

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

VANESSA DUARTE ORTIZ

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CO-ADMINISTRAÇÃO DOS HORMÔNIOS DA
TIREOIDE E DO CARVEDILOL SOBRE O CORAÇÃO DE RATOS WISTAR
SUBMETIDOS AO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

Porto Alegre

2018

Vanessa Duarte Ortiz

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CO-ADMINISTRAÇÃO DOS HORMÔNIOS DA
TIREOIDE E DO CARVEDILOL SOBRE O CORAÇÃO DE RATOS WISTAR
SUBMETIDOS AO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

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

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Luz de Castro

Porto Alegre

2018

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, por toda paciência, carinho, ensinamentos de vida, exemplo de caráter e pelo apoio emocional fundamental em todos os momentos. Ao meu pai e minha irmã pelo companheirismo e carinho.

Ao meu orientador Alex Sander da Rosa Araujo, pelos ensinamentos e excelente orientação. Pela paciência, companheirismo, dedicação e disposição para ajudar em todos os momentos. Não tenho palavras para expressar minha gratidão pela sua orientação, pois é um exemplo de professor e ser humano.

Ao meu co-orientador Alexandre Luz de Castro, pela paciência e parceria desde meus anos de iniciação científica. Muito do meu aprendizado teórico e prático do laboratório obtive graças a ele.

À professora Adriane Belló-Klein, pela generosidade em relação às pessoas que a cercam, sendo um exemplo de professora e pessoa para todos no laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (UFRGS), em especial ao Patrick, Rayane, Denise, Bruna, Schauana e Alexandre, pelo esforço e dedicação a este trabalho.

À Tânia Regina Fernandes, pela competência e dedicação com que atua em todos os trabalhos desenvolvidos no laboratório, incluindo este.

À banca que avalia essa dissertação, pelo interesse e tempo disponibilizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Departamento de Fisiologia e à UFRGS, pelas oportunidades e estruturas disponíveis para realização deste trabalho.

Agradeço aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS por apoiarem a realização deste trabalho de pesquisa.

RESUMO

Introdução: Após o infarto agudo do miocárdio (IAM), o tratamento com hormônios da tireoide (HT) vem revelando efeitos cardioprotetores. Os HT, todavia, provocam uma estimulação adrenérgica, induzindo elevação da frequência cardíaca, a qual contribui para progressão da disfunção ventricular após o IAM. O betabloqueador carvedilol, entretanto, é capaz de bloquear a estimulação adrenérgica. **Objetivo:** Avaliar o efeito da administração conjunta dos HT e do carvedilol sobre o coração de ratos submetidos ao IAM. Nesse contexto, focar nos efeitos dessa co-administração sobre o remodelamento ventricular, a função cardíaca e o estresse oxidativo. **Materiais e métodos:** Ratos Wistar machos foram divididos em cinco grupos (n=8-10/grupo): grupo sham (SHAM), grupo infarto (IM), grupo infarto+HT (IM+HT), grupo infarto+carvedilol (IM+C) e grupo infarto+C+HT (IM+C+HT). Após o IAM, os grupos SHAM e IM receberam salina, e os tratados receberam seus respectivos tratamentos por 12 dias por gavagem. Após esse período, os animais foram submetidos a uma avaliação ecocardiográfica, e, posteriormente, ao cateterismo ventricular. Em seguida, os animais foram eutanasiados para a coleta do coração, do pulmão e do fígado, para análises morfométricas e bioquímicas. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. Nível de significância $P < 0,05$. **Resultados:** A respeito dos parâmetros morfométricos, foi possível verificar hipertrofia cardíaca nos grupos infartados tratados em relação aos grupos SHAM e IM. Quanto aos parâmetros ecocardiográficos, os grupos tratados demonstraram aumento da espessura da parede posterior na sístole, da fração de ejeção e redução do índice de tensão de parede em comparação ao grupo IM. Os grupos IM+C e IM+C+HT também apresentaram atenuação da redução da mudança de área fracional e do aumento do volume sistólico final em relação aos grupos IM e IM+HT. Quanto aos parâmetros hemodinâmicos, houve redução das dP/dt máxima e mínima, da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (VE) e aumento da pressão diastólica final do VE no grupo IM em comparação ao SHAM. Entretanto, todos esses parâmetros foram revertidos nos grupos tratados. A frequência cardíaca aumentou nos grupos IM+HT e IM+C+HT em relação aos outros grupos, mas reduziu no grupo IM+C+HT em relação ao grupo IM+HT. Quanto aos parâmetros de estresse oxidativo, verificou-se aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e redução dos níveis de sulfidrilas no grupo IM e IM+C em relação ao grupo SHAM, enquanto os grupos IM+HT e IM+C+HT não foram diferentes do grupo SHAM. Ainda, no grupo IM+C+HT, o co-tratamento apresentou efeito sinérgico na redução dos níveis de ERO e no aumento da razão GSH/GSSG. **Conclusão:** A co-administração do carvedilol e dos HT foi capaz de melhorar o remodelamento ventricular e a função cardíaca após o IAM. Ainda, o carvedilol foi capaz de exercer seu efeito betabloqueador no grupo IM+C+HT, uma vez que reduziu a frequência cardíaca aumentada pelos HT. Além disso, a co-administração apresentou um efeito sinérgico positivo nos parâmetros de estresse oxidativo, especificamente, sobre os níveis de ERO e o balanço redox através da razão GSH/GSSG, dessa forma preservando a homeostase redox do tecido cardíaco.

Palavras-chave: Carvedilol. Hormônios da tireoide. Infarto agudo do miocárdio. Remodelamento ventricular. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: After acute myocardial infarction (AMI), treatment with thyroid hormones (TH) has revealed cardioprotective effects. However, TH causes adrenergic stimulation, which effect increase heart rate and this may contribute to ventricular dysfunction progression after AMI. Meanwhile, the beta-blocker carvedilol is able to block adrenergic stimulation. **Aim:** To evaluate the effects of TH and carvedilol co-administration on the heart of rats submitted to AMI. In this context, it focused on the effects of this co-administration on ventricular remodeling, cardiac function and oxidative stress. **Material and methods:** Male Wistar rats were divided in five groups (n=8-10/group): sham (SHAM), infarcted (MI), infarcted+TH (MI+TH), infarcted+carvedilol (MI+C) and infarcted group+C+TH (MI+C+TH). Post-AMI, SHAM and MI groups received saline, and the treated groups received their respective treatments for 12 days by gavage. After this period, the animals were submitted to an echocardiographic evaluation and, later, to the ventricular catheterization. Afterwards, the animals were euthanized for the heart lung and liver collection, for morphometric and biochemical analyzes. **Statistical Analysis:** One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test. Significance level $P < 0,05$. **Results:** Regarding the morphometric parameters, it was possible to verify cardiac hypertrophy in the treated infarcted groups in relation to the SHAM and MI groups, as well as there was no significant difference between the groups regarding pulmonary and hepatic congestion. In relation to echocardiographic parameters, treated groups showed an increase in systolic posterior wall thickness, ejection fraction and a reduction in wall tension index compared to MI group. MI+C and MI+C+TH groups also presented attenuation of the reduction in the fractional area change and of the increase in the final systolic volume in relation to the MI and MI+TH groups. Regarding the hemodynamic parameters, there was a reduction of the maximum and minimum dP/dt , the left ventricular (LV) systolic pressure and an increase in the final LV diastolic pressure in the MI group compared to SHAM. However, all these parameters were reversed in the treated groups. The heart rate increased in the MI+TH and MI+C+TH groups compared to the other groups, but decreased in the MI+C+TH group compared to the MI+TH group. Regarding the parameters of oxidative stress, there was an increase in the levels of reactive oxygen species (ROS) and reduction of sulfhydryl levels in the MI and MI+C groups compared to the SHAM group, while the MI+TH and MI+C groups were not different from the SHAM group. In addition, in the MI+C+TH group, the co-treatment showed a synergic effect in reducing ERO levels and increasing GSH/GSSG ratio. **Conclusion:** Co-administration of carvedilol and TH was able to improve ventricular remodeling and cardiac function after AMI. In addition, carvedilol was able to exert its betablocking effect in the MI+C+TH group, since it reduced the heart rate increased by TH. In addition, co-administration had a positive synergistic effect on oxidative stress parameters, specifically on ROS levels and redox balance through the GSH/GSSG ratio, thus preserving redox homeostasis of cardiac tissue.

Keywords: Carvedilol. Thyroid hormones. Acute myocardial infarction. Ventricular remodeling. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias de formação das ERO, da peroxidação lipídica e o papel de alguns antioxidantes como a glutathiona, vitamina E e vitamina C no manejo do estresse oxidativo.

Figura 2 – Estrutura molecular do carvedilol.

Figura 3 – Esquema cronológico do protocolo experimental deste trabalho.

Figura 4 – Imagens ecocardiográficas do VE de ratos Wistar obtidas no modo-M.

Figura 5 – Dados hemodinâmicos obtidos através do cateterismo do VE.

Figura 6 – Níveis totais da ERO.

Figura 7 – Níveis de sulfidrilas totais.

Figura 8 – Correlação entre os níveis de sulfidrila e de ERO.

Figura 9 – Níveis de TBARS.

Figura 10 – Atividade das enzimas antioxidantes.

Figura 11 – Concentrações de GSH e GSSG.

Figura 12 – Resumo esquemático dos resultados deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados morfométricos 15 dias pós-infarto.

Tabela 2 – Dados ecocardiográficos 14 dias pós-infarto.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASK 1 – Proteínas kinase-1 reguladora de sinal de apoptose

ATP – Adenosina trifosfato

CAPRICORN – *Carvedilol Post-infarct Survival Control in LV Dysfunction*

CAT – catalase

DCFH-DA – Diacetato de diclorofluoresceína

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNTB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

dP/dT – derivada pressão/volume

ERK $\frac{1}{2}$ - Enzima kinase regulada por sinal extracelular

ERN – Espécies reativa de nitrogênio

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FenVE – Fração de encurtamento do ventrículo esquerdo

GPx – glutaciona peroxidase

GSH – glutaciona reduzida

GSSG – dissulfeto de glutaciona

HT – Hormônios da tireoide (T3 e T4)

IAM – Infarto agudo do miocárdio

KCl – Cloreto de potássio

MAF – Mudança da área fracional

MAPK – Proteínas kinases ativas por mitógeno

MHC – Cadeia pesada da miosina

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NO – óxido nítrico

PKB – Proteína cinase B

PKC – Proteínas cinase C

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

RA – Receptores adrenérgicos

rT3 – 3,3',5'-triodotironina (T3 reverso)

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SOD – superóxido dismutase

T2 – 3,5-diiodotironina

T3 – 3,5,3'-triodotironina

T4 – tiroxina ou tetraiodotironina

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNB – Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico

TR – Receptores nucleares dos hormônios da tireoide

TRE – Elemento responsivo do hormônio da tireoide

TR α – Isoforma alfa dos receptores nucleares dos hormônios da tireoide

TR β – Isoforma beta dos receptores nucleares dos hormônios da tireoide

VD – ventrículo direito

VE – Ventrículo esquerdo

VSF – Volume sistólico final

α -MHC – Isoforma alfa da cadeia pesada da miosina

β -MHC – Isoforma beta da cadeia pesada da miosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1. INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E REMODELAMENTO VENTRICULAR PÓS-INFARTO.....	12
1.2. ESTRESSE OXIDATIVO	15
1.2.1. Radicais livres.....	15
1.2.2. Defesas antioxidantes.....	18
1.2.3. Estresse oxidativo no infarto agudo do miocárdio.....	21
1.3. HORMÔNIOS DA TIREOIDE	24
1.3.1. Hormônios da tireoide.....	24
1.3.2. Hormônios da tireoide e infarto agudo do miocárdio.....	26
1.3.3. Hormônios da tireoide e estimulação adrenérgica.....	29
1.4. ESTIMULAÇÃO ADRENÉRGICA, INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E BETABLOQUEADOR.....	30
1.5. CARVEDILOL	32
2 HIPÓTESE	34
3 OBJETIVOS	34
3.1. OBJETIVO GERAL.....	34
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4 METODOLOGIA	35
4.1. ANIMAIS.....	35
4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS	35
4.3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	36
4.4. CUIDADOS PÓS-CIRÚRGICOS	37
4.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	37
4.6. TRATAMENTO COM HORMÔNIOS DA TIREOIDE E CARVEDILOL.....	39

4.7.	ANÁLISES ECOCARDIOGRÁFICAS	39
4.8.	ANÁLISES HEMODINÂMICAS.....	40
4.9.	EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS	41
4.10.	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	41
4.10.1.	Índices de hipertrofia cardíaca	41
4.10.2.	Índices de congestão pulmonar e hepática.....	42
4.11.	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	42
4.11.1.	Preparo do homogeneizado.....	42
4.11.2.	Dosagem de proteínas	42
4.11.3.	Medida das espécies reativas de oxigênio totais	43
4.11.4.	Peroxidação lipídica	43
4.11.5.	Atividade antioxidante enzimática	43
4.11.5.1.	<i>Atividade da enzima superóxido dismutase.....</i>	43
4.11.5.2.	<i>Atividade da enzima catalase.....</i>	44
4.11.5.3.	<i>Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx)</i>	45
4.11.6.	Atividade antioxidante não-enzimática.....	45
4.11.6.1.	<i>Determinação do conteúdo de sulfidrilas.....</i>	45
4.11.6.2.	<i>Determinação da concentração de GSH e GSSG.....</i>	46
4.12.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4.13.	DESCARTE DE MATERIAIS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS	47
4.14.	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	47
5	RESULTADOS	48
5.1.	PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS – HIPERTROFIA CARDÍACA E CONGESTÃO PULMONAR E HEPÁTICA	48
5.2.	PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS	50
5.3.	PARÂMETROS HEMODINÂMICOS.....	53
5.4.	PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO	54

6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÃO	70
8 PERSPECTIVAS	72
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1 INTRODUÇÃO

1.1. INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E REMODELAMENTO VENTRICULAR PÓS-INFARTO

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (2008), as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo todo, constituindo cerca de 30% de todas as causas. Considerando apenas as doenças isquêmicas do coração, como o infarto agudo do miocárdio (IAM), a contribuição é de aproximadamente 13% (World Health Organization, 2008). No Brasil, as doenças cardiovasculares também são a principal causa de mortalidade na população, dentre as quais o IAM se destaca como primordial razão de morte isolada no país. Ainda, o IAM é responsável por grande parte dos casos de insuficiência cardíaca no Brasil (Datusus, 2012).

O IAM é uma doença isquêmica decorrente de uma deficiência perfusional do tecido cardíaco, responsável por levar à diminuição ou ao impedimento da chegada de nutrientes e oxigênio aos cardiomiócitos, levando esses à morte celular. A causa mais comum dessa doença é a trombose coronária decorrente da ruptura de uma placa aterosclerótica. Outras causas menos comuns são: embolia coronariana devido à endocardite ou à trombose de prótese valvar, vasoespasma associado ao consumo de cocaína, trombose coronariana associada à policitemia vera, trombocitose, estado de hipercoagulação, anomalias congênitas coronarianas, miocardite, etc (Libby et al., 2007; Gutiérrez e Bieber, 2002; Frangogiannis, 2015). Dentre os fatores de risco para o IAM, podem ser citados: idade, gênero, histórico familiar, fumo, álcool, sedentarismo, dieta inadequada, hipertensão, diabetes, dislipidemias, síndrome metabólica, entre outros (Boateng e Sanborn, 2013). O IAM resulta em alterações complexas na arquitetura ventricular envolvendo tanto a área infartada quanto o miocárdio remanescente. O conjunto dessas alterações é comumente referido como parte do “remodelamento ventricular”, o qual afeta a função cardíaca, bem como o prognóstico do paciente (Pfeffer e Braunwald, 1990).

A fase inicial do remodelamento ventricular, aproximadamente 6 horas após o insulto isquêmico, é marcada pela morte celular dos cardiomiócitos. Simultaneamente a isso, pode ocorrer desintegração do colágeno interfibrilar,

levando à perda de tecido de sustentação. Isso torna a região mais propensa à distensão e, conseqüentemente, mais suscetível às deformações (Azevedo et al., 2016). Assim, pode ocorrer deslizamento dos cardiomiócitos que sofreram morte celular, com realinhamento dos cardiomiócitos na parede infartada (Olivetti et al., 1990). Conseqüentemente, ocorre o processo chamado de expansão do infarto, caracterizado pelo afinamento e dilatação aguda da parede infartada (Pfeffer e Braunwald, 1990). Tal expansão predispõe ao aparecimento de ruptura ventricular e representa o substrato anatômico para a posterior formação de aneurismas (Azevedo et al., 2016). Esta fase da expansão do infarto é mais frequente em pacientes com infarto transmural e ocorre antes da formação da cicatriz fibrosa firme, sendo um processo que pode ocorrer horas a dias após o infarto (Pontes e Leães, 2004). Ainda, depois 12-16 horas do IAM, ocorre formação de edema e processo inflamatório sobre a região infartada. Esse último inclui uma resposta envolvendo a migração de neutrófilos, linfócitos e macrófagos para a área isquêmica, com o objetivo de remover os cardiomiócitos, que sofreram morte celular, e os debris celulares resultantes da degradação da matriz extracelular cardíaca pós-infarto. Cerca de 2 a 3 dias depois do insulto isquêmico, ocorre a formação do tecido de granulação na periferia da área infartada. Esse tecido contém células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos. Destaca-se o papel dos fibroblastos, pois são as células responsáveis pela síntese e deposição de proteínas da matriz extracelular (como a fibrina, fibronectina, tenascina, entre outras) e pela deposição de colágeno na área infartada, os quais são importantes requisitos para o processo de formação da cicatriz. A partir de 2 a 3 semanas após o IAM, o número de células do tecido de granulação começa a decair, indicando o processo de maturação da cicatriz (Blankesteyn et al., 2001).

Após o IAM, em decorrência da perda de tecido muscular, é comum ocorrer queda do volume ejetado, com aumento do volume sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo. Isso leva, conseqüentemente, a uma sobrecarga de volume na câmara ventricular, resultando em aumento da tensão parietal e na dilatação ventricular (Zornoff et al., 2008). Cronicamente, o aumento da tensão parietal sobre o ventrículo pós-infarto expõe as células musculares cardíacas sadias remanescentes a uma maior carga de trabalho. Acredita-se que a exposição à sobrecarga de trabalho e conseqüente distensão das fibras musculares cardíacas

por determinado período, bem como a ativação do sistema simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona e a liberação de vários fatores de crescimento e peptídeos, sejam os fatores responsáveis por levar os cardiomiócitos remanescentes a apresentar uma resposta adaptativa de hipertrofia do tipo excêntrica. O aumento da espessura da parede muscular cardíaca pode compensar a elevação da tensão parietal induzida após o IAM, passando a se chamar hipertrofia compensatória. Além disso, também reduz o estímulo para maior dilatação ventricular, visando, dessa forma, a manutenção do débito cardíaco (Singal et al., 1999). Embora inicialmente a hipertrofia ventricular no seu estado compensado possa diminuir o estresse parietal, a longo prazo, ela pode se tornar insuficiente para contrapor esse estresse, não conseguindo mais ser capaz de manter o débito cardíaco. Portanto, em conjunto com a dilatação ventricular, a hipertrofia em seu estado descompensado irá colaborar para o desenvolvimento de um remodelamento mal adaptativo, levando não somente à maior dilatação e disfunção ventricular, bem como contribuirá para progressão para a insuficiência cardíaca. Essa doença, uma vez estabelecida, é caracterizada pela situação na qual o coração não consegue mais bombear uma quantidade de sangue suficiente para atender as demandas metabólicas dos tecidos do organismo (Libby et al., 2007; Pfeffer e Braunwald, 1990; Tham et al.; 2015). Embora prevaleça o conceito de que o remodelamento ventricular após o IAM resulte na piora progressiva da função ventricular, os mecanismos responsáveis por esse fenômeno não são completamente esclarecidos. É importante considerar que o processo de remodelamento ventricular não ocorre de maneira homogênea após o IAM. A prevalência e a intensidade desse processo são influenciadas por quatro fatores: (1) características morfológicas do infarto (área de infarto; tipo de infarto – transmural ou subendocárdico), (2) cicatrização (tipo de colágeno depositado na área infartada), (3) estresse hemodinâmico (sobrecarga cardíaca) e (4) fatores neurohumorais (angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral, entre outros) (Zornoff et al., 2008).

Atualmente, considera-se que o processo de remodelamento ventricular abrange não só alterações estruturais da câmara ventricular, mas também alterações genéticas, bioquímicas, moleculares e celulares. Após o infarto, esse conjunto de alterações irá contribuir para a fisiopatologia da disfunção cardíaca a longo prazo. Portanto, o remodelamento ventricular está associado a um pior

prognóstico após o IAM. A evolução desse processo, entretanto, pode ser modificada por diversas intervenções terapêuticas (Azevedo et al., 2016). Adicionalmente, muitos estudos têm avaliado a influência das espécies reativas de oxigênio e do estresse oxidativo nas diferentes etapas da progressão do IAM para a insuficiência cardíaca.

1.2. ESTRESSE OXIDATIVO

1.2.1. Radicais livres

Os radicais livres são considerados qualquer espécie química capaz de existir de forma independente que possui um ou mais elétrons desemparelhados os quais ocupam o orbital atômico ou molecular. Isso permite que os radicais livres sejam atraídos para um campo paramagnético e, desta forma, tornem-se reativos. Essas espécies podem ser formadas mediante perda ou adição de um elétron a elementos não-radicalares (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana plasmática, e seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (Bianchi e Antunes, 1999). Essas espécies químicas são continuamente sintetizadas no organismo durante o metabolismo celular e podem desempenhar funções fisiológicas importantes quando em concentrações baixas ou moderadas (Halliwell e Gutteridge, 1999). No organismo, essas espécies estão envolvidas na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Seu excesso, entretanto, apresenta efeitos deletérios, tais como danos às biomoléculas do organismo, incluindo mutações no DNA e RNA, oxidação de lipídios, de proteínas e de carboidratos (Barreiros et al., 2006).

Dentre as moléculas do meio ambiente, o próprio oxigênio molecular é considerada um radical livre, visto que possui dois elétrons desemparelhados, os quais estão em spins paralelos. Devido a essa configuração eletrônica, a molécula de oxigênio é muito eletronegativa, ou seja, possui uma tendência maior de atrair

elétrons para si (Halliwell e Gutteridge, 1999). Na membrana interna da mitocôndria, ocorre a cadeia respiratória, onde 95 a 98% do oxigênio sofre redução tetravalente via ação da enzima citocromo oxidase, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (Barbosa et al., 2010). Porém, cerca de 2 a 5% do oxigênio restante é reduzido de forma univalente, produzindo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas, denominadas espécies reativas de oxigênio (ERO). Em vista disso, o metabolismo mitocondrial pode ser considerado uma das principais fontes de ERO nas células, exatamente pelo fato da cadeia transportadora de elétrons ser a principal responsável por contribuir na formação dessas espécies (Ribeiro et al., 2005; Barbosa et al., 2010).

Durante a redução univalente do oxigênio, ocorre inicialmente a formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A adição de outro elétron a esse radical leva à formação do íon peróxido (O_2^{2-}). Entretanto, o radical ânion superóxido pode sofrer um processo denominado dismutação, no qual recebe íons hidrogênio, gerando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta última reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), que acelera a reação na ordem de 10^4 vezes. O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, é uma espécie com alto potencial reativo. Isso decorre do fato do H_2O_2 , na presença de metais, tais como os íons ferro (Fe^{2+}) ou íons cobre (Cu^{1+}), sofrer uma reação não enzimática, chamada reação de Fenton, gerando uma das mais potentes espécies reativas de oxigênio, o radical hidroxila ($\cdot OH$). Esse título de radical livre mais potente se deve a sua capacidade de atravessar membranas e reagir com biomoléculas tais como lipídios, proteínas, RNA e DNA. Ainda, além de ser considerado o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, tendo como consequência a alteração da função biológica das membranas celulares, também é capaz de agir sobre as proteínas, alterando-as em relação à sua estrutura e/ou função biológica. Seu ataque ao DNA e RNA possibilita a ocorrência de mutações (Fridovich, 1995; Barbosa et al., 2010; Barreiros et al., 2006).

As principais ERO podem ser distribuídas em dois grupos, as radicalares, como hidroxila, ânion superóxido, peroxila ($LOO\cdot$), alcoxila ($LO\cdot$), entre outros; e as não-radicalares, como peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, etc. Porém, além dessas espécies reativas oriundas do oxigênio, existem também outras espécies

reativas, tais como as espécies reativas de nitrogênio (ERN), oriundas do metabolismo do óxido nítrico (NO). O NO é originado da conversão do aminoácido arginina em citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase. Ao combinar-se com o radical ânion superóxido, o NO é convertido a peroxinitrito (ONOO^-), um potente agente oxidante (Beckman e Koppenol, 1996). Além do óxido nítrico e do peroxinitrito, existem outras ERN como óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-), entre outras (Barreiros et al., 2006).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO e ERN, porém as membranas celulares são as mais atingidas, uma vez que essas espécies reativas são capazes de desfazer ligações entre átomos de carbono e hidrogênio (C-H) presentes nos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares. Esse processo é conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação. Dentre as consequências da peroxidação lipídica, podem ser citadas: a redução da fluidez da membrana celular, o aumento da sua permeabilidade e danos a proteínas, receptores e canais iônicos. Quanto à alteração da permeabilidade das membranas celulares, este evento vem acompanhado da perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos, como o malondialdeído, podendo levar à morte celular (Halliwell e Gutteridge, 1999; Ferreira e Matsubara, 1997). A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A etapa da iniciação representa o sequestro do hidrogênio do ácido graxo poli-insaturado (LH) da membrana celular. Esse sequestro pode ser realizado pelo radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) ou pelo radical alcóxila ($\text{LO}\bullet$), com consequente formação do radical lipídico ($\text{L}\bullet$). Na etapa da propagação, o radical $\text{L}\bullet$ reage rapidamente com o oxigênio, resultando na formação do radical peróxila ($\text{LOO}\bullet$). Esse radical é o responsável por propagar a peroxidação lipídica, uma vez que pode sequestrar novo hidrogênio de outro ácido graxo poli-insaturado, formando novamente o radical $\text{L}\bullet$ e o hidroperóxido lipídico (LOOH). Na etapa da terminação, na qual essa reação em cadeia da peroxidação lipídica se encerra, ocorre quando dois radicais peróxila reagem entre si formando um produto não-radicalar. Ainda, é importante destacar que a peroxidação lipídica pode ser catalisada por íons ferro, visto que reagem com hidroperóxidos lipídicos, convertendo-os em radicais

altamente reativos, como os radicais alcoxila e peroxila, que, por sua vez, iniciam nova cadeia de reações (Ferreira e Matsubara, 1997).

Ao longo da evolução dos organismos aeróbios, a produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou esses organismos a desenvolverem mecanismos de defesa antioxidante. Esses têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (Barbosa et al., 2010).

1.2.2. Defesas antioxidantes

O sistema de defesa antioxidante tem como objetivo inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicalares (Sies et al., 2017; Barbosa et al., 2010). De forma geral, os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação desse substrato de maneira eficaz (Halliwell e Gutteridge, 1999). Os antioxidantes podem ser classificados conforme seu mecanismo de ação sobre as espécies reativas, existindo aqueles que participam da prevenção da sua formação (sistemas de prevenção), aqueles que inibem sua ação (sistemas varredores) ou, ainda, aqueles que participam do reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo). Adicionalmente, os antioxidantes podem ser classificados de acordo com sua estrutura, podendo ser enzimáticos ou não-enzimáticos (Barbosa et al., 2010).

O sistema antioxidante enzimático constitui a proteção primária intrínseca do organismo humano contra as espécies reativas. Dentre as enzimas envolvidas nesse sistema, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não-radicalares (Barbosa et al., 2010; Tsutsui et al., 2001). A enzima SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. Nos seres eucariontes, existem duas isoformas da SOD: a SOD-cobre-

zinco (Cu,ZnSOD), a qual contém sítios de ligação para íons cobre e zinco e está presente principalmente no citosol, mas também pode ser encontrada no meio extracelular; e a SOD-manganês (MnSOD), a qual contém sítios de ligação para o manganês e está localizada primariamente na matriz mitocondrial. Essas enzimas desempenham seu papel antioxidante através da sua capacidade de catalisar a dismutação do radical ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, na presença do próton hidrogênio (H^+) (Ferreira e Matsubara, 1997; Fridovich, 1995). O peróxido de hidrogênio, por sua vez, é metabolizado pela enzima catalase, gerando água e oxigênio. Esse processo é importante, pois previne a formação do radical hidroxila pela reação de Fenton ou da reação de Haber-Weiss. Em animais, a catalase está presente na maioria dos órgãos, porém está presente em maiores concentrações no fígado. Especificamente, dentro das células, a catalase se encontra localizada nos peroxissomas, tendo, por isso, ação reduzida em órgãos que possuem baixa quantidade dessa organela, como o coração, o músculo esquelético e o cérebro (Halliwell e Gutteridge, 1999). Já a enzima glutathione peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos em seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG) (Ferreira e Matsubara, 1997). Dessa forma, pode ser observado que as enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Portanto, considerando a potencialidade do radical hidroxila e o fato de não existir um sistema de defesa enzimático especializado para sua remoção, é de extrema importância a manutenção do perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes e as espécies reativas, com o propósito de promover a manutenção da integralidade celular (Barbosa et al., 2010).

Já o sistema de defesa antioxidante não-enzimático consiste numa grande variedade de substâncias, que podem ter origem endógena, como a glutathione, ou dietética, como vitaminas (ex.: vitaminas C e E), minerais (zinco, cobre, selênio e magnésio) e compostos fenólicos (Smirnoff, 2001; Halliwell e Gutteridge, 1999). Focando nas substâncias antioxidantes não-enzimáticas de origem endógena, é importante destacar o papel do tripeptídeo glutathione, também conhecido como glutathione reduzida (GSH; L- γ -glutamyl-L-cisteinyl-glicina). Esse tripeptídeo é considerado um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante

intracelular e também possui um papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos (Huber et al., 2008). A GSH está presente na maioria das células dos organismos aeróbios, sendo o tiol mais abundante no meio intracelular. Sua abundância nos organismos aeróbios e as propriedades químicas do seu grupo tiol ou sulfidril (-SH) suportam a proposta de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra ERO e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente. A capacidade redutora da GSH é determinada basicamente pelo seu grupamento sulfidril, presente no aminoácido cisteína (Meister e Anderson, 1983; Ferreira e Matsubara, 1997). Esse grupamento é altamente polarizável, tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Esta habilidade de doar elétrons a outros compostos faz da glutatona um bom redutor (Huber et al., 2008). Portanto, o grupamento sulfidril é susceptível a reações com ERO e ERN, levando à geração de modificações oxidativas pós-translacionais, as quais podem alterar a função proteica (Rudyk e Eaton, 2014).

Dentro desse contexto, o estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento significativo da concentração intracelular de espécies oxidantes, como as ERO e ERN, acompanhado simultaneamente pela diminuição das defesas antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 1999). O mesmo pode também ser definido como um desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, com um aumento dos primeiros, levando a um potencial dano às células (Sies et al., 2017). Tal processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (Barbosa et al., 2010). As vias envolvidas na geração das ERO, bem como na peroxidação lipídica e o papel dos antioxidantes, estão ilustradas resumidamente na Figura 1 (Valko et al., 2007). Por conseguinte, diversos estudos revelam que as alterações no estado redox contribuem para muitas consequências do envelhecimento e para muitos processos patológicos, incluindo câncer (Remmen et al., 2003), doenças pulmonares (Cantin, 2004), diabetes (Bonfont-Rousselot, 2004), doenças neurodegenerativas (Viña et al., 2004) e doenças cardiovasculares (Okonko e Shah, 2015; Zablocki e Sadoshima, 2013; Stocker e Keaney, 2004).

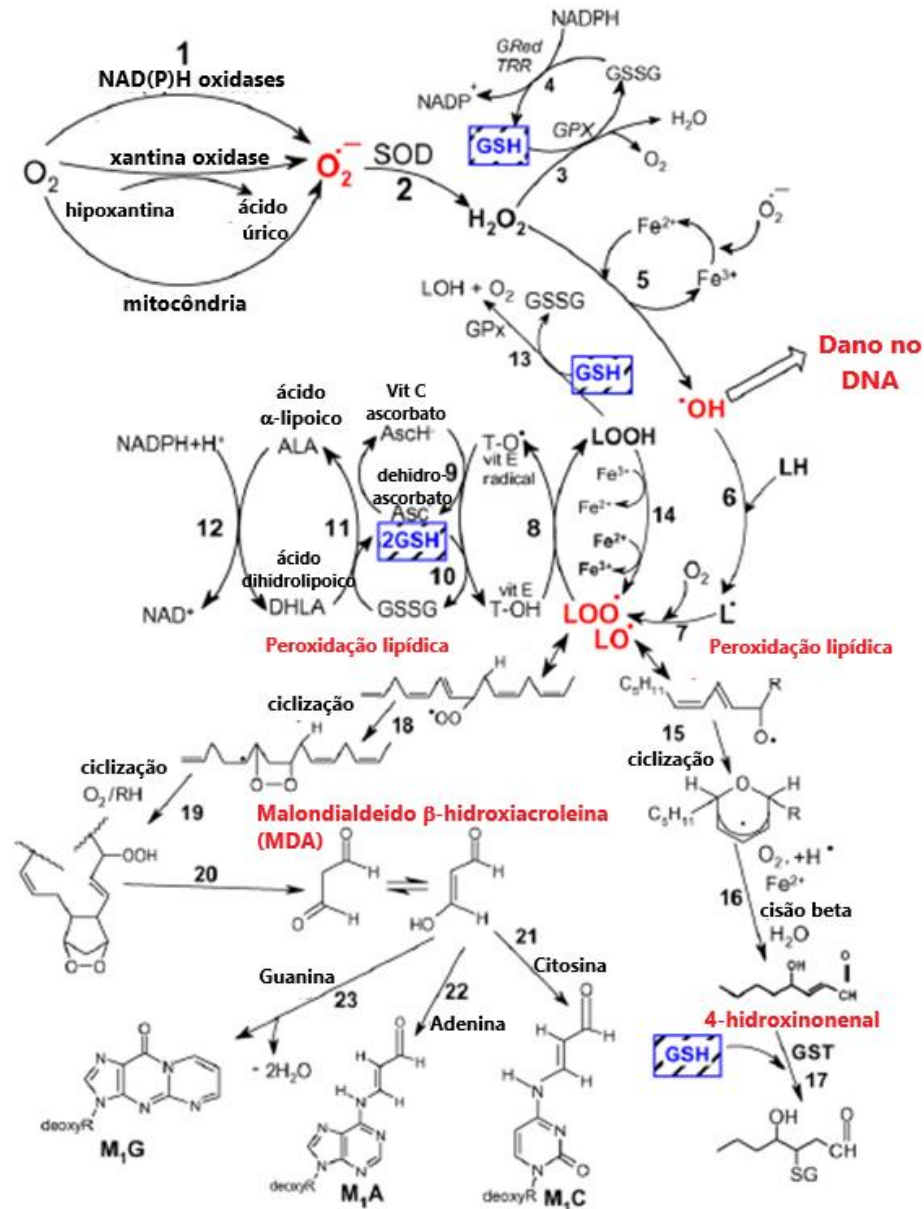


Figura 1. Vias de formação das ERO, da peroxidação lipídica e o papel de alguns antioxidantes como a glutatona, vitamina E e vitamina C no manejo do estresse oxidativo (Adaptado de Valko et al., 2007).

1.2.3. Estresse oxidativo no infarto agudo do miocárdio

Embora durante a isquemia do miocárdio haja depleção do aporte de oxigênio, isso não significa necessariamente que ERO não são formadas nos cardiomiócitos, uma vez que a desregulação metabólica após o IAM predispõe a formação dessas

espécies reativas a partir de moléculas de oxigênio residuais (Ferrari et al., 2004). A respeito dessa desregulação metabólica, já é bem descrito na literatura que durante a injúria isquêmica ocorre alteração no sistema da cadeia respiratória mitocondrial, levando à degradação do conteúdo celular de adenosina trifosfato (ATP). Isso, conseqüentemente, deixa os carreadores de elétrons da mitocôndria em um estado reduzido. Por conseguinte, ocorre um desvio de elétrons da cadeia respiratória, os quais reagem com o oxigênio residual presente na mitocôndria, levando à produção de ERO, principalmente do radical ânion superóxido (Ferrari et al., 2004; Dhalla et al., 2000). Além da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, existem outras fontes de ERO no miocárdio após o IAM, como o sistema NADPH oxidase, as enzimas ciclooxigenase, citocromo P450, glicose oxidase, xantina oxidase e lipoxigenase, a ativação de leucócitos e a degradação/autooxidação das catecolaminas (Ferrari et al., 2004; Dhalla et al., 2000; Zornoff et al., 2009; Neri et al., 2015). De todas essas fontes de ERO, na literatura fica claro que o metabolismo mitocondrial e as enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase são as fontes predominantes de ERO durante a progressão do IAM (Grieve et al., 2004).

Por conseguinte, já é bem reconhecido que ocorre um aumento da geração de ERO e o estabelecimento do estresse oxidativo no tecido cardíaco após o IAM (Hill e Singal, 1996; Hori e Nishida, 2009). Trabalhos revelam uma importante função das ERO no processo de remodelamento cardíaco pós-infarto e, conseqüentemente, na progressão do IAM para a insuficiência cardíaca (Hill e Singal, 1996; Tsutsui et al., 2009; Sawyer et al., 2002). Nesse contexto, em um estágio compensado de hipertrofia cardíaca que ocorre durante o remodelamento cardíaco, estudos demonstram que a reserva antioxidante tecidual é aumentada. Entretanto, em um estágio descompensado/insuficiente do músculo cardíaco, essa reserva encontrasse reduzida e, devido a isso, acaba por contribuir para o desequilíbrio redox, estabelecendo o estresse oxidativo. Esse aumento do estresse oxidativo e redução das defesas antioxidantes são descritos como fatores importantes na transição do estado de hipertrofia compensatória para o estado de insuficiência cardíaca (Singal et al., 1999). Corroborando com esses dados, um estudo verificou que, em um período precoce pós-infarto (2 dias após o IAM), os níveis de H_2O_2 se encontram reduzidos no miocárdio, o que provavelmente é decorrente do aumento adaptativo dos níveis da enzima antioxidante tioredoxina-1. Entretanto, em um período mais

tardio (28 dias após o IAM), houve uma redução na expressão desta enzima, o que foi associado ao aumento dos níveis das ERO e ao dano oxidativo (Schenkel et al., 2012).

De uma forma geral, no remodelamento ventricular após IAM, as ERO participam da ativação de diversos sinalizadores celulares que irão modular a transcrição de genes sensíveis ao estado redox. Dentre esses sinalizadores, podem ser citados: a enzima cinase regulada por sinal extracelular (ERK 1/2), as proteínas cinases B (PKB) e C (PKC), a enzima JNK (c-Jun N terminal cinase), as proteínas p38 e p53, a proteína cinase-1 reguladora de sinal de apoptose (ASK1), as proteínas tirosina fosfatases, as proteínas cinases ativas por mitógeno (MAPK), citocinas inflamatórias, entre outros. Na fase inicial do remodelamento, esses sinalizadores participam da ativação de diversos mecanismos, em destaque: a morte celular dos cardiomiócitos, a inflamação, a infiltração de macrófagos e a deposição de matriz extracelular. Na fase mais tardia do remodelamento, entretanto, esses sinalizadores medeiam mais proeminentemente a proliferação de fibroblastos, a síntese de colágeno, a ativação das metaloproteases e consequente degradação de matriz extracelular, a disfunção mitocondrial, a hipertrofia cardíaca e a dilatação ventricular (Grieve et al, 2004; Tsutsui et al., 2009; Hori e Nishida, 2009). Embora não se tenha um conhecimento mais preciso sobre todas as fontes moleculares de ERO envolvidas na transição do IAM para a insuficiência cardíaca, estudos relatam os efeitos benéficos de antioxidantes. Esses além de participarem da diminuição do estresse oxidativo, também influenciam na patogênese da insuficiência cardíaca, sugerindo um potencial terapêutico dos antioxidantes no tratamento da insuficiência cardíaca desencadeada, neste contexto, após um quadro de IAM (Singal et al., 1999). Nesse sentido, diversos trabalhos demonstram um papel positivo dos hormônios da tireoide, atuando como um agente terapêutico no período após o IAM, não somente por meio da sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo (de Castro et al., 2014), como também em melhorar a função e o remodelamento cardíaco (de Castro et al., 2016; Pantos et al., 2007; Pantos et al., 2009).

1.3. HORMÔNIOS DA TIREOIDE

1.3.1. Hormônios da tireoide

A tireoide é uma glândula endócrina responsável pela síntese dos seguintes hormônios: 3,5,3'-triiodotironina (T3), 3,3',5'-triiodotironina (T3 reverso ou rT3), tiroxina ou tetraiodotironina (T4) e calcitonina. Especificamente, as células foliculares da tireoide são responsáveis pela síntese das iodotironinas, classe de hormônios formados pelo acoplamento de duas moléculas de tirosinas iodadas, composta pelo T3, T4 e rT3. O T4 é considerado o principal hormônio sintetizado e liberado pela tireoide, representando aproximadamente 90% da produção dessa glândula, porém possui uma potência biológica inferior ao T3. Ainda, é considerado um pró-hormônio, o qual é convertido a T3 nos tecidos periféricos. O T3 é a forma ativa dos hormônios da tireoide, representando 10% da produção tireoídea (Koeppen e Stanton, 2009).

Os hormônios da tireoide (HT), T3 e T4, uma vez sintetizados pelas células foliculares da tireoide e secretados na corrente sanguínea, são transportados até as células-alvo dos tecidos periféricos. Esses hormônios ao atingirem essas células são transportados para o meio intracelular via transportadores de membrana específicos (Friesema et al., 2003; Visser et al., 2007; Hennemann et al., 2000). No caso do T4, uma vez dentro da célula, sofre a ação de enzimas chamadas deiodinases, especificamente as deiodinases do tipo 1 e do tipo 2, que têm papel fundamental na reação de conversão do T4 em T3 nos tecidos periféricos (Köhrle, 2000). Por conseguinte, o T3 pode ativar duas vias de mecanismo de ação diferentes: a via não-genômica e a via genômica. A via não-genômica é ativada pela ação dos HT sobre diferentes receptores, como: o receptor de membrana integrina $\alpha v \beta 3$, as isoformas do receptor alfa dos hormônios da tireoide ($TR\alpha$) presentes na membrana ou no citoplasma e as isoformas dos receptores dos HT na mitocôndria. De forma geral, a ativação desses receptores irá desencadear diversas ações não-genômicas, incluindo: a regulação de canais iônicos, a modulação da fosforilação oxidativa, a transcrição gênica mitocondrial, a geração de segundos mensageiros intracelulares, as mudanças na sinalização citosólica e a estimulação do tráfico de proteínas do citosol para o núcleo, podendo desta forma culminar em eventos celulares complexos que são mediados no núcleo (Basset et al., 2003; Hammes e Davis,

2015; Davis et al., 2008). Já a via genômica é considerada a via de ação clássica dos HT. Nela, o T3 migra para o interior do núcleo, onde irá se ligar aos receptores nucleares dos hormônios da tireoide (TR), os quais são codificados pelos genes THRA e THRB. Esses genes levam à síntese de diferentes isoformas do receptor nuclear, TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2 e TR β 3, que variam conforme o tecido em que estão sendo expressas (Basset et al. 2003). Tais receptores são considerados fatores de transcrição que se ligam em sequências de nucleotídeos específicas do DNA denominadas elementos responsivos ao hormônio da tireoide (TRE), que são encontrados na região promotora dos genes regulados pelo HT (Yen et al., 2006). O T4 pode atuar através dos TR, mas a afinidade desses receptores para o T4 é muito menor que a afinidade para o T3. Assim, o T3 é o ligante natural dos TR (Davis et al., 2008). Por fim, a ligação do T3 a esses receptores nucleares leva ao recrutamento de proteínas co-ativadoras da transcrição gênica. Tal complexo formado se liga ao TRE do gene-alvo, ativando sua expressão. Uma vez induzida a transcrição dos genes responsivos aos HT, posteriormente os mesmos são traduzidos em proteínas, tal como a cadeia pesada da miosina, a SERCA, a bomba Na⁺/K⁺ ATPase, os canais voltagem-dependente de K⁺, entre outras, as quais irão desencadear as ações específicas dos HT (Guyton e Hall, 2010).

Os HT possuem ações importantes sobre a regulação do metabolismo, a termogênese, a manutenção da homeostase energética e da atividade mitocondrial, assim como o crescimento celular (Brix et al. 2011). Além desses efeitos, T3 e T4 possuem também importantes ações no sistema nervoso central (Bauer et al. 2008) e no sistema cardiovascular (Klein e Ojamaa 2001; Hu et al., 2003). Em relação a esse último, o T3 eleva a frequência cardíaca (efeito cronotrópico positivo), garantindo um aporte suficiente de oxigênio para os tecidos. O efeito do T3 também aumenta a fração de ejeção, a força das contrações cardíacas (efeito inotrópico positivo), diminui o tempo de relaxamento diastólico (efeito lusitrópico positivo) e reduz a resistência vascular periférica total. A pressão sanguínea sistólica é modestamente aumentada e a pressão sanguínea diastólica é diminuída. A pressão de pulso é aumentada refletindo os efeitos combinados do aumento do volume de ejeção e da redução da resistência vascular periférica total, secundária à dilatação dos vasos sanguíneos na pele, músculo e coração. A combinação desses efeitos do T3 contribui para o aumento do débito cardíaco (Koeppen e Stanton, 2009).

Na literatura existem estudos que verificaram uma redução dos níveis dos hormônios da tireoide em situações patológicas como no infarto agudo do miocárdio (Franklyn et al., 1984) e na insuficiência cardíaca (Hamilton et al. 1990; Hamilton et al., 1998). Esse evento foi associado a uma piora de parâmetros hemodinâmicos cardíacos e indicado como preditor independente de baixa sobrevivência dos pacientes após o IAM (Hamilton et al., 1998; Pingitore et al., 2005)

1.3.2. Hormônios da tireoide e infarto agudo do miocárdio

Já é bem descrito na literatura que uma parcela significativa dos pacientes com doenças cardíacas, como o IAM, apresenta um rápido decréscimo nos níveis séricos de T3, um aumento nos níveis séricos de rT3 (forma inativa dos HT) e níveis séricos de T4 normais (Iervasi et al., 2003; Pedersen et al., 1984; Wiersinga et al. 1981; Friberg et al., 2002). Esses pacientes infartados, que então apresentam baixos níveis de T3, desenvolvem a chamada síndrome do eutireoideo doente ou síndrome do baixo T3, a qual está claramente associada a uma maior mortalidade e a um pior prognóstico pós-infarto (Iervasi et al., 2003). Ainda, baixos níveis de T3 já são considerados um fator preditor independente da mortalidade cardíaca em pacientes com insuficiência cardíaca crônica de origem isquêmica e não-isquêmica (Pingitore et al., 2005). Não há ainda muitos relatos na literatura sobre o mecanismo exato que possa explicar o desencadeamento dessa síndrome em pacientes com doenças cardíacas. Uma possível explicação para essa redução dos níveis de T3, entretanto, pode estar relacionada com a redução da atividade da enzima deiodinase-1, responsável por converter o T4 em T3, e com a elevação da atividade da enzima deiodinase-3, responsável por converter o T4 em rT3 e/ou o T3 em T2 (3,5-diiodotironina; também uma forma inativa dos HT), no miocárdio pós-infarto (Olivares et al., 2007).

Como discutido anteriormente, já está bem estabelecido o importante papel dos hormônios da tireoide na hemodinâmica cardíaca através dos seus efeitos sobre a contratilidade do coração, o ritmo cardíaco e a função vascular. Portanto, os baixos níveis de T3 e a conseqüente redução das suas funções hemodinâmicas sobre o

miocárdio após o IAM levaram muitos pesquisadores a estudarem o papel dos hormônios da tireoide no coração pós-infarto.

Durante o remodelamento cardíaco após o IAM, estudos em ratos também foram capazes de identificar uma redução dos níveis séricos de T3 e da expressão dos genes responsivos a esse hormônio (Ojamma et al., 2000), bem como alterações na expressão dos seus receptores nucleares (Pantos, et al., 2005a; Pantos et al., 2010b). Ainda, concomitante a esses efeitos, o programa transcricional fetal é reativado no miocárdio pós-infarto, ou seja, muitas proteínas que são expressas apenas no período fetal passam a ser expressas novamente durante a fase de remodelamento cardíaco após o IAM (Pantos et al., 2008a). Isso foi considerado um evento que colabora para um posterior remodelamento mal adaptativo do miocárdio e para a disfunção ventricular. Mudanças nos níveis de T3 e na expressão de seus receptores no período pós-infarto parecem contribuir na instalação desse fenótipo fetal no miocárdio (Pantos et al., 2008c). Além dessa questão do fenótipo fetal, Pantos e colaboradores também discutem que o coração de ratos pós-infarto também adquire um “fenótipo hipotireoideo”. Esse é caracterizado por uma redução na expressão dos receptores TR α e TR β no tecido cardíaco. Isso leva, conseqüentemente, a uma diminuição da ação dos HT sobre o coração, resultando em uma menor expressão de genes responsivos aos HT (Pantos et al., 2005). Estudos debatem que o “hipotireoidismo tecidual” possa ser um processo de cardioproteção contra a injúria isquêmica, justamente por ser uma resposta adaptativa do organismo em busca da preservação de energia e do aumento da tolerância a recorrentes insultos isquêmicos. Isso, no entanto, ocorre às custas de uma função miocárdica prejudicada pela falta da ação dos HT sobre a hemodinâmica cardíaca (Pantos et al., 2005). Por conseguinte, posteriores estudos demonstraram a existência de uma ação positiva dos hormônios da tireoide, usados como tratamento, sobre o remodelamento e a função cardíaca pós-infarto (Pantos et al. 2008b; Pantos et al. 2009; Pantos, et al., 2007; Ojamaa et al., 2000; de Castro et al., 2016).

Estudos já demonstraram que a administração de T3 e T4 leva a mudanças no padrão de hipertrofia cardíaca no coração de ratos em um curto (2 semanas) (Pantos et al., 2007) e um longo período após o IAM (13 semanas) (Pantos et al., 2008b; Pantos et al., 2009). Esse efeito foi verificado através da instalação de uma

hipertrofia com características fisiológicas ao invés de uma hipertrofia patológica normalmente observada no coração pós-infarto. Essa hipertrofia fisiológica ocorre a partir do aumento (aproximadamente de 30%) da síntese proteica total nos cardiomiócitos (Kahaly e Dillmann, 2005), levando ao aumento da massa cardíaca e da espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo. Isso, conseqüentemente, favorece a redução do estresse de parede pós-infarto (Pantos et al., 2008b). Os HT participam deste aumento na síntese proteica total durante o desenvolvimento da hipertrofia fisiológica modulando, por exemplo, a expressão das isoformas da cadeia pesada da miosina (MHC), aumentando a expressão da α -MHC e diminuindo a expressão da β -MHC. A modulação dessas isoformas visa principalmente o desempenho contrátil do coração, uma vez que a isoforma alfa tem uma maior atividade ATPásica, o que permite uma contração mais rápida (Morkin, 1993). Além disso, esses hormônios modulam as proteínas de manejo do cálcio, bem como previnem a ativação da programação gênica fetal no coração (Nicolini et al., 2013). Também, foi possível verificar nos estudos de longo prazo que, em estágios mais avançados do remodelamento cardíaco, os HT promovem mudanças na geometria da câmara ventricular esquerda, a qual adquire uma forma elipsoide ao invés da forma esférica observada nos animais infartados não-tratados (Pantos et al., 2007; Pantos et al., 2008b; Pantos et al., 2009). Portanto, os HT podem influenciar no processo de remodelamento do coração pós-infarto, impedindo o padrão fetal de expressão de proteínas contráteis, normalizando a tensão da parede e otimizando a geometria da câmara cardíaca (Pantos et al., 2010a). Ainda, os efeitos dos HT sobre a modulação da hipertrofia cardíaca aparecem nas primeiras semanas do remodelamento cardíaco e se mantêm até estágios tardios pós-infarto (Pantos et al., 2007; Pantos et al., 2008b; Pantos et al., 2009).

Além de modular a hipertrofia cardíaca, os HT conseqüentemente são capazes de sustentar uma melhora da função cardíaca através de alterações positivas sobre parâmetros ecocardiográficos e hemodinâmicos após o IAM (Panto et al., 2008b; Pantos et al., 2007; de Castro et al., 2016). Além desses efeitos benéficos, estudos recentes já verificaram efeitos dos HT sobre a diminuição do estresse oxidativo (de Castro et al., 2014), a redução da sinalização para a apoptose (de Castro et al., 2016) e para a inflamação no coração após o IAM (Billon et al., 2014; de Castro et al., 2016).

1.3.3. Hormônios da tireoide e estimulação adrenérgica

Embora estudos tenham indicado que os HT provoquem uma melhora em parâmetros morfométricos, funcionais e bioquímicos do coração após o IAM, esses hormônios também causam o aumento da estimulação adrenérgica, o que conduz conseqüentemente à elevação da frequência cardíaca (Pantos et al., 2007; Pantos et al., 2008b; de Castro et al., 2014). O efeito cronotrópico positivo induzido pelos HT pode ser mediado pela elevação da sensibilidade e, conseqüentemente, da capacidade de resposta do tecido cardíaco às catecolaminas circulantes (Kahaly e Dillmann, 2005). Isso se deve tanto ao fato dos HT promoverem o aumento da expressão (*up-regulation*) dos receptores beta-adrenérgicos no tecido cardíaco (Williams et al., 1977; Bahouth et al., 1997), como ao seu envolvimento na alteração de elementos de sinalização da cascata beta-adrenérgica, como a proteínas G e a adenilato ciclase (Kim et al., 2004; Stiles e Lefkowitz, 1981; Carvalho-Bianco, et al., 2004). Esses efeitos dos HT sobre a estimulação adrenérgica foram descobertos a partir de estudos clínicos em paciente com hiper e hipotireoidismo. Nesses estudos, pacientes tireotóxicos apresentavam níveis normais de noradrenalina (NA), o que excluía a hipótese da hiperatividade adrenérgica ser causada pelo aumento das catecolaminas e reforçava a hipótese da existência de um aumento da sensibilidade do tecido cardíaco às catecolaminas circulantes. Já os pacientes hipotireoideos apresentavam níveis elevados de NA, talvez como uma forma de compensar a sensibilidade adrenérgica reduzida. Adicionalmente, os níveis de adrenalina não eram diferentes entre os pacientes hiper e hipotireoideos, sendo os valores similares aos observados nos controles (Coulombe et al., 1976, Coulombe et al., 1977).

As catecolaminas endógenas (noradrenalina e adrenalina) têm a capacidade de ativar duas classes de receptores adrenérgicos (RA) no miocárdio: alfa (α) e beta (β). No coração, enquanto os receptores α -adrenérgicos representam em torno de 10% dos RA totais, os receptores β -adrenérgicos são considerados os RA predominantes (em torno de 90% dos RA totais). Esse último apresenta duas isoformas: β 1 e β 2 (O'Connell et al., 2014). Os receptores β 1 contemplam 70% do total de receptores β -adrenérgicos no coração e são responsáveis por induzir respostas inotrópicas e cronotrópicas positivas. Ainda, receptores β 1-adrenérgicos

se encontram em grande número no nodo sinoatrial, em torno de duas vezes mais do que nos cardiomiócitos (Kahaly e Dillmann, 2005). Os receptores β_2 -adrenérgicos, representando 30% do total de receptores β -adrenérgicos no coração, também estão envolvidos nos efeitos inotrópico e cronotrópico positivos no miocárdio, porém são menos sensíveis à noradrenalina do que os receptor β_1 (Wallukat, 2002). A influência dos HT sobre a expressão dos receptores α e β adrenérgicos varia de tecido para tecido. No coração, os HT parecem ter efeitos opostos sobre esses receptores, sendo capazes de induzir a diminuição dos receptores α -adrenérgicos (Sharma e Banerjee, 1978; Kupfer et al., 1986) e o aumento tanto do número de receptores β -adrenérgicos, quanto de moléculas intracelulares de sinalização ativada pelas catecolaminas (Bilezikian e Loeb, 1983; Kim et al., 2004; Stiles e Lefkowitz, 1981; Carvalho-Bianco, et al., 2004). Os receptores β_1 -adrenérgicos parecem ser mais sensíveis à regulação do T3 nos cardiomiócitos, de forma que o T3 pode causar um aumento de até quatro vezes dos níveis de RNA mensageiro do receptor β_1 , sem causar mudanças significativas nos níveis de RNA mensageiro do receptor β_2 (Kahaly e Dillmann, 2005).

1.4. ESTIMULAÇÃO ADRENÉRGICA, INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO E BETABLOQUEADOR

Um dos subsequentes eventos após o IAM é a ativação de diversos componentes do sistema neurohumoral. A ativação desse sistema se refere ao aumento da atividade do sistema nervoso simpático, do sistema renina-angiotensina-aldosterona, da vasopressina e do peptídeo natriurético atrial. Sabe-se que a ativação neurohumoral desempenha um papel importante no coração isquêmico durante a progressão da disfunção ventricular para a insuficiência cardíaca (Middelkauff e Mark, 1998; Rouleau, 1991; Avezum et al., 2004). Dentre os efeitos deletérios da ativação neurohumoral após o IAM estão: arritmias ventriculares, taquicardia, redução da perfusão do miocárdio isquêmico, aumento da pressão de enchimento ventricular, elevação da impedância aórtica (índice da pós-

carga), aumento do consumo de oxigênio e redução da excreção de água e sódio (Cohn, 1990).

Especificamente, a ativação do sistema nervoso simpático e concomitante aumento dos níveis plasmáticos de noradrenalina ocorrem quase que imediatamente após o IAM, podendo se prolongar por meses (Graham et al., 2002; Grassi et al., 2015; Rouleau et al., 1991). O aumento da atividade simpática após o IAM leva ao aumento do trabalho cardíaco. Esse cenário demanda, conseqüentemente, um maior aporte de oxigênio pelo miocárdio mediante três mecanismos principais: aceleração do ritmo cardíaco, elevação da pressão arterial e aumento da contratilidade miocárdica. A redução dos níveis de oxigênio decorrente do aumento do trabalho cardíaco, portanto, contribui para o agravamento da isquemia e para o potencial desenvolvimento de arritmias ventriculares. Isso se torna um crítico determinante no risco de mortalidade no portador de cardiopatia isquêmica (Avezum et al., 2004).

Estudos anteriores já verificaram que pacientes com altos níveis de catecolaminas apresentam um pior prognóstico após o infarto (Rouleau et al., 1991). Com isso, os betabloqueadores foram introduzidos como terapia após o IAM, uma vez que são fármacos capazes de inibir competitivamente os efeitos das catecolaminas circulantes. Por conseguinte, são reconhecidos por sua capacidade de diminuir a frequência cardíaca, a pressão arterial e o esforço miocárdico, reduzindo o consumo de oxigênio pelo coração através da redução do trabalho cardíaco (Smith et al., 1992). Ao mesmo tempo, os betabloqueadores também melhoram a perfusão miocárdica através do aumento do fluxo subendocárdico e do fluxo das colaterais. Essas ações em conjunto são responsáveis por diminuir as taxas de ruptura miocárdica, limitar o tamanho do IAM, melhorar a função cardíaca e diminuir a mortalidade tanto precoce como tardia (Avezum et al., 2004). Na clínica, os betabloqueadores devem ser introduzidos na fase inicial pós-infarto, titulados gradualmente, e continuarem a ser administrados indefinidamente em todos os pacientes infartados com fração de ejeção do ventrículo esquerdo menor que 40% e que não possuem contraindicações (Mercado et al., 2013).

1.5. CARVEDILOL

Um dos betabloqueadores mais prescritos pelos cardiologistas para pacientes que sofreram um IAM, é o carvedilol (Poole-Wilson et al., 2003). O carvedilol é um betabloqueador de terceira geração não-seletivo, ou seja, é capaz de se ligar em ambos receptores beta-adrenérgicos (β_1 e β_2). Além disso, também possui propriedades antioxidantes e capacidade de interagir com o receptor adrenérgico α_1 e com os canais de cálcio quando em altas concentrações (Dulin e Abraham, 2004; Gao et al., 2000). Portanto, o carvedilol age bloqueando a atividade adrenérgica (via bloqueio dos receptores β_1 e β_2) e induzindo a vasodilatação (via bloqueio do receptor α_1). Ainda, a presença do grupo carbazol na sua estrutura molecular (Figura 2) é o fator responsável pela sua atividade antioxidante. Essa atividade ocorre mediante à inibição da peroxidação lipídica na membrana dos cardiomiócitos, à inibição da liberação de ânion superóxido dos neutrófilos, à preservação do sistema antioxidante endógeno (exemplo: vitamina E e glutathione), à eliminação de radicais peróxidos e hipoclorito e à execução de outras funções de proteção do sistema baseado na redução dos radicais livres (Dulin e Abraham, 2004). Tal ação em diminuir o estresse oxidativo já foi verificada em pacientes com insuficiência cardíaca (Nakamura et al., 2002).

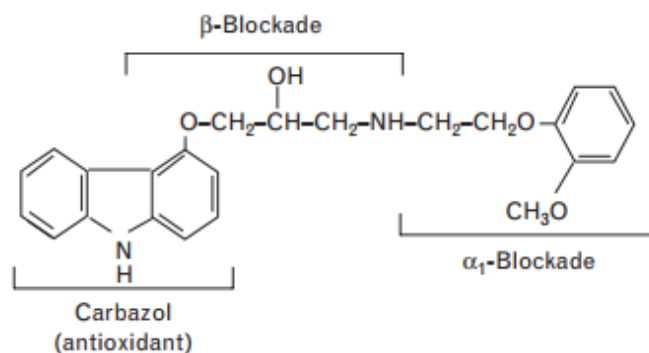


Figura 2. Estrutura molecular do carvedilol (Dandona et al., 2007).

É importante ressaltar que o carvedilol não possui atividade simpatomimética intrínseca e bloqueia os receptores α_1 , β_1 e β_2 sem exibir altos níveis de atividade agonista inversa. Essa falta de atividade agonista inversa e de atividade simpatomimética intrínseca reduz os efeitos colaterais e torna o fármaco mais

tolerado que os betabloqueadores mais antigos (Bortolotto e Colombo, 2009). Freemantle e colaboradores realizaram uma metanálise, demonstrando que os betabloqueadores diminuem a morbidade e a mortalidade após o infarto, mesmo nos pacientes submetidos à trombólise e que usavam inibidores da enzima conversora da angiotensina em associação (Freemantle et al., 1999). No estudo CAPRICORN (*Carvedilol Post-Infarct Survival Control in LV Dysfunction*), os pacientes com disfunção ventricular após o IAM tratados com carvedilol em longo prazo (4-6 semanas) tiveram redução significativa da frequência de todas as causas de mortalidade, da mortalidade cardiovascular e da recorrência de infartos do miocárdio não fatais (CAPRICORN, 2001). Ainda, um estudo associado ao ensaio CAPRICORN demonstrou, por dados ecocardiográficos, a capacidade do carvedilol em inibir o remodelamento ventricular em pacientes com disfunção do ventrículo esquerdo após o IAM (Doughty et al., 2004). Não somente em estudos com humanos, mas também com modelo animal em ratos, foi verificado benefícios do tratamento com carvedilol, como, por exemplo, a melhora da taxa de sobrevivência dos animais (Smith et al., 1992), a preservação da função ventricular esquerda e a diminuição da fibrose (Sia et al., 2002). Ainda, estudos também relatam sobre a atividade anti-inflamatória do carvedilol, a qual é dada pela redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e pelo aumento dos níveis de citocinas anti-inflamatórias (Li et al., 2006) e sobre a atividade anti-apoptótica, a qual ocorre através da diminuição da produção de proteínas pró-apoptóticas e da redução da apoptose dos cardiomiócitos (Yeh et al., 2013).

2 HIPÓTESE

A hipótese desse trabalho é que o betabloqueador carvedilol irá reduzir a estimulação adrenérgica provocada pelos HT durante o tratamento após o IAM. Isso representa uma estratégia importante, uma vez que visa à preservação da função cardíaca durante o tratamento com HT. Adicionalmente, essa co-administração promoverá um efeito sinérgico positivo sobre o coração infartado, visto que ambos tratamentos são capazes de melhorar o remodelamento ventricular, a função cardíaca e o estresse oxidativo, que são importantes fatores no pior prognóstico após o IAM.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração conjunta dos HT e do carvedilol sobre o coração de ratos submetidos ao infarto agudo do miocárdio. Nesse contexto, focar nos efeitos dessa co-administração sobre o remodelamento ventricular, a função cardíaca e o estresse oxidativo.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver o tratamento pela administração via oral dos hormônios da tireoide e do carvedilol.
- Realizar a análise de parâmetros ecocardiográficos.
- Avaliar parâmetros hemodinâmicos via cateterismo ventricular.
- Realizar uma análise morfológica para avaliar parâmetros de hipertrofia e de congestão hepática e pulmonar.
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo: concentração das espécies reativas de oxigênio totais, peroxidação lipídica, atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx) e dosagem de moléculas antioxidantes não-enzimáticas (níveis de sulfidril, de GSH e GSSG).

4 METODOLOGIA

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos com 45 dias de idade, com peso médio de 200 ± 50 gramas. Os animais foram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Durante o período do protocolo experimental (15 dias), os animais foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, sendo mantidos em caixas plásticas de 340 x 200 x 410 mm, com 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 e sob temperatura de 22°C.

4.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em cinco grupos (n= 8-10/grupo):

- Grupo sham (SHAM) – foi submetido a todos os processos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda.
- Grupo infarto do miocárdio (IM) – foi submetido ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda.
- Grupo infarto do miocárdio + Hormônios da tireoide (IM+HT) – foi submetido ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda e ao tratamento com os hormônios da tireoide.
- Grupo infarto do miocárdio + Carvediol (IM+C) – foi submetido ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda e ao tratamento com carvedilol.
- Grupo infarto do miocárdio + Carvedilol + Hormônios da tireoide (IM+C+HT) – foi submetido ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda e ao tratamento com os hormônios da tireoide e com carvedilol.

4.3. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

O IAM foi induzido por um método adaptado ao descrito por Johns e Olson em 1954 (Johns e Olson, 1954), no qual foi realizada a ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda. Para isso, os animais, primeiramente, foram mantidos anestesiados com quetamina (90mg/kg, via intraperitoneal, e volume de 0,45 mL para um rato de 250g) e xilazina (10mg/kg, via intraperitoneal, e volume de 0,12 mL para um rato de 250g) simultaneamente (CREAL 2013). Após a anestesia, os animais foram colocados em decúbito dorsal, tricotomizados e, posteriormente, entubados (Gelko-14G) e submetidos à ventilação artificial (Intermed, Inter 3, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, foi realizado um pequeno corte na pele do animal, o afastamento dos músculos peitorais e uma toracotomia esquerda no terceiro espaço intercostal, sendo colocado um afastador de tórax entre as costelas para permitir melhor visualização do coração. O pericárdio do coração foi seccionado e o átrio esquerdo afastado para a visualização da artéria coronária descendente anterior esquerda. Uma vez visualizada, seguiu-se com a ligadura dessa artéria coronária (fio mononylon 6.0), provocando a isquemia do miocárdio. Após a ligadura da artéria coronária, o afastador de costela foi retirado e feito o fechamento da incisão torácica (fio mononylon 5.0) e a retirada do pneumotórax através da sucção do ar com uma agulha (5x7) conectada a uma seringa de 10 mL. Em seguida, os músculos peitorais antes afastados foram reposicionados, e a incisura na pele foi suturada (fio mononylon 5.0). Logo após, os animais foram retirados da ventilação artificial e foi estimulada a sua respiração espontânea. Uma vez concluído o procedimento cirúrgico, os animais foram colocados em isolamento, em ambiente aquecido, nas primeiras 24 horas pós-cirurgia para a recuperação anestésica. Os mesmos foram tratados por dois dias com o analgésico tramadol (12,5 mg/kg, via subcutânea, de 12 em 12 horas) e dipirona (50mg/ml, via oral, de 12 em 12 horas) visando minimizar a dor e o desconforto no período pós-operatório (Santos et al., 2012). Durante esse tempo, foi observada a recuperação do comportamento normal do animal. A taxa de mortalidade no presente estudo foi de 23%, os quais ocorreram principalmente nas primeiras 24 horas após o procedimento cirúrgico. Os animais do grupo SHAM foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da oclusão coronariana (Schenkel et al. 2010).

4.4. CUIDADOS PÓS-CIRÚRGICOS

Todos os parâmetros monitorados durante a cirurgia foram avaliados no período pós-cirúrgico. Além da intervenção farmacológica explicitada no item “4.3. Procedimentos cirúrgicos” foram observadas, para cada animal individualmente, as seguintes características: desconforto, extremidades azuis e frias, padrão de respiração anormal e depressão respiratória, peso corporal, secreção nasal, reflexos lentos ou ausentes, aparência e processo de cicatrização da ferida operatória. Esse procedimento foi realizado por pesquisador treinado e ocorreu periodicamente (frequência - a cada 4 horas – 12 observações) durante as primeiras 48 horas pós-cirurgia, a fim de identificar as alterações e intervir adequadamente (tal como promover calor, hidratação, auxílio respiratório, medicação para dor e infecção - procedimentos relatados previamente). Durante o período de tratamento, os animais permaneceram sob observação na frequência de três vezes ao dia. A área de recuperação teve luz, temperatura, ruído adequado, assim como as gaiolas e camas limpas e secas. A eutanásia foi empregada nos animais que demonstraram pronunciados sinais de sofrimento, sem a adequada recuperação pós-operatória (método descrito no item 4.9).

4.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental deste estudo abrangeu um período de 15 dias, nos quais foram realizados os seguintes procedimentos:

- 1º Dia: Os animais dos grupos IM, IM+C, IM+HT e IM+C+HT foram submetidos ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda. Já os animais do grupo SHAM foram submetidos a uma cirurgia que consistiu dos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda.
- 1º ao 2º Dia: Os animais foram deixados em repouso para recuperação e receberam os devidos cuidados pós-cirúrgicos (conforme item 4.4).

- 3º ao 14º Dia: No 3º dia, foi realizada uma análise ecocardiográfica para a confirmação do infarto do miocárdio e para a avaliação morfológica e funcional do ventrículo esquerdo antes do início do tratamento. Essa análise permitiu a realização de uma distribuição homogênea dos animais entre os grupos infartados de acordo com a área de infarto. Após a análise ecocardiográfica, deu-se início aos tratamentos. Os animais dos grupos SHAM e IM receberam salina, enquanto os animais dos grupos infartados tratados (IM+C, IM+HT, IM+C+HT) receberam seu respectivos tratamentos durante 12 dias. Os animais foram pesados semanalmente para o acompanhamento do ganho de peso corporal.
- 14º Dia: Após algumas horas do recebimento da última dose de tratamento, os animais foram submetidos à anestesia para serem submetidos a uma última análise ecocardiográfica.
- 15º Dia: Após a anestesia, os animais foram submetidos à análise hemodinâmica via cateterismo ventricular e, posteriormente, foram eutanasiados, sendo coletado o tecido cardíaco, o pulmão e o fígado para posteriores análises.

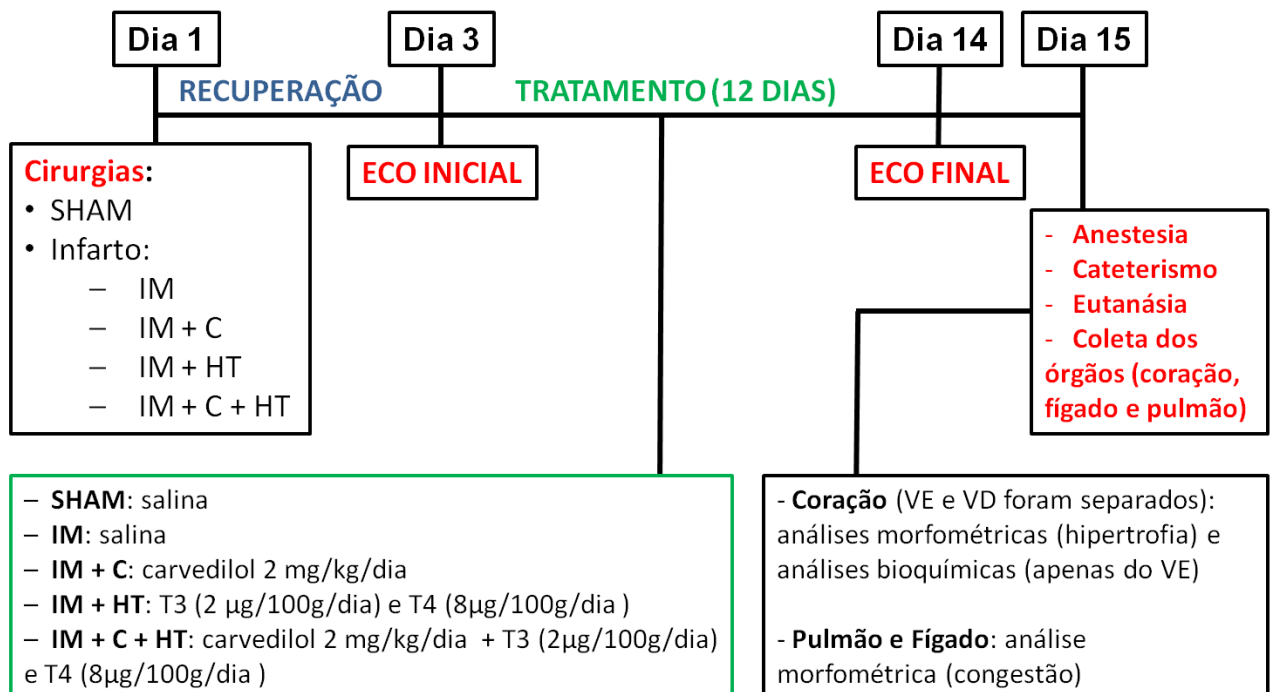


Figura 3. Esquema cronológico do protocolo experimental deste trabalho. ECO (análise ecocardiográfica), VE (ventrículo esquerdo), VD (ventrículo direito).

4.6. TRATAMENTO COM HORMÔNIOS DA TIREOIDE E CARVEDILOL

Após a cirurgia, os animais permaneceram em recuperação por 2 dias. Depois desse período, cada grupo recebeu o seguinte tratamento durante o período de 12 dias:

- SHAM – recebeu diariamente apenas solução salina por gavagem.
- IM – recebeu diariamente apenas solução salina por gavagem.
- IM+HT – recebeu diariamente, por gavagem, o tratamento hormonal com 2 µg/100g/dia de T3 (Sigma) e 8µg/100g/dia de T4 (Sigma) diluído em solução salina e hidróxido de sódio (NaOH) 1N (de Castro et al., 2014).
- IM+C – recebeu diariamente, por gavagem, o tratamento com carvedilol (Santa Cruz) (2mg/kg/dia) (Sun et al., 2005) diluído em 1% de DMSO, 2% de Tween 20 e salina (Akgüllü et al, 2015; Babu e Raju, 2009).
- IM+C+HT – recebeu diariamente, por gavagem, o tratamento hormonal com 2 µg/100g/dia de T3 e 8µg/100g/dia de T4 diluído em solução salina e hidróxido de sódio (NaOH) 1N, juntamente ao tratamento com carvedilol na dose 2mg/kg/dia diluído em 1% de DMSO, 2% de Tween 20 e salina (Akgüllü et al, 2015; Babu e Raju, 2009).

4.7. ANÁLISES ECOCARDIOGRÁFICAS

Os parâmetros ecocardiográficos foram avaliados 48 horas e 14 dias após o IAM. Para essa avaliação, os animais foram anestesiados (quetamina (90 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg)) e posicionados em decúbito lateral para a obtenção das imagens. Foi utilizado o sistema Philips HD XE (Andover, MA, USA) com um transdutor de 12-3 MHz, numa profundidade de 3 cm, e as imagens foram capturadas por um operador cegado e treinado com experiência em ecocardiografia animal. Foram analisados os parâmetros morfológicos do ventrículo esquerdo (espessuras das paredes posterior e anterior, diâmetros e áreas transversais na sístole e diástole), volumes cardíacos (volume diastólico final e volume sistólico

final), parâmetros de função sistólica (fração de ejeção e fração de encurtamento), área de infarto e índice de tensão de parede.

As áreas transversais do ventrículo esquerdo foram avaliadas no final da sístole e no final da diástole em três planos: basal, medial e apical. Utilizando a média das áreas transversais nos três planos foi calculada a mudança de área fracional (Nozawa et al., 2006). Os diâmetros sistólicos e diastólicos, assim como a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo foram igualmente avaliados nesses três planos, através do modo-M. Através da média das medidas dos diâmetros foi calculada a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (FenVE), usando a seguinte fórmula: $FenVE = (\text{média dos diâmetros diastólicos} - \text{média dos diâmetros sistólicos} / \text{média dos diâmetros diastólicos} \times 100)$ (Nozawa et al., 2006). Os volumes cardíacos foram medidos através do método de Simpson modificado (Mercier et al., 1982) e através desses foram calculados o débito sistólico, o débito cardíaco e a fração de ejeção. As imagens bidimensionais e os traçados do modo-M foram registrados em CD para posteriores análises.

4.8. ANÁLISES HEMODINÂMICAS

No 15º dia do protocolo, os animais foram anestesiados (quetamina (90 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg)). Após a anestesia, os animais passaram pelo procedimento de cateterismo realizado por um pesquisador cegado e treinado. Primeiramente, os animais tiveram a artéria carótida direita exposta. Com uma cânula feita de tubo de polietileno PE-50 previamente soldado a um tubo de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA) foi feita uma implantação na artéria exposta, a qual foi introduzida até o átrio e ventrículo esquerdo. A pressão ventricular sistólica e diastólica final esquerda e suas respectivas derivadas, derivada de contração (dP/dt máxima ou positiva) e derivada de relaxamento (dP/dt mínima ou negativa), foram monitoradas usando um transdutor de pressão (Strain-Gauge – Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155; Houston, Texas – EUA) ligado a um amplificador de sinais (Windaq frequência de amostragem de 2 kHz, Dataq Instruments, Inc., Akron, Ohio, EUA. Pressure Amplifier HP 8805C) (Schenkel et al., 2010). Após a análise hemodinâmica, foi realizada a eutanásia dos animais.

4.9. EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

Após completar a análise hemodinâmica, os animais foram imediatamente eutanasiados através da injeção intraperitoneal de tiopental (140 mg/kg), de lidocaína (10mg/kg) e com aproximadamente o triplo da dose anestésica. Essa eutanásia foi certificada mediante decapitação em guilhotina manual, em ambiente isolado (Lei 11915/2003 e as Diretrizes do CONCEA 05/2013 e as Diretrizes da Prática da Eutanásia CONCEA 2013).

Após a eutanásia, o coração dos animais foi rapidamente retirado e lavado em solução gelada de cloreto de potássio (KCl) 1,15%. Os átrios e ventrículos foram separados, sendo os átrios descartados e os ventrículos separados em ventrículo esquerdo (VE) e ventrículo direito (VD) e pesados para a avaliação da hipertrofia cardíaca. As amostras de tecido cardíaco destinadas às análises bioquímicas foram primeiramente acondicionadas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em freezer a -80°C. Também, foram coletados o fígado e o pulmão para a análise de congestão hepática e pulmonar, respectivamente.

4.10. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

4.10.1. Índices de hipertrofia cardíaca

Após a eutanásia, o coração dos animais foi rapidamente retirado, tendo sido separados os átrios e os ventrículos, sendo os átrios descartados e os ventrículos separados em VE e VD e pesados. Também, foi retirada a tíbia dos animais para utilizar seu comprimento no cálculo da hipertrofia cardíaca.

A hipertrofia cardíaca fornece dados quanto ao aumento de massa muscular do coração. Para sua análise, foram avaliadas as seguintes relações: razão do peso do coração (mg) pelo peso corporal (g) e razão do peso do coração (mg) pelo comprimento da tíbia (cm). Também, foi calculada a hipertrofia do ventrículo esquerdo, utilizando as seguintes relações: razão do peso do VE (mg) pelo peso corporal (g) e razão do peso do VE (mg) pelo comprimento da tíbia (cm) (Schenkel et al., 2010).

4.10.2. Índices de congestão pulmonar e hepática

Para o cálculo da congestão pulmonar e hepática, o pulmão e o fígado dos animais foram retirados, pesados e acondicionados em estufa em uma temperatura de 65 graus Celsius. Esses órgãos foram pesados diariamente até atingirem um peso constante para obtenção do peso seco. Após isso, foram calculadas a congestão pulmonar e a congestão hepática pela razão entre o peso seco e o peso úmido desses órgãos (Singal et al. 1999).

4.11. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

4.11.1. Preparo do homogeneizado

A homogeneização do VE foi realizada por 40 segundos com homogenizador Ultra-Turrax, com KCl 1,15% (5 mL/g de tecido) e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) na concentração de 100 mmol/L. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados por 20 minutos a 1000 x *g* a 4°C. O sobrenadante foi retirado e armazenado em freezer (- 80°C) para posteriores análises bioquímicas (Llesuy et. al., 1985).

4.11.2. Dosagem de proteínas

Para dosagem de proteínas do homogeneizado foi realizado o método descrito por Lowry, utilizando solução de albumina bovina como padrão. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL (Lowry et al. 1951).

4.11.3. Medida das espécies reativas de oxigênio totais

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

4.11.4. Peroxidação lipídica

A determinação da peroxidação lipídica no homogeneizado de VE foi determinada pelo método de detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme descrito por Ohkawa e colegas (Ohkawa et al., 1979). Resumidamente, foram adicionados a 100 µL de homogeneizado: 25 µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 8,1%, 188 µL de ácido acético 20% (pH 3,5) e 188 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8%. Após, o homogeneizado foi incubado em banho de água fervente (100°C) durante 60 minutos. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 1000 x g por 10 minutos. Após a centrifugação, removeu-se o sobrenadante e mediu-se a absorbância (535 nm) utilizando um espectrofotômetro (T80 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments, São Paulo, BR). Utilizou-se malondialdeído como padrão, e os resultados foram expressos em nmol/mg de proteína.

4.11.5. Atividade antioxidante enzimática

4.11.5.1. Atividade da enzima superóxido dismutase

A medida da atividade superóxido dismutase (SOD) foi baseada na sua capacidade de inibir a reação do radical ânion superóxido com o pirogalol. O radical

ânion superóxido é gerado pela auto-oxidação do pirogallol quando presente em meio básico. Portanto, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor a auto-oxidação do pirogallol. A SOD presente na amostra compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. A oxidação do pirogallol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a um comprimento de onda de 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogallol oxidado (Marklund, 1985). Para esse ensaio, se utilizou 10 µl de homogeneizado de VE na presença de tampão Tris Base 50 mM e EDTA 1mM, adicionando-se 4 µl de Catalase 30 µM (Sigma Aldrich, Catalase from bovine liver - aqueous suspension, 10,000-40,000 units) e 8 µl de pirogallol 24 mM (Sigma Aldrich, Pyrogallol, ≥98% (HPLC), P.M 126,11). Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína comparando-se com uma curva padrão de SOD (Sigma Aldrich, Superoxide Dismutase from bovine, lyophilized powder, ≥1500 units/mg protein).

4.11.5.2. *Atividade da enzima catalase*

A atividade da catalase foi medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O método consistiu em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, no qual ocorre maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Para a execução deste método foram utilizados uma solução tampão fosfato a 50 mM (pH=7,4) e peróxido de hidrogênio 0,3 M. Em uma cubeta de quartzo, foram adicionados 955 µL do tampão fosfato e 10 µL de amostra. A cubeta foi colocada no espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35 µL do H_2O_2 0,3 M e feito o monitoramento da diminuição da absorbância a 240 nm. Os resultados foram expressos em nanomoles de H_2O_2 por minuto por miligramas de proteína (nmol/min/mg proteína) (Boveris e Chance, 1973).

4.11.5.3. *Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)*

A enzima glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a reação de peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos com a glutathiona reduzida (GSH), formando glutathiona oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. A GPx atua em conjunto com a enzima glutathiona redutase (GR), a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada, usando NADPH como cofator. Com isso, a atividade da GPx foi determinada medindo-se a taxa de oxidação do NADPH a 340 nm na presença de GSH e GR, utilizando-se azida, para inibição da enzima catalase, e hidroperóxido de tert-butil, como iniciador. Para o ensaio, foram utilizados 25 µl de homogeneizado de VE na presença de 165 µl de tampão fosfato 143 mM EDTA 4 mM, adicionando-se 250 µl NADPH 0,24 mM (Sigma Aldrich, N1630 SIGMA), 5 µl de azida 25 mM (Sigma Aldrich, S8032 SIGMA), 25 µl de GSH 20 mM (Sigma Aldrich, G4251 SIGMA) e 5 µl de GR (Sigma Aldrich, 10 U/ml – G3664 SIGMA). A atividade da GPx foi expressa como nanomoles de NADPH por minuto por miligrama de proteína (nmol/min/mg proteína). (Flohé e Gunzler 1984).

4.11.6. **Atividade antioxidante não-enzimática**

4.11.6.1. *Determinação do conteúdo de sulfidrilas*

Para o ensaio de sulfidrilas, foram adicionados 0,1 mM de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) a 15 µL de homogeneizados do ventrículo esquerdo, que foram incubados durante 30 min à temperatura ambiente num ambiente escuro, tal como descrito por Aksenov e Markesberry (Aksenov e Markesberry et al., 2001). A absorbância (medição da formação do TNB) foi medida espectrofotometricamente a 412 nm (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom, Reino Unido) e os resultados são expressos como nanomoles de TNB por miligrama de proteína (nmol/mg proteína).

4.11.6.2. *Determinação da concentração de GSH e GSSG*

Para determinação da concentração das glutations, uma porção de 25 – 30 mg de VE foi desproteïnizada e homogeneizada na presença de de ácido perclórico 2M/EDTA 2 mM. A amostra homogeneizada foi então centrifugada a 1000 x g por 10 minutos e o sobrenadante separado em dois microtubos diferentes: 50 µl aliqüotados para mensuração das glutations totais e 50 µl aliqüotados para mensuração das glutations oxidadas. No microtubo contendo o sobrenadante para mensuração das glutations oxidadas foram adicionados 10 µl de N-etilmaleimida (NEM) 0,2 M para a inibição das glutations reduzidas, as quais se tornam o composto GS-NEM, que não irá reagir com o DTNB adicionado posteriormente. Depois de uma hora, ajustou-se o pH de ambos os sobrenadantes com MOPS 0,3 M/KOH 2M até 7,0. Para o ensaio, em cubeta de quartzo, adicionou-se 87,5 µl de água destilada, 12,5 µl de amostra, 50 µl de DTNB 6 mM (Sigma Aldrich, D8130 SIGMA), 350 µl NADPH 0,25 mM (Sigma Aldrich, N1630 SIGMA) e 5 µl de GR (Sigma Aldrich, 10 U/ml – G3664 SIGMA). Dessa forma, foi possível determinar a concentração das glutations oxidadas e reduzidas. No caso da concentração das glutations reduzidas, essa foi obtida mediante o cálculo da subtração das glutations oxidadas das glutations totais. A concentração de glutations foi calculada medindo-se espectrofotometricamente o TNB formado a 412 nm e expressa como µmol de TNB por minuto por miligrama de tecido (Akerboom e Sies, 1981).

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade da amostra pelo método de Shapiro-Wilk. Uma vez que os dados apresentaram distribuição normal, a comparação entre os grupos foi feita através da análise de variância (ANOVA) de uma via, complementada com o teste Student-Newmann-Keuls. A correlação entre duas variáveis foi analisada através do teste de correlação de Pearson. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou valor $P < 0,05$. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. O software

Sigma Plot 12.0 para Windows foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados, e o software GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows, foi utilizado para a elaboração dos gráficos.

4.13. DESCARTE DE MATERIAIS BIOLÓGICOS E QUÍMICOS

Os resíduos biológicos (carcaças, tecidos dos animais) foram acondicionados em sacos plásticos de coloração branca, congelados e enviados ao Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) aos cuidados do CREAL. Os resíduos químicos foram separados, devidamente identificados e acondicionados para posterior envio ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos (CGTRQ) do Instituto de Química da UFRGS. Materiais tóxicos foram usados na capela e 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 posteriores foram feitos com uso de avental, luva cirúrgica, máscara se necessário respeitando os devidos cuidados para proteção tanto dos animais como do pesquisador.

4.14. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto para a realização deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS sob o número de 30776. Todos os procedimentos descritos nesse estudo levaram em consideração as definições da Lei 11.794/08 (conhecida como lei Arouca) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5 RESULTADOS

5.1. PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS – HIPERTROFIA CARDÍACA E CONGESTÃO PULMONAR E HEPÁTICA

Os animais dos grupos IM, IM+HT e IM+C+HT apresentaram uma perda de peso em relação ao grupo SHAM, enquanto que o grupo IM+C apresentou um aumento do peso corporal em comparação ao grupo IM, não sendo diferente do grupo SHAM. A respeito dos parâmetros de hipertrofia cardíaca, foi possível verificar um aumento do peso do coração e do ventrículo esquerdo (VE), bem como uma elevação dos índices de hipertrofia cardíaca (coração/comprimento da tíbia; VE/comprimento da tíbia) nos grupos infartados tratados em relação aos grupos SHAM e IM. Já nos índices de hipertrofia cardíaca, coração/peso corporal e VE/peso corporal, foi observado um aumento da hipertrofia nos grupos infartados em relação ao SHAM e dos grupos IM+HT e IM+C+HT em comparação aos grupos IM e IM+C. No entanto, os grupos IM+HT e IM+C+HT apresentaram um aumento em praticamente todos os parâmetros de hipertrofia cardíaca (peso do coração; coração/peso corporal; coração/comprimento da tíbia; VE/peso corporal) em relação ao grupo IM+C. Quanto aos parâmetros de congestão pulmonar e hepática, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos nos índices de congestão pulmonar (pulmão seco/pulmão úmido) e hepática (fígado seco/fígado úmido) (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados morfométricos 15 dias pós-infarto.

Parâmetro	Grupos não-tratados		Grupos tratados		
	SHAM	IM	IM+C	IM+HT	IM+C+HT
	(n=10)	(n=8)	(n=9)	(n=10)	(n=9)
Peso corporal (g)	313±19	288±16 a	322±17 b	297±17 ac	292±8 ac
Peso do coração (g)	0,85±0,05	0,90±0,06	0,98±0,06 ab	1,12±0,08 abc	1,10±0,09 abc
Peso do VE (g)	0,65±0,03	0,68±0,03	0,75±0,05 ab	0,78±0,06 ab	0,78±0,07 ab
Peso do VD (g)	0,20±0,02	0,22±0,03	0,23±0,02	0,30±0,05 abc	0,30 ±0,04 abc
Coração/Peso corporal (mg/g)	2,72±0,10	3,05±0,33 a	3,05±0,19 a	3,71±0,25 abc	3,63±0,32 abc
Coração/comprimento da tibia (mg/cm)	2,43±0,12	2,59±0,21	2,80±0,11 ab	3,29±0,17 abc	3,14±0,25 abc
VE/peso corporal (mg/g)	2,07±0,07	2,30±0,20 a	2,34±0,13 a	2,64±0,13 abc	2,67±0,22 abc
VE/comprimento da tibia (mg/cm)	1,85±0,09	1,95±0,10	2,15±0,12 ab	2,24±0,15 ab	2,23±0,19 ab
Pulmão úmido/pulmão seco (g/g)	5,11±0,40	5,12±0,29	5,47±0,80	5,42±0,50	5,37±0,48
Fígado úmido/fígado seco (g/g)	3,33±0,05	3,37±0,09	3,30±0,05	3,37±0,03	3,374±0,04

Valores expressos como média ± desvio padrão (n=8-10 animais/grupo). a Diferença significativa em relação ao grupo SHAM (P<0,05); b Diferença significativa em relação ao grupo IM (P<0,05); c Diferença significativa em relação ao grupo IM+C (P < 0,05); d Diferença significativa em relação ao grupo IM+HT (P < 0,05).

5.2. PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS

Após 14 dias da cirurgia de infarto, a partir da análise ecocardiográfica, foi possível verificar que não houve diferença em relação à área de infarto entre os grupos infartados, revelando uma homogeneidade nesse parâmetro entre esses grupos. Ainda, os grupos infartados também revelaram um aumento nos diâmetros e nas áreas transversais do ventrículo esquerdo, analisados durante a sístole e a diástole, indicando uma dilatação significativa dessa câmara em relação ao grupo SHAM.

Nos grupos infartados, foi possível observar o aumento do volume diastólico, do débito cardíaco e do débito sistólico e uma diminuição da fração de encurtamento em comparação ao grupo SHAM. Todavia, embora todos os grupos infartados tenham apresentado uma redução da fração de ejeção em relação ao grupo SHAM, após o tratamento, os grupos IM+C, IM+HT e IM+C+HT demonstraram um aumento significativo em comparação ao grupo IM. Ainda, os grupos IM+C e IM+C+HT apresentaram uma elevação da fração de ejeção em relação ao grupo IM+HT. Quanto à espessura da parede posterior na sístole, apenas o grupo IM demonstrou uma redução em relação ao grupo SHAM, enquanto os grupos infartados tratados apresentaram um aumento neste parâmetro em relação ao grupo IM e não foram diferentes do grupo SHAM. A espessura da parede posterior na diástole, entretanto, não foi diferente entre os grupos. A respeito do índice de tensão de parede, foi possível observar uma elevação nos grupos IM e IM+HT em relação ao grupo SHAM, porém os grupos IM+C, IM+HT e IM+C+HT apresentaram uma diminuição desse índice em comparação ao grupo IM, sendo que os grupos IM+C e IM+C+HT não foram diferentes do SHAM. Em relação à mudança na área fracional (MAF) e do volume sistólico final (VSF), embora tenha sido observada uma redução da MAF e um aumento do VSF nos grupos infartados em comparação ao grupo SHAM, nos grupos tratados com carvedilol (IM+C e IM+C+HT) houve uma atenuação desses parâmetros em relação aos grupos IM e IM+HT. Todos os dados ecocardiográficos descritos estão apresentados na Tabela 2. Na figura 4, é possível verificar imagens ecocardiográficas do VE obtidas no modo-M para um animal de cada grupo utilizado neste estudo.

Tabela 2 – Dados ecocardiográficos 14 dias pós-infarto.

Parâmetros	Grupos não-tratados		Grupos tratados		
	SHAM (n=10)	IM (n=8)	IM+C (n=9)	IM+HT (n=10)	IM+C+HT (n=9)
Área de infarto (%)	—————	52±5	52±7	53±3	51±6
DS (cm)	0,31±0,04	0,69±0,06 a	0,70±0,08 a	0,71±0,09 a	0,70±0,09 a
DD (cm)	0,68±0,05	0,85±0,04 a	0,86±0,08 a	0,91±0,05 a	0,87±0,06 a
ASVE (cm ²)	0,12±0,03	0,46±0,10 a	0,41±0,15 a	0,48±0,09 a	0,39±0,11 a
ADVE (cm ²)	0,38±0,07	0,68±0,06 a	0,66±0,15 a	0,69±0,09 a	0,62±0,10 a
VD (mL)	0,22±0,04	0,48±0,07 a	0,38±0,11 a	0,44±0,08 a	0,39±0,09 a
DC (mL/min)	47±5	63±7 a	66±19 a	70±10 a	77±17 a
DS (mL)	0,18±0,02	0,24±0,03 a	0,25±0,06 a	0,23±0,04 a	0,22±0,04 a
FenVE (%)	53,9±4,33	19,2± 4,49 a	17,5±4,84 a	20,5±3,51 a	18.1±4,76 a
FE (%)	83,2±3,71	35,2±9,26 a	61,2±8,57 abd	48,5±5,86 abc	57,5±4,93 abd
EPPS (cm)	0,26±0,01	0,19±0,03 a	0,24± 0,03 b	0,24± 0,03 b	0,24±0,02 b
EPPD (cm)	0,13±0,01	0,13±0,02	0,14±0,01	0,14±0,02	0,15±0,02
ITP	2,46±0,25	3,74± 0,50 a	2,99± 0,17 b	3,14± 0,51 ab	2,93±0,60 b
MAF (%)	68,9±5,10	30,0± 9,85 a	42,2± 8,99 abd	32,1±6,89 ac	40,7±6,99 abd
VSF (mL)	0,03±0,01	0,27±0,07 a	0,17±0,08 ab	0,22±0,06 a	0,16±0,04 ab

Valores expressos como média ± desvio padrão (n=8-10 animais/grupo). DS (Diâmetro Sistólico), DD (Diâmetro Diastólico), ASVE (Área Sistólica do Ventrículo Esquerdo), ADVE (Área Diastólica do Ventrículo Esquerdo), VD (Volume diastólico), DC (Débito Cardíaco), DS (Débito Sistólico), FenVE (Fração de Encurtamento do Ventrículo Esquerdo), FE (Fração de Ejeção), EPPS (Espessura da Parede Posterior na Sístole), EPPD (Espessura da Parede Posterior na Diástole), ITP (Índice de Tensão de Parede), MAF (Mudança na Área Fracional), VSF (Volume Sistólico Final). a Diferença significativa em relação ao grupo SHAM (P < 0,05); b Diferença significativa em relação ao grupo IM (P < 0,05); c Diferença significativa em relação ao grupo IM+C (P < 0,05); d Diferença significativa em relação ao grupo IM+HT (P < 0,05).

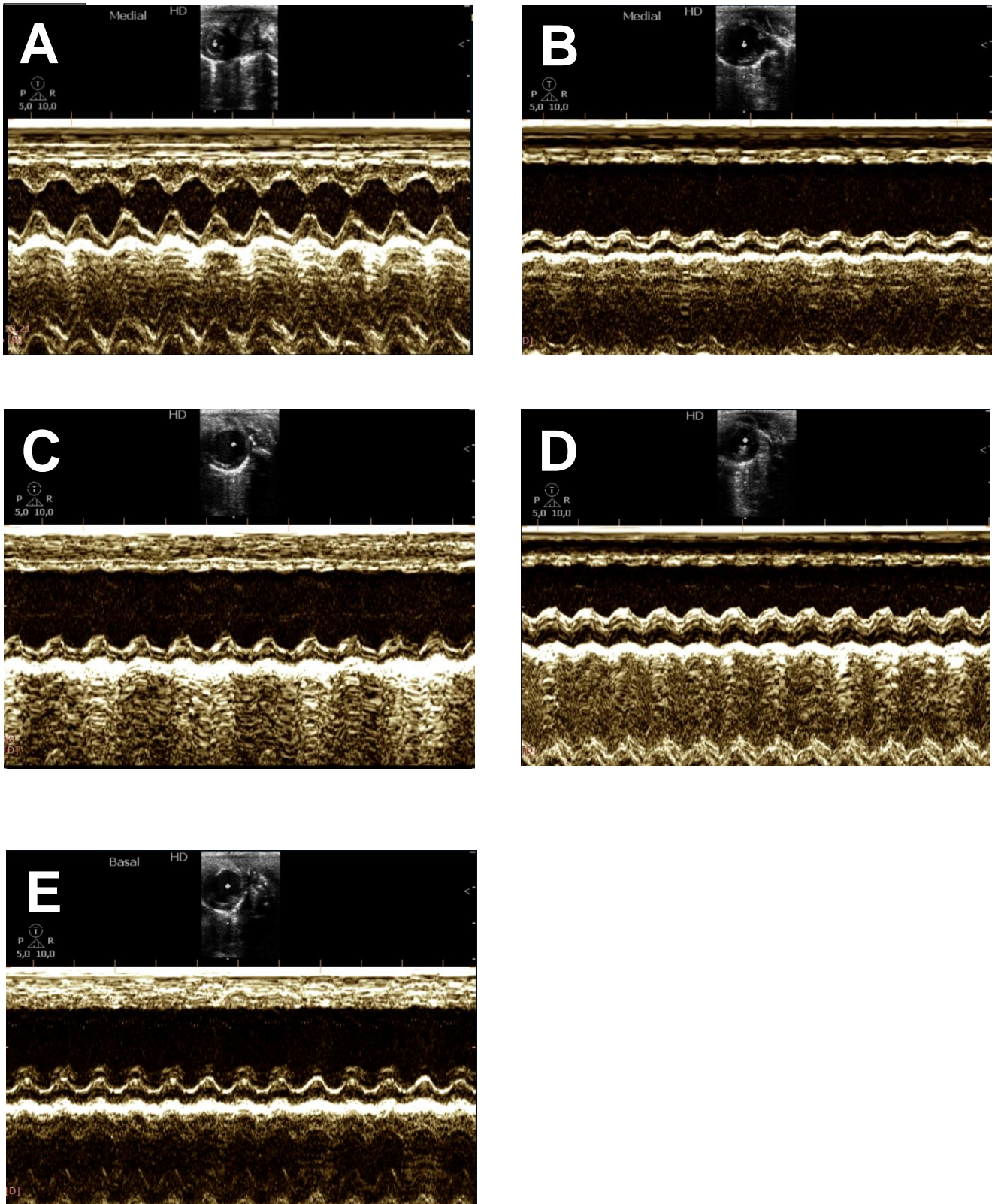


Figura 4. Imagens ecocardiográficas do VE de ratos Wistar obtidas no modo-M. (A) Animal do grupo SHAM; (B) Animal do grupo IM; (C) Animal do grupo IM+C; (D) Animal do grupo IM+HT; (E) Animal do grupo IM+C+HT.

5.3. PARÂMETROS HEMODINÂMICOS

Mediante análise hemodinâmica foi possível observar uma redução da pressão sistólica (Fig.5A) e um aumento da pressão diastólica final do VE (Fig.5B), bem como uma diminuição da dP/dt máxima e da dP/dt mínima (Fig.5C-D) no grupo IM em relação ao grupo SHAM. No entanto, após o tratamento, os grupos IM+C, IM+HT e IM+C+HT apresentaram aumento da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (Fig.5A) e diminuição da pressão diastólica final do ventrículo (Fig.5B), bem como uma elevação da dP/dt máxima e da dP/dt mínima (Fig.5C-D) em comparação ao grupo IM. A respeito da frequência cardíaca observou-se um aumento nos grupos IM+HT e IM+C+HT em relação aos grupos SHAM, IM e IM+C. No grupo IM+C+HT, entretanto, foi possível verificar uma redução da frequência cardíaca em relação ao grupo IM+HT (Fig.5E).

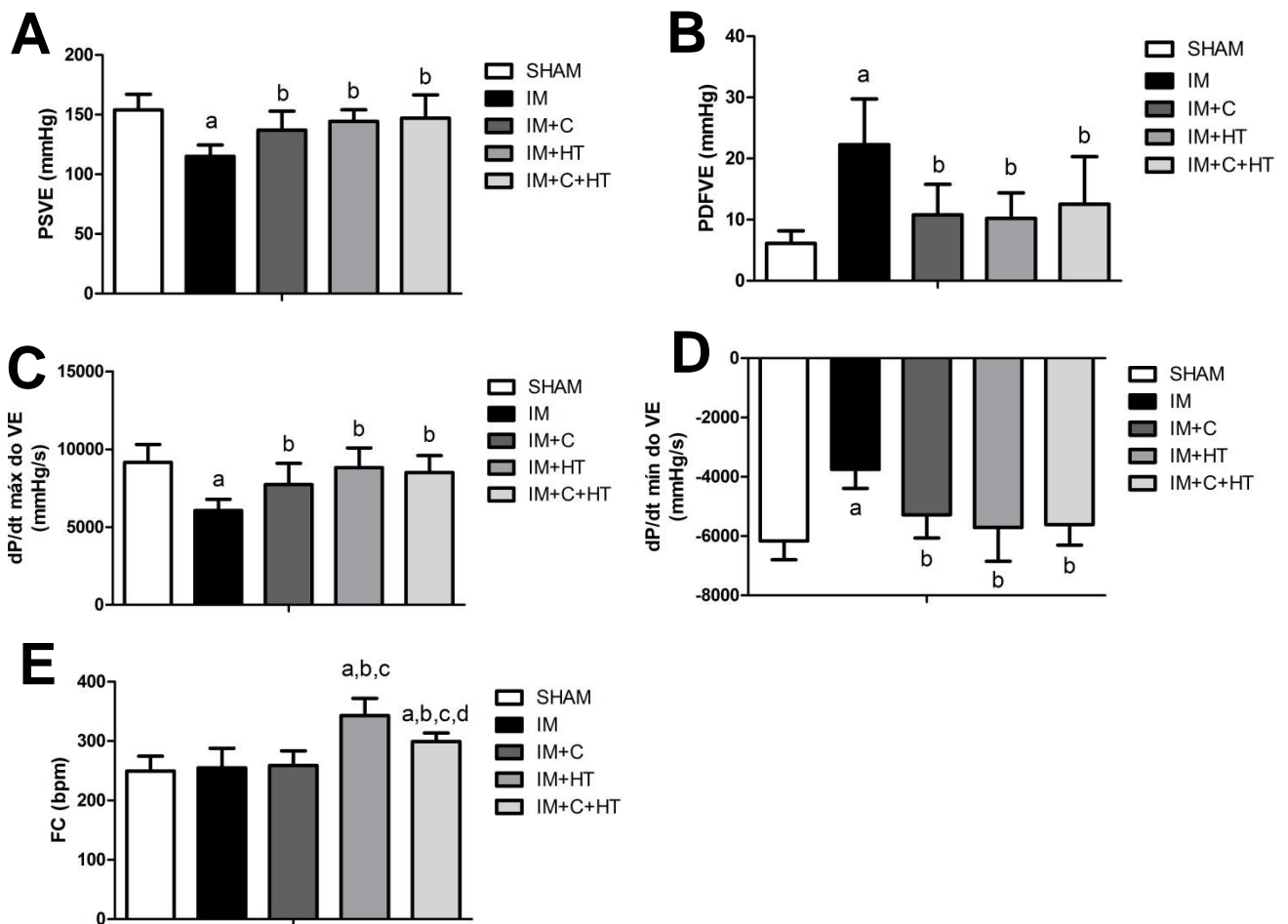


Figura 5. Dados hemodinâmicos obtidos através do cateterismo do VE. (A) PSVE (Pressão Sistólica no Ventrículo Esquerdo); (B) PDFVE (Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo); (C) dP/dt

máxima – índice de contratilidade; (D) dP/dt mínima – índice de relaxamento; (E) FC (Frequência Cardíaca). a Diferença significativa em relação ao grupo SHAM ($P < 0,05$); b Diferença significativa em relação ao grupo IM ($P < 0,05$); c Diferença significativa em relação ao grupo IM+C ($P < 0,05$); d Diferença significativa em relação ao grupo IM+HT ($P < 0,05$).

5.4. PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

5.4.1. Níveis das espécies reativas de oxigênio

Verificou-se um aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) totais nos grupos IM e IM+C em relação ao SHAM, enquanto o grupo IM+HT não foi diferente do grupo SHAM. O grupo IM+C+HT apresentou redução dos níveis de ERO em comparação aos grupos IM e IM+C e, também, não foi diferente do grupo SHAM. (Fig.6).

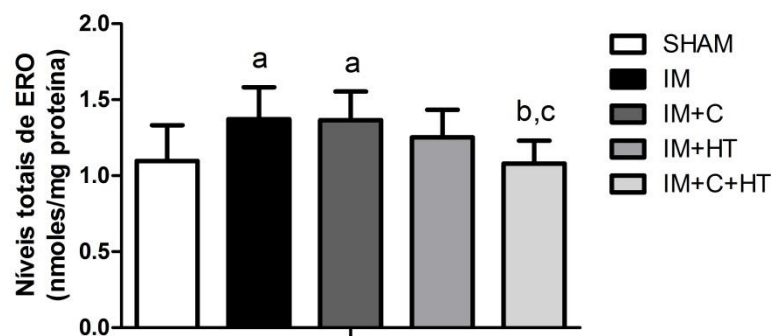


Figura 6. Níveis totais da ERO. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n=8-10$ animais/grupo). a Diferença significativa em relação ao grupo SHAM ($P < 0,05$); b Diferença significativa em relação ao grupo IM ($P < 0,05$); c Diferença significativa em relação ao grupo IM+C ($P < 0,05$); d Diferença significativa em relação ao grupo IM+HT ($P < 0,05$).

5.4.2. Níveis de sulfidrilas totais

Em relação aos níveis de sulfidrilas, foi possível observar uma diminuição dos níveis de sulfidrilas nos grupos IM e IM+C em relação ao grupo SHAM. Os grupos IM+HT e IM+C+HT, no entanto, não foram diferentes em comparação ao grupo SHAM (Fig.7).

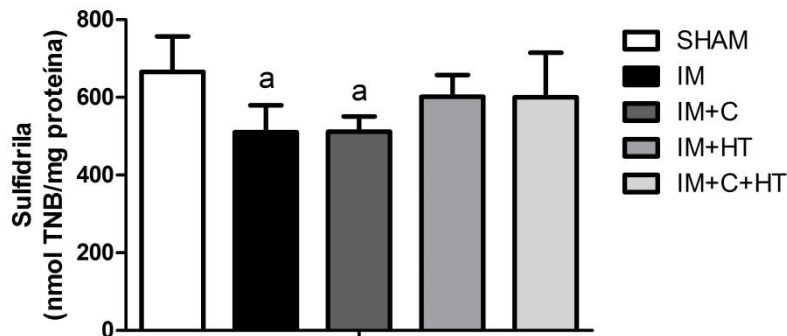


Figura 7. Níveis de sulfidrilas totais. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=8-10 animais/grupo). a Diferença significativa em relação ao grupo SHAM ($P < 0,05$); b Diferença significativa em relação ao grupo IM ($P < 0,05$); c Diferença significativa em relação ao grupo IM+C ($P < 0,05$); d Diferença significativa em relação ao grupo IM+HT ($P < 0,05$).

5.4.3. Correlação dos níveis de sulfidrilas e das ERO

Para avaliar se houve uma associação entre dos níveis de sulfidrilas com os níveis de ERO, foi feita uma análise de correlação de Pearson para essas duas variáveis utilizando os dados de todos os grupos estudados. Nessa análise, foi verificada uma correlação negativa ($r = - 0.355$, $p = 0.042$) entre os níveis de sulfidrilas e das ERO (Fig.8). Portanto, quando os níveis de ERO se encontram elevados, isso está associado com a redução dos níveis de sulfidrilas (e vice-versa), como foi observado nos grupos IM e IM+C.

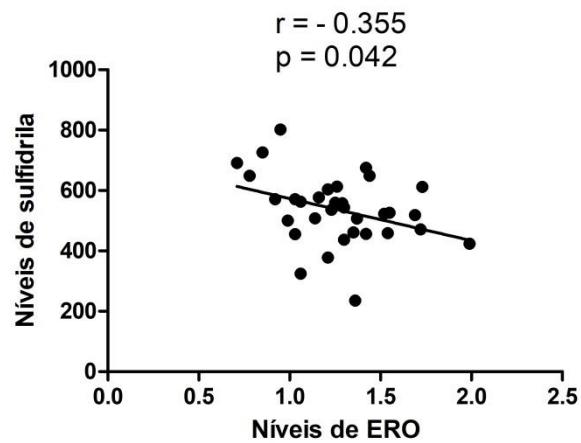


Figura 8. Correlação entre os níveis de sulfidrina e de ERO. Valores do coeficiente de Pearson (r) e do valor P estão apresentados na figura ($n = 6$ animais/grupo). Correlação considerada significativa quando $P < 0,05$.

5.4.4. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica, avaliada pelo método de detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), revelou um aumento dos níveis de TBARS em todos os grupos infartados em relação ao grupo SHAM. Ambos os tratamentos não parecem ter exercido efeito protetor sobre a lipoperoxidação, uma vez que não há diferença nos níveis de TBARS entre os grupos infartados (Fig.9).

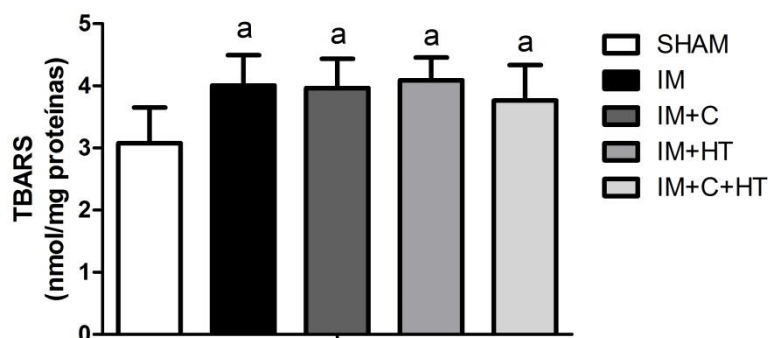


Figura 9. Níveis de TBARS. Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n = 8-10$ animais/grupo). a Diferença significativa em relação ao grupo SHAM ($P < 0,05$); b Diferença significativa em relação ao grupo IM ($P < 0,05$); c Diferença significativa em relação ao grupo IM+C ($P < 0,05$); d Diferença significativa em relação ao grupo IM+HT ($P < 0,05$).

5.4.5. Avaliação do sistema antioxidante enzimático – CAT, SOD e GPx

Quanto à atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (Fig.10A), catalase (Fig.10B) e glutathiona peroxidase (Fig. 10C), não foi observada diferença significativa entre os grupos.

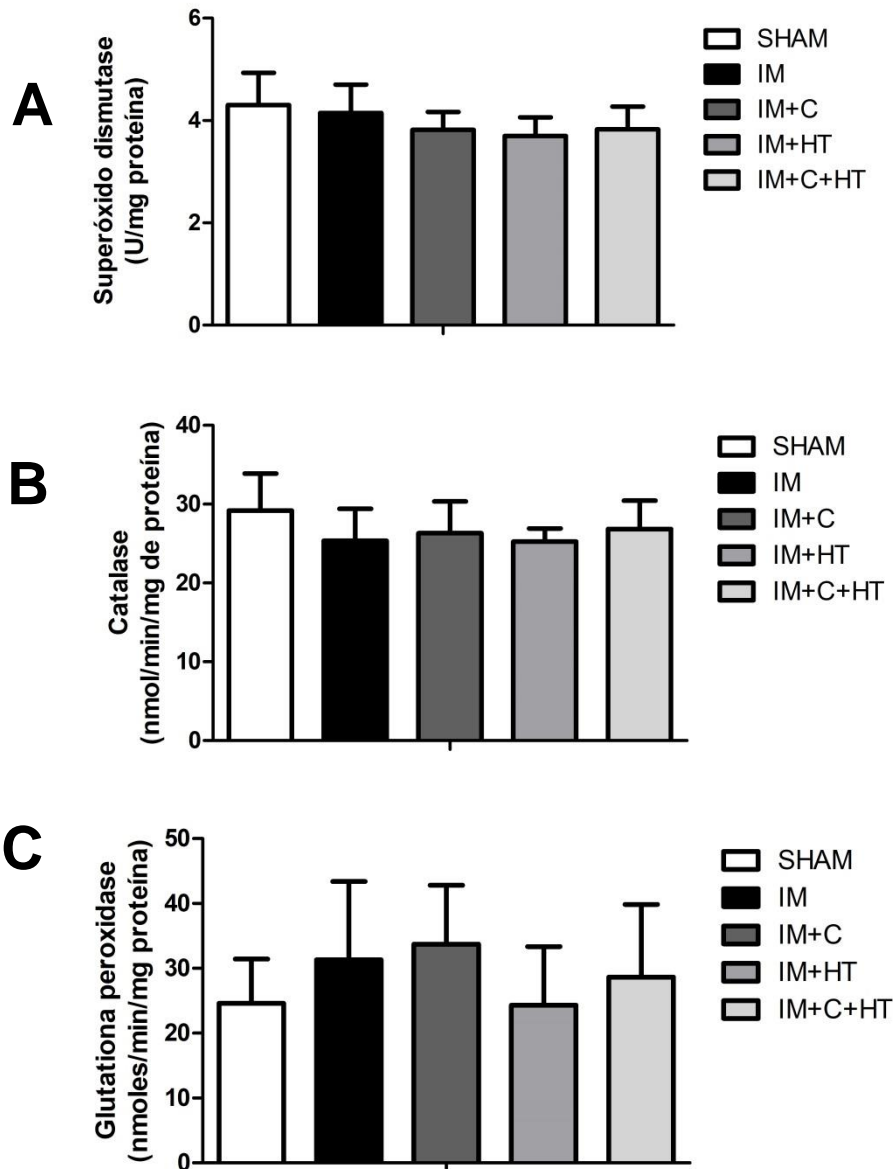


Figura 10. Atividade das enzimas antioxidantes. (A) Atividade da SOD; (B) Atividade da CAT; (C) Atividade da GPx. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=8-10 animais/grupo). a Diferença significativa em relação ao grupo SHAM ($P < 0,05$); b Diferença significativa em relação ao grupo IM ($P < 0,05$); c Diferença significativa em relação ao grupo IM+C ($P < 0,05$); d Diferença significativa em relação ao grupo IM+HT ($P < 0,05$).

5.4.6. Concentrações de GSH e GSSG

A respeito do metabolismo das glutatonas, verificou-se uma redução da glutatona reduzida (GSH) no grupo IM+C em relação aos grupos SHAM e IM, bem como um aumento no grupo IM+C+HT em comparação ao grupo SHAM, IM+C e IM+HT (Fig. 11A). Os grupos IM+C, IM+HT e IM+C+HT apresentaram uma redução dos níveis de glutatona oxidada (GSSG) em relação aos grupos SHAM e IM (Fig. 11B). A razão GSH/GSSG mostrou-se aumentada apenas no grupo IM+C+HT em comparação aos grupos SHAM e IM+C (Fig.11C).

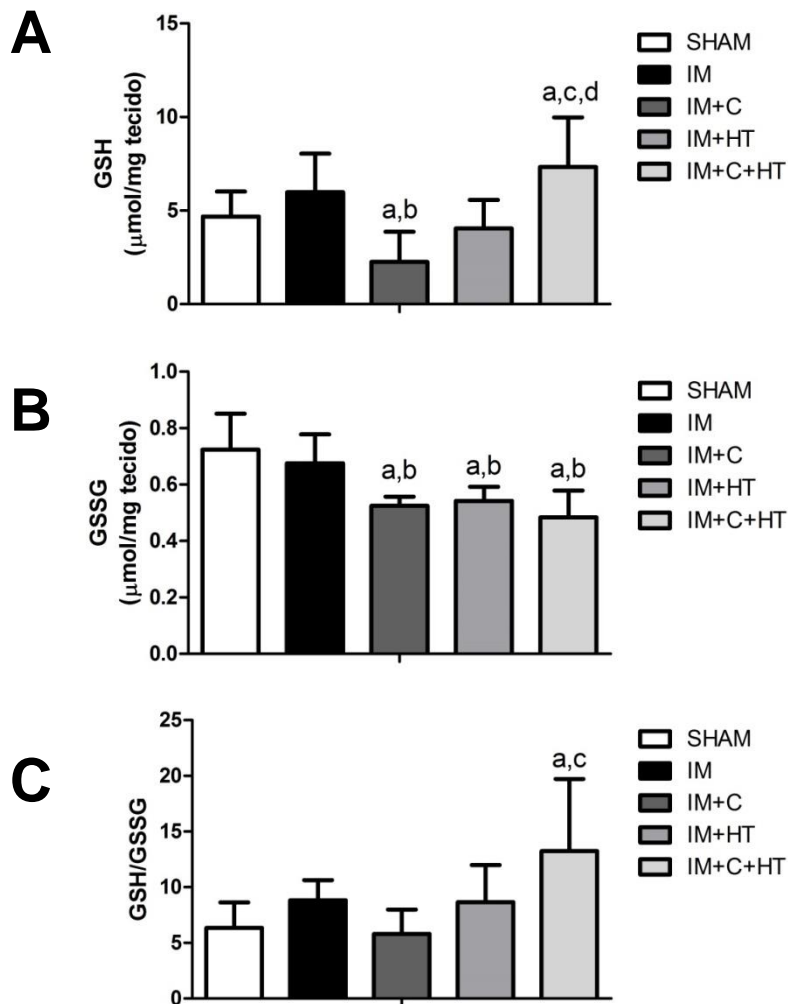


Figura 11. Concentrações de GSH e GSSG. (A) Concentração de GSH; (B) Concentração de GSSG; (C) Razão GSH/GSSG. Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=8-10 animais/grupo). a Diferença significativa em relação ao grupo SHAM ($P < 0,05$); b Diferença significativa em relação ao grupo IM ($P < 0,05$); c Diferença significativa em relação ao grupo IM+C ($P < 0,05$); d Diferença significativa em relação ao grupo IM+HT ($P < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou pela primeira vez os efeitos da co-administração dos hormônios da tireoide e do carvedilol sobre o coração de ratos submetidos ao infarto agudo do miocárdio. Nesse contexto, foram avaliados os efeitos desta co-administração sobre o remodelamento ventricular, a função cardíaca e o estresse oxidativo. Ainda, destaca-se a importância deste trabalho em avaliar os efeitos da terapia com HT, uma abordagem terapêutica ainda em fase de testes clínicos (Gerdes e Iervasi, 2010), com o betabloqueador carvedilol, uma terapia já há muito tempo utilizada na clínica no tratamento do IAM (Capricorn, 2001).

A respeito do remodelamento ventricular após 15 dias do IAM, verificou-se um aumento da hipertrofia cardíaca nos grupos infartados tratados em comparação aos grupos IM e SHAM. Entretanto, os grupos infartados tratados com os hormônios da tireoide apresentaram uma hipertrofia mais acentuada em relação ao grupo infartado tratado apenas com o carvedilol. A hipertrofia cardíaca foi verificada nos grupos tratados através do aumento do peso do coração, do peso do VE e dos índices de hipertrofia (peso do coração/peso corporal, peso do coração/comprimento da tibia, peso do VE/peso corporal, peso do VE/comprimento da tibia). Ainda, embora o grupo IM tenha apresentado um aumento dos índices de hipertrofia, peso do coração/peso corporal e peso do VE/peso corporal, esses dados sozinhos não indicam uma hipertrofia cardíaca, pois este aumento se deve provavelmente à redução do peso corporal verificada nesse mesmo grupo e não de fato pelo aumento da massa cardíaca. Os outros índices de hipertrofia cardíaca, peso do coração/comprimento da tibia e peso do VE/comprimento da tibia, são considerados os índices mais fidedignos de hipertrofia, uma vez que leva em consideração o comprimento da tibia como padrão normalizador que não se altera muito entre os grupos (Yin et al., 1982). Logo, como o grupo IM não apresentou diferença nestes índices em relação ao grupo SHAM, isso fortalece a afirmação que de fato não houve hipertrofia significativa no coração dos animais deste grupo. Embora após o IAM ocorra a ativação de todos os componentes do sistema neurohumoral, e isso seja considerado um importante fator na indução da hipertrofia cardíaca (Singal et al., 1999), não foi observado tal evento adaptativo pós-infarto no grupo IM. Isso se deve provavelmente ao curto tempo de exposição ao IAM (15 dias) proposto neste

trabalho, o qual tenha sido um período muito recente para ocorrer a hipertrofia adaptativa. Adicionalmente, é importante discutir a causa da hipertrofia cardíaca induzida por cada tratamento isoladamente, antes de discutir os efeitos desta hipertrofia no coração pós-infarto. No caso do carvedilol, não era esperado que o mesmo induzisse uma hipertrofia cardíaca, uma vez que a partir do seu efeito α e β -bloqueador seria esperada uma redução dessa hipertrofia. Essa redução ocorreria, visto que já foi descrito na literatura a capacidade das catecolaminas de induzirem o processo de hipertrofia no miocárdio (Scheuer, 1999). Portanto, teoricamente, o carvedilol com seu efeito α e β -bloqueador, diminuindo a ação das catecolaminas no miocárdio, seria capaz de prevenir o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Porém, isso não foi o observado neste trabalho e nem em alguns outros estudos (Sia et al., 2002). Sia e colaboradores, também verificaram um quadro de hipertrofia no coração de ratos infartados tratados com carvedilol e sugeriram que isso fosse decorrente da redução da apoptose dos cardiomiócitos (Sia et al., 2002). Essa hipótese foi, posteriormente, suportada por estudos a respeito da capacidade do carvedilol em reduzir a apoptose no miocárdio de ratos infartados (Zhang et al., 2013; Yeh et al., 2013). Além da redução da apoptose, outras ações do carvedilol já relatadas como a diminuição da sinalização para o processo inflamatório, do tônus adrenérgico, do processo fibrótico, do estresse oxidativo e do estresse de parede (Feuersteins et al., 1998; Nakamura et al., 2002; Li et al., 2006), podem contribuir, também, para o aumento da massa cardíaca, uma vez que estas ações colaboram para maior sobrevivência dos cardiomiócitos. Portanto, a hipertrofia cardíaca induzida pelo carvedilol provavelmente esteja associada a estes estímulos que favorecem, a sobrevivência do miocárdio remanescente. Diferentemente, a hipertrofia cardíaca induzida pelos HT decorre do aumento da síntese proteica total. Destaca-se a capacidade desses hormônios de modularem, principalmente, a expressão das isoformas da cadeia pesada da miosina (ex.: aumento da expressão da α -MHC e diminuição da expressão da β -MHC) e das proteínas de manejo do cálcio (ex.: elevação da expressão da SERCA2), bem como sua capacidade de prevenir a ativação da programação gênica fetal (Nicolini et al., 2013). Pantos e colaboradores discutem muito o papel dos HT no remodelamento do miocárdio após o IAM através da sua capacidade de ativar várias vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento da hipertrofia fisiológica. Isso vem associado a sua capacidade de

prevenir a instalação do padrão gênico fetal, de normalizar a tensão de parede e de otimizar a geometria da câmara cardíaca (Pantos et al., 2010a). Cabe salientar, que em um período mais precoce pós-infarto, estudos anteriores também já verificaram a presença de hipertrofia no coração de ratos infartados tratados com os HT (Pantos et al., 2007; de Castro et al., 2016). Sendo assim, ambos os tratamentos, tanto isolados quanto na co-administração, promoveram a instalação de um quadro de hipertrofia cardíaca em um período inicial de 15 dias após o IAM, enquanto o mesmo não foi observado no grupo infartado não tratado. A hipertrofia cardíaca induzida por ambos tratamentos, de acordo com estudos anteriores, parece se tratar de um hipertrofia benéfica para o coração após IAM e pode estar envolvida na melhora funcional apresentada nos grupos infartados tratados. A respeito dos dados morfométricos de congestão pulmonar e hepática, não foi possível observar diferença significativa entre os grupos. Isso também já foi observado em trabalhos anteriores para um período experimental semelhante ao do presente estudo (de Castro et al., 2016). Por fim, referente à mudança de peso dos animais, foi possível verificar uma redução do peso corporal nos ratos dos grupos IM, IM+HT e IM+C+HT em relação ao grupo SHAM. Isso é reconhecido já na literatura como consequência do quadro pós-IAM (Faria et al., 2011). Entretanto, o carvedilol foi capaz de prevenir essa redução do peso corporal no grupo IM+C.

Por conseguinte, para a determinação da função cardíaca, foram avaliados parâmetros ecocardiográficos e hemodinâmicos 14 e 15 dias após o IAM, respectivamente. A respeito dos dados ecocardiográficos, primeiramente, foi observada a área de infarto dos animais dos grupos infartados. Identificou-se a existência de uma homogeneidade da área de infarto entre os grupos, indicando uma reprodutibilidade do método cirúrgico utilizado para induzir o modelo de IAM. A média da área de infarto entre grupos ficou aproximadamente em torno de 51,7%, podendo ser então considerado uma área de infarto grande para ratos Wistar machos (Pfeffer et al., 1979). Pfeffer e colaboradores determinaram que apenas infartos envolvendo mais de 46% de área do ventrículo esquerdo resultariam em comprometimento da função ventricular no estado basal (Pfeffer et al., 1979). Portanto, neste modelo animal de IAM é interessante ter a presença de uma área de infarto mais extensa para que se tenha uma reprodutibilidade dos sintomas clínicos de disfunção ventricular nos animais. Já a respeito dos diâmetros e das áreas do VE

na sístole e na diástole, foi possível observar um aumento desses parâmetros em todos os grupos infartados. Isso indica uma dilatação da câmara ventricular esquerda, a qual é característica após o IAM (Zornoff et al., 2008). Nenhum dos tratamentos administrados foi capaz de reverter esta dilatação. Estudos anteriores em ratos infartados tratados com carvedilol (Sia et al., 2002), e com os HT (de Castro et al., 2016), também demonstraram resultados semelhantes, corroborando que esses tratamentos não parecem ser capazes de reduzir a dilatação ventricular. Ainda, nos grupos infartados verificou-se um aumento do volume diastólico. Tal dado é um indicativo da sobrecarga de volume sanguíneo que ocorre no coração infartado, uma vez que contraindo com menor força, esse coração ejeta menos, resultando em um maior volume de sangue nos ventrículos durante a diástole. Após a administração dos tratamentos, não foi possível, no entanto, verificar a capacidade de reduzir esse aumento do volume diastólico. Quanto ao débito cardíaco, foi observado um aumento em todos os grupos infartados em relação ao grupo SHAM. Isso é decorrente da concomitante elevação do débito sistólico, também verificado nesses grupos. No caso dos animais infartados tratados, estes achados provavelmente estão associados ao aumento da hipertrofia cardíaca e da contratilidade (dP/dt máxima aumentada) e, no caso dos grupos IM+HT e IM+C+HT, também ao aumento da frequência cardíaca. Portanto, esses fatores podem justificar o aumento do débito sistólico e, conseqüentemente, do débito cardíaco nos grupos infartados tratados. Quanto à fração de encurtamento, essa baseia-se na relação entre os diâmetros transversais de ventrículo esquerdo, obtidos no final da diástole e final da sístole (Graziosi, 1998). Após o IAM, este parâmetro tende a diminuir devido à dilatação ventricular e à redução da força de contração (Galrinho et al., 2015). Com isso, todos os grupos infartados apresentaram essa redução em relação ao grupo SHAM, e nenhum dos tratamentos foi capaz de reverter esse parâmetro. Entretanto, tanto os tratamentos com carvedilol e com HT, como a co-administração, foram capazes de melhorar a fração de ejeção, a espessura da parede posterior na sístole e o índice de tensão de parede em relação ao grupo IM. Quanto à fração de ejeção (FE), essa tende a reduzir após o IAM, justamente pela diminuição da força de contração (Galrinho et al., 2015). Essa redução da FE foi verificada, de fato, em todos os grupos infartados em relação ao grupo SHAM, porém, apenas os grupos tratados foram capazes de aumentar a FE em relação ao grupo IM. Entretanto, o aumento da FE nos grupos IM+C e IM+C+HT foi maior em relação ao grupo IM+HT.

Já foi verificada, em estudos anteriores, essa capacidade tanto do carvedilol (Nakamura et al., 2002; Doughty et al., 2004), quanto dos HT (Pantos et al., 2007; de Castro et al., 2018) em melhorar a FE. Quanto ao índice de tensão de parede, esse é definido como a relação: Diâmetro diastólico do VE/2xEspessura da parede posterior do VE (Pantos et al., 2008b). Após o IAM, esse índice tende a aumentar no coração infartado, devido à dilatação ventricular e à perda da espessura de parede. Isso foi verificado nos grupos IM e IM+HT, porém o grupo IM+HT apresentou uma redução desse índice em relação ao grupo IM, o que já foi verificado em estudos anteriores (Pantos et al., 2008b). Diferentemente, nos grupos IM+C e IM+C+HT foi verificada uma prevenção desse aumento do índice de tensão de parede, de forma que não foram diferentes do grupo SHAM. Portanto, o carvedilol parece ter sido mais eficaz em melhorar estes dois parâmetros, fração de ejeção e o índice de tensão de parede, em relação ao tratamento com apenas os HT. Ainda, após o infarto, todos os tratamentos foram eficazes em prevenir a perda da espessura de parede posterior na sístole (EPPS) verificada no grupo IM. Após o IAM, o miocárdio remanescente é exposto ao processo inflamatório, à ativação de vias de morte celular, à fibrose, entre outros mecanismos, que colaboram para a diminuição da viabilidade dos cardiomiócitos (Zornoff et al., 2008). Portanto, é esperada uma redução da EPPS após o IAM, como foi verificado no grupo IM. Entretanto, o mesmo não foi observado nos grupos infartados tratados. A prevenção da perda da EPPS nesses grupos e, conseqüentemente, o aumento desse parâmetro em relação ao grupo IM, provavelmente se deve ao aumento da hipertrofia cardíaca encontrado nestes grupos. Isso indica uma maior camada de tecido muscular disponível para auxiliar na contração e no relaxamento do coração durante o trabalho cardíaco. Dessa forma, o aumento da EPPS pode estar colaborando para a melhora da fração de ejeção verificada nos grupos infartados tratados, bem como para a diminuição do índice de tensão de parede, uma vez que auxilia na diminuição do estresse parietal. Com relação à mudança da área fracional (MAF), essa é determinada pela fórmula: $\text{área no final da diástole} - \text{área no final da sístole} / \text{área no final da diástole} \times 100$ (Schiller et al., 1989). Após o IAM, devido à redução da contratilidade cardíaca, a MAF diminuiu. Essa redução da MAF foi observada nos grupos infartados em relação ao grupo SHAM. Entretanto, os grupos infartados tratados com carvedilol (IM+C e IM+C+HT) apresentaram um aumento da MAF em relação aos grupos IM e IM+HT. Esse aumento é um indicativo de melhor contratilidade, uma vez que o coração gera

uma maior diferença de área entre sístole e a diástole. Quanto ao volume sistólico final, como o coração infartado tem força de contração reduzida e consequentemente menor fração de ejeção (Galrinho et al., 2015), o mesmo acaba retendo maior volume de sangue no final da sístole. Essa retenção causa uma sobrecarga de volume na câmara ventricular após o infarto. Quanto a este aumento do volume sistólico final, apenas os grupos tratados com carvedilol, IM+C e IM+C+HT, apresentaram uma redução, indicando menor sobrecarga de volume sanguíneo no VE. Já analisando o grupo IM+C+HT, esse apresentou todos os mesmos efeitos sobre os parâmetros ecocardiográficos que os grupos IM+HT e IM+C. Ainda, foi possível verificar que o tratamento com o carvedilol foi capaz de melhorar mais parâmetros funcionais ecocardiográficos no coração pós-infarto, quando comparado ao tratamento isolado com os HT. Também, é importante ressaltar que o grupo IM+C+HT não apresentou efeito sinérgico sobre nenhum parâmetro ecocardiográfico avaliado neste trabalho.

Já a respeito dos dados hemodinâmicos da função cardíaca, coletados 15 dias após o IAM através do cateterismo ventricular, foi verificada uma melhora em todos os parâmetros funcionais nos grupos infartados tratados em relação ao grupo IM. Os grupos tratados não foram diferentes do grupo SHAM em relação a estes parâmetros. Em relação à pressão sistólica do VE, verificou-se uma redução no grupo IM em relação ao grupo SHAM, o que decorre da diminuição da força de contração após o IAM, devido à perda de parte do tecido muscular cardíaco. Entretanto, nenhum dos grupos infartados tratados apresentou essa redução, o que provavelmente deve estar relacionado com o aumento da hipertrofia cardíaca verificada nesses grupos. Isso colabora para uma maior força de contração durante a sístole, permitindo, então, a geração dessa maior pressão sistólica no VE. Já em relação à pressão diastólica final do VE, observou-se um aumento no grupo IM em comparação ao grupo SHAM. Esse aumento ocorreu devido à sobrecarga de volume no VE. Como após o infarto, houve um aumento do volume diastólico final, esse processo levou a um aumento da pressão dentro do ventrículo durante a diástole. Ambos os tratamentos foram capazes de reverter esse aumento. Quanto às derivadas de pressão-tempo (dP/dt máxima ou positiva; dP/dt mínima ou negativa), considera-se a dP/dt máxima um índice de contratilidade, e a dP/dt mínima um índice de relaxamento (Okoshi e Tucci, 1996). Por conseguinte, verificou-se uma

redução de ambos os índices no grupo IM, ou seja, uma piora da contratilidade e do relaxamento neste grupo. Enquanto, os grupos infartados tratados não apresentaram esta piora, de modo que não foram diferentes do grupo SHAM. Todos estes dados hemodinâmicos da função cardíaca verificados neste trabalho corroboram com resultados prévios, que demonstram os efeitos benéficos tanto do carvedilol (Sia et al., 2002; Li et al., 2006; Sun et al., 2005), quanto com os HT (de Castro et al., 2016; Pantos et al., 2007), isoladamente. Ainda, é importante ressaltar, que não foi verificado um efeito sinérgico no grupo IM+C+HT para nenhum destes parâmetros hemodinâmicos.

Com relação à frequência cardíaca, verificada pelo cateterismo ventricular, observou-se um aumento nos grupos infartados tratados com os HT (IM+HT e IM+C+HT) em comparação a todos os outros grupos. Esse dado já foi demonstrado em estudos anteriores nos quais os HT foram utilizados como tratamento para o IAM na mesma dose utilizada neste trabalho (de Castro et al., 2014; Pantos et al., 2008b). Este aumento da frequência cardíaca já é esperado devido ao efeito cronotrópico positivo desses hormônios, o qual está associado elevação da sensibilidade adrenérgica e, conseqüentemente, da capacidade de resposta do tecido cardíaco às catecolaminas circulantes (Kahaly e Dillmann, 2005). Isso se deve tanto ao fato dos HT induzirem o aumento da expressão (*up-regulation*) dos receptores beta-adrenérgicos no tecido cardíaco (Williams et al., 1977; Bahouth et al., 1997), como ao seu envolvimento na alteração de elementos de sinalização da cascata beta-adrenérgica, como proteínas G e adenilato ciclase (Kim et al., 2004; Stiles e Lefkowitz, 1981; Carvalho-Bianco, et al., 2004). Entretanto, o grupo IM+C+HT apresentou uma redução da frequência cardíaca em relação ao grupo IM+HT. Isso demonstra, conseqüentemente, a capacidade betabloqueadora do carvedilol em reduzir a frequência cardíaca através do bloqueio da atividade simpática (via bloqueio dos receptores β_1 e β_2) (Dulin e Abraham, 2004). Embora o carvedilol não tenha reduzido a frequência cardíaca aos níveis normais no grupo IM+C+HT, esses dados confirmam uma das hipóteses deste trabalho referente à capacidade do carvedilol de reduzir, mesmo que parcialmente, a estimulação adrenérgica provocada pelos HT durante o tratamento após o IAM. Isso pode representar uma estratégia importante para visar a preservação da função cardíaca durante o tratamento com HT. Quanto aos outros grupos infartados, IM e IM+C, não

foi possível verificar alteração da frequência cardíaca em relação ao grupo SHAM. Sabe-se que um dos subseqüentes eventos após o IAM é a ativação de diversos componentes do sistema neurohumoral (Rouleau, 1991). Dentre os efeitos deletérios dessa ativação neurohumoral estão: arritmias ventriculares, taquicardia, redução da perfusão do miocárdio isquêmico, aumento da pressão de enchimento ventricular, elevação da impedância aórtica (índice da pós-carga), aumento do consumo de oxigênio e redução da excreção de água e sódio (Cohn, 1990). Portanto, a taquicardia é apenas um dos sintomas que podem ser verificados após o IAM. Com isso, os grupos IM e IM+C podem não ter apresentado elevação da frequência cardíaca, porém podem ter exibido outros efeitos deletérios da ativação neurohumoral não avaliados neste trabalho.

Por fim, neste trabalho também foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo, uma vez que as ERO contribuem para o pior prognóstico após o IAM e, conseqüentemente, para a progressão para a insuficiência cardíaca (Zhang et al., 2012). A respeito dos níveis das ERO, apenas os grupos IM e IM+C apresentaram aumento dos níveis das ERO, enquanto os grupos IM+HT e IM+C+HT não foram diferentes do grupo SHAM. Esses dados revelam que após o IAM há uma elevação dos níveis das ERO, o que já está bem estabelecido na literatura (Hill e Singal, 1996; Hori e Nishida, 2009). No entanto, o tratamento com carvedilol não foi capaz de reduzir essa elevação. Isso difere dos dados de estudos anteriores que relatam sobre a capacidade antioxidante do carvedilol (Dulin e Abraham, 2004; Feuerstein et al., 1998), bem como sobre sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo após o IAM (Zhuang et al., 2009). Entretanto, uma possível explicação para o fato do carvedilol não ter exercido sua capacidade antioxidante pode estar relacionado com a questão da dose de administração utilizada neste estudo e ao curto tempo de tratamento. A dose do carvedilol de 2mg/kg/dia é considerada uma dose baixa deste fármaco (Sun et al., 2005). Essa dose foi escolhida a partir do estudo de Sun e colaboradores, no qual eles avaliaram que uma baixa dose de carvedilol (2 mg/kg/dia) possui uma maior eficácia em relação a dose maiores de carvedilol em melhorar alguns parâmetros de remodelamento ventricular e de função cardíaca. No entanto, nesse estudo citado não foram avaliados parâmetros de estresse oxidativo (Sun et al., 2005). O carvedilol mostra sua capacidade antioxidante em humanos tratados com doses moderadas de 25 mg/dia (Feuerstein et al., 1998). Em pacientes

com cardiomiopatia dilatada, foi demonstrado a capacidade do carvedilol de reduzir o estresse oxidativo utilizando-se uma dose média diária de 22 ± 8 mg/dia em período de tratamento de 9 ± 4 meses (Nakamura et al., 2002). Zhuang e colaboradores verificaram uma redução do estresse oxidativo em ratos infartados tratados com carvedilol, por 4 semanas, na dose de 10 mg/kg/dia em relação ao grupo infartado não tratado (Zhuang et al., 2009). Portanto, com esses estudos, pode-se suportar o fato de que capacidade antioxidante do carvedilol esteja associada com a dose administrada e o tempo de tratamento. Diferentemente, o tratamento com os HT parece ter sido capaz de prevenir o aumento das ERO nos grupos IM+HT e IM+C+HT. Essa capacidade de reduzir o estresse oxidativo após o IAM já foi verificada na literatura (de Castro et al., 2014). Ainda, é importante ressaltar que a co-administração revelou um efeito sinérgico positivo sobre os níveis das ERO, uma vez que foi observada a redução desses níveis no grupo IM+C+HT em relação aos grupos IM e IM+C. Concomitantemente a este resultado dos níveis de ERO, a análise dos níveis de sulfidrila revelou uma redução nos grupos IM e IM+C em relação ao grupo SHAM. Sabe-se que o grupamento sulfidrilado basicamente determina a capacidade redutora da glutatona (GSH), um antioxidante não enzimático. A diminuição dos níveis do grupamento sulfidrilado no tecido cardíaco pode estar associada ao alto nível de ERO verificado nesses mesmos grupos, uma vez que o grupamento sulfidrilado é susceptível à ação das ERO (Rudyk e Eaton, 2014). Para confirmar a associação entre esses dois parâmetros foi feita uma correlação de Pearson, a qual determinou uma correção negativa significativa entre os níveis de sulfidrilado e de ERO. Portanto, quando os níveis de ERO se encontram elevados, isso está associado à redução dos níveis de sulfidrila (e vice-versa), como foi observado nos grupos IM e IM+C. Já os grupos infartados tratados com os HT (IM+HT e IM+C+HT) não apresentaram alterações no nível de sulfidrilado em relação ao SHAM. Por conseguinte, os HT parecem ter sido capazes de prevenir tanto o aumento das ERO quanto a redução dos grupamentos sulfidrila. Esse dado, até o presente momento, é inédito na literatura. No entanto, o mecanismo pelo qual os HT protegem a degradação do grupamento sulfidrilado pelas ERO ainda precisa ser melhor elucidado. Adicionalmente, assim como o tratamento com o carvedilol foi capaz de melhorar mais parâmetros funcionais ecocardiográficos, o tratamento com os HT foi capaz de melhorar a homeostase redox no coração pós-infarto mediante essa redução das ERO e manutenção dos níveis de sulfidrila nos grupos IM+HT e

IM+C+HT. Tais dados não foram encontrados no grupo tratado apenas com carvedilol. Quanto à peroxidação lipídica, verificou-se um aumento dos níveis de TBARS em todos os grupos infartados em relação ao grupo SHAM. Já é bem estabelecida a ocorrência da peroxidação lipídica no tecido cardíaco após o IAM decorrente do concomitante aumento da geração das ERO (Hori e Nishida, 2009). Entretanto, nenhum dos tratamentos foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica após 15 dias do IAM. Esse achado provavelmente deve-se ao curto período de tratamento utilizado neste estudo. No caso do carvedilol, os dados na literatura, a respeito da peroxidação lipídica, são conflitantes. Zhuang e colaboradores trataram ratos infartados por um período de 4 semanas utilizando a dose de 10 mg/kg/dia e verificaram redução da peroxidação lipídica nesses animais em relação aos animais infartados não tratados (Zhuang et al., 2009). Todavia, Sia e colaboradores, embora também tenham tratado os animais infartados por 28-30 dias em uma dose maior de carvedilol (20 mg/kg/dia), tiveram resultados semelhantes ao presente estudo, de forma que também não verificaram redução da peroxidação lipídica nos ratos infartados tratados com carvedilol (Sia et al., 2002). Com relação ao tratamento com os HT, de Castro e colaboradores avaliariam os efeitos dos HT sobre a peroxidação lipídica em um período de 28 (de Castro et al., 2014) e 14 dias (de Castro et al., 2016) após o IAM, de modo que foi possível verificar a redução da peroxidação lipídica apenas no período de 28 dias de tratamento. Já a respeito dos dados referentes às defesas antioxidantes, foi observado que o sistema antioxidante enzimático (CAT, SOD e GPx) não foi alterado em nenhum dos grupos estudados. Após o IAM, Hill e Singal demonstraram que a atividade dessas enzimas se altera ao longo do tempo (1, 4, 8 e 16 semanas pós-infarto). Eles verificaram que a CAT e a GPx apresentam uma queda da sua atividade apenas a partir da 4ª semana, enquanto a SOD diminui sua atividade só a partir da 16ª semana (Hill e Singal, 1996). Portanto, esses dados podem explicar por que nenhum dos grupos infartados do presente trabalho apresentou alteração da atividade dessas enzimas antioxidantes. Quanto ao sistema de defesa antioxidante não-enzimático, avaliou-se neste trabalho a concentração da GSH, da GSSG e da razão GSH/GSSG. Quanto à concentração de GSH, houve uma redução grupo IM+C em relação aos grupos SHAM e IM. Esse resultado é inesperado, visto que na literatura é descrita a capacidade antioxidante do carvedilol, a qual incluiria o aumento dos níveis da glutathiona (Feuerstein et al., 1998). Uma possível explicação para esse achado pode

estar relacionada com o fato de o carvedilol ser um xenobiótico. Portanto, uma vez que a GSH possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos (Huber et al., 2008), talvez a redução dos níveis de GSH no grupo IM+C seja um indício do maior consumo da GSH para eliminar o carvedilol. No entanto, está hipótese ainda necessita ser avaliada. Já os níveis de GSH nos grupos IM e IM+HT não foram diferentes do grupo SHAM. O grupo IM+C+HT apresentou uma elevação desses níveis em relação ao grupo SHAM, IM e IM+C, não sendo diferente do grupo IM+HT. Portanto, os HT parecem ter uma capacidade de conservar e/ou elevar os níveis de GSH. Com relação à concentração da GSSG, todos os grupos infartados tratados apresentaram uma redução dos níveis de GSSG. Por fim, a razão GSH/GSSG foi utilizada para estimar o estado redox nos cardiomiócitos. A respeito dessa, verificou-se um aumento apenas no grupo IM+C+HT. Uma vez que essa razão é um importante índice do balanço redox celular (de Castro et al., 2014), este resultado indica um efeito sinérgico positivo dos HT e do carvedilol, sobre esse balanço. Importante salientar que esse efeito positivo foi apenas encontrado no grupo que recebeu a co-administração, não sendo observado nos grupos que receberam os tratamentos isolados.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo revelou, pela primeira vez, que a co-administração do betabloqueador carvedilol e dos hormônios da tireoide foi capaz de melhorar o remodelamento ventricular e a função cardíaca após o infarto agudo do miocárdio. Ainda, o carvedilol foi capaz de exercer seu efeito betabloqueador no grupo IM+C+HT, uma vez que reduziu a frequência cardíaca aumentada pelos hormônios da tireoide. Além disso, a co-administração apresentou um efeito sinérgico positivo nos parâmetros de estresse oxidativo, especificamente, sobre os níveis de ERO e o balanço redox através da razão GSH/GSSG, dessa forma preservando a homeostase redox do tecido cardíaco (Figura 12). Com isso, esses resultados indicam que a co-administração do carvedilol, um fármaco já utilizado na clínica, com os HT, uma terapia ainda em testes clínicos, pode representar uma estratégia terapêutica capaz de prevenir o remodelamento mal adaptativo e as alterações funcionais e bioquímicas após o IAM.

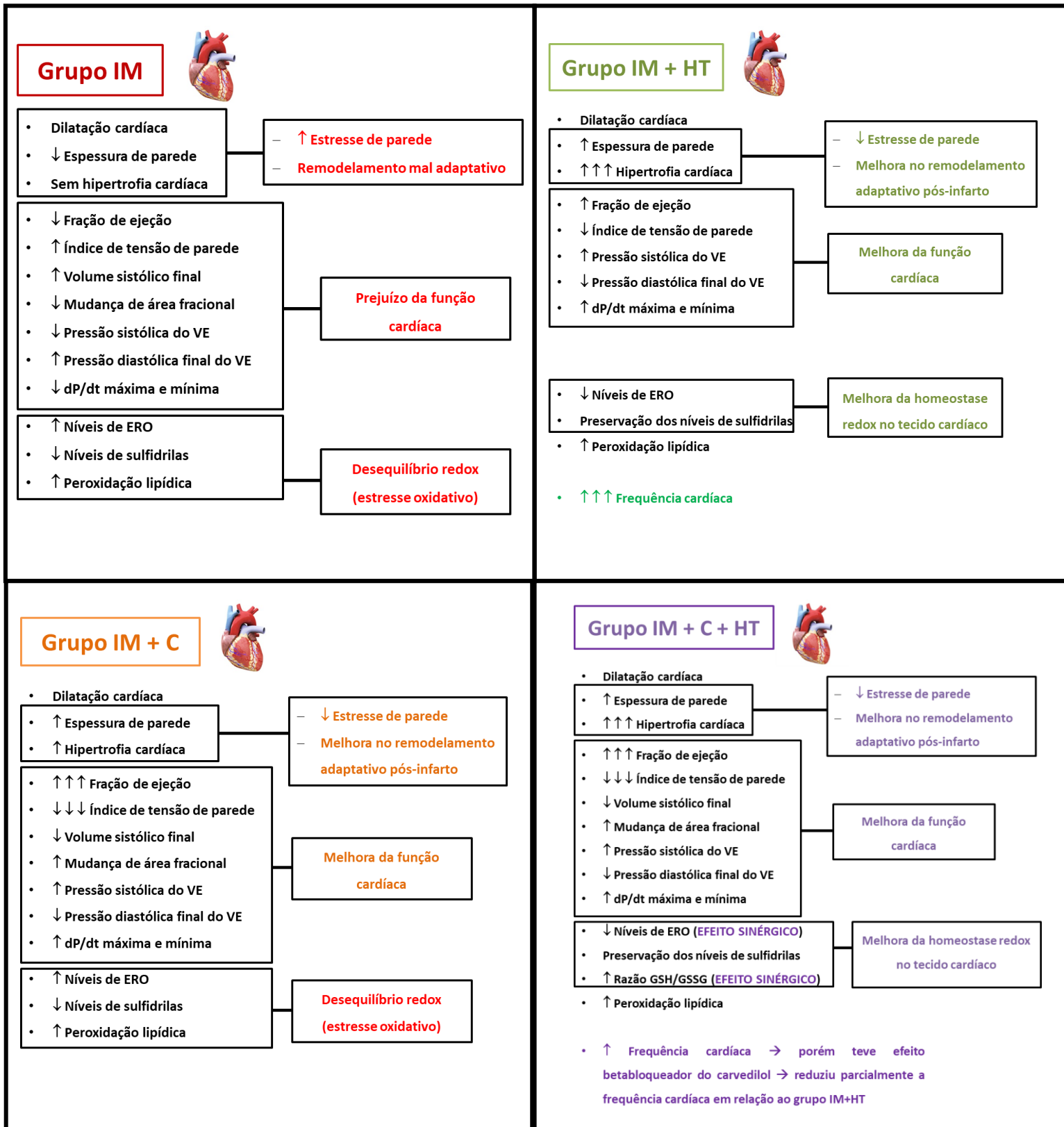


Figura 12. Resumo esquemático dos resultados deste trabalho. IM (infarto do miocárdio), C (carvedilol), HT (hormônios da tireoide), VE (ventrículo esquerdo), dP/dt (derivada pressão tempo) ERO (espécies reativas de oxigênio), GSH (glutaciona reduzida), GSSG (glutaciona oxidada), ↑ (aumento), ↓ (diminuição).

8 PERSPECTIVAS

Neste trabalho, foram avaliados os efeitos da co-administração do betabloqueador carvedilol e dos HT após o IAM sobre parâmetros morfométricos, funcionais e de estresse oxidativo. Como perspectivas, seria interessante também avaliar outros mecanismos que estão diretamente envolvidos no pior prognóstico após o IAM como a apoptose, a inflamação e a fibrose, buscando entender qual o efeito da co-administração sobre esses mecanismos. Ainda, seria interessante avaliar o envolvimento de proteínas transportadoras da glutatona e de seus conjugados (ex.: proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR)), como possível responsável pelos efeitos dos HT e do carvedilol, uma vez que essas proteínas são expressas no coração e estão envolvidas no controle da cardiocitotoxicidade/estado redox celular. Avaliar o envolvimento do sistema renina-angiotensina-aldosterona nos efeitos do carvedilol e dos HT também seria interessante como forma de estudar esse componente do sistema neurohumoral ativado em situações pós-IAM.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERBOOM, T.; SIES, H. Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 373–382, 1981.
- AKGÜLLÜ, Ç. et al. The usefulness of carvedilol and nebivolol in preventing contrast nephropathy in rats. **Renal Failure**, v. 6049, p.1–7, 2015.
- AKSENOV M.Y, MARKESBERRY W.R. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141–145, 2001.
- AVEZUM, A. et al . III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 83, supl. 4, p. 1–86, 2004.
- AZEVEDO, P. S. et al. Remodelação Cardíaca: Conceitos, Impacto Clínico, Mecanismos Fisiopatológicos e Tratamento Farmacológico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106, n. 1, p. 62–69, 2016.
- BABU, R. H.; RAJU, R. N. Development of dissolution medium for carvedilol tablets. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, n. 5, p. 931–933, 2009.
- BAHOOUTH, S. W. et al. Thyroid Hormone Induces Beta1-Adrenergic Receptor Gene Transcription Through a Direct Repeat Separated by Five Nucleotides. **J Mol Cell Cardiol**, v. 29, p. 3223–3237, 1997.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito , implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BASSETT, J. H. D.; HARVEY, C. B.; WILLIAMS, G. R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 213, p. 1–11, 2003.
- BAUER, M. et al. The Thyroid-Brain Interaction in Thyroid Disorders and Mood Disorders. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, p. 1101–1114, 2008.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxyxynitrite: the good, the bad, and ugly. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v. 271, p. C1424–C1437, 1996.
- BIANCHI, M. DE L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.

BILEZIKIAN, J. P.; LOEB, J. N. The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on α - and β -adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. **Endocrine Reviews**, v. 4, n. 4, p. 378–388, 1983.

BILLON, C. et al. TR α protects against atherosclerosis in male mice: identification of a novel anti-inflammatory property for TR α in mice. **Endocrinology**, v. 155, n. 7, p. 2735–2745, 2014.

BLANKESTEIJN, W. M. et al. Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. **Acta Physiol Scand**, v. 173, p. 75–82, 2001.

BOATENG, S.; SANBORN, T. Acute myocardial infarction. **Disease-a-Month**, v. 59, n. 3, p. 83–96, 2013.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D. The Role of Antioxidant Micronutrients in the Prevention of Diabetic Complications. **Treat Endocrinol**, v. 3, n. 1, p. 41–52, 2004.

BORTOLOTTI, L. A.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M. Betabloqueadores adrenérgicos. **Rev Bras Hipertens**, v. 16, n. 4, p. 215–220, 2009.

BOVERIS A.; CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem J**, v. 134, n. 3, p. 707–16, 1973.

BRIX, K.; FÜHRER, D.; BIEBERMANN, H. Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives. **Thyroid Research**, v. 4, n. Suppl 1, p. 1–6, 2011.

CAMAROZANO, A. et al. Diretrizes das Indicações da Ecocardiografia. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, n. 6 supl.3, p. e265–e302, 2009.

CANTIN, A. M. Potential for antioxidant therapy of cystic fibrosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 10, p. 531–536, 2004.

CAPRICORN, I. Effect of carvedilol on outcome after myocardial infarction in patients with left-ventricular dysfunction: the CAPRICORN randomised trial. **Lancet**, v. 357, p. 1385–1390, 2001.

CARVALHO-BIANCO, S. D. et al. Chronic Cardiac-Specific Thyrotoxicosis Increases Myocardial β -Adrenergic Responsiveness. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 7, p. 1840–1849, 2004.

COHN, J. N. Neuroendocrine Activation After Acute Myocardial Infarction. **THE AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY**, v. 65, p. 281–311, 1990.

COULOMBE, P.; DUSSAULT, J. H.; WALKER, P. Catecholamine metabolism in thyroid disease. II. Norepinephrine secretion rate in hyperthyroidism and hypothyroidism. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 44, p. 1185–1189, 1977.

COULOMBE, P.; DUSSAULT, J. H.; WALKER, P. Plasma catecholamine concentrations in hyperthyroidism and hypothyroidism. **Metabolism**, v. 25, n. 9, p. 973–979, 1976.

DANDONA, P.; GHANIM, H.; BROOKS, D. P. Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. **Journal of Hypertension**, v. 25, n. 4, p. 731–741, 2007.

DATASUS – Ministério da Saúde/Svs – Sistema de informações sobre mortalidade – SIM. Disponível em: www.datasus.gov.br

DAVIS, P. J.; LEONARD, J. L.; DAVIS, F. B. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 29, p. 211–218, 2008.

DE CASTRO, A. L. et al. Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 391, n. 1–2, p. 22–29, 2014.

DE CASTRO, A. L. et al. Thyroid hormones improve cardiac function and decrease expression of pro-apoptotic proteins in the heart of rats 14 days after infarction. **Apoptosis**, v. 21, n. 2, p. 184–194, 2016.

DE CASTRO, A. L. et al. Thyroid hormones decrease the proinflammatory TLR4/NF- κ B pathway and improve functional parameters of the left ventricle of infarcted rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 461, p. 132–142, 2018.

DHALLA, N. S.; TEMSAH, R. M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of Hypertension**, v. 18, n. 6, p. 655–673, 2000.

DOUGHTY, R. N. et al. Effects of Carvedilol on Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction The CAPRICORN Echo Substudy. **Circulation**, v. 109, p. 201–207, 2004.

DULIN, B.; ABRAHAM, W. T. Pharmacology of Carvedilol. **The american journal of cardiology**, v. 93, p. 3B–6B, 2004.

FARIA, T. DE O. et al. Body Weight Loss After Myocardial Infarction in Rats as a Marker of Early Heart Failure Development. **Archives of Medical Research**, v. 42, p. 274–280, 2011.

FERRARI, R. et al. Oxidative Stress During Myocardial Ischaemia and Heart Failure. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 14, p. 1699–1711, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FEUERSTEIN, G. et al. Novel mechanisms in the treatment of heart failure: inhibition of oxygen radicals and apoptosis by carvedilol. **Progress in cardiovascular diseases**, v. 41, n. 1, Supl.1, p. 17–24, 1998.

FLOHÉ L., GUNZLER W.A. Assay of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.105, p.14–121, 1984.

FRANGOIANNIS, N. G. Pathophysiology of Myocardial Infarction. **Comprehensive Physiology**, v. 5, p. 1841–1875, 2015.

FRANKLYN, J. A. et al. Thyroid status in patients after acute myocardial infarction. **Clinical Science**, v. 67, p. 585–590, 1984.

FREEMANTLE, N. et al. Beta Blockade after myocardial infarction: systematic review and meta regression analysis. **British Medical Journal**, v. 318, p. 1730–1737, 1999.

FRIBERG, L. et al. Rapid Down-regulation of Thyroid Hormones in Acute Myocardial Infarction. Is It Cardioprotective in Patients With Angina? **Archives of Internal Medicine**, v. 162, p. 1388, 2002.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 64, p. 97–112, 1995.

FRIESEMA, E. C. H. et al. Identification of Monocarboxylate Transporter 8 as a Specific Thyroid Hormone Transporter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 41, p. 40128–40135, 2003.

GAO, F. et al. Comparison of bisoprolol and carvedilol cardioprotection in a rabbit ischemia and reperfusion model. **European Journal of Pharmacology**, v. 406, p. 109–116, 2000.

GRAHAM, L. N. et al. Time Course of Sympathetic Neural Hyperactivity After Uncomplicated Acute Myocardial Infarction. **Circulation**, v. 106, p. 793–798, 2002.

GRASSI, G.; SERAVALLE, G.; MANCIA, G. Sympathetic activation in cardiovascular disease: evidence , clinical impact and therapeutic implications. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 45, n. 12, p. 1367–1375, 2015.

GRAZIOSI, P. Análise ecocardiográfica da estrutura e da função sistólica ventricular esquerda na hipertensão arterial. **HiperAtivo**, v. 5, n. 2, p. 161–174, 1998.

GRIEVE, D. J. et al. Role of Oxidative Stress in Cardiac Remodelling after Myocardial Infarction. **Heart Lung And Circulation**, v. 13, p. 132–138, 2004.

GUTIÉRREZ, I. R.; MUÑOZ, R. Infarto agudo de miocardio. **Jano: Medicina y humanidades**, v. 63, n. 1444, p. 51–53, 2002.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3ª Edição, Oxford: Clarendon Press, 1999.

HAMILTON, M. A. et al. Altered Thyroid Hormone Metabolism in Advanced Heart Failure. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 16, n. 1, p. 91–95, 1990.

HAMILTON, M. A. et al. Safety and Hemodynamic Effects of Intravenous Triiodothyronine in Advanced Congestive Heart Failure. **The american journal of cardiology**, v. 81, p. 443–447, 1998.

HAMMES, S. R.; DAVIS, P. J. Overlapping nongenomic and genomic actions of thyroid hormone and steroids. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 29, p. 581–593, 2015.

HENNEMANN, G. et al. Plasma Membrane Transport of Thyroid Hormones and Its Role in Thyroid Hormone Metabolism and Bioavailability. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 4, p. 451–476, 2001.

HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and Oxidative Stress Changes during Heart Failure Subsequent to Myocardial Infarction in Rats. **American Journal of Pathology**, v. 148, n. 1, p. 291–300, 1996.

HORI, M.; NISHIDA, K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, v. 81, p. 457–464, 2009.

HU, K. A. I.; GAUDRON, P.; ERTL, G. Long-Term Effects of Beta-Adrenergic Blocking Agent Treatment on Hemodynamic Function and Left Ventricular Remodeling in Rats With Experimental Myocardial - Infarction Importance of Timing of Treatment and Infarct Size. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 31, n. 3, p. 692–700, 1998.

HU, L. W. et al. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 285, p. 1473–1480, 2003.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; DE FÁTIMA, Â. Glutathiona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

IERVASI, G. et al. Low-T3 Syndrome A Strong Prognostic Predictor of Death in Patients With Heart Disease. **Circulation**, v. 107, p. 708–713, 2003.

JOHNS T.N.P.; OLSON B.J. Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals. **Annals of Surgery**, v. 140, p. 675–682, 1954.

KAHALY, G. J.; DILLMANN, W. H. Thyroid Hormone Action in the Heart. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 5, p. 704–728, 2005.

KIM, B.; CARVALHO-BIANCO, S. D.; LARSEN, P. R. Thyroid hormone and adrenergic signaling in the heart. **Arq Bras.Endocrinol.Metabol.**, v. 48, n. 1, p. 171–175, 2004.

KLEIN, I.; OJAMAA, K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 7, p. 501–509, 2001.

KOEPPEN, BRUCE M., STANTON, BRUCE A. **BERNE e LEVY: Fisiologia**. 6ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

KÖHRLE, J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, p. 1853–1863, 2000.

KUPFER, L. E.; BILEZIKIAN, J. P.; ROBINSON, R. B. Regulation of alpha and beta adrenergic receptors by triiodothyronine in cultured rat myocardial cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 334, p. 275–281, 1986.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227–231, 1992.

LI, B. et al. Effects of carvedilol on cardiac cytokines expression and remodeling in rat with acute myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, v. 111, p. 247–255, 2006.

LIBBY P.; BONOW R.O.; MANN D.L.; ZIPES D.P. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine. Ed 8. Saunders Elsevier, 2007.

LLESUY, S.F. et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori**, v.71, n.3, p. 241-249, 1985.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MARC A. PFEFFER; EUGENE BRAUNWALD. Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction Experimental Observations and Clinical Implications. **Circulation**, v. 81, n. 4, p. 1161–1172, 1990.

MARKLUND S. **Pyrogallol autoxidation**. In: Handbook of methods for oxygen radical research. Boca Raton. CRC Press, 243-247, 1985.

MEDICINE, C. New Echocardiographic Protocol for the Assessment of Experimental Myocardial Infarction in Rats. **MAEDICA – a Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 2, p. 85–90, 2015.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 711–760, 1983.

MERCADO, M. G.; SMITH, D. K.; MCCONNON, M. L. Myocardial Infarction: Management of the Subacute Period. **American Family Physician**, v. 88, n. 9, p. 581–588, 2013.

MERCIER J.C. et al. Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular volumes and ejection fraction in children. **Circulation**, v. 65, p. 962–969, 1982.

MIDDLEKAUFF, H. R.; MARK, A. L. The Treatment of Heart Failure: The Role of Neurohumoral Activation. **Internal Medicine**, v. 37, n. 2, p. 112–122, 1998.

MIRANDA, A. et al. Time course of echocardiographic and electrocardiographic parameters in myocardial infarct in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 639–648, 2007.

MORKIN, E. Regulation of myosin heavy chain genes in the heart. **Circulation**, v. 87, p. 1457–1460, 1993.

NERI, M. et al. Cardiac Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines Response after Myocardial Infarction. **Current Vascular Pharmacology**, v. 13, p. 26–36, 2015.

NICOLINI, G. et al. New insights into mechanisms of cardioprotection mediated by thyroid hormones. **Journal of Thyroid Research**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

NOZAWA, E. et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 687–695, 2006.

O'CONNELL, T. D. et al. Cardiac alpha1-adrenergic receptors: novel aspects of expression, signaling mechanisms, physiologic function, and clinical importance. **Pharmacological reviews**, v. 66, p. 308–333, 2014.

OHKAWA H., OHISHI N., YAGI K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annals of Biochemistry**, v.95, p. 351–358, 1979.

OJAMAA, K. et al. Thyroid hormone metabolism and cardiac gene expression after acute myocardial infarction in the rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 279, p. E1319-24, 2000.

OKONKO, D. O.; SHAH, A. M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in CHF. **Nature Reviews Cardiology**, v. 12, n. 1, p. 6–8, 2015.

OKOSHI, K.; TUCCI, P. J. F. Mecanismo de Frank-Starling e a Primeira Derivada Temporal de Pressão Ventricular (DP/DT). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 66, n. 4, p. 233–237, 1996.

OLIVARES, E. L. et al. Thyroid function disturbance and type 3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats - A time course study. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4786–4792, 2007.

OLIVETTI, G. et al. Side-to-Side Slippage of Myocytes Participates in Ventricular Wall Remodeling Acutely After Myocardial Infarction in Rats. **Circulation Research**, v. 67, p. 23–34, 1990.

ORGANIZATION, W. H. The global burden of disease: 2004 update. **Geneva: World Health Organization**, 2008.

PANTOS, C. et al. Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. **Basic Research in Cardiology**, v. 103, n. 4, p. 308–318, 2008b.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone and “cardiac metamorphosis”: Potential therapeutic implications. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 118, p. 277–294, 2008c.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone and myocardial ischaemia. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 109, p. 314–322, 2008a.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone at supra-physiological dose optimizes cardiac geometry and improves cardiac function in rats with old myocardial infarction. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 49–56, 2009.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone at supra-physiological dose optimizes cardiac geometry and improves cardiac function in rats with old myocardial infarction. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 3, p. 49–56, 2009.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. **European Journal of Cardio-thoracic Surgery**, v. 32, p. 333–339, 2007.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone receptor alpha1 downregulation in postischemic heart failure progression: the potential role of tissue hypothyroidism. **Hormone and metabolic research**, v. 42, n. 10, p. 718–724, 2010b.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone receptors alpha1 and beta1 are downregulated in the post-infarcted rat heart: consequences on the response to ischaemia-reperfusion. **Basic Research in Cardiology**, v. 100, p. 422–432, 2005.

PANTOS, C.; MOUROUZIS, I.; COKKINOS, D. V. Rebuilding the post-infarcted myocardium by activating “physiologic” hypertrophic signaling pathways: The thyroid hormone paradigm. **Heart Failure Reviews**, v. 15, p. 143–154, 2010.

PEDERSEN, F. et al. “Low T3-syndrome” in acute myocardial infarction-relationship to beta-adrenergic blockade and clinical course. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 26, p. 669–673, 1984.

PFEFFER, M. A. et al. Myocardial Infarct Size and Ventricular Function in Rats. **Circ**, v. 44, n. 4, p. 503–512, 1979.

PINGITORE, A. et al. Triiodothyronine levels for risk stratification of patients with chronic heart failure. **The American Journal of Medicine**, v. 118, n. 2, p. 132–136, 2005.

PONTES, M. R. N.; LEÃES, P. E. Remodelamento Ventricular: dos Mecanismos Moleculares e Celulares ao Tratamento. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul**, v. 3, n. 13, p. 1–7, 2004.

POOLE-WILSON, P. A. et al. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. **Lancet**, v. 362, p. 7–13, 2003.

REMMEN, H. VAN et al. Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. **Physiol Genomics**, v. 16, p. 29–37, 2003.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.

ROULEAU, J. L. et al. Activation of Neurohumoral Systems Following Acute Myocardial Infarction. **The american journal of cardiology**, v. 68, p. 80D–86D, 1991.

RUDYK, O.; EATON, P. Redox Biology Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. **Redox Biology**, v. 2, p. 803–813, 2014.

SANTOS, R. P. et al. Temperatura de polimerização da resina acrílica odontológica na medula espinhal de ratos Wistar. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, n. 4, p. 865–872, 2012.

SAWYER, D. B. et al. Role of Oxidative Stress in Myocardial Hypertrophy and Failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 34, p. 379–388, 2002.

SCHENKEL, P. C. et al. Time course of hydrogen peroxide – thioredoxin balance and its influence on the intracellular signalling in myocardial infarction. **Experimental Physiology**, v. 97, n. 6, p. 741–749, 2012.

SCHENKEL, P.C. et al. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 341, p. 1-8, 2010.

SCHEUER, J. Catecholamines in Cardiac Hypertrophy. **THE AMERICAN JOURNAL OF CARDIOLOGY**, v. 83, n. 12A, p. 70H–74H, 1999.

SCHILLER, N. B. et al. Recommendations for Quantitation of the Left Ventricle by Two-Dimensional Echocardiography. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 2, n. 5, p. 358–367, 1989.

SHARMA, V. K.; BANERJEE, S. P. alfa-Adrenergic Receptor in Rat. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 15, p. 5277–5279, 1978.

SIA, Y. T. et al. Long-Term Effects of Carvedilol on Left Ventricular Function , Remodeling , and Expression of Cardiac Cytokines After Large Myocardial Infarction in the Rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 39, p. 73–87, 2002.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715–748, 2017.

SINGAL, P. K. et al. Oxidative Stress Status in the Transition of Hypertrophy to Heart Failure. **Heart Failure Reviews**, v. 4, p. 353–360, 1999.

SMIRNOFF, N. L-Ascorbic Acid Biosynthesis. **Vitamins and Hormones**, v. 61, p. 241–266, 2001.

SMITH III, E. F. et al. Cardioprotective Effects of the Vasodilator/Beta-Adrenoceptor Blocker, Carvedilol, in Two Models of Myocardial Infarction in the Rat. **Pharmacology**, v. 44, p. 297–305, 1992.

STILES, G. L.; LEFKOWITZ, R. J. Thyroid hormone modulation of agonist - beta-adrenergic receptor interactions in the rat heart. **Life Science**, v. 28, p. 2529–2536, 1981.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. **Physiol Rev**, v. 84, p. 1381–1478, 2004.

SUN, Y. L. et al. Comparison of low and high doses of carvedilol on restoration of cardiac function and calcium-handling proteins in rat failing heart. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 32, n. 7, p. 553–560, 2005.

THAM, Y. K. et al. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. **Archives of Toxicology**, v. 89, p. 1401–1438, 2015.

TSUTSUI, H. Oxidative Stress in Heart Failure : The Role of Mitochondria. **Internal Medicine**, v. 40, n. 12, p. 1177–1182, 2001.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in myocardial remodelling. **Cardiovascular Research**, v. 81, p. 449–456, 2009.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VIÑA, J. et al. Molecular bases of the treatment of Alzheimer ' s disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 117–123, 2004.

VISSER, W. E. et al. Thyroid hormone transport in and out of cells. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 2, p. 50–56, 2007.

WALLUKAT, G. The β -adrenergic receptors. **Herz**, v. 27, p. 683–690, 2002.

WIERSINGA, W. M.; LIE, K. I.; TOUBER, J. L. Thyroid Hormones in Acute Myocardial Infarction. **Clinical Endocrinology**, v. 14, p. 367–374, 1981.

WILLIAMS, L. T. et al. Thyroid hormone regulation of beta adrenergic receptor number. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 8, p. 2787–2789, 1977.

YEH, C.H. et al. Carvedilol treatment after myocardial infarct decreases cardiomyocytic apoptosis in the peri-infarct zone during cardioplegia-induced cardiac arrest. **Shock**, v. 39, n. 4, p. 343–352, 2013.

YEN, P. M. et al. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 246, p. 121–127, 2006.

YIN, C. P. F. et al. Use of tibia length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 243, n. 12, p. H941–H947, 1982.

ZABLOCKI, D.; SADOSHIMA, J. Angiotensin II and Oxidative Stress in the Failing Heart. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 10, p. 1095–1109, 2013.

ZHANG, Y. et al. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, p. 1531–1540, 2012.

ZHANG, J. et al. Effect of carvedilol on cardiomyocyte apoptosis in a rat model of myocardial infarction: A role for toll-like receptor 4. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45, n. 5, p. 458–463, 2013.

ZHUANG, X. F. et al. Distinctive effects of carvedilol in the non-infarct zone: Remodelling of the ligated rat heart linked to oxidative stress. **The Journal of International Medical Research**, v. 37, p. 1354–1364, 2009.

ZORNOFF, L. A. M. et al. Remodelação Ventricular Pós-Infarto do Miocárdio: Conceitos e Implicações Clínicas. **Arq Bras Cardiol**, v. 92, n. 2, p. 157–164, 2009.