

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE – ICBS
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

**Influência do sistema renina angiotensina na modulação do estado redox,
no balanço autonômico e na hipertrofia cardíaca induzida pelo
hipertireoidismo experimental**

Dhãniel Dias Baraldi

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

PORTO ALEGRE

2012

Dhãniel Dias Baraldi

**Influência do sistema renina angiotensina na modulação do estado redox,
no balanço autonômico e na hipertrofia cardíaca induzida pelo
hipertireoidismo experimental**

Orientador: Prof^o. Dr^o. Alex Sander da
Rosa Araujo

**PORTO ALEGRE
2012**

Agradecimentos

Agradeço a meus pais, por me permitirem ser um pouco como eles.

Ao meu irmão, pela inseparável e indispensável companhia.

Aos meus amigos, pela amizade inabalável.

**Ao meu orientador Alex Sander da Rosa Araujo, pela interminável paciência,
compreensão e conhecimento.**

**A “chefa” Adriane Belló-Klein, por ser minha mãe científica, e me acolher em
seu segundo lar.**

**A Tânia Regina Gatelli Fernandes, pelos conselhos mais necessários, nas
horas mais improváveis.**

A Karina Rabello Casali, pelo inestimável auxílio técnico.

À todos os colegas de laboratório, por suas indispensáveis contribuições.

E aos caminhos da vida, que nos ensinam as maiores lições.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO.....	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Tireóide	12
1.2 Efeitos fisiológicos dos hormônios da tireóide.....	13
1.3 Hipertireoidismo	13
1.4 Efeitos cardiovasculares do hipertireoidismo	14
1.5 Hipertrofia Cardíaca	16
1.6 Balanço Simpato-vagal.....	18
1.7 Hipertireoidismo e sistema renina-angiotensina.....	20
1.8 Espécies ativas de oxigênio	22
2. HIPÓTESE	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivos gerais.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. METODOLOGIA.....	29
4.1 Animais.....	29
4.2 Considerações éticas	29
4.3 Manuseio de reagentes e animais.....	30
4.4 Intervenções.....	30
4.4.1 Indução do Hipertireoidismo.....	30
4.4.2 Tratamento com Losartan	31
4.5 Grupos experimentais	31
4.6 Sequência experimental	31
4.7 Coleta de Sangue.....	32
4.8 Preparo do Homogeneizado de Tecido Cardíaco	32
4.9 Quantificação de proteínas	33
4.10 Dosagem dos hormônios tireoidianos	33
4.11 Morfometria cardíaca.....	33
4.12 Registro da Pressão Aórtica.....	34

4.13 Controle simpato-vagal.....	34
4.14 Medida de peróxido de hidrogênio	35
4.15 Análise por “Western Blot”	35
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA E CÁLCULO DA AMOSTRA	37
6. RESULTADOS	38
6.1 Hormônios da tireóide	38
6.2 Morfometria cardíaca e parâmetros hemodinâmicos.....	39
6.3 Balanço autonômico	40
6.4 Expressão protéica de receptor AT1 e gp91phox	41
6.5 Análise do peróxido de hidrogênio e proteínas redox sensíveis.....	44
6.6 Correlações de Pearson.....	47
7. DISCUSSÃO	49
8. CONCLUSÕES	58
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeitos do T3 no miócito cardíaco.....	15
Figura 2. Formação e degradação das EAO.....	24
Figura 3. Imunoconteúdo do receptor AT1 em tecido cardíaco, em unidades de densidade óptica.....	42
Figura 4. Imunoconteúdo da subunidade gp91phox em tecido cardíaco, em unidades de densidade óptica.....	43
Figura 5. Concentração de H ₂ O ₂ no tecido cardíaco (nmol/g).....	44
Figura 6. Imunoconteúdo do fator de transcrição Nrf-2 em tecido cardíaco, em unidades de densidade óptica.....	45
Figura 7. Imunoconteúdo da enzima HO em tecido cardíaco, em unidades de densidade óptica.....	46
Figura 8. Correlação IHC x H ₂ O ₂	47
Figura 9. Correlação H ₂ O ₂ x gp91phox.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração sérica de hormônios da tireóide nos grupos experimentais.....	38
Tabela 2. Relação peso cardíaco (mg) / comprimento da tíbia (mm) (IHC), frequência cardíaca (bpm) (FC) e pressão aórtica (mm/Hg) (PA).....	39
Tabela 3. Valores da análise espectral no domínio da frequência.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

Ang II: Angiotensina II

CAT: Catalase

EAO: espécies ativas de oxigênio

GPx: Glutathione Peroxidase

HF: *High frequency*

HO: Heme-oxigenase

IHC: Índice de hipertrofia cardíaca

LF: *Low frequency*

Nrf-2: Fator eritróide nuclear 2

PAS: Pressão arterial sistólica

SRA: Sistema Renina Angiotensina

SOD: Superóxido dismutase

SNS: Sistema Nervoso Simpático

SNP: Sistema Nervoso Parassimpático

T3: Triiodotironina

T4: Tetraiodotironina ou tiroxina

TR: Receptor nuclear de hormônio da tireóide

TRE: Elemento responsivo aos hormônios da tireóide

VFC: Variabilidade da frequência cardíaca

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

INFLUÊNCIA DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA NA MODULAÇÃO DO ESTADO REDOX, NO BALANÇO AUTONÔMICO E NA HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA PELO HIPERTIREOIDISMO EXPERIMENTAL

Autor: Dhâniel Dias Baraldi

Orientador: Alex Sander da Rosa Araujo

O hipertireoidismo é uma patologia epidemiologicamente importante, que afeta o sistema cardiovascular de forma proeminente. O estado hipertireoideo pode afetar o metabolismo basal, consumo de O₂ celular, sistema renina angiotensina, assim como, estimular a produção de espécies ativas de oxigênio. Estas alterações produzem consequências morfológicas, funcionais, bioquímicas e moleculares no tecido cardíaco.

A hipertrofia cardíaca, decorrente do hipertireoidismo, instala-se devido a uma série de eventos que sinalizam à proliferação e sobrevivência celular, envolvendo as espécies ativas de oxigênio, a ativação do sistema renina angiotensina cardíaco e o sistema nervoso autonômico.

Neste estudo, bloqueamos o receptor AT1 da angiotensina II para avaliarmos a influência do sistema renina angiotensina cardíaco sobre o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, a participação do balanço autonômico

sobre o coração e o papel das espécies ativas de oxigênio neste processo, em modelo experimental de hipertireoidismo.

Para isto, foram utilizados ratos Wistar machos, pesando cerca de 220g, divididos em 4 grupos experimentais: Controle (C), Losartan (L) (10 mg/Kg de peso corporal/dia, 28 dias, sonda intragástrica) , T4 (12mg/L água de beber, 28 dias), e T4+L. Foram avaliados a massa cardíaca, análise espectral do balanço simpato-vagal, a expressão protéica do receptor AT1 da Angiotensina II e da gp91phox, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), Nrf-2 e Heme-oxigenase-1 (HO-1) no tecido cardíaco.

A hipertrofia cardíaca e o desequilíbrio autonômico induzidos pelo hipertireoidismo foram atenuados no grupo T4+L. Os níveis de H₂O₂, Nrf-2, gp91phox e HO-1 foram elevados no grupo T4, e significativamente reduzidos no grupo T4+L, quando comparados ao grupo Controle. A expressão protéica do receptor AT1 esteve elevada nos dois grupos hipertireoideos.

Os resultados obtidos sugerem que o bloqueio do receptor AT1 promove importante impacto sobre o balanço simpato-vagal e a hipertrofia cardíaca, no hipertireoidismo, sendo as espécies ativas de oxigênio e o sistema Nrf-2/HO-1 possíveis mediadores destas alterações.

Palavras chave: *losartan, sistema renina angiotensina, heme-oxigenase, hormônios da tireóide, hipertrofia cardíaca, análise espectral, espécies ativas de oxigênio.*

ABSTRACT

Hyperthyroidism is an epidemiologic relevant pathology, which substantially affects the cardiovascular system. The hyperthyroid state may affect basal metabolism, O₂ cell consumption, renin-angiotensin system, and increase reactive oxygen species production. Those alterations produce morphological, biochemical, functional and molecular consequences in cardiac tissue.

Hyperthyroidism induced cardiac hypertrophy develops due to a set of events, which signals cell survival and proliferation, including reactive oxygen species, cardiac rennin-angiotensin system, and autonomic nervous system.

In the present study, the role of cardiac renin-angiotensin system on development of hyperthyroidism induced cardiac hypertrophy, and the involvement of autonomic nervous system and reactive oxygen species, were assessed through blockade of angiotensin II receptor AT1.

For that, were used male Wistar rats, weighting about 220g, divided in 4 experimental groups,: Control (C), Losartan (L) (10mg/Kg body weight/day, 28 days, intragastric probe), T4 (12mg/L L-thyroxin in drinking water, 28 days), and T4+L. Cardiac mass, spectral analysis (autonomic balance), hydrogen peroxide (H₂O₂), and myocardial protein expression of angiotensin II receptor (AT1), NADPH oxidase, Nrf-2, and heme-oxygenase-1 (HO-1), were quantified.

Cardiac hypertrophy and autonomic imbalance induced by thyroid hormones were attenuated in the T4+losartan group. The H₂O₂, as well as Nrf-2, gp91phox, AT1 and HO-1 immunocontent were elevated in T4 group. All these effects were attenuated by losartan, except AT1 levels. The overall results suggest that blockade of AT1 receptor lead to relevant impact on autonomic balance and

cardiac hypertrophy, being ROS and Nrf-2/ HO-1 system possible mediators in this alterations in experimental hyperthyroidism.

Key words: *losartan, renin-angiotensin system, heme-oxygenase, thyroid hormones, cardiac hypertrophy, spectral analysis, reactive oxygen species.*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tireóide

A glândula tireóide é composta de um lóbulo direito e um esquerdo, posicionados ântero-lateralmente à traquéia. A unidade funcional da glândula tireóide é o folículo, uma estrutura esférica com cerca de 200 a 300 μm de diâmetro, revestida por uma única camada de células epiteliais (1; 2).

O produto secretório da glândula tireóide consiste nas iodotironinas, ou hormônios da tireóide, uma classe de hormônios formada pelo acoplamento de duas moléculas iodinadas de tirosina. Aproximadamente 90% da produção hormonal da tireóide é de 3,5,3',5'- tetraiodotironina (tiroxina, ou T4), 10% é de 3,5,3'- triiodotironina (T3), e menos de 1% é de 3,3',5'- triiodotironina (T3 reverso, ou rT3). O T4 é principalmente um pró-hormônio, sofrendo ação enzimática nos tecidos periféricos para formar T3. O T3 é a forma mais ativa do hormônio da tireóide. Por fim, o rT3 é a forma inativa (1; 2). Para manter adequadas as concentrações destes hormônios, é necessário um controle de retroalimentação dependente do eixo hipotálamo - hipófise (1; 2).

Os hormônios da tireóide exercem seus efeitos por meio de dois mecanismos de ação: clássico e não-clássico. No mecanismo de ação clássico, ocorre a ligação dos hormônios aos seus receptores nucleares (TR's), este complexo hormônio-receptor age como fator de transcrição na regulação da expressão gênica (3). Por outro lado, o mecanismo não clássico ocorre por intermédio de receptores localizados na membrana celular (receptor de integrinas do tipo $\alpha_v\beta_3$). Estes efeitos modulam a atividade mitocondrial, de canais iônicos, a

mobilização intracelular de Ca^{++} e a ativação de vias de sinalização intracelular, entre outros (4; 5).

1.2 Efeitos fisiológicos dos hormônios da tireóide

Os hormônios da tireóide exercem atividade reguladora sobre praticamente todas as células do organismo. Os efeitos destes podem tanto abranger os eventos relacionados ao metabolismo quanto ao crescimento e desenvolvimento (3).

Os hormônios da tireóide são imprescindíveis para o crescimento e maturação adequados do sistema nervoso central e dos pulmões, bem como o crescimento de vários outros tecidos, tais como epidérmico, ósseo e muscular esquelético e cardíaco (6). Adicionalmente, estes hormônios também exercem efeitos regulatórios sobre o metabolismo energético, principalmente sobre o consumo basal de oxigênio e produção de calor, através do aumento do tamanho e número de mitocôndrias, conferindo maior capacidade de geração de energia e calor (4; 7).

1.3 Hipertireoidismo

O hipertireoidismo é um estado hipermetabólico causado por elevados níveis circulantes de T3 e T4. O termo hipertireoidismo primário é utilizado para designar o hipertireoidismo decorrente de uma anormalidade intrínseca da tireóide, como na doença de Graves. Por outro lado, hipertireoidismo secundário

designa a patologia decorrente de causas externas à tireóide, como um tumor hipofisário secretor de TSH (8). A prevalência do hipertireoidismo varia de 0,5% a 2% na população mundial, e é dez vezes mais prevalente em mulheres do que em homens (9).

1.4 Efeitos cardiovasculares do hipertireoidismo

O hipertireoidismo tem grande impacto sobre a morfologia e função do sistema cardiovascular (Figura 1) (10). Estes efeitos incluem aumento na contratilidade cardíaca, no consumo de oxigênio pelo miocárdio, no débito cardíaco, e redução da resistência vascular periférica (11).

No leito vascular, os hormônios da tireóide promovem aumento da fosforilação da via da PI3K/Akt, importante reguladora do crescimento, do metabolismo e da sobrevivência celular. Esta, por sua vez, ativa a óxido nítrico sintase (NO sintase) endotelial, potencializando a vasodilatação induzida por acetilcolina, resultando em redução da resistência vascular periférica total, e consequentemente, redução da pressão arterial e da pós-carga (5; 12).

No coração, os hormônios da tireóide aumentam a expressão da SERCA, promovendo uma remoção mais eficiente do Ca^{++} citoplasmático, contribuindo para um efeito lusitrópico positivo (13). Assim como, induzem aumento da síntese de diversas proteínas, principalmente da cadeia pesada α da miosina, que possui maior capacidade de ATPase que a cadeia β , contribuindo para um efeito inotrópico positivo (3). Os hormônios da tireóide também estimulam a Na^+/K^+ ATPase, canais de K^+ dependentes de voltagem, e receptores $\beta 1$ adrenérgicos, acelerando a despolarização e aumentando a frequência cardíaca, causando

efeito cronotrópico positivo. Além disso, os hormônios da tireóide inibem a transcrição da cadeia pesada β da miosina, da fosfolambam, do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, e da adenilil ciclases tipo V e VI (11). Ainda, estes hormônios, como aludido acima, interagem com proteínas de sinalização intracelular, como da via da PI3K/Akt/mTOR, que parecem estar relacionadas com o crescimento celular, e a hipertrofia cardíaca (14).

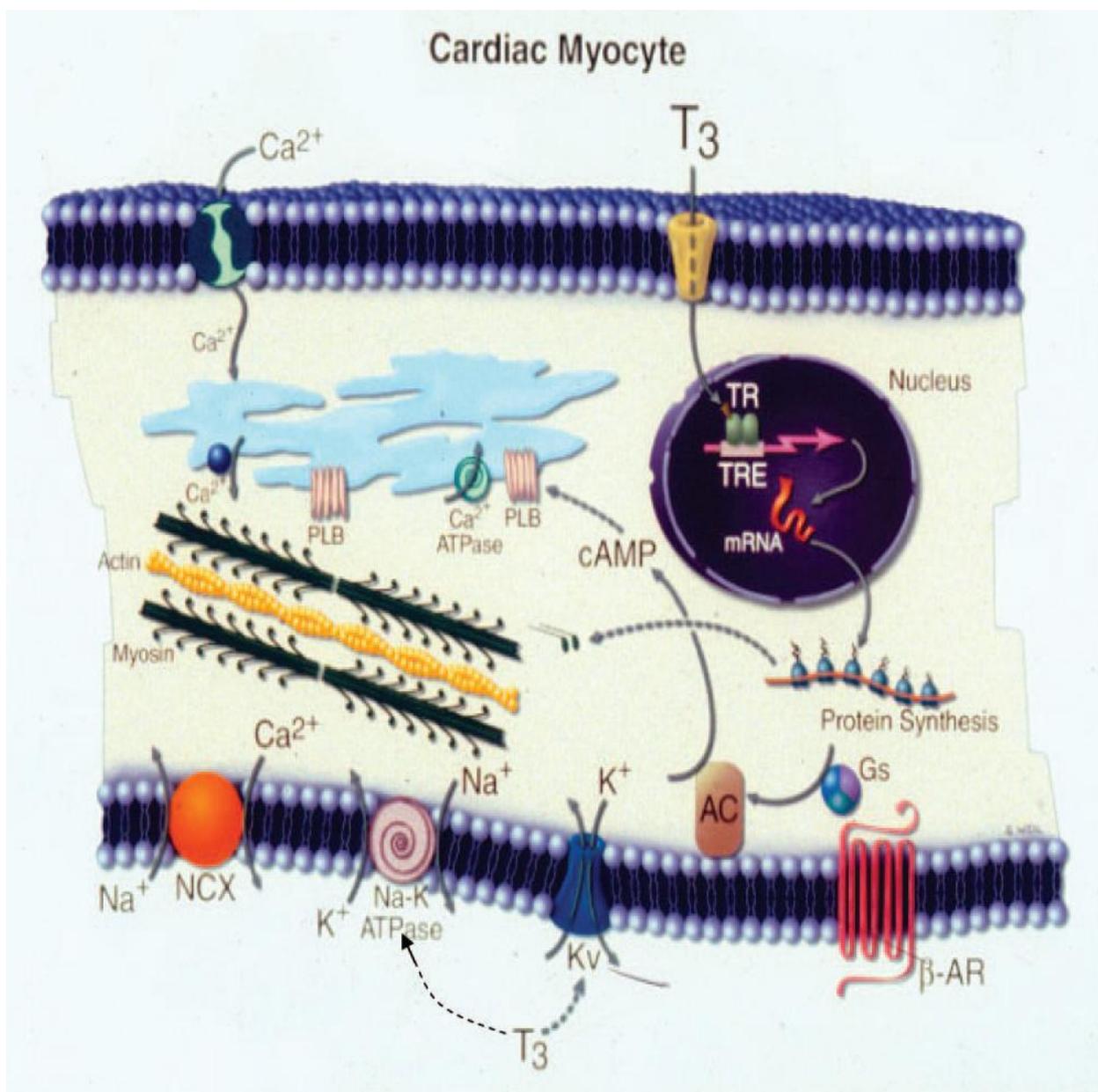


Figura 1. Efeitos do T3 no miócito cardíaco (3).

No hipertireoidismo, a intensificação na síntese de proteínas e o aumento do volume celular estão correlacionados com desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Este fenômeno pode estar associado à redução na resistência periférica total, atividade exacerbada do sistema nervoso simpático, aumento da pré-carga, e subseqüentemente, aumento do trabalho cardíaco (15).

1.5 Hipertrofia Cardíaca

O remodelamento cardíaco é um dos principais elementos envolvidos na patogênese de diversas doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão e a insuficiência cardíaca (16). Este processo pode ser definido como modificações intersticiais, celulares e moleculares, que promovem alterações no formato e tamanho do coração, bem como em sua função após lesão ou sobrecarga cardíaca (17).

O desenvolvimento do remodelamento cardíaco é influenciado por fatores hemodinâmicos e neurohumorais. Tais fatores são responsáveis por alterações na expressão de diversos genes e no formato dos cardiomiócitos, além de provocarem modificações na matriz extracelular. Essas alterações resultam no espessamento da parede cardíaca, seguido por dilatação das suas câmaras e, conseqüentemente, disfunção miocárdica (16; 18; 19).

A hipertrofia cardíaca é uma característica comum no processo de remodelamento, sendo uma adaptação inicial tanto às condições fisiológicas quanto patológicas, dependendo da natureza da carga imposta ao coração. Estes padrões de hipertrofia apresentam diferentes características estruturais e

funcionais (20; 21). A hipertrofia fisiológica é devida a sobrecargas hemodinâmicas transitórias, como a observada durante o crescimento cardíaco na adolescência, na gravidez, e em resposta ao exercício regular. Por outro lado, a hipertrofia patológica é causada pela sobrecarga hemodinâmica persistente, a exemplo da hipertensão arterial sistêmica (22). A hipertrofia cardíaca, inicialmente, constitui uma resposta adaptativa que normaliza o estresse biomecânico e mantém a integridade da função cardíaca. No entanto, quando prolongada, a hipertrofia cardíaca é um fator de risco para desfechos de insuficiência cardíaca, na qual ocorre dilatação do diâmetro da câmara cardíaca, progredindo para a disfunção contrátil (23; 24).

Os mecanismos da hipertrofia cardíaca produzida por elevados níveis de T4 incluem um efeito direto do hormônio no coração, e efeitos indiretos relacionados à estimulação do sistema nervoso simpático, e a alterações nas condições de carga do ventrículo esquerdo. A reduzida resistência vascular e o subsequente aumento no trabalho cardíaco também contribuem para hipertrofia cardíaca induzida por T4 (25; 26). Adicionalmente, alguns autores observaram que a hipertrofia cardíaca induzida por T4, em preparações de coração isolado, é acompanhada por aumento na quantidade e atividade de síntese protéica (27; 28). Dentre os fatores humorais envolvidos na hipertrofia cardíaca induzida pelo T4, o sistema renina angiotensina ocupa importante papel. Estudos demonstraram que, no hipertireoidismo, ocorre aumento da síntese e secreção de angiotensinogênio, e também da atividade da renina plasmática (15; 29). Adicionalmente, o aumento da ativação do sistema nervoso simpático (SNS), indicado pelo maior número de receptores adrenérgicos β_1 , constitui também importante fator na hipertrofia cardíaca induzida por hipertireoidismo (30).

1.6 Balanço Simpato-vagal

As alterações cardiovasculares no hipertireoidismo refletem uma interação de diversos fatores neuroendócrinos, tais como sistema nervoso autônomo e sistema renina angiotensina, culminando em alterações morfológicas e funcionais (31). Dentre as alterações funcionais, o aumento da frequência cardíaca é um relevante evento no hipertireoidismo.

As alterações no balanço simpato-vagal produzem variações na frequência cardíaca em situações patológicas (32; 33) e fisiológicas (34; 35). Tais variações são obtidas através da ação dos sistemas simpático e parassimpático que interagem rapidamente, modulando a frequência cardíaca e a pressão arterial de forma diferenciada (34).

A avaliação da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) fornece informações importantes a respeito do controle autonômico, pois expressa quantitativamente o impacto do balanço simpato-vagal sobre o sistema cardiovascular. Quanto menor a VFC, maiores serão os riscos de doenças cardíacas (31). A diminuição da VFC constitui um importante fator prognóstico para o aparecimento de eventos cardíacos tanto em indivíduos previamente saudáveis quanto em portadores de cardiopatias (36-42). Estes resultados são confirmados em pacientes pós-infarto do miocárdio, por exemplo, nos quais foi observada uma redução na variabilidade da frequência cardíaca, sendo esta então considerada um fator de risco independente para eventos arrítmicos e mortalidade global (31).

A análise no domínio da frequência, ou análise espectral, é uma metodologia de grande aplicação clínica, em grande parte, por usar registros não

invasivos e fornecer uma avaliação quantitativa da função cardiovascular (34; 35).

A análise espectral de séries temporais de frequência cardíaca, ou tacograma, e de pressão arterial sistólica, ou sistograma, permite não apenas a avaliação da variabilidade como também a sua caracterização em componentes de frequências específicas. As oscilações rítmicas presentes na frequência cardíaca apresentam três faixas distintas: a faixa HF (*High Frequency*), similar à atividade respiratória normal; a LF (*Low Frequency*) e a VLF (*Very Low Frequency*). Tais oscilações variam em amplitude e frequência de acordo com o comportamento, condições fisiológicas e patológicas (34; 35; 43).

Os componentes LF e HF da VFC estão relacionados às modulações simpática e vagal, respectivamente. Entretanto, por serem obtidas de forma indireta, diferentemente das medidas de tônus simpático e vagal, as alterações sobre tais componentes de frequência não estão sempre diretamente ligadas ao aumento ou redução da atividade simpática e/ou vagal. A avaliação da variabilidade da frequência cardíaca, por caracterizar resposta à ação do sistema nervoso sobre o coração, permite avaliar o controle autonômico através da relação entre as componentes espectrais LF/HF, ou seja, a relação entre as modulações simpática e vagal sobre o ritmo cardíaco (44).

O hipertireoidismo é tipicamente conhecido como um estado hiperadrenérgico, apresentando um desequilíbrio simpato-vagal, com incremento do componente simpático, e atenuação do parassimpático. Neste estado, ocorre aumento significativo da frequência cardíaca, ou seja, redução do intervalo R-R, e também redução da variabilidade natural deste intervalo. O tratamento com beta-bloqueadores inespecíficos retorna os valores de VFC ao normal, indicando a participação do sistema nervoso autônomo (45). Também, a angiotensina II

potencializa a atividade simpática, e amortece a parassimpática, contribuindo para o desequilíbrio simpato-vagal presente no hipertireoidismo. Da mesma forma, o bloqueio do sistema renina angiotensina produz uma melhora do equilíbrio entre sistema nervoso simpático e parassimpático (46).

1.7 Hipertireoidismo e sistema renina-angiotensina

No conceito clássico, o sistema renina angiotensina (SRA) é ativado através da liberação renal de renina para a circulação, onde converte angiotensinogênio em angiotensina I (Ang I), a qual é hidrolizada pela enzima conversora de angiotensina (ECA), para formar angiotensina II (Ang II), um hormônio peptídico (47). Estudos prévios evidenciaram a existência de componentes do SRA em tecidos periféricos, como coração e vasos, indicando a existência de SRA locais (48). Assim, a Ang II presente no coração pode ser proveniente tanto da circulação, como da produção cardíaca local (49).

A Ang II participa na manutenção da homeostase através de vasoconstrição, modulação da hipertrofia e fibrose cardíaca, e sua função é mediada pelos receptores de angiotensina (AT), principalmente AT1 (50), bem como é importante reguladora do balanço eletrolítico, e do volume de fluídos no organismo (51).

Hu e colaboradores (2003) descreveram que o SRA local exerce papel importante no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo. Estes autores demonstraram que os hormônios da tireóide ativam o SRA circulante e cardíaco, sem necessariamente envolver o sistema

nervoso simpático (15), bem como aumentam a concentração de renina, a produção de Ang II, e elevam os níveis de receptores AT1 e AT2 (29).

No coração, o SRA induz hipertrofia e fibrose, mediadas pelo receptor AT1 (52). Através deste receptor, a Ang II ativa um conjunto de proteínas cinases intracelulares, envolvidas no estabelecimento da hipertrofia cardíaca, como a família das proteínas cinase ativadoras de mitógeno (MAPK), as isoformas da proteína cinase C, cinase de adesão focal, e a via de sinalização da Akt (30). Estudos demonstraram que o bloqueio da enzima conversora da angiotensina (ECA) e dos receptores AT1 é capaz de atenuar ou prevenir o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzido por hormônios da tireóide, *in vivo* (53). Isto ressalta o papel da Ang II no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo.

Também foi demonstrado que doses baixas de bloqueadores dos receptores AT1, incapazes de reduzir a pressão arterial, foram capazes de reduzir a hipertrofia cardíaca (54). De forma geral, a interação entre os hormônios da tireóide e o SRA está longe de ser totalmente compreendida, e é importante considerar outros fatores envolvidos na patogênese das doenças cardiovasculares, como o estresse oxidativo. A Ang II pode levar ao estresse oxidativo, através da ativação do sistema NADPH oxidase, com destaque para a subunidade gp91Phox, que gera o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), uma espécie ativa de oxigênio, que também está relacionada com a sinalização intracelular (50).

Diante disso, o bloqueador de receptor AT1, Losartan, tem sido utilizado como alternativa terapêutica para tratar pacientes hipertensos, portadores de insuficiência cardíaca, e outras doenças associadas ao SRA. Contudo, os efeitos

da utilização deste fármaco na formação de espécies reativas de oxigênio induzida por Ang II, decorrente do hipertireoidismo, ainda não estão completamente estabelecidos (55).

1.8 Espécies ativas de oxigênio

As espécies ativas de oxigênio (EAO) são produtos normais do metabolismo celular (56). EAO é um termo coletivo que inclui não somente os radicais de oxigênio, mas também algumas espécies não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e ozônio (O_3) (57).

Os radicais livres podem ser definidos como espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados nos orbitais atômicos ou moleculares. Este elétron desemparelhado geralmente confere um considerável grau de reatividade ao radical livre (58). Os radicais livres derivados do oxigênio representam os radicais mais importantes gerados nos sistemas biológicos, dada a importância e quantidade utilizada de oxigênio, no metabolismo aeróbico (57).

A geração das EAO ocorre durante os processos de oxidação biológica. Dentre os quais, podemos destacar a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa, para formação de ATP na mitocôndria. Em princípio, o oxigênio (O_2) é reduzido até água (H_2O), recebendo quatro elétrons de uma só vez pela citocromo oxidase. Entretanto, em razão de sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência a receber um elétron de cada vez, gerando compostos intermediários altamente reativos. Destes compostos intermediários, pode-se destacar: o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). A formação destas moléculas ocorre em aproximadamente

5% de todo processo de redução do oxigênio até água. Ainda deve-se relatar o estado excitado do oxigênio denominado de oxigênio “singlet”, que também pode causar danos à célula (Figura 2) (59-61).

Outras fontes de EAO compreendem não só as ações enzimáticas da ciclooxigenase, lipooxigenase, xantina oxidase, aldeído oxidase e NADPH oxidase, mas também a autooxidação das catecolaminas, das flavinas e ferridoxinas, além das reações catalisadas por metais de transição, como ferro e cobre (57; 59; 62). O potencial reativo das EAO é bem ilustrado na lipoperoxidação (LPO) dos lipídios de membrana. A lipoperoxidação é um processo sucessivo fisiológico que envolve não somente a renovação das membranas celulares, como também a biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos (60). As membranas celulares são preferencialmente atacadas, porque são formadas por lipídios de cadeias insaturadas e por proteínas com grupos tióis (SH) (57; 60). As proteínas também sofrem reações oxidativas iniciadas pelas EAO, que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais. Processos como fragmentação, agregação, além da maior susceptibilidade a proteases, exemplificam algumas das ações dos radicais livres sobre proteínas (61). Pode haver, também, um ataque ao DNA nuclear, sobretudo pelo radical hidroxil, formando a 8-hidroxideoxiguanosina, que pode ser detectada experimentalmente. O DNA mitocondrial também é bastante atingido, uma vez que a mitocôndria é grande fonte de EAO (61).

A exposição a substâncias oxidantes levou os organismos a desenvolverem defesas antioxidantes, representados principalmente pelas defesas enzimáticas e não enzimáticas (58). As enzimáticas incluem superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), e catalase (CAT). As defesas

antioxidantes não enzimáticas são representadas pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathiona (GSH), carotenóides, flavonóides, entre outros. Sob circunstâncias normais, as substâncias oxidantes e antioxidantes se encontram em equilíbrio (63). Os efeitos deletérios ocorrem quando as concentrações de EAO extrapolam o sistema antioxidante, causando estresse oxidativo (64).

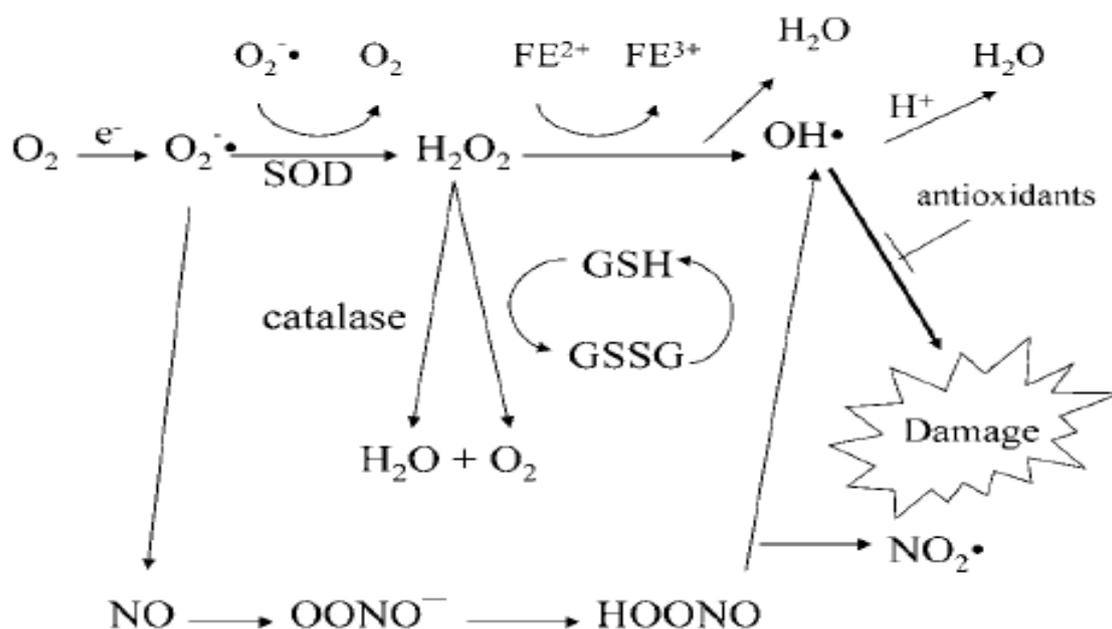


Figura 2. Formação e degradação das EAO (65).

Todavia, as EAO também possuem papel fisiológico. Os efeitos benéficos das EAO ocorrem em concentrações baixas a moderadas, e incluem não somente reações a agentes infecciosos, mas também ativação de várias vias de sinalização intracelular (66). Este equilíbrio é mantido por sistemas sensíveis a alterações e moléstias celulares, mobilizando alterações bioquímicas e moleculares, para manter a homeostase da célula. Algumas proteínas respondem às alterações redox, no sentido de proteger a célula. O fator eritróide nuclear 2

(Nrf-2) exerce um papel vital na proteção celular contra o estresse oxidativo, regulando genes citoprotetores, incluindo a via da glutathiona (67; 68). Fisiologicamente, o Nrf-2 encontra-se ligado ao repressor citoplasmático Keap1 (*Kelch ECH associating protein*), que o mantém no citoplasma, e promove sua degradação proteossomal. O Keap1 possui muitos resíduos de cisteína reduzidos em sua estrutura (SH-), que quando oxidados, alteram a conformação do Keap1, liberando o Nrf-2 no citoplasma, que se dirige ao núcleo, atuando principalmente como um ativador de transcrição, em associação com outras moléculas (68). Como resultado, ocorre aumento da transcrição de enzimas da via da glutathiona, como glutathiona-S-transferase, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, enzimas regeneradoras de NADPH (glicose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase, enzima málica), antioxidantes (ferritina e haptoglobina), e também a heme oxigenase (HO) (68).

Neste contexto, destaca-se o papel da heme-oxigenase (HO), enzima presente em todos os tecidos, que compreende HO-1 e HO-2, e que age como enzima chave na degradação do grupamento heme, um processo que leva a formação de quantidades equimolares de biliverdina, ferro livre e monóxido de carbono (CO). Sabe-se que a HO-2 é expressa constitutivamente, enquanto a HO-1 é induzível por uma variedade de circunstâncias, como o choque térmico, e o estresse celular e oxidativo. O sistema HO fornece propriedades antioxidantes e anti-apoptóticas graças aos seus subprodutos: bilirrubina/biliverdina, e CO, respectivamente. A bilirrubina e o CO, produzidos pela ação da HO, atuam como antioxidantes diretamente, protegendo a célula da superprodução de superóxido, bem como inibindo a atividade da NADPH oxidase. A HO-1 é induzível pelo estresse oxidativo, e possui um papel fundamental na proteção contra danos

oxidativos no diabetes e em doenças cardiovasculares (69). Vera e colaboradores, em 2007, observaram que a indução da HO está associada com o decréscimo da produção de superóxido mediada pela Ang II (70).

O aumento do consumo de oxigênio no hipertireoidismo, a ação da Ang II sobre o sistema NADPH oxidase, e a sua subsequente produção acentuada de EAO, tornam necessária a investigação do papel destes elementos na fisiopatologia da hipertrofia cardíaca.

2. HIPÓTESE

O hipertireoidismo conduz à ativação do sistema renina-angiotensina, com correspondente aumento na produção das espécies ativas de oxigênio. Estas espécies estão correlacionadas com a ativação das proteínas Nrf-2 e HO-1, sensíveis ao estado redox celular, levando ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca associado à disfunção autonômica cardíaca.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar a influência do bloqueio do receptor AT1 na produção das espécies ativas de oxigênio e na expressão de proteínas sensíveis ao estado redox, correlacionando com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e o controle simpato-vagal, em ratos submetidos ao hipertireoidismo crônico.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os parâmetros hemodinâmicos pela medida da frequência cardíaca e da pressão aórtica;
- Avaliar o balanço simpato-vagal cardíaco através da análise espectral;
- Realizar medidas de avaliação de peróxido de hidrogênio no tecido cardíaco;
- Determinar a expressão das proteínas heme-oxigenase (HO), fator eritróide nuclear-2 (NrF-2) , bem como receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) e subunidade gp91Phox do complexo NADP(H) oxidase, no tecido cardíaco.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, com peso médio de 200 ± 50 gramas. Os animais eram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, sendo mantidos em caixas plásticas de 270 x 260 x 310 mm, com 5 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 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob o número de protocolo 18158.

Todos os procedimentos desse estudo estão de acordo com a Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008, que estabelece normas para a Prática Didático-Científica da Vivisseção de animais; dos Princípios Éticos na Experimentação Animal (71).

4.3 Manuseio de reagentes e animais

Após a morte, os animais foram congelados em freezer -20°C e levados ao biotério da Universidade para serem recolhidos por empresa terceirizada, contratada pela Universidade. Os materiais tóxicos foram manuseados na capela e, após sua utilização, encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para sua correta eliminação.

Todos os procedimentos com animais e reagentes foram realizados com o uso de avental, luva cirúrgica e máscara, levando em consideração os devidos cuidados necessários para proteção e segurança dos animais e dos pesquisadores envolvidos.

4.4 Intervenções

4.4.1 Indução do Hipertireoidismo

O hipertireoidismo crônico foi obtido mediante administração de L-tiroxina ($0,15\mu\text{M}$) -12mg T4 dissolvidos em 1mL de NaOH 1N para um volume final de um litro de água *ad libitum* durante quatro semanas, na água de beber oferecida aos ratos (63).

4.4.2 Tratamento com Losartan

Os grupos Losartan e Hipertireoideo+Losartan foram tratados com Losartan diluído em água, administrado por sonda intragástrica (10 mg/Kg de peso corporal/dia) (54).

4.5 Grupos experimentais

Foram utilizados quatro grupos experimentais, sendo eles:

1. Controle: Animais que não receberam tiroxina e losartan.
2. Losartan: Animais que receberam apenas losartan.
3. Hipertireoideo (T4): animais que receberam apenas tiroxina.
4. Hipertireoideo+Losartan (T4+L): Animais que receberam tiroxina e losartan.

4.6 Sequência experimental

O hipertireoidismo foi induzido através da administração de L-tiroxina (T4) durante quatro semanas, concomitante à administração de Losartan.

O seguimento do protocolo experimental deu-se pela cateterização arterial, para as medidas de frequência cardíaca e pressão aórtica, e subsequente morte dos animais por decapitação. Os corações foram retirados e pesados para avaliar o índice de hipertrofia cardíaca e para avaliações cardíacas de estresse oxidativo

e de expressão protéica (receptor AT1, gp91Phox, Nrf-2, HO-1). Adicionalmente, o sangue troncular foi coletado para dosagem sérica de T3 e T4.

4.7 Coleta de Sangue

Nos animais anestesiados (quetamina 90mg/kg; xilazina 10mg/kg, i.p.), foi realizada a decapitação, e subsequente coleta de sangue troncular. O sangue coletado com ativador de coagulação sílica gel foi centrifugado por 10 minutos a 1000 X g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), o soro foi separado e congelado em freezer a -80°C para posteriores dosagens de hormônios tireoidianos.

4.8 Preparo do Homogeneizado de Tecido Cardíaco

Os ventrículos foram descongelados e homogeneizados durante 40 segundos em ultra-Turrax, na presença de KCl 1,15% (5 mL/g de coração) e de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), na concentração de 100 mM em isopropanol (10 µL por mL de KCl adicionado). O PMSF é um inibidor de proteases e é utilizado para evitar a degradação das enzimas cuja atividade será medida. Em seguida os homogeneizados foram centrifugados por 10 minutos a 1000 X g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5 B – Rotor SM 24) e o sobrenadante retirado e congelado em freezer a -80° C para dosagens posteriores (72).

4.9 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, em 1951, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados expressos em mg/mL (73).

4.10 Dosagem dos hormônios tireoidianos

O método utilizado para dosar os hormônios T3 e T4 foi quimioluminescência por imunoensaio competitivo (74). As análises foram realizadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os resultados estão expressos em ng/mL para o T3 e em µg/dL para o T4.

4.11 Morfometria cardíaca

O índice de hipertrofia cardíaca oferece uma estimativa do aumento da massa muscular do coração, o qual é uma característica importante a ser ressaltada no hipertireoidismo. Este foi calculado pela razão do peso em miligramas de tecido cardíaco pelo comprimento da tíbia em milímetros (75).

4.12 Registro da Pressão Aórtica

Um catéter de polietileno PE-50 foi utilizado para a canulação da artéria aorta via artéria carótida direita. A pressão arterial foi registrada durante 5 minutos, com os animais anestesiados (quetamina 90mg/kg; xilazina 10mg/kg, i.p.), através da conexão da cânula arterial na aorta a um transdutor de pressão (Strain-Gauge - Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) ligado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8805C). Os sinais analógicos da pressão foram digitalizados (CODAS - Data Acquisition System, PC 486) com taxa de amostragem de 2000 Hz (76).

4.13 Controle simpato-vagal (Variabilidade da Frequência Cardíaca)

A análise no domínio da frequência consistiu da decomposição do sistograma pela Transformada Rápida de Fourier (FFT). Em seguida ao remodelamento matemático, foram obtidas as potências absolutas e em unidades normalizadas nas respectivas bandas de frequências pré-determinadas: baixa frequência (LF; 0,2-0,75 Hz) e alta frequência (HF; 0,75-3,0 Hz). A variabilidade do intervalo de pulso foi obtida pela análise do tacograma a partir do registro da PAS, em que a frequência dos batimentos foi determinada pelo intervalo entre dois picos sistólicos. Para essas análises, foram utilizados registros estáveis, de no mínimo, 5 minutos e com frequência de amostragem de 2000 Hz. Também dois componentes foram obtidos na análise espectral: baixa frequência (LF; 0,2-0,75 Hz) e alta frequência (HF; 0,75-3,0 Hz). Os dados foram expressos em valores

absolutos e em unidades normalizadas. O componente LF foi usado como índice da modulação simpática. O componente HF foi usado como um índice de modulação parassimpática (77).

4.14 Medida de peróxido de hidrogênio

O método baseia-se na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete, resultando num produto que absorve luz em 610 nm. O tecido foi incubado por 30 minutos em tampão fosfato 10 mol/L (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L). Após centrifugação por 30 segundos a 1000 X g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), o sobrenadante foi coletado e adicionado na solução tampão de vermelho de fenol 0,28 mol/L e peroxidase de rabanete 8,5 U/mL. Após o intervalo de 5 minutos, foi adicionado NaOH 1mol/L e efetuada a leitura a 610 nm. O resultados estão expressos em nmoles de H₂O₂ por g de tecido (78).

4.15 Análise por “Western Blot”

O ventrículo esquerdo foi homegeneizado (Tris 20 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, EDTA 5 mmol/L, glicerol 10%, fenil methyl sulfonil fluoreto-PMSF 20 mmol/L, aprotinina 10µL/mL e leupeptina 10µL/mL) em Ultra-Turrax. A suspensão foi centrifugada a 1000 g por 10 minutos a 0-4°C para remoção de núcleo e restos celulares. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Trinta microgramas de

proteína foram expostos à eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando 15% (p/v) de gel separador e 5% (w/v) de gel fixador (79). As proteínas separadas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose, em tampão contendo 20 mmol/L Tris, 150 mmol/L glicina, metanol 20%(V/V) SDS 0.1% (p/v), pH 8.2 em uma unidade Bio-Rad TransBlot resfriada.

Após, os sítios de ligação protéica não-específicos foram bloqueados por incubação durante 1 hora em leite desnatado com Tris-buffer (63). As membranas foram processadas por imunodeteccção utilizando anticorpos de coelho anti-Nfr-2 (57 Kda, SC-722) (1:500); anti coelho anti-heme-oxigenase-1 (12 Kda, SC-10789) (1:500), anti coelho anti-receptor AT1 (41 Kda, SC-1179)(1:500), anti coelho anti-gp91phox (91 Kda, SC-20782) (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), incubados a 4°C. Os anticorpos primários ligados foram detectados utilizando anticorpos secundários de coelho anti-cabra, coelho anti-camundongo ou cabra anti-coelho conjugado com peroxidase de rabanete (1:10000 – 1:5000), e as membranas foram reveladas por quimioluminescência. As autoradiografias geradas foram quantitativamente analisadas para os níveis de proteínas com um densitômetro de imagens (Image Master VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas foram determinados por referência a um marcador padrão de peso molecular (RPN 800 Rainbow Full Range Bio-Rad, CA, USA). Resultados em unidades de densidade óptica, com 2 bandas representativas de cada grupo, sobrepostas à β -tubulina.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA E CÁLCULO DA AMOSTRA

Os resultados das análises são apresentados como médias e desvios padrões. Para a comparação entre os grupos foi aplicada análise de variância (ANOVA) de uma via, complementada com o teste de Student-Newmann-Keuls, e correlação produto-momento de Pearson .

O tamanho da amostra para a análise da expressão protéica, da análise da morfologia do tecido cardíaco e da avaliação do estresse oxidativo foi calculado através do programa PEPI 3, utilizando-se dados de estudos prévios realizados pelo nosso laboratório (63). Foi estabelecido um nível de significância de 0.05, poder estatístico de 90% e diferença entre as médias de 0.1 unidades arbitrárias, chegando-se a um n de 15 animais por grupo, em um total de 60 animais.

6. RESULTADOS

6.1 Hormônios da tireóide

Os grupos T4 e T4+L, tratados com T4, apresentaram um aumento de ~611% nos níveis séricos de T4 e ~230% nos de T3, em comparação com os grupos Controle e Losartan, que não receberam T4 ($P < 0,05$). Estes resultados comprovam a eficácia do método em induzir o hipertireoidismo. Valores de hormônios da tireóide na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração sérica de hormônios da tireóide nos grupos experimentais.

	Controle	Losartan	T4	T4+L
T3 (ng/dL)	69 ± 23	54 ± 8	463 ± 119 *	405 ± 157 *
T4 (µg/dL)	3,19 ± 1,71	2,35 ± 0,11	8,99 ± 1,99 *	8,87 ± 1,65 *

Valores representam média ± desvio padrão. *= $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle, (n=3/grupo).

6.2 Morfometria cardíaca e parâmetros hemodinâmicos

O hipertireoidismo foi capaz de levar à hipertrofia cardíaca, elevando a relação entre peso cardíaco e comprimento tibial em ~59% no grupo T4, quando comparado ao grupo Controle ($P < 0,05$). O grupo T4+L apresentou um índice de hipertrofia cardíaca (IHC) ~23% menor, quando comparado ao grupo T4 ($P < 0,05$).

Quanto à frequência cardíaca, o coração dos animais tratados com T4 encontrava-se em estado hipercinético, característico do hipertireodismo, com aumento significativo da frequência cardíaca de ~52% em relação ao grupo Controle ($P < 0,05$). O grupo T4+L mostrou uma frequência cardíaca ~23% menor do que o grupo T4 ($P < 0,05$).

Entretanto, tampouco o hipertireoidismo quanto o tratamento com Losartan apresentaram quaisquer alterações nos níveis pressóricos aórticos diastólicos e sistólicos. Valores apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Relação peso cardíaco (mg)/comprimento da tibia (mm) – índice de hipertrofia cardíaca (IHC), frequência cardíaca (bpm) (FC) e pressão aórtica (mm Hg) (PA).

	Controle	Losartan	T4	T4+L
IHC (mg/mm)	16,10 ± 1,05	16,41 ± 1,49	25,66 ± 3,31*	20,76 ± 2,56 *#
FC (bpm)	254 ± 47	236 ± 41	388 ± 73*	314 ± 87 *#
PA diastólica	83 ± 7	103 ± 8	84 ± 14	88 ± 14
PA sistólica	107 ± 4	128 ± 11	109 ± 14	116 ± 12

Valores representam média ± desvio padrão. *= $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle, #= $P < 0,05$ em relação ao grupo T4 ($P < 0,05$), (n= 4 a 9/grupo).

6.3 Balanço autonômico

A variabilidade da frequência cardíaca, os componentes de baixa e alta frequência, *low frequency* (LF) e *high frequency* (HF), e o balanço simpato-vagal (LF/HF), foram avaliados.

O hipertireoidismo levou a alterações significativas em todos os parâmetros avaliados. A variabilidade da frequência cardíaca apresentou redução significativa de ~66% no grupo T4 quando comparado ao grupo Controle ($P < 0,05$). No entanto, o tratamento com Losartan no grupo T4 preveniu esta redução.

A faixa de baixa frequência normalizada (LFnu), que indica a porcentagem de atividade autônoma exercida pelo sistema nervoso simpático, apresentou incremento significativo de ~219% nos grupos tratados com T4, quando comparados ao grupo Controle ($P < 0,05$). Todavia, o grupo T4+L apresentou uma redução de ~44% deste parâmetro quando comparado ao T4 ($P < 0,05$), assim como o grupo Losartan que apresentou uma redução de ~30% em relação ao Controle ($P < 0,05$).

A faixa de alta frequência normalizada (HFnu), que indica a porcentagem de atividade autônoma exercida pelo parassimpático sobre o coração, apresentou significativa redução de ~53% no grupo T4, em comparação ao grupo Controle ($P < 0,05$). Já no grupo T4+L, a redução foi de ~16%, em relação ao grupo Losartan ($P < 0,05$).

O balanço simpato-vagal LF/HF, que indica a proporção de controle autonômico, apresentou aumento significativo de ~770% no grupo T4, quando comparado com o grupo Controle ($P < 0,05$), indicando hiperatividade simpática, condizente com o hipertireoidismo. Já o grupo T4+L apresentou redução desta

razão em ~67%, quando comparado com grupo hipertireoideo T4 ($P<0,05$).

Valores na Tabela 3.

Tabela 3. Valores da análise espectral no domínio da frequência.

	Controle	Losartan	T4	T4+L
VFC (ms^2)	10,54 \pm 1,49	11,91 \pm 4,03	4,64 \pm 1,81 *	12,10 \pm 4,24
LFnu	0,67 \pm 0,28	0,42 \pm 0,16 *	2,14 \pm 0,41 *	1,82 \pm 0,52 *#
HFnu	90,90 \pm 1,87	95,03 \pm 2,97	42,73 \pm 6,43 *	77,23 \pm 3,00 *#
LF/HF	0,10 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,87 \pm 0,34 *	0,28 \pm 0,03 *#

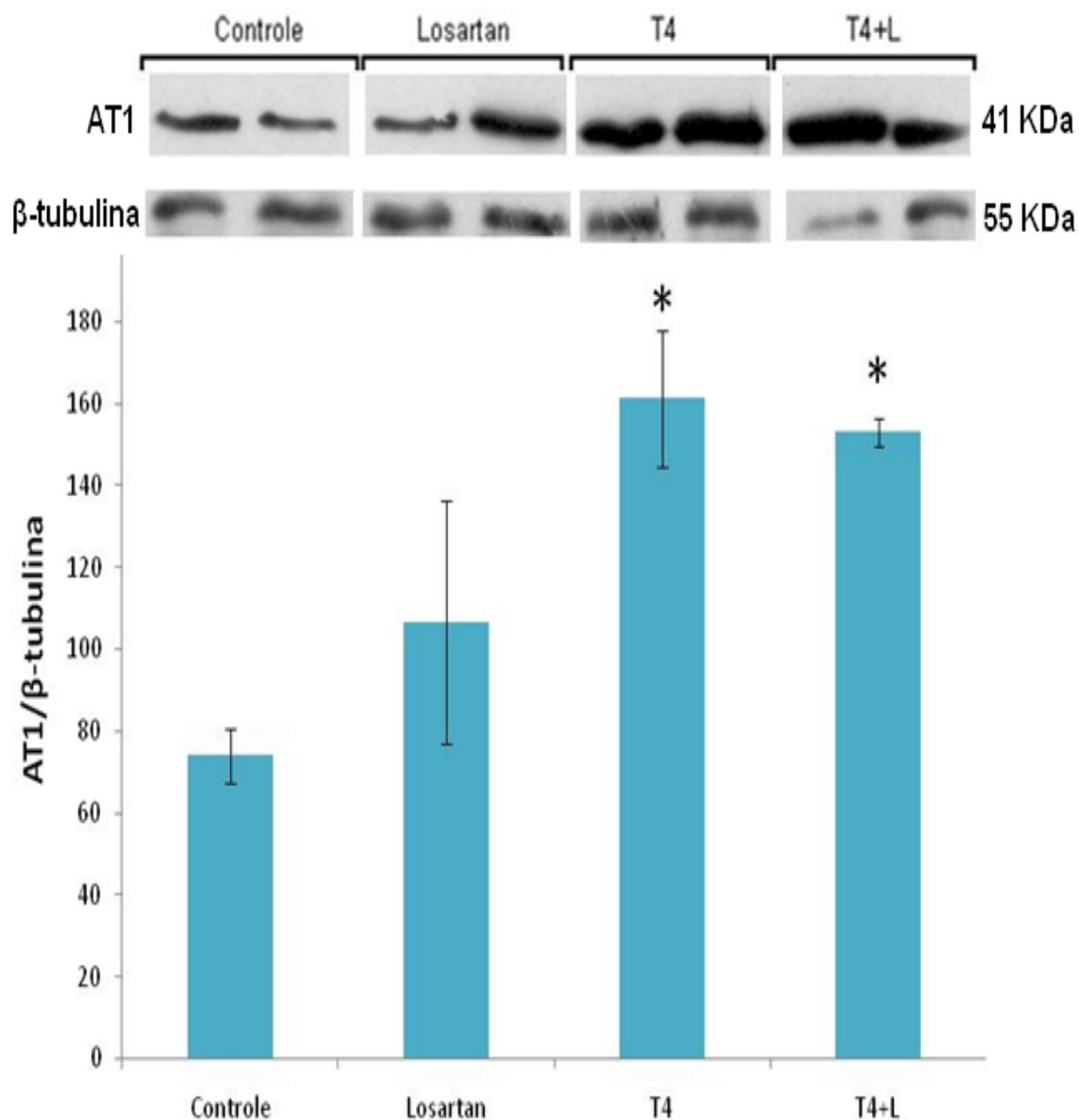
Valores representam média \pm desvio padrão.*= $P<0,05$ em relação ao grupo Controle, #= $P<0,05$ em relação ao grupo T4 ($P<0,05$), (n=4/grupo).

6.4 Expressão protéica de receptor AT1 e gp91phox

A quantificação do imunocontéudo de receptor AT1 e da subunidade gp91phox da enzima NADPH oxidase apresentou perfil semelhante nas duas análises, com elevação máxima no grupo T4, e valores intermediários no grupo T4+L, figurando entre o grupo Controle e o grupo T4.

Na quantificação do conteúdo protéico de AT1, o grupo hipertireoideo T4 apresentou aumento significativo de ~117% em relação ao grupo Controle ($P<0,05$). O grupo T4+L não apresentou alteração nesta proteína quando comparado com o grupo T4. Valores demonstrados na Figura 3.

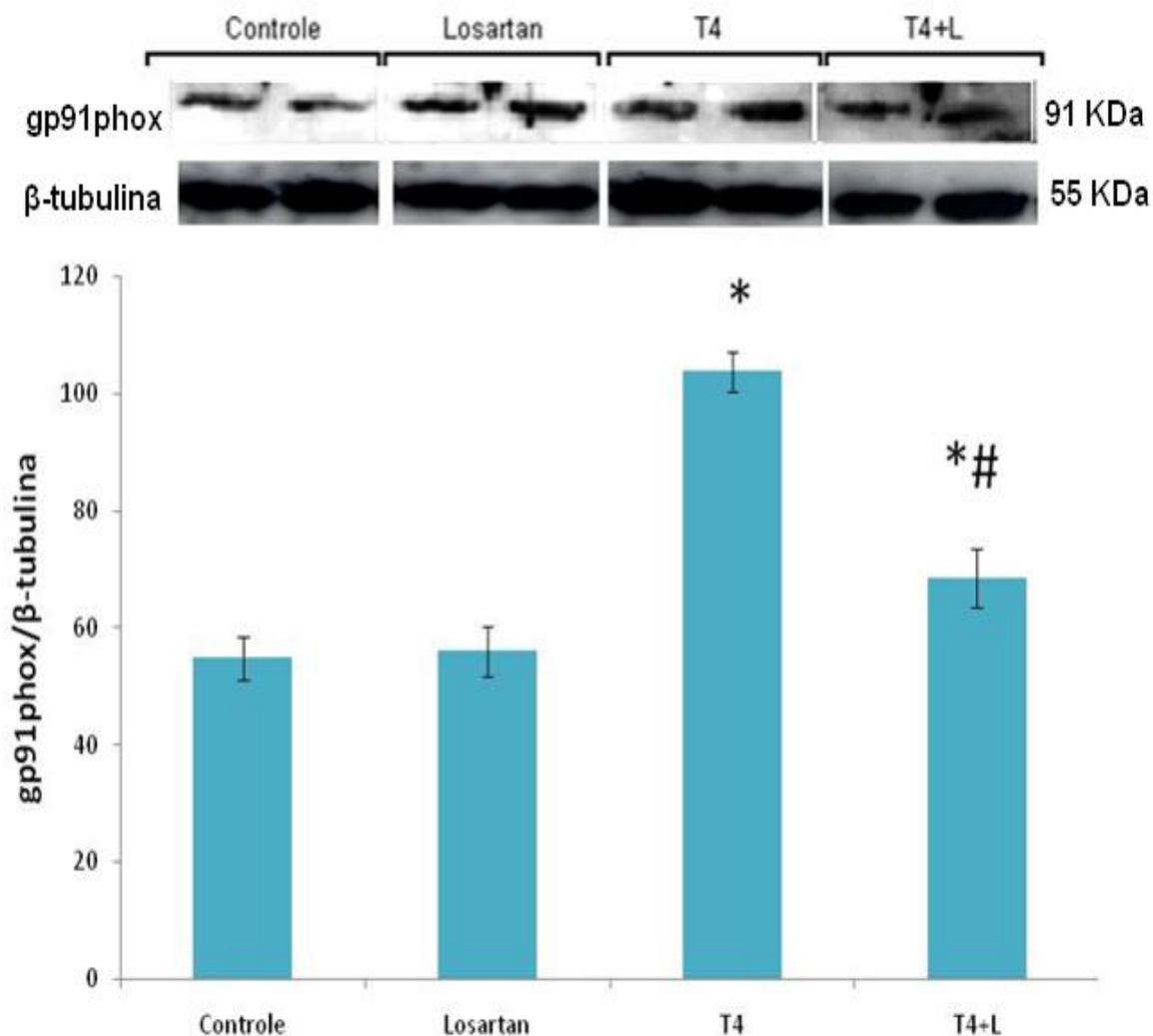
Figura 3. Imunoconteúdo do receptor AT1, em densidade óptica.



Valores representam média \pm desvio padrão.*=P<0,05 em relação ao grupo Controle, #= P<0,05 em relação ao grupo T4 (P<0,05), (n=4/grupo). Gel representativo, mostrando duas bandas de cada grupo experimental.

O imunoconteúdo da subunidade gp91phox da enzima NADPH oxidase também apresentou elevação no grupo T4, de ~88% se comparado ao grupo Controle ($P<0,05$). O grupo T4+L apresentou redução significativa de ~64%, quando comparado com o grupo T4 ($P<0,05$). Valores demonstrados na Figura 4.

Figura 4. Imunoconteúdo da subunidade gp91phox, em densidade óptica.

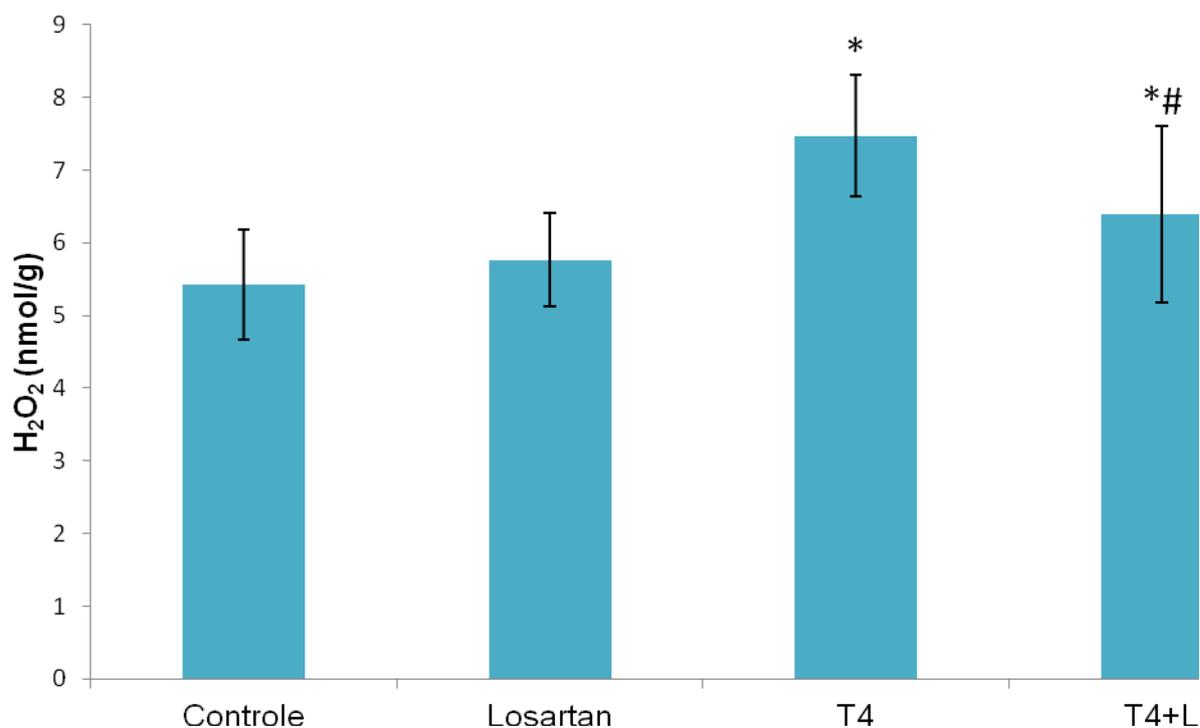


Valores representam média \pm desvio padrão.*= $P<0,05$ em relação ao grupo Controle, #= $P<0,05$ em relação ao grupo T4 ($P<0,05$), ($n=4$ /grupo). Gel representativo, mostrando duas bandas de cada grupo experimental.

6.5 Análise do peróxido de hidrogênio e proteínas redox sensíveis

O hipertireoidismo promoveu aumento significativo de ~37% nos níveis de H_2O_2 no tecido cardíaco, comparado ao grupo Controle ($P < 0,05$). O grupo T4+L apresentou redução significativa de ~20% quando comparado ao grupo T4 ($P < 0,05$). Dados na Figura 5.

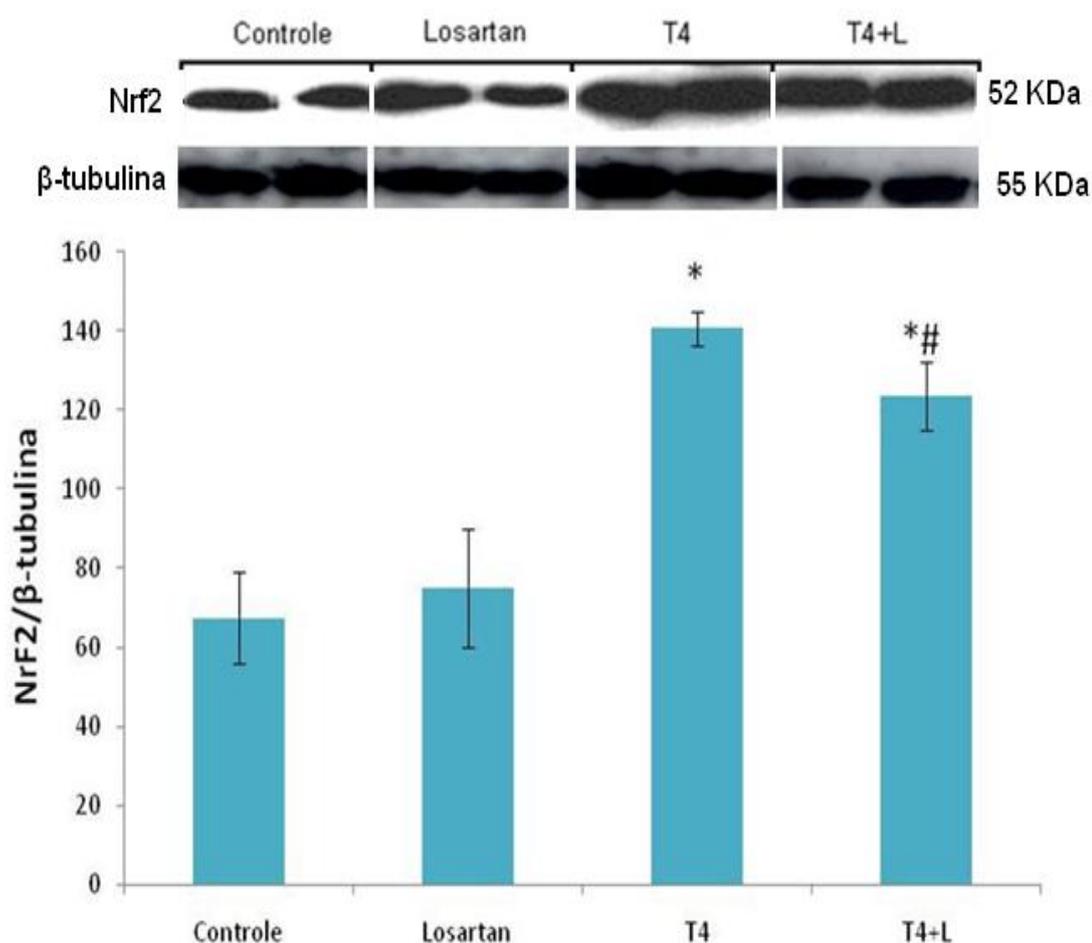
Figura 5. Concentração de H_2O_2 no tecido cardíaco (nmol/g de tecido).



Valores representam média \pm desvio padrão. *= $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle, #= $P < 0,05$ em relação ao grupo T4 ($P < 0,05$), ($n=8$ /grupo).

Os níveis de Nrf-2 no grupo T4 apresentaram elevação significativa de ~108% em relação ao grupo Controle ($P < 0,05$). O grupo T4+L apresentou redução significativa de ~26% em relação ao grupo T4 ($P < 0,05$). Valores demonstrados na Figura 6.

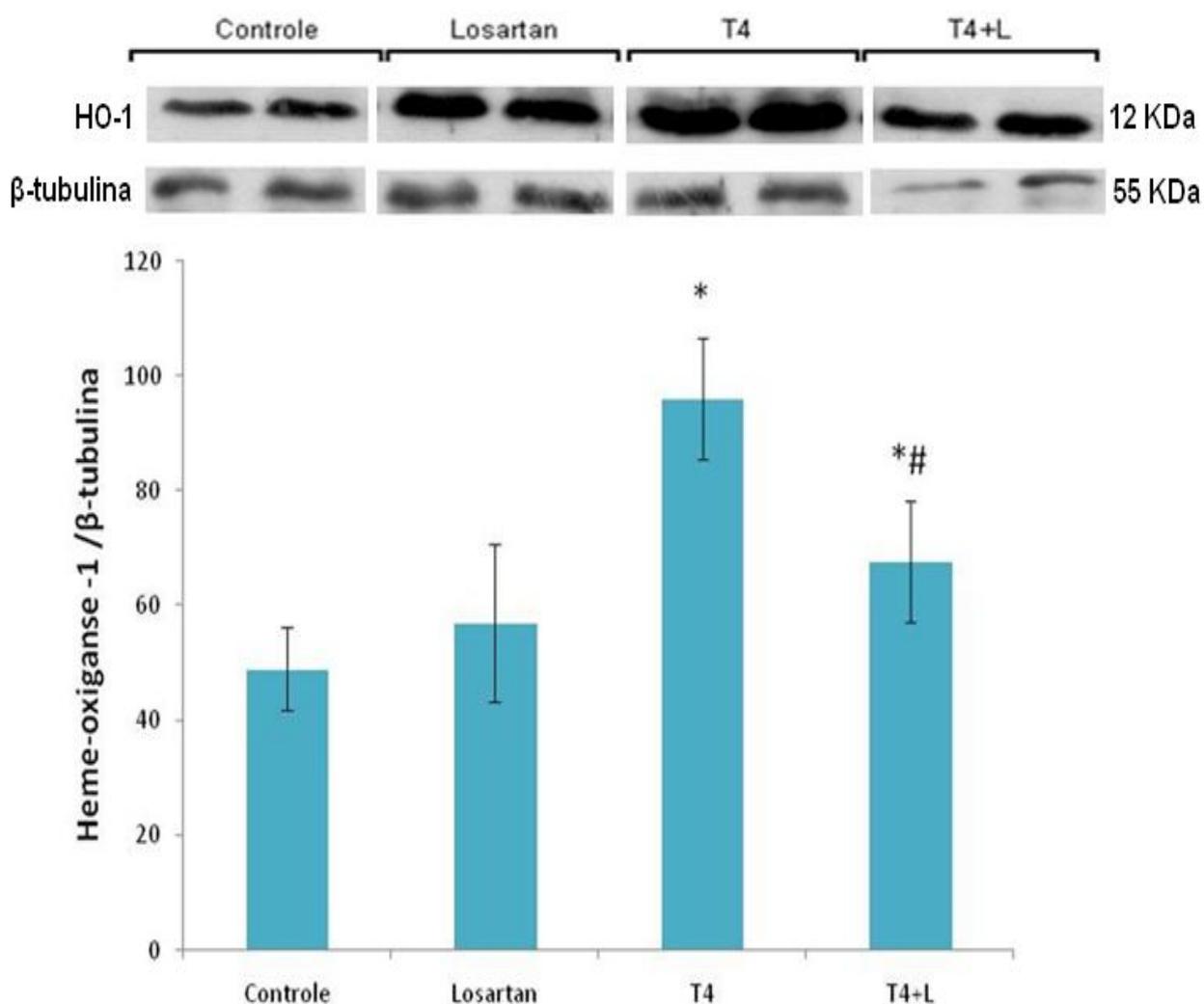
Figura 6. Imunoconteúdo do fator de transcrição Nrf-2, em densidade óptica.



Valores representam média \pm desvio padrão. *= $P < 0,05$ em relação ao grupo Controle, #= $P < 0,05$ em relação ao grupo T4 ($P < 0,05$), ($n=4$ /grupo). Gel representativo, mostrando duas bandas de cada grupo experimental.

A enzima Heme-oxigenase no grupo T4 apresentou elevação significativa de ~54% em relação ao grupo Controle ($P < 0,05$). O grupo T4+L apresentou redução significativa de ~30%, quando comparado com o grupo T4 ($P < 0,05$). Valores na Figura 7.

Figura 7. Imunoconteúdo da enzima HO, em densidade óptica.



Valores representam média \pm desvio padrão. *= $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle, #= $P < 0,05$ em relação ao grupo T4 ($P < 0,05$), ($n=4$ /grupo). Gel representativo, mostrando duas bandas de cada grupo experimental.

6.6 Correlações de Pearson

Os valores de hipertrofia cardíaca e peróxido de hidrogênio apresentaram correlação positiva direta de 0,99 ($P < 0,01$) (figura 8).

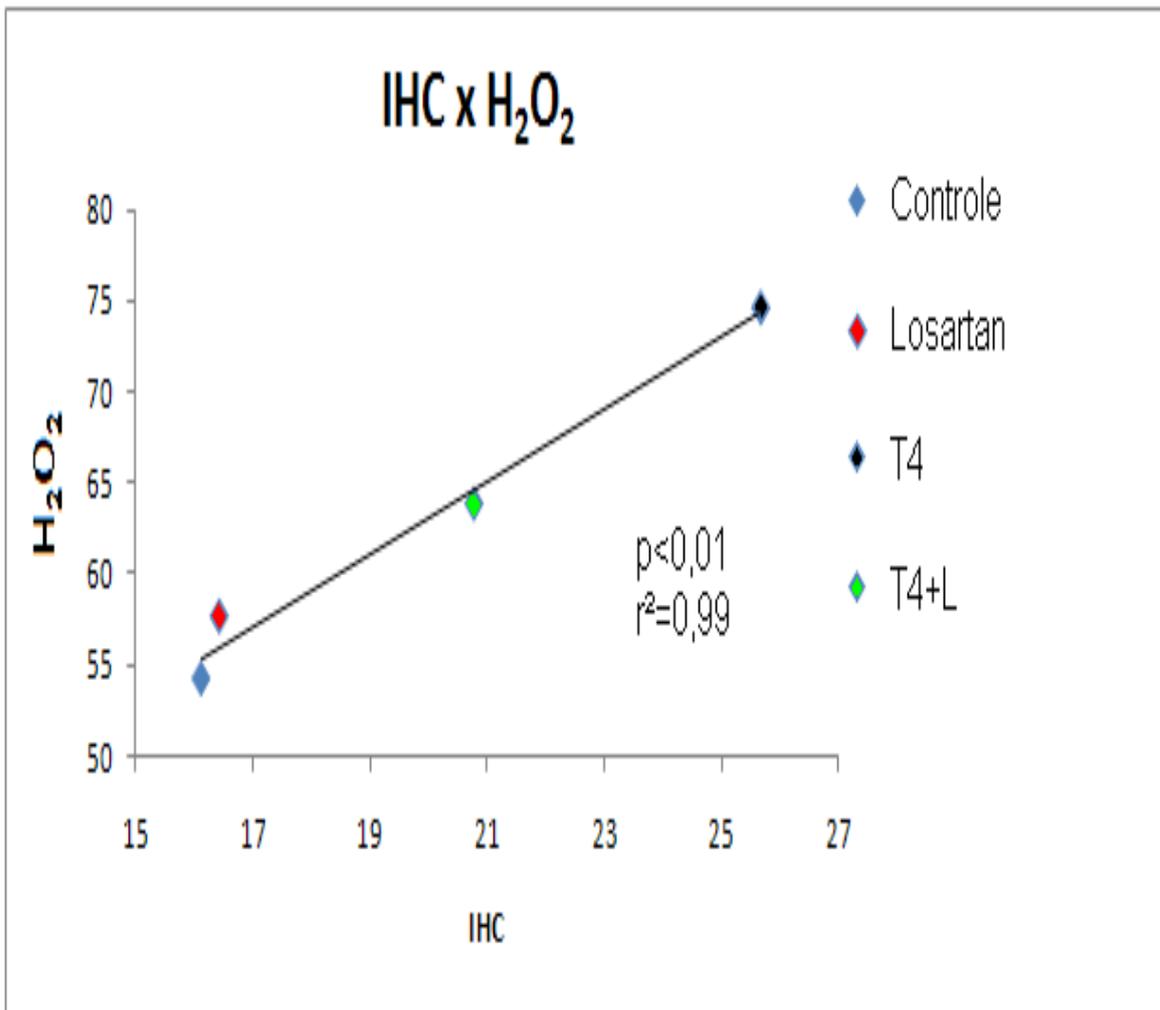
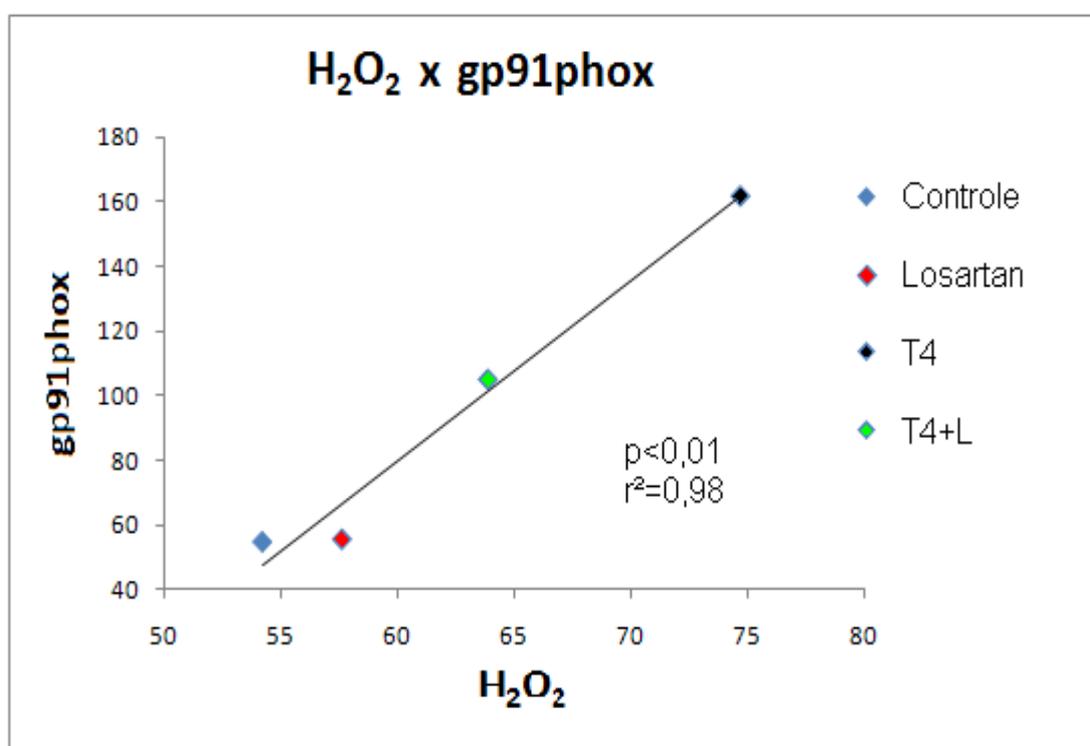


Figura 8. Correlação entre IHC e H₂O₂.

Os níveis de peróxido de hidrogênio também apresentaram correlação positiva direta de 0,98 com a expressão da subunidade gp91phox ($P < 0,01$) (Figura 9).

Figura 9. Correlação entre H_2O_2 e gp91phox



7. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi enfocada a relação entre balanço simpato-vagal cardíaco, sistema renina angiotensina e o papel das espécies ativas de oxigênio no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo. Primariamente, foi observado um desequilíbrio autonômico, indicando uma exacerbada ativação simpática (atribuída especialmente à razão LF/HF) no grupo hipertireoideo. Em segundo lugar, foi verificada influência do sistema renina angiotensina tanto no balanço autonômico quanto na hipertrofia cardíaca, uma vez que a inibição do receptor AT1 no grupo T4 gerou uma atenuação das alterações nos parâmetros espectrais e da massa cardíaca induzidos pelo hipertireoidismo. Finalmente, o bloqueio do receptor AT1 conduziu a redução não somente nos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), mas também nos sistemas de resposta ao estresse oxidativo, como o Nrf-2 a heme-oxigenase-1 (HO-1).

A confirmação do desenvolvimento do modelo de hipertireoidismo, neste estudo, se deu inicialmente pelo aumento nos níveis de hormônios da tireóide. A elevação dos níveis hormonais (aproximadamente 611% para o T4 e 230% para o T3) nos animais submetidos a este modelo experimental, sugerem um quadro de hipertireoidismo tireotóxico. Por conseguinte, esta situação possibilita um grande impacto sobre os aspectos hemodinâmicos e morfométricos cardíacos nos ratos hipertireoideos. Desta forma, foram analisados relevantes parâmetros, tais como pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica, e frequência e massa cardíaca, a fim de observar o estabelecimento do hipertireoidismo neste experimento.

Inicialmente, não foram observadas alterações na pressão arterial. Está descrito que os hormônios da tireóide exercem um importante papel vasodilator,

uma vez que modulam vias de sinalização que estimulam a síntese de vasodilatadores, como o óxido nítrico. Neste contexto, haveria uma redução da resistência periférica total associada ao aumento do débito cardíaco, induzidos pelos hormônios da tireóide. A resultante desta associação poderia ser um dos fatores importantes na manutenção dos níveis pressóricos do grupo hipertireoideo (4; 12). Neste cenário, estudos prévios do nosso grupo demonstraram um aumento da pressão sistólica ventricular esquerda e da pressão diastólica final ventricular esquerda, porém sem haver alteração na pressão arterial (63).

Por outro lado, os ratos hipertireoideos desenvolveram um expressivo aumento na frequência cardíaca. Este dado reflete o importante efeito cronotrópico positivo dos hormônios da tireóide sobre o tecido cardíaco (3). A taquicardia induzida pelo hipertireoidismo é um sintoma clínico clássico observado em pacientes hipertireoideos (44). Um amplo espectro de fatores pode influenciar as variações da frequência cardíaca, tais como sistema nervoso autônomo e sistema renina angiotensina. De fato, o grupo T4 demonstrou importante incremento na frequência cardíaca, sendo o sistema nervoso simpático um provável elemento chave neste processo no hipertireoidismo (80). Adicionalmente, também é importante a avaliação da variabilidade da frequência cardíaca, uma vez que este parâmetro pode indicar informações a respeito do controle autonômico, demonstrando a influência do balanço simpato-vagal sobre a frequência cardíaca. A diminuição na capacidade do coração de variar a sua frequência denota um relevante fator predisponente para o aparecimento de eventos cardíacos (31). Desta forma, para testar a hipótese do envolvimento do sistema autonômico, foi realizada a análise espectral para explorar aspectos como a variabilidade da frequência cardíaca, o componente de baixa frequência

normalizada (LFnu), que indica a porcentagem de atividade autônoma exercida pelo sistema nervoso simpático e o componente de alta frequência normalizada (HFnu), que indica a porcentagem de atividade autônoma exercida pelo parassimpático sobre o coração, assim como, a razão LF/HF (balanço simpato-vagal) (81). Observamos uma elevação na atividade simpática e redução da atividade vagal no coração dos ratos hipertireoideos, verificada pela diminuição da variabilidade da frequência, aumento no componente LFnu e redução no componente HFnu, neste grupo. Em relação à análise do balanço simpato-vagal, o grupo T4 demonstrou um desequilíbrio neste sistema, com predominância do sistema simpático. Portanto, estes dados sugerem que o hipertireoidismo conduz à elevação da atividade simpática sobre o tecido cardíaco. Estes dados experimentais corroboram com os achados clínicos que sugerem um estado hiperadrenérgico para os pacientes hipertireoideos. De fato, pacientes quando tratados com beta-bloqueadores, apresentam melhora dos parâmetros da análise espectral. Por outro lado, alguns autores relatam a relação entre o sistema nervoso simpático e sistema renina angiotensina no hipertireoidismo (15).

Neste contexto, procedeu-se o bloqueio do receptor tipo I da angiotensina II (AT1) com losartan, inibidor seletivo do receptor AT1. A dose utilizada (10 mg/Kg de peso corporal/dia) foi preconizada para não alterar significativamente os valores da pressão arterial (54). Como mostrado em nossos resultados, os animais tratados com losartan (grupos Losartan e T4+losartan) não apresentaram modificações significativas nos valores das pressões arteriais sistólica e diastólica. Por outro lado, a administração do losartan gerou um importante impacto sobre a frequência cardíaca dos animais hipertireoideos (grupo T4+Losartan), reduzindo-a significativamente. Do mesmo modo, este tratamento

recuperou completamente a variabilidade da frequência cardíaca nos animais hipertireoideos. Por conseguinte, os demais parâmetros da análise espectral também sofreram influência do bloqueio do receptor AT1. Os animais controles tratados com losartan (grupo Losartan) mostraram diminuição da porcentagem de atividade exercida pelo sistema nervoso simpático sobre o coração, como demonstrado pela redução do componente LFnu. Da mesma forma, os animais hipertireoideos, que receberam losartan (grupo T4+Losartan), também apresentaram um decréscimo do impacto do sistema nervoso simpático sobre o tecido cardíaco, havendo uma redução de 44%, aproximadamente, no componente LFnu em relação ao grupo T4. Por outro lado, o bloqueio do receptor AT1 nos ratos hipertireoideos levou ao aumento da porcentagem de atividade exercida pelo sistema nervoso parassimpático, indicando uma recuperação parcial da atividade vagal sobre coração, como observado pelo aumento do componente HFnu. Em verdade, o tratamento dos animais hipertireoideos com losartan promoveu uma recuperação parcial das condições fisiológicas do sistema autonômico, especialmente, do balanço simpato-vagal. A aumentada razão LF/HF dos animais hipertireoideos, indicando maior influência da ação simpática, foi significativamente reduzida pela administração de losartan no grupo T4. Estes dados sugerem uma importante comunicação entre os sistemas nervoso simpático e renina angiotensina neste modelo hipertireoidismo.

Em paralelo, o hipertireoidismo experimental também induziu o crescimento cardíaco, conforme verificado no grupo T4. O desenvolvimento da hipertrofia cardíaca é um efeito conhecido dos hormônios da tireóide (63). Neste contexto, ressalta-se o mecanismo clássico de ação dos hormônios da tireóide, em que o complexo hormônio-receptor nuclear promove a transcrição gênica de proteínas

estruturais, levando ao crescimento do miocárdio (82). Por outro lado, tem sido descrita uma ação não-clássica dos hormônios da tireóide, onde estes hormônios poderiam se ligar aos receptores na superfície da célula (proteína integrina), disparando a transdução de sinal através da via das cinases (ERK 1/2, PI3K, AKT, FRAP) na direção do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (83). Estudos prévios do nosso laboratório também demonstraram que em duas semanas de indução de hipertireoidismo (12 mg/L de T4) os animais já apresentavam hipertrofia cardíaca, porém com algumas proteínas apoptóticas ativadas (84). Adicionalmente, experimentos, em que a indução ao hipertireoidismo foi por quatro semanas, demonstraram a ativação de vias de sinalização para o crescimento (AKT e ERK 1/2) associada ao estabelecimento da hipertrofia e sinais de insuficiência cardíaca (63; 85). Ademais, também tem sido atribuído papel importante ao sistema renina angiotensina, como modulador desta via de sinalização para o crescimento cardíaco no hipertireoidismo (86).

Recentemente, dados da literatura demonstraram que os hormônios da tireóide estimulam a ativação do sistema renina angiotensina no coração, levando ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (47). Protocolos experimentais *in vivo* demonstraram importante participação do receptor AT1, neste contexto (86). Em um estudo *in vivo* prévio de nosso laboratório, foi observado aumento na expressão protéica dos receptores AT1 e AT2 nos ratos hipertireoideos, o qual estava associado com o aumento da massa cardíaca (87). Assim, como foi visto no presente estudo, os animais hipertireoideos, que desenvolveram hipertrofia cardíaca, apresentaram maior expressão protéica do receptor AT1 em relação aos seus respectivos controles. Com base nisto, para avaliar o envolvimento efetivo do sistema renina angiotensina nas alterações cardíacas no presente

estudo, o grupo hipertireoideo foi tratado com losartan, um bloqueador específico do receptor AT1.

Nossos resultados mostraram que a inibição do receptor AT1 pelo losartan em animais hipertireoideos promoveu a redução do índice de hipertrofia cardíaca no grupo T4+L, sugerindo um envolvimento efetivo deste sistema como modulador do crescimento da massa cardíaca no hipertireoidismo. Todavia, não houve alteração na expressão protéica deste receptor no grupo hipertireoideo tratado com losartan. Este fato denota que não apenas a expressão do receptor AT1, mas também a sinalização intracelular, por ele desencadeada, é importante na ativação do desenvolvimento do tecido cardíaco induzido pelos hormônios da tireoide.

Desta forma, foram avaliados os mecanismos moleculares associados à transdução de sinal a partir do receptor AT1, nos corações hipertireoideos (47). Neste estudo, foi observado o papel importante da NADPH oxidase na ativação do sistema renina angiotensina induzida pelo hipertireoidismo (88). Em 2011, Araujo e colaboradores demonstraram aumento no imunocontéudo da subunidade gp91phox nos ratos hipertireoideos (87). Estes dados corroboram com este estudo, em que também se observou uma elevação na expressão protéica desta subunidade, nos grupo hipertireoideo, sendo que o tratamento com losartan promoveu significativa redução no imunocontéudo desta proteína.

Somado a isto, a NADPH oxidase é uma importante enzima geradora de ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), sendo este radical livre um possível intermediário na sinalização intracelular na transdução de sinal do receptor AT1 (89). O tratamento dos animais hipertireoideos com losartan poderia diminuir a produção desta espécie ativa de oxigênio, uma vez que, no grupo T4+losartan, a expressão

protéica desta foi diminuída. Desta forma, reduzindo a sinalização para o crescimento celular no coração dos ratos hipertireoideos.

A relação entre os hormônios da tireóide e as espécies ativas de oxigênio (EAO) é largamente estudada (63; 90; 91). Classicamente, o consumo de oxigênio induzido pelos hormônios da tireóide pode levar não somente ao aumento na geração de EAO, como também à respostas contra-regulatórias (92). Neste estudo, o grupo T4 apresentou níveis mais elevados de H_2O_2 . Ao H_2O_2 têm sido atribuídas funções envolvidas não somente com o estresse oxidativo, mas também no processo de sinalização intracelular na homeostase do crescimento celular no tecido cardíaco (93). De fato, existe uma correlação positiva ($r=0,99$ $P<0,01$) entre os níveis de H_2O_2 com o índice de hipertrofia cardíaca (IHC) neste modelo de hipertireoidismo. Dados da literatura claramente demonstram que o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca está associado à produção desta espécie ativa de oxigênio (94). Resultados prévios do nosso laboratório indicaram a associação entre a ativação de proteínas de sobrevivência (por exemplo, AKT), hipertrofia cardíaca e aumento de peróxido de hidrogênio no hipertireoidismo, bem como, uma significativa redução destes fatores com a administração de um antioxidante (95). Em paralelo, o sistema renina angiotensina também contribui para a produção de EAO no hipertireoidismo. A estimulação da angiotensina II sobre o receptor AT1 promove uma transdução de sinal mediante ativação da NADPH oxidase, como referido acima. O $O_2^{\cdot-}$ produzido pela NADPH oxidase poderia ser dismutado pela superóxido dismutase (SOD), levando à formação peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (96). Neste cenário, foi demonstrado um aumento nos níveis de SOD, não somente em relação à sua atividade, mas também na expressão protéica desta enzima, no hipertireoidismo (63). Este sistema poderia

explicar, em parte, o aumento do H_2O_2 no grupo hipertireoideo. Nossos resultados também apresentaram uma correlação positiva ($r=0,98$ $P<0,01$) entre os níveis de H_2O_2 e gp91phox, demonstrando uma possível interação entre o sistema renina angiotensina e a geração de EAO no hipertireoidismo. Neste contexto, os ratos hipertireoideos tratados com losartan apresentaram uma redução dos níveis de H_2O_2 , reforçando que a ativação do receptor AT1 exerce um relevante papel na formação de EAO no hipertireoidismo. As variações nos níveis de H_2O_2 podem modular algumas proteínas sensíveis ao estado redox ativando ou inibindo-as (66). Dentre estas proteínas, pode-se destacar o complexo Nrf-2- Keap1.

A proteína Keap1 forma um dímero com o Nrf-2 e promove sua degradação proteossomal. O Keap1 é rico em resíduos de cisteína reduzidos (SH-), sendo sensível à oxidação. Quando o Keap1 é oxidado, ocorre uma mudança na sua conformação, levando ao seu desligamento do Nrf-2 no citoplasma. Este último, quando livre, é um importante fator de transcrição que modula a expressão gênica de um amplo espectro de proteínas antioxidantes, tais como enzimas da via da glutathione, como glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase (68). Nossos resultados mostraram um aumento na expressão protéica do Nrf-2 que foi associado aos níveis elevados de H_2O_2 no grupo hipertireoideo. Estes dados estão em concordância com os achados de Araujo e colaboradores, 2010 (97). Entretanto, o grupo hipertireoideo tratado com losartan apresentou uma pequena, mas significativa, redução na expressão desta proteína ($P<0,05$). É possível que as concentrações mais baixas de H_2O_2 , no grupo T4+Losartan, tenham influenciado na redução da expressão protéica do Nrf-2. Outra proteína modulada pelo Nrf-2 é a heme-oxigenase-1 (HO-1).

A HO-1 é uma proteína que está envolvida no metabolismo do grupo heme, cujos metabólitos exercem um potente papel antioxidante. Em paralelo, a HO-1 também pode atuar como uma proteína cardioprotetora. Alguns autores demonstraram que HO-1 poderia agir como uma proteína moduladora do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, impedindo a sua progressão para insuficiência cardíaca (69). Nossos resultados mostraram que hipertireoidismo levou ao aumento da expressão protéica desta proteína. A elevação nos níveis da HO-1 pode ser uma resposta contra-regulatória ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, no hipertireoidismo. Adicionalmente, cabe ressaltar também seu papel antioxidante, uma vez que as concentrações de H_2O_2 estão elevadas no grupo T4. Por outro lado, o tratamento do grupo T4 com losartan diminuiu a expressão protéica da HO-1. Este fenômeno poderia estar relacionado não somente à redução de peróxido, mas também à diminuição da massa cardíaca no grupo T4+Losartan. De fato, o mesmo perfil foi verificado com a hipertrofia cardíaca, indicando associação entre o sistema renina angiotensina e a resposta celular da HO-1 no tecido cardíaco de ratos hipertireoideos.

Em resumo, a inibição do receptor AT1 promoveu importante impacto no balanço simpato-vagal cardíaco, no hipertireoidismo. Somado a isto, o tratamento com losartan, nos ratos hipertireoideos, também reduziu a massa cardíaca, demonstrando participação crítica do sistema renina angiotensina no estabelecimento da hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo. Ademais, as concentrações de H_2O_2 e de proteínas contra-regulatórias, tais como Nrf-2 e HO-1, foram sensíveis ao bloqueio do receptor AT1. Estes dados sugerem que o ambiente redox celular constitui importante mediador das alterações cardíacas funcionais e morfológicas, no hipertireoidismo.

8. CONCLUSÕES

- O tratamento com T4 diluído na água de beber foi efetivo em induzir o hipertireoidismo, de acordo com os níveis séricos dos hormônios da tireóide;
- O hipertireoidismo promoveu alteração no controle autonômico cardíaco, demonstrado pela análise espectral do domínio da frequência, possivelmente por modular a ação adrenérgica sobre o coração, bem como pela ação sobre o sistema renina angiotensina;
- O hipertireoidismo foi capaz de induzir hipertrofia cardíaca, reduzida pelo Losartan, sugerindo a participação do sistema renina angiotensina no estabelecimento da hipertrofia cardíaca induzida pelos hormônios da tireoide;
- Os hormônios da tireóide promoveram aumento da expressão protéica do receptor AT1 e da subunidade gp91phox, sugerindo uma modulação destes hormônios sobre estas proteínas no tecido cardíaco;
- O aumento nos níveis dos hormônios da tireóide promoveu desequilíbrio redox, através do acúmulo de H₂O₂, induzindo aumento da expressão das proteínas redox-sensíveis contra-regulatórias Nrf-2 e HO-1, que modulam a hipertrofia cardíaca e com possível participação do sistema renina angiotensina.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aires MdM: *Fisiologia*. Rio de Janeiro, Guanabara koogan, 2008
2. Yen PM: Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 81:1097-1142, 2001
3. Klein I, Danzi S: Thyroid disease and the heart. *Circulation* 116:1725-1735, 2007
4. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ: Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 31:139-170, 2010
5. Hiroi Y, Kim HH, Ying H, Furuya F, Huang Z, Simoncini T, Noma K, Ueki K, Nguyen NH, Scanlan TS, Moskowitz MA, Cheng SY, Liao JK: Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14104-14109, 2006
6. Puzianowska-Kuznicka M, Pietrzak M, Turowska O, Nauman A: Thyroid hormones and their receptors in the regulation of cell proliferation. *Acta Biochim Pol* 53:641-650, 2006
7. Fazio S, Palmieri EA, Lombardi G, Biondi B: Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res* 59:31-50, 2004
8. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS: *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier, 2010
9. Vanderpump MP: The epidemiology of thyroid disease. *Br Med Bull* 99:39-51, 2010
10. Danzi S, Klein I: Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Minerva Endocrinol* 29:139-150, 2004

11. Kahaly GJ, Dillmann WH: Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev* 26:704-728, 2005
12. Napoli R, Guardasole V, Angelini V, Zarra E, Terracciano D, D'Anna C, Matarazzo M, Oliviero U, Macchia V, Sacca L: Acute effects of triiodothyronine on endothelial function in human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92:250-254, 2007
13. Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ: Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res* 77:265-273, 2008
14. Kenessey A, Ojamaa K: Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. *J Biol Chem* 281:20666-20672, 2006
15. Hu LW, Benvenuti LA, Liberti EA, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML: Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R1473-1480, 2003
16. Swynghedauw B: Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 79:215-262, 1999
17. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N: Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* 35:569-582, 2000
18. Bristow MR: Why does the myocardium fail? Insights from basic science. *Lancet* 352 Suppl 1:S18-14, 1998

19. Pfeffer MA: Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Annu Rev Med* 46:455-466, 1995
20. Kacimi R, Gerdes AM: Alterations in G protein and MAP kinase signaling pathways during cardiac remodeling in hypertension and heart failure. *Hypertension* 41:968-977, 2003
21. Richey PA, Brown SP: Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: a review. *J Sports Sci* 16:129-141, 1998
22. Kempf T, Wollert KC: Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. *Bioessays* 26:608-615, 2004
23. Carreno JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE: [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. *Rev Esp Cardiol* 59:473-486, 2006
24. Fortuno MA, Ravassa S, Fortuno A, Zalba G, Diez J: Cardiomyocyte apoptotic cell death in arterial hypertension: mechanisms and potential management. *Hypertension* 38:1406-1412, 2001
25. Klein I: Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: time course of development and inhibition by propranolol. *Endocrinology* 123:203-210, 1988
26. Marchant C, Brown L, Sernia C: Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 22:449-455, 1993
27. Sanford CF, Griffin EE, Wildenthal K: Synthesis and degradation of myocardial protein during the development and regression of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circ Res* 43:688-694, 1978

28. Siehl D, Chua BH, Lautensack-Belser N, Morgan HE: Faster protein and ribosome synthesis in thyroxine-induced hypertrophy of rat heart. *Am J Physiol* 248:C309-319, 1985
29. Barreto-Chaves ML, Carrillo-Sepulveda MA, Carneiro-Ramos MS, Gomes DA, Diniz GP: The crosstalk between thyroid hormones and the Renin-Angiotensin System. *Vascul Pharmacol* 52:166-170, 2009
30. Schluter KD, Wenzel S: Angiotensin II: a hormone involved in and contributing to pro-hypertrophic cardiac networks and target of anti-hypertrophic cross-talks. *Pharmacol Ther* 119:311-325, 2008
31. Reis DJ, Golanov EV: Autonomic and vasomotor regulation. *Int Rev Neurobiol* 41:121-149, 1997
32. Moraes RS, Ferlin EL, Polanczyk CA, Rohde LE, Zaslavski L, Gross JL, Ribeiro JP: Three-dimensional return map: a new tool for quantification of heart rate variability. *Auton Neurosci* 83:90-99, 2000
33. Morris M, Key MP, Farah V: Sarin produces delayed cardiac and central autonomic changes. *Exp Neurol* 203:110-115, 2007
34. Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S: Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84:482-492, 1991
35. Montano N, Porta A, Cogliati C, Costantino G, Tobaldini E, Casali KR, Iellamo F: Heart rate variability explored in the frequency domain: a tool to investigate the link between heart and behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 33:71-80, 2009
36. Acharya R, Kumar A, Bhat PS, Lim CM, Iyengar SS, Kannathal N, Krishnan SM: Classification of cardiac abnormalities using heart rate signals. *Med Biol Eng Comput* 42:288-293, 2004

37. Cerutti C, Barres C, Paultre C: Baroreflex modulation of blood pressure and heart rate variabilities in rats: assessment by spectral analysis. *Am J Physiol* 266:H1993-2000, 1994
38. Goldberger JJ, Challapalli S, Tung R, Parker MA, Kadish AH: Relationship of heart rate variability to parasympathetic effect. *Circulation* 103:1977-1983, 2001
39. Iwasaki K, Zhang R, Zuckerman JH, Levine BD: Dose-response relationship of the cardiovascular adaptation to endurance training in healthy adults: how much training for what benefit? *J Appl Physiol* 95:1575-1583, 2003
40. Mainardi LT, Bianchi AM, Baselli G, Cerutti S: Pole-tracking algorithms for the extraction of time-variant heart rate variability spectral parameters. *IEEE Trans Biomed Eng* 42:250-259, 1995
41. Parati G, Saul JP, Di Rienzo M, Mancia G: Spectral analysis of blood pressure and heart rate variability in evaluating cardiovascular regulation. A critical appraisal. *Hypertension* 25:1276-1286, 1995
42. Ribeiro TF, Azevedo GD, Crescencio JC, Maraes VR, Papa V, Catai AM, Verzola RM, Oliveira L, Silva de Sa MF, Gallo Junior L, Silva E: Heart rate variability under resting conditions in postmenopausal and young women. *Braz J Med Biol Res* 34:871-877, 2001
43. Pecis M, Azevedo MJ, Moraes RS, Ferlin EL, Gross JL: Autonomic dysfunction and urinary albumin excretion rate are associated with an abnormal blood pressure pattern in normotensive normoalbuminuric type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 23:989-993, 2000
44. Burggraaf J, Tulen JH, Lalezari S, Schoemaker RC, De Meyer PH, Meinders AE, Cohen AF, Pijl H: Sympathovagal imbalance in hyperthyroidism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E190-195, 2001

45. Chen JL, Chiu HW, Tseng YJ, Chu WC: Hyperthyroidism is characterized by both increased sympathetic and decreased vagal modulation of heart rate: evidence from spectral analysis of heart rate variability. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:611-616, 2006
46. Desai MY, Watanabe MA, Laddu AA, Hauptman PJ: Pharmacologic modulation of parasympathetic activity in heart failure. *Heart Fail Rev* 16:179-193
47. Carneiro-Ramos MS, Diniz GP, Nadu AP, Almeida J, Vieira RL, Santos RA, Barreto-Chaves ML: Blockage of angiotensin II type 2 receptor prevents thyroxine-mediated cardiac hypertrophy by blocking Akt activation. *Basic Res Cardiol* 105:325-335, 2010
48. Lavoie JL, Sigmund CD: Minireview: overview of the renin-angiotensin system-an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 144:2179-2183, 2003
49. Varagic J, Frohlich ED: Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol* 34:1435-1442, 2002
50. Das DK, Maulik N, Engelman RM: Redox regulation of angiotensin II signaling in the heart. *J Cell Mol Med* 8:144-152, 2004
51. Bomback AS, Toto R: Dual blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: beyond the ACE inhibitor and angiotensin-II receptor blocker combination. *Am J Hypertens* 22:1032-1040, 2009
52. Bader M, Ganten D: Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med (Berl)* 86:615-621, 2008
53. Pantos C, Paizis I, Mourouzis I, Moraitis P, Tzeis S, Karamanoli E, Mourouzis C, Karageorgiou H, Cokkinos DV: Blockade of angiotensin II type 1 receptor

diminishes cardiac hypertrophy, but does not abolish thyroxin-induced preconditioning. *Horm Metab Res* 37:500-504, 2005

54. Crespo MJ, Cruz N, Altieri PI, Escobales N: Enalapril and losartan are more effective than carvedilol in preventing dilated cardiomyopathy in the Syrian cardiomyopathic hamster. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 13:199-206, 2008

55. Ong HT: Are angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers especially useful for cardiovascular protection? *J Am Board Fam Med* 22:686-697, 2009

56. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1-40, 2006

57. Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, 2007

58. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84, 2007

59. Del Maestro RF: An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol Scand Suppl* 492:153-168, 1980

60. Meneghini R: A toxicidade do oxigênio. *Ciência e Cultura* 5:57-62, 1987

61. Yu BP: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162, 1994

62. McCord JM: Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 46:2402-2406, 1987

63. Araujo AS, Ribeiro MF, Enzweiler A, Schenkel P, Fernandes TR, Partata WA, Irigoyen MC, Llesuy S, Bello-Klein A: Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrinol* 249:133-139, 2006
64. Sies H, Mehlhorn R: Mutagenicity of nitroxide-free radicals. *Arch Biochem Biophys* 251:393-396, 1986
65. Goodlett CR, Horn KH, Zhou FC: Alcohol teratogenesis: mechanisms of damage and strategies for intervention. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:394-406, 2005
66. Jones DP: Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8:1865-1879, 2006
67. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Singh A, Blake DJ, Ling G, Wakabayashi N, Fujii J, Myers A, Biswal S: Nrf-2-regulated glutathione recycling independent of biosynthesis is critical for cell survival during oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 46:443-453, 2009
68. Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S: Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf-2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:89-116, 2007
69. Cao J, Inoue K, Li X, Drummond G, Abraham NG: Physiological significance of heme oxygenase in hypertension. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1025-1033, 2009
70. Vera T, Kelsen S, Yanes LL, Reckelhoff JF, Stec DE: HO-1 induction lowers blood pressure and superoxide production in the renal medulla of angiotensin II hypertensive mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R1472-1478, 2007

71. Civil C: Procedimentos para Uso Científico de Animais. Brasil, Diário Oficial da União, 2008

72. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S: Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71:241-249, 1985

73. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951

74. Ferreira AWÁ, S. L. M.: *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infeciosas e Auto-ímmunes*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001

75. Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG: Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 243:H941-947, 1982

76. Bertagnolli M, Schenkel PC, Campos C, Mostarda CT, Casarini DE, Bello-Klein A, Irigoyen MC, Rigatto K: Exercise training reduces sympathetic modulation on cardiovascular system and cardiac oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 21:1188-1193, 2008

77. Ishise H, Asanoi H, Ishizaka S, Joho S, Kameyama T, Umeno K, Inoue H: Time course of sympathovagal imbalance and left ventricular dysfunction in conscious dogs with heart failure. *J Appl Physiol* 84:1234-1241, 1998

78. Pick E, Keisari Y: A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38:161-170, 1980

79. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970

80. Klein I, Ojamaa K: Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 344:501-509, 2001
81. Casu M, Cappi C, Patrone V, Repetto E, Giusti M, Minuto F, Murialdo G: Sympatho-vagal control of heart rate variability in patients treated with suppressive doses of L-thyroxine for thyroid cancer. *Eur J Endocrinol* 152:819-824, 2005
82. Danzi S, Dubon P, Klein I: Effect of serum triiodothyronine on regulation of cardiac gene expression: role of histone acetylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1506-1511, 2005
83. Kuzman JA, Vogelsang KA, Thomas TA, Gerdes AM: L-Thyroxine activates Akt signaling in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 39:251-258, 2005
84. Fernandes RO, Dreher GJ, Schenkel PC, Fernandes TR, Ribeiro MF, Araujo AS, Bello-Klein A: Redox status and pro-survival/pro-apoptotic protein expression in the early cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *Cell Biochem Funct* 29:617-623
85. Araujo AS, Fernandes T, Ribeiro MF, Khaper N, Bello-Klein A: Redox regulation of myocardial ERK 1/2 phosphorylation in experimental hyperthyroidism: role of thioredoxin-peroxiredoxin system. *J Cardiovasc Pharmacol* 56:513-517, 2010
86. Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML: Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3beta/mTOR signaling pathway. *Basic Res Cardiol* 104:653-667, 2009
87. Araujo AS, Diniz GP, Seibel FE, Branchini G, Ribeiro MF, Brum IS, Khaper N, Barreto-Chaves ML, Bello-Klein A: Reactive oxygen and nitrogen species balance in the determination of thyroid hormones-induced cardiac hypertrophy mediated by renin-angiotensin system. *Mol Cell Endocrinol* 333:78-84, 2011

88. Soccio M, Toniato E, Evangelista V, Carluccio M, De Caterina R: Oxidative stress and cardiovascular risk: the role of vascular NAD(P)H oxidase and its genetic variants. *Eur J Clin Invest* 35:305-314, 2005
89. Nakagami H, Takemoto M, Liao JK: NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 35:851-859, 2003
90. Venditti P, Bari A, Di Stefano L, Di Meo S: Tri-iodothyronine treatment differently affects liver metabolic response and oxidative stress in sedentary and trained rats. *J Endocrinol* 197:65-74, 2008
91. Venditti P, Di Meo S: Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 63:414-434, 2006
92. Videla LA, Sir T, Wolff C: Increased lipid peroxidation in hyperthyroid patients: suppression by propylthiouracil treatment. *Free Radic Res Commun* 5:1-10, 1988
93. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS: H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 35:615-621, 2003
94. Kobayashi-Miura M, Shioji K, Hoshino Y, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J: Oxygen sensing and redox signaling: the role of thioredoxin in embryonic development and cardiac diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H2040-2050, 2007
95. Araujo AS, Schenkel P, Enzweiler AT, Fernandes TR, Partata WA, Llesuy S, Ribeiro MF, Khaper N, Singal PK, Bello-Klein A: The role of redox signaling in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *J Mol Endocrinol* 41:423-430, 2008

96. Halliwell B: Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35:1147-1150, 2007

97. Araujo AS, Fernandes T, Ribeiro MF, Khaper N, Bello-Klein A: Redox regulation of myocardial ERK 1/2 phosphorylation in experimental hyperthyroidism: role of thioredoxin-peroxiredoxin system. *J Cardiovasc Pharmacol* 56:513-517