IVSON BEZERRA DA SILVA

**EFEITO CARDIOPROTETOR DO HORMÔNIO TIREOIDIANO
NO MODELO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO:
PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2016

IVSON BEZERRA DA SILVA

**EFEITO CARDIOPROTETOR DO HORMÔNIO TIREOIDIANO
NO MODELO DE ISQUEMIA/REPERFUSÃO:
PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.
Área de concentração: Ciências Morfofuncionais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Moraes Barreto de Chaves.

Co-Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira.

Versão Original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Ivson Bezerra da.

Efeito cardioprotetor do hormônio tireoidiano no modelo de isquemia/reperfusão: participação do sistema renina angiotensina / Ivson Bezerra da Silva. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Ação hormonal na fisiopatologia cardiovascular.

Versão do título para o inglês: Cardioprotective effect of thyroid hormone in ischemia/reperfusion experimental model: role of renin angiotensin system.

1. Cardioproteção 2. Receptor AT2 3. Isquemia/reperfusão 4. Hormônio tireoidiano 5. Óxido nítrico 6. Metabolismo mitocondrial I. Chaves, Profa. Dra. Maria Luiza Morais Barreto de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB043/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ivson Bezerra da Silva.

Título da Tese: Efeito cardioprotetor do hormônio tireoidiano no modelo de isquemia/reperfusão: participação do sistema renina angiotensina.

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone +(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **120** nas fls. **109** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Maria Luiza Moraes Barreto de Chaves**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel do receptor de Angiotensina II do tipo 2 (AT2) no efeito cardioprotetor do hormônio tiroideano, em modelo de isquemia/Reperusão*" do qual participam o(s) aluno(s) **Ivson Bezerra da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **05.10.2011**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 10 de outubro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of. CEUA. 066.14

São Paulo, 08 de setembro de 2014.

REF.: Protocolo nº 120/11.

" Papel do receptor de Angiotensina II do tipo 2 (AT2) no efeito cardioprotetor do hormônio tiroideano, em modelo de Isquemia/Reperusão"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 05.10.2017.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.

Profa- Dra. Maria Lulza Moraes Barreto de Chaves
Departamento de Anatomia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

*Ao Lucas,
aquele que eu ainda não vi,
mas que já mudou para sempre minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai de amor, por ter me dado sabedoria, força, paciência e grandes oportunidades de realizar aquilo que satisfaz meu coração. Ser cientista me fez entender um pouco mais a forma perfeita como o Senhor criou todas as coisas.

Aos primeiros responsáveis por tudo isto, Inaldo Silva e Elizamar Silva, os melhores pais que Deus poderia me dar. Obrigado pelo empenho na minha educação, pelos valores passados e por tantas vezes abrirem mão dos seus sonhos para que eu pudesse sonhar os meus. Ao meu irmão Inaldo Júnior, Guego, que com amor sempre esteve na torcida e no incentivo, seja ele por palavras ou financeiro. Este título é nosso. Perdoem-me pela ausência em tantos momentos importantes em nossa família, a dedicação para conclusão deste trabalho foi a maneira que encontrei de dizer obrigado por tudo. A distância destes anos me fez entender que vocês são meu maior tesouro, estou voltando pra casa. Amo vocês.

À pessoa que eu escolhi compartilhar sonhos e planos pelo resto da minha vida, Cinthya Albuquerque. Obrigado por abraçar a causa e embarcar nesta longa viagem, abrir mão dos seus sonhos para sonhar outros desconhecidos junto comigo. Obrigado por enfrentar a loucura das cidades grandes. Eu não conseguiria chegar até aqui se não fosse sua compreensão, paciência e dedicação para que este sonho se tornasse real. Obrigado por todos os finais de semana que você me acompanhou no laboratório, por ser minha aluna de iniciação científica (IC) preferida, por me buscar quando eu ficava até tarde na USP, pela torcida quando eu precisava apresentar seminários, qualificações ou simplesmente teria uma prova em alguma disciplina. Este título também é seu, minha doutora, te amo.

Aos segundos pais que a vida me presenteou, Aloízio Santos e Lea Santos, por todo apoio torcida e investimento. A Christiane Laís Morais e Isaque Morais, irmãos que a vida graciosamente me deu. Amo vocês.

À minha amiga e orientadora Maria Luiza, por quem tenho extrema admiração e respeito, com quem aprendi coisas que vão além da academia, aprendi sobre a vida. Sua confiança em meu trabalho sempre excedeu a

expectativa que eu tinha sobre mim mesmo. Como disse Mahatma Gandhi (1883-1944): um pai sábio deixa que os filhos cometam erros, é bom que, de quando em quando, queimem os dedos. Foi assim muitas vezes, você permitiu que eu tomasse minhas próprias decisões, mesmo sabendo que não eram as melhores, foi desta maneira que você me ensinou respeitando minhas próprias vontades. Obrigado por todo o esforço, desde meu estágio “fragmentado” Recife-São Paulo (2009-2011), para me manter no laboratório, serei eternamente grato e espero ter oportunidade de fazer o mesmo por outras pessoas. Obrigado por abrir as portas do laboratório e permitir que o LBCAF (Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional) se tornasse minha segunda casa, por vezes a primeira.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Julio Cesar, por todo auxílio e por disponibilizar o laboratório coordenado por ele para que eu pudesse realizar os experimentos.

Ao Prof. Dr. Aníbal Moura por disponibilizar o laboratório da UERJ, assim como sua equipe de trabalho para que eu pudesse ter o primeiro contato com a técnica de Langendorff em camundongos. Um agradecimento especial à doutoranda Anatalia Kutianski que de maneira muito gentil se dispôs a me ajudar no tempo em que estive no Rio de Janeiro.

Ao Prof. Dr. Robson Santos que se faz presente desde o início deste trabalho, disponibilizando a linhagem dos animais *knockout* para o receptor AT2, ofertando o laboratório de Hipertensão da UFMG, assim como toda a equipe. Obrigado aos técnicos do laboratório, e ao doutorando Jônathas Almeida pela ajuda quando estive em Belo Horizonte.

À família LBCAF. Aos que fizeram parte: Prof. Dr. Renato Chopard (*in memoriam*) obrigado pelos ensinamentos anatômicos e por dar nome ao evento que me trouxe até à USP; Dra. Dayane Santos, obrigado por ser minha primeira mentora no LBCAF, por disponibilizar seu tempo e conhecimento compartilhando comigo; MSc. Felix Meira, um irmão com o qual eu tive oportunidade de conviver dentro e fora do LBCAF, um amigo que me ensinou grande parte do que fiz durante a pós-graduação, você continua fazendo falta no laboratório; Dra. Cristina Fürstenau, sua alegria contagia todos a sua volta, obrigado por alegrar nossos dias no laboratório, obrigado pelo incentivo, pelos

conselhos, pelas cantorias, você faz muita falta; MSc. Caroline Emy, a ex-integrante mais LBCAF que existe, que bom que a vida me proporcionou ter você como amiga mesmo você tendo concluído seu ciclo no laboratório, você é uma pessoa muito especial que faz muita falta na vida de todos os que tiveram o privilégio de um dia conviver com você; MSc. Priscilla Monteiro, obrigado por sua ajuda nos meus primeiros meses no LBCAF; MSc. Maria Brito obrigado por sua disposição em servir, você é um ser humano fantástico; Mary obrigado pelo cuidado materno, pelo carinho e preocupação, por atentar para detalhes que vão além da vida acadêmica. A equipe atual: Dra. Ana Paula Taniguti, muito obrigado por sua torcida de sempre, por seus conselhos, foi muito bom aprender com você todo este tempo, sua conduta me ensina; Dra. Ana Paula Takano, obrigado por estar disponível todas as vezes que precisei da sua ajuda, você nunca hesitou em me socorrer, valeu; MSc. Caroline Lino, como agradecer a esta pessoa incrível que me irrita e me faz admirá-la todos os dias, você é uma cientista brilhante e eu aprendo muito com você todos os dias, muito obrigado por toda a sua ajuda e amizade, e, por favor, tente não chorar ao ler este agradecimento (missão impossível); MSc. Nathália Senger, você é uma pessoa incrível que faz muito bem a todos os que estão ao seu redor, sempre disponível a ajudar a todos que precisam de você, sentirei muito a sua falta, sua serenidade me inspira; MSc. Elaine Castilho, muito obrigado por sua ajuda e atenção de sempre, foi muito bom compartilhar momentos na pós com você, você é uma pessoa extremamente competente e eu estarei torcendo por você sempre; Denicio Sousa, obrigado pela disposição em ajudar sempre que precisei, convivemos pouco na bancada, mas foi o suficiente pra saber que você é um cara incrível; Camila Moreno, você é a IC mais pós-graduanda que eu já conheci, muito obrigado por estar sempre tão engajada em tudo no laboratório e sempre dizer sim quando precisei de você, valeu; Marina Fevereiro, a melhor técnica em laboratório que o LBCAF poderia ter, obrigado por usar da sua competência para ajudar a todos, sempre preocupada com a qualidade do que fazíamos, você esteve disposta a nos ajudar, sem sua ajuda e persistência com a genotipagem este trabalho não teria saído, muito obrigado Má; À Prof. Dra. Gabriela Placoná Diniz, pessoa que tive oportunidade de conhecer quando ela ainda era aluna de doutorado no LBCAF, hoje professora

da USP, mas que continua o mesmo ser, disposta a ajudar, extremamente comprometida com o que faz, você me inspira, quando crescer quero ser igual a você, muito obrigado por tudo.

Aos integrantes do LISB (Laboratório de Integração dos Sistemas Biológicos) que sempre me receberam muito bem e me ajudaram sempre que eu precisei, a MSc. Kátia Gomes e a Dra. Cintia Ueta por discutirem e participarem de alguns ensaios mitocondriais. Agradecimento especial à amiga e companheira de bancada MSc. Vanessa Lima, sem você eu não teria conseguido, obrigado por todo o tempo dedicado aos intermináveis isolamentos de mitocôndrias, que por vezes começavam muito cedo e terminavam muito tarde e ainda se estendiam para os finais de semana. Van você sempre esteve disposta a me ajudar, você não foi simplesmente uma companheira de bancada, você é uma amiga que eu levarei por toda vida, sem sua competência e experiência este trabalho não teria a mesma cara. Muito grato por tudo, não conseguirei demonstrar minha gratidão com palavras.

Aos amigos e professores da turma Fisioterapia 75 UFPE, que mesmo distantes estiveram tantas vezes presentes. Aos amigos mais próximos: Caroline França, Débora Wanderley, Hamilton Sekitani, Lucinaldo Albuquerque, Luíza Moneta, Milka Higina e Renata Pereira. Em especial a minha amiga-irmã Deniele Lós, que esteve muito presente durante todo este tempo na torcida, nos conselhos, nas correções de texto, no compartilhamento dos artigos, Deni sem você este trabalho não teria sido o mesmo, muito obrigado minha amiga. Outra pessoa extremamente importante nesta jornada foi Catarina Rattes, obrigado pelo apoio, incentivo, torcida e inúmeras visitas a São Paulo, valeu Cata.

Ao meu primeiro orientador de IC, Dr. Cristiano Mendes, que despertou em mim o amor e a admiração pela ciência; ao Dr. Rodrigo Fragoso que pacientemente me ensinou os passos fundamentais para fazer ciência com excelência e honestidade, muito obrigado meu amigo, sei que posso contar com você sempre que for preciso; à Dr^a. Janaína Miranda pelo incentivo à vida acadêmica e a Dr^a. Caroline Wanderley pela orientação na IC no DeFisio-UFPE.

À Dra. Sílvia Moraes, a quem eu posso chamar de Silvinha, obrigado por sua ajuda durante toda minha graduação, pelos seus conselhos, sua torcida, seu incentivo, por acreditar em mim e me fazer enxergar que eu poderia ir além do que eu imaginava que pudesse, será um privilégio voltarmos a trabalhar juntos.

Aos meus amigos e irmãos em Cristo espalhados por este país, que eu sei que posso considerá-los como família sempre. Obrigado pelo incentivo, orações e compreensão da minha ausência em tantos momentos bons. Muito obrigado família ISP (Igreja em São Paulo), entre vocês eu tenho pais (Sidney Dourado e Sérgio Sakai), mães (Maria Eugênia e Lumi Sakai) e muitos irmãos, eu amo vocês.

Um agradecimento especial à amiga Giovana Almeida, obrigado por sua ajuda para a conclusão desta etapa, obrigado pelo cuidado, atenção e por dividir dúvidas e procurar soluções comigo.

Obrigado aos meus parentes que sempre me incentivaram e apoiaram das mais diversas formas, em especial aos primos Marta Bittencourt, Cláudio Bittencourt e Samuel Bittencourt pela acolhida durante o tempo na UFMG.

Obrigado ao Geraldo, Ivanilda, Ana Paula e Danilo por me acolherem em São Paulo, e ao Pedro Assumpção, Vivian Assumpção, Felipe Assumpção e Ellen Assumpção pela acolhida em Chicago, todos vocês se dispuseram a me receber sem mesmo me conhecer, isso me fez sentir-me em casa.

I would like to express my gratitude to Dr. Bonini for the support and the great opportunity to develop some experiments at his laboratory. Also, I would like to thank the lab's team that taught me some techniques. Thank you so much Dr. Chenxia He and Dr. André Luersdorff for care and friendship during my period in Chicago.

Aos Brasileiros na UIC (Universidade de Illinois em Chicago), André Luersdorff, Andréia Chinaglia, Bianca Ratti, Marta Gomes, Michele Schiavi, Simone Potje e Suellen D'Arc que foram amigos mais chegados que irmãos neste último ano. Valeu galera.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais pela oportunidade de cursar o Doutorado, agradeço à secretária Patrícia Campos por sua atenção e disponibilidade, aos bioteristas por seu essencial

trabalho, em especial ao Renivaldo de Souza por cuidar dos camundongos, aos professores do programa com os quais eu tive oportunidade de ser monitor do PAE (Programa de Aprimoramento ao Ensino), a todos os professores que ministraram aulas nas disciplinas que cursei e aos amigos pós-graduandos do programa Diego Cury, Ismael Cabral, Kátia Gomes, Manuela Miranda, Marcos Vinicius, Marília Bianca, Tábata Bohlen e Tábata Leal.

Um agradecimento especial aos amigos: 1 – Miguel Xavier, companheiro desde o ingresso no mestrado, obrigado por todas nossas conversas e pela amizade dentro e fora da USP, chorando ou sorrindo vivemos grandes emoções, um irmão que vou levar pra vida; 2 – Marina Silveira, que bom que através do doutorado Deus me presenteou com sua amizade, seja em Sampa, Chicago ou Recife sei que a gente sempre vai se encontrar. Obrigado por estar sempre perto nos momentos bons e ruins da pós-graduação, seu positivismo me fez rir nos momentos de desespero desta carreira; 3 – Milena Freitas, nem parece que você está em outro país, pois a tecnologia tem mantido você sempre por perto, obrigado pela amizade leal, pelo companheirismo e por vibrar tanto com minhas conquistas; 4 – Marília Bianca (Mabi) que desde o início não mediu esforços para ensinar o que sabia sobre camundongos e tratamento com hormônio tireoidiano, sempre presente nos bons e maus momentos. Sua amizade se estendeu a toda minha família, obrigado por nos visitar quando estávamos distantes dos amigos. Eu amo vocês.

Aos professores presentes nas qualificações de 2013 (Prof^a. Dr^a. Elen Miyabara, Prof^a. Dr^a. Maria Tereza Nunes, Prof. Dr. Vagner Antunes) e 2014 (Prof. Dr. Joel Heimann, Prof. Dr. Thiago Moreira, Prof. Dr. William Festucci). Suas considerações foram de extrema importância para o resultado final deste trabalho.

Ao Maurício dos Santos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP) pela ajuda e disposição nas dosagens do óxido nítrico. À Bibliotecária Tereza Cristina Soutto Mayor pela paciência e simpatia ao corrigir a tese, muito obrigado.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa nos 6 primeiros meses do curso e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela

concessão da bolsa e financiamento do projeto de pesquisa, assim como concessão da BEPE (Bolsa de Estágio do Pesquisador no Exterior).

A todos os que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho, quer seja com palavras, acolhimento e/ou financiamento da pesquisa através do pagamento dos seus impostos, meu muito obrigado.

“Nós não fomos capazes de responder a todos os nossos problemas, na verdade, não respondemos completamente a nenhum deles. As respostas que obtivemos serviram apenas para levantar um novo conjunto de questões. De alguma forma, nos sentimos tão confusos quanto antes, mas pensamos que estamos confusos em nível muito mais elevado e sobre coisas mais importantes.”

Texto postado em *outdoors* nos centros de pesquisa da IBM, baseado na ideia de Karl Popper

Resumo

da Silva, IB. Efeito cardioprotetor do hormônio tireoidiano no modelo de isquemia/reperfusão: participação do sistema renina-angiotensina. [tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O coração corresponde a um dos principais alvos dos hormônios tireoidianos (HT), os quais, entre outras ações, influenciam o trofismo cardíaco, por ações diretas e indiretas. Parte das ações dos HT no sistema cardiovascular é mediada por ativação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA). A hipótese do presente estudo é a de que o papel cardioprotetor exercido pelos HT após eventos de isquemia-reperfusão (I-R) ocorra com a participação do receptor de angiotensina II do tipo II (AT2). Esta hipótese foi testada utilizando o modelo de coração isolado (Langendorff), realizando-se um protocolo de I/R (20 min de isquemia global e 45 min de reperfusão) em corações de camundongos selvagens (WT) e nocautes para o AT2 (KO), submetidos a tratamento por 14 dias com T₃ (7µg/100g de peso corpóreo/dia). Considerando a presença do AT2 em membranas mitocondriais (SRA subcelular), a possível participação deste sistema foi também analisada, avaliando o consumo de oxigênio, a produção de H₂O₂ e o potencial de membrana mitocondrial nas mitocôndrias cardíacas dos animais dos grupos experimentais (WT-C, WT-T3, KO-C, KO-T3). Por último, uma possível via de sinalização implicada com a resposta cardioprotetora (Akt) e ativada pelo AT2 foi ainda avaliada. Os resultados foram avaliados como média±erro-padrão e analisados por teste t ou ANOVA de duas vias. Os dados funcionais obtidos a partir dos experimentos de coração isolado confirmaram o efeito cardioprotetor do HT nos animais WT-T3, no período pós-isquêmico, evidenciado pelos seguintes parâmetros: pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo - LVDP, primeira derivada positiva da pressão ventricular esquerda - +dP/dt, primeira derivada negativa -dP/dt e EDP), quando comparados aos WT-C. Esse efeito cardioprotetor do HT foi abolido nos animais KO (KO-T3), mostrando a participação do receptor AT2 nesse processo. Quanto aos mecanismos moleculares, o HT ativou a via de sinalização Akt, com consequente aumento na produção de óxido nítrico, o que não foi observado nos animais KO-T3, evidenciando a dependência do AT2 nesta sinalização. Por último, o receptor AT2 parece estar envolvido no controle do metabolismo mitocondrial cardíaco, regulando parâmetros metabólicos desencadeados pelo hipertireoidismo. Juntos, os resultados mostram haver um efeito cardioprotetor do T3, o qual ocorre de maneira dependente do receptor AT2.

Palavras-chave: Modelo de I/R. Hipertireoidismo. Receptor AT2. Cardioproteção. Óxido nítrico. Metabolismo mitocondrial.

Abstract

da Silva, IB. The cardioprotective effect of thyroid hormone in ischemia reperfusion experimental model: role of renin angiotensin system. [Ph.D. thesis (Morphofunctional Sciences)]. Sao Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo; 2016.

The heart corresponds to the main target of thyroid hormones (TH), which influence the cardiac trophism, directly or indirectly. In the last years we and other authors have shown a close relationship between the action of TH on cardiovascular system and renin-angiotensin system (RAS) activation. The hypothesis of this study is that cardioprotective effect of TH in ischemia/reperfusion (I/R) model may occur with the participation of angiotensina II type 2 receptor (AT2R). This hypothesis was tested using I/R experimental model (20 min of global ischemia followed by 45 min of reperfusion) in isolated hearts (Langendorff heart system) of AT2 knockout and wild-type mice submitted to experimental hyperthyroidism (7µg of T₃/100g of body weight/day) by 14 days. Based on presence of AT2R in mitochondrial internal membrane (mitochondrial RAS), the participation of this system was also evaluated (oxygen consumption, H₂O₂ and mitochondrial membrane potential were analyzed) on isolated mitochondria from 4 different groups (control and treated wild-type mice; control and treated knockout mice - WT-C, WT-T₃, KO-C and KO-T₃, respectively). A possible signaling pathway activated by TH and AT2R was also evaluated. The results were analyzed and compared using t of Student or analysis of variance (ANOVA) for two-way followed by Tukey's post hoc test. The post-ischemic recovery of cardiac function was increased in T₃-treated hearts when compared to control (LVDP, +dP/dt, -dP/dt and EDP), and this response was abolished on AT2 knockout mice. The TH was able to increase the Akt and iNOS phosphorylation, and NO production only on wild-type mice (WT-T₃), showing the AT2R participation on TH effect. Furthermore, the data revealed the AT2R involvement in mitochondrial metabolism. Taken together, the results show that T₃ induces cardioprotection through AT2 receptor.

Keywords: Ischemia/Reperfusion experimental model. Hyperthyroidism. AT2 receptor. Cardioprotection. Nitric oxide. Mitochondrial metabolism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema representativo dos principais componentes do SRA (Em Mello-Aires, 2012; adaptado de Warner et al., 2004). 28
- Figura 2 - Esquema representativo do SRA subcelular (Abadir et al., 2012). ... 31
- Figura 3 - Produtos da reação de PCR da sequência do receptor AT2, apresentados numa corrida eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 10 mg/mL. Receptor AT2 dos animais selvagens (aproximadamente 500pb) e nocaute (aproximadamente 1.100pb) (Fonte: Silva, 2014). 45
- Figura 4 - Sistema de perfusão de coração isolado – Langendorff (ADInstruments-Radnoti). Fonte: ADInstruments, 2016. 47
- Figura 5 - A. Representação (esquerda) e B. Fotografia (direita) de um coração canulado num sistema de perfusão isolado com um balonete inserido no ventrículo esquerdo (imagem encontrada em Bell et al., 2011). 48
- Figura 6 - Esquema mostrando a medida do consumo de O₂ em mitocôndria isolada do coração de camundongos. A medida basal foi feita após adição de substratos (malato, glutamato e succinato) e mitocôndria. Posteriormente foi avaliado o consumo máximo de oxigênio induzido pela adição de ADP, o consumo de oxigênio na presença de oligomicina (inibidor do complexo V) e, por fim, foi avaliado o consumo de oxigênio na presença de CCCP, um desacoplador mitocondrial. A redução dos níveis de oxigênio na câmara é inversamente proporcional ao consumo de oxigênio mitocondrial. 51
- Figura 7 - Esquema ilustrativo da quantificação de liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em mitocôndria isolada. A medida basal foi feita após adição de substratos (malato, glutamato e succinato) e mitocôndria. Quando o ADP foi adicionado ao sistema, ocorreu uma estimulação da produção de ATP, com consequente aceleração da cadeia respiratória e menor escape de elétrons, que, por sua vez, produziu uma quantidade menor de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, quando foi adicionada a oligomicina, a síntese de ATP foi bloqueada, havendo uma diminuição na respiração e um acúmulo de elétrons, possibilitando maior escape e maior formação de espécies reativas. Posteriormente, com a adição de FCCP, um desacoplador da membrana mitocondrial, ocorreu uma aceleração da entrada de prótons levando ao consumo máximo de oxigênio, com uma menor possibilidade de liberação de elétrons, diminuindo desta forma a produção de H₂O₂..... 52
- Figura 8 - Esquema ilustrativo da reação de potencial de membrana interna mitocondrial. Quando a mitocôndria é adicionada, a safranina O, presente na solução, se liga à membrana mitocondrial ou entra na organela, diminuindo a

fluorescência do meio. Após a adição do FCCP (desacoplador da membrana mitocondrial) ocorre a liberação da safranina O, com consequente aumento da fluorescência. 53

Figura 9 - Dosagem sérica dos níveis de T4 total (ug/dl). WT-C – Selvagem Controle (n= 5); WT-T3 – Selvagem Hipertireoideo (n=5); KO-C – Nocaute Controle (n=5); KO-T3 – Nocaute Hipertireoideo (n=5). * vs. WT-C (p<0,05); # vs. KO-C (p<0,05). Fonte: Silva, 2016..... 58

Figura 10 - Análise da razão peso do coração pelo comprimento da tíbia, nos diferentes grupos experimentais. WT-C – Selvagem Controle (n= 5); WT-T3 – Selvagem Hipertireoideo (n=5); KO-C –Nocaute Controle (n=8); KO-T3 – Nocaute Hipertireoideo (n=7). * vs. WT-C (p<0,05); # vs. KO-C (p<0,05). Fonte: Silva, 2016..... 58

Figura 11 - Consumo de oxigênio em mitocôndria isolada. Estado 2 (A), Estado 3 (B), Estado 4 (C), FCCP (D) e Controle Respiratório (CR) Mitocondrial (E) nos grupos controles e tratados dos animais nocaute e selvagens. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão,* vs. WT-C (p $\leq$ 0,05), # vs. KO-C (p $\leq$ 0,05) e & vs. WT-T3 (p $\leq$ 0,05). Os grupos nocautes (controle e tratado) apresentam n=7 e os grupos selvagens (controle e tratado) apresentam n=6. Foram utilizados três animais para compor n=1. Fonte: Silva, 2016. 60

Figura 12 - Liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela mitocôndria. Estado 2 (A), Estado 3 (B), Estado 4 (C) e Estado desacoplado - FCCP (D) nos grupos WT-C, KO-C, WT-T3 e KO-T3. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão,* vs. WT-C (p $\leq$ 0,05), # vs. KO-C (p $\leq$ 0,05) e & vs. WT-T3 (p $\leq$ 0,05). Os grupos nocautes (controle e tratado) apresentam n=7 e os grupos selvagens (controle e tratado) apresentam n=6. Foram utilizados três animais para compor n=1. Fonte: Silva, 2016. 62

Figura 13 - Delta do potencial de membrana mitocondrial nos grupos controle e tratado, dos animais nocautes e selvagens. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão, WT-C (n=5), KO-C (n=5), WT-T (n=5) e KO-T (n=4). Fonte: Silva, 2016. 63

Figura 14 - Taxa metabólica basal mensurada por calorimetria indireta, nos animais selvagens (WT) e nocautes para o receptor AT2 (KO). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão, n = 4. Fonte: Silva, 2016..... 64

Figura 15 - Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), em mmHg, no período de estabilização. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). Fonte: Silva, 2016. 65

Figura 16 - Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização), nos

diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). * vs.WT-C do respectivo tempo de reperfusão ($p<0,05$), & vs. WT-T3 do respectivo tempo de reperfusão ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016..... 65

Figura 17 - Primeira derivada positiva de pressão por tempo (+dP/dt), em mmHg. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). * vs.WT-C ($p<0,05$), # vs. KO-C ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016..... 67

Figura 18 - Primeira derivada positiva de pressão por tempo (+dP/dt), apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização) nos diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). A ordem dos grupos segue a mesma disposição da Fig 16. * vs. WT-C (45min) ($p<0,05$) e & vs. WT-T3 (25min) ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016..... 67

Figura 19 - Primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt), em mmHg. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). * vs.WT-C ($p<0,05$), # vs. KO-C ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016..... 68

Figura 20 - Primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt) apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização) nos diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). A ordem dos grupos segue a mesma disposição da Fig 16. * vs.WT-C do respectivo tempo de reperfusão ($p<0,05$), & vs. WT-T3 do respectivo tempo de reperfusão ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016..... 69

Figura 21 - Frequência Cardíaca em bpm. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). * vs. WT-C ($p<0,05$), # vs. KO-C ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016..... 69

Figura 22 - Frequência cardíaca apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização) nos diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3

(n=7) e KO-T3 (n=7). A ordem dos grupos segue a mesma disposição da Fig 16. Fonte: Silva, 2016. 70

Figura 23 - Pressão de perfusão no período de estabilização em mmHg. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=6), WT-T3 (n=6) e KO-T3 (n=6). * vs.WT-C (p<0,05), # vs. KO-C (p<0,05). & vs. WT-T3 (p<0,05). Fonte: Silva, 2016. 71

Figura 24 - Pressão de perfusão apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização) nos diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=6), WT-T3 (n=6) e KO-T3 (n=6). A ordem dos grupos segue a mesma disposição da Fig 16. Fonte: Silva, 2016. 71

Figura 25 - Pressão diastólica final no período de estabilização em mmHg. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=7), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=8). * vs. WT-C (p<0,05), # vs. KO-C (p<0,05) e & vs. WT-T3 (p<0,05). Fonte: Silva, 2016. 72

Figura 26 - Pressão diastólica final apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização) nos diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=7), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=8). A ordem dos grupos segue a mesma disposição da Fig 16. & vs.WT-T3 (p<0,05). Fonte: Silva, 2016. 73

Figura 27 - Atividade enzimática da LDH. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5) e os demais grupos (n=6). * vs. WT-C 1min (p<0,05), # vs. KO-C 1min (p<0,05), & vs. WT-T3 1min (p<0,05), § vs. KO-T3 1min (p<0,05) e α vs. WT-T3 5min (p<0,05). Fonte: Silva, 2016. 74

Figura 28 - Área de infarto mostrada como % em relação à área total nos diferentes grupos experimentais e cortes transversais de corações corados com TTC. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração da área infartada. WT-C (n=5) e os demais grupos (n=6). Fonte: Silva, 2016. 75

Figura 29 - Consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas. Estado 2 (A), Estado 3 (B) e Controle Respiratório Mitocondrial (C) nos grupos controles e tratados dos animais selvagens e nocautes (WT-C, WT-T3, KO-C e KO-T3), após I/R. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. Todos os grupos

apresentaram n=6. * vs.WT-C (p<0,05), # vs. KO-C (p<0,05). Fonte: Silva, 2016. 76

Figura 30 - Liberação de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria. Estado 2 (A), Estado 3 – ADP (B), Estado 4 - Oligomicina (C) e Estado desacoplado – FCCP (D) nos grupos WT-C, KO-C, WT-T3 e KO-T3. Dados expressos em média ± erro-padrão. * vs.WT-C (p<0,05), # vs. KO-C (p<0,05) e & vs. WT-T3 (p<0,05). Todos os grupos apresentaram n=6. Fonte: Silva, 2016..... 78

Figura 31 - Liberação de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria. Estado 2 - basal (A), Complexo I bloqueado por Rotenona (B), Estado 2 - basal (C) e Complexo III bloqueado por Antimicina (D) nos grupos WT-C, KO-C, WT-T3 e KO-T3. Dados expressos em média ± erro-padrão. Todos os grupos apresentaram n=6. * vs.WT-C (p<0,05), # vs. KO-C (p<0,05) e & vs. WT-T3 (p<0,05). Fonte: Silva, 2016. 78

Figura 32 - Delta do potencial de membrana mitocondrial nos diferentes grupos experimentais submetidos ao protocolo de I/R. Dados expressos em média ± erro-padrão. Todos os grupos apresentaram n=6. * vs.WT-C (p<0,05), # vs. KO-C (p<0,05). Fonte: Silva, 2016. 79

Figura 33 - Expressão proteica da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS). Razão iNOS/ α -actinina dos animais selvagens e nocautes. Dados expressos em média ± erro-padrão. n = 4 para cada grupo. * vs.WT-C (p<0,05), & vs. WT-T3 (p<0,05). Fonte: Silva, 2016. 80

Figura 34 - Quantificação de NO nos diferentes grupos experimentais. Animais eutireoideos e hipertireoideos selvagens e nocautes para o AT2R após I/R. Dados expressos em média ± erro-padrão. WT-C (n=4), WT-T3 (n=5), KO-C (n=3) e KO-T3 (n=3). * vs.WT-C (p<0,05), & vs. WT-T3 (p<0,05). Fonte: Silva, 2016. 81

Figura 35 - Quantificação de NO nos diferentes grupos experimentais. Animais eutireoideos e hipertireoideos selvagens e nocautes para o AT2R não submetidos à I/R. Dados expressos em média ± erro-padrão. WT-C (n=3), WT-T3 (n=5), KO-C (n=3) e KO-T3 (n=3). Fonte: Silva, 2016..... 82

Figura 36 - Expressão proteica da p-Akt (Thr308) (A) e p-Akt (Ser427) (B). Razão p-Akt/Akt total dos animais selvagens e nocautes. Os dados foram expressos em média ± erro-padrão. n = 4 para cada grupo. * vs.WT-C (p<0,05), & vs. WT-T3 (p<0,05).Fonte: Silva, 2016. 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Soluções para preparação do Gel de SDS-Poliacrilamida 55

Tabela 2 - Lista dos anticorpos primários utilizados para análise de expressão proteica por Western Blotting 55

LISTA DE ABREVIATURAS

³²P – UTP – Uridina trifosfato marcada com Fósforo³²

AMPK – Proteína quinase ativada por AMP (do inglês, *AMP-activated protein kinase*)

Ang II - Angiotensina II

AT1 - Receptor de Angiotensina II tipo 1

AT2 - Receptor de Angiotensina II tipo 2

FCCP - Carbonildiciano-P-trifluoro-metoxifenil-hidrazona

CR – Coeficiente respiratório

ECA - Enzima Conversora de Angiotensina I

eNOS - Óxido Nítrico Sintase do tipo Endotelial

FC - Frequência Cardíaca

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GSK3β – Glicogênio sintase quinase 3 beta (do inglês, *Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*)

HT- Hormônio Tireoidiano ou Hormônios Tireoidianos

IAM – Infarto Agudo do Miocárdio

iNOS - Óxido Nítrico Sintase do tipo Indutível

I/R – Isquemia e Reperfusão

KO – nocaute (*knockout*)

NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo

nNOS - Óxido Nítrico Sintase do tipo Neuronal

MAPK – MAP quinase (do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinases*)

MPTP – Poro de Permeabilidade Transitória Mitocondrial (do inglês, *Mitochondrial Permeability Transition Pore*)

O₂ - Oxigênio

PKC – Proteína quinase C (do inglês, *Protein Kinase C*)

RNA_m – Ácido Ribonucleico Mensageiro

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

SRA- Sistema Renina-Angiotensina

T3 - Triiodotironina

T4 – Tiroxina

WT – Selvagem (*wild-type*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 Sistema Renina-Angiotensina.....	27
1.2 Receptor de Angiotensina II do tipo 2 (AT2)	32
1.3 Hormônios Tireoidianos	33
1.4 Isquemia/Reperusão (I/R)	36
2 HIPÓTESE DO ESTUDO	40
3 OBJETIVOS.....	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Animais e Grupos Experimentais	42
4.2 Camundongos Geneticamente Modificados (AT2R⁻)	42
4.3 Genotipagem por Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR)	43
4.3.1 Coleta de tecido.....	43
4.3.2 Extração do DNA	44
4.3.3 Reação de PCR e Gel de Agarose.....	44
4.4 Grupos Experimentais	45
4.4.1 Indução ao Hipertireoidismo	45
4.5 Dosagem dos hormônios tireoidianos	46
4.6 Preparação do Coração Isolado.....	46
4.7 Aquisição de dados	47
4.7.1 Função ventricular esquerda	48
4.7.2 Pressão de Perfusão.....	49
4.8 Determinação do dano tecidual e extensão do infarto	49
4.9 Análise mitocondrial	50
4.9.1 Isolamento da mitocôndria.....	50
4.9.2 Consumo de oxigênio na mitocôndria cardíaca isolada.....	50
4.9.3 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	51
4.9.4 Potencial da membrana interna da mitocôndria cardíaca isolada	52
4.10 Potência aeróbica (VO₂).....	53
4.11 Análise da expressão proteica por Western Blotting.....	53

4.11.1 Extração e Dosagem de Proteínas Totais	53
4.11.2 Expressão proteica – Akt e iNOS.....	55
4.12 Quantificação de óxido nítrico (NO)	55
4.13 Análise estatística	56
5 RESULTADOS.....	57
5.1 Caracterização do modelo experimental.....	57
5.2 Caracterização do papel do receptor AT2 no metabolismo mitocondrial	59
5.2.1 Consumo de oxigênio mitocondrial.....	59
5.2.2 Liberação de peróxido de hidrogênio.....	61
5.2.3 Potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)	62
5.2.4 Potência aeróbica (VO_2).....	63
5.3 Papel do receptor AT2 nos efeitos promovidos pelo T ₃ após I/R	64
5.3.1 Parâmetros de função cardíaca	64
5.3.1.1 Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP)	64
5.3.1.2 Primeira derivada positiva da pressão ventricular esquerda	66
5.3.1.3 Primeira derivada negativa da pressão ventricular esquerda	67
5.3.1.4 Frequência Cardíaca	69
5.3.1.5 Pressão de Perfusão	70
5.3.1.6 Pressão diastólica final (EDP).....	72
5.3.2 Avaliação do parâmetro bioquímico – atividade da LDH.....	73
5.3.3 Avaliação de parâmetro morfológico - TTC	74
5.3.4 Avaliação de parâmetros do metabolismo mitocondrial	75
5.3.4.1 Consumo de oxigênio mitocondrial.....	75
5.3.4.2 Liberação de peróxido de hidrogênio.....	77
5.3.4.3 Potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)	79
5.4 Possíveis mecanismos moleculares envolvidos no efeito cardioprotetor do T ₃ , via receptor AT2.....	79
5.4.1 Avaliação da participação do receptor AT2 na produção de NO	80
5.4.1.1 Expressão proteica	80
5.4.1.2 Quantificação do NO	80
5.4.2 Avaliação da participação do receptor AT2 na ativação da Akt.....	82
6 DISCUSSÃO	84

6.1 Hipertrofia Cardíaca induzida por HT	84
6.2 HT, SRA e atividade mitocondrial	85
6.3 Função cardíaca, HT e via de sinalização	89
7 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS*	98
APÊNDICE.....	114
A - Valores brutos dos resultados encontrados.....	114
B - Relatório científico da Bolsa de Estágio do Pesquisador no Exterior (BEPE) concedido pela FAPESP no período de Março a Dezembro de 2015 na University of Illinois at Chicago (UIC)	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Renina-Angiotensina

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) corresponde a um complexo sistema hormonal relacionado, entre outras funções, à homeostase do tecido cardíaco. Por quase um século o SRA foi classificado como um sistema endócrino, cujo hormônio efetor, a angiotensina II (Ang II), era o principal responsável pelos efeitos fisiológicos do sistema. No entanto, hoje se sabe que esse sistema é muito mais amplo do que o inicialmente suposto, com a ação de inúmeras outras enzimas, que resultam na formação de peptídeos biologicamente ativos, os quais, ao se ligarem aos seus receptores específicos, acabam também agindo, além da ação endócrina, de forma parácrina, autócrina e intácrina. Neste sentido, os mecanismos que controlam a formação, a degradação ou a ação da Ang II em um determinado tecido são fundamentais na determinação dos efeitos fisiológicos ou patológicos deste peptídeo no organismo.

Após o primeiro relato sobre o SRA (Tiegersted, Bergman, 1898), há mais de um século, muitos esforços têm sido feitos na tentativa de compreender sua fisiologia e seu envolvimento em diversas patologias. Tiegersted e Bergman demonstraram que o extrato renal de coelhos era capaz de elevar a pressão arterial, quando injetado em outros animais, sendo a RENINA identificada como o componente ativo desse extrato. Posteriormente foi demonstrado por Goldblatt e cols. (1934) que a constrição da artéria renal de cães resultava em hipertensão arterial e que era a liberação da renina a responsável por essa elevação na pressão arterial. No final da década de 30 estudos realizados simultaneamente por Braun-Menendez e cols. (Buenos Aires, Argentina), e Page e Helmer (Indianápolis, EUA), revelaram que a renina, por si só, não apresentava atividade hiperpressora; no entanto, agia sobre um substrato protéico que estava presente no plasma e gerava um novo peptídeo denominado HIPERTENSINA (Braun-Menendez et al., 1939), ANGIOTONINA (Page, Helmer, 1940) e que foi posteriormente denominado ANGIOTENSINA, resultado da junção dos termos angiotonina e hipertensina. Cerca de quinze anos depois da descoberta da angiotensina, Skeggs e cols.

O clássico conceito do SRA circulante vem sendo modificado em virtude do aparecimento de estudos que demonstram a participação de diferentes tecidos e órgãos na geração da Ang II. Foi no final da década de 80, que a existência de SRA locais, ou teciduais, foi descrita pela primeira vez. Com o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas de biologia molecular tornou-se então possível comprovar a existência do RNA mensageiro (RNAm) e da proteína dos diversos componentes do SRA em vários tecidos. Baseado nessas evidências, Dzau (Dzau, 1986) propôs o conceito de SRA local ou tecidual, o qual é capaz de gerar Ang II independente do SRA clássico, e encontra-se presente no coração e em células cardíacas isoladas (Re, 2004). Da sua descoberta (1986) até os dias atuais diversos estudos têm evidenciado a existência desse sistema local e sua importante função homeostática e, por vezes, implicações patológicas (Campbell, 1987; Lindpainter et al., 1990; Schunkert et al., 1990).

Esses SRA locais são regulados independentemente do SRA circulatório e, desta forma, a geração de Ang II que ocorre na circulação é complementada pela produção local (Abadir, 2011). Lindpaintner e cols. (1988) ressaltaram que no tecido cardíaco os peptídeos de angiotensina encontrados apresentam-se em concentrações superiores às encontradas na circulação; cerca de 90% da Ang I e 75% da Ang II encontradas no coração são de origem local (Van Kats et al., 1998), demonstrando a importância desse sistema na manutenção dos níveis cardíacos desses peptídeos.

Independentemente do local de geração da Ang II, esta irá exercer as suas funções após ligação aos seus receptores (AT1 e AT2). O receptor AT1 é uma proteína integral de membrana, responsável por mediar a maioria dos efeitos fisiológicos e hipertróficos induzidos pela Ang II, sendo considerado por muitos pesquisadores como um ponto-chave de controle dos efeitos locais exercidos por esse peptídeo (Mehta, Griendling, 2007). Este é responsável por induzir respostas inflamatórias envolvidas com estresse oxidativo, promover efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivos no coração, induzir apoptose, além de ativar vias relacionadas ao crescimento e proliferação celular, que acabam por culminar com a hipertrofia cardíaca (Dorn, 2009). Em roedores, o receptor AT1 apresenta dois subtipos, o AT1a, localizado no cromossomo 17, e o AT1b,

localizado no cromossomo 2 (Griendling et al., 1996; Hunyady, Catt, 2006). Devido à alta similaridade entre estes dois subtipos de receptores, cerca de 95%, tem sido difícil o desenvolvimento de antagonistas específicos que possibilitem distinguir o papel exato de cada um destes subtipos de receptor (De Gasparo et al., 2000).

O receptor AT2 apresenta pequena homologia em relação ao receptor AT1 quanto à sequência de aminoácidos (Volpe et al., 2003). O AT2R é altamente expresso durante o período fetal, e logo após o nascimento tem a sua expressão drasticamente reduzida, ficando restrita a poucos órgãos, incluindo os do sistema cardiovascular (Bedecs et al., 1997; Huang et al., 1996). Ao contrário do receptor AT1, o papel fisiológico do receptor AT2 ainda é muito controverso.

Recentemente, após a identificação dos componentes do SRA no interior de organelas citoplasmáticas e também no núcleo da célula do cardiomiócito (Gwathmey et al., 2009; Tadevosyan et al., 2010), uma nova classificação foi incorporada ao clássico SRA: o SRA subcelular ou intrácrino (Figura 2). Neste sentido, Abadir e cols. (2011) identificaram a presença dos receptores de Ang II (AT1 e AT2) na membrana interna da mitocôndria da célula muscular cardíaca. Esses autores também demonstraram que o receptor AT2 mitocondrial modula a produção de óxido nítrico (NO) nessa organela. Em ensaios de mitocôndrias isoladas os autores ainda mostraram que houve diminuição na respiração celular após ativação do AT2 pelo seu agonista (CGP421140), a qual foi revertida pelo uso do PD-123319, um antagonista do receptor AT2. O uso do L-NAME (um inibidor da enzima óxido nítrico sintase - NOS) também reverteu o efeito do CGP421140 sobre a respiração celular, indicando que o efeito funcional da ativação do receptor AT2 mitocondrial sobre a respiração celular ocorre por um mecanismo dependente da liberação do óxido nítrico - NO.

Figura 2 - Esquema representativo do SRA subcelular (Abadir et al., 2012).

Além da localização em membranas mitocondriais, Tadevosyan e cols. (2010) demonstraram a presença dos receptores de Ang II (AT1 e AT2) na membrana nuclear de cardiomiócitos de ratos. A fim de verificar o papel dos receptores de Ang II nucleares, os autores realizaram um ensaio de incorporação de uridina trifosfato marcada com Fósforo³² - [³²P] UTP no núcleo isolado, e determinaram a capacidade dos receptores AT1 e AT2 de controlar a transcrição gênica. Os núcleos foram incubados, tanto com Ang II, quanto com agonistas seletivos dos receptores AT1 e AT2 (L162,313 e CGP 42112A, respectivamente) e seus antagonistas seletivos (Candesartan e PD 123177, respectivamente). Em ambos os tratamentos, tanto com a Ang II como com os agonistas, houve aumento da síntese de RNA, sendo maior no grupo L162,313, quando comparado ao grupo CGP 42112A; e nos dois grupos que receberam antagonistas dos receptores (Candesartan e PD 123177) houve significativa redução da capacidade da Ang II em aumentar a síntese de RNA.

Trabalhos como esses citados anteriormente mostram o papel funcional desse SRA subcelular, como a síntese de NO via receptor AT2 mitocondrial e a sinalização deflagrada via receptores de Ang II na regulação da transcrição gênica.

1.2 Receptor de Angiotensina II do tipo 2 (AT2)

Apesar da visão clássica do receptor AT2 ser atribuída à inibição do crescimento (Horiuchi et al., 1999), recentemente, alguns estudos demonstram que sua expressão tem seus níveis aumentados diante de patologias que promovem o remodelamento cardíaco (Kim, Iwao, 2000; Zhu et al., 2003). Nesse sentido, o receptor AT2 mostrou-se ser essencial para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga de pressão (Senbonmatsu et al., 2000) ou induzida por elevados níveis de hormônio tireoideano (Carneiro-Ramos et al., 2010). Além disso, a ativação do receptor AT2 parece ser capaz de promover diretamente a hipertrofia dos cardiomiócitos, independentemente da ligação da Ang II (D'amore et al., 2005).

Baseado em trabalhos recentes que demonstram que o receptor AT2 parece estar envolvido em situações de injúrias cardiovasculares, afirmar que o receptor AT2 seja importante única e exclusivamente ao longo do período fetal parece estar descartado e inúmeros estudos têm se proposto a investigar o seu papel, mais profundamente, também na fase adulta.

Embora algumas vias de sinalização deflagradas pela ativação do receptor AT2 já tenham sido apontadas há algum tempo na literatura, novas vias têm sido propostas mediar as ações intracelulares resultantes da ativação deste receptor no coração. Uma das vias envolvidas na ativação deste receptor é a das proteínas tirosina fosfatases, responsáveis pela desfosforilação de algumas das proteínas da via das MAP quinases - MAPK (Bottari et al., 1992; Horiuchi et al., 1999). Uma segunda via identificada e diretamente associada à função cardiovascular é aquela relacionada à via de produção do óxido nítrico (NO) (Siragy e Carey, 1997) e GMPc (Siragy e Carey 1996). Este, é produzido nos miócitos cardíacos após ativação dos receptores AT2 e consequente aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), de forma dependente da via da calcineurina (Ritter et al., 2003). O aumento da produção de NO, mediada pelos receptores AT2, foi também verificado por nós em células musculares lisas, após tratamento com T3, contribuindo para o efeito vasodilatador que este hormônio apresenta (Carrillo-Sepulveda et al., 2010). Ainda, estudos demonstraram que o receptor AT2 é capaz de ativar a via da PI3K/Akt (Caruso-Neves, Kwon e Guggino, 2005), a qual também está

diretamente relacionada à síntese de NO (Han et al., 2007) e é uma via diretamente ativada por aumentados níveis de hormônios tiroideanos (Diniz et al., 2009).

1.3 Hormônios Tireoidianos

Estima-se que as doenças que afetam a glândula tireóide atinjam cerca de 12% da população (Silva, 2005). Paralelamente, diversos estudos evidenciam uma estreita relação entre os níveis de hormônios tiroideanos (HT) e a função cardíaca (Canaris et al., 2000), sendo que alterações dos níveis desses hormônios são capazes de aumentar o fator de risco para o desenvolvimento e a progressão das doenças cardiovasculares (Pantos et al., 2007; Schmidt-Ott, Ascheim, 2006). No entanto, em alguns modelos, o aumento dos níveis destes hormônios deflagra o fenômeno de cardioproteção (Pantos et al., 2005; Tavares et al., 2013). Assim, mesmo sabendo que o sistema cardiovascular é controlado principalmente pelo sistema nervoso simpático (SNS) e pelo sistema renina-angiotensina (SRA), estudos revelam que ambos podem ser modulados pelos HT (Marchant et al., 1993), promovendo, indiretamente, através de ações hemodinâmicas, alterações na função e na estrutura cardíaca. Por outro lado, os HT, agindo diretamente sobre o tecido cardíaco, alteram quantitativa e qualitativamente a sua síntese proteica (Klein, Levey, 1984) através da regulação da expressão de genes estruturais e genes regulatórios (Davis et al., 2008), induzindo a um aumento da massa muscular ou hipertrofia cardíaca.

Embora inúmeros trabalhos da literatura apontem para que as ações dos HT sejam dependentes da ligação desses hormônios a receptores nucleares, ações não-genômicas têm sido cada vez mais descritas por diversos trabalhos. Neste sentido, alguns estudos têm demonstrado que o T3 pode exercer efeitos rápidos, que ocorrem após segundos ou minutos, e que esses efeitos não são alterados por inibidores de transcrição ou de síntese proteica. (De Vito et al., 2012; Wrutniak-Cabello et al., 2001) e independem inicialmente da formação do complexo intranuclear entre HT e receptor de hormônio tiroideano (TR) (Davis, Davis, 2002; Davis et al., 2008).

Além dos efeitos diretos promovidos pelos HT no coração, descritos anteriormente, nas últimas três décadas vários estudos evidenciaram que o SRA está envolvido em algumas dessas ações no sistema cardiovascular, sugerindo que este (SRA) possa agir como um importante mediador das ações dos HT (Barreto-Chaves et al., 2009, 2011). Nesse contexto, nosso grupo demonstrou que a hipertrofia cardíaca induzida por HT é acompanhada por um aumento da expressão cardíaca do receptor AT2 (Carneiro-Ramos et al., 2010), e que a utilização de inibidores específicos de componentes do SRA, como antagonista do receptor AT1 ou inibidor da ECA (Hu et al., 2003) são capazes de atenuar o aumento da massa muscular induzido pelo HT *in vivo* e *in vitro* (Diniz et al., 2009). Assim, esforços vêm sendo realizados, não só pelo nosso grupo, na tentativa de compreender essa estreita relação existente entre esses dois sistemas endócrinos, SRA e HT, a fim de contribuir com o entendimento da fisiopatologia de algumas doenças sobre o sistema cardiovascular.

Na literatura é possível encontrar trabalhos que demonstram que os HT são capazes de estimular diretamente a expressão gênica da renina, *in vivo* e *in vitro*, além de aumentar a síntese e secreção de angiotensinogênio e de alterar também a expressão dos receptores de Ang II (Carneiro-Ramos et al., 2010; Ichiara et al., 2001; Kobori et al., 1997; Semia et al., 1993). Como citado anteriormente, vale ressaltar que a hipertrofia cardíaca decorrente dos elevados níveis de HT encontra-se associada a um aumento, em torno de 50%, da expressão do receptor AT2; e que este, quando bloqueado pela administração de PD123319, previne em 40% o aumento da massa muscular cardíaca (Carneiro-Ramos et al., 2010).

Como visto até o presente, o efeito dos HT sobre a regulação do sistema cardiovascular já tem sido intensamente explorado pela literatura. Entretanto, o papel destes hormônios em condições patológicas como as que envolvem fenômenos de isquemia, infarto e insuficiência cardíaca ainda permanece a ser elucidado. Neste sentido, trabalhos realizados tanto em modelos experimentais com animais, como em ensaios clínicos com humanos, demonstram que os níveis séricos de T3 caem significativamente após uma injúria cardíaca, estando estes níveis associados à disfunção ventricular esquerda e à alteração

em vários genes responsivos aos HT (Ojamaa et al., 2000; Pantos et al., 2012). Assim, em humanos, uma queda significativa já é observada 48h após a ocorrência de infarto agudo do miocárdio (IAM) (Eber et al., 1995), como também após 6-24h a realização de cirurgia de revascularização miocárdica (Holland et al., 1991). Segundo Friberg e cols. (2002), a diminuição dos níveis séricos de T3 pode então corresponder a um importante fator preditivo para mortalidade após um IAM, sendo que o tratamento com administração de T3 por quatro semanas, por outro lado, já se mostrou eficiente na melhora da função cardíaca e na normalização da maioria das alterações da expressão de genes-alvos cardíacos dos HT (Ojamaa et al., 2000). Ainda neste contexto, em estudo realizado com grupos de pacientes que sofreram IAM, com ou sem angina pectoris prévia, os autores relatam que a angina parece promover a diminuição dos níveis de HT, o que, segundo os autores, representa uma vantagem, uma vez que, provavelmente, ocorre redução na demanda de oxigênio miocárdico e diminuição da taxa metabólica. No entanto, os mesmos autores discutem que a emergência da falência cardíaca parece ocorrer com maior frequência em pacientes hipotireoideos, quando comparados a pacientes eutireoideos (Friberg et al., 2002). Estes estudos indicam, portanto, um possível efeito cardioprotetor dos HT, principalmente em situações relacionadas a cardiopatias isquêmicas.

Já no que diz respeito à ativação das vias de sinalização intracelular deflagradas pelos HT para a indução do aumento da massa muscular cardíaca, a via de sinalização da Akt está diretamente envolvida (Condorelli et al., 2002; Diniz et al., 2010). Embora, de modo geral, esta via esteja associada a efeitos celulares benéficos, como a indução do crescimento e efeitos anti-apoptóticos, a ativação desta via de sinalização também já foi demonstrada em diversas doenças cardiovasculares, como hipertensão e falência cardíaca, o que a torna alvo de inúmeros estudos atuais (Benkirane et al., 2006; Diniz et al., 2009; Oudit et al., 2004). Além da relação que esta via de sinalização apresenta com o aumento da massa muscular cardíaca, estudos já demonstraram que ela também está diretamente relacionada à síntese de NO (Han et al., 2007).

1.4 Isquemia/Reperusão (I/R)

Um dos problemas mais sérios da medicina cardiovascular nos dias de hoje é a injúria tecidual que se desenvolve como consequência a episódios de isquemia-reperusão (I/R), nos quais a restauração do fluxo sanguíneo aos tecidos ou órgãos isquêmicos promove efeitos até mais deletérios do que aqueles decorrentes da própria isquemia. Assim, embora a ausência de fluxo sanguíneo contribua para a fisiopatologia de diversas doenças, como o infarto do miocárdio e a insuficiência vascular periférica, a restauração do fluxo sanguíneo ou a reperusão, mesmo que necessária, pode, por si só, agravar o dano celular isquêmico (Silva Jr et al., 2002). Entre vários fatores que contribuem para essa injúria celular encontra-se o fato do restabelecimento do fluxo sanguíneo após um evento isquêmico ocorrer de modo não uniforme para todas as porções do tecido, resultando numa restauração “caótica” do fluxo tissular que leva a um círculo vicioso de disfunção endotelial vascular, com redução da perfusão local, edema, entre outras complicações (Evora et al., 1996).

Ao longo dos anos, diversos grupos de pesquisa vêm caracterizando os eventos que levam à injúria de I/R, e esses grupos têm ressaltado a capacidade apresentada pelo coração em resistir a essas lesões, as quais são induzidas por breves episódios isquêmicos (pré-condicionamento isquêmico). Diversos mecanismos celulares envolvidos nessas circunstâncias são dependentes da ativação de vias de sinalização intracelulares, como a enzima proteína quinase C (PKC), a quinase glicogênio sintase 3 β (GSK3 β) e a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) (Hausenloy et al., 2006).

Esforços têm sido realizados na tentativa de entender as vias de sinalização envolvidas no fenômeno denominado “cardioproteção”. Neste sentido, em modelos de isquemia regional ou infarto, investigações laboratoriais sugerem que o NO desempenhe um importante papel cardioprotetor (Jones, Bolli, 2005; Rakhit e Marber, 2001; Vinten-Johansen et al., 1995), sendo que os potenciais mecanismos deste efeito incluiriam o seqüestro de radicais livres do oxigênio, a melhora da microcirculação em virtude do processo de vasodilatação e a diminuição da interação entre

leucócitos e plaquetas com o endotélio (Evora et al., 1996; Sobey et al., 1992). Entretanto, os estudos que existem na literatura ainda são bastante controversos. Por um lado, alguns deles demonstram que a produção de NO encontra-se aumentada durante a isquemia ou nos períodos iniciais de reperfusão em modelos de I/R cerebral de rato ou em coração isolado (Sato et al., 1994; Wang, Zweier, 1996). Por outro, estudos mostram que a geração de NO é reduzida devido à diminuição da expressão e à inativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Ma et al., 1993; Messina et al., 2000). Rakhit e Marber (2001), numa revisão sobre os papéis fisiopatológicos do NO, relatam que este está presente no contexto da I/R por sua interação com espécies reativas de oxigênio (ROS). Esta interação é complexa, no entanto, tanto efeitos citoprotetores do NO na I/R (Moncada e Palmer, 1991; Agullo et al., 1999; Jones et al., 1999; Ritter et al., 2003), como outros mostrando citotoxicidade (Andelová et al., 2005; Cope et al., 1997; Woolfson et al., 1995) já foram relatados. Desta forma, o papel do NO na I/R cardíaca não está ainda estabelecido e, aparentemente, o motivo para parte dos dados contraditórios parece estar diretamente relacionado às condições iniciais do tecido, bem como às condições experimentais utilizadas.

Paralelamente aos estudos envolvendo o modelo de I/R, recentemente o NO surgiu como um importante regulador do remodelamento cardíaco, especificamente reconhecido como um mediador anti-hipertrófico. Neste sentido, vários estudos têm demonstrado os alvos celulares, as vias de sinalização anti-hipertrófica e o seu papel funcional (Kempf e Wollert, 2004; Matsuoka et al., 1996; Ozaki et al., 2002; Wollert e Drexler, 2002). Assim, o NO produzido no coração agiria como inibidor endógeno da cascata de sinalização que induz a hipertrofia cardíaca mal-adaptada. As primeiras evidências mostrando que o NO pode apresentar efeitos anti-hipertróficos no coração foram obtidas em ratos SHR, sob tratamento crônico com L-arginina (Matsuoka et al., 1996). Mais tarde, Ozaki e cols. (2002) demonstraram que camundongos que superexpressam a eNOS apresentaram significativa atenuação da hipertrofia cardíaca induzida pela infusão crônica de isoprenalina, indicando que o NO endógeno tenha atuado como modulador negativo para essa hipertrofia.

West e cols. (2008) demonstraram ainda um importante papel cardioprotetor do NO. Esses autores utilizaram camundongos transgênicos que superexpressam iNOS (óxido nítrico sintase induzível) e demonstraram que esses animais apresentaram menor área de infarto, melhor recuperação funcional (pós-isquêmica) e menor formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). No mesmo estudo, ainda em mitocôndrias isoladas, os autores avaliaram a abertura de MPTP (poro de permeabilidade transitória mitocondrial) e concluíram que os animais que superexpressavam iNOS, e consequentemente produziam maiores níveis de NO, apresentavam menor abertura desses canais, com menor alteração na permeabilidade das membranas mitocondriais.

Conforme citado anteriormente, ainda no que diz respeito à produção de NO na mitocôndria, Abadir e cols. (2011) demonstraram que o receptor AT2 mitocondrial modula a sua produção nessa organela. Em ensaios de mitocôndrias isoladas, os autores ainda mostraram que houve diminuição na respiração celular após ativação do AT2 pelo seu agonista (CGP421140), a qual foi revertida pelo uso do PD-123319, um antagonista do receptor AT2. O uso do L-NAME (um inibidor da NOS) também reverteu o efeito do CGP421140 sobre a respiração celular, indicando que o efeito funcional da ativação do receptor AT2 mitocondrial sobre a respiração celular ocorre por um mecanismo dependente da liberação do NO.

Poucos são os estudos realizados que envolvem a cardioproteção mediada pelo receptor AT2 no modelo de I/R. Alguns autores já demonstraram que a injúria de I/R em corações isolados de ratos foi capaz de diminuir a expressão do receptor AT2, o que resultou em prejuízo funcional, enquanto que quando a expressão desse receptor foi induzida, houve melhora da função cardíaca pós-isquêmica (Przyklenk et al., 1993; Xu et al., 2002). Ainda, camundongos nocautes para o receptor AT2 apresentaram diminuição na sobrevivência e dilatação ventricular esquerda após infarto do miocárdio, no modelo de oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda (Oishi et al., 2003).

Os mecanismos relacionados ao papel cardioprotetor do receptor AT2 ainda não foram totalmente elucidados e merecem maiores estudos.

Embora exista uma possível relação entre o aumento na expressão desse receptor e a cardioproteção após um processo isquêmico, pouco ainda se sabe como esse fenômeno ocorre, e foram exatamente esses motivos que nos levaram a investigar qual o papel funcional do receptor AT2 na cardioproteção induzida pelos HT em eventos isquêmicos. Dados do nosso laboratório, utilizando modelo de perfusão de coração isolado, revelam que a recuperação funcional pós-isquêmica foi melhor nos animais tratados previamente com T3, quando comparada à do grupo controle que não recebeu HT, caracterizando o T3 como um potencial agente cardioprotetor (Tavares et al., 2013). Essa ação cardioprotetora do T3 foi em parte mediada pelo SRA (receptor AT2), uma vez que a inibição farmacológica desse receptor aboliu o efeito cardioprotetor do T3.

2 HIPÓTESE DO ESTUDO

Como citado previamente, nós evidenciamos recentemente uma importante participação dos receptores AT₂ no modelo de hipertrofia cardíaca induzida pelo HT (Carneiro-Ramos et al., 2010) e reportamos ainda que este receptor é, em parte, o responsável pelo efeito que o HT exerce na produção de NO em células musculares lisas vasculares (Carrillo-Sepulveda et al., 2013). Por outro lado, o HT, por sua vez, exerce um efeito cardioprotetor bastante similar àquele observado com o pré-condicionamento, ou seja, aumenta a contratatura isquêmica e melhora a recuperação da função cardíaca pós-isquemia no modelo de coração isolado (Pantos et al., 2002). Desta forma, levando em consideração:

1 – o fato de a hipertrofia cardíaca induzida por elevados níveis de HT ser mediada por ativação da via PI3K/Akt (Diniz et al., 2009)

2 – o fato desta via de sinalização (PI3K/Akt) ser ativada pelo receptor AT₂ (Caruso-Neves, Kwon, Guggino, 2005) e promover o aumento da síntese de NO (Han et al., 2007);

3 – e ainda o fato da hipertrofia cardíaca induzida por elevados níveis de HT ser acompanhada por aumento dos níveis de expressão dos receptores AT₂ (Carneiro-Ramos et al., 2010) e a ativação destes receptores levar ao aumento da produção de NO nos miócitos cardíacos (Ritter et al., 2003);

a hipótese deste trabalho, a qual testamos neste estudo é a de que:

“o efeito cardioprotetor dos HT no modelo de Isquemia/Reperusão ocorra como consequência à ativação dos receptores AT₂ e aos elevados níveis de NO gerados a partir dessa ativação”. Assim, em animais que não expressam esses receptores (nocautes para AT₂), hipotetizamos que haja a perda, mesmo que parcial, desse efeito cardioprotetor dos HT.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Diante do exposto previamente, temos como objetivo no presente estudo avaliar se o efeito cardioprotetor dos HT ocorre com a participação do receptor de Angiotensina II do tipo 2 (AT2), analisando a contribuição do metabolismo mitocondrial neste processo. Para tal, será usado o modelo de Isquemia-Reperusão, em corações isolados de camundongos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel do receptor AT2 na recuperação da função cardíaca pós-isquemia, em situações de hipertireoidismo, através da análise dos seguintes parâmetros cardíacos: LVDP (pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo), EDP (pressão diastólica final), $+dP/dt$ (primeira derivada positiva de pressão por tempo) $-dP/dt$ (primeira derivada negativa de pressão por tempo), frequência cardíaca (FC) e pressão de perfusão das artérias coronárias (PP);
- Avaliar a possível contribuição do AT2 no metabolismo mitocondrial observado no hipertireoidismo;
- Avaliar a participação do receptor AT2 na ativação da via de sinalização PI3K/Akt na hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo;
- Avaliar o papel do AT2 na produção de NO induzida pelo tratamento com HT.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Grupos Experimentais

Todos os experimentos foram realizados de acordo com a lei federal nº 6638 de 1979, que regulamenta o emprego de animais em experimentação científica, sob aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (registrado sob nº120 na fl. 109 do livro 02, protocolo 120/11).

Foram utilizados camundongos machos geneticamente modificados e seus controles (selvagens); camundongos apresentam função cardíaca suficientemente similar à dos humanos, o que faz deste modelo uma estratégia interessante para estudos que possam vir a ser relevantes para as condições fisiológicas humanas (Senbonmatsu et al., 2003). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas e mantidos em sala climatizada com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo utilizados com idade entre 10 e 14 semanas. Os camundongos foram sacrificados por decapitação 10 minutos após serem heparinizados (200 UI), por via intraperitoneal, uma vez que o uso de anestésicos pode induzir mudanças nas concentrações bioquímicas basais de enzimas envolvidas no SRA (Kilbourn et al., 2007). Seguida a decapitação, o animal foi submetido à toracotomia e o coração retirado e colocado num béquer contendo solução de Krebs- Henseleit oxigenada, com temperatura de 4 °C. Posteriormente, o coração foi transferido para uma placa de Petri, onde foram retirados vasos, partes do pulmão, traquéia e esôfago, que eventualmente acabam acompanhando o coração. Em seguida, a artéria aorta ascendente foi seccionada, canulada e fixada numa cânula de aço inoxidável acoplada ao sistema de perfusão – Langendorff, conforme descrito por Castro e cols. (2006).

4.2 Camundongos Geneticamente Modificados (AT2R)

Os camundongos geneticamente modificados utilizados neste estudo foram provenientes do Biotério de Animais Transgênicos do Laboratório de Hipertensão do ICB-UFMG (Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade Federal de Minas Gerais), cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Robson Augusto Souza dos Santos e mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia (ICB-

USP). Esses camundongos, gerados no *Howard Hughes Medical Institute*, na *Vanderbilt University School of Medicine, Nashville - TE, USA*, apresentam uma inserção de uma sequência de um cassete de resistência à neomicina, que torna o AT2R inativo, porém estruturalmente conservado. Os animais foram desenvolvidos a partir da linhagem de camundongos C57Bl/6 (Ichiki et al., 1995). Em decorrência da ausência funcional do receptor AT2, esses camundongos apresentam um acréscimo de cerca de 10mmHg na pressão arterial média, além de valores menores na razão peso do ventrículo esquerdo/peso corpóreo, espessura e massa do ventrículo esquerdo, quando comparados aos animais selvagens (Ichiki et al., 1995, 2001; Senbonmatsu et al., 2000). Mesmo com essas alterações, a função cardíaca desses animais não difere daquela dos selvagens (Senbonmatsu et al., 2000). Estudos que utilizaram esses animais revelaram que esses camundongos preveniram o estabelecimento da hipertrofia cardíaca, tanto no modelo de estenose aórtica, como no de infusão crônica de Ang II (Ichihara et al, 2001; Senbonmatsu et al., 2000). A função cardíaca mostrou-se similar entre os camundongos AT2- vs. selvagens, tanto no trabalho que utilizou o modelo de estenose aórtica, quanto no de infusão crônica de Ang II. O grupo de pesquisadores que desenvolveu esse camundongo geneticamente modificado ainda demonstrou não haver alteração morfológica em áreas que expressam o receptor AT2, como cérebro (oliva inferior e locus coeruleus), coração, pulmões, rins e glândulas adrenais (Ichiki et al., 1995).

4.3 Genotipagem por Reação em Cadeia de Polimerase (RT-PCR)

Os animais obtidos a partir dos cruzamentos realizados no Biotério do Departamento de Anatomia – ICBIII/USP foram genotipados ao atingirem 4 semanas de vida, para verificar a presença da alteração genética que resulta na ausência da expressão dos receptores AT2 funcional.

4.3.1 Coleta de tecido

As amostras de tecidos para a extração do DNA foram obtidas através da coleta de aproximadamente 3 mm da extremidade caudal do camundongo. Os tecidos foram então homogeneizados com 500 uL de tampão de lise (Tris

HCl 1M-pH 8,5, EDTA 0,5M-pH 8,0, SDS 10%, NaCl 4M, água MilliQ e proteinase K 10 mg/mL) e deixados *overnight* sob agitação de 150 rpm numa temperatura de 55°C.

4.3.2 Extração do DNA

No dia seguinte à coleta do tecido procedeu-se com uma centrifugação a 1.000g, a 4 °C por 2 min. O sobrenadante dessa centrifugação foi retirado e homogenizado, por inversão, com 500 uL de isopropanol, afim de precipitar o DNA, cuja visualização tornou-se possível. Após nova centrifugação (10.000g, a 4 °C por 10 min), o sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA lavado com 1mL de etanol 70 ° e submetido a mais uma centrifugação (10.000 g, a 4 °C, por 5 min). O descarte do sobrenadante foi realizado e as amostras permaneceram por 15 minutos secando em temperatura ambiente. A solubilização do DNA foi feita em 100 uL de TE (Tris HCl+EDTA) pH 8,0 e a quantificação a 260/280 nm foi realizada em um leitor de microplacas Biotek® (Gen5 Data Analysis Software).

4.3.3 Reação de PCR e Gel de Agarose

Para reação de PCR foi utilizado o kit comercial GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, EUA) contendo a enzima TaqDNA polimerase, dNTPs, MgCl₂ e tampão de reação, sendo ainda adicionados água livre de RNase, o DNA coletado e os primers sense e anti-sense.

Para a amplificação dos fragmentos de DNA foram utilizados 30 ng de DNA. Os primers foram adquiridos da Integrated DNA Technologies (IDT), diluídos em água MilliQ autoclavada numa concentração de 10 µM, aliquotados e congelados (-20 °C). Os primers para o receptor AT2 foram: 5'-CCC CTT AGG CTT TGG GTA TG-3' e 5'-TAA GAT GCT TGC CAG GGA TT-3' (*primers common sense e anti-sense*, respectivamente) A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi realizada com os seguintes parâmetros: 1 ciclo de desnaturação na condição de 95 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos (95 °C – 3 min, 60 °C – 30 seg e 72 °C – 1 min) no termociclador (MJ Research – PTC200).

O gel de agarose foi preparado logo após o término da reação de PCR, utilizando-se 0,25 g de agarose diluída em 30 mL de TAE 1X e 10 µL de

brometo de etídio (10 mg/mL). As amostras foram pipetadas nos poços do gel (5 µL da amostra + 1 µL de Loading Dye), sendo o primeiro poço preenchido com 2 µL de Ladder - GeneRuler 1 kb DNA (Thermo Scientific®). O gel foi então submetido a um campo elétrico de 70W por 40 minutos para fracionamento do DNA. O gel foi posteriormente fotografado (Kodak 1D Image Analysis Software Version 3.6), como mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Produtos da reação de PCR da sequência do receptor AT2, apresentados numa corrida eletroforética em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 10 mg/mL. Receptor AT2 dos animais selvagens (aproximadamente 500pb) e nocaute (aproximadamente 1.100pb) (Fonte: Silva, 2014).

4.4 Grupos Experimentais

Os grupos foram formados por camundongos geneticamente modificados para o receptor AT2 e seus controles (obtidos por cruzamento com camundongos C57Bl/6):

Grupo 1: Selvagens submetidos ao protocolo de I/R eutireoideos (WT-C);

Grupo 2: Selvagens submetidos ao protocolo de I/R hipertireoideos (WT-T3);

Grupo 3: Nocautes submetidos ao protocolo de I/R eutireoideos (KO-C);

Grupo 4: Nocautes submetidos ao protocolo de I/R hipertireoideos (KO-T3).

4.4.1 Indução ao Hipertireoidismo

O hipertireoidismo foi induzido nos camundongos pela administração de triiodotironina i.p. (T3, 7 ug/100 g de peso corpóreo por 14 dias; Sigma – Aldrich). O T3 foi previamente dissolvido em NaOH (0,1 M), diluído em solução salina e armazenado em condições adequadas. A dose de indução ao hipertireoidismo corresponde a 20 vezes a dose fisiológica de T3, tendo já sido

utilizada em trabalhos prévios do grupo (Carrillo-Sepúlveda et al. 2010; Tavares et al, 2013).

4.5 Dosagem dos hormônios tireoidianos

As dosagens plasmáticas de HT foram realizadas nos camundongos tratados por 14 dias com T₃ ou salina e as dosagens foram feitas mediante a técnica de radioimunoensaio (RIA), sendo utilizado um kit comercial (Coat-a-Count, Siemens®) para as dosagens de T4 total. Conforme as instruções do próprio kit, não houve a necessidade de qualquer tipo de extração ou purificação prévia dos compostos do plasma. O sangue foi coletado por punção cardíaca utilizando-se 100 U de heparina (Hepamax-S Blau®), imediatamente centrifugado (3.000 RPM, 15 min, 4 °C) e armazenado em freezer -80°C. As amostras foram posteriormente descongeladas e homogeneizadas, conforme as recomendações do fabricante para o uso do kit.

A quantificação foi realizada através de um elemento radioativo, Iodo 125 (I¹²⁵), no qual curvas-padrão foram construídas e a contagem foi feita em um Contador Gama (Wizard Automatic Gama Counter, Modelo 170) localizado no Laboratório Multiusuário do Departamento de Anatomia – ICB III – USP.

4.6 Preparação do Coração Isolado

Como descrito anteriormente, os corações foram excisados e limpos em solução modificada de Krebs-Henseleit (KH) contendo: NaCl (118 mM), KCl (4,7 mM), CaCl₂ (1,75 mM), MgSO₄ (1,66 mM), NaHCO₃ (24,88 mM), KH₂PO₄ (1,18 mM), dextrose 2 g/L e água bi-destilada, pH 7,4. O pH foi ajustado por contínua gaseificação com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. O perfusato foi preparado no momento do experimento e filtrado (Swinnex® 47mm, poro da membrana 0,22 µm) imediatamente antes da perfusão.

Os corações foram rapidamente montados no Sistema de Langendorff (Radnoti-ADInstruments) e perfundidos retrogradamente, de acordo com o Método de Langendorff (Langendorff, 1895), através da aorta ascendente, em solução KH, a 37 °C, a fluxo constante de 3 ml/min e sem recirculação (Figura 4). Menos de 3 minutos foi o tempo utilizado entre a retirada do coração do

animal e a canulação da aorta no sistema. Quando o período de preparação excedeu esse tempo, o coração foi descartado.

Todos os corações foram submetidos ao processo de Isquemia/Reperusão obedecendo a um protocolo experimental de 30 minutos de estabilização, 20 minutos de isquemia global (fluxo=0) e posterior restauração do fluxo, com 45 minutos de reperusão (Castro et al., 2006). Ao término do experimento o coração foi pesado, os átrios desprezados e os ventrículos separados em ventrículo direito e ventrículo esquerdo + septo e armazenados a -80 °C para posterior processamento das amostras.

Figura 4 - Sistema de perfusão de coração isolado – Langendorff (ADInstruments-Radnoti). Fonte: ADInstruments, 2016.

4.7 Aquisição de dados

Cinco parâmetros foram aferidos: a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP – *Left Ventricular Developed Pressure*), que corresponde à diferença entre a pressão sistólica (LVSP – *Left Ventricular Systolic Pressure*) e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (LVEDP – *Left Ventricular End Diastolic Pressure*). A dP/dt máxima e dP/dt mínima, que são índices de contratilidade e de relaxamento do coração, respectivamente, a frequência cardíaca e pressão de perfusão. Todos estes parâmetros foram monitorados continuamente por um sistema de registro (PowerLab-Lab Chart 7, ADInstruments, USA).

4.7.1 Função ventricular esquerda

A função ventricular esquerda foi avaliada mediante a utilização de um balonete intraventricular; assim como descrito por Fallen e cols. (1967). Este método oferece a possibilidade de avaliar, com considerável exatidão, a força contrátil. Um pequeno balonete foi inserido no interior do ventrículo esquerdo, entre o 5º e 10º minuto do período de estabilização, através de uma incisão no átrio esquerdo (Figura 5). O volume do balonete foi ajustado a produzir uma pressão diastólica final de 5-10 mmHg em todos os grupos, determinando a pré-carga não-fisiológica no início do experimento. O balonete medindo cerca de 3 - 3,5 mm de diâmetro foi confeccionado de maneira artesanal, a partir de filme PVC, no próprio laboratório. Este, foi conectado ao transdutor de pressão (ADInstruments, EUA) acoplado ao software (LabChart 7.0) para aquisição de dados.

A fim de avaliar a função sistólica do ventrículo esquerdo, foram utilizados os valores de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP) (definida como a diferença entre o pico de pressão sistólica do ventrículo esquerdo e a pressão ventricular esquerda diastólica final), pela primeira derivada positiva ($+dP/dt$) e negativa ($-dP/dt$) da pressão ventricular. O parâmetro de frequência cardíaca foi derivado a partir dos parâmetros obtidos pelo balonete intraventricular.

Figura 5 - A. Representação (esquerda) e B. Fotografia (direita) de um coração canulado num sistema de perfusão isolado com um balonete inserido no ventrículo esquerdo (imagem encontrada em Bell et al., 2011).

4.7.2 Pressão de Perfusão

Um transdutor de pressão conectado à cânula de perfusão foi utilizado para avaliar a pressão de perfusão. O coração foi suprido pelo perfusato oxigenado através de uma bomba peristáltica de fluxo pulsátil e constante, que foi capaz de gerar uma pressão de perfusão correspondente variável, que dependeu da resistência imposta pelas coronárias de cada animal.

4.8 Determinação do dano tecidual e extensão do infarto

O perfusato cardíaco foi coletado em 4 diferentes tempos de reperfusão: 1, 5, 10 e 15 minutos, para análise da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH). Esse ensaio foi realizado a fim de verificarmos o dano tecidual nos diferentes grupos estudados, e consiste na observação na queda da absorbância no comprimento de onda 340 nm, sendo a atividade da LDH proporcional à redução dos níveis de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). Utilizamos piruvato como substrato enzimático.

O perfusato foi mantido na geladeira (2-6 °C) e analisado até 8h após coleta. Numa placa de leitura de absorbância de 90 poços foram adicionados em duplicata e lidos num espectrofotômetro com comprimento de onda de 340 nm (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader - Biotek®):

- 190 µl de Tris HCl (0,2 M pH 7,3);
- 7 µl de NADH (6,6 mM);
- 7 µl de Piruvato de Sódio (30 mM);
- 20 µl do perfusato.

Ao término do período de reperfusão uma secção transversal dos dois ventrículos (cerca de 2-3mm), na altura da distância média entre o ápice e a base, foi realizada. A secção cardíaca foi imersa por 15 minutos numa solução tamponada (pH 7,4) de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 1% a 37 °C. Essa solução levou à formação de um aspecto vermelho escuro das áreas cardíacas viáveis, o que ocorre em virtude do TTC reagir com as moléculas de NADH₂ (NAD na sua forma reduzida) e também com as enzimas desidrogenases presentes nos tecidos viáveis. As áreas necróticas, por outro lado, apresentaram-se pálidas, uma vez que, durante a reperfusão ocorre a lavagem

destas regiões, sendo que a ausência de moléculas de NADH_2 e enzimas desidrogenases não permitem a ocorrência da reação química. Após a coloração os cortes foram imersos em solução de formol 10% por 24 h a 4 °C, permitindo um maior contraste entre as diferentes regiões (Santos et al., 2008). Posteriormente esses cortes foram escaneados e quantificados pelo programa *ImageJ* (versão 1.6.0, de domínio público <http://rsb.info.nih.gov>).

4.9 Análise mitocondrial

4.9.1 Isolamento da mitocôndria

A fim de caracterizar o metabolismo mitocondrial nos corações dos animais selvagens e nocautes tratados ou não com T3, as mitocôndrias cardíacas foram isoladas, conforme descrito previamente por Cancherini e cols. (2007). O tecido cardíaco recebeu um tampão de lise (Sacarose 300 mM, Hepes 10 mM, EGTA 2 mM, pH 7,2, 4 °C) e foi triturado na presença de 0,1mg/ml de protease do tipo I (pâncreas bovino), para que ocorresse a liberação das mitocôndrias das fibras musculares cardíacas. O tampão de lise também serviu para lavar a suspensão na presença de 0,1 mg/ml de BSA e, posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em um moedor de tecido de 2 ml. O homogenato foi posteriormente centrifugado a 1000 g por 5 min (4° C) e o sobrenadante resultante foi centrifugado a 9500 g por 10 min (4° C). O precipitado resultante (fração mitocondrial) foi lavado e ressuspendido no tampão de lise.

4.9.2 Consumo de oxigênio na mitocôndria cardíaca isolada

Esse parâmetro foi avaliado utilizando um eletrodo específico de oxigênio (do tipo Clark) acoplado a um registrador (*Oxygraph System, Hansatech*), previamente descrito (da Silva et al., 2003). O eletrodo é composto por um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos em solução eletrolítica de KCl. A reação se processa pela corrente gerada entre os eletrodos e está relacionada com a concentração de oxigênio na superfície do cátodo. Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em tampão de KCl (Sacarose 125 mM, KCl 65 mM, Hepes 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, MgCl_2 2 mM, 0,01% BSA, pH 7.2) numa concentração final de proteína de 0,125 mg/ml. Os registros de

consumo de oxigênio foram feitos na presença de succinato (2 mM), malato-glutamato (2 mM) e ADP (1 mM). Um inibidor específico do complexo V (Oligomicina 1 µg/ml) foi adicionado para inibir a atividade deste complexo durante o ensaio. Além disso, foi utilizado ainda um desacoplador da membrana interna da mitocôndria (FCCP-1 µM) para estimular o consumo máximo de oxigênio (Figura 6). Os valores foram expressos em nanomoles por minuto por miligrama de proteína.

Figura 6 - Esquema mostrando a medida do consumo de O₂ em mitocôndria isolada do coração de camundongos. A medida basal foi feita após adição de substratos (malato, glutamato e succinato) e mitocôndria. Posteriormente foi avaliado o consumo máximo de oxigênio induzido pela adição de ADP, o consumo de oxigênio na presença de oligomicina (inibidor do complexo V) e, por fim, foi avaliado o consumo de oxigênio na presença de CCCP, um desacoplador mitocondrial. A redução dos níveis de oxigênio na câmara é inversamente proporcional ao consumo de oxigênio mitocondrial.

4.9.3 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi analisada por espectrofluorimetria, conforme Tahara e cols. (2009). A fração isolada das mitocôndrias cardíacas foi diluída em tampão de KCl (o mesmo descrito no tópico 5.8.2, referente ao consumo de oxigênio na mitocôndria cardíaca isolada), numa concentração final de proteína de 0,125 mg/ml. Através da geração de resorufina (decorrente da oxidação do *Amplex Red* (25 µM) na presença de *horseradish peroxidase* (0,5 U/ml)), a produção de H₂O₂ foi determinada, sendo identificada pelos comprimentos de onda de 563 nm para excitação e 587 nm para emissão. O ensaio foi realizado na presença de succinato (2 mM), malato-glutamato (2 mM), ADP (1 mM) e Oligomicina (1 µg/ml). A quantificação dos valores foi feita após uma calibração com

quantidades conhecidas de H_2O_2 , expressos em nanomoles por minuto por miligrama de proteína (Figura 7).

Figura 7 - Esquema ilustrativo da quantificação de liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em mitocôndria isolada. A medida basal foi feita após adição de substratos (malato, glutamato e succinato) e mitocôndria. Quando o ADP foi adicionado ao sistema, ocorreu uma estimulação da produção de ATP, com consequente aceleração da cadeia respiratória e menor escape de elétrons, que, por sua vez, produziu uma quantidade menor de espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, quando foi adicionada a oligomicina, a síntese de ATP foi bloqueada, havendo uma diminuição na respiração e um acúmulo de elétrons, possibilitando maior escape e maior formação de espécies reativas. Posteriormente, com a adição de FCCP, um desacoplador da membrana mitocondrial, ocorreu uma aceleração da entrada de prótons levando ao consumo máximo de oxigênio, com uma menor possibilidade de liberação de elétrons, diminuindo desta forma a produção de H_2O_2 .

4.9.4 Potencial da membrana interna da mitocôndria cardíaca isolada

O potencial de membrana foi avaliado por espectrofluorimetria (Tahara et al., 2009). Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em um tampão de KCl (o mesmo descrito no tópico 4.9.2 referente ao consumo de oxigênio na mitocôndria cardíaca isolada), numa concentração final de proteína de 0,125 mg/ml. Após a adição de safranina O (5 μM), succinato (2 mM) e malato-glutamato (2 mM), o potencial da membrana interna foi estimado por mudanças na fluorescência ($\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 586 \text{ nm}$) (Figura 8). Foi utilizado um desacoplador da membrana interna da mitocôndria (FCCP 1 μM) para inibir seu potencial da membrana. O ensaio é baseado no acúmulo de safranina O, um cátion lipofílico, no interior ou na proximidade da membrana mitocondrial interna, reduzindo a fluorescência da suspensão, de forma proporcional ao balanço eletroquímico mitocondrial.

Figura 8 - Esquema ilustrativo da reação de potencial de membrana interna mitocondrial. Quando a mitocôndria é adicionada, a safranina O, presente na solução, se liga à membrana mitocondrial ou entra na organela, diminuindo a fluorescência do meio. Após a adição do FCCP (desacoplador da membrana mitocondrial) ocorre a liberação da safranina O, com consequente aumento da fluorescência.

4.10 Potência aeróbica (VO₂)

O VO₂ corresponde ao volume de oxigênio que o corpo consegue capturar no ar presente nos pulmões, entregando-o aos tecidos através do sistema cardiovascular para ser usado na produção de energia, numa unidade de tempo. Este foi mensurado nos camundongos com quatorze semanas de vida, por meio de teste em câmara metabólica de calorimetria indireta (Van Klinken et al., 2012). Os animais foram colocados no interior de uma câmara metabólica conectada por tubos a um analisador de oxigênio e uma bomba de ar, responsável pela manutenção do fluxo de gases dentro desta câmara. O aparelho foi calibrado após cada teste e o VO₂ foi calculado pela seguinte fórmula:

$$VO_2 = \frac{(PO_{2amb} - PO_{2feo}) \times 3500}{m}$$

Onde PO_{2amb} representa a fração de oxigênio no ar ambiente, PO_{2feo} a fração expirada de oxigênio, 3500 o fluxo de ar em ml/min e “m” a massa corporal em quilogramas.

4.11 Análise da expressão proteica por Western Blotting

4.11.1 Extração e Dosagem de Proteínas Totais

Os corações acondicionados em *freezer* -80 °C foram homogeneizados em tampão de extração (90 mM KCl, 10 mM Hepes, 3 mM MgCl₂⁺, 5 mM

EDTA, 1% glicerol, 1 mM DTT, 0,04% SDS, pH7,4) no Polytron (KINEMATICA POLYTRON HOMOGENIZER MIXER – PCU11), com adição de um mix de inibidores de proteases. Após centrifugação (10.000 RPM, 20 min., 4 °C), os sobrenadantes foram coletados e congelados em *freezer* -80 °C e posteriormente utilizados como amostras empregadas na técnica de Western Blotting. A concentração de proteína foi determinada pelo Método de Bradford (Bradford, 1976) e calculada segundo a equação da reta, obtida a partir da curva de concentração padrão (Albumina Sérica Bovina - BSA), sendo todas as amostras dosadas em duplicata. Após a realização de curva de quantidade de proteína, a qual se utilizou dos pontos de 25, 50 e 75 µg, a melhor concentração proteica para a proteína de interesse foi determinada. As amostras proteicas foram separadas por eletroforese (140 V por 1 h) em gel de 10% de SDS-Poliacrilamina (Sódio Dodecil Sulfato-Poliacrilamina), e então transferidas (20V por 1 h) para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) (concentração de componentes do gel de poliacrilamida na Tabela 1).

A membrana foi marcada com solução de Ponceau para confirmar se a concentração de proteína foi similar nos diferentes poços, assim como avaliar a eficiência da transferência proteica do gel para a membrana. Posteriormente, a membrana foi lavada em Tampão Salina Tris Tween-20 (TBST) (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5 e 2% Tween-20), por 10 min, em temperatura ambiente. As membranas foram então incubadas a 4° C, *overnight* com anticorpo primário específico contra a proteína de interesse. Após lavar as membranas com TBST para remover o anticorpo primário, estas foram então incubadas por 1h, em temperatura ambiente, com o anticorpo secundário ligado à peroxidase. Após a ligação do anticorpo secundário (Jackson Immuno Research), foi acrescentada uma solução de ECL (Enhanced Chemiluminescence – Thermo Scientific®), que, ao reagir com a peroxidase do anticorpo secundário, produziu uma reação quimioluminescente, oxidando um filme de raio-X (T-MAT G/RAFilm - KODAK) e permitindo a identificação de bandas referentes à marcação de proteínas específicas ao anticorpo primário.

A banda correspondente à proteína de interesse foi quantificada por densitometria em um sistema de fotodocumentação através do *software*

ImageJ (versão 1.6.0, de domínio público <http://rsb.info.nih.gov>), onde a densidade ótica de cada banda foi detectada.

Tabela 1 - Soluções para preparação do Gel de SDS-Poliacrilamida

Componente	Gel 10% (ml)
Água Destilada	4,0
30% Mix de Acrilamida	3,3
1.5 M Tris (pH 8,8)	2,5
10% SDS	0,1
10% Persulfato de Amônio	0,1
TEMED	0,004

Os valores expressos acima são utilizados para preparação de um Gel de 10 ml.

4.11.2 Expressão proteica – Akt e iNOS

A expressão proteica da Akt e iNOS foi avaliada e quantificada por Western Blotting. Foram utilizados anticorpos primários para GAPDH, α -actinina, Akt total e fosforilada, e para iNOS (Tabela 2).

Tabela 2 - Lista dos anticorpos primários utilizados para análise de expressão proteica por Western Blotting

Proteínas Analisadas	Origem	Peso Molecular	Titulação
Akt 1	Santa Cruz (sc-7126)	62kDa	1:700
p-Akt 1/2/3 (Ser473)	Santa Cruz (sc-7985)	56-62kDa	1:700
p-Akt 1/2/3 (Thr308)	Santa Cruz (sc-16646-R)	56-62kDa	1:500
iNOS	Sigma-Aldrich (N9657)	130kDa	1:1000
α -actinina	Santa Cruz (sc-17829)	100 kDa	1:5000
GAPDH	Santa Cruz (sc-47778)	37 kDa	1:5000

Os anticorpos secundários utilizados foram produzidos pela Jackson Immuno Research (Laboratories, Inc – PA/USA), com titulação de 1:40.000 (Akt1), 1: 10.000 (p-Akt, α -actinina e GAPDH) e 1:5.000 (iNOS).

4.12 Quantificação de óxido nítrico (NO)

Lisados de tecido cardíaco foram obtidos após homogenização por Polytron (KINEMATICA POLYTRON HOMOGENIZER MIXER – PCU11) em tampão de extração proteica (ver tópico 4.11.1), juntamente com um mix de inibidores de proteases (20 mM aprotinina, 20 nM pepstatina, 20 nM

leupepstatina, 40 μ M PMSF e 100 mM ortovanadato). Após centrifugação (10.000 RPM, 15 min., 4 °C), os sobrenadantes foram coletados e congelados imediatamente em *freezer* -80 °C. Posteriormente, alíquotas de 10 μ L do lisado foram injetadas no detector quimioluminescente de óxido nítrico de alta sensibilidade - Nitric Oxide Analyzer (NOA™ 280; Siervers Inc., Boulder, CO, USA). O funcionamento deste aparelho se baseia na reação de quimioluminescência em fase gasosa entre o óxido nítrico e o ozônio gerada pela redução da amostra com cloreto de vanádio (VCl_3) em ácido clorídrico (HCl) a 95 °C (Braman, Hendrix, 1989). Após a adição das amostras no aparelho um *software* do próprio equipamento determinou a área sob a curva transformando-a em concentração (μ M). A concentração de NO (μ M) foi comparada com um padrão e normalizada pela concentração proteica.

4.13 Análise estatística

Os dados obtidos no presente estudo encontram-se apresentados na forma de média $\pm$ erro-padrão. O valor amostral (n) corresponde ao número de animais utilizados. Os resultados foram analisados e comparados utilizando-se o Teste t de “Student” ou a Análise de Variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, para análises two-way. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

Na sequência serão descritos primeiramente os resultados obtidos em condições basais e em seguida aqueles obtidos frente ao modelo de Isquemia-Reperfusão, conforme orientação dos itens a seguir:

- 5.1 Caracterização do modelo experimental;
- 5.2 Caracterização do papel do receptor AT₂ no metabolismo mitocondrial;
- 5.3 Papel do receptor AT₂ nos efeitos promovidos pelo T₃, após I-R, na avaliação de:
 - 5.3.1 Parâmetros de função cardíaca;
 - 5.3.2 Parâmetro de função bioquímica;
 - 5.3.3 Parâmetro morfológico;
 - 5.3.4 Parâmetros de metabolismo mitocondrial;
- 5.4 Possíveis mecanismos moleculares envolvidos no efeito cardioprotetor do T₃ via receptor AT₂.

5.1 Caracterização do modelo experimental

A dosagem sérica do T₄ total no plasma dos animais nos diferentes grupos experimentais foi realizada para comprovação da eficiência do modelo experimental. Os animais de ambos os grupos (selvagem e nocaute) que receberam injeções diárias de T₃ (WT-T₃ e KO-T₃), apresentaram redução significativa nos níveis de T₄ total em relação aos controles (WT-C e KO-C, respectivamente), confirmando o funcionamento da alça de retroalimentação negativa e, portanto, o estado hipertiroideo que desenvolveram (Figura 9).

O modelo de hipertireoidismo experimental induzido pela administração de T₃ (20X a dose fisiológica) foi caracterizado previamente em nosso laboratório, em ratos. Sendo assim, os experimentos foram iniciados pela caracterização do modelo experimental, agora em camundongos. Para tal, foi utilizado como parâmetro de avaliação a razão peso do coração, em miligramas (mg), pelo comprimento da tíbia, em milímetros (mm), uma vez que o aumento desta razão reflete a intensidade da hipertrofia cardíaca,

característica comumente associada ao tratamento com doses supra fisiológicas de hormônio tireoideano. Conforme mostrado a seguir, a administração de T3 determinou uma hipertrofia cardíaca com aumento de 26,28% da razão peso do coração/comprimento da tíbia nos WT e 28,95% nos KO (Figura 10).

Figura 9 - Dosagem sérica dos níveis de T4 total (ug/dl). WT-C – Selvagem Controle (n= 5); WT-T3 – Selvagem Hipertireoideo (n=5); KO-C – Nocaute Controle (n=5); KO-T3 – Nocaute Hipertireoideo (n=5). * vs. WT-C (p<0,05); # vs. KO-C (p<0,05). Fonte: Silva, 2016.

Figura 10 - Análise da razão peso do coração pelo comprimento da tíbia, nos diferentes grupos experimentais. WT-C – Selvagem Controle (n= 5); WT-T3 – Selvagem Hipertireoideo (n=5); KO-C –Nocaute Controle (n=8); KO-T3 – Nocaute Hipertireoideo (n=7). * vs. WT-C (p<0,05); # vs. KO-C (p<0,05). Fonte: Silva, 2016.

5.2 Caracterização do papel do receptor AT2 no metabolismo mitocondrial

Conforme citado anteriormente, com a identificação do receptor AT2 na membrana interna da mitocôndria da célula muscular cardíaca, capaz de modular a produção de óxido nítrico (NO) nessa organela, buscamos entender o papel funcional desse receptor como parte do SRA subcelular e o seu envolvimento com a respiração mitocondrial. Sendo assim, inicialmente foi realizada uma caracterização em mitocôndrias isoladas de corações de camundongos na presença e na ausência do receptor AT2, induzidos ou não ao hipertireoidismo. Essa caracterização foi realizada com os seguintes experimentos: avaliação do consumo de oxigênio mitocondrial, liberação de peróxido de hidrogênio e medida do potencial de membrana interna mitocondrial. Todas as medidas foram realizadas nos animais entre 12 e 14 semanas de idade.

5.2.1 Consumo de oxigênio mitocondrial

No ensaio de consumo de oxigênio mitocondrial foi possível avaliar os seguintes parâmetros: consumo de oxigênio no Estado 2 (respiração basal), consumo de oxigênio no Estado 3 (respiração máxima após adição de ADP), consumo de oxigênio no estado 4 (respiração após adição de oligomicina, bloqueador do complexo V) e consumo de oxigênio no estado desacoplado (após adição de FCCP). Ainda, para avaliar a eficiência respiratória mitocondrial foi calculado o coeficiente de controle respiratório (CR), como sendo a razão entre o consumo de oxigênio no estado 3 e no estado 4, de acordo com Chance e Williams (1955).

Em relação à respiração basal (estado 2), é possível observar que somente os animais KO tiveram, após tratamento com T3, aumento deste parâmetro (Figura 11A). Quanto ao consumo máximo de oxigênio, representado pelo estado 3 (adição de ADP ao meio), o tratamento com T3 promoveu significativa diminuição deste parâmetro nas mitocôndrias dos animais selvagens (WT-T3) e aumento naquelas dos nocautes (KO-T3), quando comparados aos respectivos controles (Figura 11B). No que se refere ao estado 4, o qual reflete o desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons, mais uma vez se observa que o tratamento com T3 promoveu

aumento significativo apenas no grupo nocaute (KO-T3 vs. KO-C), não tendo exercido efeito neste parâmetro no grupo WT (Figura 11C).

Figura 11 - Consumo de oxigênio em mitocôndria isolada. Estado 2 (A), Estado 3 (B), Estado 4 (C), FCCP (D) e Controle Respiratório (CR) Mitocondrial (E) nos grupos controles e tratados dos animais nocaute e selvagens. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão, * vs. WT-C ($p \leq 0,05$), # vs. KO-C ($p \leq 0,05$) e & vs. WT-T3 ($p \leq 0,05$). Os grupos nocautes (controle e tratado) apresentam $n=7$ e os grupos selvagens (controle e tratado) apresentam $n=6$. Foram utilizados três animais para compor $n=1$. Fonte: Silva, 2016.

É notório observar que no estado 4 houve uma diminuição no consumo de oxigênio em todos os grupos, o que já era esperando tendo em vista que a oligomicina age diretamente na síntese de ATP, interferindo no funcionamento da cadeia transportadora de elétrons (Figura 11C).

Na avaliação do estado desacoplado (FCCP) não houve diferença entre os grupos (Figura 11D). Ainda, o controle respiratório mitocondrial (CR) mostrou-se reduzido no grupo selvagem tratado (WT-T3), apontando para um prejuízo no acoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa mitocondrial desencadeada pelo T3 (Figura 11E).

De modo geral, estes dados em conjunto apontam para o aumento do consumo de oxigênio mitocondrial que ocorreu nas mitocôndrias dos animais hipertiroideos que não expressam o receptor AT2.

5.2.2 Liberação de peróxido de hidrogênio

Após a análise do consumo de oxigênio mitocondrial, buscamos avaliar a liberação de radicais livres (peróxido de hidrogênio). A maior parte dos nossos achados aponta para uma alta liberação de H_2O_2 mitocondrial nos animais tratados com T3.

Os resultados mostram que os animais controles (WT e KO) apresentam diferença na produção de peróxido de hidrogênio em quase todas as situações metabólicas (exceto no estado 4 – Oligomicina). Os animais KO parecem produzir uma quantidade menor de H_2O_2 numa situação basal (sem tratamento com T3), e, uma vez submetidos ao tratamento com T3 (KO-T3), o perfil metabólico muda completamente, resultando em aumento na produção de H_2O_2 em todos os estados analisados, sobretudo quando a mitocôndria não está em situações que estimulam o consumo máximo de oxigênio (estado 2 e na adição de oligomicina ao meio) (Figura 12).

Figura 12 - Liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela mitocôndria. Estado 2 (A), Estado 3 (B), Estado 4 (C) e Estado desacoplado - FCCP (D) nos grupos WT-C, KO-C, WT-T3 e KO-T3. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão, * vs. WT-C ($p \leq 0,05$), # vs. KO-C ($p \leq 0,05$) e & vs. WT-T3 ($p \leq 0,05$). Os grupos nocautes (controle e tratado) apresentam $n=7$ e os grupos selvagens (controle e tratado) apresentam $n=6$. Foram utilizados três animais para compor $n=1$. Fonte: Silva, 2016.

Após análise dos dados de produção de H₂O₂ e verificação da maior liberação de radicais livres pela mitocôndria dos animais tratados com T3, sobretudo os nocautes, passamos a avaliar outros parâmetros da biologia mitocondrial, essenciais para sua funcionalidade. Sendo assim, avaliamos o potencial da membrana interna mitocondrial.

5.2.3 Potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

O potencial elétrico da membrana mitocondrial (potencial transmembranar) corresponde à diferença de potencial elétrico (DDP), ou voltagem, entre os meios intra e extramitocondrial. Como observado visto na figura 13, não houve diferença quanto a este parâmetro entre os grupos experimentais analisados.

Figura 13 - Delta do potencial de membrana mitocondrial nos grupos controle e tratado, dos animais nocautes e selvagens. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão, WT-C (n=5), KO-C (n=5), WT-T (n=5) e KO-T (n=4). Fonte: Silva, 2016.

Baseado nesses dados de caracterização mitocondrial, e, partindo da ideia de que os animais com deleção genética do receptor AT2 (KO) apresentaram alterações no metabolismo energético celular, decidimos analisar a potência aeróbica dos animais nocautes e selvagens em repouso, verificando a taxa de metabolismo basal dos animais. Os resultados obtidos encontram-se a seguir.

5.2.4 Potência aeróbica (VO_2)

O VO_2 foi mensurado nos camundongos por meio de teste em câmara metabólica (como descrito anteriormente). Os animais nocautes para o receptor AT2 (KO) sugeriram uma tendência à diminuição do consumo de oxigênio numa situação basal, quando comparada à dos animais selvagens (KO-C vs. WT-C; Figura 11). Partindo desta observação, mensuramos a taxa do metabolismo basal nestes animais (Figura 14). Esse experimento revelou que a ausência do receptor AT2 contribui para um menor consumo de O_2 nesses animais, em situação de repouso.

Figura 14 - Taxa metabólica basal mensurada por calorimetria indireta, nos animais selvagens (WT) e nocautes para o receptor AT2 (KO). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão, n = 4. Fonte: Silva, 2016.

5.3 Papel do receptor AT2 nos efeitos promovidos pelo T₃ após I/R

Os dados apresentados a seguir foram obtidos a partir dos experimentos de coração isolado, conforme descrito na metodologia (4.7.1 Função Ventricular Esquerda). Os parâmetros foram registrados durante todo o experimento (95 minutos) e, para a avaliação, foram então selecionados os últimos 5 minutos do período de estabilização (30 minutos) e os diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos).

5.3.1 Parâmetros de função cardíaca

5.3.1.1 Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP)

A pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo corresponde à diferença entre o pico de pressão sistólica e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo, sendo este um parâmetro de fundamental importância para avaliar a função cardíaca. Os resultados da Figura 15 demonstram não haver diferença nesse parâmetro entre os grupos analisados no período de estabilização, momento que antecede o insulto isquêmico.

Durante a reperfusão, período após a isquemia - momento onde o tecido cardíaco passou por uma série de mudanças metabólicas na tentativa de manter suas funções preservadas, a deleção do receptor AT2 não alterou a LVDP nos períodos analisados (WT-C vs. KO-C). O tratamento com T₃ promoveu nos animais selvagens (WT-T₃) um significativo aumento da LVDP em todos os tempos de reperfusão analisados (25, 35 e 45min). Esses dados mostram que o tratamento com T₃ imprimiu nos animais selvagens uma total capacidade de recuperação do coração, frente a esse parâmetro, uma vez que os valores observados nos três períodos de reperfusão atingem os valores encontrados durante o período de estabilização (100%). No entanto, esse efeito do T₃ deixou de ser observado nos animais contendo ausência do receptor AT2 (KO-T₃ vs. KO), em qualquer dos tempos avaliados, mostrando a

participação do receptor AT2 no efeito do HT sobre a recuperação da LVDP (Figura 16).

Figura 15 - Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), em mmHg, no período de estabilização. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). Fonte: Silva, 2016.

Figura 16 - Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização), nos diferentes tempos de reperusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). * vs. WT-C do respectivo tempo de reperusão ($p < 0,05$), & vs. WT-T3 do respectivo tempo de reperusão ($p < 0,05$). Fonte: Silva, 2016.

5.3.1.2 Primeira derivada positiva da pressão ventricular esquerda

A variação da pressão por unidade de tempo (dP/dt), normalmente denominada de 1ª derivada temporal da pressão ventricular, corresponde a um dos índices utilizados para avaliação da função do ventrículo esquerdo. A derivada positiva, $+dP/dt$ – derivada máxima, é considerada um índice de contratilidade e através deste parâmetro é possível avaliar, mesmo que de maneira indireta, o inotropismo cardíaco, o qual corresponde à propriedade do coração relacionada à força de contração muscular.

No período de estabilização, a dP/dt máxima foi similar em ambos os grupos controles (WT-C e KO-C). No entanto, este parâmetro foi significativamente aumentado nos grupos tratados com T_3 (WT-T3 e KO-T3), revelando o efeito deste hormônio sobre a força contrátil cardíaca, mesmo na ausência do receptor AT2 (Figura 17). No que se refere ao período de reperfusão, embora não haja diferença estatisticamente significativa nos dois primeiros tempos analisados (25 e 35 min), aos 45 minutos fica claro o efeito que o tratamento com T_3 promoveu aumentando esse parâmetro nos animais selvagens (WT-T3), em relação àqueles que não receberam o T_3 (WT-C). Novamente, conforme observado em relação à LVDP, o tratamento com T_3 no grupo KO (KO-T3) não sofreu alteração na dP/dt máxima, mostrando que a ausência do receptor previne a recuperação cardíaca, no que concerne à força contrátil, nos vários tempos de reperfusão (Figura 18).

Figura 17 - Primeira derivada positiva de pressão por tempo (+dP/dt), em mmHg. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). * vs.WT-C (p<0,05), # vs. KO-C (p<0,05). Fonte: Silva, 2016.

Figura 18 - Primeira derivada positiva de pressão por tempo (+dP/dt), apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização) nos diferentes tempos de reperusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). A ordem dos grupos segue a mesma disposição da Fig 16. * vs. WT-C (45min) (p<0,05) e # vs. WT-T3 (25min) (p<0,05). Fonte: Silva, 2016.

5.3.1.3 Primeira derivada negativa da pressão ventricular esquerda

A dP/dt mínima ou derivada negativa (-dP/dt) também corresponde a um índice utilizado para avaliação da função ventricular esquerda e reflete a capacidade de relaxamento cardíaco global ou lusitropismo. Esta propriedade está relacionada com o relaxamento diastólico, determinado pelo fim do processo de contração, ao término da estimulação elétrica.

No período de estabilização, conforme se pode observar, os animais com ausência do receptor AT2 (KO-C) apresentaram uma maior (menor valor negativo) e significativa -dP/dt em relação aos selvagens (WT-C). Ainda, o tratamento com T3 só foi capaz de modular este parâmetro nos animais nocautes (KO-T3), promovendo uma intensificação desse parâmetro (KO-T3 vs. KO-C) (Figura 19).

Após a reperfusão, no entanto, novamente se constata o mesmo padrão de comportamento entre os grupos observado até agora. Assim, se observa que o tratamento com T_3 promoveu nos animais selvagens (WT- T_3) significativo aumento da $-dP/dt$ nos três tempos avaliados (25, 35 e 45 minutos), o que não ocorreu nos animais KO tratados com T_3 (KO- T_3) (Figura 20). Esses dados apontam para um comprometimento da recuperação do relaxamento ventricular nos animais que não expressam o receptor AT₂, frente ao estímulo hormonal por T_3 .

Figura 19 - Primeira derivada negativa de pressão por tempo ($-dP/dt$), em mmHg. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT- T_3 (n=7) e KO- T_3 (n=7). * vs.WT-C (p<0,05), # vs. KO-C (p<0,05). Fonte: Silva, 2016.

Figura 20 - Primeira derivada negativa de pressão por tempo ($-dP/dt$) apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização) nos diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). A ordem dos grupos segue a mesma disposição da Fig 16. * vs.WT-C do respectivo tempo de reperfusão ($p<0,05$), & vs. WT-T3 do respectivo tempo de reperfusão ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016.

5.3.1.4 Frequência Cardíaca

Outra propriedade cardíaca avaliada foi o cronotropismo. Essa propriedade corresponde à capacidade da célula cardíaca em gerar seus próprios impulsos elétricos de maneira independente de fatores estimulantes extrínsecos ao coração. São diversos os fatores que influenciam o cronotropismo, como íons plasmáticos, temperatura e irrigação coronariana. Com base nisto, nos experimentos com o coração isolado (*ex vivo*) os parâmetros de temperatura, fluxo e a solução de perfusão foram rigidamente controlados, garantindo que a FC não sofresse influências extrínsecas.

Conforme pode ser observado em relação ao período de estabilização (Figura 21) o tratamento com T3 promoveu um aumento significativo deste parâmetro tanto nos animais WT, como nos KO. No entanto, quando os animais foram submetidos ao dano isquêmico, não se observaram diferenças quanto a este parâmetro nos vários tempos analisados, tanto nos WT como nos animais KO (Figura 22).

Figura 21 - Frequência Cardíaca em bpm. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). * vs. WT-C ($p<0,05$), # vs. KO-C ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016.

Figura 22 - Frequência cardíaca apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização) nos diferentes tempos de reperusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=8), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=7). A ordem dos grupos segue a mesma disposição da Fig 16. Fonte: Silva, 2016.

5.3.1.5 Pressão de Perfusão

As necessidades metabólicas do tecido cardíaco fazem com que tanto a pressão de perfusão quanto o fluxo coronariano se ajustem de maneira dinâmica. A pressão de perfusão é resultante da adaptação vascular coronariana ao fluxo constante exercido pela bomba peristáltica do sistema de perfusão isolado – Langendorff (3ml/min). Com este parâmetro é possível fazer a análise indireta do estado de relaxamento e constrição das artérias coronárias dos animais submetidos às diferentes condições experimentais. Desta forma, é possível observar que, durante o período de estabilização, o efeito vasodilatador do T3 foi evidenciado apenas nos animais selvagens (WT-T3), os quais apresentaram significativa diminuição da pressão de perfusão (Figura 23). Por outro lado, a ausência do receptor AT2 curiosamente promoveu nos animais tratados com T3 (KO-T3) um significativo aumento deste parâmetro, indicando que, pelo menos em parte, o efeito do T3 atuando como vasodilatador ocorre com a participação do AT2 (Figura 23). No que concerne à pressão de perfusão ao longo dos períodos de reperusão, embora seja notória uma forte tendência de aumento no grupo selvagem tratado com

T3 (WT-T3), em relação ao WT, esta diferença não alcançou níveis de significância em qualquer dos tempos observados (Figura 24).

Figura 23 - Pressão de perfusão no período de estabilização em mmHg. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=6), WT-T3 (n=6) e KO-T3 (n=6). * vs.WT-C ($p<0,05$), # vs. KO-C ($p<0,05$). & vs. WT-T3 ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016.

Figura 24 - Pressão de perfusão apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização) nos diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=6), WT-T3 (n=6) e KO-T3 (n=6). A ordem dos grupos segue a mesma disposição da Fig 16. Fonte: Silva, 2016.

5.3.1.6 Pressão diastólica final (EDP)

O volume de água colocado no interior do balonete intraventricular correspondeu ao volume mínimo necessário para atingir uma EDP entre 5 e 10 mmHg. Assim, o volume injetado dá uma ideia indireta da dimensão interna do ventrículo esquerdo. O volume do balonete foi ajustado nos primeiros 5 minutos do período de estabilização e como os dados correspondem à média dos últimos 5 minutos do período de estabilização (entre 25 e 30 minutos), estes valores variaram. Os valores da EDP no grupo KO-C se apresentaram superiores em relação aos do WT-C (Figura 25). O tratamento com T3 não alterou este parâmetro nos animais selvagens, mas promoveu um significativo aumento da EDP nos animais nocautes (KO-T3 vs. KO-C).

Durante a reperfusão, os animais que não expressam o receptor AT2 e foram tratados com T3 (KO-T3) mostraram, em todos os tempos, a recuperação da EDP, ultrapassando os valores obtidos no período de estabilização, o que não foi observado nos demais grupos experimentais. Apenas aos 25 minutos de reperfusão houve significativo aumento da EDP nos animais KO-T3, em relação aos respectivos controles (KO-C).

Figura 25 - Pressão diastólica final no período de estabilização em mmHg. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5), KO-C (n=7), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=8). * vs. WT-C ($p < 0,05$), # vs. KO-C ($p < 0,05$) e & vs. WT-T3 ($p < 0,05$). Fonte: Silva, 2016.

Figura 26 - Pressão diastólica final apresentada como % em relação ao controle (período de estabilização) nos diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos). Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=5), KO-C (n=7), WT-T3 (n=7) e KO-T3 (n=8). A ordem dos grupos segue a mesma disposição da Fig 16. & vs.WT-T3 ($p < 0,05$). Fonte: Silva, 2016.

5.3.2 Avaliação do parâmetro bioquímico – atividade da LDH

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima que catalisa a redução reversível do piruvato a lactato. Esta enzima está presente no coração, e em situações de aerobiose (presença de oxigênio) o coração metaboliza a glicose a piruvato e, em seguida a CO_2 e H_2O , produzindo pouco lactato. No entanto, em situações de isquemia, o piruvato pode ser convertido a lactato como medida de emergência (Campbell, 2001). A enzima LDH utiliza $\text{NADH} + \text{H}^+$ para reduzir o piruvato, formando NAD^+ e lactato, sendo a atividade de LDH proporcional à formação de NAD^+ (sendo observada pela queda na absorbância no comprimento de onda 340 nm) (Champer e Harvey, 2008).

Na análise da atividade da LDH foi possível verificar que seus maiores índices, em todos os grupos, foram encontrados no primeiro minuto de reperfusão. O perfil encontrado em todos os grupos foi semelhante entre os tempos 5, 10 e 15 minutos, mostrando que o maior dano tecidual, detectável pela quantificação da LDH, ocorre imediatamente após a isquemia. É curioso observar também que, independentemente da ação do T3, o dano tecidual foi

maior no grupo que não expressa o receptor AT2 – KO-C já no primeiro minuto (KO-C vs. WT-C), mostrando que esse receptor parece estar envolvido na cardioproteção em modelos de I/R (Figura 27). É clara a diferença existente entre os grupos WT-T3 e KO-T3 nos tempos de 1 e 5 minutos e há uma forte tendência nos tempos 10 e 15 minutos, mostrando que a cardioproteção exercida pelo T3 ocorre com a participação do AT2. Esses dados fortalecem aqueles encontrados na análise de função ventricular, onde o grupo WT-T3 apresentou melhor desempenho funcional, a qual se relaciona com a menor atividade da LDH.

Figura 27 - Atividade enzimática da LDH. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=5) e os demais grupos (n=6). * vs. WT-C 1min ($p<0,05$), # vs. KO-C 1min ($p<0,05$), & vs. WT-T3 1min ($p<0,05$), § vs. KO-T3 1min ($p<0,05$) e α vs. WT-T3 5min ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016.

5.3.3 Avaliação de parâmetro morfológico - TTC

Secções transversais do coração foram obtidas para avaliar a extensão do infarto cardíaco. A porcentagem da área infartada em relação à área total analisada pode ser observada a seguir (Figura 28). O método utilizado para verificação da extensão do infarto foi o estudo anatomopatológico por coloração pelo TTC, com posterior cálculo matemático da área infartada (=área infartada X 100 / área total).

Figura 28 - Área de infarto mostrada como % em relação à área total nos diferentes grupos experimentais e cortes transversais de corações corados com TTC. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão da porcentagem de alteração da área infartada. WT-C (n=5) e os demais grupos (n=6). Fonte: Silva, 2016.

5.3.4 Avaliação de parâmetros do metabolismo mitocondrial

5.3.4.1 Consumo de oxigênio mitocondrial

Os ensaios foram realizados utilizando os mesmos parâmetros descritos no item 5.2.1 (apenas os estados 2 e 3 – basal e ADP). Os resultados após I/R são semelhantes aos que já haviam sido observados numa situação basal, sem o insulto isquêmico. Houve uma redução da respiração basal (estado 2) nos animais nocautes pertencentes ao grupo controle (KO-C), quando comparados aos selvagens controles (WT-C), e o T₃ só foi capaz de modular este parâmetro na ausência do receptor AT₂ (Figura 29A).

O consumo máximo de oxigênio, representado pelo estado 3, em ambos os grupos (nocautes e selvagens) mostrou-se significativamente aumentado tanto nos animais controles (WT-C e KO-C), como nos tratados (WT-T3 e KO-T3), quando comparados a eles mesmos no estado basal. O efeito do T₃ foi notório apenas nos animais nocautes (KO-T3) (Figura 29B). Quando estimuladas ao máximo pela adição de ADP, as mitocôndrias de todos os grupos aumentaram o consumo de oxigênio. Houve um aumento de 55,72% no consumo de oxigênio no estado 3, quando comparado ao estado 2, no grupo controle dos animais selvagens (WT-C), e 65,76% no grupo controle dos animais nocautes (KO-C). Já nos grupos tratados com T₃ o aumento foi de

71,99% e 72,05% nos grupos selvagem (WT-T3) e nocaute (KO-T3), respectivamente. É interessante notar que quando comparados aos dados descritos no item 5.2.1 (mesmos experimentos **sem protocolo de I/R**) observamos que nos grupos WT-C e KO-C a resposta ao estímulo com ADP (atividade máxima mitocondrial) foi menor, mostrando o prejuízo funcional causado pelo insulto isquêmico nesta organela. Já no grupo selvagem tratado (WT-T3) aconteceu exatamente o contrário, mostrando que a I/R deflagra os efeitos benéficos do T₃ nestes animais (Figura 29, ver também Figura 11).

Figura 29 - Consumo de oxigênio em mitocôndrias isoladas. Estado 2 (A), Estado 3 (B) e Controle Respiratório Mitocondrial (C) nos grupos controles e tratados dos animais selvagens e nocautes (WT-C, WT-T3, KO-C e KO-T3), após I/R. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. Todos os grupos apresentaram n=6. * vs. WT-C ($p < 0,05$), # vs. KO-C ($p < 0,05$). Fonte: Silva, 2016.

O controle respiratório mitocondrial (CR) mostrou-se maior nos grupos WT-T3 e KO-C em relação ao controle WT-C. Vale ressaltar que os valores de CR foram menores que os encontrados nos experimentos da Figura 11, e isso aponta para um possível prejuízo no acoplamento entre a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa mitocondrial causada pela I/R (Figura 11E).

5.3.4.2 Liberação de peróxido de hidrogênio

De maneira semelhante ao que fizemos na caracterização mitocondrial, analisamos a liberação de radicais livres (peróxido de hidrogênio) em todos os grupos estudados, agora após as condições de I-R. Os resultados mostrados na Figura 30A são semelhantes ao que foi visto antes da isquemia entre os grupos selvagens (WT-C e WT-T3). O T₃ aumentou a produção de H₂O₂ nos animais selvagens, mas diferentemente do que foi visto na figura 12 o tratamento hormonal não foi capaz de aumentar a liberação de peróxido de hidrogênio nos animais nocautes. Já na parte B da figura 30 os resultados foram completamente diferentes dos encontrados numa situação sem isquemia, ou seja, o T₃ não aumentou este parâmetro, e apenas o grupo KO-T3 se mostrou diferente do WT-T3; isto também ocorreu no estado de desacoplamento da membrana mitocondrial (Figura 30D). De maneira semelhante ao estado 3 (Figura 30B), no estado 4 o T₃ não foi capaz de aumentar a produção de H₂O₂ em ambos os grupos tratados (WT-T3 e KO-T3) como tinha sido observado antes da isquemia.

Figura 30 - Liberação de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria. Estado 2 (A), Estado 3 – ADP (B), Estado 4 - Oligomicina (C) e Estado desacoplado – FCCP (D) nos grupos WT-C, KO-C, WT-T3 e KO-T3. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. * vs.WT-C ($p<0,05$), # vs. KO-C ($p<0,05$) e & vs. WT-T3 ($p<0,05$). Todos os grupos apresentaram $n=6$. Fonte: Silva, 2016.

Na tentativa de entender a possível contribuição do AT2 mitocondrial, assim como a ação do T3 sobre o metabolismo desta organela, quantificamos a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) bloqueando seletivamente os complexos I e III. Utilizamos a rotenona para inibir o complexo mitocondrial I (Zhou et al., 2015) e para inibir o complexo III utilizamos a Antimicina (Martin et al., 2014). No estado basal (Figura 31 A e C) o comportamento mitoncodrial foi semelhante ao que havia sido observado na figura 12 (sem isquemia), já a parte B da Figura 31 revela que a produção de H_2O_2 se dá pelo escape de elétrons pelo Complexo I, uma vez que a inibição deste complexo aboliu o aumento na produção de peróxido de hidrogênio induzido pelo T3. Com a inibição do Complexo III não houve diferença na produção de H_2O_2 em comparação ao basal.

Figura 31 - Liberação de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria. Estado 2 - basal (A), Complexo I bloqueado por Rotenona (B), Estado 2 - basal (C) e Complexo III bloqueado por Antimicina (D) nos grupos WT-C, KO-C, WT-T3 e KO-T3. Dados

expressos em média $\pm$ erro-padrão. Todos os grupos apresentaram n=6. * vs.WT-C ($p<0,05$), # vs. KO-C ($p<0,05$) e & vs. WT-T3 ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016.

5.3.4.3 Potencial elétrico da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$)

Outra maneira de avaliar o papel do receptor AT2 mitocondrial (SRA subcelular) foi através da realização dos ensaios de potencial da membrana mitocondrial, uma vez que a integridade deste potencial está diretamente envolvida com a produção de energia, conforme mencionado anteriormente. Como pode ser observado na Figura 32, o T₃ modulou este parâmetro de maneira independente do receptor AT2. Ainda, vale salientar que, quando comparados aos dados de potencial realizados nos animais que não foram submetidos ao experimento prévio de I/R, observa-se que houve um aumento no potencial de todos os grupos submetidos à I/R (comparar com a Figura 13).

Figura 32 - Delta do potencial de membrana mitocondrial nos diferentes grupos experimentais submetidos ao protocolo de I/R. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. Todos os grupos apresentaram n=6. * vs.WT-C ($p<0,05$), # vs. KO-C ($p<0,05$). Fonte: Silva, 2016.

Juntos, os dados de função cardíaca, a quantificação da atividade de LDH, a mensuração da área de infarto por TTC e os parâmetros mitocondriais analisados após a I/R mostram que o T₃ é capaz de desempenhar um efeito cardioprotetor, e que este efeito depende do receptor AT2.

5.4 Possíveis mecanismos moleculares envolvidos no efeito cardioprotetor do T₃, via receptor AT2

5.4.1 Avaliação da participação do receptor AT2 na produção de NO

5.4.1.1 Expressão proteica

A fim de tentar correlacionar o papel cardioprotetor desencadeado pelo T₃ com o aumento da produção de NO, foi quantificada a expressão proteica das 3 isoformas da óxido nítrico sintase (eNOS, eNOS e iNOS). Apenas a iNOS foi detectável pela técnica de Western Blotting nas condições utilizadas. O tratamento com T₃ promoveu significativo aumento (34%) da expressão dessa enzima no grupo selvagem (WT-T3 vs. WT), o qual foi observado em menor intensidade (10%) no grupo nocaute para o receptor AT2 (KO-T3 vs. KO-C), mostrando o possível envolvimento do receptor AT2 na produção de NO pela iNOS.

Figura 33 - Expressão proteica da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOS). Razão iNOS/α-actinina dos animais selvagens e nocautes. Dados expressos em média ± erro-padrão. n = 4 para cada grupo. * vs. WT-C (p<0,05), & vs. WT-T3 (p<0,05). Fonte: Silva, 2016.

5.4.1.2 Quantificação do NO

A quantificação de óxidos de nitrogênio foi realizada no lisado proteico dos corações dos vários grupos experimentais submetidos a I/R. A concentração de NO das amostras foi quantificada e os valores expressos em μM/μg de proteína (Figura 34). Os níveis de NO não foram diferentes entre os grupos controles (KO-C vs. WT-C), havendo um aumento na síntese do NO apenas nos animais tratados com T₃, confirmando a hipótese do trabalho na

qual ocorre melhora dos parâmetros funcionais pós-isquêmicos em situação de hipertireoidismo. Vale ressaltar que o tratamento com T3 nos animais KO (KO-T3) foi completamente atenuado em relação ao efeito do T3 nos selvagens (WT-T3 vs. WT-C), mostrando que, pelo menos em parte, o aumento na síntese do NO após tratamento com T3 é mediada pelo receptor AT2.

Figura 34 - Quantificação de NO nos diferentes grupos experimentais. Animais eutireoideos e hipertireoideos selvagens e nocautes para o AT2R após I/R. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=4), WT-T3 (n=5), KO-C (n=3) e KO-T3 (n=3). * vs.WT-C (p<0,05), & vs. WT-T3 (p<0,05). Fonte: Silva, 2016.

Uma vez observado o aumento na produção do NO nos animais selvagens tratados com T₃, um novo experimento foi realizado a fim de investigar se os elevados níveis de NO induzidos pelo T₃ eram deflagrados pelo processo de I/R e não pelo tratamento por si só. Sendo assim, animais submetidos ao mesmo protocolo experimental de tratamento hormonal tiveram os níveis de NO mensurados sem que tivessem sido submetidos à I/R.

Os resultados não mostraram diferença entre os grupos, e desta maneira concluímos que a I/R é a responsável por aumentar a síntese do NO em animais hipertireoideos, sendo esta depende do receptor AT2 (Figura 35).

Figura 35 - Quantificação de NO nos diferentes grupos experimentais. Animais eutireoideos e hipertireoideos selvagens e nocautes para o AT2R não submetidos à I/R. Dados expressos em média $\pm$ erro-padrão. WT-C (n=3), WT-T3 (n=5), KO-C (n=3) e KO-T3 (n=3). Fonte: Silva, 2016.

5.4.2 Avaliação da participação do receptor AT2 na ativação da Akt

De maneira semelhante ao que ocorreu com a expressão da iNOS, o tratamento com T3 promoveu significativo aumento (47%) dos níveis de expressão da p-Akt (Thr 308) nos animais selvagens (WT-T3 vs. WT-C), o qual não foi observado nos animais nocautes para o receptor AT2 (KO-T3 vs. KO-C) (Figura 36). Quando avaliamos a expressão da Akt fosforilada em outro resíduo (Ser 427), notamos a ausência de efeito do T3.

Figura 36 - Expressão proteica da p-Akt (Thr308) (A) e p-Akt (Ser427) (B). Razão p-Akt/Akt total dos animais selvagens e nocautes. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro-padrão. n = 4 para cada grupo. * vs. WT-C (p<0,05), & vs. WT-T3 (p<0,05). Fonte: Silva, 2016.

Em conjunto, os ensaios de quantificação proteica, aliados ao de mensuração de NO, atestam para a confirmação da hipótese levantada no início do trabalho, a qual sugeria que o efeito cardioprotetor do T₃, pelo menos em parte, ocorre com a participação do receptor AT₂, com consequente fosforilação da Akt e aumento dos níveis de NO produzidos.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a participação do SRA clássico e mitocondrial, mais especificamente do receptor AT₂, na cardioproteção desempenhada pelo T₃, no modelo experimental de I/R, em corações isolados de camundongos, bem como a contribuição do NO neste processo.

Para tal, inicialmente foi avaliado se o tempo e a dose hormonal escolhidos neste estudo seriam suficientes para induzir uma situação de hipertireoidismo, a qual é marcada pelo aumento da massa muscular cardíaca ou hipertrofia cardíaca. A diminuição dos níveis séricos de T₄, após o tratamento com T₃, bem como o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca nesses animais confirmaram a eficácia do modelo experimental, permitindo que seguissemos testando a hipótese aventada no presente estudo. Uma vez estabelecido o modelo experimental de hipertireoidismo em camundongos, passamos a avaliar o efeito do T₃ sobre a função cardíaca pós-isquêmica, o envolvimento do SRA mitocondrial, bem como a contribuição da produção do NO e ativação da via de sinalização da Akt tanto em condições normais como em condições na ausência do receptor AT₂.

6.1 Hipertrofia Cardíaca induzida por HT

O aumento da razão peso do coração pelo comprimento da tíbia nos animais pertencentes aos grupos que receberam o T₃ evidenciou o efeito trófico esperado dos HT sobre o coração. A ação do hipertireoidismo sobre o coração já é bem conhecida pela comunidade acadêmica, em modelos tanto *in vivo*, quanto *in vitro* (Kenessey, Ojamaa, 2006; Kuzman et al., 2005). A hipertrofia cardíaca corresponde a um conjunto de alterações estruturais que são normalmente decorrentes do aumento do volume dos cardiomiócitos, podendo vir acompanhada da proliferação dos fibroblastos e da diminuição da microcirculação coronariana (Wollert, Drexler, 2002). Muitos são os mecanismos que podem contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, e diferentes estímulos podem resultar em diferentes padrões geométricos do coração. A porcentagem de aumento da razão peso do

coração/comprimento da tíbia nos animais tratados se assemelha ao que já havíamos visto em ratos (Carneiro-Ramos et al., 2010; Tavares et al., 2013).

A atividade da glândula tireóide é predominantemente regulada pela concentração de TSH (do inglês, *Thyroid Stimulating Hormone* – Hormônio Estimulante da Tireóide), um hormônio produzido pela adenohipófise, glândula situada na base do cérebro, cuja síntese e liberação são estimuladas, por sua vez, por TRH (do inglês, *Thyrotropin Releasing Hormone* – Hormônio Liberador de Tireotrofina), um tripeptídeo secretado pelas células neuronais hipotalâmicas. A produção e secreção do TSH e TRH são controlados pelos níveis plasmáticos dos HT (T3 e T4), por um mecanismo denominado retroalimentação negativa ou *feedback negativo*. Quando os níveis de T3 e T4 circulantes estão aumentados há uma inibição na produção do TRH, com consequente diminuição do TSH, e ausência da estimulação da síntese de HT pela tireóide. Por outro lado, quando os níveis de T3 e T4 circulantes diminuem, essa alça de retroalimentação negativa deixa de existir, havendo maior estímulo para a síntese de HT (Gardner, Shoback, 2011). Dessa forma, a análise dos níveis reduzidos de T₄ nos animais induzidos ao hipertireóideos confirmaram novamente a eficácia do protocolo experimental.

6.2 HT, SRA e atividade mitocondrial

Sabe-se que as mitocôndrias correspondem a um importante alvo dos HT e alterações metabólicas ocorrem nessa organela em resposta aos elevados níveis de hormônios tireoideanos (Maity et al., 2013). Bioquimicamente a mitocôndria medeia os efeitos calorigênicos dos HT (Goglia et al., 1999). Em condições normais os ácidos graxos são a principal fonte de energia, na qual a β -oxidação (processo catabólico dos ácidos graxos que consiste em sua oxidação mitocondrial) provê cerca de 70-90% do ATP total (Maity et al., 2013). No entanto, durante a hipertrofia cardíaca, o metabolismo energético muda dos ácidos graxos para a glicose, de maneira semelhante ao período fetal, quando o conteúdo mitocondrial ainda é baixo (Barger, Kelly, 2000; Marín-García, Goldenthal, 2002; Goffart et al., 2004; Lehman, Kelly, 2002). Tem sido demonstrado que o remodelamento metabólico que ocorre nos cardiomiócitos é um importante mecanismo adaptativo que está envolvido com

essa mudança na preferência do substrato (de ácido graxo em coração adulto normal para glicose na hipertrofia cardíaca); isso eventualmente pode ser a causa da depleção na produção do ATP, vista nestas condições (Ingwall, 2009).

Um alto nível de HT é capaz de elevar o consumo de oxigênio e a produção de calor, que se manifesta por uma elevação na taxa metabólica basal (Tata et al., 1963). Em nossos resultados não foi possível visualizar o aumento do consumo de oxigênio nos animais selvagens tratados com T₃ (Figura 11). No entanto, em concordância com os nossos dados, Pingitore e cols. (2008) observaram, em um estudo clínico com pacientes que a melhora do desempenho cardíaco obtido a partir da administração de T₃ não foi acompanhada pelo aumento no consumo de oxigênio, indiretamente estimado pela taxa do produto da pressão (ou produto cardiovascular – comumente usado na cardiologia e na fisiologia do exercício para determinar a carga de trabalho miocárdico) e pelo trabalho cardíaco total. Os nossos dados mostraram que apenas no grupo nocaute para o receptor AT₂ foi possível observar esse efeito do T₃ sobre o consumo de oxigênio. Ainda não há na literatura trabalhos que expliquem o porquê do bloqueio ou da ausência do receptor AT₂ aparentemente deixar as mitocôndrias mais responsivas ao T₃, o que dificulta a interpretação destes resultados.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido à propriedade de serem ou gerarem radicais livres. Esses radicais livres correspondem a qualquer espécie química capaz de existência independente e que contenha um ou mais elétrons desemparelhados, sendo, desta maneira, altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula (Belló, 2002). Alguns trabalhos ao longo dos anos relatam que há uma influência dos HT sobre o estresse oxidativo (Marzoev, 1985; Paller, 1986; Shinohara et al., 2000; Swaroop e Ramasarma, 1985; Venditti, 1997; Videla et al., 1988). É sabido que os HT regulam o metabolismo de muitos tecidos, através do aumento no consumo de oxigênio, produção de calor, modulação de reações do metabolismo intermediário, aumento de frequência cardíaca, força de contração ventricular e pressão arterial (Goglia, 1999; Tavares et al., 2013; Yen, 2001). Em nosso estudo, o aumento do

consumo do oxigênio nos animais nocautes tratados com T₃ (KO-T3) foi acompanhado pelo aumento na produção de H₂O₂. Parece haver um mecanismo regulatório que impede o consumo e a produção exacerbada de H₂O₂ presente apenas nos animais selvagens, visto que isso só aconteceu nesses animais. Assim, a cardioproteção desempenhada pelos HT parece estar relacionada à produção de ROS e é mediada pelo receptor AT2.

Em 2011 um trabalho do grupo da Profa. Dra. Adriane Belló (UFRGS) em colaboração com nosso grupo, revelou que tanto *in vitro*, quanto *in vivo* os HT aumentam a produção de ROS, as 3 isoformas da NO sintase (NOS) e os metabólitos do NO (nitrito e nitrato), desencadeando a hipertrofia cardíaca. Os autores também demonstraram que o uso de um antioxidante (Trolox-análogo da vitamina E) foi capaz de reduzir os níveis das ROS, expressão das NOS e abolir completamente a hipertrofia cardíaca (Araújo et al., 2011). Lesmana e cols. (2016) demonstraram recentemente que o HT é essencial para a biogênese e atividade mitocondrial no músculo esquelético. Eles ainda mostraram que o aumento na produção de ROS em células musculares de linhagem L6 tratadas com T₃ foi dose e tempo dependentes. Esses trabalhos corroboram com os dados encontrados no presente estudo, onde a produção de H₂O₂ foi aumentada em animais tratados com T₃, independente da presença do receptor AT2.

Avaliar a integridade do potencial da membrana mitocondrial foi uma etapa extremamente importante deste trabalho, uma vez que esta integridade está diretamente envolvida com a produção de energia. Sabe-se que a transferência de elétrons ao longo de toda a cadeia transportadora é acompanhada pela extrusão transmembrana mitocondrial de prótons, e a energia decorrente desta diferença de concentração de prótons é utilizada subsequentemente para a formação de ATP (Araújo Lima et al., 2001). Esta força próton motriz é constituída pelo ΔpH (resultado da diferença na concentração de prótons através da membrana mitocondrial) e o $\Delta\Psi$ (resultante da diferença de cargas entre o espaço intermembranas e a matriz mitocondrial) (Nicholls, Fegurson, 2002). O $\Delta\Psi$ mitocondrial está reduzido em situações que interrompem o metabolismo energético celular (Bernardi et al.,

2001). No presente estudo, não foi observada diferença com relação a este parâmetro nos diferentes grupos analisados numa situação basal (sem I/R).

Miranda e cols (2005) já haviam mostrado que fígado de cães submetidos a 30, 45 e 60 minutos de isquemia, seguidos por 60 ou 120 minutos de reperfusão não apresentaram mudança no potencial elétrico da membrana mitocondrial. Em mitocôndrias isoladas de coração de ratos Abadir e cols. (2011) mostraram não haver diferença no potencial mitocondrial quando o receptor AT2 era estimulado por seu agonista (CGP421140), o que corrobora com nossos dados, uma vez que a ausência deste receptor não modulou o potencial da membrana mitocondrial.

Quando diferenças relativas ao metabolismo mitocondrial foram evidenciadas entre os nossos grupos experimentais, surgiu então a curiosidade de entender como o metabolismo global desses animais que não expressam o receptor AT2 se apresentava. A partir daí foi então realizado o teste de potencial aeróbico (VO_2). O VO_2 é determinado por dois fatores: 1) oferta sanguínea oriunda do débito cardíaco (DC), e 2) capacidade do músculo esquelético em extrair oxigênio e nutrientes do sangue ofertado. Isso é observado na Equação de Fick ($VO_2 = DC \times \text{dif. a-v}O_2$), onde estão representados os fatores centrais e periféricos que determinam a potência aeróbica (VO_2), o débito cardíaco (DC) e a diferença artério-venosa de oxigênio (dif. a-v O_2). A taxa metabólica de repouso (taxa metabólica basal) corresponde ao nível mínimo de energia requerido pelo corpo para o desempenho das funções vitais (Van Klinken et al., 2012). O consumo muscular de oxigênio depende do funcionamento adequado de, essencialmente, três sistemas: o respiratório (troca gasosa), o sistema cardiovascular (bombeamento de sangue arterial) e do sistema muscular. Qualquer deficiência em algum desses sistemas pode resultar na diminuição do consumo de oxigênio (VO_2) (Blaxter, 1989; Bursztein et al., 1989). Nossos resultados mostraram que os animais nocautes para o AT2 apresentaram uma taxa de metabolismo basal inferior à dos selvagens, evidenciando o envolvimento deste receptor no metabolismo global desses animais. Uma possível explicação para estes resultados está no fato da Ang II estar envolvida na regulação de diferentes respostas: pressóricas, apetite ao sódio, sede e liberação de vasopressina (Phillips, 1987)

e, juntas, estas respostas interferirem no metabolismo animal. Neste sentido, Saad e Camargo (2003) mostraram que a administração do antagonista do receptor AT₂ (PD123319) foi capaz de bloquear parcialmente o aumento da ingestão de água e sódio e o aumento da pressão arterial induzida pela injeção de Ang II (10 nmol) na área septal medial de ratos acordados. Embora os receptores AT₂ ainda sejam pouco estudados do ponto de vista estrutural e funcional, quando comparados ao AT₁, alguns estudos vêm demonstrando que a expressão deste receptor está aumentada na insuficiência cardíaca, nos processos de reparo após um quadro de infarto, em lesões de pele e no sistema nervoso (Armando et al., 2002; Kim e Iwao, 2000; Sullivan, 2008; Unger, 2002; Zhu et al., 2003). Sendo assim, o papel deste receptor no desenvolvimento e diferenciação celular merece ser ainda estudado.

6.3 Função cardíaca, HT e via de sinalização

Estudos utilizando ensaios funcionais em corações isolados de ratos já haviam sido previamente realizados em nosso laboratório. No entanto, camundongos, este corresponde ao primeiro trabalho de coração isolado desenvolvido em nosso grupo. A LVDP durante o período de estabilização não se apresentou diferente entre os grupos, ou seja, tanto a ausência do receptor AT₂ quanto o tratamento com T₃ não foram capazes de modular este parâmetro. Ratos tratados com o inibidor farmacológico do receptor AT₂ (PD123319) apresentaram uma redução em 16% na LVDP ainda no período de estabilização (Tavares et al., 2013). NO presente estudo, no período de reperfusão os animais selvagens tratados com T₃ (WT-T₃) apresentaram um aumento significativo neste parâmetro nos três tempos analisados, o que não ocorreu nos animais nocautes tratados com T₃ (Figura 16). O efeito do HT se apresentou maior sobre o lusitropismo ($-dP/dt$) que o inotropismo ($+dP/dt$), durante o período de reperfusão. Um estudo recente que utilizou o modelo experimental de pós-condicionamento isquêmico (PCI), mostrou que a LVDP, $+dP/dt$ e $-dP/dt$ aumentam significativamente durante a reperfusão em ratos controles, e isto é abolido quando a PCI é realizada em ratos hipotireoideos, revelando o papel cardioprotetor dos HT em modelos de I/R (Jeddi, Zaman e Ghasemi, 2015). Pantos e cols. (2005) mostraram que a análise da

recuperação pós isquêmica, através dos mesmos parâmetros funcionais utilizados em nosso estudo, revelou que ratos tratados com T₄ apresentaram uma melhor recuperação funcional. Com o mesmo modelo experimental Tavares e cols. (2013) demonstraram que ratos tratados com T₃ também apresentam uma melhor recuperação funcional pós isquêmica.

Na análise da FC ambos os grupos tratados aumentaram este parâmetro no período de estabilização. A frequência cardíaca intrínseca é determinada pela atividade dos cardiomiócitos especializados do nodo sino atrial, e pode sofrer influências externas, como por exemplo, do sistema nervoso autônomo - SNA (Mittag et al., 2010). Além do SNA, simpático e parassimpático, outros fatores podem exercer influência sobre a atividade dos cardiomiócitos especializados, como os HT, que podem modular a atividade desses cardiomiócitos através da regulação da expressão de proteínas que constituem canais iônicos (Dillmann, 2002). Nós demonstramos, recentemente, que os HT são capazes de modular negativamente o canal de sódio (Nav1.5), responsável pela rápida despolarização das células atriais cardíacas (da Silva et al., 2016 – em preparação), o que predispõe ao aparecimento de distúrbios no ritmo cardíaco. Desta forma, os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com outros da literatura, uma vez que alguns trabalhos mostram que esse parâmetro é modulado em animais tratados com HT (Klein e Ojamaa, 2001; Dahl et al., 2008; Klein, 2011), e estudos prévios do nosso grupo já revelaram o aumento da atividade cardíaca desencadeada pelos HT (Lino et al., 2015; Tavares et al., 2013).

Os dados frente à pressão de perfusão mostraram que esta foi diminuída pelo T₃ nos animais selvagens, sendo que nos animais nocautes tratados com T₃ houve aumento deste parâmetro no período de estabilização. A observação na redução da resistência arterial sistêmica, que ocorre no hipertireoidismo, surgiu com a descoberta do papel vasodilatador que os HT exercem sobre as células musculares lisas do sistema vascular (Ojamaa, Klemperer e Klein, 1996). O efeito vasodilatador da Ang II é mediado pelo receptor AT₂, a fim de balancear o efeito vasoconstritor da Ang II via receptor AT₁, por ação direta nas células musculares lisas (Santos, Fangundes-Moura, Simões e Silva, 2000). A ação vasorrelaxante do receptor AT₂ tem sido atribuída à produção de

NO por este receptor (Kohagura et al., 2001). Um outro trabalho ainda demonstrou que o receptor AT2 estimula diretamente a produção de NO renal de maneira independente de sua interação com receptores de bradicinina (receptor B₂), promovendo vasodilatação (Abadir et al., 2003).

No período de reperfusão nossos dados indicam que parece haver uma tendência ao aumento da pressão de perfusão no grupo WT-T3, perfil comumente encontrado em corações que aumentam a contratatura miocárdica durante a isquemia (contratatura isquêmica) com consequente melhora da função cardíaca. Pantos e cols. (2002) já haviam relatado esse perfil em ratos tratados com HT. Outros trabalhos já demonstraram que o HT é capaz de desencadear uma resposta vasodilatadora de maneira dependente e independente do endotélio (Fernández-Real et al., 2006; Park et al., 1997).

No que diz respeito à análise bioquímica os resultados revelam o comportamento da LDH na injúria cardíaca. Sabe-se que após um insulto isquêmico, o tecido cardíaco morre e proteínas intracelulares, como lactato desidrogenase (LDH), se apresentam aumentadas na corrente sanguínea (Hearse et al., 1973). Por isso, clinicamente o ensaio de atividade da LDH é frequentemente usado como um marcador bioquímico de lesão isquêmica, sendo principalmente solicitado quando há suspeita de infarto do miocárdio. Em humanos, após um infarto do miocárdio os níveis de LDH atingem um pico em 3 a 4 dias e permanecem elevados por até 10 dias (Nicolau et al., 2001). Recentemente Penna e cols. (2014) demonstraram que a atividade da LDH está diminuída em experimentos de I/R cardíaca em camundongos submetidos ao pré-condicionamento isquêmico, quando comparada à do grupo não condicionado (30 minutos de isquemia e 60 minutos de reperfusão). No nosso estudo, o grupo WT-T3 apresentou um perfil semelhante ao grupo pré-condicionado apresentado no trabalho supracitado, e é conhecido que o hormônio tireoidiano exerce um efeito cardioprotetor bastante similar àquele observado no pré-condicionamento (Pantos et al., 2002).

Embora tivesse ocorrido diferença nos níveis da LDH, não houve diferença na área de infarto entre os animais nos diferentes grupos analisados. Na literatura há uma grande variabilidade nos valores deste ensaio de mensuração da área cardíaca infartada, e isso parece ser devido a diferentes

protocolos de I/R utilizados, no que diz respeito aos parâmetros temporais estabelecidos. Ferrera e cols. (2009) encontraram 33% de área infartada, em corações de ratos submetidos ao protocolo experimental de 40 minutos de isquemia seguidos por 60 minutos de reperfusão e 34,5% em animais onde a reperfusão durou 120 minutos. Já Xiang e cols. (2011) visualizaram 37,5% de área infartada em coração de camundongos submetidos a 30 minutos de isquemia e 40 de reperfusão. Em trabalho realizado por Gao e cols. (2013) houve 40% de área infartada com 30 minutos de isquemia seguidos por 60 de reperfusão. Toldo e cols. (2012) mostraram $32\pm 5\%$ de área infartada em camundongos submetidos a 30 minutos de isquemia e reperfundidos por 24 horas, num modelo de isquemia regional. Nossos valores foram inferiores aos encontrados na literatura, pois a média da área de infarto dos 4 grupos apresentados ficou em torno de 10,5%, o que parece caracterizar um infarto leve.

Os dados funcionais obtidos nos experimentos de coração isolado, juntamente com o bioquímico (LDH) e o anatomofuncional (TTC), vão ao encontro de outros já demonstrados na literatura, onde no modelo de I/R em coração isolado de ratos o desempenho cardíaco aumenta durante a reperfusão pós-isquemia global, quando esses animais são aguda ou cronicamente tratados com HT (Buser et al., 1990; Liu et al., 1998; Pantos et al., 2000, 2002, 2003; Venditti et al., 2000). Foram esses trabalhos, inclusive, que nos levaram a estudar o efeito cardioprotetor do hormônio tireoidiano no modelo de I/R. Outros trabalhos na literatura também demonstram um perfil semelhante ao encontrado em nossos experimentos, mesmo quando o T_3 é administrado apenas no período de reperfusão em corações isolados de ratos (Dyke et al., 1991; Holland et al., 1992; Kadletz et al., 1994; Klemperer et al., 2002). Trabalhos clínicos envolvendo humanos submetidos à revascularização miocárdica, demonstram que há uma queda nos níveis séricos de T_3 pós injúria cardíaca, e esta queda está diretamente relacionada à perda de função ventricular cardíaca (Klemperer et al., 1995; Pantos et al., 2012). No entanto, o restabelecimento dos níveis basais de T_3 é apontado como sendo um fator eficiente para a melhora da função cardíaca.

Os dados deste estudo indicam que há um importante papel do T_3 sobre a função contrátil do coração frente ao estresse isquêmico, e mais, esse efeito desempenhado pelo T_3 é, pelo menos em parte, mediado pelo receptor AT2. Um importante grupo de pesquisa grego coordenado pelo Prof. Constantino Pantos já havia mostrado em 2005 que o bloqueio farmacológico do receptor de angiotensina II do tipo 1 (AT1) diminui a hipertrofia cardíaca induzida pelo T_3 . Em cardiomiócitos isolados, Diniz e cols. (2009) também demonstrou o mesmo efeito da inibição do AT1. No entanto, o bloqueio farmacológico desse receptor, não abole o efeito cardioprotetor desempenhado por esse hormônio. Esses nossos dados certamente contribuirão para entendermos melhor a interação que há entre esses dois sistemas endócrinos: SRA e HT.

Após comprovar nossa hipótese de que o efeito cardioprotetor do hormônio tireoidiano é mediado pelo receptor AT2, partimos para a avaliação da contribuição do SRA subcelular nesse processo. Essa avaliação é pertinente, uma vez que diversos trabalhos do nosso grupo de pesquisa já revelaram o SRA clássico e local cardíaco como mediadores das ações dos hormônios tireoidianos sobre o sistema cardiovascular. A administração de inibidores, tanto da enzima conversora de Angiotensina I (ECA), quanto dos receptores de angiotensina II (AT1 e AT2) foram capazes de prevenir, parcial ou totalmente, a hipertrofia cardíaca induzida por HT (Barreto-Chaves et al., 2010; Carneiro-Ramos et al., 2010; Diniz et al., 2009; Hu et al., 2003). Então, repetimos os ensaios mitocondriais já realizados em mitocôndrias isoladas de animais tratados por 14 dias com T_3 (tratados) ou salina (controle), porém após o período de I/R (Langendorff).

De maneira semelhante ao que acontece numa situação basal, o T_3 só foi capaz de aumentar o consumo de oxigênio em animais nocautes e a I/R não foi capaz de mudar isto. Quanto à produção de peróxido de hidrogênio, esta foi atenuada pela I/R nos animais tratados. Vale salientar que a produção de H_2O_2 foi maior em todos os grupos após a I/R quando comparados aos valores sem isquemia – exceto nos animais selvagens no estado 2. Essa, pode ser a explicação pela qual o T_3 não induziu o aumento na produção de peróxido de hidrogênio nos grupos tratados, uma vez que a produção já era alta.

A I/R foi capaz de modular o potencial elétrico da membrana mitocondrial. Ambos os grupos que receberam T₃ apresentaram um $\Delta\Psi$ mitocondrial maior, mostrando o efeito cardioprotetor do T₃ frente à I/R. Em uma linhagem de células derivada de humanos, Kvetny e cols. (2009) demonstraram por citometria de fluxo que o potencial de membrana mitocondrial é aumentado com o tratamento com HT. Esses dados parecem ir ao encontro dos nossos, uma vez que as células utilizadas no estudo citado são de câncer de mama, um tecido que apresenta uma elevada produção de ROS, o que também observamos em episódios de I/R.

Na tentativa de entender quais vias de sinalização que possivelmente estão envolvidas no fenômeno de cardioproteção do HT, nós avaliamos a expressão proteica da Akt e iNOS, uma vez que alguns modelos da literatura nos davam indícios que ambas as proteínas poderiam estar envolvidas neste processo (Carrillo-Sepúlveda et al., 2013; Caruso-Neves, Kwon, Guggino, 2005).

Corfome pôde ser visto, tanto a Akt quanto a iNOS aumentam a expressão com o tratamento do T₃ de maneira dependente do receptor AT₂. Isto também foi observado na produção de NO. Alguns trabalhos mostram que a ativação da Akt é desencadeada por diversos estímulos, como fatores de crescimento (Datta et al., 1999), hormônios (Diniz et al., 2009) e citocinas (Franke et al., 1995). Juntos, estes trabalhos sugerem um importante papel desta proteína na função mitogênica das células. Animais nocautes para Akt mostraram um perfil de atrofia muscular (Cho et al., 2001), já animais que superexpressam a Akt1 resultaram num fenótipo hipertrófico (Matsui et al., 2002). Em linhagem de células renais do túbulo proximal (LLC-PK1), a Ang II induziu seletivamente a fosforilação da Akt no resíduo Thr-308, sem alterar a fosforilação na Ser-473 e esta combinação levou ao aumento da atividade da Akt. Além dos dados citados, os autores ainda mostraram que esta ativação da Akt se deu de maneira dependente do receptor AT₂ (Caruso-Neves, Kwon e Guggino, 2005). Nossos dados mostraram-se muito semelhantes ao dados do trabalho supra-citado.

Um trabalho prévio do nosso grupo já havia demonstrado o aumento da expressão da Akt induzida pelos HT em culturas primárias de cardiomiócitos de

ratos neonatos, ainda que parte das ações destes hormônios sejam mediadas pelo SRA (Diniz et al., 2009). Em cultura de células musculares lisas de aorta de ratos adultos, outro trabalho do grupo demonstrou a ativação da via da Akt de maneira dependente do receptor AT₂, e que a ativação desta via levou ao aumento na produção do NO (Carrillo-Sepúlveda et al., 2013). Fulton (2009) já havia relatado que diversas proteínas são alvo de fosforilação e ativação da Akt, entre elas a NOS.

A produção de NO é extremamente desejável durante um evento isquêmico, por sua ação vasodilatadora; no entanto, sua produção demasiada leva a danos teciduais graves. O aumento na expressão da iNOS é descrito em vários modelos de doenças inflamatórias (Grabowski et al., 1996; Kubes, McCafferty, 2000; Reade, Young, 2003) e estes autores acreditam que este aumento seja o fator limitante da lesão tecidual encontrada por eles.

Em geral, a iNOS é indetectável em tecidos normais, mas é altamente induzida por citocinas inflamatórias, fatores de crescimento, promotores de tumores ou após uma lesão tecidual (Wang et al., 2015). A iNOS é capaz de produzir NO e diminuir os níveis de ROS gerados durante a reperfusão (West et al., 2008). Além disso, o NO tem sido apontado como um dos responsáveis por abrir os canais de K⁺mitocondriais sensíveis a ATP (mitoK_{ATP}) e também inibir a abertura de poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) (Gross et al., 2013; Ohtani et al., 2012). O MPTP é voltagem e Ca²⁺ dependentes e abre devido à sobrecarga de Ca²⁺ e produção excessiva de ROS durante a reperfusão (Zorov et al., 2009). A ativação do mitoK_{ATP} durante o processo de I/R protege o coração por meio da atenuação da abertura de canais iônicos mitocondriais, controlando o influxo de Ca²⁺ intramitocondrial e o efluxo de ROS para o citoplasma, o que regula diretamente a abertura dos MPTPs protegendo o cardiomiócito (Gross, Peart, 2003).

Bolli (2001) afirma que o aumento da expressão da iNOS está relacionado ao aumento da expressão de proteínas antioxidantes e que o NO desempenha um importante papel na neovascularização pós-isquêmica. Wang e cols. (2015) demonstraram o envolvimento da iNOS na proteção cardíaca induzida pelo pós-condicionamento isquêmico (PCI) numa fase tardia (24h de reperfusão). Quando comparado ao grupo I/R o grupo PCI aumentou

significativamente a expressão de iNOS. Os mesmos autores inibiram a expressão da iNOS com 1400W (um inibidor seletivo de iNOS) e verificaram diminuição na proteção cardíaca induzida pela PCI (Wang et al., 2015).

Juntos, nossos resultados sugerem que, pelo menos em parte, a cardioproteção do HT seja mediada pelo receptor AT2 em situações de isquemia/reperfusão. Os efeitos da Ang II mediados pelo receptor AT2 ainda são pouco explorados, e trabalhos que mostrem a relação deste receptor (AT2) com os HT ainda são escassos na literatura. Trabalhos prévios do nosso grupo, somados ao estudo presente revelam que a ação do HT mediado pelo SRA deflagra vias de proteínas reguladoras do metabolismo, como AMPK (Tavares et al., 2013), produção de NO (Carrillo-Sepúlveda et al., 2013), e vias envolvidas com o processo de hipertrofia cardíaca, como PI3K/Akt (Diniz et al., 2009). Acreditamos que juntas estas vias ativadas podem ser as responsáveis pela preservação da estrutura e função celular após um evento isquêmico.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, podemos concluir que o SRA subcelular, especificamente o receptor AT₂, parece modular o metabolismo mitocondrial, sobretudo nas ações deflagradas pelo T₃. Os resultados funcionais, bioquímicos e moleculares indicam haver um efeito cardioprotetor desempenhado pelo T₃, e este efeito, pelo menos em parte, ocorre de maneira dependente do receptor AT₂, uma vez que o mesmo efeito foi abolido em animais que não apresentavam esse receptor. Os resultados ainda revelam o envolvimento do óxido nítrico neste processo, assim como a ativação da via de sinalização intracelular da Akt.

REFERÊNCIAS*

- Abadir PM, Carey RM, Sigary HM. Angiotensin AT₂ receptors directly stimulate renal nitric oxide in bradykinin B₂-receptor-null mice. *Hypertension*. 2003;42(4):600-4, 2003.
- Abadir PM, Foster DB, Crow M, Cooke CA, Rucker JJ, Jain A, Smith BJ, Burks TN, Cohn RD, Fedarko NS, Carey RM, O'Rourke B, Walston JD. Identification and characterization of a functional mitochondrial angiotensin system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(36):14849-54.
- Abadir PM, Walston JD, Carey RM. Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems. *Peptides*. 2012;38(2):437-45.
- Agulló L. L-arginine limits myocardial cell death secondary to hypoxia-reoxygenation by a cGMP-dependent mechanism. *Am J Physiol*. 1999;276:1574-80.
- Andelová E. The role of NO in ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart. *Gen Physiol Biophys*. 2005;24(4):411-26.
- Annicotte JS, Iankova I, Miard S, Fritz V, Sarruf D, Abella A, Berthe ML, Noël D, Pillon A, Iborra F, Dubus P, Maudelonde T, Culine S, Fajas L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates angiotensin II-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase in blood vessels in vivo. *Hypertension*; 2006;47(1):102-8.
- Araujo AS, Diniz GP, Seibel FE, Branchini G, Ribeiro MF, Brum IS, Khaper N, Barreto-Chaves ML, Belló-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*. 2011;333(1):78-84.
- Araujo Lima AAL, Ramalho LNZ, Zucoloto S, Bagnato VS, Silva Júnior OC. Study of mitochondrial membrane potential in cirrhotic and hepatectomized rats after laser irradiation. *Acta Cir. Bras*. 2001;16(1):18-9.
- Armando I., Jezova M., Juorio A. V., et al. Estrogen upregulates renal angiotensin II AT₂ receptors. *The American Journal of Physiology—Renal Physiology*. 2002;283(5):F934–F43.
- Barger PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10(6):238-45.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Barreto-Chaves ML, Carrillo-Sepúlveda MA, Carneiro-Ramos MS, Gomes DA, Diniz GP. The crosstalk between thyroid hormones and the Renin Angiotensin System. *Vasc. Pharmacol.* 2009;52(3-4):166-70.

Barreto-Chaves ML, de Souza Monteiro P, Fürstenau CR. Acute actions of thyroid hormone on blood vessel biochemistry and physiology. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011;18(5):300-3.

Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, Masson M, Susini C, Strosberg AD, Nahmias C, Biochem J. Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J.* 1997;325(2):449-54.

Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(6):940-50.

Belló A. Estresse Oxidativo no Coração Adaptado. In: Marroni, N.P. et al. Estresse Oxidativo e Antioxidantes. Porto Alegre: Editora Ulbra; 2002. p.49-61.

Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, Forte M.. A mitochondrial perspective on cell death. *Trends Biochem Sci Oxon;* 2001;26(2):112-7.

Bianco AC, Kieffer JD, Silva JE. Adenosine 3',5'- monophosphate and thyroid hormone control of uncoupling protein messenger ribonucleic acid in freshly dispersed brown adipocytes. *Endocrinology.* 1992;130:2625-33.

Blaxter, K. Energy Metabolism in Animals and Man. Cambridge: Cambrigde University Press, 1989. 336 p.

Bolli, R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(11):1897-918.

Bottari SP, King IN, Reichlin S, Dahlstroem I, Lydon N, de Gasparo M. The angiotensin AT2 receptor stimulates protein tyrosine phosphatase activity and mediates inhibition of particulate guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;183(1):206-11.

Bouillaud F. UCP1, UCP2 and UCP3: are they true uncouplers of respiration?. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1999;23(6):S19-23.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.

Braman RS, Hendrix SA. Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem.* 1989;61(24):2715-8.

Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol.* 1940;98:283-98.

Bursztein S, Elwyn DH, Askanazi J, Kinney JM. Energy metabolism, indirect calorimetry, and nutrition. Baltimore: Williams & Wilkins; 1989, 266 p.

Buser PT, Wikman-Coffelt J, Wu ST, Derugin N, Parmley WW, Higgins CB. Postischemic recovery of mechanical performance and energy metabolism in the presence of left ventricular hypertrophy. A ^{31}P -MRS study. *Circ Res*. 1990;66(3):735-46.

Campbell DJ. Circulating and tissue angiotensin systems. *Journal of Clinical Investigation*. 1987;79:1–6.

Campbell MK. *Bioquímica*. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001. 752 p.

Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch. Intern. Med*. 2000;160(4):526-34.

Cancherini, DV; Queliconi, BB; Kowaltowski, AJ. Pharmacological and physiological stimuli do not promote Ca^{2+} -sensitive K^{+} channel activity in isolated heart mitochondria. *Cardiovasc Res*. 2007;73(4):720-8.

Carneiro-Ramos MS, Diniz GP, Nadu AP, Almeida J, Vieira RL, Santos RA, Barreto-Chaves MLM. Blockage of Angiotensin II type 2 receptor prevents thyroxine-mediated cardiac hypertrophy by blocking Akt activation *Basic Research in Cardiology*. 2010;105(3):325-35.

Carrillo-Sepúlveda MA, Barreto-Chaves ML. Phenotypic modulation of cultured vascular smooth muscle cells: a functional analysis focusing on MLC and ERK1/2 phosphorylation. *Mol Cell Biochem*. 2010;34(1-2):279-89.

Carrillo-Sepúlveda MA, Ceravolo GS, Furstenau CR, Monteiro PS, Bruno-Fortes Z, Carvalho MH, Laurindo FR, Tostes RC, Webb RC, Barreto-Chaves ML. Emerging role of angiotensin type 2 receptor (AT2R)/Akt/NO pathway in vascular smooth muscle cell in the hyperthyroidism. *PLoS One*. 2013;8(4):1-9.

Caruso-Neves C, Kwon SH, Guggino WB. Albumin endocytosis in proximal tubule cells is modulated by angiotensin II through an AT2 receptor-mediated protein kinase B activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(48):17513-8.

Castro CH, Santos RA, Ferreira AJ, Bader M, Alenina N, Almeida AP. Evidence for a functional interaction of the angiotensin-(1-7) receptor Mas with AT1 and AT2 receptors in the mouse heart. *Hypertension*. 2006;46(4):937-42.

Cerqueira NF, Yoshida WB. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir Bras*. 2002;17(6):417-23.

Champe PC, Harvey RA. *Bioquímica Ilustrada*. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2008. 528 p.

Chance B, Williams GR. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. *Nature*. 1955;175:1120-1.

Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance or glucose homeostasis in mice. *J. Biol. Chem.* 2001;276:38349-52.

Condorelli G, Drusco A, Stassi G, Bellacosa A, Roncarati R, Iaccarino G, Russo MA, Gu Y, Dalton N, Chung C, Latronico MV, Napoli C, Sadoshima J, Croce CM, Ross J Jr. Akt induces enhanced myocardial contractility and cell size in vivo in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(19):12333-8.

Cope JT, Banks D, Laubach VE, Binns OA, King RC, Richardson RM, Shockey KS, Tribble CG, Kron IL. Sodium nitroprusside exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 1997;64:1656–9.

Dahl P, Danzi S, Klein I. Thyrotoxic cardiac disease. *Curr Heart Fail Rep.* 2008;5(3):170-6.

D'Amore A, Black MJ, Thomas WG. The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension.* 2005;46:1347–54.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: A play in three Akts. *Genes Dev.* 1999;13:2905-27.

Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid.* 2002;12(6):459-66.

Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29:211–8.

Davis PJ, Shih A, Lin HY, Martino LJ, Davis FB. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem.* 2000;275(48):38032-9.

De Gasparato M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev.* 2000;52(3):415-72.

De Vito P, Balducci V, Leone S, Percario Z, Mangino G, Davis PJ, Davis FB, Affabris E, Luly P, Pedersen JZ, Incerpi S. Nongenomic effects of thyroid hormones on the immune system cells: New targets, old players. *Steroids.* 2012;77(10):988-95.

Dillmann WH. Cellular Action of Thyroid Hormone on the Heart. *Thyroid.* 2002;12(6):447-52.

Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves ML. Thyroid Hormone Increases TGF- β 1 in Cardiomyocytes Cultures Independently of Angiotensin II Type 1 and Type 2 Receptors. *Int J Endocrinol.* 2010;2010:1-7.

Diniz GP, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves MLM. Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through

the Akt/GSK-3 β /mTOR signaling pathway. *Basic Res Cardiol*. 2009;104:653–67.

Dorn GW. Novel pharmacotherapies to abrogate postinfarction ventricular remodeling. *Nat. Rev. Cardiol*. 2009;6(4):283-91.

Dyke CM, Yeh T Jr, Lehman JD, Abd-Elfattah A, Ding M, Wechsler AS, Salter DR. Triiodothyronine-enhanced left ventricular function after ischemic injury. *Ann Thorac Surg*. 1991;52(1):14-9.

Dzau VJ. Significance of the vascular rennin-angiotensin pathway. *Hypertension*. 1986;8(7):553-9.

Eber B, Schumacher M, Langsteger W, Zweiker R, Fruhwald FM, Pokan R, Gasser R, Eber O, Klein W. Changes in thyroid hormone parameters after acute myocardial infarction. *Cardiology*. 1995;86(2):152-6.

Evora PRB, Pearson PJ, Seccombe JF, Schaff HV. Lesão de Isquemia-Reperusão. Aspectos Fisiopatológicos e a Importância da Função Endotelial. *Arq Bras Cardiol*. 1996;66(4):239-45.

Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Castro A, Casamitjana R, Ricart W. Thyroid function is intrinsically linked to insulin sensitivity and endothelium-dependent vasodilation in healthy euthyroid subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3337-43.

Ferrera R, Benhabbouche S, Bopassa JC, Li B, Ovize M. One hour reperfusion is enough to assess function and infarct size with TTC staining in Langendorff rat model. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009;23(4):327-31.

Forini F, Ucciferri N, Kusmic C, Nicolini G, Cecchetti A, Rocchiccioli S, Cittì L, Iervasi G. Low T3 State Is Correlated with Cardiac Mitochondrial Impairments after Ischemia Reperfusion Injury: Evidence from a Proteomic Approach. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26687-705.

Franke TF, Yang SI, Chan TO, Datta K, Kazlauskas A, Morrison DK, Kaplan DR, Tsichlis PN. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell*. 1995;81:727-36.

Friberg L, Werner S, Eggertsen G, Ahnve S. Rapid down-regulation of thyroid hormones in acute myocardial infarction: is it cardioprotective in patients with angina? *Arch Intern Med*. 2002;162(12):388-94.

Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*. 1999;399(6736):597-601.

Fulton DJ. Mechanisms of vascular insulin resistance: a substitute Akt? *Circ Res*. 2009;104(9):1035-7.

Gao D, Zhang L, Dhillon R, Hong TT, Shaw RM, Zhu J. Dynasore protects mitochondria and improves cardiac lusitropy in Langendorff perfused mouse heart. *PLoS One*. 2013;8(4):e60967.

Gardner DG, Shoback D. Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology. 9. ed. Columbus: McGraw Hill Professional, 2011. 880 p.

Goffart S, von Kleist-Retzow JC, Wiesner RJ. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004;64(2):198-207.

Goglia F, Moreno M, Lanni A. Action of thyroid hormones at the cellular level: the mitochondrial target. *FEBS Lett*. 1999;452(3):115-20.

Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension: I. The production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med*. 1934;59:347.

Goldenthal MJ, Ananthakrishnan R, Marín-García J. Nuclear-mitochondrial cross-talk in cardiomyocyte T3 signaling: A time-course analysis. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 2005;39:319–26.

Grabowski PS, England AJ, Dykhuizen R, Copland M, Benjamin N, Reid DM, Ralston SH. Elevated nitric oxide production in rheumatoid arthritis. Detection using the fasting urinary nitrate: creatinine ratio. *Arthritis Rheum*. 1996;39(4):643-7.

Gregory RB, Berry MN. On the thyroid hormone-induced increase in respiratory capacity of isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1098(1):61-7.

Griendling KK, Lassègue B, Alexander RW. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. 1996; 36:281-306.

Gross GJ, Hsu A, Pfeiffer AW, Nithipatikom K. Roles of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) in epoxyeicosatrienoic acid (EET)-induced cardioprotection against infarction in intact rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;59:20–9.

Gross GJ, Peart JN. KATP channels and myocardial preconditioning: an update. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H921–30.

Gwathmey TM, Shaltout HA, Pendergrass KD, Pirro NT, Figueroa JP, Rose JC, Diz DI, Chappell MC. Nuclear angiotensin II type 2 (AT2) receptors are functionally linked to nitric oxide production. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296(6):F1484-93.

Han G, Ma H, Chintala R, Miyake K, Fulton DJ, Barman SA, White RE. Nongenomic, endothelium-independent effects of estrogen on human coronary smooth muscle are mediated by type I (neuronal) NOS and PI3-kinase-Akt signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1):314-21.

Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res*. 2006;70:240–53.

Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol*. 1973;5(4):395-407.

Holland FW, Brown PS, Clark RE. Acute severe postischemic myocardial depression reversed by triiodothyronine. *Ann Thorac Surg*. 1992;54(2):301-5.

Horiuchi T, Yoshida T, Koshihara Y, Sakamoto H, Kanai H, Yamamoto S, Ito H. The increase of parathyroid hormone-related peptide and cytokine levels in synovial fluid of elderly rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Endocr J*. 1999;46(5):643-9.

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*. 2003;285(6):R1473-80.

Huang XC, Richards EM, Sumners C. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type I receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. *J. Biol. Chem*. 1996;271(26):15635-41.

Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol. Endocrinol*. 2006;20(5):953-70.

Ichihara S, Senbonmatsu T, Price EJ, Ichiki T, Gaffney FA, Inagami T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. *Circulation*. 2001;104:346-51.

Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature*. 1995;26(377):748-50.

Ingwall JS. On the control of metabolic remodeling in mitochondria of the failing heart. *Circ Heart Fail*. 2009;2(4):275-7.

Jeddi S, Zaman J, Ghasemi A. Effects of ischemic postconditioning on the hemodynamic parameters and heart nitric oxide levels of hypothyroid rats. *Arq Bras Cardiol*. 2015;104(2):136-43.

Jones SP, Girod WG, Palazzo AJ, Granger DN, Grisham MB, Jourdain D, Huang PL, Lefer DJ. Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in the absence of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol (Heart Circ Physiol)*. 1999;276:1567–73.

Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40(1):16-23.

Kadletz M, Mullen PG, Ding M, Wolfe LG, Wechsler AS. Effect of triiodothyronine on postischemic myocardial function in the isolated heart. *Ann Thorac Surg.* 1994;57(3):657-62.

Kempf T, Wollert KC. Nitric oxide and the enigma of cardiac hypertrophy. *Bioessays.* 2004;26(6):608-15.

Kenessey A, Ojamaa K. Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. *J Biol Chem.* 2006;281(30):20666-72.

Kilbourn MR, Ma B, Butch ER, Quesada C, Sherman PS. Anesthesia increases in vivo N-([¹⁸F]fluoroethyl) piperidiny benzilate binding to the muscarinic cholinergic receptor. *Nucl Med Biol.* 2007;34(5):479-82.

Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev.* 2000;52(1):11-34.

Klein I, Levey G.S. New perspectives on thyroid hormone, catecholamines, and the heart. *Am J Med.* 1984; 76:167-72.

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

Klein I. Thyroid and the heart: the intimacy is strained. *Thyroid.* 2011;21(5):469-70.

Klemperer JD, Klein I, Gomez M, Helm RE, Ojamaa K, Thomas SJ, Isom OW, Krieger K. Thyroid hormone treatment after coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med.* 1995;333(23):1522-7.

Klemperer JD. Thyroid hormone and cardiac surgery. *Thyroid.* 2002;12(6):517-21.

Kobori H, Ichiara A, Suzuki H, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Thyroid hormone stimulates renin synthesis in rats without involving the sympathetic nervous system. *Am. J. Physiol.* 1997;272(2):E227-32.

Kohagura K, Arima S, Endo Y, Chiba Y, Ito O, Abe M, Omata K, Ito S. Involvement of cytochrome P450 metabolites in the vascular action of angiotensin II on the afferent arterioles. *Hypertens Res.* 2001;24(5):551-7.

Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med.* 2000;109(2):150-8.

Kuzman JA, Gerdes AM, Kobayashi S, Liang Q. Thyroid hormone activates Akt and prevents serum starvation-induced cell death in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;39(5):841-4.

Kvetny J, Bomholt T, Pedersen P, Wilms L, Anthonsen S, Larsen J. Thyroid hormone effect on human mitochondria measured by flow cytometry. *Scand J Clin Lab Invest*. 2009;69(7):772-6.

Langendorff O. Untersuchungen an überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch*. 1895;61:291–332.

Lehman JJ, Kelly DP. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(4):339-45.

Leite PF, Danilovic A, Moriel P, Dantas K, Marklund S, Dantas AP, et al. Sustained decrease in superoxide dismutase activity underlies constrictive remodeling after balloon injury in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;12:2197-202.

Lesmana R, Sinha RA, Singh BK, Zhou J, Ohba K, Wu Y, Yau WW, Bay BH, Yen PM. Thyroid Hormone Stimulation of Autophagy Is Essential for Mitochondrial Biogenesis and Activity in Skeletal Muscle. *Endocrinology*. 2016;157(1):23-38.

Lindpaintner K, Jin M, Wilhelm MJ, Suzuki F, Linz W, Schoelkens BA, Ganten D. Intracardiac generation of angiotensin and its physiologic role. *Circulation*. 1988;77(6):18-23.

Lindpaintner K, Jin MW, Niedermaier N, Wilhelm MJ, Ganten D. Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart. *Circ Res*. 1990;67(3):564-73.

Lino CA, da Silva IB, Shibata CE, Monteiro P de S, Barreto-Chaves ML. Maternal hyperthyroidism increases the susceptibility of rat adult offspring to cardiovascular disorders. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;416:1-8.

Liu Q, Clanachan AS, Lopaschuk GD. Acute effects of triiodothyronine on glucose and fatty acid metabolism during reperfusion of ischemic rat hearts. *Am J Physiol*. 1998;275(3):E392-9.

Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ. Res*. 1993;72:403-12.

Maity S, Kar D, De K, Chander V, Bandyopadhyay A. Hyperthyroidism causes cardiac dysfunction by mitochondrial impairment and energy depletion. *J Endocrinol*. 2013;217(2):215-28.

Marchant C, Brown L, Sernia C. Renin–angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 1993;22:449–55.

Marín-García J, Goldenthal MJ. The mitochondrial organelle and the heart. *Rev Esp Cardiol*. 2002;55(12):1293-310.

Marín-García, J. Thyroid hormone and myocardial mitochondrial biogenesis. *Vascul. Pharmacol*. 2010;52:120–30.

Martin A, Byrne A, Burke CS, Forster RJ, Keyes TE. Peptide Bridged Dinuclear Ru(II) Complex for Mitochondrial Targeted Monitoring of Dynamic Changes to Oxygen Concentration and ROS Generation in Live Mammalian Cells. *J Am Chem Soc.* 2014;136(43):15300-9.

Marzoev AL, Parnev OM, Andriushchenko AP, Narin OV, Vladimirov LA. Electrical stability of mitochondrial membranes: the role of thyroid hormones and the fat component of the diet. *Biull Eksp Biol Med.* 1985;99(2):149-51.

Matsui T, Li L, Wu JC, Cook SA, Nagoshi T, Picard MH, Liao R, Rosenzweig A. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. *J. Biol. Chem.* 2002;277:22896-901.

Matsuoka H, Nakata M, Kohno K, Koga Y, Nomura G, Toshima H, Imaizumi T. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1996;27(1):14-8.

Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J. Physiol.* 2007;292(1):82-97.

Mello-Aires M. *Fisiologia*. 4. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2012. 1352 p.

Messina A, Knight KR, Dowsing BJ, Zhang B, Phan LH, Hurley JV, Morrison WA, Stewart AG. Localization of inducible nitric oxide synthase to mast cells during ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle. *Lab Invest.* 2000;80(3):423-31.

Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva R, Evora PRB. A atividade respiratória mitocondrial é um bom parâmetro para a lesão por isquemia e reperfusão hepática?. *Arq. Gastroenterol.* 2005;42(2):89-94.

Mittag J, Davis B, Vujovic M, Arner A, Vennström B. Adaptations of the autonomous nervous system controlling heart rate are impaired by a mutant thyroid hormone receptor- α 1. *Endocrinology.* 2010;151(5):2388-95.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.

Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics* 3. 3. Ed. London: Academic Press, 2002. 114 p.

Nicolau JC, Timerman A, Marin-Neto JA, Piegas LS, Barbosa CJDG, Franci A, Avezum Jr. A, Carvalho ACC, Markman Filho B, Polanczyk CA, Rochitte CE, Serrano Júnior CV, Precoma DB, Silva Junior DG, Albuquerque DC, Stefanini E, Knobel E, Jatene FB, Feres F, Morcerf FAP, Ganem F, Lima Filho FA, Feitosa Filho GS, Ferreira JFM, Meneghetti JC, Saraiva JFK, Silva LS, Maia LN, Baracioli LM, Lisboa LAF, Dallan LAO, Bodanese LC, Andrade MD, Oliveira Júnior M, Dutra OP, Coelho OR, Leães PE, Albuquerque PF, Lemos P, Kalil R, Costa RVC, Esporcate R, Marino RL, Botelho RV, Meneghelo RS, Sprovieri SR, Timerman S, Mathias Júnior W. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Angina Instável e Infarto Agudo do Miocárdio sem

Supradesnível do Segmento ST: PARTE I Estratificação de Risco e Condutas nas primeiras 12 horas após a chegada do paciente ao Hospital. *Arq. Bras. Cardiol.* 2001;77(2):3-23.

Ohashi Y, Kaneko SJ, Cupples TE, Young SR. Ubiquinol cytochrome c reductase (UQCRFS1) gene amplification in primary breast cancer core biopsy samples. *Gynecol Oncol.* 2004;93(1):54-8.

Ohtani H, Katoh H, Tanaka T, Saotome M, Urushida T, Satoh H, Hayashi H. Effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition pore and thiol-mediated responses in cardiac myocytes. *Nitric Oxide.* 2012;26:95–101.

Oishi Y. Cardioprotective role of AT2 receptor in postinfarction left ventricular remodeling. *Hypertension.* 2003;41(3):814-8.

Ojamaa K, Kenessey A, Shenoy R, Klein I. Thyroid hormone metabolism and cardiac gene expression after acute myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol.* 2000;279:E1319–24.

Ojamaa K, Klemperer JD, Klein I. Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle. *Thyroid.* 1996;6:505-12.

Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37(1):449–71.

Ozaki M, Kawashima S, Hirase T, Yamashita T, Namiki M, Inoue N, Hirata Ki K, Yokoyama M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells is protective against ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Am J Pathol.* 2002;160(4):1335-44.

Page I, Helmer O. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from reaction between rennin activation. *The Journal of Experimental Medicine.* 1940;71(1):29-42.

Paller MS. Hypothyroidism protects against free radical damage in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 1986;29(6):1162-6.

Pantos C, Dritsas A, Mourouzis I, Dimopoulos A, Karatasakis G, Athanassopoulos G, Mavrogeni S, Manginas A, Cokkinos DV. Thyroid hormone is a critical determinant of myocardial performance in patients with heart failure: potential therapeutic implications. *European Journal of Endocrinology.* 2007;157:515–20.

Pantos C, Malliopoulou V, Mourouzis I, Sfakianoudis K, Tzeis S, Doumba P, Xinaris C, Cokkinos AD, Carageorgiou H, Varonos DD, Cokkinos DV. Propylthiouracil-induced hypothyroidism is associated with increased tolerance of the isolated rat heart to ischaemia-reperfusion. *J Endocrinol.* 2003;178(3):427-35.

Pantos C, Malliopoulou VA, Mourouzis IS, Karamanoli EP, Paizis IA, Steimberg N, Varonos DD, Cokkinos DV. Long-term thyroxin administration protects the

heart in a pattern similar to ischemic preconditioning. *Thyroid*. 2002;12(4):325-9.

Pantos C, Mourouzis I, Cokkinos DV. Thyroid hormone and cardiac repair/regeneration: from Prometheus myth to reality? *Can J Physiol Pharmacol*. 2012;90(8):977-87.

Pantos C, Mourouzis IS, Tzeis SM, Malliopoulou V, Cokkinos DD, Asimacopoulos P, Carageorgiou HC, Varonos DD, Cokkinos DV. Propranolol diminishes cardiac hypertrophy but does not abolish acceleration of the ischemic contracture in hyperthyroid hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36(3):384-9.

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 thyroxine-induced preconditioning. *Horm Metab Res*. 2005;37(8):500-4.

Park KW, Dai HB, Ojamaa K, Lowenstein E, Klein I, Sellke FW. The direct vasomotor effect of thyroid hormones on rat skeletal muscle resistance arteries. *Anesth Analg*. 1997;85(4):734-8.

Penna C, Brancaccio M, Tullio F, Rubinetto C, Perrelli MG, Angotti C, Pagliaro P, Tarone G. Overexpression of the muscle-specific protein, melusin, protects from cardiac ischemia/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2014;109(4):418.

Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*. 1987;49:413-35.

Pingitore A, Galli E, Barison A, Iervasi A, Scarlattini M, Nucci D, L'abbate A, Mariotti R, Iervasi G. Acute effects of triiodothyronine (T3) replacement therapy in patients with chronic heart failure and low-T3 syndrome: a randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(4):1351-8.

Przyklenk K, Kloner RA. "Cardioprotection" by ACE-inhibitors in acute myocardial ischemia and infarction? *Basic Res Cardiol*. 1993;88(1):139-54.

Rakhit RD, Marber MS. Nitric oxide: an emerging role in cardioprotection? *Heart*. 2001;86:368-72.

Re RN. Mechanisms of disease: local rennin-angiotensin-aldosterone systems and the pathogenesis and treatment of cardiovascular disease. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med*. 2004;1(1):42-7.

Reade MC, Young JD. Of mice and men (and rats): implications of species and stimulus differences for the interpretation of studies of nitric oxide in sepsis. *Br J Anaesth*. 2003;90(2):115-8.

Rieske, JS. Composition, structure, and function of complex III of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* 1976;456:195-247.

Ritter O, Neyses L. The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *TRENDS in Molecular Medicine*. 2003;9(7):313-21.

Saad WA, Camargo LA. Influence of angiotensin II receptor subtypes of the paraventricular nucleus on the physiological responses induced by angiotensin II injection into the medial septal area. *Arq Bras Cardiol*. 2003;80(4):396-405.

Santos RAS, Fagundes-Moura CR, Simões e Silva AC. Efeitos cardiovasculares e renais do sistema renina-angiotensina. *Rev Bras Hipertens*. 2000;3:227-36.

Sato S, Tominaga T, Ohnishi T, Ohnishi ST. Role of Nitric Oxide in Brain Ischemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1994;738:369–73.

Schmidt-Ott UM, Ascheim DD. Thyroid hormone and heart failure. *Curr Heart Fail Rep*. 2006;3:114–19.

Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, Hirsch AT, Apstein CS, Lorell BH. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. *J Clin Invest*. 1990;86(6):1913-20.

Scott A, Hunter FE Jr. Support of thyroxine-induced swelling of liver mitochondria by generation of high energy intermediates at any one of three sites in electron transport. *J Biol Chem*. 1966;241(5):1060-6.

Senbonmatsu T, Ichihara S, Price E Jr, Gaffney FA, Inagami T. Evidence for angiotensin II type 2 receptor-mediated cardiac myocyte enlargement during in vivo pressure overload. *J Clin Invest*. 2000;106(3):25-9.

Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price EJr, Roberts RL, Imboden H, Fitzgerald TG, Gaffney FA, Inagami T. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J*. 2003;22(24):6471-82.

Sernia C, Marchant C, Brown L, Hoey A. Cardiac angiotensin receptors in experimental hyperthyroidism in dogs. *Cardiovascular Research*. 1993;27:423-28.

Shinohara R, Mano T, Nayashi R, Uchimura K, Nakano I, Watanabe F, Tsugawa T, Makino M, Kakizawa H, Nagata N, Iwase K, Ishizuki Y, Itoh M. Lipid peroxidation levels in rat cardiac muscle are affected by age and thyroid status. *J. Endocrinol*. 2000;164:97–102.

Silva Jr OC, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Basics aspects of the ischemia reperfusion injury and of the ischemic preconditioning. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2002;17(3):96-100.

Silva RC. Importância da avaliação da função tireoidiana em pacientes com diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2005;49(2):180-82.

Siragy HM, Carey RM. The subtype 2 (AT₂) angiotensin receptor mediates renal production of nitric oxide in conscious rats. *J Clin Invest.* 1997;100(2):264-9.

Siragy HM, Carey RM. The subtype-2 (AT₂) angiotensin receptor regulates renal cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate and AT₁ receptor-mediated prostaglandin E₂ production in conscious rats. *J Clin Invest.* 1996;97(8):1978-82.

Skeggs LTJr, Kahn JR, Shumway NP. The preparation and function of the hypertensin-converting enzyme. *J Exp Med.* 1956;103:295-9.

Sobey CG. Impaired endothelium-dependent relaxation of dog coronary arteries after myocardial ischaemia and reperfusion: prevention by amlodipine, propranolol and allopurinol. *Br J Pharmacol.* 1992;105(3):557-62.

Sullivan J. C. Sex and the renin-angiotensin system: inequality between the sexes in response to RAS stimulation and inhibition. *American Journal of Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology.* 2008;294(4):R1220–R6.

Swaroop A, Ramasarma T. Heat exposure and hypothyroid conditions decrease hydrogen peroxide generation in liver mitochondria. *Biochem J.* 1985;226(2):403-8.

Tadevosyan A, Maguy A, Villeneuve LR, Babin J, Bonnefoy A, Allen BG, Nattel S. Nuclear-delimited angiotensin receptor-mediated signaling regulates cardiomyocyte gene expression. *J Biol Chem.* 2010;285(29):22338-49.

Tata JR, Ernster L, Lindberg O, Arrhenius E, Pedersen S, Hedman R. The action of thyroid hormones at the cell level. *Biochem J.* 1963;86:408-28.

Tavares FM, Silva IB, Gomes DA, Barreto-Chaves ML. Angiotensin II type 2 receptor (AT₂R) is associated with increased tolerance of the hyperthyroid heart to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2013;27(5):393-402.

Tiegerstedt R, Bergman P. Niere und Kreislauf. *Skandinävisches. Archiev für Physiologie.* 1898;8:223–71.

Toldo S, Breckenridge DG, Mezzaroma E, Van Tassell BW, Shryock J, Kannan H, Phan D, Budas G, Farkas D, Lesnefsky E, Voelkel N, Abbate A. Inhibition of apoptosis signal-regulating kinase 1 reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in the mouse. *J Am Heart Assoc.* 2012;1(5):e002360.

Unger, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 2002;89(2A):3A-9A.

Van Kats JP, Danser AH, van Meegen JR, Sassen LM, Verdouw PD, Schalekamp MA. Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. *Circulation*. 1998;98(1):73-81.

Van Klinken JB, van den Berg SA, Havekes LM, Willems Van Dijk K. Estimation of activity related energy expenditure and resting metabolic rate in freely moving mice from indirect calorimetry data. *PLoS One*. 2012;7(5):e361-2.

Venditti P, Balestrieri M, Di Meo S, De Leo T. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J Endocrinol*. 1997;155(1):151-7.

Venditti P, Masullo P, Agnisola C, Di Meo S. Effect of vitamin E on the response to ischemia-reperfusion of Langendorff heart preparations from hyperthyroid rats. *Life Sci*. 2000;66(8):697-708.

Videla LA, Sir T, Wolff C. Increased lipid peroxidation in hyperthyroid patients: suppression by propylthiouracil treatment. *Free Radic Res Commun*. 1988;5(1):1-10.

Vinten-Johansen J, Zhao ZQ, Sato H. Reduction in surgical ischemic-reperfusion injury with adenosine and nitric oxide therapy. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(3):852-7.

Volpe M, Musumeci B, De Paolis P, Savoia C, Morganti A. Angiotensin II AT2 receptor subtype: an uprising frontier in cardiovascular disease? *J. Hypertens*. 2003;21(8):1429-43.

Wang P, Zweier JL. Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem*. 1996;271(46):29223-30.

Wang G, Li X, Wang H, Wang Y, Zhang L, Zhang L, Liu B, Zhang M. Later phase cardioprotection of ischemic post-conditioning against ischemia/reperfusion injury depends on iNOS and PI3K-Akt pathway. *Am J Transl Res*. 2015;7(12):2603-11.

Warner FJ, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61(21):2704-13.

West MB, Rokosh G, Obal D, Velayutham M, Xuan YT, Hill BG, Keith RJ, Schrader J, Guo Y, Conklin DJ, Prabhu SD, Zweier JL, Bolli R, Bhatnagar A. Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia/reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 2008;118(19):1970-8.

Wollert KC, Drexler H. Regulation of Cardiac Remodeling by Nitric Oxide: Focus on Cardiac Myocyte Hypertrophy and Apoptosis. *Heart Failure Reviews*. 2002;7:317-25.

Woolfson RG. Nitric oxide contributes to tissue injury in mercuric chloride-induced autoimmunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;14(2):515-21.

Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. The direct tri-iodothyronine mitochondrial pathway: science or mythology? *Thyroid*. 2000;10(11):965-9.

Wrutniak-Cabello C, Casas F, Cabello G. Thyroid hormone action in mitochondria. *J. Mol. Endocrinol*. 2001;26:67–77.

Wu CC, Yen MH. Higher level of plasma nitric oxide in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 1999;12(5):476-82.

Xiang SY, Ye LL, Duan LL, Liu LH, Ge ZD, Auchampach JA, Gross GJ, Duan DD. Characterization of a critical role for CFTR chloride channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32(6):824-33.

Xu Y, Kumar D, Dyck JR, Ford WR, Clanachan AS, Lopaschuk GD, Jugdutt BI. AT(1) and AT(2) receptor expression and blockade after acute ischemia-reperfusion in isolated working rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282(4):H1206-15.

Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1097-142.

Zhou Q, Liu C, Liu W, Zhang H, Zhang R, Liu J, Zhang J, Xu C, Liu L, Huang S, Chen L. Rotenone induction of hydrogen peroxide inhibits mTOR-mediated S6K and 4E-BP1/eIF4E pathways, leading to neuronal apoptosis. *Toxicol Sci*. 2015;143(1):81-96.

Zhu YC, Zhu YZ, Lu N, Wang MJ, Wang YX, Yao T. Role of angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodelling. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 2003;30(12):911-8.

Zorov DB, Juhaszova M, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*. 2009;3:213–25.

APÊNDICE

A - Valores brutos dos resultados encontrados

Valores da dosagem sérica de T4 ($\mu\text{g/dL}$), PC/CT (razão peso do coração/comprimento da tibia - mg/mm), LVDPe e LVDP_r (pressão desenvolvida do ventrículo esquerdo na estabilização e reperfusão, respectivamente - mmHg), FCe e FC_r (frequência cardíaca na estabilização e reperfusão, respectivamente - bpm), +dP/dte e +dP/dtr (primeira derivada de pressão por tempo positiva na estabilização e reperfusão, respectivamente - mmHg/s), -dP/dte e -dP/dtr (primeira derivada de pressão por tempo negativa na estabilização e reperfusão, respectivamente - mmHg/s) PPe e PPr (pressão de perfusão coronariana na estabilização e reperfusão, respectivamente - mmHg), EDPe e EDP_r (pressão diastólica final na estabilização e reperfusão, respectivamente - mmHg), AI (área de infarto - % em relação à área total), consumo de oxigênio mitocondrial (nmol/min), produção de H_2O_2 (nmol/min) e delta do potencial da membrana mitocondrial (diferença dos valores quantificados em nmol/min). Os caracteres correspondentes à análise estatística têm sua legenda nas figuras descritas no texto.

	WTC	KOC	WTT	KOT
PC/CT	9,14 $\pm$ 0,75(5)	6,76 $\pm$ 0,51(8)*	11,88 $\pm$ 0,49(5)	8,72 $\pm$ 0,98(7)
T4	4,82 $\pm$ 0,41(5)	4,57 $\pm$ 0,74(5)	0,74 $\pm$ 0,09(5)	0,78 $\pm$ 0,33(5)
ConO₂-Basal	67,89 $\pm$ 10,85(6)	40,45 $\pm$ 4,72(7)	67,89 $\pm$ 9,15(6)	80,99 $\pm$ 5,20(7)
ConO₂-ADP	126,48 $\pm$ 9,95(6)	77,85 $\pm$ 11,41(7)	89,5 $\pm$ 7,75(6)	128,2 $\pm$ 7,33(7)
ConO₂-Oligo	54,63 $\pm$ 6,13(6)	38,97 $\pm$ 5(7)	49,09 $\pm$ 5,31(6)	62,06 $\pm$ 5,02(7)
ConO₂-FCCP	82,52 $\pm$ 4,67(6)	59,87 $\pm$ 4,67(7)	67,87 $\pm$ 6,75(6)	90,56 $\pm$ 9,33(7)
CR	2,37 $\pm$ 0,13(6)	2,02 $\pm$ 0,11(7)	1,86 $\pm$ 0,09(6)	2,11 $\pm$ 0,13(7)
H₂O₂-Basal	1,62 $\pm$ 0,31(6)	1,10 $\pm$ 0,18(7)	1,97 $\pm$ 0,32(6)	2,60 $\pm$ 0,20(7)
H₂O₂-ADP	0,12 $\pm$ 0,006(6)	0,10 $\pm$ 0,01(7)	0,15 $\pm$ 0,003(6)	0,19 $\pm$ 0,02(7)
H₂O₂-Oligo	0,59 $\pm$ 0,06(6)	0,5 $\pm$ 0,1(7)	0,97 $\pm$ 0,2(6)	1,29 $\pm$ 0,02(7)
H₂O₂-FCCP	0,17 $\pm$ 0,006(6)	0,14 $\pm$ 0,03(7)	0,16 $\pm$ 0,005(6)	0,17 $\pm$ 0,01(7)
ΔPotencial	1523,75 $\pm$ 195,55(2)	1431,01 $\pm$ 38,96(2)	1632,81 $\pm$ 46,43(5)	1476,81 $\pm$ 93,42(4)
I/R-ConO₂-Basal	41,24 $\pm$ 5,57(6)	29,65 $\pm$ 1,64(6)	44,03 $\pm$ 5,31(6)	43,65 $\pm$ 6,67(6)
I/R-ConO₂-ADP	64,22 $\pm$ 9,15(6)	49,15 $\pm$ 2,20(6)	75,73 $\pm$ 12,03(6)	75,10 $\pm$ 13,06(6)
I/R-CR	1,55 $\pm$ 0,05(6)	1,66 $\pm$ 0,04(6)	1,69 $\pm$ 0,09(6)	1,70 $\pm$ 0,03(6)
I/R-H₂O₂-Basal	1,84 $\pm$ 0,49(6)	1,74 $\pm$ 0,22(6)	3,02 $\pm$ 0,26(6)	1,94 $\pm$ 0,29(6)
I/R-H₂O₂-ADP	0,44 $\pm$ 0,06(6)	0,39 $\pm$ 0,03(6)	0,44 $\pm$ 0,01(6)	0,34 $\pm$ 0,03(6)
I/R-H₂O₂-Oligo	1,76 $\pm$ 0,45(6)	1,47 $\pm$ 0,14(6)	2,22 $\pm$ 0,26(6)	1,52 $\pm$ 0,19(6)
I/R-H₂O₂-FCCP	0,66 $\pm$ 0,08(6)	0,59 $\pm$ 0,02(6)	0,67 $\pm$ 0,06(6)	0,50 $\pm$ 0,03(6)
I/R-ΔPotencial	2460,42 $\pm$ 217,66(6)	2272,73 $\pm$ 217,69(6)	2909,87 $\pm$ 373,51(6)	3043,36 $\pm$ 226,33(6)

LVDPe	72,04±6,52(5)	59,3±3,19(8)	64,38±7,89(7)	64,44±7,97(7)
LVDPr_{25min}	55,69±4,36(5)	49,78±4,54(8)	65,35±7,53(7)	49,2±7,57(7)
LVDPr_{35min}	54,13±6,05(5)	46,18±4,6(8)	62,64±7,21(7)	48,47±7,79(7)
LVDPr_{45min}	50,24±6,2(5)	41,66±4,3(8)	59,03±6,77(7)	45,67±7,29(7)
+dP/dte	3320,42±425,97(5)	2245,08±189,08(8)	3320,42±425,97(7)	3429,19±416,59(7)
+dP/dtr_{25min}	2086,92±128,12(5)	1986,94±240,89(8)	3415,9±391,84(7)	2924,38±428,46(7)
+dP/dtr_{35min}	2059,4±236,06(5)	1885,59±245,21(8)	3395,84±381,32(7)	3003,56±443,82(7)
+dP/dtr_{45min}	1898,57±187,36(5)	1712,89±219,58(8)	3249,21±368,46(7)	2859,95±417,83(7)
-dP/dte	-2031,13±171,2(5)	-1694,53±111,1(8)	-1834,09±245,9(7)	-2111,33±238,6(7)
-dP/dtr_{25min}	-1607,14±90,5(5)	-1352,09±141,5(8)	-1864,13±213,1(7)	-1533,76±220,3(7)
-dP/dtr_{35min}	-1560,94±147,3(5)	-1235,72±139,1(8)	-1795,28±198,6(7)	-1496,09±226,3(7)
-dP/dtr_{45min}	-1419,75±158,1(5)	-1086,27±123,6(8)	-1645,14±175,2(7)	-1357,97±202,8(7)
FCe	319,23±23,45(5)	333,13±29,14(8)	405,18±12,3(7)	421,76±17,85(7)
FCr_{25min}	337,19±26,11(5)	322,42±20,05(8)	393,56±16,62(7)	395,29±21,57(7)
FCr_{35min}	334,68±21,59(5)	306,16±30,71(8)	398,22±17,56(7)	391,69±21,18(7)
FCr_{45min}	321±23,81(5)	293,47±24,33(8)	389,59±15,38(7)	383,26±19,77(7)
PPe	119,19±17,41(5)	120,7±22,63(6)	84,06±12,68(6)	163,11±11,63(5)
PPr_{25min}	137,26±18,77(5)	125,25±25,65(6)	95,68±14,58(6)	167,63±14,02(5)
PPr_{35min}	138,03±18,32(5)	127,47±24,72(6)	98,48±18,08(6)	166,92±12,87(5)
PPr_{45min}	139,65±17,62(5)	125,12±26,44(6)	103,84±18,53(6)	166,33±14,12(5)
EDPe	6,19±0,77(5)	8,04±0,36(7)	6,74±0,61(7)	10,13±0,39(8)
EDP_{25min}	4,71±0,78(5)	7,77±0,34(7)	6,41±0,6(7)	15,59±3,14(8)
EDP_{35min}	5,25±0,69(5)	7,76±0,4(7)	6,36±0,63(7)	14,4±2,3(8)
EDP_{45min}	5,72±0,74(5)	7,56±0,54(7)	6,3±0,64(7)	14,76±2,19(8)
AI	11,08±1,1%(5)	11,01±0,81%(6)	9,87±0,84%(6)	10,17±0,92%(6)

B - Relatório científico da Bolsa de Estágio do Pesquisador no Exterior (BEPE) concedido pela FAPESP no período de Março a Dezembro de 2015 na University of Illinois at Chicago (UIC)

Thyroid hormone decreases gap junctions expression in cardiac atria: role of Caveolin-1.

Ivson Bezerra da Silva^{1,2}, Marcelo G. Bonini², Maria Luiza M. Barreto-Chaves¹.

¹Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

²Department of Medicine, University of Illinois at Chicago, Chicago, Illinois, USA

Running Head: Thyroid hormone and Cardiac Function

Keywords: Thyroid hormone; Caveolin-1; Gap junctions, Cardiac atria.

*Correspondence should be addressed to Maria Luiza M. Barreto-Chaves, Laboratory of Cellular Biology and Functional Anatomy, Department of Anatomy, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 2415, Sao Paulo, SP, 05508-900, Brazil.

Phone: +55 (11) 3091-8049; Fax: 55 +(11) 3091-7366; Email: mchaves@usp.br

ABSTRACT

Background: The heart corresponds to main target of thyroid hormone (TH), and many of the classic signs and symptoms of hyperthyroidism are the cardiac and hemodynamic manifestations and include heart rhythm disorders. TH regulates many cardiac genes via nuclear thyroid receptors, and hyperthyroidism is frequently associated with atrial fibrillation. Electrical activity propagation in myocardium depends on the transfer of current at gap junctions, and connexins 40 and 43 are the predominant junction proteins. Another important protein involved on cardiac rhythm is an ion channel protein, Nav1.5, a sodium channel. Recently some studies have demonstrated an important role of Caveolin-1 (Cav-1) on genesis of arrhythmias. We have demonstrated that TH increase reactive oxygen species (ROS) in cardiomyocytes, and some authors have shown that ROS increases have been implicated in the genesis of arrhythmias. Purpose: to define the role of Cav-1 depletion and oxidative stress in the pro-arrhythmic effects of hyperthyroidism. Method: We examined effects of ROS increase induced by TH on the levels of Cav-1, Cx40, Cx43 and Nav1.5 in cardiac atria by Western Blotting and confocal analyses with two different doses (1.75 μ g/100g b.w. and 7 μ g/100g b.w.) and ages (10 and 26weeks). Results: Hyperthyroidism increases the ROS production and decreases the protein levels of Cav-1, Cx40, Cx43 and Nav1.5. Confocal analyses showed that Cav-1 absence leads to intensive Cx40 downregulation. Conclusion: We showed that TH is able to increase ROS production and promotes Cav-1, gap junctions and ion channel downregulation.

Keywords: Hyperthyroidism, ROS, Caveolin-1, gap junctions, ion channel.

INTRODUCTION

The thyroid hormone (TH) plays a significant role in diverse processes related to growth, development, differentiation, and metabolism (McAninch and Bianco, 2014). The precise cellular and molecular mechanisms by which TH exerts its action on almost every cell and organ in the body have been well worked out by several authors (Wu and Koeni, 2000; Klein and Ojamaa, 2001; Klein and Danzi, 2007 and Barreto-Chaves et al., 2010). Considering the general effects of TH acting in various different cells types in the organism, disturbances on the TH levels may result in severe complications.

The heart corresponds to main target of TH (Warner and Mittag, 2012) therefore thyroid dysfunctions, including subclinical thyroid diseases, has significant effects on cardiovascular function and health (Danzi and Klein, 2014). Many of the classic signs and symptoms of hyperthyroidism are cardiac and hemodynamic manifestations and include palpitations, tachycardia, exercise intolerance, dyspnea on exertion, widened pulse pressure, and sometimes atrial fibrillation (Klein and Ojamaa 2001; Dahl et al., 2008; Kim, 2008; Klein, 2011). Although the hyperthyroidism is associated with increased cardiac contractility (Tavares et al., 2013), which induces to a cardiac hypertrophy phenotype, disorders in cardiac electrical conduction (arrhythmias) are commonly observed in this situation and they may contribute to elevated risk of cardiac failure (Klein and Ojamaa, 2001). The sinus tachycardia is a common manifestation of hyperthyroidism that also may lead to atrial fibrillation, given THs are able to regulate cardiac excitation and electrical conduction by changing the expression of ionic channels and transporters (Almeida et al., 2009).

The arrhythmia is characterized as a problem with the rate or rhythm of the heartbeat. The heart can beat too fast, too slow, or with an irregular rhythm (Cochet et al., 2014). Tachycardia is the most common finding and the sinus tachycardia occurs in

approximately 40% of cases of hyperthyroidism (Northcote et al., 1986). In addition, atrial fibrillation is the second most common arrhythmias in hyperthyroidism, occurs in 10%-15% of patients, and its prevalence increasing with age (Osman et al., 2002; Rhee and Pearce, 2011).

We have shown previously that TH is able to increase reactive oxygen species (ROS) levels in vivo and in vitro cardiac hypertrophy experimental model (Araújo et al., 2011). Some studies show that excess amounts of ROS have been implicated in the genesis of arrhythmia (Brown and O'Rourke, 2010; Sovari et al., 2011 and 2013). Sovari and co-workers (2013) demonstrated that Cx43 remodeling and increase of ROS levels are the main responsible for cardiac arrhythmic risk.

Gap junctions are clusters of intercellular channels that allow direct diffusion of ions and small molecules between adjacent cells (Goodenough and Paul, 2009). The intercellular channels are formed by head-to-head docking of hexameric assemblies (connexons) of tetraspan integral membrane proteins, the connexins (Cx) (Goodenough et al. 1996). Each gap junction is made of two connexons, which are hexameric proteins of the connexin (Cx) subunit (Tse and Yeo, 2015). The connexin gene family is characterized by 20 members in the mouse and 21 members in the human genome. Among the known “cardiovascular” connexins, Cx40 were demonstrated to be functionally expressed in mouse and human endothelial cells, Cx40 and Cx43 in cardiomyocytes of both species (Söhl and Willecke, 2004). Cx43 is expressed in both, the atria and ventricles (Beyer, Paul and Goodenough, 1987), whereas Cx40 is expressed only in the atria and His–Purkinje system (Gourdie et al., 1993a,b).

Connexin 40 (Cnx40) is a major gap-junction protein in the atrial myocardium. In the heart, gap junctions are responsible for cell-to-cell conduction of the action potential. In several cardiac diseases, the expression of connexins is changed and is

associated with increased propensity for arrhythmias. (Chaldoupi et al., 2009). The loss of Cx40, prevalent in the His-Purkinje system, results in cardiac arrhythmias resembling right-bundle-branch block in humans (Simon et al. 1998; Kirchhoff et al. 1998). Endothelial cells express mainly Cx40 (Little et al. 1995; van Kempen and Jongsma 1999), and smooth muscle cells express mainly Cx43 (Gabriels and Paul 1998), although both cell types express both connexins.

Another important protein involved on arrhythmic disorders is the Nav1.5, a sodium channel responsible for the rapid depolarization upstroke of the cardiac action potential. It has been associated with numerous arrhythmic disorders including the atrial fibrillation and sick sinus syndrome, some supraventricular diseases (Benson et al., 2003). Voltage-gated sodium channels play a critical role in the generation and propagation of the cardiac action potential (Watanabe et al., 2011).

Recently some studies have demonstrated an important role of Caveolin-1 (Cav-1) on genesis of arrhythmias (Cronk et al., 2007; Holm et al., 2010; Ellinor et al., 2012). Cav-1 is an essential protein for the formation of caveolae, which are vesicular invaginations (50-100nm) of the plasma membrane (Anderson, 1998 and Zhao et al., 2002). This protein shows activity in the modulation of intracellular signaling, can interact with several proteins by its caveolin scaffolding domain (CSD) and, in general, this interaction leads to inhibition of associated proteins (Okamoto et al., 1998). Cav-1 is a key regulator of endothelial cell function and vascular homeostasis (Minshall et al., 2003), and in the heart, Cav-1 plays a role in regulating systolic and diastolic cardiac function (Wunderlich et al., 2006). According to some studies, the ventricular tachycardia and bradycardia may represent the result of connexin43 (Cx43) reduction, and the impairment of gap junction conduction (Iravanian et al., 2011; Sovari et al., 2011 and 2013; Yang et al., 2014).

So, this study hypothesized that increase of ROS induced by high levels of TH, may to decrease the cardiac expression of Cav-1 which can result in gap junction downregulation, inducing to cardiac arrhythmias phenotype observed in hyperthyroid condition.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Experimental Design

Animal handling and experiments were conducted in accordance with the policies of the Animal Care Facility of the University of Illinois at Chicago and the National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS). Mice were housed under controlled temperature and light (24°C, 12/12h light/dark cycle), and given free access to standard rat chow and water. The animals were randomized and allocated to six groups: 1 - Control (10 weeks old), 2 - Treated with T3 -1.75µg/100g BW – 5x physiologic dose (10 weeks old), 3 - Treated with T3 -7µg/100g BW – 20x physiologic dose (10 weeks old), 4 - Control (26 weeks old), 5 - Treated with T3 -1.75µg/100g BW – 5x physiologic dose (26 weeks old) and 6 - Treated with T3 -7µg/100g BW – 20x physiologic dose (26 weeks old). All animals (C57Bl/6) were acquired from The Jackson Laboratory (Figure 1). Besides of C57/Bl6 mice, was used a different strain: Cav-1 knockout mice, as previously described by Mao and co-workers (2014).

Induction of Hyperthyroidism

Hyperthyroidism was induced by daily injections of triiodothyronine (T3; 1.5 and 7 µg/100 g BW in 0.01 mM NaOH, i.p.), administered once a day for 14 days, while control mice received a daily injection of vehicle (Tavares et al., 2013). The T3 was purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

Immunoblotting

Western blot analysis was performed as previously described (Lino et al., 2015). Heart were harvested, atria, left and right ventricles were separated and protein were extracted using an extraction buffer on a tissue homogenizer. Homogenates were centrifuged (11,000 RPM, 4°C for 15min) and the supernatants stored at -80°C freezer. Protein concentration of samples was determined according to BCA curve and 10ug of total protein was separated on 4-12% Bis-Tris gels and transferred to nitrocellulose membrane by humid electroblotting for 2h (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The membranes were blocked for 60 min at room temperature in 5% milk in TBS-T (0.05% Tween-20, pH 7.4), washed with TBS-T and then incubated overnight at 4°C with primary antibody [mouse antiCav-1 (BD Technologies, Research Triangle Park, NC), rabbit anti- β -actin (Cell Signaling Technologies, Boston, MA), rabbit anti-4-HNE (EMD Millipore, Billerica, MA), rabbit anti-Connexin43 (Abcam). Antibodies were diluted 1:1000 (in TBS-T) unless stated otherwise. The nitrocellulose membranes were washed (three times) and incubated with the infrared secondary antibody to anti-rabbit/mouse, 1:5,000 in TBS-T and incubated for 2 hours at room temperature. After 3 washes, protein signals were analyzed by Odyssey CLx Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE). β -Actin was used as internal control and the quantitative analysis was calculated as percentage in relation to control.

Confocal microscopy

The heart was harvested and fixated in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich Company) for 48h, after were kept into ethanol 70% for long term storage. To process the cardiac atria samples for morphological analysis by confocal microscopy, the samples were dehydrated through a series of graded ethanol baths to displace the water, and then infiltrated with wax paraffin and later cut with glass knives (8 μ m). The slices were washed in 1%PBS three times for 3 min each and then blocked using 5% bovine

serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich Company) for 45 min. Slices were then washed in 1% TBS-T three times for 3 min and incubated in primary antibodies [mouse anti-Cav-1–1:200 (BD Technologies), rabbit anti-4-HNE 1:100 (EMD Millipore, Billerica, MA), rabbit anti-Connexin43 1:200 (Abcam), sheep anti-Connexin40 1:100 (Abcam), mouse anti-Nav1.5 1:100 (Abcam) and mouse anti-3-Nitrotyrosine 1:100 in 1% BSA in 1% TBS-T overnight at 4°C in a humid chamber. Slices were washed three times in 1% TBS-T for 3 min and incubated with secondary fluorescent antibodies [rabbit Alexafluor-568, mouse Alexafluor-488, sheep Alexafluor-555 and goat Alexafluor-647 (Thermo Fisher Scientific)] for 2 h at room temperature in a dark, humid chamber. Slices were then washed three times in 1% TBS-T for 3 min and incubated with 50 µM DAPI (Thermo Fisher Scientific) for 15 min. Slices were washed twice in 1% TBS-T for 3 min and once in distilled water for 5 min and the slides were mounted and then imaged using LSM- 510META (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad InStat. Data are presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). The results were analyzed and compared using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test for one-way analysis. $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

RESULTS

Validation of experimental model of TH treatment

As expected, thyroid hormone treatment promoted a significant increase in cardiac mass, evidencing the development of cardiac hypertrophy given by heart weight to tibia length ratio. Into two different ages (10 and 26 weeks) the different doses (5 and 20x physiological dose – p.d.) of T3 led to cardiac hypertrophy (Figure 2).

Does TH increase ROS production?

We therefore measured 4-HNE-protein adducts and total tyrosine nitration sites in the cardiac atria. All treated groups displayed a significant increase of cardiac 4-HNE-protein adducts (Figure 4A and B) and protein tyrosine nitration (Figure 4A and B) compared with relative controls. The levels of 4-HNE in cardiac atria were significantly increased on T₃5x (130.34%) and T₃20x (122.05%) when compare to control (10 weeks), among mice 26 weeks old was an increase of 78.06% (T₃5x) and 303.12% (T₃20x) (Figure 5A and B). The analysis of 4-HNE protein expression by Western Blotting showed no difference among groups, therefore there was a tendency to increase of 4-HNE expression on all groups that received T3 (Figure 3A).

Does ROS high levels downregulate Cav-1?

Western blot analyses revealed a 39% reduction of the Cav-1 expression in 5x-TH treated mice 10 weeks old and 50% in 20x-TH treated mice 10 weeks old. In mice 26 weeks only 20x-TH treated group showed reduction of 37 % on Cav-1 protein expression. Recent evidence shows that the functional connections between cav-1 and ROS play a key role in many diseases (Yang et al., 2014; Sun et al., 2016). Figure 5 summarizes our findings that Cav-1 expression is reduced in cardiac atria where there was an increase of ROS production (Figure 4)

Decrease of Cav-1 expression results in Cx43 downregulation

Loss of Cav-1 results in Cx43 downregulation, as showed in Figure 3C. The analyses on confocal reveals that Cx43 expression is accompanied of the same Cav-1 expression profile (Figure 5).

Sodium channel (Nav1.5) and Cx40 protein abundance is reduced in cardiac atria of hyperthyroid mice.

The Figure 6 shows that Nav1.5 expression is progressively reduced on mice treated with different doses of T₃. Mice 10 weeks old treated with 5x p.d. presented loss of 10% of Nav1.5, however when mice received 20x p.d. they presented loss of 75%. Mice 26 weeks old submitted at the same conditions showed loss of 33.5% (5x p.d.) and 42% (20x p.d.). Cx40 also presented reduced on treated mice of 30% (mice 10 weeks old – 5x p.d.), 12% and 49% (mice 26 weeks old – 5 and 20x p.d., respectively). Had no difference between control and mice 10 weeks old treated with 20x p.d.

Do Cx40, Cx43 and Nav1.5 downregulation seen in hyperthyroid mice have relationship with Cav-1 absence?

In order to confirm if Cav-1 absence was able to promotes downregulation on Cx40, Cx43 and Nav1.5 in cardiac atria, we used Cav-1^{-/-}KO, as describe previously. The results are shown on Figure 7. Have no difference on Nav1.5 and Cx43 expression level between wild-type and Cav-1 knockout mice, but when we analyzed the Cx40 expression level we found decreases on 85% in Cav-1 knockout mice.

DISCUSSION

Several evidence have suggested that Cav-1 is involved in the regulation of cardiac electric functioning. For example, Cav-1 regulates the Cx43 function and degradation (Schubert et al., 2002; Yang et al., 2014). Two important human genome studies revealed the association of Cav-1 variants with increased risk of cardiac arrhythmias (Holm et al., 2010; Ellinoor et al., 2012). It is known that TH imbalance, hypothyroidism and hyperthyroidism, is able of increase atrial fibrillation in rats (Zhang et al., 2013) and to our knowledge, this is the first study examining the effects of different TH doses and ages on arrhythmic molecular profile, demonstrating the Cav-1

role. Atrial fibrillation occurs in 10-25% of patients with hyperthyroidism (Fuster et al., 2011) and in patients with hyperthyroidism and atrial fibrillation, the primary treatment goal is to restore normal thyroid function (Zhang et al., 2013).

A work showed that hyperthyroidism increases atrial fibrillation vulnerability, the hyperthyroid rats demonstrated increased ventricular contractility (Zhang et al., 2013). Several authors have shown the important link between thyroid hormone levels and heart function (Klein and Ojamaa, 2001; Tang et al., 2005; Gerdes and Iervasi, 2010). Chen and co-workers (2002) revealed that thyroid hormone changes the electrophysiological activity of the pulmonary vein cardiomyocytes. Increased automaticity and enhanced triggered activity may increase the arrhythmogenic activity of PVs in hyperthyroidism. The hyperthyroidism is associated with an increased supraventricular ectopic activity in patients with normal hearts. The activation of arrhythmogenic foci by high thyroid hormone levels may be an important causal link between hyperthyroidism and atrial fibrillation (Wustmann et al., 2008).

We decided to have experimental groups with different ages because some authors have demonstrated that thyroid hormone would be one of the factors involved in the modulation of cardiovascular nitric oxide (NO) production and caveolin-1 and caveolin-3 tissue-specific abundance, regardless of age (Sarati et al., 2012). Clinical features of thyroid dysfunction vary with age (Engels et al., 2015).

The great majority of the cells in the organism need to be depolarized in order to fulfill their functions. This is case for excitable tissues like cardiac muscles, and the sodium ion (Na^+) is principally responsible for the process (Catterall, 2012). Different experimental studies (in humans and mice) have shown the presence of Nav1.5 channels not only at the level of cell membranes in cardiac muscle but also in intercalated discs, in lateral cell membranes, and in T-tubules (Huges, 2007). The intercalated disc serves

as a meeting point of the proteins that are relevant for excitability, propagation, and the mechanical joining of cardiomyocytes (León-Ariza et al., 2014). There is an interaction between the sodium channels and the gap junctions, Cx43. This communication is important because it determines the intensity of the sodium current between the cardiomyocytes (Mario, 2012). Furthermore, an important Nav1.5 modulators are free oxygen radicals (ROS), that leads to the reduction of rapid influx of sodium. Our results show that hyperthyroidism leads to increase of ROS production, followed by Cav-1, sodium channel (Nav1.5) and gap junctions (Connexins 40 and 43) downregulation. Thus, our results demonstrate that TH high level may contribute to the onset of cardiac arrhythmic episodes.

Recently a study showed the important role of Cx43 level to improved gap junction intercellular communication (Veeranki et al., 2016) and other study with 34 cases of electric shock death who had definite current mark evidence found reduction on Cx43 expression in the sinoatrial node (Chen et al., 2015). These authors concluded that Cx43 expression in the sinoatrial node illustrate electric shock death might be related to the abnormalities of cardiac electrophysiology and conduction. Gemel and co-workers (2014) said that a normal atrial conduction requires similar abundances and homogeneous/overlapping distributions of two connexins (Cx40 and Cx43) and showed that Cx40 immunostaining was severely reduced in all chronic atrial fibrillation patients.

The loss of Cav-1 resulted in slowed cardiac conduction and increased risk of arrhythmia (Yang et al., 2014). The authors showed that genetic deletion of Cav-1 leads to impact on cardiac electric functioning, the ECG recordings revealed that left ventricular (LV) conduction velocity in Cav-1^{-/-} was significantly lower than in wild-type mice, besides that the authors concluded that electric abnormalities observed in

Cav-1^{-/-} mice result from LV connexin 43 downregulation by activated cSrc tyrosine kinase (Yang et al., 2014). There is a significant association between rs3807989 (single-nucleotide polymorphism) and atrial fibrillation in the Chinese Han population. The Cav-1 interacts with sodium channel (Nav1.5), so Cav-1 becomes a strong candidate susceptibility gene for atrial fibrillation across different ethnic populations (Chen et al., 2015).

The use of carvedilol and bisoprolol (drugs with antiarrhythmic action), was able to increase the Cav-1 and cardiac ion channel protein (Nav1.5) expression in HL-1 cardiac myocytes cells. The authors previously have been reported that carvedilol has antiarrhythmic effects in the patients with chronic heart failures (Endo et al., 2015).

In summary, by using an original hyperthyroid experimental model we provide evidences that hyperthyroidism leads to altered pattern of expression of gap junctions (Cx40 and 43) and sodium channel (Nav1.5) in cardiac atria from young and old mice and that may be correlated to the arrhythmia episodes seen in hyperthyroidism condition. We expect that future studies using similar approach will provide new and important findings that will help understanding the link between thyroid gland disorders and cardiovascular functions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Dawood Dabar for invaluable discussions related to cardiac gap junctions and sodium channels, as well as to Dr. André Luelsdorf and Dr. Chenxia He and RRC-UIC (Research Resources Center-UIC) for the technical assistance provided. Ivson Bezerra da Silva is recipient of a scholarship from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Foundation for the Support of Research in the state of Sao Paulo).

GRANTS

This work was supported by FAPESP (2014-21464-8).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: I.B.S. performed experiments; I.B.S. prepared figures; I.B.S., M.G.B. and M.L.M.B.C. conception and design of research; I.B.S., M.G.B. and M.L.M.B.C. edited and revised manuscript; I.B.S., M.G.B. and M.L.M.B.C. interpreted results of experiments; M.G.B. and M.L.M.B.C. approved final version of manuscript.

REFERENCES

1. McAninch EA, Bianco AC. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 1311:77-87, 2014.
2. Wu Y, Koenig RJ. Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab.* 11(6):207-11, 2000.
3. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 344(7):501-9, 2001.
4. Klein I, Danzi S. Thyroid disease and the heart. *Circulation.* 116(15):1725-35, 2007.
5. Barreto-Chaves ML, Carrillo-Sepúlveda MA, Carneiro-Ramos MS, Gomes DA, Diniz GP. The crosstalk between thyroid hormones and the Renin-Angiotensin System. *Vascul Pharmacol.* 52(3-4):166-70, 2010.
6. Warner A, Mittag J. Thyroid hormone and the central control of homeostasis. *J Mol Endocrinol.* 49(1):R29-35, 2012.
7. Danzi S, Klein I. Thyroid disease and the cardiovascular system. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 43(2):517-28, 2014.
8. Dahl P, Danzi S, Klein I. Thyrotoxic cardiac disease. *Curr Heart Fail Rep.* 5(3):170-6, 2008.
9. Kim B. Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid.* 18(2):141-4, 2008.

10. Klein I. Thyroid and the heart: the intimacy is strained. *Thyroid*. 21(5):469-70, 2011.
11. Tavares FM, da Silva IB, Gomes DA, Barreto-Chaves ML. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) is associated with increased tolerance of the hyperthyroid heart to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther*. 27(5):393-402, 2013.
12. Almeida NA, Cordeiro A, Machado DS, Souza LL, Ortega-Carvalho TM, Campos-de-Carvalho AC, Wondisford FE, Pazos-Moura CC. Connexin40 messenger ribonucleic acid is positively regulated by thyroid hormone (TH) acting in cardiac atria via the TH receptor. *Endocrinology*. 150(1):546-54, 2009.
13. Cochet H, Dubois R, Sacher F, Derval N, Sermesant M, Hocini M, Montaudon M, Haïssaguerre M, Laurent F, Jaïs P. Cardiac arrhythmias: multimodal assessment integrating body surface ECG mapping into cardiac imaging. *Radiology*. 271(1):239-47, 2014.
14. Northcote RJ, MacFarlane P, Kesson CM, Ballantyne D. Continuous 24-hour electrocardiography in thyrotoxicosis before and after treatment. *Am Heart J*. 112(2):339-44, 1986.
15. Osman F, Gammage MD, Sheppard MC, Franklyn JA. Clinical review 142: cardiac dysrhythmias and thyroid dysfunction: the hidden menace? *J Clin Endocrinol Metab*. 87(3):963-7, . 2002.
16. Rhee SS, Pearce EN. Update: Systemic Diseases and the Cardiovascular System (II). The endocrine system and the heart: a review. *Rev Esp Cardiol*. 64(3):220-31, 2011.
17. Araujo AS, Diniz GP, Seibel FE, Branchini G, Ribeiro MF, Brum IS, Khaper N, Barreto-Chaves ML, Belló-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(1):78-84, 2011.
18. Brown DA, O'Rourke B. Cardiac mitochondria and arrhythmias. *Cardiovasc Res*. 88(2):241-9, 2010.
19. Sovari AA, Iravanian S, Dolmatova E, Jiao Z, Liu H, Zandieh S, Kumar V, Wang K, Bernstein KE, Bonini MG, Duffy HS, Dudley SC. Inhibition of c-Src tyrosine kinase prevents angiotensin II-mediated connexin-43 remodeling and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol*. 58(22):2332-9, 2011.
20. Sovari AA, Rutledge CA, Jeong EM, Dolmatova E, Arasu D, Liu H, Vahdani N, Gu L, Zandieh S, Xiao L, Bonini MG, Duffy HS, Dudley SC Jr.

- Mitochondria oxidative stress, connexin43 remodeling, and sudden arrhythmic death. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 6(3):623-31, 2013.
21. Goodenough DA, Paul DL. Gap junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1(1):a002576, 2009.
 22. Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem.* 65:475-502, 1996.
 23. Tse G, Yeo JM. Conduction abnormalities and ventricular arrhythmogenesis: The roles of sodium channels and gap junctions. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 9:75-82, 2015.
 24. Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 62(2):228-32, 2004.
 25. Beyer EC, Paul DL, Goodenough DA. Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver. *J Cell Biol.* 105(6 Pt 1):2621-9, 1987.
 26. Gourdie RG, Green CR, Severs NJ, Anderson RH, Thompson RP. Evidence for a distinct gap-junctional phenotype in ventricular conduction tissues of the developing and mature avian heart. *Circ Res.* 72(2):278-89, 1993.
 27. Gourdie RG, Severs NJ, Green CR, Rothery S, Germroth P, Thompson RP. The spatial distribution and relative abundance of gap-junctional connexin40 and connexin43 correlate to functional properties of components of the cardiac atrioventricular conduction system. *J Cell Sci.* 105 (Pt 4):985-91, 1993.
 28. Chaldoupi SM, Loh P, Hauer RN, de Bakker JM, van Rijen HV. The role of connexin40 in atrial fibrillation. *Cardiovasc Res.* 84(1):15-23, 2009.
 29. Simon AM, Goodenough DA, Paul DL. Mice lacking connexin40 have cardiac conduction abnormalities characteristic of atrioventricular block and bundle branch block. *Curr Biol.* 8(5):295-8, 1998.
 30. Kirchhoff S, Nelles E, Hagendorff A, Krüger O, Traub O, Willecke K. Reduced cardiac conduction velocity and predisposition to arrhythmias in connexin40-deficient mice. *Curr Biol.* 8(5):299-302, 1998.
 31. Little TL, Beyer EC, Duling BR. Connexin 43 and connexin 40 gap junctional proteins are present in arteriolar smooth muscle and endothelium in vivo. *Am J Physiol.* 1995 Feb;268(2 Pt 2):H729-39.
 32. van Kempen MJ, Jongsma HJ. Distribution of connexin37, connexin40 and connexin43 in the aorta and coronary artery of several mammals. *Histochem Cell Biol.* 112(6):479-86, 1999.

33. Gabriels JE, Paul DL. Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed. *Circ Res.* 83(6):636-43, 1998.
34. Benson DW, Wang DW, Dymment M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL Jr. Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *J Clin Invest.* 112(7):1019-28, 2003.
35. Watanabe H, Nogami A, Ohkubo K, Kawata H, Hayashi Y, Ishikawa T, Makiyama T, Nagao S, Yagihara N, Takehara N, Kawamura Y, Sato A, Okamura K, Hosaka Y, Sato M, Fukae S, Chinushi M, Oda H, Okabe M, Kimura A, Maemura K, Watanabe I, Kamakura S, Horie M, Aizawa Y, Shimizu W, Makita N. Electrocardiographic characteristics and SCN5A mutations in idiopathic ventricular fibrillation associated with early repolarization. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 4(6):874-81, 2011.
36. Cronk LB, Ye B, Kaku T, Tester DJ, Vatta M, Makielski JC, Ackerman MJ. Novel mechanism for sudden infant death syndrome: persistent late sodium current secondary to mutations in caveolin-3. *Heart Rhythm.* 4(2):161-6, 2007.
37. Holm H, Gudbjartsson DF, Arnar DO, Thorleifsson G, Thorgeirsson G, Stefansdottir H, Gudjonsson SA, Jonasdottir A, Mathiesen EB, Njølstad I, Nyrnes A, Wilsgaard T, Hald EM, Hveem K, Stoltenberg C, Løchen ML, Kong A, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Several common variants modulate heart rate, PR interval and QRS duration. *Nat Genet.* 42(2):117-22, 2010.
38. Ellinor PT, Lunetta KL, Albert CM, Glazer NL, Ritchie MD, Smith AV, Arking DE, Müller-Nurasyid M, Krijthe BP, Lubitz SA, Bis JC, Chung MK, Dörr M, Ozaki K, Roberts JD, Smith JG, Pfeufer A, Sinner MF, Lohman K, Ding J, Smith NL, Smith JD, Rienstra M, Rice KM, Van Wagoner DR, Magnani JW, Wakili R, Clauss S, Rotter JJ, Steinbeck G, Launer LJ, Davies RW, Borkovich M, Harris TB, Lin H, Völker U, Völzke H, Milan DJ, Hofman A, Boerwinkle E, Chen LY, Soliman EZ, Voight BF, Li G, Chakravarti A, Kubo M, Tedrow UB, Rose LM, Ridker PM, Conen D, Tsunoda T, Furukawa T, Sotoodehnia N, Xu S, Kamatani N, Levy D, Nakamura Y, Parvez B, Mahida S, Furie KL, Rosand J, Muhammad R, Psaty BM, Meitinger T, Perz S, Wichmann HE, Witteman JC, Kao WH, Kathiresan S, Roden DM, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, McKnight B, Sjögren M, Newman AB, Liu Y, Gollob MH, Melander O, Tanaka T, Stricker BH, Felix SB, Alonso A, Darbar D, Barnard J, Chasman DI, Heckbert SR, Benjamin EJ, Gudnason V, Kääb S. Meta-analysis identifies six new susceptibility loci for atrial fibrillation. *Nat Genet.* 44(6):670-5, 2012.

39. Anderson RG. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem.* 67:199-225, 1998.
40. Zhao YY, Liu Y, Stan RV, Fan L, Gu Y, Dalton N, Chu PH, Peterson K, Ross J Jr, Chien KR. Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(17):11375-80, 2002.
41. Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem.* 273(10):5419-22, 1998.
42. Minshall RD, Sessa WC, Stan RV, Anderson RG, Malik AB. Caveolin regulation of endothelial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 85(6):L1179-83, 2003.
43. Wunderlich C, Schober K, Lange SA, Drab M, Braun-Dullaeus RC, Kasper M, Schwencke C, Schmeisser A, Strasser RH. Disruption of caveolin-1 leads to enhanced nitrosative stress and severe systolic and diastolic heart failure. *Biochem Biophys Res Commun.* 340(2):702-8, 2006.
44. Iravanian S, Sovari AA, Lardin HA, Liu H, Xiao HD, Dolmatova E, Jiao Z, Harris BS, Witham EA, Gourdie RG, Duffy HS, Bernstein KE, Dudley SC Jr. Inhibition of renin-angiotensin system (RAS) reduces ventricular tachycardia risk by altering connexin43. *J Mol Med (Berl).* 89(7):677-87, 2011.
45. Yang KC, Rutledge CA, Mao M, Bakhshi FR, Xie A, Liu H, Bonini MG, Patel HH, Minshall RD, Dudley SC Jr. Caveolin-1 modulates cardiac gap junction homeostasis and arrhythmogenicity by regulating cSrc tyrosine kinase. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 7(4):701-10, 2014.
46. Tavares FM, da Silva IB, Gomes DA, Barreto-Chaves ML. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) is associated with increased tolerance of the hyperthyroid heart to ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther.* 27(5):393-402, 2013
47. Lino CA, da Silva IB, Shibata CE, Monteiro Pde S, Barreto-Chaves ML. Maternal hyperthyroidism increases the susceptibility of rat adult offspring to cardiovascular disorders. *Mol Cell Endocrinol.* 416:1-8, 2015.
48. Sun LN, Liu XC, Chen XJ, Guan GJ, Liu G. Curcumin attenuates high glucose-induced podocyte apoptosis by regulating functional connections between caveolin-1 phosphorylation and ROS. *Acta Pharmacol Sin.* 2016 Feb 1. doi: 10.1038/aps.2015.159. [Epub ahead of print]

49. Schubert AL, Schubert W, Spray DC, Lisanti MP. Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry*. 41(18):5754-64, 2002.
50. Zhang Y, Dedkov EI, Teplitsky D, Weltman NY, Pol CJ, Rajagopalan V, Lee B, Gerdes AM. Both hypothyroidism and hyperthyroidism increase atrial fibrillation inducibility in rats. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 6(5):952-9, 2013.
51. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Kay GN, Le Huezey JY, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann LS, Smith SC, Jr, Priori SG, Estes NA, 3rd, Ezekowitz MD, Jackman WM, January CT, Page RL, Slotwiner DJ, Stevenson WG, Tracy CM, Jacobs AK, Anderson JL, Albert N, Buller CE, Creager MA, Ettinger SM, Guyton RA, Hochman JS, Kushner FG, Ohman EM, Tarkington LG, Yancy CW. 2011 ACCF/AHA/HRS focused updates incorporated into the ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation: A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation*. 123:e269–e367, 2011.
52. Catterall WA. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. *J Physiol*. 590:2577-89, 2012.
53. Huges A. Roles and regulation of cardiac sodium channel Nav 1.5: Recent insights from experimental studies. *Cardiovasc Res*. 76:381-9, 2007.
54. León-Ariza HH, Valenzuela-Faccini N, Rojas-Ortega AC, Botero-Rosas DA. Nav1.5 cardiac sodium channels, regulation and clinical implications. *Rev.Fac.Med*. 62(4), 587-92, 2014.
55. Mario D. Connexin43 regulates sodium current; ankyrin-G modulates gap junctions: the intercalated disc exchanger. *Cardiovasc Res*. 93:220-2, 2012.
56. Veeranki S, Givvimani S, Kundu S, Metreveli N, Pushpakumar S, Tyagi SC. Moderate intensity exercise prevents diabetic cardiomyopathy associated contractile dysfunction through restoration of mitochondrial function and connexin 43 levels in db/db mice. *J Mol Cell Cardiol*. S0022-2828(16)30023-2, 2016.
57. Chen XF, Liang D, Han Q, Zhou SF, Zheng MJ, Wang CQ. Changes of HCN4, Cx43 Expression in the Sinoatrial Node of Electric Shock Death. *Fa Yi Xue Za Zhi*. 31(4):266-8, 2015.
58. Gemel J, Levy AE, Simon AR, Bennett KB, Ai X, Akhter S, Beyer EC. Connexin40 abnormalities and atrial fibrillation in the human heart. *J Mol Cell Cardiol*. 76:159-68, 2014.

59. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med.* 344:501–509, 2001.
60. Tang YD, Kuzman JA, Said S, Anderson BE, Wang X, Gerdes AM. Low thyroid function leads to cardiac atrophy with chamber dilatation, impaired myocardial blood flow, loss of arterioles, and severe systolic dysfunction. *Circulation.* 112:3122–3130, 2005.
61. Gerdes AM, Iervasi G. Thyroid replacement therapy and heart failure. *Circulation.* 122:385–393, 2010.
62. Endo R, Bahrudin U, Notsu T, Tanno S, Onohara T, Yamaguchi S, Ikeda N, Surastri B, Nakayama Y, Ninomiya H, Shirayoshi Y, Inagaki Y, Yamamoto K, Yoshida A, Hisatome I. Carvedilol Suppresses Apoptosis and Ion Channel Remodelling of HL-1 Cardiac Myocytes Expressing E334K cMyBPC. *Drug Res (Stuttg).* 2015 Oct 19. [Epub ahead of print]
63. Chen YC, Chen SA, Chen YJ, Chang MS, Chan P, Lin CI. Effects of thyroid hormone on the arrhythmogenic activity of pulmonary vein cardiomyocytes. *J Am Coll Cardiol.* 39:366–372, 2002.
64. Wustmann K, Kucera JP, Zanchi A, Burow A, Stuber T, Chappuis B, Diem P, Delacretaz E. Activation of electrical triggers of atrial fibrillation in hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 93:2104–2108, 2008.
65. Chen S, Wang C, Wang X, Xu C, Wu M, Wang P, Tu X, Wang QK. Significant Association Between CAV1 Variant rs3807989 on 7p31 and Atrial Fibrillation in a Chinese Han Population. *J Am Heart Assoc.* 4(5). pii: e001980, 2015.
66. Sarati LI, Martinez CR, Artés N, Arreche N, López-Costa JJ, Balaszczuk AM, Fellet AL. Hypothyroidism: age-related influence on cardiovascular nitric oxide system in rats. *Metabolism.* 61(9):1301-11, 2012.
67. Engels K, Rakov H, Zwanziger D, Moeller LC, Homuth G, Köhrle J, Brix K, Führer D. Differences in Mouse Hepatic Thyroid Hormone Transporter Expression with Age and Hyperthyroidism. *Eur Thyroid J.* 4(Suppl 1):81-6, 2015.
68. Mao M, Varadarajan S, Fukai T, Bakhshi FR, Chernaya O, Dudley SC Jr, Minshall RD, Bonini MG. Nitroglycerin tolerance in caveolin-1 deficient mice. *PLoS One.* 9(8):e104101, 2014.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Experimental design of study. The figure represents 6 different experimental groups.

Figure 2: Cardiac hypertrophy determined by the ratio of heart weight to tibia length and expressed as mg/mm. [$*p<0.05$ from control group (10w) and $\#p<0.05$ from control group (26w)].

Figure 3: Representative Western blots of the cardiac atria protein lysates from control and treated mice 10 and 26 weeks old (5 and 20x of physiological dose of T_3). Western blot analysis of 4-HNE (A), Cav-1 (B) and Cx43 (C), * represents $p<0.05$ from control group (10 weeks old mice).

Figure 4: Confocal images of 4-HNE and anti-3-nitrotyrosine (YNO2) in atria of mice 10 weeks old, treated with T_3 (5 and 20x) for 14 days (bar 10 μ m) (A and B), mice 26weeks old, treated with T_3 (5 and 20x) for 14 days (bar 10 μ m) (C and D). Blue label corresponds to DAPI (nucleus). *vs. Control (10w) $p<0.05$ and $\#$ vs. T_3 5x (10w) $p<0.05$.

Figure 5: Confocal images of Cav-1 and Cx43 in atria of mice 10 weeks old, treated with T_3 (5 and 20x) for 14 days (bar 10 μ m) (A and B), mice 26weeks old, treated with T_3 (5 and 20x) for 14 days (bar 10 μ m) (C and D). Blue label corresponds to DAPI (nucleus). *vs. Control (10w) $p<0.05$ and $\#$ vs. T_3 5x (10w) $p<0.05$.

Figure 6: Confocal images of Nav1.5 and Cx40 in atria of mice 10 weeks old, treated with T_3 (5 and 20x) for 14 days (bar 10 μ m) (A and B), mice 26weeks old, treated with T_3 (5 and 20x) for 14 days (bar 10 μ m) (C and D). Blue label corresponds to DAPI (nucleus). *vs. Control (10w) $p<0.05$ and $\#$ vs. T_3 5x (10w) $p<0.05$.

Figure 7: Confocal images of Cav-1 (A and B), Cx43 (A and B), Nav1.5 (C and D) and Cx40 (C and D) in atria of wild-type and Cav-1^{-/-} knockout mice 10 weeks old. Blue label corresponds to DAPI (nucleus). *vs. Wild-type (WT) $p < 0.05$.

Figure 1.

Figure 2.

Figure 3.**A** **B** **C**

Figure 4.**A** **B**

C

D

Figura 5**A** **B**

C

D

Figure 6**A** **B**

C

D

Figure 7**A** **B**

C

D