

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – ICBS

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO SOBRE OS NÍVEIS DE
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E PROTEÍNAS APOPTÓTICAS NO
HIPERTIREOIDISMO EXPERIMENTAL**

Rayane Brinck Teixeira

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

CO-ORIENTADORA: Dra. Cristina Campos Carraro

PORTO ALEGRE

2015

Rayane Brinck Teixeira

**PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO SOBRE OS NÍVEIS DE
CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E PROTEÍNAS APOPTÓTICAS NO
HIPERTIREOIDISMO EXPERIMENTAL**

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

**Orientador: Prof. Dr. Alex Sander
da Rosa Araujo**

**Co-orientadora: Dra. Cristina
Campos Carraro**

PORTO ALEGRE

2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Alex Sander Araujo e a minha co-orientadora Cristina Campos Carraro por todo o auxílio e ensinamentos, que foram fundamentais ao longo da realização deste trabalho.

A professora Adriane belló-Klein por todo o suporte para a realização desta pesquisa.

A Tânia Regina Fernandes pelo apoio técnico.

Aos demais colegas integrantes do laboratório de fisiologia cardiovascular e espécies reativas de oxigênio, cujo apoio foi indispensável para a realização dos experimentos.

A professora Ilma Simoni Brum e a aluna de pós-doc Lolita, pelo auxílio prestado para a análise de p53 por western blot.

Aos professores do programa de pós-graduação em fisiologia, pelos ensinamentos durante o meu mestrado.

Ao meu amado namorado André Figueiredo, por todo o apoio e compreensão.

A Deus e a minha família por estarem sempre presentes, em todos os momentos da minha vida, contribuindo para minha formação pessoal e profissional.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 HORMÔNIOS DA TIREOIDE E HIPERTIREOIDISMO.....	15
1.2 HIPERTIREOIDISMO, HIPERTROFIA E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA	18
1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	21
1.4 INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	23
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE	25
2 JUSTIFICATIVA	28
3 HIPÓTESE	29
4 OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO GERAL.....	30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5 MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
5.2 ANIMAIS	31
5.3 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL.....	32
5.4 DESCARTE DE ANIMAIS E MATERIAIS TÓXICOS	33
5.5 INDUÇÃO AO HIPERTIREOIDISMO	34
5.6 COLETA DE SANGUE	34
5.7 DOSAGEM HORMONAL.....	35
5.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	35
5.9 PREPARAÇÃO DO HOMOGENEIZADO DO VENTRÍCULO ESQUERDO	36
5.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	37
5.11 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO	37
5.11.1 Avaliação da concentração de espécies reativas totais pela oxidação de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH)	37
5.11.2 Determinação de H ₂ O ₂	37
5.11.3 Determinação do conteúdo de sulfidrilas	38
5.11.4 Avaliação da atividade da tioredoxina redutase	39

5.11.5 Avaliação da atividade de glutarredoxina	39
5.12 ANÁLISES RELACIONADAS AO METABOLISMO.....	39
5.12.1 Avaliação da atividade das enzimas glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD) e 6 fosfogluconato desidrogenase (6PGD)	40
5.12.2 Avaliação da atividade da Lactato desidrogenase (LDH)	40
5.13 ANÁLISES DE PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS E APOPTÓTICAS.....	41
5.13.1 Quantificação das Proteínas Inflamatórias por “ELISA”	41
5.13.2 Análise de Proteínas de sinalização celular por “Western Blot”.....	41
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
7 RESULTADOS.....	45
7.1 DOSAGEM HORMONAL	45
7.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	45
7.2.1 Peso corporal.....	45
7.2.2 Peso dos órgãos.....	46
7.2.3 Índices de hipertrofia.....	47
7.3 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO	48
7.3.1 Espécies reativas totais	48
7.3.2 Níveis de H ₂ O ₂ no VE	49
7.3.3 Níveis de grupos sulfidrilas no plasma e VE.....	50
7.3.4 Atividade da tiorredoxina redutase no eritrócito	52
7.3.5 Atividade da glutarredoxina no eritrócito	53
7.4 ANÁLISES RELACIONADAS AO METABOLISMO.....	54
7.4.1 Atividade das enzimas G6PD e 6PGD no eritrócito	54
7.4.2 Níveis plasmáticos de LDH.....	57
7.5 ANÁLISES DE PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS E APOPTÓTICAS.....	58
7.5.1 Quantificação de Proteínas Inflamatórias por “ELISA”	58
7.5.2 Quantificação de proteínas de sinalização celular por “Western Blot” ...	60
8 DISCUSSÃO	64
9 CONCLUSÃO	72
10 PERSPECTIVAS.....	73
11 REFERÊNCIAS.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Períodos de coleta de sangue através do plexo venoso retro-orbital.....	34
Figura 2. Peso corporal dos grupos controle e T4.....	46
Figura 3. Análise temporal dos níveis plasmáticos de EROs total nos grupos controle e T4.	49
Figura 4. Análise do conteúdo de H ₂ O ₂ em VE nos grupos controle e T4.....	50
Figura 5. Análise temporal do conteúdo plasmático de sulfidrilas nos grupos controle e T4.	51
Figura 6. Análise do conteúdo de sulfidrilas em VE nos grupos controle e T4.....	52
Figura 7. Análise temporal da atividade da tioredoxina redutase em eritrócitos nos grupos controle e T4.....	53
Figura 8. Análise temporal da atividade da glutarredoxina em eritrócitos nos grupos controle e T4.....	54
Figura 9. Análise temporal da atividade total de G6PD em eritrócitos dos grupos controle e T4.	55
Figura 10. Análise temporal da atividade de G6PD em eritrócitos dos grupos controle e T4.	56
Figura 11. Análise temporal da atividade da 6PGD em eritrócitos dos grupos controle e T4.	57
Figura 12. Análise temporal da atividade plasmática de LDH nos grupos controle e T4.....	58
Figura 13. Análise temporal dos níveis plasmáticos de: (A) IL-10, (B) TNF- α e (C) razão IL-10/TNF- α nos grupos controle e T4.....	60

Figura 14. Imagem representativa das bandas e respectivos gráficos normalizados por Ponceau de p53 (A), HSP70 (B), HIF1- α (C) e caspase-9 (D) nos grupos controle e T4.	61
Figura 15. Imagem representativa das bandas e respectivos gráficos normalizados por Ponceau de PGC1- α (A), Bcl ₂ (B), Bax (C) e razão Bax/Bcl ₂ (D) nos grupos controle e T4.	63
Figura 16. Esquema de uma possível via de sinalização dos hormônios da tireoide, levando ao estresse oxidativo e morte celular.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados na técnica de western blot.	42
Tabela 2. Níveis hormonais de T3 e T4 e razão T3/T4.	45
Tabela 3. Peso do coração total, VE e peso total dos rins.	47
Tabela 4. Índices de hipertrofia cardíaca e renal.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT - alanina transaminase

ARNT - translocador nuclear do receptor de hidrocarboneto arila

AST - aspartato transaminase

ATP - trifosfato de adenosina

BH1 - Domínio Bcl₂ homologia 1

BH2 - Domínio Bcl₂ homologia 2

BH3 - Domínio Bcl₂ homologia 3

CAT - catalase

CPK - creatina fosfocinase

DCFH - 2, 7-diclorofluoresceína

DIT - 3,5-diiodotirosina

DTNB - 5'5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)

ERK 1/2 - (cinase regulada por sinal extracelular 1/2)

ERNs - espécies reativas de nitrogênio

EROs - espécies reativas de oxigênio

G6PD - glicose 6 fosfato desidrogenase

GGT - gama glutamil transferase

GPx - glutathiona peroxidase

GRD - GSSG redutase

GSH - glutathiona

GSSG - glutathiona oxidada

H₂O - água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

HIF1- α - fator 1- α induzido por hipóxia

HSP70 - proteína de choque térmico 70

I⁻ - Iodeto

ICAM-1 - molécula de adesão intracelular 1

IKK - complexo I κ B cinase

IL-10 - interleucina 10

IL-6 - interleucina 6

I κ B - inibidora do κ B

KC - quimiocina derivada de queratinócitos

LDH - lactato desidrogenase

MIT - 3-monoiodotirosina

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NADP⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido

NCX - permutador de Na⁺ / Ca²⁺

NF κ β - fator nuclear kappa beta

NO - óxido nítrico

NRFs - fatores respiratórios nucleares

O₂ - oxigênio

O₂⁻ - radical ânion superóxido

PGC1- α - co-ativador 1- α do receptor ativado por proliferador do

peroxissoma

6PGD - 6 fosfogluconato desidrogenase

Prx - peroxiredoxina

R-SSG - proteína S-glutatiolada

rT3 - 3,3',5'-triodotironina

SDS-PAGE - dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida

SERCA - Ca²⁺- ATPase do retículo sarcoplasmático

-SH - grupos sulfidrilas

SOD - superóxido dismutase

T3 - 3,5,3'-triodotironina

T4 - 3,5,3',5'-tetraiodotironina, L-tiroxina

TNB - ácido 5-tio-2-nitrobenzóico

TNF- α - fator de necrose tumoral α

TR nuclear - receptor do hormônio tireoideano

TSH – tireotropina

VE - ventrículo esquerdo

RESUMO

No sistema cardiovascular, os hormônios da tireoide exercem uma importante ação, influenciando a captação de cálcio, o inotropismo e o cronotropismo cardíaco e a resistência vascular periférica. No entanto, uma exacerbação destas ações, causada pelo aumento da secreção dos hormônios da tireoide, gera uma quebra desta homeostase e o desenvolvimento de hipertireoidismo. O hipertireoidismo leva ao aumento do consumo de oxigênio, gerando uma situação de estresse oxidativo. A exposição crônica ao estresse oxidativo leva à ativação de fatores de transcrição e citocinas, causando hipertrofia de cardiomiócitos e progressão para insuficiência cardíaca com inflamação e apoptose. Logo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel dos hormônios da tireoide sobre a ativação de vias inflamatórias e apoptóticas mediada pelo estresse oxidativo.

Neste estudo, nós avaliamos parâmetros de estresse oxidativo e algumas citocinas envolvidas com as vias de sinalização inflamatória e apoptótica. Para isso, utilizamos 60 ratos wistar, divididos em 2 grupos: Controle e Tratado (T4), com um n de 30 animais por grupo. O grupo T4 foi submetido à indução de hipertireoidismo através da adição de L-tiroxina (T4 – 12mg/L) na água de beber por 28 dias. O grupo controle não recebeu tratamento com L-tiroxina.

Houve desenvolvimento de hipertireoidismo e indução de hipertrofia cardíaca no grupo T4. Verificamos também o aumento de H_2O_2 no coração e redução de -SH em eritrócitos no grupo T4. Houve aumento de LDH no grupo T4,

indicando dano tecidual. Por fim, houve redução de PGC1- α , além de uma redução do p53 e de Bcl₂ e aumento da razão Bax/Bcl₂ no grupo T4.

Os resultados apontam para a ocorrência de estresse oxidativo, o que com potencial dano induziu uma redução de PGC1- α e de p53, que podem estar relacionados à ativação de proteínas apoptóticas, como observado pelo aumento da razão Bax/Bcl₂ no grupo tratado.

Palavras-chave: *hipertireoidismo, hormônios da tireoide, espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo, hipertrofia cardíaca, inflamação, apoptose.*

ABSTRACT

In the cardiovascular system, the thyroid hormones play an important action, influencing the uptake of calcium, the cardiac inotropy and chronotropy and peripheral vascular resistance. However, an exacerbation of these actions, caused by increased secretion of thyroid hormones, generates a breach of this homeostasis and could lead to development of hyperthyroidism. Hyperthyroidism leads to increased oxygen consumption, generating oxidative stress. Chronic exposure to oxidative stress leads to the activation of transcription factors and cytokines, causing cardiomyocyte hypertrophy and progression to heart failure with inflammation and apoptosis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the role of thyroid hormones on the activation of inflammatory pathways and apoptotic mediated by oxidative stress.

In this study, we evaluated some oxidative stress parameters and cytokines involved in inflammatory and apoptosis signaling pathways. For this, we used 60 Wistar rats, divided into 2 groups: control and treated (T4), with an n of 30 animals per group. The group T4 was subjected to hyperthyroidism induction by the addition of L-thyroxine (T4 - 12mg / L) in their drinking water for 28 days. The control group received no treatment with L-thyroxine.

There was development of hyperthyroidism and induction of cardiac hypertrophy in the T4 group. We noticed the increase of H_2O_2 in the heart and reduced -SH in erythrocytes in the T4 group. There was LDH increase in the T4 group, indicating tissue damage. Finally, a reduction of PGC1- α , as well as a reduction of p53 and Bax/Bcl₂ ratio increase in the T4 group.

The results point to the occurrence of oxidative stress, which with potential damage induced a PGC1- α and p53 reduction, which can be related to the activation of apoptotic proteins, as observed by increased Bax / Bcl₂ ratio in the treated group.

Keywords: *hyperthyroidism, thyroid hormones, reactive oxygen species, oxidative stress, cardiac hypertrophy, inflammation, apoptosis.*

1 INTRODUÇÃO

1.1 HORMÔNIOS DA TIREOIDE E HIPERTIREOIDISMO

A tireoide é uma das maiores glândulas endócrinas. Está localizada ântero-lateralmente à traqueia e é composta por dois lobos, conectados por um istmo. A tireoide possui células denominadas células C, que são responsáveis pela secreção de calcitonina, um hormônio regulador do cálcio. A unidade funcional da tireoide é o folículo tireoideo, responsável pela produção e secreção dos hormônios da tireoide, que são secretados no lúmen folicular, preenchido por coloide. As células foliculares concentram iodeto (I^-), que é fundamental para a produção dos hormônios da tireoide (Silverthorn, 2010; Koeppen & Stanton, 2009).

A síntese e a secreção de hormônios pela tireoide são reguladas por um sistema de *retroalimentação* negativa (eixo hipotálamo-hipófise-tireoide) (Yen, 2001). No coloide, o I^- é oxidado a iodo pela ação do peróxido de hidrogênio. Em seguida, o iodo se liga à posição 3 do anel de tirosina, na molécula de tireoglobulina, pela ação da enzima tireoide peroxidase, formando 3-monoiodotirosina (MIT). A adição de outro iodo à posição 5 da MIT, pela ação da tireoide peroxidase forma 3,5-diiodotirosina (DIT). Em seguida, são formados os hormônios T4 (3,5,3',5'-tetraiodotironina), pela junção de dois DITs, e em menor quantidade os hormônios T3 (3,5,3'-triiodotironina) e seu inibidor competitivo T3 reverso (3,3',5'-triiodotironina; rT3), pela junção de um MIT e um DIT. Após sua formação, os hormônios são separados da tireoglobulina pela ação de proteases lisossomais e liberados na circulação (Gregory, 2000). Diariamente, são

produzidos pela tireoide cerca de 100 µg de T4. O T3 é o hormônio com maior atividade metabólica, sendo produzidos 30 µg, das quais 20% são produzidas na tireoide e 80% por deiodinação do T4 na circulação (Leonard, Koehrle, 1996).

Existem dois mecanismos de ação dos hormônios da tireoide: o genômico e o não genômico. Na ação genômica, após ser liberado na circulação, o T3 liga-se ao receptor do hormônio tireoideano (TR nuclear), que funciona como um fator de transcrição dependente do ligante e controla a expressão de genes específicos. Nos mamíferos, existem três isoformas TR: TR α 1, TR β 1 e TR β 2, que estão envolvidas na sinalização genômica. A ação não genômica ocorre por meio da regulação de cascatas de sinalização celular. Os hormônios da tireoide ativam a cinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2), através do receptor de integrina α V β 3. A ativação da ERK 1/2 regula vários eventos celulares, como o tráfego e a ativação de proteínas (Cao *et al.*, 2009).

Os hormônios da tireoide exercem um papel chave no metabolismo, sendo importantes para o desenvolvimento e manutenção cerebral, agindo na migração e diferenciação das células neurais, na sinaptogênese, e na mielinização (Bernal, 2007). Os hormônios da tireoide também são importantes para a manutenção do tônus vascular, níveis de lipídios e consumo de oxigênio, crescimento e desenvolvimento ósseo e captação de glicose pelas células ósseas. Além disso, são responsáveis pela manutenção em condições fisiológicas da função das células musculares lisas, do tecido adiposo, de fibroblastos, do sistema vascular periférico e da homeostase cardíaca, uma vez que o excesso dos hormônios causa aumento da taxa metabólica, angiogênese cardíaca, diminuição da resistência periférica total e do tônus vascular e fibrose do ventrículo esquerdo

(VE) (Dillmann, 2010; Zoidis *et al.*, 2012). No sistema cardiovascular, em particular, os hormônios da tireoide exercem um conjunto de diversas ações que influenciam a contratilidade e o relaxamento do miocárdio, a captação de cálcio, a coordenação das respostas dos mecanismos eletroquímicos e mecânicos do miocárdio, o inotropismo e o cronotropismo cardíaco e a resistência vascular periférica (Fazio *et al.*, 2004; Weltman *et al.*, 2012). Além disso, os hormônios da tireoide, principalmente o T3, regulam a síntese e a ação de diversas proteínas cardíacas, como as subunidades α e β da cadeia pesada da miosina, a Ca^{2+} -ATPase (SERCA) do retículo sarcoplasmático, o permutador de $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX), o fosfolamban e os canais de potássio (Klein & Ojamaa, 2001).

Devido a sua grande influência no funcionamento de diversos órgãos e funções celulares, é importante que a atividade da glândula tireoide, a produção e liberação de seus hormônios, bem como sua regulação, mantenham-se sob condições fisiológicas, uma vez que alterações da função da tireoide, tal como o hipertireoidismo, podem causar diversas consequências para o organismo (Vargas *et al.*, 2006).

O hipertireoidismo é caracterizado pelo aumento da produção e secreção dos hormônios T3 e T4 e diminuição dos níveis de tireotropina (TSH). Os principais fatores que levam ao desenvolvimento de hipertireoidismo são: a doença de Graves (doença autoimune na qual anticorpos ativam o receptor do TSH, causando hiperfunção da glândula tireoide), o bócio tóxico multinodular e o carcinoma de tireoide (Ploski *et al.*, 2011; Henry, 1999).

O excesso dos hormônios da tireoide gera consequências como o aumento da taxa metabólica cardíaca, do volume sanguíneo, do débito cardíaco, da força e

velocidade sistólica, da velocidade de relaxamento diastólico, e da angiogênese cardíaca e diminuição da resistência periférica total e do tônus vascular. A elevação na taxa metabólica cardíaca gera uma propensão para a ocorrência de fibrilação atrial (Klein & Ojamaa, 2001; Dillmann, 2010). O hipertireoidismo crônico pode ocasionar remodelamento cardíaco deletério, fibrose do ventrículo esquerdo e declínio da função cardíaca (Weltman *et al.*, 2012). Dentre os principais sintomas cardiovasculares do hipertireoidismo estão: palpitação, fibrilação atrial (5 a 10% dos pacientes), aumento da pressão arterial sistólica e diminuição da diastólica e aumento da pressão de pulso (Fazio *et al.*, 2004).

1.2 HIPERTIREOIDISMO, HIPERTROFIA E INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

As alterações geradas pelo hipertireoidismo levam a uma sobrecarga cardíaca, o que gera como resposta adaptativa a ativação de mecanismos que induzem o crescimento dos cardiomiócitos com o objetivo de melhorar a função contrátil, reduzir o estresse da parede ventricular, e/ou compensar o aumento da demanda hemodinâmica (Suarez *et al.*, 2010). Este processo é conhecido como hipertrofia cardíaca. A hipertrofia cardíaca pode ocorrer como um processo fisiológico em resposta a uma sobrecarga cardíaca de curto prazo e não causar efeitos adversos ao organismo. Porém, quando a sobrecarga ocorre de forma crônica, por exemplo, no hipertireoidismo crônico, a hipertrofia torna-se um processo patológico e podem ocorrer diversos efeitos adversos, levando ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca (Li *et al.*, 2007).

Os hormônios da tireoide podem controlar a expressão do co-ativador 1- α do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC1- α) e ativar a sua cascata de transcrição através de uma via indireta. Foi demonstrado que o tratamento de ratos com hormônios da tireoide induz o aumento do consumo cardíaco de oxigênio, da capacidade bioenergética mitocondrial e da expressão de marcadores de biogênese mitocondrial, como o PGC1- α e sua cascata de sinalização (Goldenthal *et al.*, 2004).

O PGC1- α está presente em tecidos com alta atividade oxidativa, como o coração e o tecido adiposo marrom, e em menor extensão no músculo esquelético e rins. O PGC1- α interage e coativa outros fatores de transcrição, como fatores respiratórios nucleares (NRFs), hormônios da tireoide, glicocorticoides e estrogênio. Este fator de transcrição tem sua atividade rapidamente aumentada em condições de aumento da demanda energética, como o frio e exercício físico. O PGC1- α é descrito como o principal regulador da biogênese mitocondrial (Ventura-Clapier *et al.*, 2008). Outras ações importantes do PGC1- α são a de regulação sistêmica da homeostase do lactato, utilizado diretamente como fonte de energia pelo coração, e a regulação da atividade do ciclo das pentoses (Summermatter *et al.*, 2010; Summermatter *et al.*, 2013).

O aumento de PGC1- α induz o aumento da atividade da glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD), uma enzima do ciclo das pentoses. Concomitante a este aumento, o PGC1- α induz ao aumento de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) e redução correspondente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado (NADP⁺). O NADPH é produzido em maior

quantidade pelo ciclo das pentoses e é o principal agente redutor da glutathiona, sendo importante para a defesa antioxidante (Summermatter *et al.*, 2010).

O aumento de PGC1- α leva ao aumento da enzima lactato desidrogenase (LDH) no coração (Summermatter *et al.*, 2013). Em modelo experimental de hipertireoidismo, ocorre também aumento da atividade plasmática da LDH (Messarah *et al.*, 2011). Este aumento, junto com o aumento das enzimas aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT), gama glutamil transferase (GGT) e creatina fosfocinase (CPK), sugere que o tratamento excessivo do animal com tiroxina pode causar lesões e disfunções cardíacas (Messarah *et al.*, 2011).

Durante o crescimento patológico do coração ocorre diminuição da ativação de PGC1- α . Uma pesquisa que investigou a origem da diminuição da capacidade oxidativa do músculo cardíaco na patogênese da insuficiência cardíaca demonstrou que a diminuição da função mitocondrial no músculo cardíaco seguida da sobrecarga de pressão está relacionada com a diminuição da atividade de PGC1- α e de sua via de sinalização (Garnier *et al.*, 2003). A severa deficiência de energia e a diminuição da expressão de PGC1- α são características de disfunção cardíaca, o que leva a um metabolismo energético prejudicado, contribuindo para uma diminuição na contração muscular (Ventura-Clapier *et al.*, 2008).

Segundo Araujo e colaboradores (2006), há uma correlação positiva entre a hipertrofia cardíaca e o estresse oxidativo, indicando que as espécies reativas de oxigênio (EROs) podem contribuir para a progressão à insuficiência cardíaca no modelo experimental de hipertireoidismo. Isso pode ser devido aos hormônios da tireoide serem os maiores reguladores do metabolismo energético oxidativo a nível

mitocondrial, induzindo o aumento do consumo de oxigênio e da formação de EROs.

1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Durante o processo de geração de trifosfato de adenosina (ATP), nas mitocôndrias, são formadas baixas concentrações de EROs, tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As EROs são agentes derivados do O_2 com alta capacidade oxidante, que associadas ao óxido nítrico (NO) funcionam como iniciadoras da sinalização celular (Ago *et al.*, 2011; Cohen & Tong, 2010). Entretanto, existem substâncias antioxidantes endógenas que controlam as EROs, diminuindo ou prevenindo a oxidação de substratos.

Os principais agentes antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase (SOD) (superóxido dismutase manganês e superóxido dismutase cobre/zinco - MnSOD, Cu/Zn SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (Cohen & Tong, 2010; Paravicini & Touyz, 2008). Após sua formação, o $O_2^{\cdot-}$ é dismutado pela SOD para H_2O_2 , o qual pode ser posteriormente convertido em água (H_2O) e oxigênio (O_2) por diversos tipos de peroxidases, como GPx, CAT ou peroxiredoxina (Prx) (sistema tioredoxina-peroxidases) (Cox *et al.*, 2010). A GPx é a enzima que converte a glutathione (GSH) à forma oxidada (GSSG) e reduz hidroperóxidos como o H_2O_2 . Contudo, a GSSG não permanece nessa forma oxidada e poderá ser reduzida para a forma GSH pela GSSG redutase (GRD), através da utilização de NADPH (Gul *et al.*, 2006). Neste processo, a glutarredoxina 1, uma tioltransferase, catalisa a redução da proteína S-glutatiolada

(R-SSG) na presença de NADPH e GRD. Esta reação tem um potencial anti-apoptótico, uma vez que a glutatilação de proteínas regula a sinalização celular, fatores de transcrição e apoptose (Shelton *et al.*, 2005; Klatt & Lamas, 2000).

Os compostos antioxidantes presentes no interior das células, membranas celulares e fluido extracelular podem ser mobilizados para regular a formação excessiva de EROs e manter o equilíbrio redox adequado. Neste processo, o sangue tem o papel central de transporte e redistribuição de antioxidantes para todo o corpo (Stephens *et al.*, 2009). O sangue transporta antioxidantes não enzimáticos chamados de tióis. Os tióis possuem grupos sulfidrilas (-SH), compostos por um átomo de enxofre e um átomo de hidrogênio, ligados a um átomo de carbono. O transporte de tióis é predominantemente feito pela albumina, por outras proteínas, e por compostos não proteicos, como cisteína, cisteinilglicina, glutathione, homocisteína e γ – glutamylcisteína. Na presença de oxidantes, os tióis formam uma reação de oxidação, formando pontes dissulfeto e reduzindo o composto oxidado. A formação da ponte dissulfeto é reversível, podendo ser novamente reduzida a tiol, mantendo a homeostase entre tiol e dissulfetos. Exemplo desta reação é o processo de oxidação e redução da glutathione, descrito anteriormente no texto (EREL, 2004).

Quando existe um processo patológico, ocorre um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e os antioxidantes, com aumento da relação oxidantes/antioxidantes, gerando um acúmulo excessivo dos níveis de EROs, chamado estresse oxidativo (Perrelli *et al.*, 2011). No hipertireoidismo, o aumento dos níveis de hormônios da tireoide gera um estado hipermetabólico, acelerando o transporte mitocondrial de elétrons, levando a um aumento excessivo da geração

de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), com alto consumo de antioxidantes e inativação de enzimas antioxidantes, induzindo ao estresse oxidativo (Mishra & Samanta, 2012). Uma exposição por um período prolongado ao estresse oxidativo induz ao dano celular, injúria tecidual e leva a morte de cardiomiócitos por apoptose (Sarkar *et al.*, 2005; Dai *et al.*, 2012; Harsdorf *et al.*, 1999).

1.4 INFLAMAÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

Citocinas inflamatórias podem modular a função cardiovascular por meio de vários mecanismos, incluindo sinalização adrenérgica alterada, aumento do $\bullet\text{NO}$, alteração da homeostase de cálcio e do balanço redox. O estresse oxidativo e a indução de inflamação estão interligados através de um círculo vicioso. O aumento de oxidantes e o estresse oxidativo levam a um desequilíbrio redox, que promove processos inflamatórios pela ativação de fatores sensíveis ao estado redox, como o fator nuclear kappa beta ($\text{NF}\kappa\beta$) (Khaper *et al.*, 2010).

Os membros da família NF- κ B são encontrados no citoplasma na forma de homodímeros ou heterodímeros em um estado inativo ligados ao inibidor I κ B. Vários estressores podem liberar o I κ B do NF- κ B através de uma via que envolve a fosforilação da cinase I κ B (inibidora do κ B) pelo IKK (complexo I κ B cinase) ativado (IKK α , IKK β e IKK γ). A fosforilação da I κ B leva a sua degradação pelo sistema proteossoma ubiquitina. A degradação da I κ B então permite a translocação do dímero NF- κ B para o núcleo, onde, dependendo da composição do NF- κ B, cofatores recrutados, e a sequência de genes-alvo, respostas diferentes

podem ser observadas, como por exemplo a indução de citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Noble & Shen, 2012; Khaper *et al.*, 2010; Gordon *et al.*, 2011). As citocinas inflamatórias, por sua vez ativam eventos em sequencia, levando ao aumento do estresse oxidativo, contribuindo para a progressão da doença pela intensificação da resposta inflamatória (Khaper *et al.*, 2010).

A síntese de TNF- α é inibida pela interleucina 10 (IL-10), uma citocina anti-inflamatória que inibe a formação de EROs e a produção de \bullet NO. O TNF- α aumenta os níveis de EROs e a apoptose de cardiomiócitos, o que é prevenido pela ação da IL-10 (Khaper *et al.*, 2010). Em pacientes com insuficiência cardíaca crônica avançada ocorre um aumento da relação TNF- α /IL-10 (Stumpf *et al.*, 2003).

A proteína de choque térmico 70 (HSP70) possui ação anti-inflamatória, uma vez que pode inibir citocinas inflamatórias como o TNF- α (Noble & Shen, 2012). No entanto, a HSP70 também pode ter efeitos deletérios, devido a sua capacidade de interação com diferentes moléculas intracelulares (Vondriska & Wang, 2008). Neste contexto, a HSP70 pode exercer efeito inflamatório através da interação com o receptor *toll-like 2* e sua molécula adaptadora, o MyD88, induzindo a expressão do NF- κ B, que por sua vez leva a uma resposta inflamatória envolvendo a expressão de moléculas pró-inflamatórias como a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), a interleucina 6 (IL-6) e a quimiocina derivada de queratinócitos (KC), causando a diminuição da contratilidade de cardiomiócitos e resultando em morte celular (Mathur *et al.*, 2011).

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE

O estresse oxidativo pode estar envolvido com a morte celular programada mediante aumento da proteína p53 e liberação de citocromo-c para o citosol, por induzir o rompimento do gradiente elétrico ($\Delta\Psi$) mitocondrial, a redução da expressão da proteína Bcl₂, o aumento de Bax e Bad e a ativação da cascata das caspases (caspases-3,-7 e -9), induzindo fragmentação do DNA e morte celular por apoptose (Chaudhari *et al.*, 2009; Narula *et al.*, 1999; Harsdorf *et al.*, 1999; Mihara *et al.*, 1999).

Os membros da família Bcl₂ são reguladores essenciais para a maquinaria mitocondrial de morte celular. A família Bcl₂ é dividida em dois subgrupos: pró-sobrevivência (ex. Bcl₂, BclX_L) e pró-apoptose (ex. Bax, Bak) (Baines & Molkenin, 2009). A Bcl₂ age como um antioxidante, para diminuir as EROs e radicais livres, que quando em excesso, induzem a apoptose. Além disso, previne o rompimento $\Delta\Psi$ mitocondrial, inibindo a cascata das caspases e promove sobrevivência celular através da formação de heterodímeros com BAX, que induz a apoptose (Mihara *et al.*, 1999).

A formação de heterodímeros é mediada por três domínios chamados de Bcl₂ homologia 1 (BH1), Bcl₂ homologia 2 (BH2), e Bcl₂ homologia 3 (BH3). O processo de heterodimerização é dependente dos domínios BH1 e BH2, e mutações específicas nestes domínios anulam a capacidade da Bcl₂ se ligar a BAX. Se há predomínio de homodímeros BAX, a morte celular ocorre, ao passo que se heterodímeros Bcl₂-BAX prevalecem, a célula irá sobreviver (Olivetti *et al.*, 1997).

A alta expressão de Bcl₂ inibe a indução de apoptose pela p53. O p53 é um fator de transcrição que induz proteínas pró-apoptóticas e ativa a cascata das caspases nos cardiomiócitos (Regula & Kirshenbaum, 2001). O aumento da ativação do p53 gerado pelo estresse oxidativo é essencial para a transição de hipertrofia cardíaca para a insuficiência cardíaca (Sano *et al.*, 2007). Durante a transição de hipertrofia cardíaca para insuficiência cardíaca, o p53 ativa o NF-κβ, indutor de hipertrofia cardíaca e citocinas inflamatórias (Das *et al.*, 2010; Gordon *et al.*, 2011).

Assim como a Bcl₂, a PGC1-α é capaz de inibir os efeitos apoptóticos do p53, modulando-os através da sua ligação ao p53. Ao ligar-se ao p53, o PGC1-α modula sua sinalização para promover a parada do ciclo celular e a ativação de genes envolvidos com o controle do metabolismo. Ocorre então um estresse metabólico, promovendo a depuração de EROs. Entretanto, esta situação gera uma grande deprivação de nutrientes, resultando na degradação de PGC1-α e conseqüentemente na indução de apoptose (Sen *et al.*, 2011).

Outro fator que pode se associar com o p53 é o fator 1-α induzido por hipóxia (HIF1- α). O HIF1- α é um fator de transcrição que induz a expressão de diferentes genes, cujos produtos promovem adaptação de tecidos e células hipóxicas. A atividade do HIF1- α pode ser tanto anti-apoptótica como pró-apoptótica, dependendo do tipo celular e das condições experimentais. Os efeitos pró-apoptóticos parecem ocorrer em uma hipóxia mais severa ou mais prolongada e resultam da associação do HIF1- α com o p53. O efeito anti-apoptótico ocorre em situação de hipóxia menos severa, que leva à ativação do HIF1-α mediante sua dimerização com o translocador nuclear do receptor de hidrocarboneto arila

(ARNT), ocasionando um aumento adaptativo na transcrição gênica para promoção de sobrevivência celular (Piret *et al.*, 2002). Estes dois efeitos contrários ocorrem de acordo com o estado de fosforilação do HIF1- α . A forma fosforilada do HIF-1 α liga-se ao ARNT, e a forma desfosforilada liga-se a p53, estabilizando-a e induzindo apoptose pelo aumento de Bax (Suzuki *et al.*, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

Os hormônios da tireoide são importantes para o desenvolvimento e manutenção das funções celulares, exercendo influência nos diferentes sistemas do organismo, principalmente no sistema cardiovascular. O hipertireoidismo é uma patologia decorrente do aumento dos níveis dos hormônios da tireoide, e leva ao aumento do metabolismo celular e do consumo de oxigênio. A alta demanda de oxigênio gera um aumento das EROs, com incapacidade de remoção das mesmas pelos antioxidantes, levando a uma situação de estresse oxidativo e desequilíbrio redox, induzindo a ativação de fatores de transcrição e citocinas, que levam a hipertrofia, inflamação e apoptose.

A exposição crônica ao estresse oxidativo e desequilíbrio redox induzida pelo hipertireoidismo leva a hipertrofia de cardiomiócitos, e progressão para insuficiência cardíaca. Apesar de existirem estudos sobre as respostas hipertróficas, inflamatórias e apoptóticas mediadas por proteínas frente ao estado redox, o papel das vias inflamatórias e apoptóticas associado ao estresse oxidativo no desenvolvimento do hipertireoidismo crônico induzido pelos hormônios da tireoide não está ainda bem esclarecido. O mesmo protocolo experimental deste trabalho já foi realizado anteriormente, com administração de L-tiroxina por um período de 14 dias (Fernandes *et al.*, 2011). Porém, conforme o estudo de Kim e colaboradores (2013), que evidenciaram a ocorrência de disfunção cardíaca em modelo experimental de 28 dias de tratamento com L-tiroxina, faz-se necessária uma avaliação mais prolongada, por um período de 28 dias.

3 HIPÓTESE

O aumento dos níveis dos hormônios da tireoide (hipertireoidismo) gera a exacerbação da ativação de vias metabólicas e de sinalização celular, causando o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, levando a uma situação de estresse oxidativo e desequilíbrio redox. Esta situação gera diversas alterações cardiovasculares, um processo inflamatório possivelmente mediado por $TNF\alpha$, IL-10, HSP70, PGC1- α e a ativação de vias apoptóticas (Bad, Bax/Bcl₂, caspase, HIF1- α , P53) no tecido cardíaco, culminando no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, podendo evoluir para a insuficiência cardíaca.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência do estresse oxidativo na ativação de vias inflamatórias e de apoptose em ratos Wistar, em modelo experimental de hipertireoidismo, induzido pela administração de L-tiroxina por um período de 28 dias.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, nos grupos controle e T4, após um período de 28 dias:

- A concentração sérica dos hormônios tireoidianos;
- A participação das EROs no estresse oxidativo pela quantificação de EROs total, em sangue e tecido cardíaco, e H_2O_2 , em tecido cardíaco;
- A quantidade plasmática de sulfidrilas;
- A atividade das enzimas glutarredoxina e tioredoxina redutase em eritrócitos, e da G6PDH e 6PGD em sangue e tecido cardíaco;
- A atividade da enzima LDH em plasma;
- A quantidade de IL-10 e TNF- α em plasma;
- A concentração de proteínas de sinalização celular inflamatória (HSP70) e de biogênese mitocondrial (PGC1- α) em tecido cardíaco.
- A expressão de proteínas de apoptose (Bax/Bcl₂, caspase-9, HIF1- α , P53) em tecido cardíaco.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo caracterizou-se por ser experimental com ratos Wistar machos, divididos em dois diferentes grupos. O projeto foi desenvolvido no Laboratório de fisiologia cardiovascular e espécies reativas de oxigênio do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICBS-UFRGS). O projeto foi encaminhado à Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aprovado sob nº. 24504.

Todos os procedimentos desse estudo foram realizados de acordo com a Lei Federal 11.794 de 08/10/2008, que estabelece normas para a Prática Didática - Científica da Vivisseção de animais; dos Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal; bem como àquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais provenientes do *Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS)* (Goldim, 1997).

5.2 ANIMAIS

Foram utilizados 60 ratos machos Wistar, com peso médio de 200 ± 50 gramas, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Durante o período de indução ao

hipertireoidismo (28 dias), os animais foram alojados no Biotério Setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) no Departamento de Farmacologia da UFRGS. Os animais foram mantidos em caixas plásticas de 41x34x16 cm, contendo quatro ratos cada, com o assoalho recoberto com serragem. Receberam alimentação e água à vontade e foram mantidos sob períodos de 12 horas luz/ 12 horas escuro, sob temperatura de 22°C.

Os animais receberam ração (Nuvilab CR1) e água (*Ad libitum*), e foram divididos em dois grupos (n=30 animais/grupo):

- **Controle (C)**: animais que receberam somente ração e água;
- **Hipertireoideo (T4)**: animais que receberam ração e foram submetidos à ingestão de L-tiroxina adicionada à água de beber.

5.3 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos à indução de hipertireoidismo através da administração de L-tiroxina (T4) 0,15 µM na água de beber, por um período de 28 dias (quatro semanas). Foi coletado sangue a partir do plexo venoso retro-orbital no início (1º dia), na metade (14º dia) e no término (28º dia) do referido tempo de tratamento para realização das dosagens bioquímicas dos hormônios tireoidianos (hormônios T3 e T4 livres no plasma), de estresse oxidativo sistêmico (total de EROs e sulfidrilas no plasma; e conteúdo de glutarredoxina, tioredoxina redutase, G6PD e 6PGD em eritrócitos) e vias inflamatórias (níveis plasmáticos de IL-10, TNF-α e LDH).

Após o fim dos 28 dias de indução de hipertireoidismo por adição de L-tiroxina na água de beber, foi realizada a decapitação por guilhotinamento de todos os animais. Em seguida, foi realizada a retirada do coração, para avaliação não somente do índice de hipertrofia cardíaca (índice de hipertrofia do peso total do coração em relação ao peso corporal, do peso total do coração em relação ao comprimento da tíbia, e do peso total dos rins em relação ao peso corporal), mas também medidas bioquímicas, em homogeneizado de ventrículo esquerdo, de estresse oxidativo tecidual (H_2O_2 , sulfidrilas), e quantificação de proteínas de sinalização do metabolismo (HSP70, PGC1- α , HIF1- α) e de apoptose (p53, Bcl₂, Bax, caspase-9) por western blot.

5.4 DESCARTE DE ANIMAIS E MATERIAIS TÓXICOS

As carcaças dos animais mortos, foram armazenadas em sacos plásticos brancos, e levadas ao biotério – ICBS - UFRGS- (Centro de experimentação de animais de laboratório – CREAL), onde foram recolhidas pela empresa terceirizada responsável pelo serviço de coleta de materiais biológicos de descarte. Os materiais tóxicos que foram utilizados na capela foram encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para sua correta eliminação. Todos os procedimentos com os animais e análises foram feitos com uso de avental, luva cirúrgica, máscara, se necessário, respeitando os devidos cuidados para proteção tanto dos animais como do pesquisador.

5.5 INDUÇÃO AO HIPERTIREOIDISMO

O hipertireoidismo crônico foi induzido mediante administração de L-tiroxina 0,15 μ M (12 mg de T4 dissolvido em 50 mL de Tris para um volume final de um litro de água), *ad libitum* durante quatro semanas, na água de beber oferecida aos ratos (Ladenson *et al.*,1986; Miranda, 1997).

5.6 COLETA DE SANGUE

A coleta de sangue foi realizada no 1º dia, no 14º dia e no 28º dia do protocolo de indução do hipertireoidismo (Figura 1). Os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.), e foi realizada a coleta de 1,5 mL de sangue, através de punção do plexo venoso retro-orbital com capilar de vidro (Halpern & Pacaud, 1951).



Figura 1. Períodos de coleta de sangue através do plexo venoso retro-orbital.

O sangue coletado com heparina foi centrifugado por 15 minutos a 7390 xg em centrífuga refrigerada a 4°C (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24) e o plasma separado e congelado em freezer a -80°C para posterior análise dos hormônios tireoidianos, EROs, sulfidrilas, IL-10, TNF- α e LDH. Após a retirada do plasma, foi

feita a lavagem dos eritrócitos, por adição de soro fisiológico aos eritrócitos, e centrifugação por 3 minutos a 24640 xg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e o procedimento de lavagem foi repetido duas vezes. Em seguida, os eritrócitos foram preparados em solução de enzimas (ácido acético 10 $\mu\text{mol/L}$ e MgCl_2 4 mmol/L) para algumas das medidas de estresse oxidativo sistêmico (glutarredoxina, tioredoxina redutase, G6PD e 6PGD).

5.7 DOSAGEM HORMONAL

O método utilizado para dosar os hormônios T3 e T4 foi de quimiluminescência por imunensaio competitivo (Ferreira & Ávila, 2001). Os resultados foram expressos em ng/mL para os níveis plasmáticos de T3 e $\mu\text{g/dL}$ para os níveis plasmáticos de T4.

5.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

O peso dos animais foi acompanhado durante todo o período experimental, sendo efetuada a pesagem dos animais uma vez por semana. Após a eutanásia dos animais, foi realizada pesagem do coração total, ventrículo esquerdo (VE), peso total dos rins e medida da tíbia. Em seguida, o VE foi congelado a -80°C , para posterior preparação de homogeneizado para técnicas de estresse oxidativo tecidual (H_2O_2 , sulfidrilas), e determinação de HSP70, PGC1- α , HIF1- α , p53, Bcl₂, Bax e caspase-9 por western blot.

A partir dos dados de peso dos órgãos e da medida da tíbia, foram calculados os índices de hipertrofia cardíaca e renal. Os índices de hipertrofia cardíaca e renal oferecem uma noção do aumento da massa dos respectivos órgãos, sendo uma característica importante a ser ressaltada no hipertireoidismo. O índice de hipertrofia cardíaca foi calculado pela razão do peso total em grama de tecido cardíaco pelo comprimento da tíbia (Hu *et al.*, 2003). Um segundo cálculo foi realizado pela razão do peso total em grama de tecido cardíaco pelo peso corporal total. Adicionalmente, foi calculada a razão do peso total em grama do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia e pelo peso corporal de cada rato após o término do tratamento. O mesmo cálculo foi aplicado para a razão do peso total dos rins, em grama, pelo peso corporal.

5.9 PREPARAÇÃO DO HOMOGENEIZADO DO VENTRÍCULO ESQUERDO

O tecido cardíaco foi imerso imediatamente após a extração e pesagem, em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C . Para a preparação do homogeneizado, as amostras de VE foram primeiramente descongeladas, sendo retirada uma amostra representativa de aproximadamente 50 mg para cada análise. Em seguida, o volume pesado foi homogeneizado em KCl 1,15% e PMSF, usando um homogenizador Politron em um pulso de 40 segundos. As proteínas presentes no homogeneizado foram quantificadas e utilizadas para normalizar a quantidade de proteína.

5.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As proteínas em plasma, eritrócitos e homogeneizado de VE foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951), que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL.

5.11 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO

5.11.1 Avaliação da concentração de espécies reativas totais pela oxidação de 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH)

O método baseia-se na mensuração da fluorescência produzida pela oxidação do DFCH pelas espécies reativas de oxigênio presentes na amostra. A fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de excitação (480 nm) e emissão (535 nm). Os resultados foram expressos em pmol de DCF formado / mg de proteína (Lebel *et al.*, 1992). A técnica foi realizada utilizando amostra de plasma.

5.11.2 Determinação de H₂O₂

O método baseia-se na oxidação do vermelho D - fenol pelo H_2O_2 , mediado pela peroxidase de rabanete, tendo como resultado um produto que absorve em 610 nm. Primeiramente, o tecido (VE) foi incubado por 60 minutos em tampão fosfato 10 mM (NaCl 140 mM e dextrose 5mM). Em seguida, o sobrenadante foi coletado e adicionado na solução tampão de vermelho D - fenol 0,28 mM e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 5 minutos, foi adicionado NaOH 1N e efetuada a leitura a 610 nm. O resultados foram expressos em nmoles de H_2O_2 por mg de proteína (Pick & Keisari 1980).

5.11.3 Determinação do conteúdo de sulfidrilas

Os grupos de sulfidrilas livres no plasma e no tecido cardíaco foram dosados por espectrofotometria, conforme método de Ellman (1959), modificado por Hu (1993). O método baseia-se na reação do ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) com grupos tióis, resultando na liberação de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB). Neste método, adicionou-se 50 μ L de plasma/tecido cardíaco a 1mL de buffer com pH 8.2, contendo Tris 0,1mol/L e EDTA 19mmol/L. Em seguida, foram adicionados 50 μ L de 5'5-ditiobis(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 10mmol/L em metanol. Foram preparados brancos para cada amostra, seguindo os passos anteriores, porém sem a adição de DTNB em metanol. As amostras e brancos foram incubadas por 15 minutos e após foi realizada leitura a 412nm. O valor do branco foi subtraído das amostras. A concentração de grupos sulfidrilas foi determinada usando o

coeficiente de extinção molar do TNB, que corresponde a $14,100\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol/L}$.

5.11.4 Avaliação da atividade da tiorredoxina redutase

A atividade da tiorredoxina redutase foi mensurada em amostra de eritrócitos a partir da redução do composto DTNB à TNB, detectada espectrofotometricamente a 412nm. Os dados foram expressos em nmol/min/mg de proteína (Holmgren & Björnstedt, 1995).

5.11.5 Avaliação da atividade de glutarredoxina

Para avaliar a atividade de glutarredoxina foi utilizado o protocolo estabelecido por Holmgren e Åslund (1995), em amostra de eritrócitos. A glutationa reduzida foi misturada ao hidroximetil disulfito em 100 mM de tampão Tris/HCL (pH 7,8) contendo 1mM de EDTA, sendo incubada por 2 minutos. Após este procedimento uma pequena alíquota de enzima foi adicionada reagindo com a mistura pelo próximo minuto. A quantidade de GSSG produzida foi medida a partir da adição de uma pequena alíquota contendo NADPH e glutationa redutase de levedura. A atividade está expressa em mmol/mg de proteína.

5.12 ANÁLISES RELACIONADAS AO METABOLISMO

5.12.1 Avaliação da atividade das enzimas glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PD) e 6 fosfogluconato desidrogenase (6PGD)

As enzimas G6PD e 6PGD determinam a produção de NADPH, um modelador do potencial redox, pelo controle do metabolismo da glicose via pentose-fosfato. Esta técnica baseia-se no aumento da absorbância causado pela produção de NADPH pelas duas enzimas em um meio contendo substrato e cofatores essenciais para a atividade enzimática.

A atividade foi expressa em mmol/mg de proteína em amostra de eritrócitos. A medida da G6PD foi executada a partir do método de Leong e Clark (1984). A sua atividade específica é representada como unidades por mg de proteína.

5.12.2 Avaliação da atividade da Lactato desidrogenase (LDH)

Consiste em um teste cinético com leitura em UV (ultravioleta), baseado no procedimento indicado por Wacker e Snodgrass (1960), e Amador e colaboradores (1963), utilizando um kit de ensaio da marca Bioliquid para amostra de plasma. Nesta técnica, a LDH presente na amostra converte o L-lactato a piruvato, formando nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH). A velocidade de aumento da concentração de NADH no meio de reação (medida a 340 nm) é proporcional à atividade da LDH na amostra. Os resultados foram expressos em unidades de LDH por litro (U/L).

5.13 ANÁLISES DE PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS E APOPTÓTICAS

5.13.1 Quantificação das Proteínas Inflamatórias por “ELISA”

A quantificação plasmática das proteínas inflamatórias foi realizada através do método ELISA, utilizando kits ELISA IgG para IL-10 (IL-10 Rat ELISA Kit), e TNF- α (Rat TNF- α ELISA) da Invitrogen Corporation, Camarillo, CA. Os resultados foram expressos em pg/mL.

5.13.2 Análise de Proteínas de sinalização celular por “Western Blot”

Para a técnica de western blot, após a quantificação das proteínas, foi preparada uma alíquota do homogeneizado de VE, à qual foi adicionado tampão Laemmli 5X (Tris HCl 0,5M, SDS 10%, bromofenol blue 0,5%, glicerol, β -mercaptoetanol 5%), para que todas as amostras possuíssem a mesma concentração proteica de 50 μ g de proteína em 40 μ L do preparado. Cinquenta microgramas de proteína foram expostos à eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando 15% (p/v) de gel separador e 5% (w/v) de gel fixador (Laemmli 1970). As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membranas usando tampão contendo Tris 20 mol/L, glicina 150 mol/L, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH= 8,3) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados através de 1h de incubação em solução bloqueadora (5% (p/v) de leite

desnatado) em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. Após o bloqueio, as membranas de nitrocelulose foram incubadas por, no mínimo, 16 h a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos de interesse específicos, conforme Tabela 1: PGC1- α , HIF1- α , HSP70, p53, Bax, Bcl-2 e Caspase-9.

Tabela 1. Anticorpos utilizados na técnica de western blot.

Anticorpo	Anticorpo primário	Anticorpo secundário	Origem	Marca
PGC1- α	1:500	1:5000	Coelho	Santa cruz
HIF1- α	1:200	1:5000	Coelho	Santa cruz
HSP70	1:500	1:5000	Coelho	Santa cruz
p53	1:500	1:5000	Rato	Biosource
Bax	1:1000	1:5000	Coelho	Cell signaling
Bcl2	1:500	1:5000	Rato	Cell signaling
Caspase-9	1:1000	1:5000	Rato	Cell signaling

Concentrações utilizadas para os respectivos anticorpos primários e secundários, origem e marca dos mesmos.

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TTBS (3 lavagens de 10 minutos cada) e então incubadas com o segundo anticorpo por 2 horas. Após a incubação com o segundo anticorpo, as membranas foram lavadas com TBS (3 lavagens de 10 minutos cada). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimiluminescência (ECL) por 1 min.

Após a incubação com solução para quimiluminescência, as membranas de NC foram colocadas em contato com o filme fotográfico (GE Healthcare[®]) durante 30 a 120 segundos. Para revelação, o filme foi colocado na solução reveladora por 1 min; lavado com ácido acético e colocado por mais 1 min na solução fixadora. Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura. A

densidade óptica das bandas foi medida por um sistema de processamento de imagem. A densitometria obtida para as bandas das proteínas estudadas foi corrigida pela coloração com *Ponceau Red*, sendo os resultados obtidos expressos em unidades arbitrárias.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tamanho da amostra foi calculado através do programa PEPI 3, utilizando-se dados de estudos prévios realizados pelo nosso laboratório (Araujo et al., 2006). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 90% e diferença entre as médias de 0,1 unidades arbitrárias, chegando-se a um n de 15 animais por grupo. Como foram realizados 02 experimentos (o primeiro destinado principalmente para as medidas de estresse oxidativo; o segundo, para medidas de proteínas envolvidas com apoptose e inflamação), chegou-se a um total de 60 animais ($n=15/\text{grupo} \times 2 \text{ experimentos}$). Ao longo do período experimental, alguns animais não resistiram à anestesia, devido a este fato adotamos um N de 23 animais por grupo para a análise estatística.

Os dados foram analisados através de procedimentos estatísticos descritivos e inferenciais. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Para a comparação entre os grupos foi aplicado Teste t de Student. As correlações foram feitas pelo teste de Pearson. Para comparação entre os grupos ao longo do tempo foi aplicada análise longitudinal e post- hoc Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Os cálculos foram efetuados através do programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 20.0.

7 RESULTADOS

7.1 DOSAGEM HORMONAL

Os resultados da dosagem dos hormônios T3 e T4 livres no plasma encontram-se na Tabela 2. Os níveis de T4 foram maiores no grupo T4, que foi induzido ao hipertireoidismo, quando comparado ao grupo controle ($P < 0,01$). Os níveis de T3 não diferiram entre os grupos. A razão T3/T4 foi menor no grupo T4 em comparação ao grupo controle ($P < 0,001$).

Tabela 2. Níveis hormonais de T3 e T4 e razão T3/T4.

Níveis de Hormônios da tireoide	Controle	T4
T4 ($\mu\text{g/mL}$)	5,03 \pm 0,484	20,64 \pm 5,697**
T3 (ng/mL)	1,28 \pm 0,207	1,9 \pm 0,923
T3/T4	0,26 \pm 0,056	0,09 \pm 0,033#

Valores representam média \pm desvio padrão. n= 5 animais por grupo. Os dados foram analisados por teste t de Student. ** $P < 0,01$ em comparação com o grupo Controle. # $P < 0,001$ em comparação com o grupo controle.

7.2 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

7.2.1 Peso corporal

O peso corporal não diferiu entre os grupos ao longo de todo o período experimental, conforme demonstrado na Figura 2.

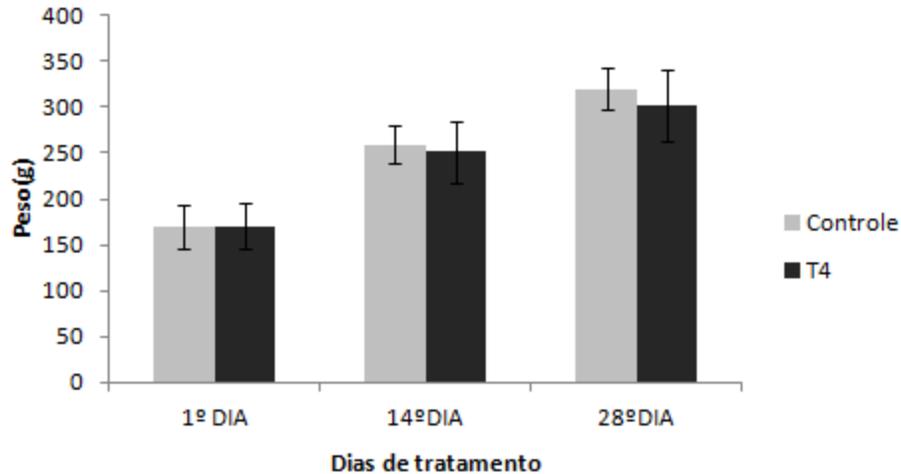


Figura 2. Peso corporal dos grupos controle e T4. Valores representam média \pm desvio padrão. n= 23 animais por grupo. Os dados foram analisados por teste t de Student.

7.2.2 Peso dos órgãos

O peso do coração inteiro foi maior no grupo T4 em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$). Adicionalmente, o peso do VE também foi maior no grupo T4 em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$). Não houve diferença de peso total dos rins entre os grupos estudados. Os resultados de peso encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Peso do coração total, VE e peso total dos rins.

Peso (g)	Controle	T4
Coração total	0,84±0,053	0,90±0,117*
VE	0,65±0,039	0,71±0,092*
Peso total dos rins	2,75±0,262	2,88±0,410

Valores representam média±desvio padrão. n= 23 animais por grupo. Os dados foram analisados por teste t de Student. *P<0,05 em comparação ao grupo controle. VE – ventrículo esquerdo.

7.2.3 Índices de hipertrofia

O grupo T4 apresentou índices de hipertrofia cardíaca maiores quando comparado ao grupo controle, conforme segue: razão coração e razão VE em relação ao peso corporal (P<0,001), razão coração em relação ao comprimento da tibia (P<0,05) e razão ventrículo esquerdo em relação ao comprimento da tibia (P<0,01). O índice de hipertrofia renal, apresentado pela razão entre o peso total dos rins e o peso corporal, também foi maior no grupo T4 em comparação com o grupo controle (P<0,01). Os resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Índices de hipertrofia cardíaca e renal.

Índice	Controle	T4
Razão coração/peso corporal (g/g)	0,0026±0,0001	0,0029±0,0004 [#]
Razão coração/comprimento da tíbia (g/cm)	0,0243±0,0014	0,0259±0,0032 [*]
Razão VE/peso corporal (g/g)	0,0020±0,0001	0,0023±0,0003 [#]
Razão VE/comprimento da tíbia (g/cm)	0,0187±0,0011	0,0204±0,0025 ^{**}
Peso dos rins/peso Corporal (g/g)	0,0085±0,0006	0,0093±0,0009 ^{**}

Valores representam média±desvio padrão. n= 23 animais por grupo. Os dados foram analisados por teste t de Student. ^{*}P<0,05 em comparação ao grupo controle. ^{**}P< 0,01 em comparação ao grupo controle. [#]P<0,001 em comparação com o grupo Controle. VE- Ventrículo Esquerdo.

7.3 ANÁLISES DE ESTRESSE OXIDATIVO

7.3.1 Espécies reativas totais

Os resultados da dosagem plasmática de espécies reativas totais encontram-se na Figura 3. A análise longitudinal demonstrou uma diminuição das espécies reativas totais ao longo dos 28 dias de experimento, independente do grupo, sendo esta considerada um efeito do tempo (P<0,001).

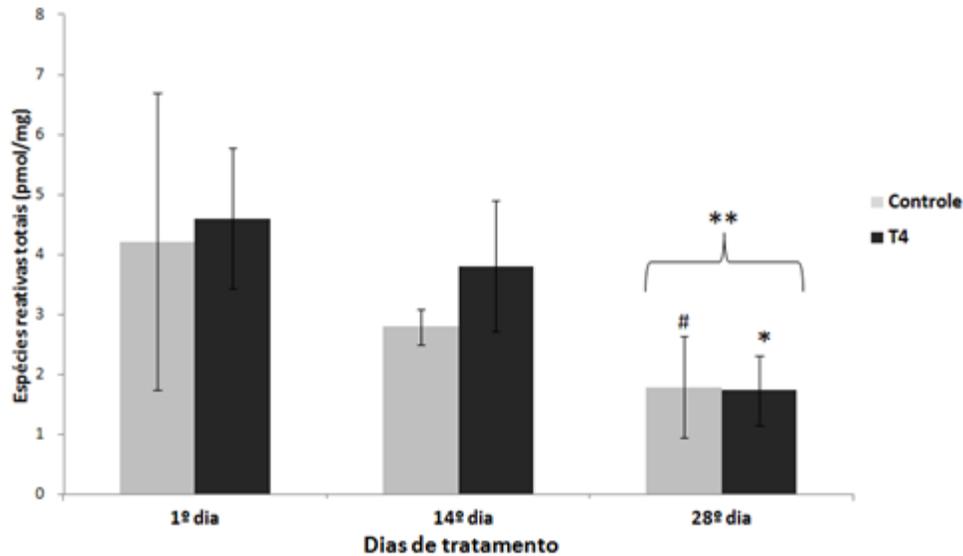


Figura 3. Análise temporal dos níveis plasmáticos de EROs total nos grupos controle e T4. Valores representam média±desvio padrão. n= 7 animais por grupo. Os dados foram analisados por análise longitudinal de dados, seguida de post-hoc Bonferroni. **P<0,001 em comparação com o 1º e 14º dia, sem distinção de grupos. *P<0,05 em comparação com o 1º e 14º dia no grupo T4 e 1º dia no grupo controle. #P<0,05 em comparação com o 1º dia no grupo Controle e 1º e 14º dia no grupo T4.

7.3.2 Níveis de H₂O₂ no VE

O grupo T4 apresentou maior quantidade de H₂O₂ no VE quando comparado ao grupo Controle (P<0,05) (Figura 4).

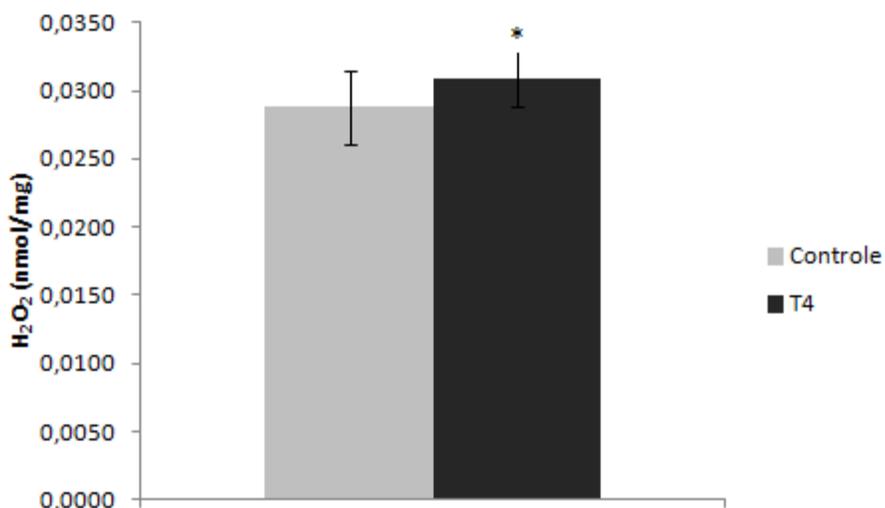


Figura 4. Análise do conteúdo de H₂O₂ em VE nos grupos controle e T4. Valores representam média±desvio padrão. n= 12 animais por grupo. Os dados foram analisados por teste t de Student. *P<0,05 em comparação com o grupo controle.

7.3.3 Níveis de grupos sulfidrilas no plasma e VE

A análise do conteúdo plasmático de sulfidrilas mostrou que, independente do tempo, o grupo T4 apresentou menor quantidade de sulfidrilas que o grupo controle (P<0,05). Com relação ao tempo, o conteúdo encontrado no 1º dia foi menor que o encontrado no 14º e 28º dias, independente do grupo (P<0,05). O grupo controle ao primeiro dia apresentou menor conteúdo de sulfidrilas que o mesmo grupo nos dias 14 e 28 (P<0,05). No 14º dia, o grupo T4 obteve resultados menores em relação ao grupo controle (P<0,05). Os resultados encontram-se na Figura 5.

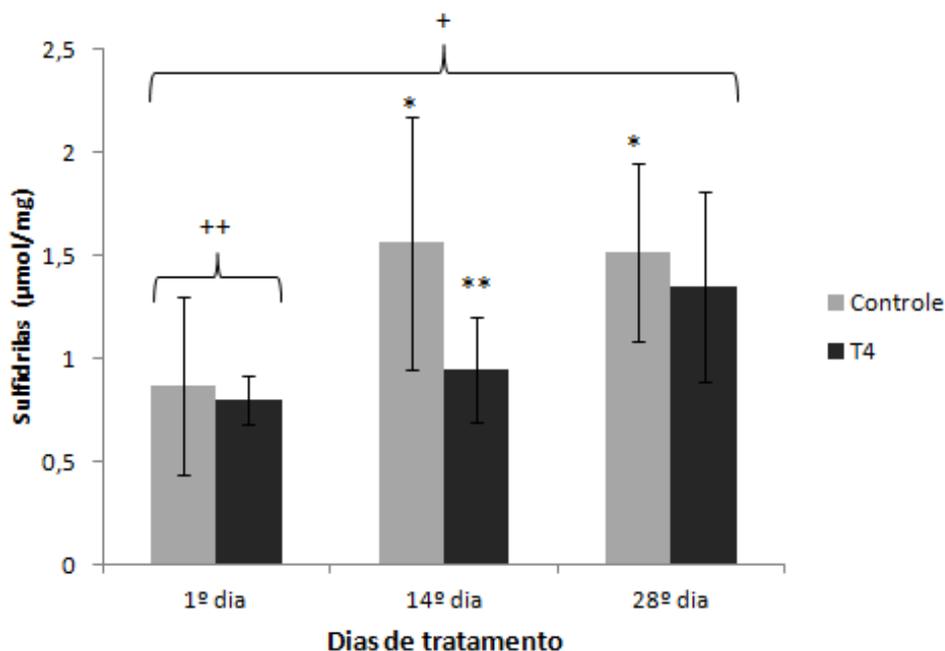


Figura 5. Análise temporal do conteúdo plasmático de sulfidrilas nos grupos controle e T4. Valores representam média±desvio padrão. n= 7 animais por grupo. Os dados foram analisados por análise longitudinal de dados, seguida de post-hoc Bonferroni. +P<0,05 para a comparação entre os grupos, independente do tempo. ++P<0,05 em comparação com o 14º e 28º dia, sem distinção de grupos. *P<0,05 em comparação com o 1º dia do mesmo grupo. **P<0,05 em comparação com o 14º dia do grupo controle.

Na análise do conteúdo de sulfidrilas em amostra de VE, não houve diferença entre os grupos (Figura 6).

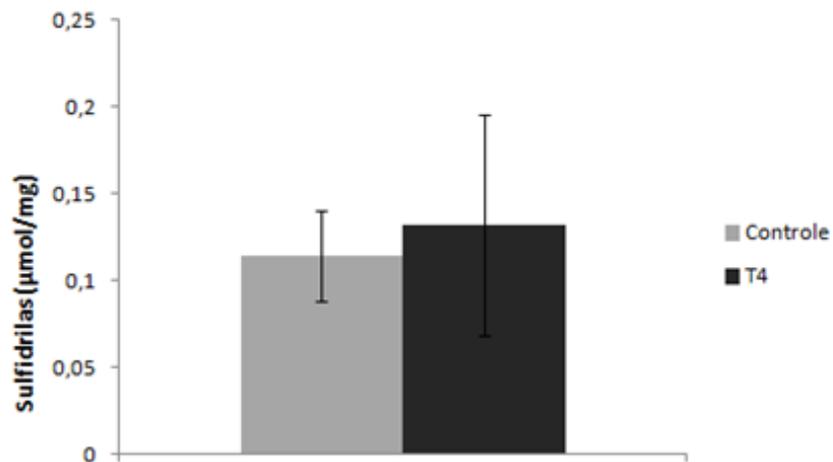


Figura 6. Análise do conteúdo de sulfidrilas em VE nos grupos controle e T4. Valores representam média±desvio padrão. n= 7 animais por grupo. Os dados foram analisados por teste t de Student.

7.3.4 Atividade da tiorredoxina redutase no eritrócito

Não houve diferença entre os grupos na análise temporal da atividade da tiorredoxina redutase em eritrócitos, conforme Figura 7.

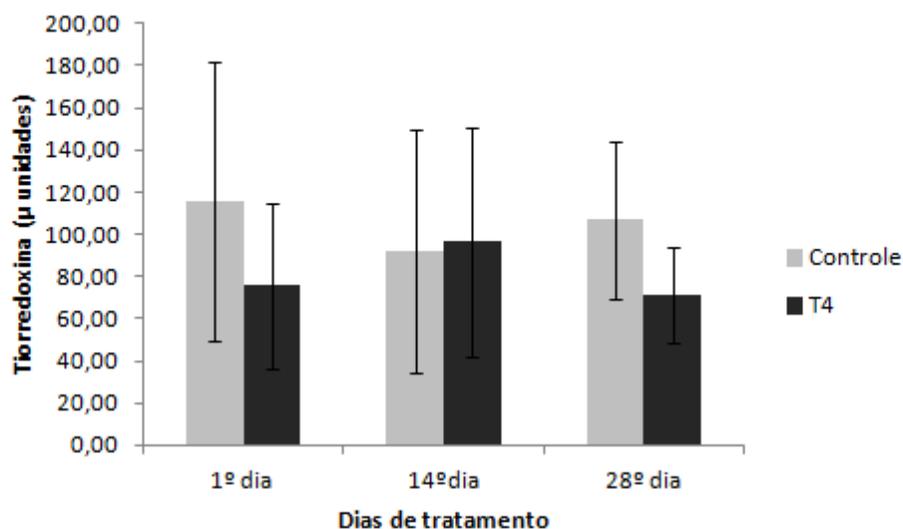


Figura 7. Análise temporal da atividade da tiorredoxina redutase em eritrócitos nos grupos controle e T4. Valores representam média±desvio padrão. n= 7 animais por grupo. Os dados foram analisados por análise longitudinal de dados, seguida de post-hoc Bonferroni.

7.3.5 Atividade da glutarredoxina no eritrócito

A atividade da glutarredoxina não diferiu entre os grupos ao longo dos 28 dias de indução ao hipertireoidismo (Figura 8).

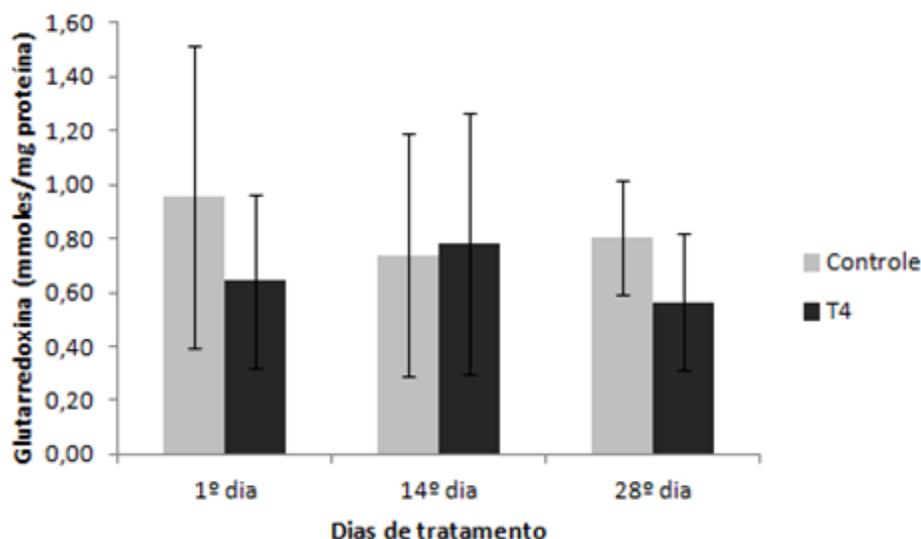


Figura 8. Análise temporal da atividade da glutarredoxina em eritrócitos nos grupos controle e T4. Valores representam média±desvio padrão. n= 7 animais por grupo. Os dados foram analisados por análise longitudinal de dados, seguida de post-hoc Bonferroni.

7.4 ANÁLISES RELACIONADAS AO METABOLISMO

7.4.1 Atividade das enzimas G6PD e 6PGD no eritrócito

A análise da atividade total de G6PD em eritrócitos, isto é, da atividade da enzima G6PD somada à atividade da 6PGD, mostrou que, independente do tempo, o grupo T4 apresentou menor quantidade de G6PD total que o grupo controle ($p < 0,05$). O grupo T4 apresentou menor atividade de G6PD total no 28º dia, em comparação ao 1º dia do grupo controle ($P < 0,05$), conforme Figura 9.

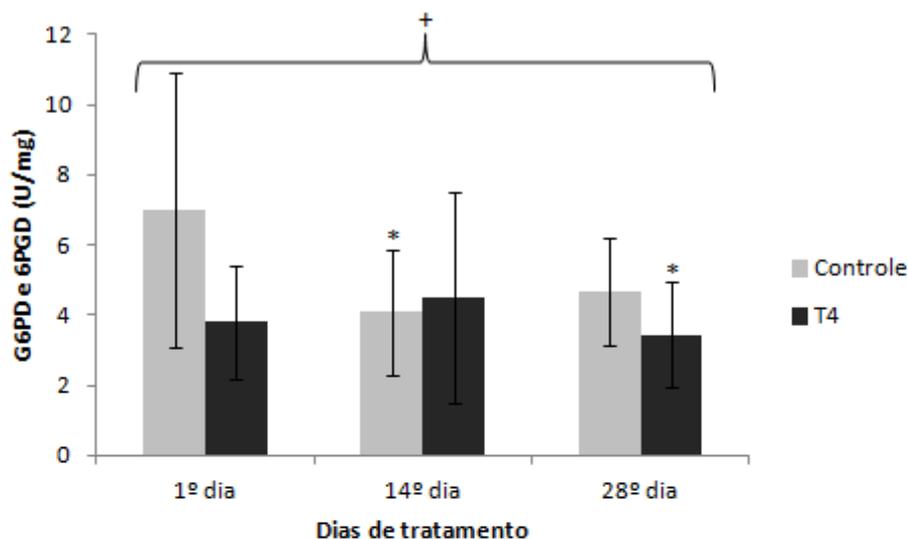


Figura 9. Análise temporal da atividade total de G6PD em eritrócitos dos grupos controle e T4. Valores representam média±desvio padrão. n= 7 animais por grupo. Os dados foram analisados por análise longitudinal de dados, seguida de post-hoc Bonferroni. *P<0,05 para a comparação entre os grupos, independente do tempo. *P<0,05 em comparação com o tempo 1 do grupo Controle. G6PD – glicose 6 fosfato desidrogenase; 6PGD – 6 fosfogluconato desidrogenase.

Com relação à atividade isolada da G6PD em eritrócitos, não houve diferença entre os grupos na análise temporal (Figura 10).

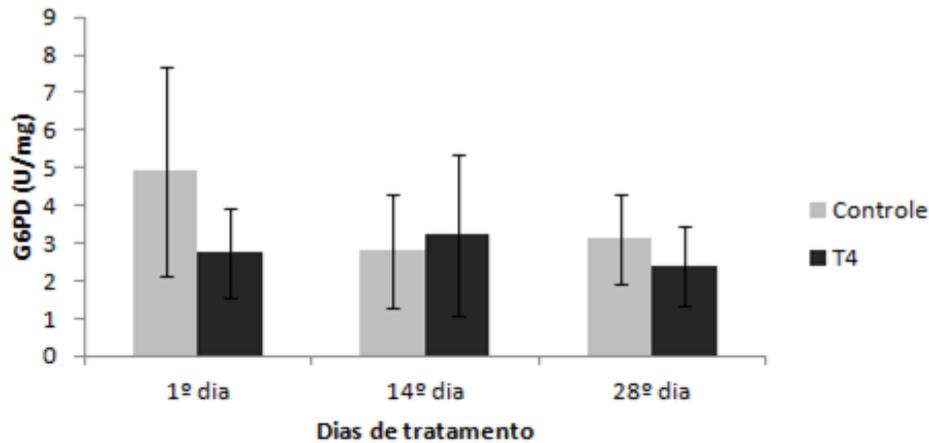


Figura 10. Análise temporal da atividade de G6PD em eritrócitos dos grupos controle e T4. Valores representam média±desvio padrão. n= 7 animais por grupo. Os dados foram analisados por análise longitudinal de dados, seguida de post-hoc Bonferroni. G6PD – glicose 6 fosfato desidrogenase.

Entretanto, na análise da atividade isolada da 6PGD em eritrócitos, o grupo T4 apresentou menor atividade de 6PGD que o grupo controle ($P<0,05$), independente do tempo. O grupo T4 no 1º e 28º dias apresentou menor atividade de 6PGD em comparação com o grupo controle no 1º dia de indução ao hipertireoidismo ($P<0,05$), como demonstrado na Figura 11.

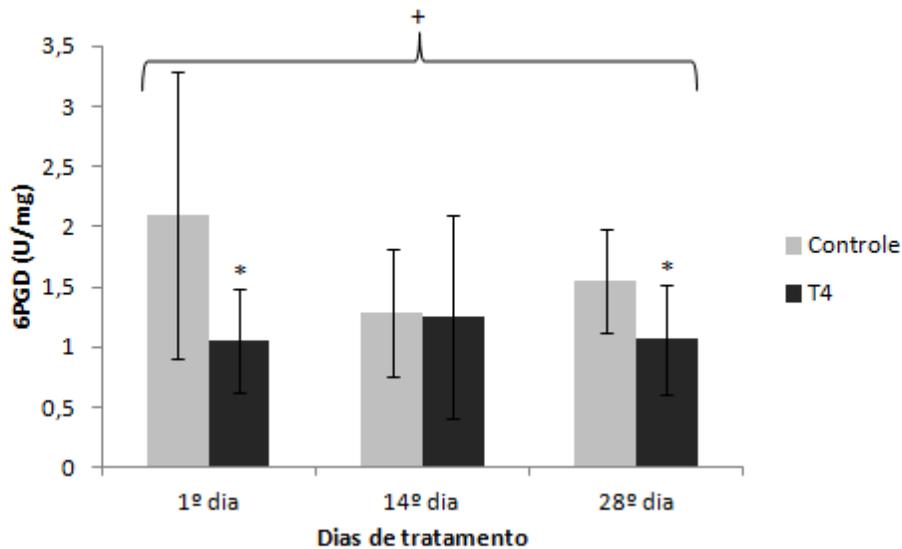


Figura 11. Análise temporal da atividade da 6PGD em eritrócitos dos grupos controle e T4. Valores representam média±desvio padrão. n= 7 animais por grupo. Os dados foram analisados por análise longitudinal de dados, seguida de post-hoc Bonferroni. +P<0,05 para a comparação entre os grupos, independente do tempo. *P<0,05 em comparação com o tempo 1 do grupo Controle. 6PGD – 6 fosfogluconato desidrogenase.

7.4.2 Níveis plasmáticos de LDH

Na comparação entre os grupos, o grupo T4 obteve menor nível de LDH em comparação ao grupo controle (P<0,01), independente do tempo. Com relação ao tempo, os níveis plasmáticos de LDH foram maiores no 28º dia de indução ao hipertireoidismo, quando comparados ao 1º e 14º dias, independente do grupo (P<0,01). O grupo T4 nos dias 1º e 14º apresentou níveis menores de LDH em comparação ao grupo controle no 28º dia (P=0,001). O grupo T4 ao 28º dia de

tratamento obteve maior atividade de LDH, quando comparado ao 1º dia do mesmo grupo ($P=0,001$). Os resultados encontram-se na Figura 12.

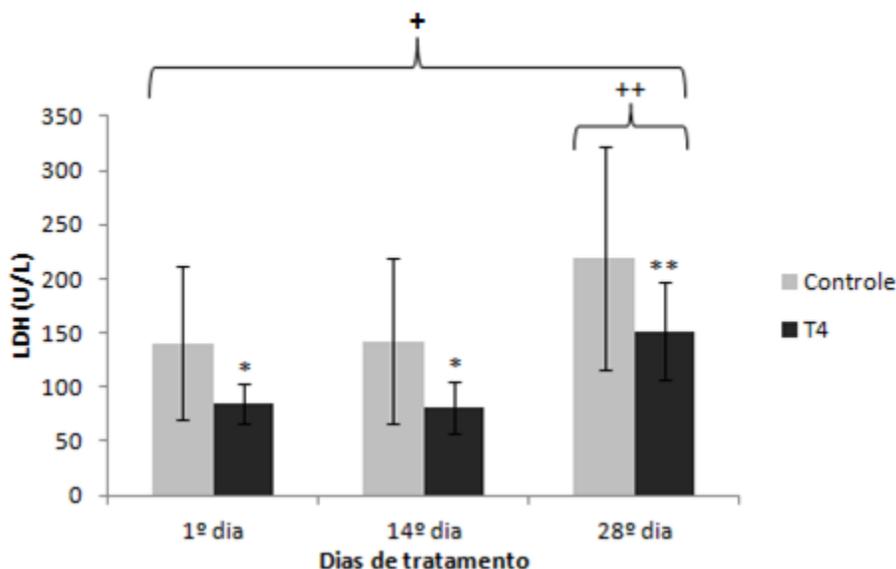
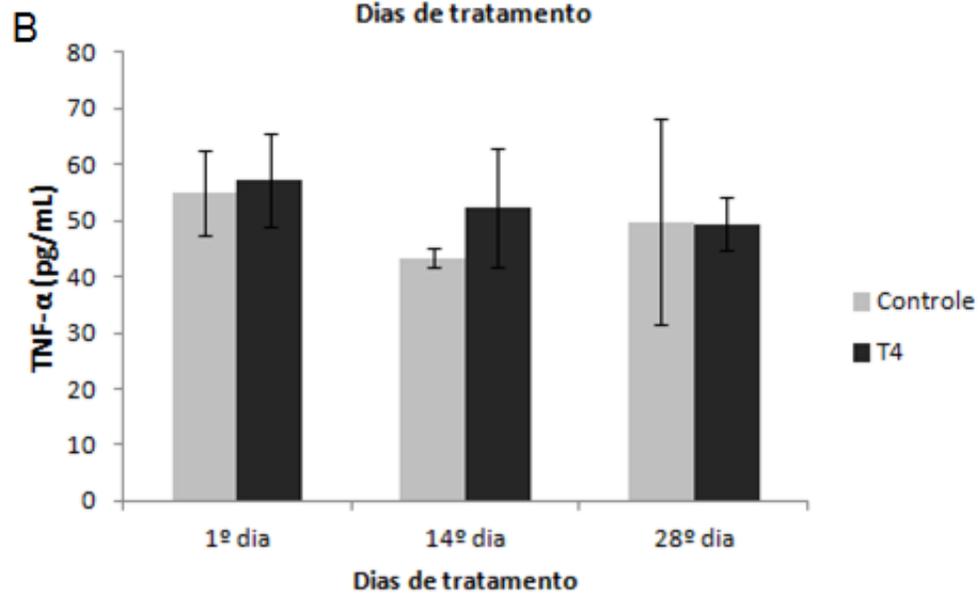
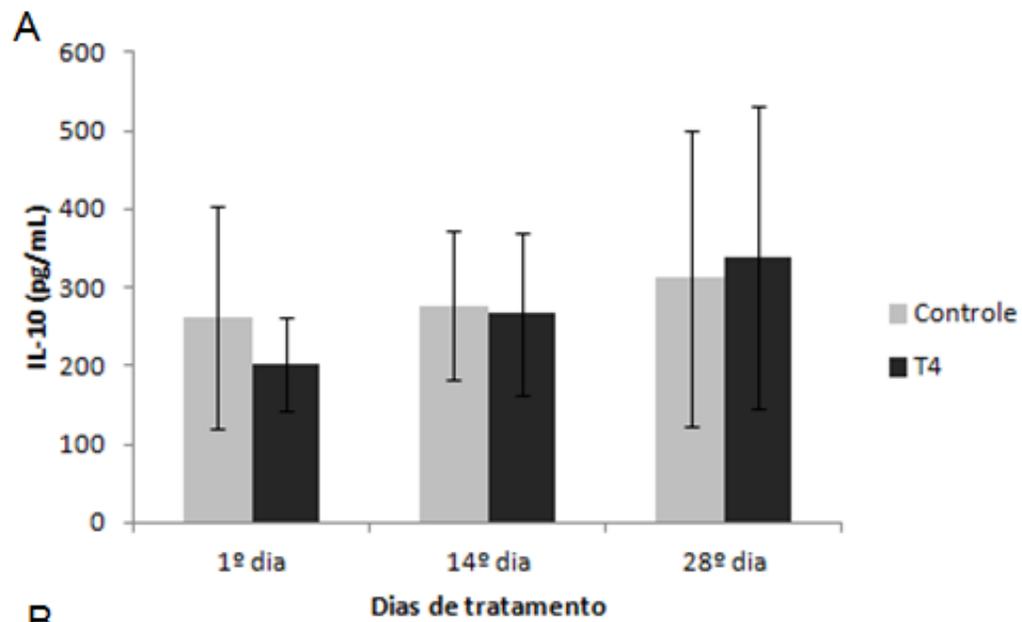


Figura 12. Análise temporal da atividade plasmática de LDH nos grupos controle e T4. Valores representam média±desvio padrão. $n= 7$ animais por grupo. Os dados foram analisados por análise longitudinal de dados, seguida de post-hoc Bonferroni. $^+P<0,01$ para a comparação entre os grupos, independente do tempo. $^{++}P<0,01$ em comparação com o 1º e 14º dias, sem distinção de grupos. $^*P=0,001$ em comparação com o 28º dia do grupo controle. $^{**}P=0,001$ em comparação com o 1º dia do mesmo grupo. LDH – lactato desidrogenase.

7.5 ANÁLISES DE PROTEÍNAS INFLAMATÓRIAS E APOPTÓTICAS

7.5.1 Quantificação de Proteínas Inflamatórias por “ELISA”

Não houve diferença entre os grupos na análise temporal de IL-10, TNF- α e razão IL-10/TNF- α , conforme dados da Figura 13.



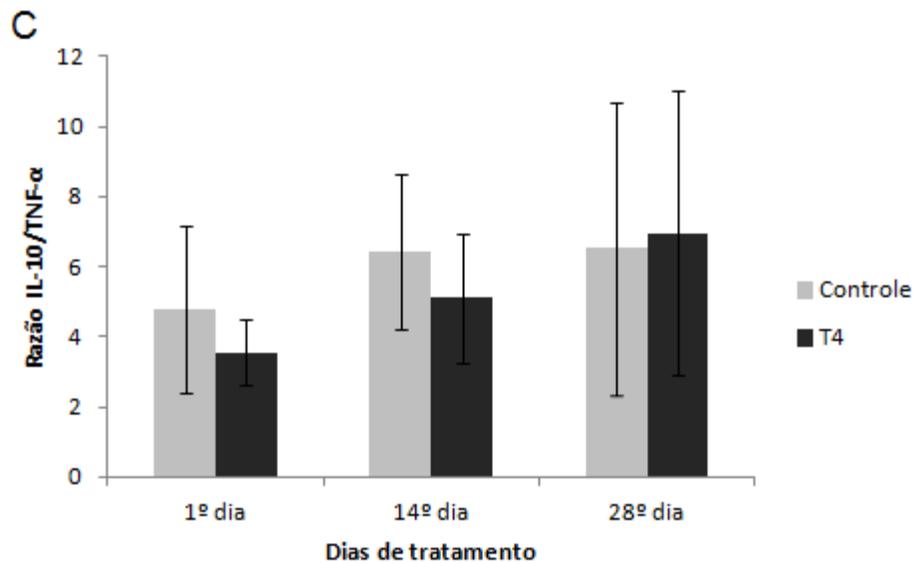
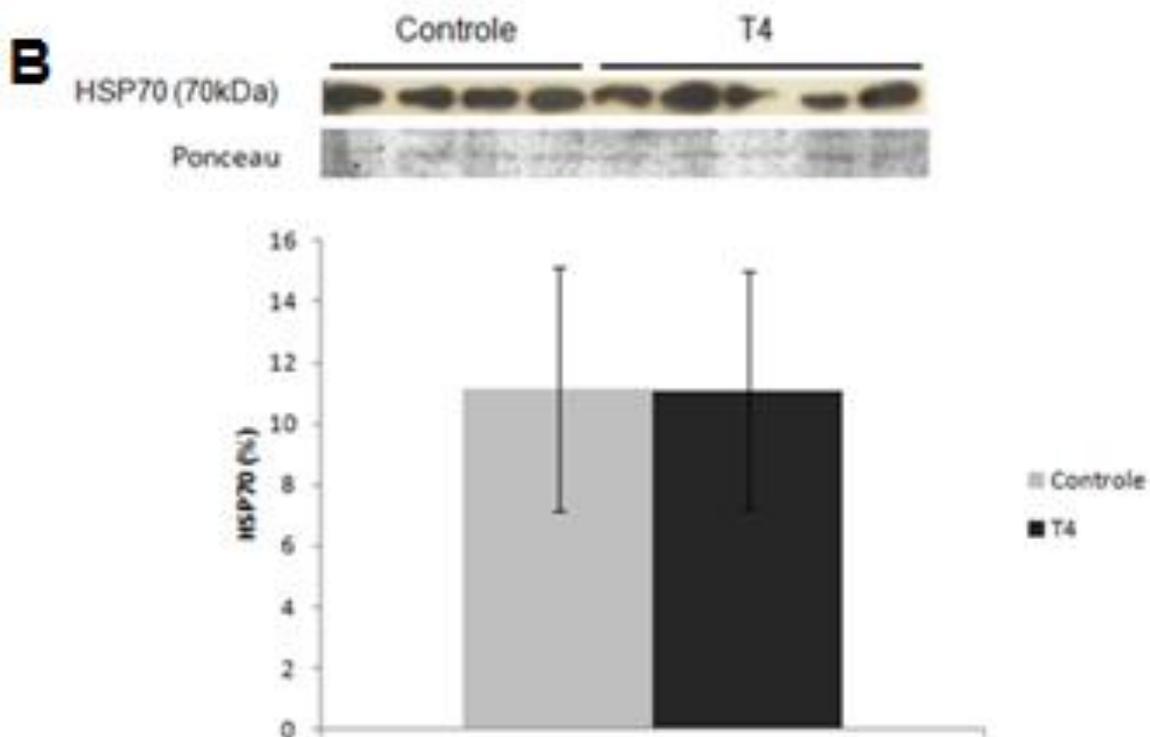
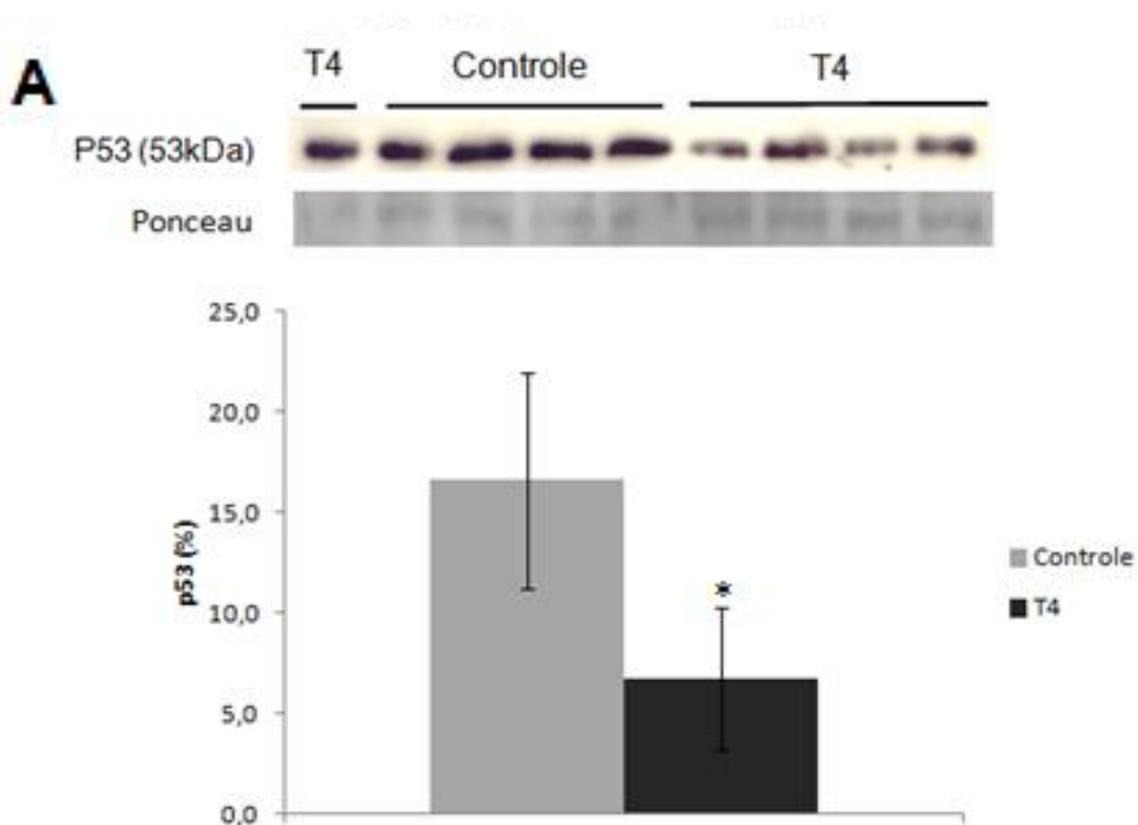


Figura 13. Análise temporal dos níveis plasmáticos de: **(A)** IL-10, **(B)** TNF- α e **(C)** razão IL-10/TNF- α nos grupos controle e T4. Valores representam média \pm desvio padrão. n= 7 animais por grupo. Os dados foram analisados por análise longitudinal de dados, seguida de post-hoc Bonferroni.

7.5.2 Quantificação de proteínas de sinalização celular por “Western Blot”

Com relação à quantificação, o p53 ($P < 0,05$) apresentou menor concentração nos animais do grupo T4, em comparação ao grupo controle. A HSP70, o HIF1- α e a caspase-9, não foram diferentes entre os grupos. Os resultados encontram-se na Figura 14.



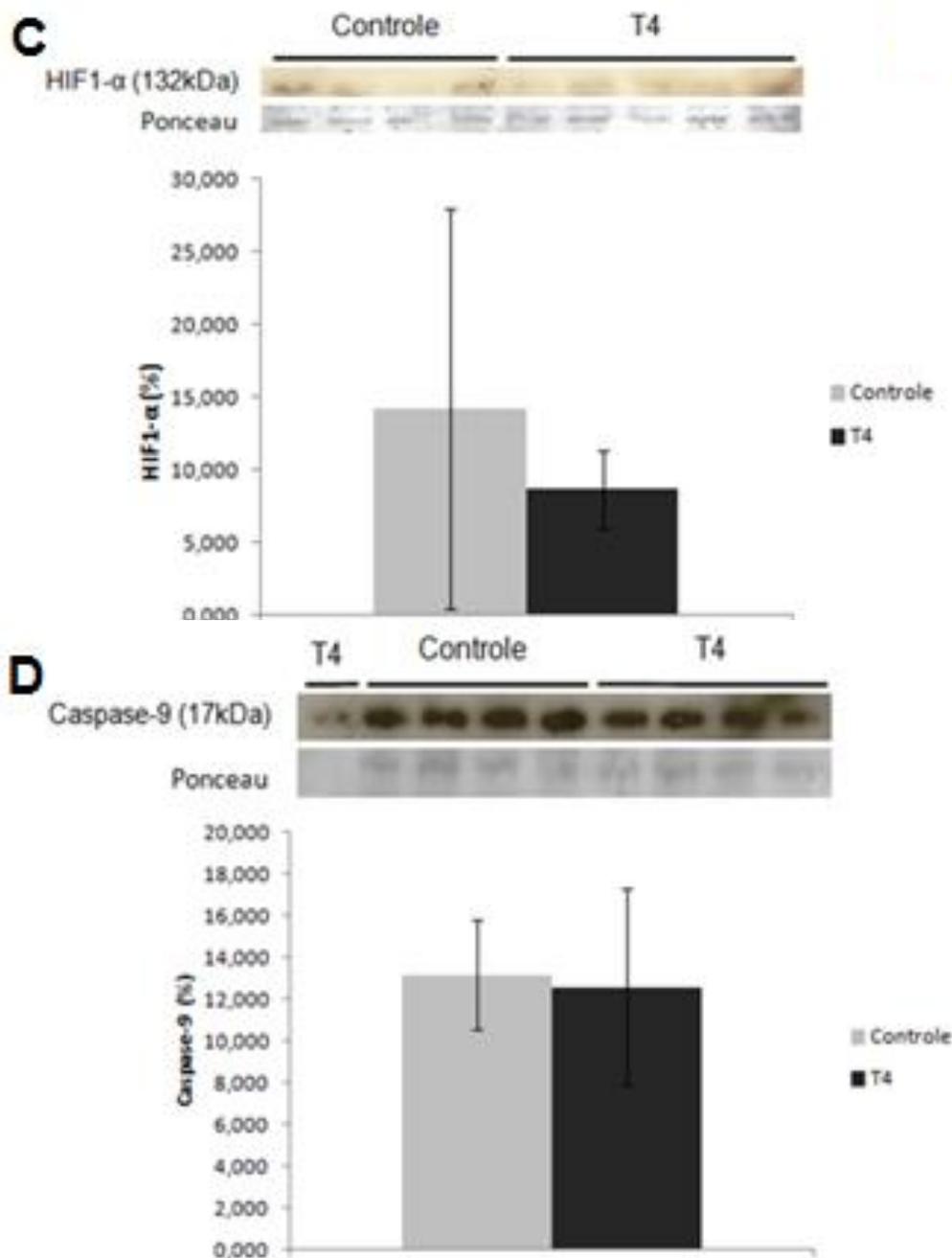
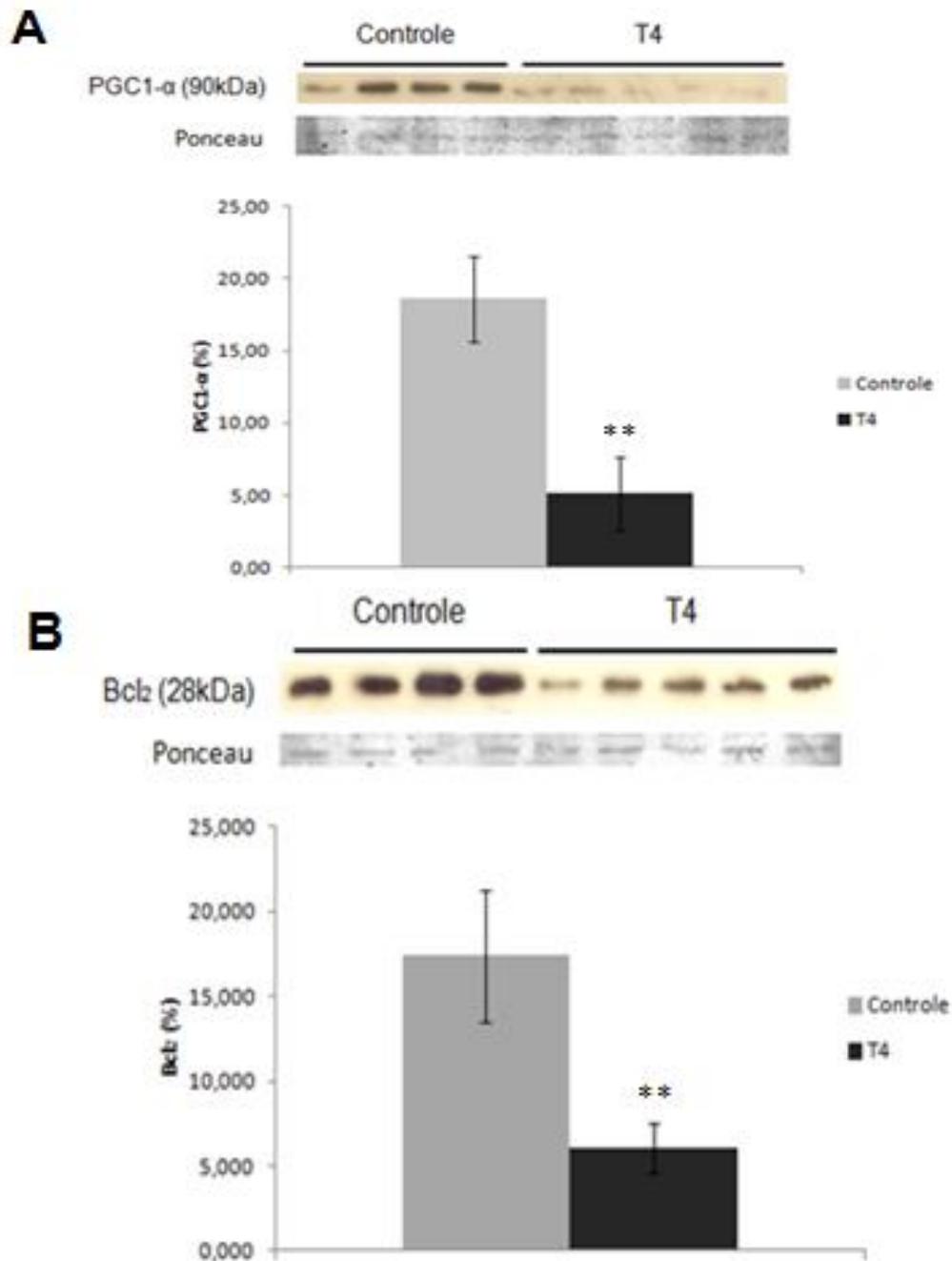


Figura 14. Imagem representativa das bandas e respectivos gráficos normalizados por Ponceau de p53 (A), HSP70 (B), HIF1- α (C) e caspase-9 (D) nos grupos controle e T4. Valores representam média \pm desvio padrão. n= 4 animais no grupo controle e 5 animais no grupo T4. Os dados foram analisados por teste t de Student.

A Bax também não foi diferente entre os grupos, no entanto, o PGC1- α ($P < 0,001$) e Bcl₂ ($P < 0,001$) apresentaram menor concentração nos animais do grupo T4, em comparação ao grupo controle. A razão Bax/Bcl₂ foi maior no grupo T4 em comparação ao grupo controle ($P < 0,05$), conforme Figura 15.



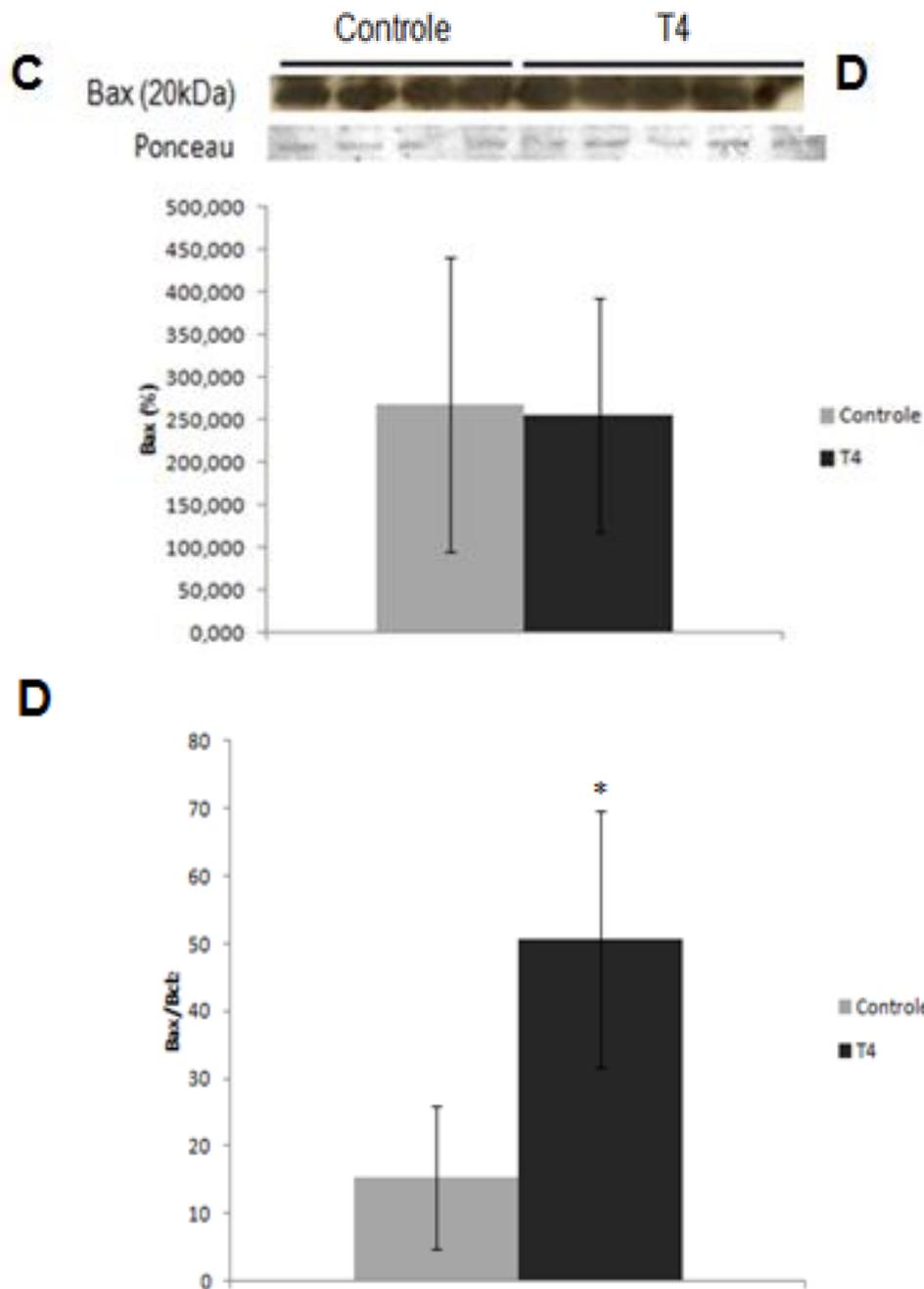


Figura 15. Imagem representativa das bandas e respectivos gráficos normalizados por Ponceau de PGC1- α (A), Bcl₂ (B), Bax (C) e razão Bax/Bcl₂ (D) nos grupos controle e T4. Valores representam média \pm desvio padrão. n= 4 animais no grupo controle e 5 animais no grupo T4. Os dados foram analisados por teste t de Student. *P<0,05 em comparação com o grupo controle. **P<0,001 em comparação ao grupo controle.

8 DISCUSSÃO

Este estudo foi conduzido em razão de investigar e proporcionar um maior entendimento sobre o envolvimento do estresse oxidativo induzido pelo hipertireoidismo e a consequente ativação de vias de inflamação e apoptose neste modelo experimental. Para isto, ao longo deste trabalho realizamos diversas análises, tanto em plasma e eritrócitos quanto em amostras de ventrículo esquerdo, realizando inclusive acompanhamento temporal de algumas moléculas envolvidas no desenvolvimento e progressão do hipertireoidismo.

Começamos avaliando o nível plasmático dos hormônios da tireoide (T3 e T4), que estavam elevados, confirmando a indução de hipertireoidismo. Em seguida, avaliamos o desenvolvimento de hipertrofia através de índices de massa e medidas morfométricas, que confirmaram a ocorrência de hipertrofia, tanto cardíaca quanto renal. Avaliamos parâmetros oxidantes (H_2O_2) e antioxidantes (sulfidrilas e 6PGD), que demonstraram a ocorrência de estresse oxidativo. Avaliamos também indicadores de dano tecidual (LDH), que encontrou-se aumentada ao longo do tempo. Não evidenciamos a ocorrência de inflamação, pois a HSP70, a IL-10 e o TNF- α permaneceram inalterados, mas verificamos a indução de apoptose com redução de PGC1- α , p53 e Bcl₂.

O nível plasmático aumentado de hormônio T4 e a diminuição da razão T3/T4 no grupo que recebeu água com adição de L-tiroxina indica que houve desenvolvimento de hipertireoidismo no grupo T4, uma vez que o aumento de T4 é uma das características desta patologia (Ploski *et al.*, 2011).

Conforme já bem documentado, os hormônios da tireoide são responsáveis por diversas alterações cardiovasculares decorrentes do hipertireoidismo, dentre elas, pelo estímulo de síntese proteica, pode-se destacar a hipertrofia cardíaca concêntrica. Ao longo do tempo, esta hipertrofia evolui para uma hipertrofia patológica e, posteriormente, para insuficiência cardíaca (Dillmann, 2010).

Neste estudo, foram realizadas diversas medidas morfométricas, a fim de verificar o desenvolvimento de hipertrofia. A primeira medida foi o acompanhamento do peso dos animais, cuja média permaneceu semelhante entre os grupos durante os 28 dias de tratamento, indicando que a amostra era homogênea quanto ao peso corporal. O maior peso do coração e do VE no grupo T4 é um indicativo de hipertrofia cardíaca, que foi constatada através de todos os índices de hipertrofia cardíaca apresentados na tabela 4, os quais foram maiores no grupo T4, confirmando o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzido pelo hipertireoidismo. Adicionalmente, houve o desenvolvimento de hipertrofia renal no grupo T4, fato já descrito em diversos estudos sobre o impacto dos hormônios da tireoide no sistema renal (Vargas *et al.*, 2006, Kobori *et al.*, 1998).

No hipertireoidismo, a capacidade antioxidante mitocondrial diminui, aumentando a suscetibilidade da mitocôndria a oxidantes, como as EROs, que possuem um importante papel na gênese da hipertrofia cardíaca neste modelo experimental, havendo evidências de que o aumento de EROs causa apoptose de cardiomiócitos e disfunção ventricular (Mishra & Samanta, 2012). Porém, nosso resultado da dosagem temporal do nível plasmático de EROs (Figura 3) mostrou uma diminuição do total de EROs com o passar do tempo, o que ocorreu em ambos os grupos (controle e T4), indicando que esta diminuição não tem relação

com o hipertireoidismo. No entanto, é possível observar que o nível de EROs no grupo T4 aos vinte e oito dias foi menor que ao primeiro e décimo quarto dias, já no grupo controle, o nível de EROs no dia vinte e oito foi menor apenas que no dia primeiro.

Por outra perspectiva, a hiperlipidemia é o maior indutor de estresse oxidativo. De acordo com Rueckschloss e colaboradores (2002), o LDL oxidado induz ações proateroscleróticas, como a expressão de NADPH oxidases e formação de ânion superóxido em células endoteliais vasculares, podendo ser este o mecanismo pelo qual o LDL oxidado estimula a geração de EROs, resultando em disfunção endotelial e aterosclerose, fatores de risco para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. O interessante é que no hipertireoidismo ocorre redução dos valores de colesterol total, LDL e HDL no plasma (Cambri *et al.*, 2013). Embora não tenhamos dosado marcadores lipídicos, a redução de tais marcadores pode ter causado uma diminuição do nível plasmático de EROs ao longo do tempo.

Apesar de ter ocorrido redução do nível plasmático de EROs em ambos os grupos, o nível tecidual de H_2O_2 foi maior no grupo T4 em comparação ao grupo controle, resultado já descrito na literatura (Araujo *et al.*, 2008). Conforme Venditti e colaboradores (2003), no hipertireoidismo, o aumento da liberação de H_2O_2 pelas mitocôndrias do tecido cardíaco ocorre nos estágios 3 e 4 da respiração, com substratos ligados ao complexo I ou II, e estas modificações na produção de H_2O_2 ocorrem devido a modulação que os hormônios da tireoide exercem sobre o conteúdo mitocondrial dos transportadores de elétrons auto-oxidáveis.

A avaliação do total de grupos sulfidrilas no plasma fornece uma noção indireta das defesas antioxidantes do organismo e baixos níveis deste grupo sugerem prejuízo no sistema de defesa antioxidante (Lemarechal *et al.*, 2006). A análise temporal do conteúdo plasmático de sulfidrilas revelou valores inferiores no grupo T4 em comparação ao grupo controle, indicando um prejuízo da defesa antioxidante no grupo T4. O grupo controle teve aumento de sulfidrilas nos dias 14 e 28, em comparação ao dia 1 no mesmo grupo, indicando aumento da defesa antioxidante. Já o grupo T4 apresentou menor nível de sulfidrilas no dia 14 em comparação com o grupo controle no mesmo dia. Este resultado demonstra que o grupo T4 teve uma redução significativa de antioxidantes no décimo quarto dia de tratamento, podendo esta ter sido causada pelo aumento de oxidantes, porém esta redução não se manteve até o dia 28. Além disso, o conteúdo tecidual de sulfidrilas foi semelhante entre os grupos. Esta alteração nos grupos tióis pode ter relação com a redução na disponibilidade de agentes redutores, tais como o NADPH, produzido pelas enzimas G6PD e 6PGD, componentes do ciclo das pentoses.

Foi observada uma menor atividade das enzimas do ciclo das pentoses em eritrócitos do grupo T4, independente do tempo, indicando que houve diminuição da formação de NADPH pelo ciclo das pentoses. Do dia 1 ao dia 14 houve uma redução da atividade das enzimas G6PD e 6PGD no grupo controle, diferentemente do grupo T4. Estas alterações na atividade total das duas enzimas provavelmente devem-se a alterações na atividade da 6PGD, uma vez que a G6PD não apresentou diferença entre os grupos. A 6PGD teve menor atividade no

grupo T4, independente do tempo, significando redução na formação de NADPH (Summermatter *et al.*, 2010).

Analisando juntamente o resultado do H_2O_2 tecidual, que encontrou-se aumentado, e o nível plasmático de sulfidrilas e G6PD, que encontraram-se diminuídos, pode-se afirmar que houve um aumento do estresse oxidativo, uma vez que houve aumento de oxidantes (H_2O_2) e diminuição de antioxidantes (sulfidrilas e 6PGD). Mais ainda, a análise temporal da atividade da tiorredoxina redutase e glutarredoxina em eritrócitos não demonstrou diferença entre os grupos, provavelmente estes antioxidantes não tiveram sua atividade alterada devido ao hipertireoidismo, o que reforça o ambiente oxidativo induzido neste modelo. Do contrário, pode ter ocorrido uma leve diminuição da atividade do sistema da glutathione, evidenciada pela redução de 6PGD e, conseqüentemente, de NADPH, que é o principal agente redutor da glutathione (Summermatter *et al.*, 2010). Nesta perspectiva, não haveria necessidade de produzir mais NADPH devido ao fato do substrato glutathione não estar sendo utilizado.

O aumento da atividade plasmática da enzima LDH é bem documentado por estudos experimentais de hipertireoidismo (Messarah *et al.*, 2011). Nossos resultados da análise temporal da LDH mostraram que houve uma diminuição do nível plasmático desta enzima no grupo T4 em comparação ao grupo controle, independente do tempo. Mas considerando os diferentes tempos, é possível notar que no dia 28 a atividade da LDH foi maior que nos dias 1 e 14, tanto no grupo controle quanto no grupo T4. Ao comparar os diferentes tempos no grupo T4, houve um aumento da atividade desta enzima no dia 28 em comparação ao mesmo grupo no primeiro dia de tratamento. Neste mesmo período o grupo

controle não sofreu alteração da atividade da LDH. Portanto, estes resultados demonstram que o grupo T4 pode ter desenvolvido lesões cardíacas e disfunções (Messarah *et al.*, 2011).

Com relação à indução de inflamação que ocorre no hipertireoidismo, nossos resultados mostraram que os níveis plasmáticos de IL-10, TNF- α e a razão IL-10/TNF- α permaneceram inalterados ao longo do período de tratamento. É conhecido que o TNF- α aumenta os níveis de EROs e a apoptose de cardiomiócitos, e esta ação é prevenida pela IL-10, que inibe a produção de TNF- α e a formação de EROs (Khaper *et al.*, 2010). Uma vez que não há alteração na homeostase destas citocinas, pode-se sugerir que estes mediadores inflamatórios não estão exercendo influência nas alterações nos níveis de EROs.

No que diz respeito às análises de western blot, a quantificação do HIF1- α e caspase-9, não houve diferença entre os grupos, demonstrando que estas proteínas não foram alteradas devido ao hipertireoidismo. Também não houve uma resposta da HSP70, o que reforça os resultados da IL-10 e TNF- α , pois a HSP70 possui ação anti-inflamatória, inibindo o TNF- α (Noble & Shen, 2012). Uma vez que a HSP70 permaneceu inalterada, o TNF- α também não teve alterações, indicando que não houve indução de inflamação por esta via.

O HIF1- α e a caspase -9, duas proteínas envolvidas com a sinalização de apoptose, não foram diferentes entre os grupos, indicando que não houve indução de apoptose por essas vias. Porém, apesar da quantificação de Bax não ter demonstrado diferença, a quantificação da Bcl₂ revelou uma redução desta proteína no grupo T4. Como a Bcl₂ é uma proteína de sinalização de sobrevivência celular, sua redução indica que há uma possível indução de

apoptose. Este fato é confirmado pelo aumento da razão Bax/Bcl₂ no grupo T4, que indica que como há maior quantidade de Bax em relação a quantidade de Bcl₂, há uma propensão para a apoptose, pois conforme descrito na literatura, se heterodímeros Bcl₂-BAX prevalecem, a célula irá sobreviver, ao passo que se há predomínio de homodímeros BAX, a morte celular ocorre (Olivetti *et al.*, 1997).

Como descrito anteriormente, o PGC1- α entre outras ações, modula a atividade do p53, promovendo a parada do ciclo celular e a ativação de genes envolvidos com o controle do metabolismo. Ao longo do tempo, esta ação gera um estresse metabólico, promovendo a depuração de EROs, fato que poderia explicar a redução do nível plasmático de EROs no grupo T4. Devido à falta de nutrientes, o PGC1- α seria degradado e ocorreria indução de apoptose pelo p53 (Sen *et al.*, 2011). O fato intrigante é que nossos resultados mostram a redução de ambos PGC1- α e p53 no grupo T4 em comparação ao grupo controle. Talvez o PGC1- α possa ter sido degradado, mas não em quantidade suficiente para liberar as ações do p53. Mas como descrito na literatura, a diminuição da função mitocondrial no músculo cardíaco seguida da sobrecarga de pressão está relacionada com a diminuição da atividade de PGC1- α e de sua via de sinalização (Garnier *et al.*, 2003). Além disso, a severa deficiência de energia e a diminuição da expressão de PGC1- α são características de disfunção cardíaca (Ventura-Clapier *et al.*, 2008).

9 CONCLUSÃO

Os resultados das análises realizadas permitem concluir primeiramente que houve o desenvolvimento de hipertireoidismo nos animais do grupo T4, conforme demonstrado pelos níveis plasmáticos de T4 e razão T3/T4. O aumento do hormônio T4 induziu estresse oxidativo, que pôde ser evidenciado pelo aumento tecidual de oxidantes (H_2O_2) e redução plasmática de antioxidantes (sulfidrilas e 6PGD). O estresse oxidativo aliado à ação dos hormônios da tireoide induziu hipertrofia cardíaca e também hipertrofia renal nos animais do grupo T4, como demonstrado por todos os índices de hipertrofia cardíaca e renal. Esta hipertrofia, conforme evidenciado na literatura, pode ter ocorrido devido ao aumento do PGC1- α em uma fase inicial de tratamento (Goldenthal *et al.*, 2004). Possivelmente, este aumento do PGC1- α induziu o aumento da atividade da LDH, importante indicador de dano tecidual. Ao longo do tempo, o estresse metabólico causado pelo PGC1- α causou a depuração das EROs a nível sistêmico. Associado a isso, o PGC1- α passou a ser degradado, não o suficiente para que o p53 pudesse induzir apoptose, mas suficiente para que ocorresse redução de Bcl₂, induzindo apoptose. A redução de PGC1- α indica um processo patológico mais avançado neste modelo experimental de hipertireoidismo, no qual estaria ocorrendo disfunção cardíaca e possível progressão para insuficiência cardíaca. As conclusões deste trabalho encontram-se esquematizadas na Figura 16.

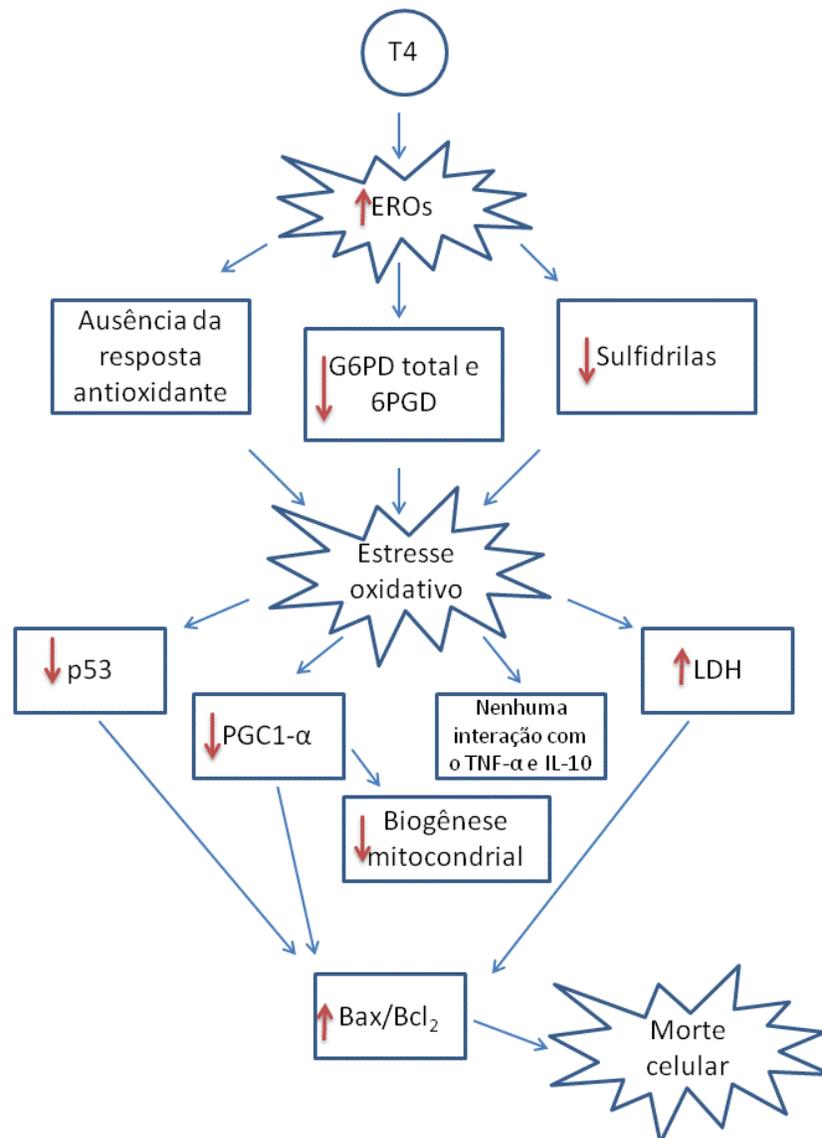


Figura 16. Esquema de uma possível via de sinalização dos hormônios da tireoide, levando ao estresse oxidativo e morte celular. O aumento do hormônio T4 estimula a maior formação de EROs, sem que haja uma resposta antioxidante. Ao contrário ocorre redução de G6PD total, 6PGD e sulfidrilas frente ao aumento de EROs, gerando um estado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo prolongado promove redução de p53 e PGC1- α , diminuindo a biogênese mitocondrial, o que, aliado a ausência de resposta inflamatória, promove o aumento de LDH, causando dano tecidual e levando a morte celular, evidenciada pelo aumento da razão Bax/Bcl₂.

10 PERSPECTIVAS

As perspectivas deste trabalho incluem quantificar por western blot:

- 1 – O conteúdo de p53 na sua forma ativa, em tecido cardíaco;
- 2 – O conteúdo de NF κ β , em tecido cardíaco;
- 3 – Os níveis de IL-6, IL-10 e TNF- α , em amostra de plasma.

11 REFERÊNCIAS

Ago T, Kuroda J, Kamouchi M, Sadoshima J, Kitazono T. Pathophysiological Roles of NADPH Oxidase/Nox Family Proteins in the Vascular System. *Circ J.* v. 75, p. 791 – 1800, 2011.

Amador, E.; Dorfman, L.E.; Wacker, W.E.C. *Clin. Chem.* 9, 391, 1963.

Araujo ASR, Ribeiro MFM, Enzweiler A, Schenkel P, Fernandes TRG, Partata WA. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrinol*; 249: 133-39, 2006.

Araujo ASR, Schenkel P, Enzweiler AT, Fernandes TRG, Partata WA, Llesuy S, Ribeiro MFM, Khaper N, Singal PK, Bello´-Klein A. The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *Journal of Molecular Endocrinology* 41, 423–430, 2008.

Bernal J. Thyroid hormone receptors in brain development and function. *Nature Reviews Endocrinology* 3, 249-259, 2007.

Cambri LT, Vital TM, Teixeira CVL, Jambassi Filho JC, Dalia RA, Luciano E. Perfil lipídico de ratos com hipertireoidismo induzido: efeitos do exercício físico agudo. *R. bras. Ci. e Mov* 21(3):13-20, 2013.

Cao X, Kambe F, Yamauchi M, Seo H. Thyroid-hormone-dependent activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade requires Src and enhances neuronal survival. *Biochem. J.* 424, 201–209, 2009.

Chaudhari M, Jayaraj R, Bhaskar AS, Lakshmana Rao PV. Oxidative stress induction by T-2 toxin causes DNA damage and triggers apoptosis via caspase pathway in human cervical cancer cells. *Toxicology* 262:153-61, 2009.

Cohen RA, Tong XY. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol.* v. 55, n. 4, p. 308–316, 2010.

Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox Signalling. *Biochem. J.* 425, 313–325, 2010.

Dai DF, Rabinovitch PS, Ungvari Z. Mitochondria and Cardiovascular Aging. *Circ Res.* v. 110, p. 1109-1124, 2012.

Das B, Young D, VasANJI A, Gupta S, Sarkar S, Sen S. Influence of p53 in the transition of myotrophin-induced cardiac hypertrophy to heart failure. *Cardiovascular Research* 87, 524–534, 2010.

Dillmann W. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. *Heart Fail Rev* 15:125–132, 2010.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82(1):70–77, 1959.

Erel O, Neselioglu S. A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clinical Biochemistry* 47 326–332, 2014.

Fazio S, Palmieri EA, Lombardi G, Biondi B. Effects of Thyroid Hormone on the Cardiovascular System. *Recent Progress in Hormone Research* 59:31-50, 2004.

Fernandes RO, Dreher GJ, Schenkel PC, Fernandes TR, Ribeiro MF, Araujo AS, Belló-Klein A. Redox status and pro-survival/pro-apoptotic protein expression in the early cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *Cell Biochem Funct* 29 (7): 617-623, 2011.

Ferreira A. W, Ávila S. L. M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes. 2º ed. Ed. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, 2001.

Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 551:491–501, 2003.

Gregory SK. Peripheral Metabolism of Thyroid Hormones: A Review. *Altern Med Rev* 5(4):306-333, 2000.

Goldenthal MJ, Weiss HR, Marin-Garcia J. Bioenergetic remodeling of heart mitochondria by thyroid hormone. *Mol Cell Biochem* 265: 97–106, 2004.

Goldim JR, Raymundo MM. Pesquisa em saúde e direito dos animais. Porto Alegre, HCPA, 1997.

Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple Facets of NF- κ B in the Heart: To Be or Not to NF- κ B. *Circ Res*. 108:1122-1132, 2011.

Gul M, Demircan B, Taysi S, Oztasan N, Gumustekin K, Siktar E, Polat MF, Akar S, Akcay F, Dane S. Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 143, p. 239–245, 2006.

Halpern BN, Pacaud A. [Technique of obtaining blood samples from small laboratory animals by puncture of ophthalmic plexus]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 145(19-20):1465-6, 1951.

Harsdorf RV, Li PF, Dietz R. Signaling Pathways in Reactive Oxygen Species–Induced Cardiomyocyte Apoptosis. *Circulation.* 99:2934-2941, 1999.

Henry JB. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* 19^a ed. W. B. Sanders Company, 1999.

Holmgren A, Åslund F. “Glutaredoxin” *Methods in Enzymology*, vol. 252, pp. 283–292, 1995.

Holmgren A, Björnstedt M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 252:199-208, 1995.

Hu LW, Benvenuti LA, Liberti EA, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves MLM. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285: 1473–1480, 2003.

Khaper N, Bryan S, Dhingra S, Singal R, Bajaj A, Pathak CM, Singal PK. Targeting the vicious Inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1033-1049, 2010.

Kim BH, Cho KI, Kim SM, Kim N, Han J, Kim JY, Kim IJ. Heart rate reduction with ivabradine prevents thyroid hormone-induced cardiac remodeling in rat. *Heart Vessels* 28:524–535, 2013.

Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *European Journal of Biochemistry.* 267:4928–4944, 2000.

Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med*, 344:501–9, 2001.

Kobori H, Ichihara A, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Mechanism of hyperthyroidism-induced renal hypertrophy in rats. *J Endocrinol*. 159(1):9-14, 1998.

Koeppen BM, Stanton BA. *Berne & Levy: Fisiologia*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

Ladenson PW, Kieffer JD, Farwell AP, Ridgway EC. Modulation of myocardial L-triiodothyronine receptors in normal, hypothyroid and hyperthyroid rats. *Metabolism*; 35: 5-12, 1986.

Laemmli V. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-85, 1970.

LeBel CP, Ali SF, Bondy SC. Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol* 112 (1):161-165, 1992.

Lemarechal H, Allanore Y, Chenevier-Gobeaux C, Kahan A, Ekindjian OG, Borderie D. Serum protein oxidation in patients with rheumatoid arthritis and effects of infliximab therapy. *Clinica Chimica Acta* 372, 147–153, 2006.

Leonard JL, Koehrle L. Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: Braverman LE, Utiger RD, editors. *Werner and Ingbar's the thyroid: a fundamental and clinical text*. Philadelphia: Lippincott-Raven. 125–161, 1996.

Leong SF, Clark JB. Regional development of glutamate dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem* 43(1):106-111, 1984.

Li HJ, Yin H, Yao YY, Shen B, Bader M, Chao L & Chao J. Tissue kallikrein protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy through kinin B2 receptor and glycogen synthase kinase-3 β activation. *Cardiovascular Research* 73: 130–142, 2007.

Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193: 265–75, 1951.

Mathur S, Walley KR, Wang Y, Indrambarya T, Boyd JH. Extracellular Heat Shock Protein 70 Induces Cardiomyocyte Inflammation and Contractile Dysfunction via TLR2. *Circ J*. 75: 2445 – 2452, 2011.

Messarah M, Saoudi M, Boumendjel A, Boulakoud MS, Feki AE. Oxidative stress induced by thyroid dysfunction in rat erythrocytes and heart. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 3 1: 33–41, 2011.

Mihara S, Suzuki N, Wakisaka S, Suzuki S, Sekita N, Yamamoto S, Saito N, Hoshino T, Sakane T. Effects of Thyroid Hormones on Apoptotic Cell Death of Human Lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1378–1385, 1999.

Miranda M.F.S. Função tireoidiana e estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio em coração isolado de rato. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós graduação – Fisiologia; 1997.

Mishra P, Samanta L. Oxidative Stress and Heart Failure in Altered Thyroid States. *The ScientificWorld Journal*. Volume 2012, Article ID 741861, 17 pages, 2012.

Narula J, Pandey P, Arbustini E, Haider N, Narula N, Kolodgiei Fd, Bello Bd, Semigran Mj, Bielsa-Masdeu A, Dec Gw, Israels S, Ballester M, Virmanii R, Saxena S, Kharbanda S. Apoptosis in heart failure: Release of cytochrome c from

mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 8144–8149, 1999.

Noble EG, Shen GX. Impact of Exercise and Metabolic Disorders on Heat Shock Proteins and Vascular Inflammation. *Autoimmune Diseases Volume 2012*, Article ID 836519, 13 pages, 2012.

Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA, Quaini E, Loreto CD, Beltrami CA, Krajewski S, Reed JC, Anversa P. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 336:1131-41, 1997.

Paravicini TM, Touyz HM. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension. Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* v. 31, n.2, p. S170–S180, 2008.

Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol.* v. 3, n. 6, p. 186-200, 2011.

Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Meth*; 38(1-2): 161-70, 1980.

Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is hif-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol.* 64 (5-6):889-92, 2002.

Ploski R, Szymanski K, Bednarczuk T. The genetic basis of Graves' disease. *Current Genomics,* 12, 542-563, 2011.

Regula KM, Kirshenbaum LA. p53 activates the mitochondrial death pathway and apoptosis of ventricular myocytes independent of de novo gene transcription. *J Mol Cell Cardiol.* 33:1435–1445, 2001.

Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H. Dose-Dependent Regulation of NAD(P)H Oxidase Expression by Angiotensin II in Human Endothelial Cells - Protective Effect of Angiotensin II Type 1 Receptor Blockade in Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1845-1851, 2002.

Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 446: 444–448, 2007.

Sarkar M, Varshney R, Chopra M, Sekhri T, Adhikari JS, Dwarakanath BS. Flow-Cytometric Analysis of Reactive Oxygen Species in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Thyroid Dysfunction. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)* 70B:20–23, 2005.

Sen N, Satija YK, Das S. PGC-1 α , a Key Modulator of p53, Promotes Cell Survival upon Metabolic Stress. *Molecular Cell* 44, 621–634, 2011.

Shelton MD, Chock PB, Mieyal JJ. Glutaredoxin: Role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxidants & Redox Signaling*. 7:348–366, 2005.

Silverthorn DU. *Fisiologia Humana*. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 202, 321–329, 2009.

Stumpf C, Lehner C, Yilmaz A, Daniel WG, Garlachs CD. Decrease of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 in patients with advanced chronic heart failure. *Clinical Science* 105, 45–50, 2003.

Suarez J, Scott BT, Suarez-Ramirez JA., Chavira CV, Dillmann WH. Thyroid hormone inhibits ERK phosphorylation in pressure overload-induced hypertrophied mouse hearts through a receptor-mediated mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C1524–C1529, 2010.

Summermatter S, Baum O, Santos G, Hoppeler H, Handschin C. Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Coactivator 1 α (PGC-1 α) Promotes Skeletal Muscle Lipid Refueling in Vivo by Activating de Novo Lipogenesis and the Pentose Phosphate Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 285,32793-32800, 2010.

Summermatter S, Santos G, Pérez-Schindler J, Handschin C. Skeletal muscle PGC-1 α controls whole-body lactate homeostasis through estrogen-related receptor α -dependent activation of LDH B and repression of LDH A. *PNAS* 110 (21): 8738-8743, 2013.

Suzuki H; Tomida A; Tsuruo T. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1a as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* 20, 5779-5788, 2001.

Vargas F, Moreno JM, Rodríguez-Gómez I, Wangenstein R, Osuna A, Álvarez-Guerra M, García-Estañ J. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *European Journal of Endocrinology* 154 197–212, 2006.

Venditti P, Puca A, Di Meo S. Effects of thyroid state on H₂O₂ production by rat heart mitochondria: sites of production with complex I- and complex II-linked substrates. *Horm Metab Res* 35(1): 55-61, 2003.

Ventura-Clapier R; Garnier A; Veksler VI, Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α . *Cardiovascular Research* 79, 208–217, 2008.

Vondriska TM, Wang Y. A New (Heat) Shocking Player in Cardiac Hypertrophy. *Circ Res.* 103:1194-1196, 2008.

Wacker WEC, Snodgrass PJ. *J.A.M.A* 174, 2142, 1960.

Weltman NY, Wang D, Redetzke RA, Gerdes AM. Longstanding Hyperthyroidism Is Associated with Normal or Enhanced Intrinsic Cardiomyocyte Function despite Decline in Global Cardiac Function. *PLoS ONE* 7(10): e46655. doi:10.1371/journal.pone.0046655, 2012.

Yen PM. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiol Rev* 81: 1097–1142, 2001.

Zoidis E, Ghirlanda-Keller C, Schmid C. Triiodothyronine stimulates glucose transport in bone cells. *Endocrine* 41:501–511, 2012.