

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

**CURSO DE BIOMEDICINA**

**Giana Blume Corssac**

**REMODELAMENTO DO VENTRÍCULO DIREITO  
PÓS-INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO: EFEITO DOS  
HORMÔNIOS DA TIREOIDE SOBRE O ESTADO REDOX**

Porto Alegre

Maio/2014

Giana Blume Corssac

**REMODELAMENTO DO VENTRÍCULO DIREITO PÓS-INFARTO AGUDO  
DO MIOCÁRDIO: EFEITO DOS HORMÔNIOS DA TIREÓIDE SOBRE O ESTADO REDOX**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof. Dra. Adriane Belló-Klein

Co-orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araújo

**Porto Alegre**

**Maior/2014**

## Agradecimentos

Dedico especial agradecimento ao doutorando Alexandre Luz de Castro, que foi fundamental para a realização desse trabalho, tanto na parte experimental, como nas análises dos resultados e no auxílio à parte escrita, e dedicou muito tempo para me ajudar, mesmo com tantas outras coisas para fazer.

Aos meus orientadores Prof. Dra. Adriane Belló-Klein e Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araújo, pelo auxílio, disponibilidade de tempo e material, sempre solícitos e demonstrando apoio e confiança no meu trabalho, não apenas durante a realização do TCC, mas desde quando ingressei no laboratório, em julho de 2012.

À técnica do laboratório Tânia Regina Gatelli Fernandes, que sempre se disponibilizou a ajudar durante a realização dos experimentos. E aos colegas e amigos do laboratório de fisiologia cardiovascular, aqueles que participaram da realização desse projeto e os que de alguma forma me apoiaram durante esses anos de iniciação científica: Rafaela, Rafael Colombo, Rafael Fernandes, Jéssica, Cristina, Ângela, Amanda, Adriana, Rayane, Tatiane, Carla, Vanessa, Bruna e Carmem. Muito obrigada a todos do laboratório, que fizeram com que eu me sentisse querida e num ótimo ambiente de trabalho.

Aos meus pais, Vera e Paulo e meus irmãos Caio e Carol, pelo apoio, amor e carinho todos os dias. A vocês dedico todas as minhas realizações. E a toda a minha família, aos que já foram e aos que estão sempre torcendo por mim.

A todos os meus amigos, pelo apoio de sempre, especialmente àqueles que estão e estiveram presentes nos momentos importantes da minha vida desde o início do curso: Rafaela, Paula, Leonardo, Maria Eduarda, Luana, Andréia, Eduardo, Jéssica, Patrícia, Mauro, Caroline e Luísa.

Também agradeço a todos os professores e funcionários da UFRGS, que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse nesta etapa da vida acadêmica.

Por mim, agradeço o auxílio financeiro das entidades CNPq, Capes e Fapergs.

## Índice

Resumo.....	5
1. Introdução compreensiva.....	6
1.1. Infarto Agudo do Miocárdio.....	6
1.2. Estresse oxidativo.....	7
1.3. Defesas antioxidantes.....	10
1.4. Balanço redox e remodelamento cardíaco pós-infarto.....	11
1.5. Hormônios da tireoide.....	11
1.6. Hormônios da tireoide e remodelamento cardíaco pós-infarto.....	12
1.7. Tratamento hormonal e remodelamento do ventrículo direito pós-infarto..	15
2. Artigo.....	17
2.1. Resumo.....	17
2.2. Introdução.....	18
2.3. Materiais e métodos.....	19
2.4. Resultados.....	25
2.5. Discussão.....	27
2.6. Referências do artigo.....	28
2.7. Legendas das figuras.....	31
2.8. Tabela 1.....	32
2.9. Figura 1.....	33
2.10. Figura 2.....	34
2.11. Figura 3.....	35
3. Conclusões e perspectivas.....	36
4. Referências gerais.....	37
5. Anexo.....	43
5.1. Regras da revista.....	44

## Resumo

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma patologia onde há desequilíbrio do estado redox e aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais estão envolvidas com a progressão do infarto à insuficiência cardíaca. Estudos mostram que há um papel cardioprotetor dos hormônios da tireoide (TH) no remodelamento cardíaco pós-infarto, no ventrículo esquerdo (VE). Entretanto, o comprometimento do ventrículo direito (VD) parece ser importante para o desfecho dessa patologia. Além disso, não existem estudos avaliando o efeito dos hormônios tireoidianos nessa câmara, no modelo de infarto do miocárdio. Em vista disso, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos desses hormônios na modulação do balanço redox, no VD. Ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: controle (SHAM), infarto (IAM), controle + TH (SHAMT) e infartado + TH (IAMT). Durante 26 dias, os animais receberam T3 (2 µg/100 g /dia) e T4 (8 µg/100 g/dia) por meio de gavagem. Parâmetros ecocardiográficos foram avaliados e o VD foi coletado para análise bioquímica e molecular. O grupo IAMT apresentou aumento do índice de hipertrofia, porém apresentou uma redução na congestão pulmonar, em relação ao grupo IAM. Os grupos IAMT e SHAMT apresentaram aumento da frequência cardíaca. O tratamento hormonal diminuiu os níveis de ERO e peróxido de hidrogênio, e aumentou a atividade e expressão da SOD, porém aumentou a lipoperoxidação e diminuiu a atividade e expressão da GPx nos animais infartados. Esses resultados mostram que o tratamento hormonal parece estar causando alterações no VD diferentes das que já foram evidenciadas no VE. Acredita-se que, aos 28 dias pós-infarto, os animais não apresentaram ainda um maior comprometimento da câmara direita e, assim, é como se os hormônios fossem administrados em um tecido sadio. Dessa forma, o tratamento hormonal poderia apresentar efeitos diferentes em um estágio de insuficiência cardíaca em que houvesse comprometimento do VD. Pode-se concluir, portanto, que apesar desse tratamento ter se mostrado benéfico no VE, no VD ele causa alterações em parâmetros morfológicos e de estresse oxidativo; e mais estudos são necessários para averiguar as consequências dessas alterações nessa câmara cardíaca.

## 1. Introdução compreensiva

### 1.1. Infarto Agudo do Miocárdio

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma cardiopatia isquêmica que ocorre por uma deficiência perfusional do tecido cardíaco, levando à necrose da parede miocárdica. Entre as principais complicações dessa patologia estão as arritmias, o tromboembolismo, a disfunção dos músculos papilares e a insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (Libby *et al.*, 2007). Segundo dados do DATASUS (Departamento de Informática do SUS), cerca de 300 a 400 mil casos de infarto agudo do miocárdio ocorrem anualmente no Brasil. Destes, cerca de 66 mil levam a vítima ao óbito, sendo a doença considerada a principal causa isolada de morte no país.

Em resposta à lesão isquêmica da parede miocárdica, ocorre a substituição do miocárdio lesado por tecido cicatricial, fazendo com que as células musculares cardíacas saudáveis sejam expostas a uma maior carga de trabalho. Em função disso, os cardiomiócitos podem apresentar uma resposta adaptativa de hipertrofia (Libby *et al.* 2007). Essa resposta hipertrófica dos cardiomiócitos após o infarto agudo do miocárdio visa à manutenção do débito cardíaco e, inicialmente, pode ser considerada como um processo benéfico, uma vez que permite ao coração se adaptar ao aumento do estresse de parede ocasionado pela sobrecarga mecânica (Francis *et al.*, 2001).

No entanto, um longo período de hipertrofia pós-infarto predispõe à disfunção ventricular e a um remodelamento mal adaptativo do coração, que pode progredir para a insuficiência cardíaca (Pfeffer *et al.*, 1985). Nessa situação, os cardiomiócitos podem sofrer apoptose, levando à dilatação ventricular (Baines *et al.* 2005). Essa patologia acomete principalmente o VE do coração, que acaba sofrendo modificações na sua geometria, tornando-se mais esférico. Isto resulta em importantes alterações para o músculo cardíaco, como o aumento do estresse de parede e da necessidade energética (Dorn, 2007).

Em um estudo em ratos infartados através da técnica de ligadura da artéria coronária descendente anterior, os animais apresentaram uma redução na função contrátil do VE, evidenciada através das medidas da fração de ejeção do VE (FEVE) e da fração de encurtamento do VE (FencVE), avaliadas através de análise ecocardiográfica. Esses animais também apresentaram um aumento no diâmetro do VE no final da sístole (DVEFS) e no final da diástole (DVEFD). Analisando variáveis hemodinâmicas nos ratos submetidos ao infarto, esse estudo demonstrou, também, um aumento na pressão diastólica final do VE (PDFVE) e uma redução na pressão sistólica do VE (PSVE). Estes achados são sinais típicos de uma hipertrofia cardíaca mal adaptativa, a qual está associada à insuficiência cardíaca (Schenkel *et al.*, 2010).

Um trabalho avaliando a progressão temporal para insuficiência cardíaca pós-infarto em ratos demonstrou que, após dois dias de infarto, os animais apresentaram uma diminuição na FEVE, sem modificações na FencVE. No entanto, em sete e em vinte e oito dias pós-infarto, ocorreu uma diminuição tanto na FEVE como na FencVE, demonstrando uma deterioração importante da função do VE (Schenkel *et al.*, 2012). Outros estudos em ratos corroboram esses achados, demonstrando que, após vinte e um dias de infarto, os animais apresentaram alterações características de insuficiência cardíaca, tais como o aumento na PDFVE e congestão hepática e pulmonar, associadas com dispneia e ascite (Rabald *et al.*, 2007; Hagen *et al.*, 2009; Schenkel *et al.*, 2010).

Avaliando parâmetros ecocardiográficos em ratos infartados que desenvolveram ou não ICC, Pantos e colaboradores (2010) demonstraram uma redução na fração de ejeção nos animais com ICC em relação aos que não desenvolveram essa complicação. Nos animais com insuficiência cardíaca, o índice de tensão de parede do VE se mostrou elevado quando comparado ao apresentado pelo grupo controle e pelo grupo de animais infartados sem ICC. Esses dados demonstram a contribuição da ICC para a piora da função cardíaca no período pós-infarto (Pantos *et al.*, 2010).

Nesse contexto, o desequilíbrio do estado redox é um fator importante, visto que as espécies reativas de oxigênio (ERO) podem causar prejuízo na função contrátil do coração e podem influenciar os processos de sinalização intracelular,

que podem desencadear hipertrofia cardíaca, apoptose e necrose (Maccarthy e Shah, 2003). Estudos demonstram que, em um estágio compensado da hipertrofia cardíaca, a reserva antioxidante tecidual é aumentada, enquanto que, em um estágio descompensado/insuficiente do músculo cardíaco, essa reserva encontra-se reduzida. Essa redução compromete o balanço redox, e conseqüentemente, favorece o estresse oxidativo (Singal *et al.*, 1999).

### 1.2. Estresse oxidativo

O papel desenvolvido pelas ERO pode se dar tanto através da ativação de vias de sinalização, como a via das proteínas quinase mitógeno-ativadas (MAPKs), como através da regulação da expressão de vários genes e fatores de transcrição envolvidos no remodelamento vascular e cardíaco (Giordano, 2005). Grande parte dessas espécies são radicais livres, ou seja, são espécies químicas capazes de existir de forma independente, que contêm um ou mais elétrons desemparelhados (Halliwell e Gutteridge, 2006). Essas espécies são continuamente produzidas no organismo durante o metabolismo celular e desempenham funções fisiológicas importantes quando em concentrações baixas ou moderadas.

As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro (Halliwell e Gutteridge, 2006). Outra importante fonte são as reações intracelulares envolvendo os metais ferro e cobre. A molécula de  $O_2$  é considerada um radical livre, pois a mesma possui dois elétrons desemparelhados, os quais possuem spins paralelos, o que restringe sua reatividade. No entanto, o oxigênio pode ser considerado um agente oxidante (Halliwell e Gutteridge, 2006), pois a partir dele são geradas as espécies reativas de oxigênio. Uma forma mais reativa de oxigênio chamada de oxigênio singlet pode ser gerada a partir do  $O_2$ . Esta espécie apresenta os elétrons em spins antiparalelos, o que aumenta o seu potencial oxidante (Foote *et al.*, 1985).

O metabolismo mitocondrial é uma das principais fontes de ERO nas células. O processo de redução do oxigênio à água ocorre em grande escala na mitocôndria, e é realizado com a participação da enzima citocromo oxidase. Essa enzima remove

um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas do citocromo C, oxidando-as e adicionando quatro elétrons ao  $O_2$  (Babcock, 1999). O oxigênio, no entanto, pode sofrer uma redução univalente, recebendo apenas um elétron. Nesse processo, pode ocorrer a formação de outra ERO, o radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). A adição de outro elétron a esse ânion leva, por sua vez, à formação do íon peróxido ( $O_2^{-2}$ ), gerando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esta reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio, na presença de metais de transição, tais como os íons  $Fe^{+2}$ , pode sofrer uma reação não enzimática chamada reação de Fenton, que gera uma das mais potentes espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) (Fridovich, 1995). Esse radical, além de ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, é capaz de alterar a estrutura e a função biológica de proteínas e causar mutações no DNA.

Além das espécies oriundas do oxigênio, existem também as espécies reativas de nitrogênio (ERN), oriundas do metabolismo do óxido nítrico (NO). Esse radical é originado da conversão do aminoácido arginina em citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (Beckman e Koppenol, 1996). Ao combinar-se com o ânion superóxido, o NO é convertido a peróxido nitrito ( $ONOO^-$ ), um potente agente oxidante que pode gerar outras formas de ERN, tais como  $HONO_2$ ,  $NO_2$  e  $NO_2^-$  (Beckman e Koppenol, 1996).

As ERO e ERN são capazes de desfazer ligações entre átomos de carbono e hidrogênio (C-H) presentes em ácidos graxos poli-insaturados. Ao reagirem com essas moléculas, deixam-nas com elétrons desemparelhados, gerando o radical peróxil ( $R-COO^{\bullet}$ ). Esse radical, bem como o radical hidroxil, é reativo o suficiente para oxidar outros lipídios insaturados adjacentes, presentes nas membranas celulares, gerando uma reação em cadeia que causa peroxidação lipídica (Fam e Morrow, 2003).

As consequências da peroxidação lipídica são a redução da fluidez da membrana celular, o aumento da sua permeabilidade e os danos a proteínas, receptores e canais iônicos (Halliwell e Gutteridge, 1984). A continuação do processo de oxidação das cadeias de ácidos graxos presentes nos fosfolipídios de membrana pode levar à perda da integridade da membrana celular, assim como da membrana de organelas, como os lisossomos e a mitocôndria (Fam e Morrow,

2003). O dano lipídico na membrana mitocondrial acaba por levar a alterações nos grupos tióis presentes em proteínas na membrana interna da mitocôndria. Este processo promove a formação de poros nessa membrana, os quais estão associados à liberação de fatores pró-apoptóticos, tais como o citocromo C e o fator de indução a apoptose (AIF), presentes nessa organela. Além disso, o aumento de permeabilidade na membrana celular pode levar ao aumento da entrada de íons  $\text{Ca}^{+2}$ , os quais podem ativar diversas enzimas e vias de sinalização, culminando com a morte celular (Zoratti e Szabo, 1995; Skulachev *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2003).

Nesse contexto, o estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento significativo da concentração intracelular de espécies oxidantes, como as ERO e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), acompanhado simultaneamente pela perda das defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 2007). O mesmo, portanto, pode ser definido como um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, onde os fatores pró-oxidantes estão aumentados, levando a um potencial dano à célula (Sies, 1991). Diferentes estudos mostram que essas alterações no estado redox contribuem para muitos processos patológicos, como doenças cardiovasculares (Araújo *et al.*, 2006; Stocker e Keaney, 2004), doenças pulmonares (Cantin, 2004), doenças neurodegenerativas (Vina *et al.*, 2004), diabetes (Bonfont-Rousselot, 2004), e câncer (Van Remmen *et al.*, 2003).

### 1.3. Defesas antioxidantes

Por causa dos danos oriundos do processo oxidativo, a vida aeróbica desenvolveu um conjunto complexo de sistemas antioxidantes para controlar as reações de oxirredução celular e reparar ou substituir as moléculas danificadas. As defesas antioxidantes existentes são constituídas de elementos enzimáticos e não enzimáticos (Dean e Jones, 2006; Hogg e Kalyanamaran, 1999). O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de

prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não radicais.

A enzima SOD é considerada a primeira linha de defesa contra o dano oxidativo. Em animais, há duas isoformas dessa enzima: uma isoforma que contém sítios de ligação ao manganês (MnSOD), presente na matriz mitocondrial, e outra que contém sítios de ligação ao cobre e ao zinco (CuZnSOD), presente no citosol. Essa enzima é responsável por proteger as células do dano causado pelo radical superóxido, através da conversão do radical superóxido em  $H_2O_2$  (Fridovich, 1995).

O peróxido de hidrogênio, por sua vez, é metabolizado pelas enzimas CAT e GPx. A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do  $H_2O_2$  em água e oxigênio, com atividade dependente de NADPH (Scott *et al.*, 1991). Esse processo é importante, pois previne a formação do radical hidroxil, através das reações de Fenton ou de Haber-Weiss (Halliwell e Gutteridge, 2006). Já a GPx catalisa a redução de  $H_2O_2$  e de peróxidos orgânicos em seus correspondentes álcoois (Shan *et al.*, 1990). Sua ação depende da manutenção do ciclo redox da glutatona, pelo controle da conversão de glutatona reduzida (GSH) à glutatona oxidada (GSSG) (Barbosa *et al.*, 2010).

Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas, o tripeptídeo glutatona é um dos principais mecanismos de remoção do  $H_2O_2$  e de outras espécies reativas de oxigênio. Composta por aminoácidos que contêm grupos tióis (glutamato, cisteína e glicina), a forma reduzida da glutatona (GSH) sofre a ação da GPx, sendo convertida em glutatona oxidada (GSSG). Nessa reação ocorre a redução do  $H_2O_2$  em água e oxigênio, protegendo a célula do dano oxidativo gerado por essa espécie reativa de oxigênio (Brigelius-Flohe, 1999). Posteriormente a isso, através da enzima glutatona redutase (GR), ocorre a transferência de elétrons do NADPH para a GSSG, recuperando a GSH (Mannervik e Gluthemberg, 1981; Halliwell e Gutteridge, 2006). Além da glutatona, outras defesas antioxidantes não enzimáticas são a vitamina C e a vitamina E (Smirnoff, 2001; Halliwell e Gutteridge, 2006).

#### 1.4. Balanço redox e remodelamento cardíaco pós-infarto

Além do dano oxidativo ocasionado pelas ERO no miocárdio pós-infarto, muitos trabalhos têm demonstrado o papel desses radicais como moduladores de vias de sinalização celular sensíveis ao estado redox (Niethammer *et al.*, 2009; Stone e Yang, 2006). Através da oxidação de resíduos de cisteína, essas espécies podem inativar enzimas fosfatases, impedindo a desfosforilação de determinadas proteínas sinalizadoras; portanto, deixando-as mais tempo num estado ativo ou inativo. Dentre as ERO envolvidas na sinalização redox, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi identificado como um importante mensageiro celular (Niethammer *et al.*, 2009; Stone e Yang, 2006). Nesse sentido, estudos atuais mostram o envolvimento do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas vias de sinalização relacionadas com a hipertrofia cardíaca (Araújo *et al.*, 2008; Schenkel *et al.*, 2010). Num estudo com ratos infartados, Schenkel e colaboradores (2010) observaram uma redução na razão GSH/GSSG, assim como um aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio dos ratos que sofreram infarto agudo do miocárdio, em relação aos controles (Schenkel *et al.*, 2010).

Por todos esses motivos, a busca de formas de tratamento e controle da progressão do infarto agudo do miocárdio para insuficiência cardíaca é uma realidade. Assim, muitos trabalhos já relacionaram as ações protetoras dos hormônios da tireoide com as modificações encontradas nos parâmetros morfométricos e ecocardiográficos, e no balanço redox, no VE.

### 1.5. Hormônios da tireoide

A tireoide é uma das maiores glândulas endócrinas e é responsável pela síntese de três hormônios: T4 (tiroxina ou tetraiodotironina), T3 (triiodotironina) e a calcitonina. O T4 representa o principal hormônio liberado por essa glândula, apesar de possuir uma potência biológica inferior ao T3 (Ganong, 2000). Por esse motivo, parte do T4 liberado é transformada periféricamente em T3 através das enzimas deiodinases, presentes nas células-alvo desses hormônios. Para a síntese dos hormônios da tireoide é necessário que essa glândula receba um aporte de nutrientes, como iodo e selênio (Kohrle, 2000).

Os hormônios da tireoide, por sua natureza lipofílica, são capazes de atravessar a membrana plasmática e interagir com receptores nucleares. A ligação do T3 a esses receptores leva ao recrutamento de proteínas co-ativadoras da transcrição gênica, levando ao aumento na expressão de inúmeros genes (Yen *et al.*, 2006). Os genes responsivos a esses hormônios possuem sequências de nucleotídeos em sua região promotora, denominadas elementos de resposta aos hormônios da tireoide (TRE) (Basset *et al.*, 2003).

Os receptores nucleares dos hormônios da tireoide (TRs) são codificados por dois genes, TR $\alpha$  e TR $\beta$ . Esses genes levam à síntese de diferentes isoformas do receptor nuclear ( $\alpha$ 1,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3) que variam conforme o tecido em que estão sendo expressas (Basset *et al.*, 2003). Além de sua ação através de receptores nucleares, foi descrito, para os hormônios da tireoide, um mecanismo de ação não clássico, baseado na ligação dos mesmos a receptores localizados na membrana plasmática (receptor de integrinas do tipo  $\alpha$ v $\beta$ 3). Essa ligação desencadeia ações rápidas, tais como a ativação da enzima ERK1/2 e a modulação de transportadores de íons, como o trocador Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> (Cody *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2008). Nesse sentido, trabalhos demonstraram o papel dos hormônios da tireoide na ativação das vias de sinalização das enzimas fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e da cinase ativada por mitógeno (MAPK) (Furuya *et al.*, 2009). Entre as principais ações hormonais da tiroxina estão os processos de regulação da taxa metabólica basal e do metabolismo geral, a termogênese, a manutenção da homeostase energética e da atividade mitocondrial, assim como o crescimento celular (Brix *et al.*, 2011). Além desses efeitos, T3 e T4 possuem importantes ações no sistema cardiovascular (Klein e Ojamaa, 2001; Hu *et al.*, 2003; Araújo *et al.*, 2008) e no sistema nervoso central (Bauer *et al.*, 2008).

### 1.6. Hormônios da tireoide e remodelamento cardíaco pós-infarto

Os hormônios da tireoide possuem importantes ações no tecido cardíaco, podendo ocasionar modificações hemodinâmicas, tais como a redução da resistência vascular sistêmica e aumento da contratilidade cardíaca e do débito

cardíaco (Klein e Ojamaa, 2001). Muitos dos efeitos destes hormônios sobre os cardiomiócitos ocorrem não somente pela modulação na expressão gênica, via clássica, mas também pela ação mediada por receptores de membrana, via não clássica (Klein e Ojamaa, 2001; Araújo *et al.*, 2007). Estudos avaliando a expressão gênica em células musculares cardíacas demonstraram a influência do T4 na expressão de proteínas importantes para o processo contrátil, tais como a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA), a proteína fosfolambam (inibe a atividade da SERCA, dificultando a recaptação do cálcio), os receptores de rianodina (canais de cálcio ligantes-dependentes do retículo sarcoplasmático, mediadores da liberação de cálcio induzida por cálcio) e a cadeia pesada da miosina (MHC) (Rohrer *et al.*, 1991; Kahaly e Dillmann, 2005). Esses hormônios são igualmente importantes no processo de maturação do miocárdio durante a fase de desenvolvimento (Pantos *et al.*, 2008a).

Durante o período de remodelamento cardíaco pós-infarto, foram identificadas modificações nas concentrações dos hormônios da tireoide (Ojamaa *et al.*, 2000). Adicionalmente, Pantos e colaboradores (2010) demonstraram alterações na expressão dos receptores TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 no período pós-infarto. Avaliando a expressão proteica no miocárdio de ratos infartados, este trabalho demonstrou um aumento no conteúdo de TR $\alpha$ 1 e uma redução no de TR $\beta$ 1, em animais que não desenvolveram ICC. Nos animais infartados com ICC, ambos os receptores apresentaram uma menor expressão no tecido cardíaco, caracterizando um estado de “hipotireoidismo” tecidual. Estes resultados demonstram que a redução na expressão de TR $\alpha$ 1 pode estar implicada com a progressão da fase hipertrófica compensatória pós-isquemia para a insuficiência cardíaca (Pantos *et al.*, 2010).

Na fase de hipertrofia compensatória pós-infarto, a expressão aumentada de TR $\alpha$ 1, sem o aumento concomitante dos hormônios da tireoide, leva este receptor à atividade independente de ligante (apo-receptor) (Pantos *et al.*, 2008b). Em função disso, o receptor TR $\alpha$ 1 induz o crescimento celular e a repressão de genes regulados positivamente por T3, tais como a proteína  $\alpha$ -MHC (Kinugawa *et al.*, 2005). Na ausência dos hormônios da tireoide, o TR $\alpha$ 1 também leva ao aumento da expressão da proteína fosfolambam e à redução da contração cardíaca (Tavi *et al.*, 2005). Já

numa situação de insuficiência cardíaca, a redução da expressão de TR $\alpha$ 1 leva à atrofia cardíaca com dilatação de câmara, além de um prejuízo do fluxo sanguíneo para o miocárdio e a perda de função sistólica (Khalife *et al.*, 2005). A utilização dos hormônios da tireoide no período pós-infarto visa, portanto, prevenir a instalação do “hipotireoidismo” tecidual e, assim, atenuar as alterações deletérias no coração (Pantos *et al.*, 2008a; Pantos *et al.*, 2010).

Em função disso, Pantos e colaboradores (2008) demonstraram que a administração dos hormônios da tireoide pode levar à mudança do padrão de hipertrofia cardíaca, alterando de uma forma patológica para uma forma fisiológica (Pantos *et al.*, 2008a). Este mesmo estudo mostrou que a administração destes hormônios pode melhorar a função contrátil, através de alterações na expressão das proteínas contráteis do miocárdio, assim como da proteína de choque térmico 70 (HSP70) (Pantos *et al.*, 2008a). A HSP70 é uma proteína regulada pelo estado redox, sendo capaz de aumentar a tolerância do miocárdio ao processo isquêmico, assim como preservar a sua contratilidade (Pantos *et al.*, 2003). Em ratos submetidos ao infarto agudo do miocárdio, observou-se uma redução na expressão dessa proteína. Já nos animais infartados e tratados com T3 e T4 não se observou essa redução (Pantos *et al.*, 2008a).

Estudos avaliando as alterações na geometria do VE no período pós-isquemia mostraram que os hormônios da tireoide são capazes de prevenir muitas das modificações patológicas desta câmara cardíaca. Os mesmos são capazes de normalizar o estresse de parede através do aumento da massa cardíaca (Pantos *et al.*, 2007; Pantos *et al.*, 2008a). Em um trabalho com ratos infartados, análises ecocardiográficas revelaram um aumento na espessura da parede posterior do VE dos animais tratados com T3 e T4, duas semanas após a isquemia. Já nos animais que apenas sofreram o infarto, somente após 13 semanas pós-isquemia se constatou esse aumento. Nos ratos infartados e não tratados com T3 e T4, observou-se um aumento no índice de tensão de parede após duas semanas de isquemia. Nos ratos tratados, esse índice aumentou somente 13 semanas após o infarto (Pantos *et al.*, 2008a). Além disso, em estágios mais avançados do remodelamento cardíaco, esses hormônios induzem mudanças favoráveis na

geometria cardíaca, impedindo que a câmara do VE assumira uma forma esférica. (Pantos *et al.*, 2008a).

Trabalhos analisando o efeito dos hormônios da tireoide sobre a deposição de colágeno no tecido cardíaco demonstraram que os mesmos reduzem a síntese das fibras de colágeno tipo 1 e previnem a fibrose cardíaca durante o processo de hipertrofia (Yao *et al.*, 1992). Além dos efeitos sobre o colágeno, os hormônios da tireoide apresentam um efeito pró-angiogênico no miocárdio infartado, tanto através de receptores nucleares (TR $\beta$ ), como através de receptores de membrana (Luidens *et al.*, 2010). A administração de doses fisiológicas de T3, durante a hipertrofia cardíaca, foi capaz de restaurar a expressão do TR $\beta$  e do receptor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR2), assim como aumentar a densidade capilar e o fluxo sanguíneo coronariano (Makino *et al.*, 2008).

Estudos em humanos demonstraram o benefício da administração de T4 e de T3 sobre a fração de ejeção, o débito cardíaco, a resistência vascular periférica e as dimensões do VE durante a diástole, em pacientes com cardiomiopatia dilatada isquêmica e não isquêmica (Moruzzi *et al.*, 1994; Moruzzi *et al.*, 1996; Pingitore *et al.*, 2008; Pantos *et al.*, 2010).

Muitos trabalhos demonstraram os efeitos positivos dos hormônios da tireoide sobre o remodelamento cardíaco pós-infarto, em modelos animais (Pantos *et al.*, 2007; Pantos *et al.*, 2008a; Makino *et al.*, 2008). Um trabalho recente relacionou as ações protetoras de T3 e T4 com as modificações encontradas no balanço redox. Esse trabalho avaliou, além dos níveis de espécies reativas de oxigênio, radicais livres e defesas antioxidantes, proteínas e fatores da sinalização celular, no processo de hipertrofia e de progressão do infarto para a insuficiência cardíaca (de Castro *et al.*, 2014). Esse trabalho sugeriu um efeito cardioprotetor dos hormônios da tireoide no VE, onde o tratamento hormonal com T3 e T4 promoveu uma melhora da função cardíaca e do balanço redox, reduzindo os níveis de espécies reativas de oxigênio e prevenindo a peroxidação lipídica, no período pós-infarto do miocárdio.

### *1.7. Tratamento hormonal e remodelamento do ventrículo direito pós-infarto*

O VD tem massa muscular que representa 1/6 da massa muscular do VE, porém tem débito cardíaco similar ao VE. A maior parte do fluxo sanguíneo para o VD é oriundo da artéria coronária direita. Uma parte do fluxo sanguíneo, mais precisamente a irrigação da parede anterior do VD, é feita pela artéria coronária esquerda (Thomaz *et al.*, 2010).

No infarto, apesar do VE ser o mais frequentemente acometido, o comprometimento do VD pode causar repercussões hemodinâmicas, como a disfunção sistólica da câmara direita. Essa câmara é muito sensível a alterações de pré-carga e pós-carga e, numa situação de diminuição da função sistólica, há um aumento da contratilidade atrial como forma de compensar essa disfunção, o que possibilita uma melhora parcial da função sistólica direita e do débito cardíaco (Inohara *et al.*, 2013). O infarto agudo do miocárdio envolvendo somente o VD é raro. Mais frequentemente, o infarto no VD está associado com o infarto no VE, e a ocorrência no VD é, em grande parte dos casos, clinicamente silenciosa. Entretanto, a presença de infarto no VD tem importantes implicações para o manejo e prognóstico da doença, pois o acometimento do VD afeta negativamente o prognóstico precoce de pacientes com infarto agudo do miocárdio e, conseqüentemente, a sobrevida desses pacientes (Thomaz *et al.*, 2010). Um estudo mostrou que pacientes com infarto agudo do miocárdio do VE, com envolvimento do VD, têm mais chances de desenvolver graves complicações da doença, como choque cardiogênico, taquicardia ventricular e bloqueio átrio-ventricular, e de falecer devido à doença, quando comparados com aqueles que não têm envolvimento do VD no processo isquêmico (Mehta *et al.*, 2001).

Levando isso em consideração, apesar do tratamento com hormônios tireoidianos ter se mostrado benéfico no VE, é importante verificar se o mesmo ocorre no VD, já que ele tem papel importante nas complicações dessa patologia. Por isso, a análise de parâmetros de hipertrofia e do balanço entre espécies oxidantes e defesas antioxidantes no VD é importante para considerar fatores como toxicidade, segurança e quaisquer outros efeitos da administração dos hormônios da tireoide sobre o remodelamento cardíaco, durante a transição do infarto agudo do miocárdio para a insuficiência cardíaca.

## 2. Artigo

# Remodelamento do ventrículo direito pós-infarto agudo do miocárdio: efeito dos hormônios da tireoide sobre o estado redox

GB Corssac<sup>1</sup>, AL de Castro<sup>1</sup>, AV Tavares<sup>1</sup>, RO Fernandes<sup>1</sup>, R Siqueira<sup>1</sup>, A Conzatti<sup>1</sup>, TRG Fernandes<sup>1</sup>, AS Araújo<sup>1</sup> e A Belló-Klein<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

### Resumo

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma patologia onde há desequilíbrio do estado redox e aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais estão envolvidas com a progressão do infarto à insuficiência cardíaca. Estudos mostram um papel cardioprotetor dos hormônios da tireoide (TH) no remodelamento cardíaco pós-infarto, no ventrículo esquerdo (VE). Entretanto, o comprometimento do ventrículo direito (VD) parece ser importante no estudo dessa patologia. Em vista disso, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos desses hormônios na modulação do balanço redox, no VD. Ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: controle (SHAM), infarto (IAM), controle + TH (SHAMT) e infartado + TH (IAMT). Durante 26 dias, os animais receberam T3 (2 µg/100 g /dia) e T4 (8 µg/100 g/dia) por meio de gavagem. Parâmetros ecocardiográficos foram avaliados e o VD foi coletado para análise bioquímica e molecular. O grupo IAMT apresentou aumento do índice de hipertrofia, em relação ao grupo IAM. O tratamento hormonal diminuiu os níveis de ERO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e aumentou a atividade e expressão da SOD, porém aumentou a lipoperoxidação e diminuiu a atividade e expressão da GPx nos animais infartados. O tratamento hormonal parece estar causando alterações no VD diferentes das que já foram evidenciadas no VE. Acredita-se que o tratamento hormonal poderia apresentar efeitos diferentes em um estágio de insuficiência cardíaca em que houvesse comprometimento do VD. Assim, apesar desse tratamento ter se mostrado benéfico no VE, no VD ele causa alterações em parâmetros morfológicos e de estresse oxidativo; e mais estudos são necessários para averiguar as consequências dessas alterações nessa câmara cardíaca.

Palavras-chave: T3; T4; Estresse oxidativo; Equilíbrio redox; Ventrículo direito;

Correspondente: Adriane Belló-Klein. Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite 500, sala 01. CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel: +55 (51) 3308 3621. Email: [belklein@ufrgs.br](mailto:belklein@ufrgs.br).

## 1. Introdução

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma cardiopatia isquêmica que ocorre por uma deficiência perfusional do tecido cardíaco, levando à necrose da parede miocárdica. Entre as principais complicações dessa patologia estão a disfunção contrátil do VE, as arritmias, o tromboembolismo, a disfunção dos músculos papilares e a insuficiência cardíaca congestiva. Segundo dados do DATASUS (Departamento de Informática do SUS), cerca de 300 a 400 mil casos de infarto agudo do miocárdio ocorrem anualmente no Brasil. Destes, cerca de 66 mil levam a vítima ao óbito, sendo a doença considerada a principal causa isolada de morte no país.

Em resposta à lesão isquêmica da parede miocárdica, ocorre a substituição do miocárdio lesado por tecido cicatricial, fazendo com que as células musculares cardíacas saudáveis sejam expostas a uma maior carga de trabalho. Em função disso, os cardiomiócitos podem apresentar uma resposta adaptativa de hipertrofia (Libby *et al.*, 2007). Essa resposta hipertrófica dos cardiomiócitos pode ser considerada benéfica no início, pois visa à manutenção do débito cardíaco e permite a adaptação do coração ao estresse ocasionado pela sobrecarga volumétrica (Francis *et al.*, 2001). Entretanto, após certo período, a hipertrofia pós-infarto predispõe à disfunção ventricular, podendo progredir para uma insuficiência cardíaca (Pfeffer *et al.*, 1985). Essa patologia acomete principalmente o VE, que acaba sofrendo modificações na sua geometria, tornando-se mais esférico.

O desequilíbrio do estado redox é um fator importante nesse processo, visto que as ERO ativam proteínas e regulam a expressão de genes e fatores de transcrição envolvidos no remodelamento cardiovascular. Essa regulação pode causar prejuízo na contratilidade do coração e nos processos de sinalização celular, que desencadeiam a hipertrofia cardíaca. Estudos demonstram que, em um estágio compensado da hipertrofia cardíaca, a reserva antioxidante tecidual é aumentada, enquanto que, em um estágio descompensado/insuficiente do músculo cardíaco, essa reserva encontra-se reduzida. Essa redução compromete o balanço redox, e consequentemente, favorece o estresse oxidativo (Singal *et al.*, 1999).

Ainda, um trabalho recente (de Castro et al., 2014) analisou o VE de ratos infartados e tratados com os hormônios T3 e T4. Nesse estudo, foi observado um efeito cardioprotetor dos hormônios sobre parâmetros de estresse oxidativo e melhora da função cardíaca.

A partir disso, dados da literatura demonstram um papel positivo dos hormônios da tireoide no remodelamento cardíaco pós-infarto agudo do miocárdio (Pantos *et al.* 2008a; Pantos *et al.* 2010). O tratamento de animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio com tais hormônios parece levar a uma melhora dos parâmetros morfológicos e funcionais do coração, assim como parece modificar a expressão proteica tecidual dos mesmos. Esses efeitos contribuem para a melhora da função cardíaca pós-infarto (Pantos *et al.*, 2007; Pantos *et al.*, 2008a; Makino *et al.*, 2009).

Estudos avaliando as alterações na geometria do VE no período pós-isquemia mostraram que os hormônios da tireoide são capazes de prevenir muitas das modificações patológicas desta câmara cardíaca. Os mesmos são capazes de normalizar o estresse de parede através do aumento da massa cardíaca (Pantos *et al.*, 2007; Pantos *et al.*, 2008a). Em um trabalho com ratos infartados, análises ecocardiográficas revelaram um aumento na espessura da parede posterior do VE dos animais tratados com T3 e T4, duas semanas após a isquemia. Já nos animais que apenas sofreram o infarto, somente após 13 semanas pós-isquemia se constatou esse aumento. Nos ratos infartados e não tratados com T3 e T4, observou-se um aumento no índice de tensão de parede após duas semanas de isquemia. Nos ratos tratados, esse índice aumentou somente 13 semanas após o infarto (Pantos *et al.*, 2008a). Além disso, em estágios mais avançados do remodelamento cardíaco, esses hormônios induzem mudanças favoráveis na geometria cardíaca (Pantos *et al.*, 2008a).

Apesar do infarto agudo do miocárdio atingir essencialmente o VE, alguns estudos têm mostrado que o comprometimento do VD concomitantemente, representa uma piora no prognóstico da doença (Mehta *et al.*, 2001).

Em vista disso, apesar do tratamento com hormônios tireoidianos ter se mostrado benéfico no VE, é importante verificar se o mesmo ocorre no VD, através da análise de parâmetros de hipertrofia e de estresse oxidativo. Nesse sentido, o

estudo desses parâmetros torna-se relevante para a consideração de fatores como toxicidade e segurança do tratamento hormonal. Levando isso em consideração, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da administração dos hormônios da tireoide sobre o remodelamento cardíaco durante a transição do infarto agudo do miocárdio para a insuficiência cardíaca, com enfoque no ventrículo direito.

## **2. Materiais e métodos**

### *2.1. Animais*

Todos os procedimentos com animais foram de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com processo número 23262. Foram utilizados ratos Wistar machos com 90 dias de idade e peso médio de  $347 \pm 48$  g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal (CREAL) da UFRGS. Durante do período de experimentação (28 dias), os animais foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, sendo mantidos em caixas plásticas (270 x 260 x 310 mm), com o assoalho coberto com serragem. Receberam alimentação e água a vontade e foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, em ambiente climatizado a 22°C.

### *2.2. Grupos experimentais*

Os animais foram separados em 4 grupos (n=6-8 animais/grupo):

- Grupo sham (SHAM) – foi submetido a todos os procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria coronária descendente anterior;
- Grupo infarto do miocárdio (IAM) – foi submetido ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior;

- Grupo sham + tratamento com os hormônios da tireoide (SHAMT) – foi submetido a todos os procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria coronária descendente anterior, juntamente ao tratamento com T3 e T4;
- Grupo infarto do miocárdio + tratamento com os hormônios da tireoide (IAMT) – foi submetido ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior juntamente ao tratamento com T3 e T4.

### 2.3. Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados (quetamina 90mg/kg e xilazina 20mg/kg, via intraperitoneal) e a cirurgia de infarto do miocárdio foi realizada segundo um método adaptado ao descrito por Johns e Olson em 1954 (Johns and Olson, 1954), no qual os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de ligadura do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda. Uma vez concluído o procedimento cirúrgico, os animais foram colocados isoladamente em suas gaiolas para a recuperação anestésica. Os animais do grupo SHAM e SHAMT foram submetidos à cirurgia fictícia que consistiu dos mesmos procedimentos cirúrgicos feitos nos animais dos grupos IAM e IAMT, com exceção da oclusão coronariana (Schenkel *et al.*, 2010).

### 2.4. Administração dos hormônios da tireoide

Após a cirurgia, os animais permaneceram em recuperação por 2 dias. Depois desse período, os animais dos grupos IAMT e SHAMT receberam diariamente, por gavagem, o tratamento hormonal com 2 µg/100 g/dia de T3 e 8 µg/100 g/dia de T4 em solução salina (Pantos *et al.*, 2007; Pantos *et al.*, 2008a). Os animais dos grupos IAM e SHAM, por sua vez, receberam diariamente apenas solução salina por gavagem. O período de tratamento foi de 26 dias, após o período de recuperação.

### 2.5. Dosagem sérica de T4 e T3

Os animais anestesiados foram submetidos à coleta de sangue através do plexo retro orbital. O sangue coletado com heparina foi centrifugado por 10 minutos a 1000 X g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), e o soro separado e congelado em freezer a - 80°C para a dosagem dos hormônios tireoidianos. O método utilizado para a dosagem de T3 e T4 foi o método de quimiluminescência, realizado no Laboratório Veterinário TECSA, utilizando o sistema automatizado ROCHE, modelo COBAS E-411. Os resultados de T4 foram expressos em µg/dL e os de T3 em ng/dL.

### 2.6. Análises ecocardiográficas

Após 28 dias da cirurgia, foi realizada a análise ecocardiográfica dos animais. Os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (90mg/kg e 20mg/kg, respectivamente, via intraperitoneal) e posicionados em decúbito lateral para a obtenção das imagens. Foi utilizado o sistema de ultrassom Philips HD XE com um transdutor de 12-13 MHz, numa profundidade de 3 cm. Para a medida da área de infarto (AI) foi utilizado o perímetro correspondente ao segmento infartado (região acinética ou hipocinética (RAH)) e o perímetro endocárdico total (PET). Esses perímetros foram analisados durante a diástole em cada um dos planos ecocardiográficos transversos utilizados: basal, medial e apical. A área de infarto foi calculada através da seguinte equação:  $AI = (RAH/PET \times 100)$  (Nozawa *et al.* 2006). A frequência cardíaca (batimentos/min) foi medida usando o Modo-M nos três planos citados anteriormente (basal, medial e apical) (Nozawa *et al.*, 2006). O tempo de aceleração do fluxo na artéria pulmonar e o tempo de ejeção do fluxo na artéria pulmonar foram medidos por ecocardiografia Doppler. (Nozawa *et al.*, 2006).

### 2.7. Análises morfométricas

Após 26 dias de tratamento, os animais foram pesados para análise do peso corporal. Após isso, os animais foram anestesiados e mortos por deslocamento

cervical. O coração, os pulmões e o fígado foram rapidamente retirados e pesados. O VD foi separado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido, para a realização das análises bioquímicas e moleculares. Foi calculado o índice de hipertrofia do VD, utilizando a razão entre o peso dessa câmara (em mg) e o peso corporal do animal (em g), bem como a razão entre o peso do VD (em mg) e o comprimento da tíbia (em cm). A congestão pulmonar e a congestão hepática foram avaliadas pela razão entre o peso seco e o peso úmido (g/g) dos órgãos (Fernandes *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2010).

### 2.8. Preparação do tecido

O VD foi homogeneizado (1,15% peso/volume em KCl, contendo fenil metil sulfonil fluoreto (PMSF) 20 mmol/L) no aparelho homogeneizador Ultra-Turrax. A suspensão foi centrifugada a 3000g durante 20 minutos a 4°C, para remover os restos nucleares e celulares, e os sobrenadantes foram utilizados para as análises de estresse oxidativo (Llesuy *et al.*, 1985).

### 2.9. Determinação da concentração proteica

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

### 2.10. Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio Totais

As espécies reativas de oxigênio totais foram avaliadas espectrofluorimetricamente através da oxidação do diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) em 2,7-diclorofluoresceína, na presença dessas espécies. As amostras foram excitadas em 488 nm e a emissão foi coletada em 525 nm. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína (Lebel *et al.*, 1992).

### *2.11. Determinação dos níveis de peróxido de hidrogênio*

Os níveis de peróxido de hidrogênio foram medidos através da oxidação do vermelho de fenol, resultando num produto cuja leitura foi efetuada em 610 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por miligrama de proteína (Pick e Keisari, 1980).

### *2.12. Determinação da concentração da glutatona oxidada e reduzida*

Na determinação da glutatona oxidada (GSSG), o tecido cardíaco foi desproteinizado com ácido perclórico 2 mol/L e centrifugado por 10 min a 1000 g. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O meio de reação continha tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7.2), ácido nicotinamida dinucleotídeo fosfato 2 mmol/L, glutatona redutase 0.2 U/mL, 5,5' ditiobis (2-nitro ácido benzóico) 70 µmol/L. Na determinação da glutatona reduzida (GSH), o sobrenadante neutralizado reagiu com 5,5' ditiobis (2-nitro ácido benzóico) 70 µmol/L e a leitura foi efetuada em 420 nm. Os resultados das glutatonas totais, da GSH e da GSSG foram expressos em micromoles por mg de tecido (Akerboom e Sies, 1981).

### *2.13. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes*

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) baseou-se na capacidade de inibição da auto-oxidação do pirogalol pela SOD (quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor a auto-oxidação do pirogalol), e foi medida em 420 nm. O resultado foi expresso em unidades por miligrama de proteína (Marklund, 1985). A atividade da catalase foi analisada através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio, e foi medida em 240 nm. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (Aebi, 1984). A atividade da glutatona peroxidase (GPx) foi determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução da GSSG à GSH. Essa reação foi medida em 340nm. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína (Flohe e Gunzler, 1984).

#### 2.14. Determinação da peroxidação lipídica por quimiluminescência

A peroxidação lipídica foi avaliada em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Brommma, Sweden). Os homogeneizados de tecido foram colocados em vias contendo baixo potássio, numa concentração de 0,5 mg/mL, num meio de reação que consiste em tampão fosfato 30 mmol/L e 120 mmol/L de KCl (pH = 7,4). A reação foi estimulada pela adição de 3 mmol/L de terc-butil-hidroperóxido (tBOOH). Os resultados foram expressos em contagens por segundo por miligrama de proteína (cps/mg de proteína) (Gonzalez *et al.*, 1991).

#### 2.15. Análise da expressão proteica por Western Blot

Foram analisadas as expressões proteicas das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx. A homogeneização do tecido, a eletroforese e a transferência de proteínas foram realizadas conforme descrito anteriormente (Laemmli, 1970; Araujo *et al.*, 2006). As membranas foram processadas para a imunodeteção utilizando os seguintes anticorpos primários: superóxido dismutase (23 kDa), catalase (60 kDa) e glutationala peroxidase (22 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA ou Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Os anticorpos primários foram detectados utilizando-se anticorpos secundários de acordo com a origem dos primários (anti-rabbit ou anti-mouse) e as membranas foram reveladas por quimiluminescência. Os filmes autorradiográficos foram quantitativamente analisados no densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences, Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados em referência a um marcador de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados de cada membrana foram normalizados pelo método de Ponceau (Klein *et al.*, 1995).

#### 2.16. Análise estatística

A comparação entre dados foi realizada através da análise de variância (ANOVA) de duas vias, complementado com teste de Student-Newmann-Keuls. Foi utilizado o Teste t de Student para comparar as áreas de infarto entre os dois grupos infartados (IAM e IAMT). As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou um  $P < 0.05$ . Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. O software GraphPad InStat, versão 3.00 para Windows, foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados.

### **3. Resultados**

#### *3.1. Níveis dos hormônios da tireoide no plasma*

Após 26 dias de administração dos hormônios da tireoide, o nível de T3 no plasma foi significativamente maior no grupo IAMT, em comparação com IAM, como mostrado na Tabela 1. Em ratos SHAMT, no entanto, estes níveis não foram estatisticamente diferentes dos outros grupos. Também não houve diferença nos níveis de T3 entre IAM e SHAM. Os níveis de T4 não foram diferentes entre os grupos (Tabela 1).

#### *3.2. Análises morfométricas*

Após 28 dias da cirurgia, o peso corporal dos animais não foi diferente entre os grupos. Os animais do grupo IAMT apresentaram um aumento do peso do VD, assim como um aumento do índice de hipertrofia ventricular direita, quando comparados aos grupos IAM e SHAMT. Os animais infartados não tratados apresentaram um aumento do índice de congestão pulmonar. O tratamento foi capaz de reverter esse aumento (Tabela 1). No fígado, a razão entre o peso seco e o peso úmido, que indica congestão hepática, não foi diferente entre os grupos.

### *3.3. Análises ecocardiográficas*

Após 28 dias da cirurgia, os grupos IAM e IAMT não apresentaram diferença em relação à área de infarto. O tratamento hormonal resultou em um aumento na frequência cardíaca dos animais dos grupos SHAMT e IAMT. O tempo de aceleração do fluxo pela artéria pulmonar, assim como a razão entre o tempo de aceleração do fluxo pelo tempo de ejeção do fluxo pela artéria pulmonar (TA/TE), os quais são indicativos de resistência na artéria pulmonar, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Tabela 1).

### *3.4. Parâmetros de estresse oxidativo*

Os animais tratados apresentaram uma redução significativa nos níveis de espécies reativas de oxigênio totais no tecido cardíaco, em relação aos não tratados; e os animais do grupo SHAMT também apresentaram redução significativa nos níveis dessas espécies, quando comparados aos animais do grupo SHAM (Figura 1a). Além disso, o tratamento hormonal pós-infarto reduziu os níveis de peróxido de hidrogênio nos animais do grupo IAMT, em relação aos grupos IAM e SHAMT (Figura 1b). Quanto à avaliação dos níveis de peroxidação de lipídeos, os animais tratados apresentaram um aumento desses níveis, em relação aos não tratados. Além disso, houve aumento no grupo SHAMT, em relação ao grupo SHAM, e no grupo IAMT, em relação ao grupo IAM (Figura 1c). Em relação às glutatonas, foram avaliados os níveis de glutatonas totais, os níveis de GSH e de GSSG, bem como a razão GSH/GSSG (balanço redox). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos, nos parâmetros citados (Figura 2).

### *3.5. Atividade e expressão das enzimas antioxidantes*

A atividade e expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) aumentaram nos grupos tratados, em comparação aos não tratados. A expressão da SOD aumentou no grupo SHAMT, em relação ao SHAM, bem como no grupo IAMT, em relação ao IAM. Além disso, houve diminuição da atividade da enzima no grupo

IAM, em relação ao SHAM. No grupo IAMT, o tratamento foi capaz de aumentar essa atividade novamente (Figura 3a). Em relação à atividade e expressão da enzima catalase, não houve diferença significativa entre os grupos, nos dois parâmetros (Figura 3b). Em relação à glutathiona peroxidase (GPx), o tratamento diminuiu significativamente a expressão e a atividade da enzima, em relação aos grupos que não receberam tratamento hormonal (Figura 3d).

#### 4. Discussão

O principal achado deste estudo foi demonstrar que a administração dos hormônios da tireoide no período pós-infarto foi capaz de modificar os níveis de espécie reativas de oxigênio e a atividade e a expressão de enzimas antioxidantes no VD. Estas alterações foram acompanhadas de hipertrofia do VD e de um aumento do dano lipídico nos animais tratados, 28 dias após o infarto.

No presente estudo, houve similaridade entre as áreas de infarto em ambos os grupos infartado, indicando que houve uma boa reprodutibilidade do método cirúrgico utilizado. Em relação ao peso e ao índice de hipertrofia do VD, não houve diferenças entre os grupos SHAM e SHAMT, e o grupo IAM. Isto demonstra que, aos 28 dias pós-infarto, os animais infartados não apresentaram aumento de massa na câmara direita. No grupo IAMT, no entanto, esses valores estavam maiores do que nos outros grupos, resultado similar ao encontrado no VE de animais que receberam T3 e T4 nas mesmas condições (de Castro *et al.*, 2014). As análises ecocardiográficas mostraram que não houve diferença nos parâmetros de fluxo da artéria pulmonar entre os grupos, indicando que o tratamento hormonal de animais infartados não parece alterar a resistência da artéria pulmonar – dado não encontrado antes na literatura. Em função disso, a hipertrofia do VD parece não ter se dado em resposta a um aumento da resistência da artéria pulmonar, mas foi provavelmente resultado da ação hormonal sobre os cardiomiócitos. Além disso, os animais infartados e tratados não apresentaram congestão pulmonar, diferentemente dos ratos infartados que não receberam o tratamento hormonal.

Provavelmente este resultado deve-se à melhora da função cardíaca promovida por esses hormônios no VE, como já foi demonstrado previamente (de Castro *et al.*, 2014). Não houve diferença no índice de congestão hepática entre os grupos. Este resultado indica que provavelmente, no período de tempo analisado, os animais infartados não apresentaram comprometimento da função cardíaca direita que pudesse levar a um quadro de congestão hepática (Francis *et al.*, 2001). O tratamento hormonal promoveu um aumento da frequência cardíaca nos grupos SHAMT e IAMT. Este aumento foi semelhante ao apresentando em outros trabalhos que avaliaram o papel cardioprotetor dos hormônios da tireoide (Pantos *et al.*, 2007; 2008).

Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo, o tratamento hormonal promoveu a diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio nos grupos SHAMT e IAMT, bem como a diminuição dos níveis de peróxido de hidrogênio no grupo IAMT. Esse resultado é semelhante ao encontrado no VE de animais infartados e tratados com T3 e T4 (de Castro *et al.*, 2014). Apesar disso, houve um aumento do dano oxidativo a lipídeos nos animais tratados com T3 e T4. Como o nível de  $H_2O_2$  está diminuído, uma possível explicação para o aumento da lipoperoxidação seria um aumento nos níveis de ânion superóxido. Acredita-se que o ânion superóxido possa estar interagindo com o óxido nítrico - uma vez que os hormônios da tireoide aumentam a produção de NO (Araújo *et al.*, 2010) – e gerando peróxido nítrico, que pode estar causando o dano. No entanto, mais análises são necessárias para demonstrar esse mecanismo de dano oxidativo. Os altos níveis de ânion superóxido, por sua vez, poderiam estar promovendo o aumento da expressão e da atividade da SOD nos animais tratados, em relação aos não tratados. No entanto, uma vez que o nível de  $H_2O_2$  está baixo, não é necessária uma grande quantidade de enzimas que o metabolizem, o que explica o porquê da atividade e expressão da GPx estarem diminuídas nesses animais. Já a ativação da catalase se dá quando os níveis de  $H_2O_2$  estão muito altos, e, além disso, sua atividade é baixa no tecido cardíaco. Por esses motivos não houve diferenças tanto na atividade quanto na expressão dessa enzima entre os grupos. Assim como a catalase, não houve, entre os grupos, diferenças nos níveis de glutatona totais,

oxidadas ou reduzidas, mostrando que o balanço redox nos animais tratados não foi alterado, apesar do dano lipídico (Halliwell e Gutteridge, 2006).

Assim, analisando esses resultados, parece que a administração dos hormônios tireoidianos está levando o VD a um estado pró-oxidante, diferentemente do que foi demonstrado no VE (de Castro *et al.*, 2014). Devido ao fato de que o VE é o principal acometido nesse modelo de infarto agudo do miocárdio, e que, após 28 dias, ainda não houve alterações de morfometria nem de função do VD, como evidenciado pela ausência de hipertrofia, no grupo IAM, e de congestão hepática, o VD parece comportar-se como um tecido sadio, não sendo possível observar efeitos semelhantes aos encontrados no VE, do T3 e T4 sobre essa câmara. No VE, no entanto, estudos prévios demonstram uma alteração na expressão dos receptores dos hormônios da tireoide, levando a um quadro de “hipotireoidismo tecidual” (Pantos *et al.*, 2010). Nesse contexto, a administração hormonal parece exercer efeitos benéficos, reduzindo o dano oxidativo e melhorando a função desta câmara (de Castro *et al.*, 2014; Pantos *et al.*, 2007, 2008). No presente trabalho, apesar do aumento do dano lipídico na câmara direita, não podemos afirmar que este tratamento possa levar a um prejuízo funcional do VD, uma vez que os animais do IAMT não apresentaram congestão hepática nem aumento na resistência arterial pulmonar. Provavelmente o tratamento hormonal poderia apresentar efeitos diferentes em um estágio de insuficiência cardíaca em que houvesse comprometimento do VD.

Por fim, é importante salientar a contribuição desse trabalho num contexto em que não há outros trabalhos realizados com objetivo de compreender o impacto do tratamento com hormônios tireoidianos no VD. Em vista disso, pode-se concluir que, apesar desse tratamento ter se mostrado benéfico no VE (Pantos *et al.*, 2007; Pantos *et al.*, 2008a; Makino *et al.*, 2008; de Castro *et al.*, 2014), no VD ele causa alterações tanto em parâmetros morfológicos, como em parâmetros de estresse oxidativo; e mais estudos são necessários para averiguar as consequências dessas alterações nessa câmara cardíaca.

## Referências

1. Aebi H. **Catalase in vitro**. *Methods in Enzymology*, v.105, p.121-126; 1984.
2. Akerboom T., Sies H. **Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples**. *Methods in Enzymology*, v.77, p. 373-382, 1981.
3. Araújo A.S.R., Ribeiro M.F.M., Enzweiler A., Schenkel P., Fernandes T.R.G., Partata W.A., Irigoyen M.C., Llesuy S., Belló-Klein A. **Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism**. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 249, p.133-139, 2006.
4. Araújo A.S.R. ; Fernandes T. ; Ribeiro M.F.M. ; Khaper N. ; Belló-Klein A. **Redox Regulation of Myocardial Erk 1/2 Phosphorylation in Experimental Hyperthyroidism: Role of Thioredoxin–Peroxiredoxin System**. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v.56, p.513–517, 2010.
5. de Castro A.L., Tavares A.M.V., Campos C., Fernandes R.O., Siqueira R., Conzatti A., Bicca A.M., Fernandes T.R.G., Schenkel P.C., Belló-Klein A., Araújo A.S.R. **Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction**. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014.
6. Fernandes R.O., et al. **Redox status and pro-survival/pro-apoptotic protein expression in the early cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism**. *Cell Biochem. Funct.* 29, 617-623. 2011.
7. Flohé L., Gunzler W.A. **Assay of glutathione peroxidase**. *Methods in Enzymology*, v.105, p.14–121, 1984.
8. Francis J., Weiss R.M., Wei S.G., Johnson A.K., Felder R.B. **Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat**. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 281, p.1734–1745, 2001.
9. Gonzalez B.F., Llesuy S., Boveris A. **Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle**. *Free Radicals in Biology and Medicine*, v.10, p.41–47, 1991.
10. Johns T.N.P., Olson B.J. **Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals**. *Annals of Surgery*, v.140, p.675-682, 1954.
11. Klein D., Kern R.M., Sokol R.Z. **A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes**. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.36, p.59-66, 1995.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. 1970.
13. Lebel C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C. **Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress**. *Chemical Research and Toxicology*, v.5, p.227-231, 1992.

14. Libby P., Bonow R.O., Mann D.L., Zipes D.P. **Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine**, 8th ed. Saunders Elsevier, 2007.
15. Llesuy S.F. et al. **Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adramiyacin and 4'-epiadramiyacin in mice.** Tumori 71:241-249. 1985.
16. Lowry O.H., Rosebrough A.L., Farr A.L., Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265–275, 1951.
17. Makino A., Suarez J., Wang H., Belke D.D., Scott B.T., Dillmann W.H. **Thyroid hormone receptor-beta is associated with coronary angiogenesis during pathological cardiac hypertrophy.** *Endocrinology*, v.150, p.2008–2015, 2009.
18. Marklund S. **Handbook of methods for oxygen radical research.** Boca Raton. CRC. Press. 243-247, 1985.
19. Mehta S.H., Eikelbom J.W., Natarajan M.K., Diaz R., Yi C., Gibbons R.J., Yusuf S. **Impact of right ventricular involvement on mortality and Morbidity in patients with inferior myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol*;37:43. 2001.
20. Nozawa E., Kanashiro R., Murad N., Carvalho A.C.C., Cravo S.L., Campos O., Tucci P.J.F., Moises V.A. **Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.39, p.687-695, 2006.
21. Pantos C., Mourouzis I., Galanopoulos G., Gavra M., Perimenis P., Spanou D., Cokkinos D.V. **Thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  down-regulation in postischemic heart failure progression: the potential role of tissue hypothyroidism.** *Hormone and Metabolic Research*, v.42, p.718 – 724, 2010.
22. Pantos C., Mourouzis I., Markakis K., Dimopoulos A., Xinaris C., Kokkinos A.D., Panagiotou M., Cokkinos D.V. **Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats.** *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, v.32, p.333–339, 2007.
23. Pantos C., Mourouzis I., Markakis K., Tsagoulis N., Panagiotou M., Cokkino D.V. **Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats.** *Basic Research in Cardiology*, v.103, p.308-318, 2008a.
24. Pfeffer M.A., Pfeffer J.M., Steinberg C., Finn P. **Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril.** *Circulation*, v.72, p.406–412, 1985.
25. Pick E., Keisari Y. **A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture.** *Journal of Immunological Methods*, v.38, p.161-70, 1980.
26. Schenkel P.C., Tavares A., Fernandes R., Diniz G.P., Bertagnolli M., Araujo A.S.R., Barreto-Chaves M.L., Ribeiro M.F.M, Clausell N., Belló-Klein A. **Redox-sensitive prosurvival and**

- proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats.** Molecular and Cellular Biochemistry, v.341, p.1-8, 2010.
27. Schenkel P.C., Tavares A., Fernandes R.O., Diniz G.P., Ludke A.R.L., Ribeiro M.F.M., Araújo A.S.R., Barreto-Chaves M.L., Belló-Klein A. **Time profile of hydrogen peroxide/ thioredoxin balance and its influence in the intracellular signaling post-myocardial infarction.** Experimental Physiology, 2012
28. Singal P.K., Khaper N., Belló-Klein A., Bhayana M. **Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure.** Heart Failure Reviews, v.4, p.353–360, 1999.
29. Tavares A.M.V. et al. **Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction.** Life Sci. 87, 699-706. 2010.

## Legendas

**Figura 1.** Níveis de Espécies Reativas de Oxigênio Totais (A), Peróxido de Hidrogênio (B) e Lipoperoxidação (C) no tecido cardíaco, 28 dias pós-cirurgia. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6-8 animais por grupo. <sup>a</sup> significativamente diferente do grupo SHAM ( $P < 0.05$ ); <sup>b</sup> significativamente diferente do grupo IAM ( $P < 0.05$ ), <sup>c</sup> significativamente diferente do grupo SHAMT ( $P < 0.05$ ).

**Figura 2.** Valores das glutations no tecido cardíaco, 28 dias pós-cirurgia. Glutinationas Totais (A), GSH (glutaciona reduzida) (B), GSSG (glutaciona oxidada) (C) e razão GSH/GSSG (D). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6-8 animais por grupo. Não houve diferença entre os grupos.

**Figura 3.** Atividade e expressão das enzimas SOD, Catalase e GPx, no tecido cardíaco, 28 dias pós-cirurgia. Expressão da SOD (superóxido dismutase) (A), atividade da SOD (B), expressão da catalase (C), atividade da catalase (D), expressão da GPx (glutaciona peroxidase) (E) e atividade da GPx (F). Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6-8 animais por grupo. <sup>a</sup> significativamente diferente do grupo SHAM ( $P < 0.05$ ); <sup>b</sup> significativamente diferente do grupo IAM ( $P < 0.05$ ).

Tabela 1.

Tabela 1. Níveis hormonais e parâmetros morfométricos e ecocardiográficos, 28 dias pós-cirurgia.

Parâmetros	SHAM	IAM	SHAMT	IAMT
<b>Níveis Hormonais</b>				
T4 ( $\mu\text{g/dL}$ )	5.6 $\pm$ 1.2	6.2 $\pm$ 0.5	6.02 $\pm$ 2.38	5.1 $\pm$ 0.9
T3 ( $\text{ng/dL}$ )	114.7 $\pm$ 23	114.1 $\pm$ 22.7	235 $\pm$ 172	214.9 $\pm$ 64.4 <b>b</b>
<b>Parâmetros morfométricas</b>				
Peso corporal (g)	356 $\pm$ 42	362 $\pm$ 54	361 $\pm$ 51	359 $\pm$ 53
Peso do VD (g)	0.17 $\pm$ 0.01	0.20 $\pm$ 0.03	0.19 $\pm$ 0.03	0.30 $\pm$ 0.01 <b>bc</b>
VD/peso corporal (mg/g)	0.48 $\pm$ 0.08	0.57 $\pm$ 0.09	0.53 $\pm$ 0.11	0.92 $\pm$ 0.31 <b>bc</b>
VD/ comprimento da tibia (mg/cm)	4.6 $\pm$ 0.5	4.8 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 0.9	6.4 $\pm$ 1.8 <b>bc</b>
Pulmão (peso seco/peso úmido) (g/g)	1.49 $\pm$ 0.27	1.88 $\pm$ 0.37 <b>a</b>	1.57 $\pm$ 0.24	1.43 $\pm$ 0.22 <b>b</b>
Fígado (peso seco/peso úmido) (g/g)	3.36 $\pm$ 0.08	3.40 $\pm$ 0.02	3.41 $\pm$ 0.10	3.54 $\pm$ 0.30
<b>Parâmetros Ecocardiográficos</b>				
Área de Infarto (%)	-----	57.4 $\pm$ 14.4	-----	53.9 $\pm$ 9.2
Frequência cardíaca (bpm)	225 $\pm$ 44	228 $\pm$ 13	279 $\pm$ 73 <b>a</b>	324 $\pm$ 24 <b>b</b>
TA da artéria pulmonar (ms)	27 $\pm$ 6	28 $\pm$ 7	26 $\pm$ 6	28 $\pm$ 10
TA/TE da artéria pulmonar	0.27 $\pm$ 0.05	0.27 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.07	0.36 $\pm$ 0.13

Valores expressos como média $\pm$  desvio padrão de 6-8 animais por grupo. VD (ventrículo direito), TA (tempo de aceleração do fluxo pela artéria pulmonar), TA/TE (razão do tempo de aceleração do fluxo pela artéria pulmonar pelo tempo de ejeção pela artéria pulmonar). <sup>a</sup> Significativamente diferente do grupo SHAM ( $P < 0.05$ ); <sup>b</sup> significativamente diferente do grupo IAM ( $P < 0.05$ ), <sup>c</sup> significativamente diferente do grupo SHAMT ( $P < 0.05$ ).

Figura 1.

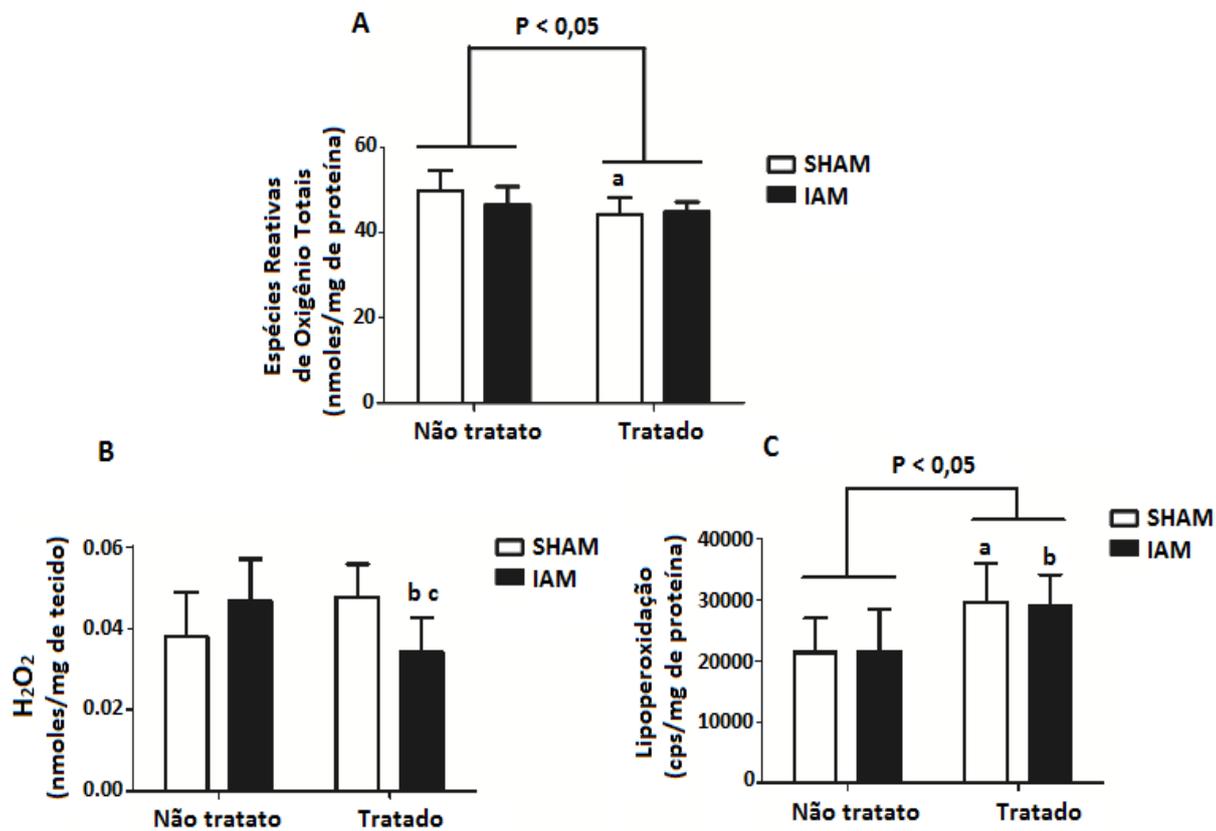


Figura 2.

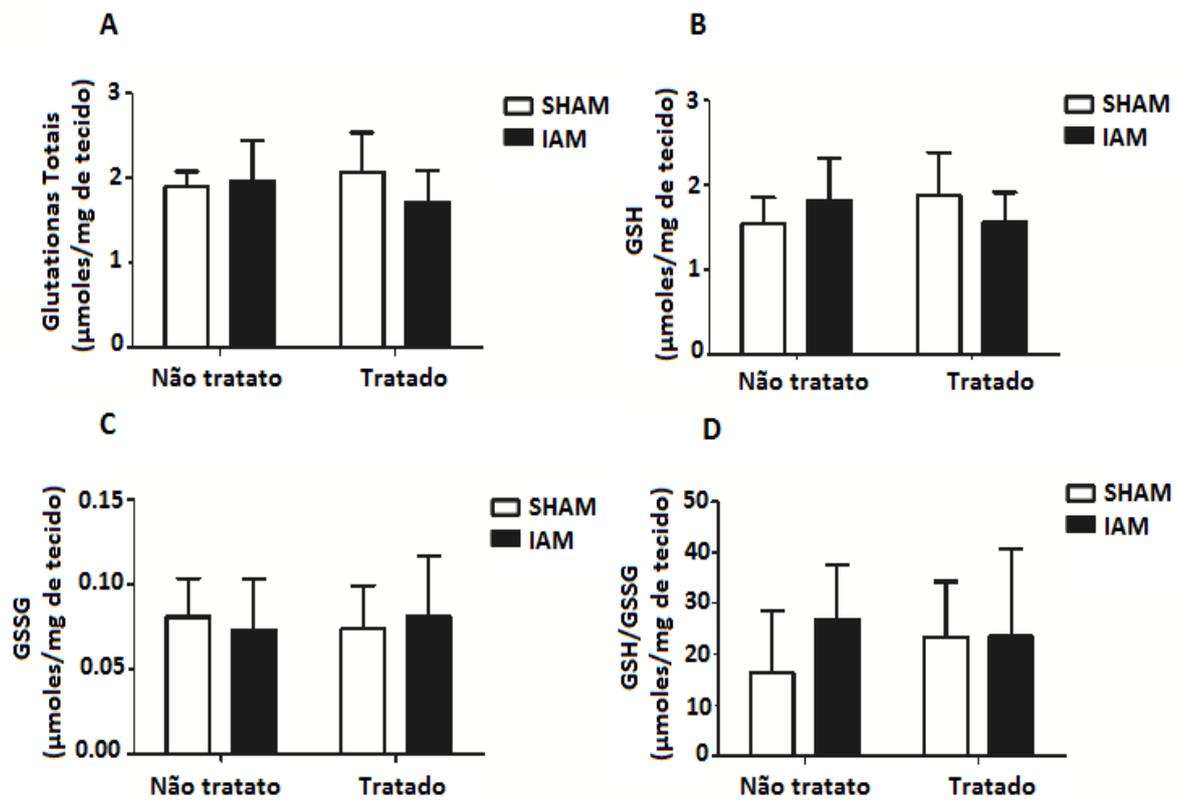
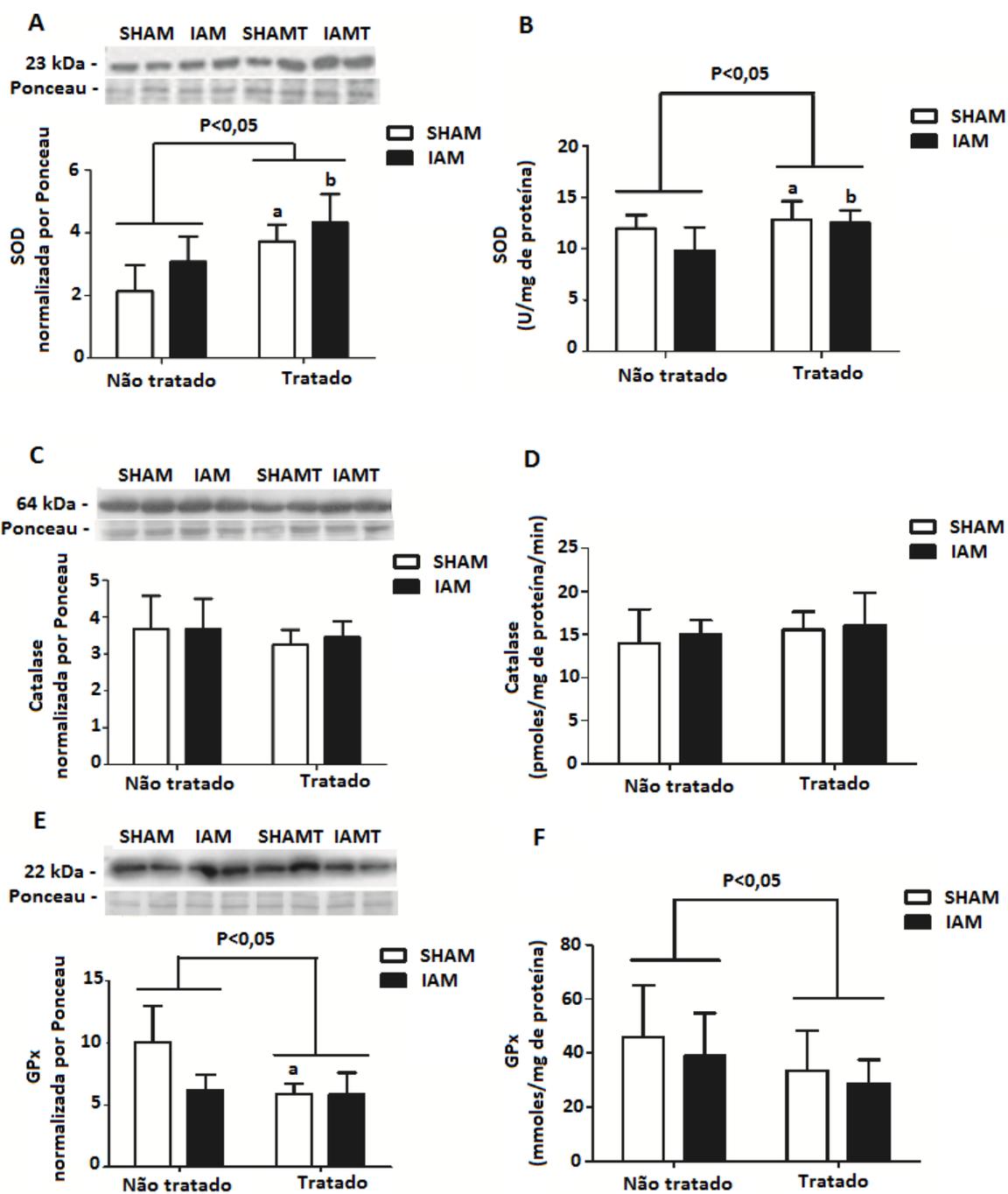


Figura 3.



## Conclusões e perspectivas

A administração dos hormônios tireoidianos parece estar causando alterações no VD diferentes do que já foi evidenciado no VE (de Castro *et al.*, 2014). Isso pode estar ocorrendo, devido ao fato de que o VE é o principal acometido no infarto agudo do miocárdio, e também de que, após 28 dias, ainda não há dano significativo no VD. Nesse contexto, é como se os hormônios fossem administrados em um tecido normal. Dessa forma, acredita-se que o tratamento hormonal poderia apresentar efeitos diferentes em um estágio de insuficiência cardíaca em que houvesse comprometimento do VD.

Por fim, é importante salientar a contribuição desse trabalho num contexto em que não há outros trabalhos realizados com objetivo de compreender o impacto do tratamento com hormônios tireoidianos no VD. Em vista disso, pode-se concluir que, apesar desse tratamento ter se mostrado benéfico no VE (Pantos *et al.*, 2007; Pantos *et al.*, 2008a; Makino *et al.*, 2008; de Castro *et al.*, 2014), no VD ele causa alterações tanto em parâmetros morfológicos e de função cardíaca, como em parâmetros de estresse oxidativo; e mais estudos são necessários para averiguar as consequências dessas alterações nessa câmara cardíaca.

Assim, as perspectivas desse trabalho são realizar a medida de espécies reativas de nitrogênio, através da análise de nitritos e nitratos e análises da via da enzima óxido nítrico sintase, para verificar os níveis de NO, assim como de marcadores de produção de peróxido nítrico, a fim de investigar se a lipoperoxidação está ocorrendo por essa via. Além disso, analisar a expressão e atividade de outras enzimas antioxidantes e vias de sinalização redox, como as enzimas glutarredoxina, tioredoxina, a enzima cinase regulada por sinal extracelular (ERK) e a proteína cinase B (AKT/PKB). Após isso, uma ideia interessante seria analisar o efeito dos hormônios no VD após um período maior de infarto, quando provavelmente o VD estará mais comprometido pela patologia.

## Referências gerais

1. Aebi H. **Catalase in vitro**. *Methods in Enzymology*, v.105, p.121-126; 1984.
2. Akerboom T., Sies H. **Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples**. *Methods in Enzymology*, v.77, p. 373-382, 1981.
3. Araújo A.S.R., Enzweiler A.T., Schenkel P., Fernandes T.R.G., Ribeiro M.F.M., Partata W.A., Llesuy S., Belló-Klein A. **Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine**. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.303, p.89–95, 2007.
4. Araújo A.S.R., Ribeiro M.F.M., Enzweiler A., Schenkel P., Fernandes T.R.G., Partata W.A., Irigoyen M.C., Llesuy S., Belló-Klein A. **Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism**. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 249, p.133-139, 2006.
5. Araújo A.S.R., Schenkel P., Enzweiler A.T., Fernandes T.R.G., Partata W.A., Llesuy S., Ribeiro M.F.M., Khaper N., Singal P.K., Belló-Klein A. **The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism**. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.41, p.423–43, 2008.
6. Babcock G.T. **How oxygen is activated and reduced in respiration**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.96, p.13114–13111, 1999.
7. Baines C.P., Molkentin J.D. **Stress signaling pathway that modulate cardiac myocyte apoptosis**. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v.38, p.47–62, 2005.
8. Barbosa K., Barra F. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. *Rev. Nutr.*, Campinas , v. 23, n. 4, Aug. 2010.
9. Basset J.H., Harvey C.B., Williams G.R. **Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions**. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.213, n.1, p.1–11, 2003.
10. Bauer M., Goetz T., Glenn T., Whybrow P.C. **The thyroid-brain interaction in thyroid disorders and mood disorders**. *Journal of Neuroendocrinology*, v.20, p.1101-1114, 2008.
11. Beckman J.S., Koppenol W.H. **Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly**. *American Journal of Physiology*, v.271, p.1424–1437, 1996.
12. Bonnefont-Rousselot D. **The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications**. *Treat. Endocrinol.*, v.3, p.41–52, 2004.
13. Brigelius-Flohe R. **Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases**. *Free Radical Biology and Medicine*, v.27, p.951–965, 1999.
14. Brix K., Biebermann D.F.H. **Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives**. *Thyroid Research*, v.4, 2011.
15. Cantin A.M. **Potential for antioxidant therapy of cystic fibrosis**. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, v.10, p.531–536, 2004.

16. Cody V., Davis P.J., Davis F.B. **Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with alpha v beta 3 integrin.** *Steroids*, v.72, p.165–170, 2007.
17. Davis P.J., Leonard J.L., Davis F.B. **Mechanisms of non-genomic actions of thyroid hormone.** *Frontiers in Neuroendocrinology*, v.29, n.2, p.211–218, 2008.
18. Dean P., Jones. **Redefining Oxidative Stress.** *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 8, p.1865–1879, 2006.
19. Dorn G.W. **The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy.** *Hypertension*, v.49, p.962–970, 2007.
20. Fam S.S., Morrow J.D. **The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation - a review.** *Current Medicinal Chemistry*, v.10, p.1723–1740, 2003.
21. Fernandes R.O., et al. **Redox status and pro-survival/pro-apoptotic protein expression in the early cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism.** *Cell Biochem. Funct.* 29, 617-623. 2011.
22. Flohé L., Gunzler W.A. **Assay of glutathione peroxidase.** *Methods in Enzymology*, v.105, p.14–121, 1984.
23. Foote C.S., Valentine J.S., Greenberg A., Liebman J.F. **Active Oxygen in Chemistry.** Chapman and Hall, New York, 1985.
24. Francis J., Weiss R.M., Wei S.G., Johnson A.K., Felder R.B. **Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat.** *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 281, p.1734–1745, 2001.
25. Fridovich I. **Superoxide radical and sods.** *Annu Rev Biochem*, v.64, p.97–112, 1995.
26. Furuya F., Lu C., Guigon C.J., Cheng S.Y. **Nongenomic activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by thyroid hormone receptors.** *Steroids*, v.74, p.628-634, 2009.
27. Ganong. *Fisiologia Médica.* 19 ed. Ed. Mcgraw-Hill, 2000.
28. Giordano J.F. **Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure.** *The Journal of Clinical Investigation.* 115:500-508. 2005.
29. Gonzalez B.F., Llesuy S., Boveris A. **Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle.** *Free Radicals in Biology and Medicine*, v.10, p.41–47, 1991.
30. Hagen M., Lehenbauer-Lüdke A., Paludo A., Schenkel P., Gonçalves L., Fernandes T., Caron R., Llesuy S., Mill J., Belló-Klein A. **Diet with isolated soy protein reduces oxidative stress and preserves ventricular function in rats with myocardial infarction.** *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v.19, p.91-97, 2009.
31. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006.
32. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. **Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.** *Biochemical Journal*, v.219, p.1–14, 1984.

33. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. **Measurement of reactive species**. In: Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4 ed. Oxford University Press, Oxford, p. 268–340, 2007.
34. Hogg, Kalyanamaran. **Nitric oxide and lipid peroxidation**. *Biochimica et Biophysica Acta* v.1411, p.378-384, 1999.
35. Hu L.W., Benvenuti L.A., Liberti E.A., Carneiro-Ramos M.S., Barreto-Chaves M.L.M. **Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling**. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v.285, p.1473–1480, 2003.
36. Inohara T., Kohsaka S., Fukuda K., Menon, V. The challenges in the management of right ventricular infarction. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*. Sep 2013; 2(3): 226–234.
37. Johns T.N.P., Olson B.J. **Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals**. *Annals of Surgery*, v.140, p.675-682, 1954.
38. Kahaly G.J., Dillmann W.H. **Thyroid hormone action in the heart**. *Endocrine Reviews*, v.26, n.5, p.704–728, 2005.
39. Khalife W.I., Tang Y.D., Kuzman J.A., Thomas T.A., Anderson B.E., Said S., Tille P., Schlenker E.H., Gerdes A.M. **Treatment of subclinical hypothyroidism reverses ischemia and prevents myocyte loss and progressive LV dysfunction in hamsters with dilated cardiomyopathy**. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, v.289, p.2409–2415, 2005.
40. Kim G., Chun Y., Park J., Kim M. **Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia–reperfusion**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.309, p.619–624, 2003.
41. Kinugawa K., Jeong M.Y., Bristow M.R., Long C.S. **Thyroid hormone induces cardiac myocyte hypertrophy in a thyroid hormone receptor alpha1-specific manner that requires TAK1 and p38 mitogen-activated protein kinase**. *Molecular Endocrinology*, v.19, p.1618–1628, 2005.
42. Klein D., Kern R.M., Sokol R.Z. **A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes**. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.36, p.59-66, 1995.
43. Klein I., Ojamaa K. **Thyroid hormone and the cardiovascular system**. *The New England Journal of Medicine*, v.344, n.7, p.5011–5019, 2001.
44. Kohrle J. **The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action**. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.57, p.1853-1863, 2000.
45. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685. 1970.

46. Lebel C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C. **Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress.** *Chemical Research and Toxicology*, v.5, p.227-231, 1992.
47. Libby P., Bonow R.O., Mann D.L., Zipes D.P. **Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine**, 8th ed. Saunders Elsevier, 2007.
48. Lowry O.H., Rosebrough A.L., Farr A.L., Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265–275, 1951.
49. Luidens M.K., Mousa S.A., Davis F.B., Lin H.Y., Davis P.J. **Thyroid hormone and angiogenesis.** *Vascular Pharmacology*, v.52, p.142–145, 2010.
50. MacCarthy P.A., Shah A.M. **Oxidative stress and heart failure.** *Coronary Artery Disease*. 14:109-113. 2003.
51. Makino A., Suarez J., Wang H., Belke D.D., Scott B.T., Dillmann W.H. **Thyroid hormone receptor-beta is associated with coronary angiogenesis during pathological cardiac hypertrophy.** *Endocrinology*, v.150, p.2008–2015, 2009.
52. Mannervik B., Gluthenberg C. **Glutathione Transferase.** *Methods in Enzymology*, v.77, p.231-235, 1981.
53. Marklund S. **Handbook of methods for oxygen radical research.** Boca Raton. CRC. Press. 243-247, 1985.
54. Mehta S.H., Eikelbom J.W., Natarajan M.K., Diaz R., Yi C., Gibbons R.J., Yusuf S. **Impact of right ventricular involvement on mortality and Morbidity in patients with inferior myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol* 2001;37:43.
55. Moruzzi P., Doria E., Agostoni P.G. **Medium-term effectiveness of L-thyroxine treatment in idiopathic dilated cardiomyopathy.** *American Journal of Medicine*, v.101, p.461–467, 1996.
56. Moruzzi P., Doria E., Agostoni P.G., Capacchione V., Sganzerla P. **Usefulness of L-thyroxine to improve cardiac and exercise performance in idiopathic dilated cardiomyopathy.** *American Journal of Cardiology*, v.73, p.374–378, 1994.
57. Niethammer P., Grabher C., Look A.T., Mitchison T.J. **A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish.** *Nature*, v.459, p.996–999, 2009.
58. Nozawa E., Kanashiro R., Murad N., Carvalho A.C.C., Cravo S.L., Campos O., Tucci P.J.F., Moises V.A. **Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.39, p.687-695, 2006.
59. Ojamaa K., Kenessey A., Shenoy R., Klein I. **Thyroid hormone metabolism and cardiac gene expression after acute myocardial infarction in the rat.** *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism*, v.279, p.1319–1324, 2000.
60. Pantos C., Malliopoulou V., Mourouzis I., Moraitis P., Tzeis S., Thempeyioti A., Paizis I., Cokkinos A., Carageorgiou H., Varonos D.D., Cokkinos D.V. **Involvement of p38 MAPK and**

- JNK in heat stress-induced cardioprotection.** Basic Research in Cardiology, v.98, p.158–164, 2003.
61. Pantos C., Mourouzis I., Galanopoulos G., Gavra M., Perimenis P., Spanou D., Cokkinos D.V. **Thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  down-regulation in postischemic heart failure progression: the potential role of tissue hypothyroidism.** Hormone and Metabolic Research, v.42, p.718 – 724, 2010.
62. Pantos C., Mourouzis I., Markakis K., Dimopoulos A., Xinaris C., Kokkinos A.D., Panagiotou M., Cokkinos D.V. **Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats.** European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, v.32, p.333–339, 2007.
63. Pantos C., Mourouzis I., Markakis K., Tsagoulis N., Panagiotou M., Cokkino D.V. **Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats.** Basic Research in Cardiology, v.103, p.308-318, 2008a.
64. Pantos C., Xinaris C., Mourouzis L. **Thyroid hormone receptor alpha 1: a switch to cardiac cell “metamorphosis”?** Journal of Physiology and Pharmacology, v.59, p.253–269, 2008b.
65. Pfeffer M.A., Pfeffer J.M., Steinberg C., Finn P. **Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril.** Circulation, v.72, p.406–412, 1985.
66. Pick E., Keisari Y. **A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture.** Journal of Immunological Methods, v.38, p.161-70, 1980.
67. Pingitore A., Galli E., Barison A., Iervasi A., Scarlattini M., Nucci D., L'abbate A., Mariotti R., Iervasi G. **Acute effects of triiodothyronine (T3) replacement therapy in patients with chronic heart failure and low-T3 syndrome: a randomized, placebo-controlled study.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.93, p.1351–1358, 2008.
68. Rabald S., Hagebdorff A., Pfeiffer D., Zimmer H., Deten A. **Contrast enhanced echocardiographic follow-up of cardiac remodeling and function after myocardial infarction in rats.** Ultrasound in Medicine and Biology, v.33, p.1561-1571, 2007.
69. Rohrer D.K., Hartong R., Dillmann W.H. **Influence of thyroid hormone and retinoic acid on slow sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and myosin heavy chain alpha gene expression in cardiac myocytes. Delineation of cis-active DNA elements that confer responsiveness to thyroid hormone but not to retinoic acid.** The Journal of Biological Chemistry, v.266, n.13, p.8638–8646, 1991.
70. Schenkel P.C., Tavares A., Fernandes R., Diniz G.P., Bertagnolli M., Araujo A.S.R., Barreto-Chaves M.L., Ribeiro M.F.M, Clausell N., Belló-Klein A. **Redox-sensitive pro-survival and pro-apoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats.** Molecular and Cellular Biochemistry, v.341, p.1-8, 2010.

71. Schenkel P.C., Tavares A., Fernandes R.O., Diniz G.P., Ludke A.R.L., Ribeiro M.F.M., Araújo A.S.R., Barreto-Chaves M.L., Belló-Klein A. **Time profile of hydrogen peroxide/ thioredoxin balance and its influence in the intracellular signaling post-myocardial infarction.** *Experimental Physiology*, 2012
72. Scott M.D., Lubin B.H., Zuo L., Kuypers F.A. **Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase.** *J Lab Clin Med*; 118: 7-16. 1991.
73. Shan X., Aw T.Y., Jones D.P. **Glutathione-dependent protection against oxidative injury.** *Pharmacol Ther*; 47: 61-71. 1990.
74. Sies H. **Oxidative Stress.** *Oxidants and Antioxidants.* Academic Press, New York, 1991.
75. Singal P.K., Khaper N., Belló-Klein A., Bhayana M. **Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure.** *Heart Failure Reviews*, v.4, p.353–360, 1999.
76. Skulachev V.P. **Why are mitochondria involved in apoptosis. Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell.** *FEBS Letters*, v. 397, p.7–10, 1996.
77. Smirnoff N. **L-ascorbic acid biosynthesis.** *Vitam Horm*, v.61, p. 241–266, 2001.
78. Stocker R., Keaney J.F. **Role of oxidative modifications in atherosclerosis.** *Physiological Reviews*, v. 84, p.1381–1478, 2004.
79. Stone J.R., Yang S. **Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger.** *Antioxidants & redox signaling*, v.8, n.3-4, p.244-269, 2006.
80. Tavares A.M.V. et al. **Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction.** *Life Sci.* 87, 699-706. 2010.
81. Tavi P., Sjogren M., Lunde P.K., Zhang S.J., Abbate F., Vennström B., Westerblad H. **Impaired Ca<sup>2+</sup> handling and contraction in cardiomyocytes from mice with a dominant negative thyroid hormone receptor $\alpha$ 1.** *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v.38, p.655–663, 2005.
82. Thomaz P.G., Borela J.A.R., Baptista Filho M.L.A., Assad R.S. **Right ventricle infarction.** *Rev Med Minas Gerais* 20(1): 307-312. 2010.
83. Van Remmen H., Ikeno Y., Hamilton M., Pahlavani M., Wolf N., Thorpe S.R., Alderson N.L., Baynes J.W., Epstein C.J., Huang T.T. **Life-long reduction in mnsod activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging.** *Physiological Genomics*, v.16, p.29–37, 2003.
84. Vina J., Lloret A., Orti R., Alonso D. **Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress.** *Molecular Aspects of Medicine*, v.25, p.117–123, 2004.
85. Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J.Y. **Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked.** *Science*, v. 275, p.1129–1132, 1997.

86. Yao J., Eghbali M. **Decreased collagen gene expression and absence of fibrosis in thyroid hormone-induced myocardial hypertrophy. Response of cardiac fibroblasts to thyroid hormone in vitro.** *Circulation Research*, v.71, p.831–839, 1992.
87. Yen P.M., Andos S., Feng X., Liu Y., Maruvada P., Xia X. **Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 246, n.1-2, p.121–127, 2006.
88. Zoratti M., Szabo I. **The mitochondrial permeability transition.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1241, p.139–176, 1995.

## Anexo

- Regras da revista “Brazilian Journal of Medical and Biological Research”;



### **Preparation of Research Manuscripts**

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research publishes original research articles of outstanding scientific significance. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a limited number of experiments. The key criteria are that the research demonstrates clearly its novelty, its importance to a particular field as well as its interest to those outside that discipline, and conclusions that are justified by the data.

### **Authorship requirements**

Only those persons who contributed directly to the intellectual content of the paper should be listed as authors. Authors should meet all of the following criteria, thereby allowing persons named as authors to take public responsibility for the content of the paper.

- Conceived, planned and carried out the experiments that led to the paper or interpreted the data it presents, or both.
- Wrote the paper, or reviewed successive versions.
- Approved the final version.
- Holding positions of administrative leadership, contributing patients, and collecting and assembling data, however important to the research, are not by themselves criteria for authorship. Other persons who have made substantial, direct contributions to the work but cannot be considered authors should be cited in the acknowledgment section, with their permission, and a description of their specific contributions to the research should be given.

### **Text format**

The text of a manuscript can only be accepted as a Microsoft Word file as a "doc".

- Each page should contain the page number in the upper right-hand corner starting with the title page as page 1.
- Report all measurements in Système International, SI (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>) and standard units where applicable (see below).
- Do not use abbreviations in the title or abstract and limit their use in the text.
- The length of the manuscript and the number of tables and figures must be kept to a minimum.
- Ensure that all references are cited in the text.

- Generic names must be used for all drugs. Instruments may be referred to by proprietary name; the name and country or electronic address of the manufacturer should be given in parentheses in the text.

Guidance on grammar, punctuation, and scientific writing can be found in the following sources: Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers. 7th edn. Rockefeller University Press, Reston, 2006; Medical Style and Format. Huth EJ (Editor). ISI Press, Philadelphia, 1987, Marketed by Williams & Wilkins, Baltimore, MD. The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine (<http://www.icmje.org/>).

### Footnotes

Text footnotes, if unavoidable, should be numbered consecutively in superscript in the manuscript and written on a separate page following the abstract.

### Headings in text

- Position all headings flush with the left margin.
- Keep headings short (three or four words).
- Use only three types of headings in the text. Clearly indicate the type of level of headings by using the following typographic conventions.
  - First-level: Only the 1<sup>st</sup> letter of the 1<sup>st</sup> word is capitalized, font size 11, **bold type**.
  - Second-level: Only the 1<sup>st</sup> letter of the 1<sup>st</sup> word is capitalized, font size 9, **bold type**.
  - Third-level: Only the 1<sup>st</sup> letter of the 1<sup>st</sup> word is capitalized, *italic type*

### Abbreviations

Abbreviations should be kept to a minimum. Define all abbreviations upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

- Explain all abbreviations in the text, figure and table legends when they first appear. Keep the number of abbreviations to a minimum.
- Do not explain abbreviations for units of measurement [3 mL, not 3 milliliters (mL)] or standard scientific symbols [Na, not sodium (Na)].
- Abbreviate long names of chemical substances and terms for therapeutic combinations. Abbreviate names of tests and procedures that are better known by their abbreviations than by the full name (VDRL test, SMA-12).
- Use abbreviations in figures and tables to save space, but they must be defined in the legend.

### Nomenclature

The use of standardized nomenclature in all fields of science and medicine is an essential step toward the integration and linking of scientific information reported in published literature. We will enforce the use of correct and established nomenclature wherever possible:

We strongly encourage the use of SI units. If you do not use these exclusively, please provide the SI value in parentheses after each value. Examples:

- s for second
- min for minute
- h for hour
- L for liter
- m for meter
- kDa for mass in kilodaltons
- 5 mM rather than  $5 \times 10^{-3}$  M or 0.005 M

Species names should be italicized (e.g., *Homo sapiens*).

Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database, e.g., HUGO for human genes. It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text.

#### **Subject sections (and subsections)**

Eight to nine issues per year of the Brazilian Journal are organized into sections of **Biosciences** and authors should specify in the cover letter the specific section in which they prefer to publish their paper.

- Biochemistry and Molecular Biology
- Cell Biology
- Experimental Biology
- Immunology
- Neurosciences and Behavior
- Pharmacology
- Physiology and Biophysics

Three to four issues per year are dedicated to **Clinical Investigation** and authors should specify in the cover letter the specific section in which they prefer to publish their paper.

- Analytical, diagnostic and therapeutic techniques and instruments
- Blood, immunology and organ transplantation
- Cardiovascular, respiratory and sport medicine
- Digestive system
- Endocrine diseases, nutrition and metabolism
- Environmental factors of diseases
- Health care and community medicine
- Infectious agents and diseases
- Kidney and extracellular environment

- Neonatal medicine, growth and development
- Oncology
- Psychological processes, behavior and mental diseases
- Reproductive medicine
- Skeletal, muscle and nervous systems
- Skin and connective tissue diseases
- Surgical procedures, anesthesia and analgesia

### **Full-length paper**

Each manuscript should clearly state its objective or hypothesis; the experimental design and methods used (including the study setting and time period, patients or participants with inclusion and exclusion criteria, or data sources and how these were selected for the study); the essential features of any interventions; the main outcome measures; the main results of the study, and a section placing the results in the context of published literature.

The manuscript should contain:

- abstract of no more than 250 words
- no more than 6 key words
- a running title to be used as a page heading, which should not exceed 60 letters and spaces
- the text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion), without a separate section for conclusions
- no more than 40 references (without exceptions)

### **Organization of the Manuscript**

#### **Title Page**

##### **Title**

The title should be as short and informative as possible, should not contain non-standard acronyms or abbreviations, and should not exceed two printed lines.

Example:

**Single-step purification of crotapotin and crotactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing**

Please also provide a brief "running title" of approximately 60 characters.

Example:

**Purification of crotapotin and crotactine**

##### **Authors and Affiliations**

Initials and last name(s) of author(s) (matched with superscript numbers identifying institutions). Institution(s) (Department, Faculty, University, city, state, country) of each author (in Portuguese if authors are from Brazil).

Example:

A.S. Aguiar<sup>1</sup>, A.R. Melgarejo<sup>1</sup>, C.R. Alves<sup>2</sup> and S. Giovanni-De-Simone<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Divisão de Animais Peçonhentos, Instituto Vital Brazil, Niterói, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Microsequenciamento de Proteínas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil

**One of the authors** should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list, and the summary of the author contributions to the study are accurate and complete. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and affiliations should be listed after the Acknowledgments.

**Corresponding author:** Name, complete mailing address, including zip code, telephone number, Fax number and E-mail of author to whom correspondence should be sent.

**Acknowledgment** of research grants and fellowships (agency and grant number).

#### **Key Words**

A list of key words or indexing terms (no more than 6) should be included. A capital letter should be used for the first letter of each key word, separated by a semicolon. The Journal recommends the use of medical subject headings of Index Medicus for key words to avoid the use of several synonyms as entry terms in the index for different papers on the same subject. Remember, key words are used by the Scielo Database (see [http://www.scielo.br/bjmbr;articles search/subject](http://www.scielo.br/bjmbr;articles%20search/subject)) to index published articles.

#### **Running title**

This short title, to be used as a page heading, should not exceed 60 letters and spaces.

#### **Abstract**

Since abstracts are published separately by Information Services, they should contain sufficient hard data, to be appreciated by the reader. The Brazilian Journal publishes unstructured abstracts.

The abstract should briefly and clearly present the problem, experimental approach, new results as quantitative data if possible, and conclusions. It should mention the techniques used without going into methodological detail and mention the most important results.

Abbreviations should be kept to a minimum and should be defined in both the Abstract and text.

Please do not include any reference citations in the abstract. If the use of a reference is unavoidable, the full citation should be given within the abstract.

The abstract should not exceed 250 words and should be written as a single paragraph double-spaced on a separate page following the title page.

Please see <[http://www.bjournal.com.br/writing\\_a\\_good\\_abstract.html](http://www.bjournal.com.br/writing_a_good_abstract.html)> for suggestions on writing a good abstract

#### **Introduction**

The Introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the introduction, think of readers who are not experts in this field. This should state the purpose of the investigation and justification for undertaking the research and relationship to other work in the field. An extensive listing or review of the literature should not be used. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about what was achieved.

### **Material and Methods**

Sufficient information should be provided in the text or by referring to papers in generally available journals to permit the work to be repeated.

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. We encourage authors to submit, as separate files, detailed protocols for newer or less well-established methods. These will be linked to the article and will be fully accessible.

### **Results**

The results should be presented clearly and concisely. Tables and figures should be used only when necessary for effective comprehension of the data. In some situations, it may be desirable to combine Results and Discussion into a single section. The Results section should provide results of all of the experiments that are required to support the conclusions of the paper. There is no specific word limit for this section, but a description of experiments that are peripheral to the main message of the article and that detract from the focus of the article should not be included. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supplemental files; these are published online alongside the accepted article. The Results section should be written in past tense.

### **Discussion**

The purpose of the Discussion is to identify new and relevant results and relate them to existing knowledge. Information given elsewhere in the text, especially in Results, may be cited but all of the results should not be repeated in detail in the Discussion. The Discussion should spell out the major conclusions and interpretations of the work including some explanation of the significance of these conclusions. How do the conclusions affect the existing assumptions and models in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done? The Discussion should be concise and tightly argued. If warranted, the Results and Discussion may be combined into one section.

### **Acknowledgments**

When appropriate, briefly acknowledge technical assistance, advice and contributions from colleagues. People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments, along with their contributions. Donations of animals, cells, or reagents should also be acknowledged. You must also ensure that anyone named in the

Acknowledgments agrees to being so named. Financial support for the research and fellowships should be acknowledged on the title page.

### **Figures**

Figures must be submitted in high-resolution version (600 dpi). Please ensure that the files conform to our [Guidelines for Figure Preparation](#) when preparing your figures for production.

### **Preparing figure files for submission**

Brazilian Journal of Medical and Biological Research encourages authors to use figures where this will increase the clarity of an article. The use of color figures in articles is free of charge. The following guidelines must be observed when preparing figures. Failure to do so is likely to delay acceptance and publication of the article.

- Each figure of a manuscript should be submitted as a single file.
- Tables should NOT be submitted as figures but should be provided as separate files in Word (.doc).
- Figures should be numbered in the order they are first mentioned in the text, and uploaded in this order.
- Figure titles and legends should be provided in the main manuscript, not in the graphic file.
- The aim of the figure legend should be to describe the key messages of the figure, but the figure should also be discussed in the text. An enlarged version of the figure and its full legend will often be viewed in a separate window online, and it should be possible for a reader to understand the figure without moving back and forth between this window and the relevant parts of the text. Each legend should have a concise title of no more than 15 words. The legend itself should be succinct, while still explaining all symbols and abbreviations. Avoid lengthy descriptions of methods.
- Each figure should be closely cropped to minimize the amount of white space surrounding the illustration. Cropping figures improves accuracy when placing the figure in combination with other elements, when the accepted manuscript is prepared for publication on our site. For more information on individual figure file formats, see [Guidelines for figures](#).
- Individual figure files should not exceed 5 MB. If a suitable format is chosen, this file size is adequate for extremely high quality figures.
- Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures (or tables) that have previously been published elsewhere. In order for all figures to be open-access, authors must have permission from the rights holder if they wish to include images that have been published elsewhere in non-open-access journals. Permission should be indicated in the figure legend, and the original source included in the reference list.

### **Tables**

- Tables must be submitted in word (.doc) or Excel (.xls).
- Tables must be numbered consecutively with Arabic numerals in the text.

- Tables must have a concise and descriptive title.
- All explanatory information should be given in a footnote below the table. Footnotes should be used to explain abbreviations and provide statistical information.
- All abbreviations must be defined in this footnote, even if they are explained in the text.
- Tables must be understandable without referring to the text.
- Each table should be submitted in a separate file. They should be uploaded after the manuscript file, in numerical order. Tables occupying more than one printed page should be avoided, if possible.
- Vertical and diagonal lines should not be used in tables; instead, indentation and vertical or horizontal space should be used to group data.
- Adapting/Reproducing Tables and Relevant Permissions. Acknowledgments of original sources of copied material should be given as a reference in the table footnote.
- Tables in Excel must be cell-based; do not use picture elements, text boxes, tabs, or returns in tables.

### References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Meeting abstracts, conference talks, or papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only. All personal communications should be supported by a letter from the relevant authors. Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. When possible, references which are easily available in English should be cited.

The BJMBR uses the numbered citation (citation-sequence) method. References are listed and numbered in the order that they appear in the text. In the text, citations should be indicated by the reference number in parentheses. Multiple citations within a single set of parentheses should be separated by commas without a space (1,5,7) . Where there are more than three sequential citations, they should be given as a range. Example: "...has been shown previously (4–9)." Make sure the parts of the manuscript are in the correct order before numbering the citations.

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. For all references, list the first 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages,

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research follows the reference format of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which can be found on the website of the National Library of Medicine ([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)). Use the Medline journal abbreviations and follow the reference style shown on the Website noted above, with several exceptions. See below for details. If the author uses the program "Reference Manager", copy the file containing the style of the Brazilian Journal of Medical and Biological Research and place it in the folder of "Styles". When submitting the manuscript, send the file produced in Reference Manager (".rmd" and ".rmx" ) as an attachment.

Please use the following style for the reference list:

**Published Papers.** First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation in italics), Year, Volume, Complete Pages.

Lammers AE, Hislop AA, Flynn Y, Haworth SG. The 6-minute walk test: normal values for children of 4-11 years of age. *Arch Dis Child* 2008; 93: 464-468.

Zhang Q, Malik P, Pandey D, Gupta S, Jagnandan D, Belin de CE, et al. Paradoxical activation of endothelial nitric oxide synthase by NADPH oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1627-1633.

National Heart Lung and Blood Institute. Global Initiative for Asthma (GINA). *Global strategy for asthma management and prevention: NHLBI/WHO Workshop Report*. Bethesda: National Institute of Health. National Heart, Lung and Blood Institute publication No. 02-3659; 2006.

**Article accepted for publication but not yet published.** First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year of expected publication, (in press) at the end of the citation.

Janiszewski M, Lopes LR, Carmo AO, Pedro MA, Brandes RP, Santos CXC, et al. Regulation of NAD(P)H oxidase by associated protein disulfide isomerase in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005 (in press).

**Electronic Journal Articles** (Online Journals). Ensure that URLs are active and available.

American Academy of Ophthalmology. Diabetic retinopathy disease severity scale. *Am Acad Ophthalmol* [http://www.aaopt.org/education/library/recommendations/international\\_dr.cfm](http://www.aaopt.org/education/library/recommendations/international_dr.cfm); 2005. Accessed 11 August 2006.

Simon JA, Hudes ES. Relationship of ascorbic acid to blood lead levels. *JAMA* <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/abstract/281/24/2289>; 1999. Accessed 11 August 2006.

**Internet Communication.** Ensure that URLs are active and available.

Brasil. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade: pesquisa da população brasileira. <http://www.abeso.org.br>. Accessed February 22, 2008.

Information behaviour of the researcher of the future, CIBER Report. <http://www.bl.uk/news/2008/pressrelease20080116.html>.

CAPES Statistics. <http://www.capes.gov.br/capes/portal>. Accessed March 16, 2006.

CNPq Plataforma Lattes, "Investimentos do CNPq em CT&I". <http://fomentonacional.cnpq.br/dmfomento/home/index.jsp>. Accessed March 16, 2006.

**Audiovisual Material**

*Physician's Desk Reference (PDR)*. Release 2003.1AX. [CD-ROM]. Montvale: Thomson PDR; 2003.

**Computer Program**

Dean AG, Dean JA, Coulombier D, Brendel KA, Smith DC, Burton AH, et al. *Epi info, version 6.04: a word processing database and statistics program for public health on IBM-compatible microcomputers*. [Computer program]. Atlanta: Centers of Disease Control and Prevention; 1998.

*Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*. Version 12.0. [Computer program]. Chicago: SPSS Inc.; 2006.

#### Patent

Larsen CE, Trip R, Johnson CR. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. Patent No. 5.529.067. Novoste Corporation; 1995.

**Book, Whole.** Authors, Book title, Edition, City, Publisher, Year.

American College of Sports Medicine. *Diretrizes do ACSM para os testes de esforço e sua prescrição*. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan; 2007.

**Book, Chapter.** Authors, Chapter Title, Editors, Book title, Edition, City, Publisher, Year, Pages of citation.

Kronfol A. Behavioral effects of cytokines: a psychiatrist's perspective. In: Plotnikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Good RA (Editors), *Cytokines stress and immunity*. London: CRC Press; 2007. p 1-16.

Kintzios SE. What do we know about cancer and its therapy? In: Kintzios SE, Barberaki MG (Editors), *Plants that fight cancer*. New York: CRC Press; 2004. p 1-14.

#### Report

WHO (World Health Organization), IPCS (International Program in Chemical Safety). *Environmental health criteria: 118 Inorganic mercury*. Geneva: World Health Organization; 1991.

National Commission on Sleep Disorders Research. *Wake up America: a national sleep alert*. Washington: Government Printing Office; 1993.

#### Thesis

Joselevitch C. Visão no ultravioleta em *Carassius auratus* (Ostariophysi, Cypriformes, Cyprinidae): estudo eletrofisiológico do sistema cone - células horizontais. [Master's thesis]. São Paulo: Instituto de Psicologia, USP; 1999.

**Conference, Symposium Proceedings.** Cite papers only from published proceedings.

Hejzlar RM, Diogo PA. The use of water quality modelling for optimising operation of a drinking water reservoir. *Proceedings of the International Conference Fluid Mechanics and Hydrology*. 1999 Jun 23-26; Prague. Prague: Institute of Hydrodynamics AS CR; 1999. p 475-482.

**"Unpublished results", "Personal communication" and "Submitted papers"**. Reference should appear in the text with the individual name(s) and initials and not in the reference list.

(Santos CS, da-Silva GB, Martins LT, unpublished results).

It is assumed that the author has obtained permission from the source when "personal communication" is cited.

**Abstract.** First 6 authors followed by et al., Title, Journal (abbreviation), Year, Volume, Complete Pages (Abstract).

Lima SM, Bonci DM, Grotzner SR, Ribeiro CA, Ventura DF. Loss of amacrine cells in MeHg-treated retinæ in a tropical fish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: E-5172 (Abstract).