP, Torres BP, Nascimento AF, Campos DHS, Leopoldo AS, Dal Pai-Silva M, Padovani CR, Okoshi MP, Cicogna AC. Análise comparativa dos perfis nutricional e cardiovascular de ratos com obesidade induzida por dieta balanceada e hipercalórica. **Resumo publicado:** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2009; 93:103.

Costa LCO, Campos DHS, **Martinez PF**, Cezar MDM, Damatto RL, Lima ARR, Guimaraes AA, Rodrigues LL, Okoshi K, Okoshi MP. Efeito do bloqueio da aldosterona sobre o desenvolvimento de fibrose miocárdica e insuficiência cardíaca em ratos com estenose aórtica. **Resumo publicado:** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2009; 19:25.

Damatto RL, Cezar MDM, **Martinez PF**, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Lima ARR, Guirado GN, Cicogna AC, Okoshi K, Okoshi MP. Ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca apresentam atrofia e fibrose do músculo esquelético sóleo. **Resumo publicado:** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2009; 19:141.

Bonomo C, Guizoni DM, **Martinez PF**, Lima ARR, Zornoff LAM, Cezar MDM, Damatto RL, Okoshi K, Okoshi MP. Effect of administration of physiological dose of thyroid hormone on cardiac remodeling in rats with myocardial infarction. VI Encontro de Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, 2010, Botucatu, SP. **Resumo publicado:** Anais do Evento, 2010.

Okoshi K, Rosa CM, Xavier NP, Fernandes AAH, Campos DHS, Cezar MDM, **Martinez PF**, Takamoto AHR, Cicogna AC, Okoshi MP. Diabetes mellitus worsens cardiac remodeling in aged spontaneously hypertensive rats. European Society of Cardiology Congress 2010, Stockholm, Sweden. **Resumo publicado:** European Heart Journal, 2010; 31: 273.

Okoshi MP, Xavier NP, Rosa CM, Fernandes AAH, Campos DHS, Cezar MDM, **Martinez PF**, Rodrigues LL, Cicogna AC, Okoshi K. Antioxidant quercetin reduces oxidative stress and ameliorates myocardial and ventricular function of diabetic rats. European Society of Cardiology Congress 2010, Stockholm, Sweden. **Resumo publicado:** European Heart Journal, 2010; 31: 568.

Damatto RL, **Martinez PF**, Lima ARR, Cezar MDM, Campos DHS, Oliveira SA Jr, Guizoni DM, Bonomo C, Okoshi K, Okoshi MP. Myogenic regulatory factors and myostatin/follistatin expression in heart failure-induced skeletal muscle phenotype changes. European Society of Cardiology Congress 2010, Stockholm, Sweden. **Resumo publicado:** European Heart Journal, 2010; 31: 427.

Lima ARR, **Martinez PF**, Damatto RL, Zornoff LAM, Cezar MDM, Guizoni DM, Bonomo C, Rosa CM, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced myosin heavy chain changes in rat diaphragm muscle are not related to gene expression of myogenic regulatory

factors. European Society of Cardiology Congress 2010, Stockholm, Sweden. **Resumo publicado:** European Heart Journal, 2010; 31: 426.

Cezar MDM, Damatto RL, **Martinez PF**, Lima ARR, Bonomo C, Rosa CM, Guizoni DM, Cicogna AC, **Okoshi MP**, Okoshi K. Spironolactone reduces mortality rate without changing left ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats. European Society of Cardiology Congress 2010, Stockholm, Sweden. **Resumo publicado:** European Heart Journal, 2010; 31: 859.

Oliveira SA Jr, Okoshi MP, **Martinez PF**, Campos DHS, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Dal Pai-Silva M, Padovani CR, Okoshi K, Cicogna AC. Influence of dietary-induced obesity on endocrine and cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats. European Society of Cardiology Congress 2010, Stockholm, Sweden. **Resumo publicado:** European Heart Journal, 2010; 31: 1015.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira SA Jr, Campos DHS, Lima ARR, Damatto RL, Cezar MDM, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Análise de variáveis ecocardiográficas por meio da técnica de agrupamento para detecção de insuficiência cardíaca em ratos. IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2010, Curitiba, PR. **Resumo publicado:** Arq Bras Cardiol 2010; 95: 10.

Martinez PF, Seiva FRF, Damatto RL, Lima ARR, Cezar MDM, Bonomo C, Guizoni DM, Zornoff LAM, Okoshi K, Novelli ELB, Okoshi MP. Influência da N-acetilcisteína sobre o estresse oxidativo em músculo esquelético de ratos infartados. IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2010, Curitiba, PR. **Resumo publicado:** Arq Bras Cardiol 2010; 95: 1.

Martinez PF, Okoshi K, Damatto RL, Lima ARR, Cezar MDM, Oliveira SA Jr, Rosa CM, Bonomo C, Guizoni DM, Zornoff LAM, **Okoshi MP**. Influência da N-acetilcisteína sobre o processo de remodelação cardíaca de ratos infartados. IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2010, Curitiba, PR. **Resumo publicado:** Arq Bras Cardiol 2010; 95: 10.

Lima ARR, **Martinez PF**, Damatto RL, Cezar MDM, Guizoni DM, Bonomo C, Zornoff LAM, Dal Pai-Silva M, Okoshi K, Okoshi MP. Estudo morfológico e molecular do músculo diafragma de ratos com insuficiência cardíaca crônica. IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2010, Curitiba, PR. **Resumo publicado:** Arq Bras Cardiol 2010; 95: 1.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira SA Jr, Lima ARR, Damatto RL, Cezar MDM, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Análise de agrupamento para detecção ecocardiográfica de insuficiência cardíaca em ratos após infarto do miocárdio. XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010, São Paulo, SP. **Resumo publicado:** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010; 20: 42.

Martinez PF, Okoshi K, Lima ARR, Damatto RL, Guizoni DM, Bonomo C, Cezar MDM, Oliveira SA Jr, Zornoff LAM, Okoshi MP. A administração de N-acetilcisteína melhora a função diastólica de ratos com insuficiência cardíaca. XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010, São Paulo, SP. **Resumo publicado:** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010; 20: 100.

Oliveira SA Jr, Torres BP, **Martinez PF**, Leopoldo AS, Damatto RL, Lima ARR, Campos DHS, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC. Influência do bloqueio da angiotensina II sobre o perfil nutricional e cardiovascular de ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica. XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010, São Paulo, SP. **Resumo publicado:** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010; 20: 30.

Damatto RL, **Martinez PF**, Cezar MDM, Lima ARR, Guizoni DM, Bonomo C, Guirado GN, Campos DHS, Okoshi K, Okoshi MP. A insuficiência cardíaca crônica altera a expressão gênica da miogenina e MyoD em músculo esquelético periférico. XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010, São Paulo, SP. **Resumo publicado:** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010; 20: 56.

Martinez PF, Seiva FR, Damatto RL, Lima ARR, Cezar MDM, Bonomo C, Zornoff LAM, Okoshi K, Novelli ELB, Okoshi MP. N-acetilcisteína reduz o estresse oxidativo sistêmico e muscular de ratos com insuficiência cardíaca. XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo - SOCESP, 2011, São Paulo, SP. **Resumo publicado:** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2011; 21:136.

Rosa CM, Xavier NP, Cezar MDM, Campos DHS, **Martinez PF**, Gimenes R, Fernandes AAH, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. Remodelamento cardíaco em ratos espontaneamente hipertensos com diabetes mellitus. XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo - SOCESP, 2011, São Paulo/ SP. **Resumo publicado:** Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2011; 21:78.

Prêmios e Títulos

Diploma de Mérito Acadêmico, melhor índice de aproveitamento no Curso de Graduação em Fisioterapia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Presidente Prudente, 2005.

Martinez PF, Okoshi K, Campos DHS, Oliveira Júnior SA, Lima ARR, Carvalho RF, Zornoff LAM, Damatto RL, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. A insuficiência cardíaca altera a expressão gênica dos fatores de regulação miogênica no músculo esquelético de ratos. Selecionado entre os cinco melhores temas livres orais na sessão “Prêmio Melhor Pesquisa Básica Cantídio de Moura Campos Filho” do XXVIII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, São Paulo, 2007.

Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Padovani CR, Nascimento AF, **Martinez PF**, Nogueira CR, Cicogna AC. Influência da obesidade sobre a expressão gênica das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio miocárdico. Selecionado entre os oito melhores temas livres orais na sessão “Melhor Tema Livre Oral - Sessão Silvio Carvalho” do 62º Congresso Brasileiro de Cardiologia, São Paulo, 2007.

Iyomasa RM, Silva MB, **Martinez PF**, Campos DHS, Damatto RL, Matsubara LS, Okoshi MP, Okoshi K. Efeitos do bloqueio da aldosterona sobre a remodelação cardíaca de ratos com sobrecarga pressórica persistente. Menção Honrosa - XVI Congresso Médico Acadêmico de Botucatu, Botucatu, 2007.

Gosuen GB, **Martinez PF**, Lima ARR, Oliveira Júnior SA, Campos DHS, Bonomo C, Damatto, RL, Zornoff LAM, Okoshi K, Okoshi MP. Expressão da miogenina e trofismo no músculo esquelético de ratos com infarto do miocárdio. Menção Honrosa no 17º Congresso Médico Acadêmico de Botucatu, 2008, Botucatu, SP.

Cezar MDM, Campos DHS, **Martinez PF**, Guizoni DM, Rosa CM, Bonomo C, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. Bloqueio da aldosterona na remodelação cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos. Um dos 3 finalistas ao Prêmio Melhor Tema Livre - Área Básica no VII Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2008, Búzios, RJ.

Lima ARR, **Martinez PF**, Okoshi K, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Júnior SA, Cezar MDM, Damatto, RL, Gosuen GB, Paladino Júnior JR, Polin MAM, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Down-regulation of myostatin gene expression in skeletal muscle fo rats with chronic heart failure. 1º lugar - Categoria Melhor Apresentação de Painel dentre os Trabalhos Experimentais e Demais não Clínicos no IV Encontro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, 2008, Botucatu, SP.

Costa LCO, Campos DHS, Damatto RL, Gosuen GB, Lima ARR, **Martinez PF**, Okoshi K, Okoshi MP. O bloqueio da aldosterona piora a remodelação cardíaca de ratos com sobrecarga pressórica persistente. 1º Lugar - XVII Prêmio Mário Rubens Guimarães Montenegro no 17º Congresso Médico Acadêmico de Botucatu, 2008, Botucatu, SP.

Xavier NP, Rosa CM, Campos DHS, Rodrigues LL, Cezar MDM, **Martinez PF**, Damatto RL, Fernandes AAH, Bonomo C, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. Influence of the antioxidant quercetin on cardiac structure and function of diabetic rats: in vivo and in vitro studies. 2º Lugar na Categoria Melhor Apresentação de Painel entre os Trabalhos Experimentais no V Encontro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, 2009, Botucatu/ SP.

Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, **Martinez PF**, Lima-Leopoldo AP, Campos DHS, Nascimento AF, Leopoldo AS, Padovani CR, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC. Caracterização nutricional e cardiovascular de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos com obesidade induzida por dieta. Selecionado entre os oito melhores temas livres orais na "Sessão: 'Protásio Lemos da Luz' - Categoria: Pesquisa Básica e Experimental" do 64º Congresso Brasileiro de Cardiologia, 2009, Salvador/BA.

Oliveira Junior SA, Okoshi K, **Martinez PF**, Lima-Leopoldo AP, Torres BP, Nascimento AF, Campos DHS, Leopoldo AS, Dal Pai-Silva M, Padovani CR, Okoshi MP, Cicogna AC. Análise comparativa dos perfis nutricional e cardiovascular de ratos com obesidade induzida por dieta balanceada e hipercalórica. Selecionado entre os oito melhores temas livres orais na "Sessão: 'Protásio Lemos da Luz' - Categoria: Pesquisa Básica e Experimental" do 64º Congresso Brasileiro de Cardiologia, 2009, Salvador/BA.

Guizoni DM, Lima ARR, **Martinez PF**, Damatto RL, Okoshi K, Okoshi MP. Expressão da miostatina e da follistatina em músculo esquelético de ratos com insuficiência cardíaca crônica. 3º Lugar - Melhor Trabalho de Iniciação Científica na área de Ciências Biológicas e Médicas do XXI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2009, São José do Rio Preto.

Guizoni DM, Lima ARR, **Martinez PF**, Okoshi K, Zornoff LAM, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Bonomo C, Pai-Silva MD, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in

skeletal muscle of rats with chronic heart failure. Selecionado entre os cinco melhores trabalhos de iniciação científica na área de Genética e Evolução Humana e Genética Médica do 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia.

Costa LCO, Campos DHS, **Martinez PF**, Cezar MDM, Damatto RL, Lima ARR, Guimaraes AA, Rodrigues LL, Okoshi K, Okoshi MP. Efeito do bloqueio da aldosterona sobre o desenvolvimento de fibrose miocárdica e insuficiência cardíaca em ratos com estenose aórtica. Selecionado entre os cinco finalistas ao Prêmio Jovem Investigador Josef Feher do XXX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2009, São Paulo.

Damatto RL, Cezar MDM, **Martinez PF**, Campos DHS, Oliveira Jr SA, Lima ARR, Guirado GN, Cicogna AC, Okoshi K, Okoshi MP. Ratos espontaneamente hipertensos com insuficiência cardíaca apresentam atrofia e fibrose do músculo esquelético sóleo. 3º Lugar na Apresentação de Tema Livre Oral do XV Simpósio de Fisioterapia em Cardiologia; XXX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2009, São Paulo.

Cezar MDM, Damatto RL, Campos DHS, **Martinez PF**, Lima ARR, Oliveira Jr SA, Bonomo C, Costa LCO, Guizoni DM, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. A administração precoce de espirolactona reduz a mortalidade em ratos espontaneamente hipertensos. Selecionado entre os cinco melhores temas livres na área de Ciências Básicas do VIII Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2009, São Paulo.

Xavier NP, Rosa CM, Campos DHS, Rodrigues LL, Cezar MDM, **Martinez P.F**, Damatto R L, Bonomo C, Fernandes AAH, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. Influência do antioxidante quercitina sobre a estrutura e função cardíaca de ratos diabéticos: estudo in vivo e in vitro. Selecionado entre os cinco melhores temas livres na área de Ciências Básicas do VIII Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2009, São Paulo.

Bonomo C, Guizoni DM, **Martinez PF**, Lima ARR, Zornoff LAM, Cezar MDM, Damatto RL, Okoshi K, Okoshi MP. Effect of administration of physiological dose of thyroid hormone on cardiac remodeling in rats with myocardial infarction. 1º lugar - Prêmio Melhor Tema Livre – Experimental do VI Encontro de Pós Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, 2010, Botucatu, SP.

Martinez PF, Seiva FRF, Damatto RL, Lima ARR, Cezar MDM, Bonomo C, Guizoni DM, Zornoff LAM, Okoshi K, Novelli ELB, Okoshi MP. Influência da N-acetilcisteína sobre o estresse oxidativo em músculo esquelético de ratos infartados. Selecionado entre os três finalistas ao Prêmio Melhor Tema Livre – Experimental/Ciência Básica do IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2010, Curitiba, PR.

Lima ARR, **Martinez PF**, Damatto RL, Cezar MDM, Guizoni DM, Bonomo C, Zornoff LAM, Dal Pai-Silva M, Okoshi K, Okoshi MP. Estudo morfológico e molecular do músculo diafragma de ratos com insuficiência cardíaca crônica. 1º lugar - Prêmio Melhor Tema Livre – Experimental/Ciência Básica do IX Congresso Brasileiro de Insuficiência Cardíaca, 2010, Curitiba, PR.

Oliveira SA Jr, Torres BP, **Martinez PF**, Leopoldo AS, Damatto RL, Lima ARR, Campos DHS, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC. Influência do bloqueio da angiotensina II

sobre o perfil nutricional e cardiovascular de ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica. Selecionado entre os cinco finalistas ao Prêmio Melhor Pesquisa Básica Cantídio de Moura Campos Filho do XXXI Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2010, São Paulo, SP.

Rosa CM, Xavier NP, Cezar MDM, Campos DHS, **Martinez PF**, Gimenes R, Fernandes AAH, Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. Remodelamento cardíaco em ratos espontaneamente hipertensos com diabetes mellitus. Um dos 5 melhores trabalhos selecionados para o Prêmio Melhor Pesquisa Básica "Cantídio de Moura Campos Filho" no XXXII Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo - SOCESP, 2011, São Paulo/ SP.

Artigos publicados

Damatto RL, **Martinez PF**, Lima ARR, Cezar MDM, Campos DHS, Oliveira Junior SA, Guizoni DM, Bonomo C, Nakatani BT, Dal Pai-Silva M, Carvalho RF, Okoshi K, Okoshi MP. Heart failure-induced skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. *International Journal of Cardiology*, 2012, submetido após revisão.

Minicucci MF, Azevedo PS, **Martinez PF**, Lima ARR, Bonomo C, Guizoni DM, Polegato BF, Okoshi MO, Okoshi K, Matsubara BB, Paiva SAR, Zornoff LAM. Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *International Journal of Cardiology*, 2011; 151: 242-243.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Oliveira Junior SA, Campos DHS, Lima ARR, Damatto RL, Cezar MDM, Bonomo C, Guizoni DM, Padovani CR, Cicogna AC, Okoshi MP. Echocardiographic detection of congestive heart failure in postinfarction rats. *Journal of Applied Physiology*, 2011; 111: 543-551.

Freire CMM, Azevedo PS, Minicucci MF, Oliveira Junior SA, **Martinez PF**, Novo R, Chiuso-Minicucci F, Matsubara BB, Matsubara LS, Okoshi K, Novelli ELB, Zornoff LAM, Paiva SAR. Influence of different doses of retinoic acid on cardiac remodeling. *Nutrition*, 2011; 27: 824-828.

Minicucci MF, Azevedo PS, Oliveira Junior SA, **Martinez PF**, Chiuso-Minicucci F, Polegato BF, Justulin LA Jr, Matsubara LS, Matsubara BB, Paiva SA, Zornoff LA. Tissue vitamin a insufficiency results in adverse ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Cell Physiology and Biochemistry*, 2010; 26: 523-530.

Martinez PF, Okoshi K, Zornoff LAM, Carvahó RF, Oliveira Junior SA, Lima ARR, Campos DHS, Damatto RL, Padovani CR, Nogueira CR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Chronic heart failure-induced skeletal muscle atrophy, necrosis, and changes in myogenic regulatory factors. *Medical Science Monitor*, 2010; 16(12):BR374-BR383.

Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva, **Martinez PF**, Lima-Leopoldo AP, Campos DHS, Leopoldo AS, Okoshi MP, Okoshi K, Padovani CR, Cicogna AC. Diet-induced obesity causes metabolic, endocrine and cardiac alterations in spontaneously hypertensive rats. *Medical Science Monitor*, 2010; 16(12):BR367-BR373.

Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, **Martinez PF**, Campos DHS, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Nascimento AF, Okoshi MP, Okoshi K, Padovani CR, Cicogna AC. Differential nutritional, endocrine and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. Medical Science Monitor, 2010; 16(7):BR208-BR217.

Guizoni DM, Lima ARR, **Martinez PF**, Damatto RL, Cezar MDM, Bonomo C, Okoshi K, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas. Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica, 2010; 8(3):266-271.

Oliveira Junior SA, Okoshi K, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Campos DHS, **Martinez PF**, Okoshi MP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, Cicogna AC. Perfil nutricional e cardiovascular de ratos normotensos e hipertensos sob dieta hiperlipídica. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2009; 93:526-533.

Lima AR, **Martinez PF**, Okoshi K, Guizoni DM, Zornoff LA, Campos DH, Oliveira Junior SA, Bonomo C, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Myostatin and follistatin expression in skeletal muscles of rats with chronic heart failure. International Journal of Experimental Pathology, 2010; 91(1):54-62.

Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Carvalho RF, Nogueira RF, Nascimento AF, Martinez PF, Luvizotto RAM, Padovani CR, Cicogna AC. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca²⁺ handling. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2008; 41:615-620.

Martinez PF, Okoshi K, Carvalho RF, Campos DHS, Damatto RL, Lima ARR, Dal Pai-Silva M, Okoshi MP. Miopatia associada à insuficiência cardíaca crônica. Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica, 2007; 5:203-210.

Co-orientação concluída

Daniele Mendes Guizoni. Miostatina e redução da massa muscular em doenças crônicas. 2009. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Orientador principal: Profa. Dra. Marina Politi Okoshi

Participação em bancas

Martinez PF, Navega MT, Ambrozini ARP. Participação em banca de trabalho de conclusão de curso de Lízia Augusta Arantes Coutinho. Correlação da força muscular respiratória e das medidas antropométricas em pacientes com IMC acima de 25 kg/m², 2010. Curso de Fisioterapia, Faculdade de Filosofia e Ciências de Marília.

Participação em banca de comissões julgadoras - Comissão avaliadora das Sessões de Painéis do XX Congresso de Iniciação Científica - Unesp, São José dos Campos, 2008.