ANA PAULA CREMASCO TAKANO

**FATORES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO NA
HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA PELO HORMÔNIO
TIROIDEANO. CONTRIBUIÇÃO 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

Ana Paula Cremasco Takano

**Fatores relacionados à inflamação na hipertrofia cardíaca
induzida pelo hormônio tiroideano. Contribuição 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: Profa. Dra. Maria Luiza Morais Barreto
de Chaves.

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

Takano, Ana Paula Cremasco.

Fatores relacionados à inflamação na hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tiroideano: contribuição do sistema renina-angiotensina / Ana Paula Cremasco Takano. -- 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: Inflammation-related aspects in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone: contribution of the renin-angiotensin system.

1. Hormônio tiroideano 2. Hipertrofia cardíaca 3. Sistema renina-angiotensina 4. Cardiomiócito 5. Inflamação 6. NF- κ B 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/SBIB010/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ana Paula Cremasco Takano.

Título da Tese: Fatores relacionados à inflamação na hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tiroideano: contribuição 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 **030** nas fls. **126** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Maria Luiza Morais Barreto de Chaves**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel do sistema renina- angiotensina na hipertrofia cardíaca e/ou renal induzida pelos hormônios tiroideanos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Ana Paula Cremasco Takano**, 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 **04.06.2012**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 05 de junho de 2012.

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

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

A todos os professores e professoras que tive,
por terem contribuído a cada etapa ao longo da minha trajetória
até esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Reginaldo e Solange, pela motivação e apoio para que eu conquiste minhas realizações pessoais e profissionais.

Ao meu grande amor Alexandre, cujo companheirismo, força e amor foram e são fundamentais para todos os meus dias. Estando longe ou perto, sempre me apoiou para que este grande momento se tornasse possível.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Morais Barreto de Chaves, por mais uma vez apoiar e confiar em meu trabalho. Seu incentivo e cumplicidade foram cruciais para a realização deste trabalho. Além disso, agradeço por todos os momentos, sejam eles de ensinamentos, discussões ou conselhos, os quais foram de grande importância para minha formação profissional e pessoal.

Aos queridos colegas do laboratório que estavam no início do meu doutoramento Cristina Fürstenau, Felix Tavares, Priscilla Monteiro, Vanessa Lima e Luiz Bozi; e também aos atuais colegas Ana Paula Taniguti, Caroline Lino, Ivson da Silva, Nathalia Senger, Elaine Castilho, Camila Rodrigues e Denicio Sousa. Obrigada pela colaboração de todos e entre todos na realização dos experimentos, além da amizade e companheirismo, fundamentais para a convivência agradável no laboratório e em momentos de descontração fora do laboratório.

À técnica do laboratório Marina Fevereiro, pela supervisão e ajuda durante nosso trabalho na bancada, pela administração das compras para o laboratório, e claro, pela alegria que traz ao nosso dia-a-dia.

Ao Prof. Anselmo Sigari Moriscot, que contribuiu diretamente com os dados iniciais os quais permitiram a idealização deste trabalho.

À Prof. Dra. Gabriela P. Diniz, a qual tenho muita admiração por sua competência e dedicação à pesquisa. Agradeço principalmente pelo seu apoio fundamental nos meus primeiros anos no laboratório.

Aos professores Fabiano Pinheiro da Silva, Alexandre da Costa Pereira e Carolina D. Munhoz, pela participação em meu exame de qualificação e pelas valiosas sugestões. Agradeço em especial à Carol, que após a qualificação acabou contribuindo com a realização dos experimentos de gene repórter.

À Prof. Dr^a. Marcela Sorelli Carneiro-Ramos, pelo apoio e sugestões que contribuíram para a realização deste trabalho.

À técnica Meire Hiyane e ao Prof. Dr. Niels O. S. Câmara do Departamento de Imunologia do ICB, por contribuírem com a realização e discussão dos resultados de Bioplex.

Aos funcionários, professores e pós-graduandos do Departamento de Anatomia e também de outros departamentos do ICB, pelo convívio e momentos compartilhados ao longo dos anos de pós-graduação.

Aos funcionários do Biotério do Instituto Butantan e do Biotério Central do ICB que nos forneceram os neonatos de ratos, necessários para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Sudhiranjan Gupta da Universidade Texas A & M, pela oportunidade da realização do estágio no exterior e pela contribuição para a obtenção de resultados complementares a este trabalho.

À Candice M. Thomas, Giusepina Dusio e a todos os colegas de departamento da Universidade Texas A & M, pela imensa ajuda na execução de experimentos, pelo companheirismo e por fazerem parte desta experiência ímpar vivida durante o período no exterior.

Aos funcionários da Biblioteca do ICB que contribuíram na revisão textual e no suporte com relação às diretrizes para elaboração desta tese.

A todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

Às instituições de fomento, especialmente à FAPESP, que concederam auxílio financeiro para a realização deste trabalho e outros projetos desenvolvidos ao longo do período de doutoramento.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

TAKANO, A. P. C. **Fatores relacionados à inflamação na hipertrofia cardíaca induzida pelo hormônio tiroideano. Contribuição do sistema renina-angiotensina.** 2016. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Recentes trabalhos evidenciam a participação de mecanismos de resposta inflamatória no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e outras consequências no sistema cardiovascular. Resultados prévios ainda não publicados demonstraram um aumento de genes relacionados ao processo inflamatório em corações de ratos tratados com hormônios tiroideanos (HT). Além disso, sabe-se o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) induz uma resposta inflamatória no sistema cardiovascular, bem como participa do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelos elevados níveis de HT. Baseado nestas evidências, o presente estudo avaliou aspectos relacionados ao contexto inflamatório na hipertrofia cardíaca induzida pelos HT e o possível envolvimento do SRA nesse processo, utilizando análises *in vivo* e *in vitro*. Os dados obtidos mostraram algumas alterações nos níveis de citocinas circulantes e cardíacas de animais tratados com HT. A expressão de calgranulina A (ou também conhecida como S100A8) e do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) apresentaram-se bem elevados no tecido cardíaco de animais submetidos ao hipertiroidismo, bem como em cardiomiócitos em cultura estimulados com HT. A participação destas moléculas na hipertrofia dos cardiomiócitos em resposta aos HT foi também evidenciada. Ainda, S100A8 e MyD88 atuam como cruciais mediadores da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), o qual também apresenta um papel fundamental no crescimento hipertrófico de cardiomiócitos tratados com HT. Por fim, a ação dos HT modulando a expressão de S100A8 e NF- κ B está sob influência do SRA ou, mais especificamente, da participação do receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) mediando os efeitos provocados pelos HT. Estes dados contribuem com o entendimento das bases moleculares da ação dos HT no tecido cardíaco, bem como da relação deste com o SRA, considerando a importante influência da interação destes sistemas endócrinos no desenvolvimento de uma série de alterações na fisiopatologia cardiovascular.

Palavras-chave: Hormônio tiroideano. Hipertrofia cardíaca. Cardiomiócito. Sistema renina-angiotensina. Inflamação. NF- κ B.

ABSTRACT

TAKANO, A. P. C. **Inflammation-related aspects in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone. Contribution of the renin-angiotensin system.** 2016. 104 p. Ph. D. thesis (Morphological Sciences) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Recent studies have evidenced the involvement of inflammatory related mechanisms to the development of cardiac hypertrophy and other consequences on cardiovascular system. Previous unpublished results demonstrated increased pro-inflammatory genes in heart of rats treated with thyroid hormone (TH). In addition, it is well known that the renin-angiotensin system (RAS) induce inflammatory response on cardiovascular system and mediate the cardiac hypertrophy induced by high levels of TH. Based on those evidences, the present study evaluated some aspects related to the inflammatory context in the cardiac hypertrophy induced by TH, and the possible involvement of RAS in this process, by using *in vivo* and *in vitro* analysis. The data showed some alterations in circulating and cardiac cytokines from TH-treated animals. The expression of calgranulin A (or also known as S100A8) and the myeloid differentiation factor-88 (MyD88) were increased in cardiac tissue of hyperthyroid animals and in cultured cardiomyocytes under T3 stimulation. The contribution of those molecules in the cardiomyocyte hypertrophy in response to TH was also demonstrated. Furthermore, S100A8 and MyD88 were crucial mediators of nuclear factor kappa B (NF- κ B) activation, which is also fundamental to the hypertrophic growth of TH-treated cardiomyocytes. Finally, the TH action modulating the expression of S100A8 and NF- κ B was influenced by RAS, or specifically, by the contribution of angiotensin type 1 receptor (AT1) mediating the TH effects. These data contribute to the knowledge of molecular basis of TH action on cardiac tissue, as well as the crosstalk between TH and RAS, considering the important influence of both endocrine systems to the development of many alterations in the cardiovascular physiopathology.

Keywords: Thyroid hormone. Cardiac hypertrophy. Cardiomyocyte. Renin-angiotensin system. Inflammation. NF- κ B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise do perfil global de genes expressos no coração de ratos submetidos a diferentes tempos de tratamento com T3.....	28
Figura 2 - Expressão de calgranulinas A e B em ratos tratados com T3 (20x a dose fisiológica) por 12 e 24 horas ou 7 dias.....	29
Figura 3 - Esquema com possíveis vias de sinalização ativadas por S100A8/S100A9.....	31
Figura 4 - Evolução da massa corpórea (g) dos animais dos grupos controle e hipertiroideo (Hiper) ao longo do tratamento.....	45
Figura 5 - Avaliação da hipertrofia cardíaca em resposta ao hipertiroidismo experimental.....	46
Figura 6 - Avaliação de parâmetros hemodinâmicos.....	48
Figura 7 - Expressão de RNAm de S100A8 ou calgranulina A e S100A9 ou calgranulina B no tecido cardíaco.....	51
Figura 8 - Expressão proteica de S100A8 e S100A9 (calgranulina A e calgranulina B, respectivamente) no tecido cardíaco.....	52
Figura 9 - Análise da via de sinalização ativada por S100A8/ S100A9 no tecido cardíaco.....	53
Figura 10 - Curva tempo-resposta de T3 na expressão de RNAm de IL-1 β e TNF- α em cardiomiócitos em cultura.....	55
Figura 11 - Curva tempo-resposta de T3 na expressão de RNAm de S100A8 e S100A9 (calgranulinas A e B, respectivamente) em cardiomiócitos em cultura.....	56
Figura 12 - Efeito do T3 nos níveis proteicos de S100A8 em cardiomiócitos e no sobrenadante celular.....	56
Figura 13 - Padronização do silenciamento de S100A8 (calgranulina A) por RNA de interferência.....	58
Figura 14 - Prevenção da hipertrofia dos cardiomiócitos tratados com T3, após silenciamento de S100A8.....	59
Figura 15 - Efeito do T3 na expressão proteica de TLR4, MyD88 e I κ B em cardiomiócitos em cultura.....	60
Figura 16 - Efeito do T3 na ativação de NF- κ B em cardiomiócitos em cultura.....	62
Figura 17 - Padronização do silenciamento de MyD88 por RNA de interferência...	63

Figura 18 - Avaliação da participação de MyD88 na hipertrofia dos cardiomiócitos, resultante do tratamento com T3.....	64
Figura 19 - Prevenção da hipertrofia dos cardiomiócitos tratados com T3, após inibição do NF- κ B.....	66
Figura 20 - Ativação de NF- κ B pelo T3 é mediada por S100A8 e MyD88.....	67
Figura 21 - O aumento da expressão de S100A8 e S100A9 pelo T3 é mediado pelo receptor AT1 em cardiomiócitos.....	68
Figura 22 - Expressão de MyD88 após tratamento com T3 e/ou losartan em cardiomiócitos.....	69
Figura 23 - A ativação de NF- κ B pelo T3 é mediada pelo receptor AT1 em cardiomiócitos.....	70
Figura 24 - Modelo proposto para ilustrar a participação do eixo S100A8/ TLR4/ MyD88/ NF- κ B na hipertrofia cardiomiocítica induzida pelos HT.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos diferentes <i>primers</i> utilizados nos experimentos de PCR em Tempo Real.....	40
Tabela 2 - Lista de anticorpos primários utilizados para a análise de expressão proteica nos experimentos de Western Blot.....	44
Tabela 3 - Níveis séricos de T3 e T4 total.....	46
Tabela 4 - Análise da massa muscular cardíaca nos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD).....	47
Tabela 5 - Perfil de citocinas dosadas no soro dos grupos experimentais.....	49
Tabela 6 - Perfil de citocinas dosadas no tecido cardíaco dos grupos experimentais.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANF: fator natriurético atrial

Ang II: angiotensina II

AT1: receptor de angiotensina II do tipo 1

AT2: receptor de angiotensina II do tipo 2

BNP: peptídeo natriurético cerebral

cDNA: DNA complementar

Ct: do inglês *cycle threshold*

DAMP: padrões moleculares associados a danos

DMEM: meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco

DNA: ácido desoxirribonucleico

FC: frequência cardíaca

GAPDH: gliceraldeído-fosfato-desidrogenase

GRO-KC: oncogene relacionado a crescimento- quimiocina

HS: soro de cavalo

HT: hormônios tiroideanos

IFN γ : interferon gama

I κ B: proteína inibitória do NF- κ B

IKK: quinase da I κ B

IL-10: interleucina 10

IL-1 α : interleucina 1 alfa

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-5: interleucina 5

IL-6: interleucina 6

IRAK: quinase associada ao receptor de IL-1

LPS: lipopolissacarídeo

MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos

M-CSF: fator estimulador de colônias de monócitos

MIP-3a: proteína inflamatória de macrófago 3a

MyD88: fator de diferenciação mielóide 88

NCS: soro de bezerro neonato

NF- κ B: fator nuclear kappa B

PAS: pressão arterial sistólica

PBS: tampão fosfato salino

PCR: reação em cadeia da polimerase

PKC: proteína quinase C

RAGE: receptor para produtos de glicação avançada

RANTES: quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais

RNA: ácido ribonucleico

RNAi: RNA de interferência

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

S100A8: calgranulina A

S100A9: calgranulina B

SERCA: cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático

SRA: sistema renina-angiotensina

T3: triiodotironina

T4: tiroxina

TFG- β 1: fator de transformação de crescimento-beta 1

TLR4: receptor *toll-like* 4

TNF- α : fator de necrose tumoral α

VD: ventrículo direito

VE: ventrículo esquerdo

α -MHC: miosina de cadeia pesada do tipo alfa

β -MHC: miosina de cadeia pesada do tipo beta

LISTA DE SÍMBOLOS

Bases nitrogenadas dos nucleotídeos

Adenina.....	A
Citosina.....	C
Guanina.....	G
Timina.....	T

Aminoácidos

Serina.....	Ser
-------------	-----

Símbolos

Alfa.....	α
Beta.....	β
Kappa.....	κ
Gama.....	γ

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Hipertrofia cardíaca	21
2.2 Hormônios tiroideanos e hipertrofia cardíaca	23
2.3 Sistema Renina-Angiotensina e Hormônios tiroideanos	25
2.4 Mecanismos associados à resposta inflamatória no coração: Calgranulinas e via de sinalização do fator NF- κ B	28
3 OBJETIVOS	33
3.1 Objetivo geral	33
3.2 Objetivos específicos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Protocolo experimental <i>in vivo</i>	34
4.1.1 Animais	34
4.1.2 Grupos experimentais	34
4.1.3 Dosagem sérica dos hormônios tiroideanos	35
4.1.4 Determinação do trofismo cardíaco	35
4.1.5 Avaliação de parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC)	35
4.1.6 Medida dos níveis de citocinas inflamatórias	35
4.2 Protocolo experimental <i>in vitro</i>	36
4.2.1 Culturas primárias de cardiomiócitos	36
4.2.2 Tratamento das células	37
4.2.3 Transfecção das células com RNA de interferência (RNAi)	37
4.2.4 Avaliação da hipertrofia de cardiomiócitos	39
4.3 Análise da expressão de RNAm: Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real	39
4.4 Ensaio de incorporação de leucina triciada	40
4.5 Medida da área de superfície celular	41
4.6 Ensaio de gene repórter de NF- κ B através da determinação da atividade da luciferase	41
4.7 Dosagem de S100A8 (Calgranulina A) por ELISA	42
4.8 Análise da expressão proteica – Western Blot	42

4.9 Análise dos resultados	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Resultados <i>in vivo</i>	45
5.1.1 Validação do modelo experimental <i>in vivo</i>	45
5.1.2 Análise de parâmetros hemodinâmicos	48
5.1.3 Análise do perfil de citocinas inflamatórias	48
5.1.4 Efeitos do T3 na expressão de S100A8 e S100A9 no coração	51
5.1.5 Análise do efeito do T3 em componentes da via de sinalização do NF- κ B no coração	52
5.2 Resultados <i>in vitro</i>	55
5.2.1 Análise do efeito do T3 sobre a expressão de citocinas inflamatórias, S100A8 e S100A9 em cardiomiócitos em cultura	55
5.2.2 Avaliação da participação de S100A8 na hipertrofia do cardiomiócito promovida pelo T3	57
5.2.3 Análise do efeito do T3 em componentes da via de sinalização do NF- κ B <i>in vitro</i>	60
5.2.4 Avaliação da participação de MyD88 na hipertrofia do cardiomiócito promovida pelo T3	63
5.2.5 Avaliação da participação de NF- κ B na hipertrofia do cardiomiócito promovida pelo T3	65
5.2.6 Efeito do silenciamento da calgranulina A e de MyD88 na ativação do fator NF- κ B	66
5.2.7 Participação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), via receptor AT1, mediando as ações do T3 no eixo S100A8/ MyD88/ NF- κ B	68
6 DISCUSSÃO	72
6.1 A respeito dos modelos experimentais utilizados	72
6.2 Perfil de citocinas inflamatórias após tratamento com T3	75
6.3 Influência do T3 na expressão de S100A8 e S100A9	77
6.4 Efeito do T3 na expressão de TLR4 e na via de sinalização do NF- κ B	79
6.5 Participação do SRA mediando os efeitos dos HT	83
7 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Recentes estudos vêm evidenciando que o desenvolvimento e a progressão de grande parte das doenças cardiovasculares é acompanhada pelo acionamento de mecanismos relacionados à resposta inflamatória (BAUMGARTEN et al., 2006; LIN; KNOWLTON, 2014; MANN, 2011; ZHANG et al., 2015). Considerando isso, dados ainda não publicados do nosso grupo indicaram que alguns genes relacionados ao processo inflamatório encontram-se ativados em corações de ratos tratados com hormônios tiroideanos (HT). Os HT agem nos mais diferentes tipos celulares promovendo, de modo geral, ações que levam ao aumento do metabolismo basal. No sistema cardiovascular, elevados níveis de HT exercem profundos efeitos morfológicos e funcionais, os quais culminam com a instalação de um processo de hipertrofia cardíaca, que dependendo de seu grau, pode culminar para um prejuízo funcional e uma situação de insuficiência cardíaca.

A hipertrofia cardíaca, assim como outros efeitos cardiovasculares resultantes da ação dos HT é mediada em parte por outros sistemas endócrinos como o Sistema Nervoso Simpático (através da ação beta-adrenérgica) e o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) (BARRETO-CHAVES et al., 2010; HU et al., 2003). Embora hoje se saiba que o SRA compreende vários novos peptídeos e enzimas, as ações mais descritas até o momento ocorrem principalmente pela Angiotensina II, via receptor do tipo 1 (AT1), sendo esta capaz de gerar em vários tecidos, incluindo o tecido cardíaco, não só efeitos pró-hipertroficantes, mas também pró-inflamatórios. Esta resposta se deve, pelo menos em parte, a mecanismos intracelulares que culminam com a ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear kappa B (NF- κ B) (BHATT; LOKHANDWALA; BANDAY, 2014; BRASIER et al., 2000; HASHIKATA et al., 2015; HE et al., 2015; SUZUKI et al., 2003).

A ativação do NF- κ B apresenta papel crítico na regulação da expressão de grupos de genes envolvidos na resposta inflamatória, na sobrevivência, bem como no crescimento de diferentes tipos celulares, incluindo cardiomiócitos (GORDON; SHAW; KIRSHENBAUM, 2011). Além disso, vários trabalhos já demonstraram o envolvimento do NF- κ B na instalação e no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca resultante de distintos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* (GUPTA et al., 2002; JAVAN et al., 2015; LI et al., 2004; PURCELL et al., 2001; RAJAPUROHITAM et al., 2012; XU et al., 2015; ZELARAYAN et al., 2009).

Baseado nestas evidências, o presente estudo avalia o possível envolvimento deste fator de transcrição relacionado ao contexto inflamatório com a hipertrofia cardíaca (*in vivo*) ou cardiomiocítica (*in vitro*) deflagrada por elevados níveis de HT. Basicamente, o foco do estudo foi avaliar o efeito dos HT na sinalização envolvendo a calgranulina A (ou também conhecida como S100A8), o receptor *Toll-like* tipo 4 (TLR4) e o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), a qual está diretamente relacionada à ativação do fator NF- κ B. O papel desta sinalização na instalação da hipertrofia, bem como o possível envolvimento do SRA, via receptor AT1, neste processo, foi ainda objeto deste estudo.

Uma descrição mais detalhada sobre a hipertrofia cardíaca que se observa em resposta a elevados níveis de HT, sua relação com a ativação do SRA bem como a contribuição da sinalização relacionada ao NF- κ B neste processo encontram-se a seguir.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hipertrofia cardíaca

As doenças cardiovasculares são consideradas a principal causa de morbidade e mortalidade atualmente. Embora o termo doenças cardiovasculares inclua uma variedade de doenças com múltiplas causas, uma resposta comum a algumas destas enfermidades é o remodelamento cardíaco que pode levar à insuficiência do coração. Com relação ao remodelamento, o aumento da massa cardíaca, ou seja, a hipertrofia cardíaca representa um mecanismo eficiente de compensação do coração frente a uma sobrecarga de trabalho. É importante comentar que o aumento da massa cardíaca deve-se basicamente ao aumento da massa ventricular, tendo como finalidade adequar o desempenho cardíaco às demandas metabólicas sistêmicas. Inicialmente o crescimento do coração ocorre de forma adaptativa, compensada, porém a manutenção do estímulo hipertrófico faz com que a hipertrofia cardíaca passe a ser considerada um importante fator de risco para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca, como observado em modelos experimentais, bem como em pacientes (LEVY et al., 1990; PACHER et al., 2008; SCHAEFER et al., 2003; YU et al., 2007).

A nível celular, o coração é composto pelas células musculares cardíacas ou cardiomiócitos, que embora correspondam em humanos e em ratos a um terço do número total de células ventriculares, constituem cerca de 70 a 80% da massa cardíaca (BANERJEE et al., 2007; POPESCU et al., 2006; VLIAGEN et al., 1991). Além dos cardiomiócitos, outros tipos celulares estão presentes no tecido cardíaco como fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas, além de matriz celular ao redor de todas as células (NAG, 1980). Embora ainda controverso, a incapacidade dos cardiomiócitos se dividirem (ANVERSA; KAJSTURA; OLIVETTI, 1996; GERDES, 1992) faz com que a hipertrofia cardíaca resulte basicamente do aumento do tamanho destas células e/ou divisão das demais.

O crescimento dos cardiomiócitos ocorre como resultado da ativação de diferentes sinalizações intracelulares e mudanças no padrão de expressão de inúmeros genes, incluindo a reativação de genes expressos durante o período fetal, os quais são utilizados como marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca. Por conseguinte à alteração do perfil de expressão gênica, ocorre um aumento da

síntese de proteínas estruturais, e uma reorganização de proteínas contráteis dentro da unidade sarcomérica, provocando assim o aumento das dimensões da célula (BOHELER et al., 1992). Em relação à reorganização dos sarcômeros, distinguem-se dois fenótipos de hipertrofia: 1) hipertrofia concêntrica, quando há adição em paralelo de sarcômeros, levando ao maior aumento dos cardiomiócitos em largura do que em comprimento; e 2) hipertrofia excêntrica, caracterizada pela adição de sarcômeros em série, o que resulta no crescimento longitudinal das células, acompanhado da dilatação da cavidade ventricular (DORN; ROBBINS; SUGDEN, 2003; HEINEKE; MOLKENTIN, 2006). Paralelamente ao aumento do volume dos cardiomiócitos, pode também haver um aumento desproporcional da proliferação das células não contráteis, dependendo da intensidade do processo hipertrófico (MCMULLEN; JENNINGS, 2007).

De forma geral, os estímulos que desencadeiam a resposta hipertrófica no cardiomiócito podem ser classificados em estímulos que geram sobrecarga de pressão ou de volume, ou ainda estímulos neuro-humorais, os quais estão associados à liberação de neuro-transmissores, hormônios, citocinas, quimiocinas e pequenos peptídeos. Além disso, a hipertrofia cardíaca pode ser classificada como compensada, ou ainda fisiológica (por alguns autores), quando o aumento da massa muscular cardíaca ocorre de forma adaptativa, sem prejuízo funcional, sendo neste caso reversível após a remoção do estímulo hipertrófico; como ocorre, por exemplo, na prática de exercício físico e durante a gestação (BERNARDO et al., 2010). Em contraste, a hipertrofia pode vir a se tornar descompensada (ou patológica, como intitulada por alguns autores), quando, além do aumento do tamanho do coração, ocorre a perda de cardiomiócitos e consequente prejuízo contrátil, com reposição de tecido fibroso, levando ao enrijecimento do coração e à disfunção deste órgão, o que aumenta o risco de insuficiência cardíaca (ANVERSA; KAJSTURA; OLIVETTI, 1996; SABBAH; SHAROV; GOLDSTEIN, 2000).

Os eventos moleculares deflagrados por vários estímulos que resultam na hipertrofia cardíaca, seja adaptativa ou em transição para a insuficiência do miocárdio, são amplamente estudados e mais complexos do que os supostos inicialmente.

2.2 Hormônios tiroideanos e hipertrofia cardíaca

A glândula tireoide, em resposta à tireotrofina (TSH) produzida por células da adenohipófise, secreta predominantemente o hormônio tiroxina (T4), que posteriormente é convertido em triiodotironina (T3), através da ação de desidases presentes em vários tecidos como músculo esquelético, rim, fígado e coração (BRENT, 1994). A atividade biológica de T3 circulante é no mínimo cinco vezes maior do que T4, sendo assim responsável por uma variedade de processos fisiológicos em todo o organismo (NUNES, 2003).

Os hormônios tiroideanos (HT) exercem uma ampla influência no sistema cardiovascular, tendo o coração como um dos seus principais órgãos-alvo (KAHALY; DILLMANN, 2005; KLEIN; OJAMAA, 2001; MORKIN, 1979). Esta associação foi descrita pela primeira vez há mais de 200 anos, quando foi notada uma correlação entre aumento da glândula tireóide com palpitações e aumento do tamanho do coração (PARRY, 1785 apud MORKIN, 1979). A partir de então, diversos estudos demonstraram com maiores detalhes esta estreita relação entre os níveis de HT e a função cardíaca, uma vez que alterações dos níveis desses hormônios são capazes de aumentar o fator de risco para o desenvolvimento e a progressão de doenças cardiovasculares (CANARIS et al., 2000; PANTOS et al., 2007b; SCHMIDT-OTT; ASCHEIM, 2006; SHIRANI et al., 1993).

Os HT atuam na função contrátil do coração, função eletrofisiológica e estrutura cardíaca. Assim, os principais efeitos relacionados ao hipertireoidismo, ou seja, numa situação em que há elevados níveis circulantes destes hormônios, incluem o aumento da força de contração sistólica e da taxa de relaxamento diastólico, aumento da frequência cardíaca e também o aumento da propensão a arritmias atriais (DAHL; DANZI; KLEIN, 2008; FAZIO et al., 2004). Além disso, os HT estimulam a síntese proteica no tecido cardíaco, o que contribui para o aumento da massa muscular cardíaca ou desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (KENESSEY; OJAMAA, 2006; PANTOS et al., 2008).

A hipertrofia cardíaca resultante dos elevados níveis de HT apresenta características bem peculiares. É caracterizada, a princípio, como uma hipertrofia do tipo concêntrica e de forma geral, muitos trabalhos a consideram como um processo adaptativo (BERNARDO et al., 2010; HU; LIBERTI; BARRETO-CHAVES, 2005; OJAMAA, 2010). No entanto, doses séricas elevadas de HT também podem estar

associadas a arritmias cardíacas, como previamente mencionado (DAHL; DANZI; KLEIN, 2008). Embora nem sempre observado do ponto de vista clínico, níveis de HT elevados e sustentados por longos períodos promovem, além de outros efeitos, a desorganização ultraestrutural das unidades sarcoméricas que formam o tecido cardíaco (FERREIRA et al., 2003), tendo como consequência a disfunção contrátil do miocárdio (ELNAKISH et al., 2015).

Assim, a resposta hipertrófica pode ser decorrente tanto de ações indiretas, uma vez que os HT atuam sobre alguns parâmetros hemodinâmicos (KLEIN, 1990, 2003), por meio dos quais a função e a estrutura cardíaca são alteradas, como diretamente nas células musculares cardíacas, por influenciarem o processo de síntese proteica.

No que se refere às ações diretas dos HT e até onde conhecemos na literatura, estas podem ocorrer de três formas: 1) Através de efeitos mediados pela ligação dos HT a receptores nucleares que interagem com regiões do DNA responsáveis a eles, cujo efeito é então classicamente descrito como ação genômica; 2) Através da ligação de T3 a receptores citosólicos, com consequente rápida ativação de vias de sinalização intracelular; 3) Ou ainda por meio de efeitos que também independem dos receptores nucleares de HT, iniciados pela ligação dessas moléculas a domínios específicos de proteínas (que agem como receptores) na membrana plasmática das células como, por exemplo, ao domínio RGD da integrina $\alpha V\beta 3$ (OJAMAA, 2010). Dentre as sinalizações deflagradas pelos HT, destacam-se a rápida fosforilação e ativação da via da PI3K-AkT-mTOR, que ocorre nos cardiomiócitos, após tratamento com T3 (DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2009; KENESSEY; OJAMAA, 2006; KUZMAN; O'CONNELL; GERDES, 2007) ou ainda a ativação da via MAPK/ERK 1/ 2 (BERGH et al., 2005; PANTOS et al., 2007a) e da via de sinalização da AMPK (TAKANO; DINIZ; BARRETO-CHAVES, 2013). Essas vias de sinalização ativadas após tratamento com HT estão intimamente relacionadas à síntese proteica, ao crescimento e à sobrevivência dos cardiomiócitos, além do processo angiogênico induzido por este hormônio (ANJOS-RAMOS et al., 2006; CHAN et al., 2004; DAVIS et al., 2004; KUZMAN et al., 2005).

Ainda, por meio da ação genômica ou mesmo através da rápida ativação de vias celulares, os HT influenciam, por exemplo, o transporte de cálcio através do aumento dos níveis da enzima cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), além de também alterar a expressão de proteínas miofibrilares, como as miosinas de

cadeia pesada do tipo alfa (α -MHC) e beta (β -MHC) as quais desempenham papel fundamental na contratilidade cardíaca (KAHALY; DILLMANN, 2005). Deste modo, independentemente da ação do HT ter sido iniciada no núcleo, citosol ou na membrana plasmática, todas as formas de atuação deste hormônio acabam por estimular, de alguma forma, o desenvolvimento da hipertrofia do cardiomiócito em resposta aos mecanismos resultantes da ativação de diferentes vias de sinalização intracelular. Com base no exposto, torna-se plausível acreditar que o conhecimento das bases celulares e moleculares envolvidas na resposta hipertrófica do cardiomiócito, bem como em todos os efeitos cardiovasculares exercidos pelos HT, podem ter profundas implicações clínicas.

2.3 Sistema Renina-Angiotensina e Hormônios tiroideanos

O sistema renina-angiotensina (SRA) corresponde a um dos sistemas hormonais mais significantes, no que diz respeito ao seu espectro de ação, e dos mais extensivamente estudados, já que está intimamente relacionado ao controle da pressão arterial (PA), doença que acomete grande parte da população. O início dos relatos a respeito do SRA ocorreu após a descoberta de Tigersted e Bergman, em 1898, de um fator liberado pelos rins, cuja ação mostrou-se capaz de controlar a PA (TERRAGNO, 2001; TIGERSTED; BERGMAN, 1898 apud BASSO). Desde então, os dados a respeito desse sistema se expandiram e evidenciaram um amplo sistema de cascatas enzimáticas, moléculas bioativas e múltiplos receptores, com papel fundamental na regulação de respostas fisiológicas e patológicas no sistema cardiovascular e em todo o organismo (KUMAR et al., 2012).

Embora diferentes peptídeos efetores tenham sido descritos, a Angiotensina II (Ang II) é ainda considerada o principal peptídeo bioativo do SRA (BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014; FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). A nível sistêmico, sucintamente, a Ang II é formada na circulação a partir do angiotensinogênio secretado do fígado, o qual, por ação da enzima renina liberada pelos rins, o converte ao decapeptídeo Angiotensina I (Ang I), que é clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA) localizada em células vasculares endoteliais, originando então o octapeptídeo Ang II. Assim, a Ang II circulante pode atuar de forma endócrina em diferentes tecidos alvos. Já o conceito de SRA local ou tecidual, o qual começou a ser evidenciado na década de 80, indica que os diferentes tecidos

do organismo possuem a capacidade de sintetizar e secretar Ang II no próprio ou próximo ao local de ação, agindo de forma autócrina e parácrina (DZAU, 1988; LYU et al., 2015). Ainda, a mais recente identificação dos receptores em organelas intracelulares demonstra que a síntese e a ação da Ang II podem ser iniciadas intracelularmente, o que representaria uma potencial ação intrácrina deste peptídeo (BAKER; BOOZ; DOSTAL, 1992 ; KUMAR; SINGH; BAKER, 2009).

Independentemente da Ang II agir de forma sistêmica, local ou intracelular, seus efeitos biológicos ocorrem após a sua ligação a dois receptores transmembranares acoplados à proteína G, os receptores de angiotensina do tipo I (AT1) e do tipo II (AT2). Entretanto, embora um número crescente de estudos, inclusive de nosso grupo, venha evidenciando um importante papel do receptor AT2 em diferentes modelos experimentais, a maior parte dos efeitos mediados pela Ang II é atribuída ao receptor AT1, a partir do qual diferentes vias de sinalização intracelular são ativadas (BALAKUMAR; JAGADEESH, 2014).

Neste sentido, muitos estudos vêm demonstrando que elevados níveis de Ang II, após ligação aos receptores AT1, promovem hipertensão, aterosclerose, infarto do miocárdio, hipertrofia e insuficiência cardíaca (GRIENDLING, et al., 1996; HE et al., 2015; MONTECUCCO; PENDE; MACH, 2009; SADOSHIMA; IZUMO, 1993; SATA; FUKUDA, 2010; WOLLERT; DREXLER, 1999). Ainda, a Ang II tem um papel crucial no remodelamento cardíaco, promovendo a hipertrofia de cardiomiócitos, além da proliferação de fibroblastos e acúmulo de colágeno intersticial (LI et al., 2015; RAIZADA et al., 2012).

Paralelamente às ações diretas sobre o remodelamento cardíaco, estudos experimentais demonstram o papel da Ang II como importante mediadora de eventos-chave do processo inflamatório, levando ao aumento da expressão de proteínas pró-inflamatórias e influenciando a permeabilidade vascular, a infiltração de células inflamatórias e o reparo tecidual (SUZUKI et al., 2003). Estes efeitos inflamatórios da Ang II via receptor AT1 são mediados principalmente por dois mecanismos: a geração de espécies reativas de oxigênio e a ativação do fator nuclear kappa B, conhecido como NF- κ B (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI, 2010; BHATT; LOKHANDWALA; BANDAY, 2014; BRASIER, 2010; LAHERA; CACHOFEIRO; DE LAS HERAS, 2011; MACKENZIE, 2011).

Recentes estudos contribuem com inúmeros outros aspectos sobre o SRA, incluindo a descoberta de novos peptídeos e a ação destes e outros componentes

na fisiopatologia cardiovascular. Além disso, destaca-se cada vez mais na literatura a relação do SRA com outros sistemas hormonais como, por exemplo, a ação da Ang II mediando efeitos deflagrados pela insulina (MUSCOGIURI et al., 2008) ou também pelos hormônios tiroideanos (BARRETO-CHAVES et al., 2010).

Neste sentido, sabe-se que no hipertireoidismo há um aumento da síntese e secreção de angiotensinogênio (BOUHNİK et al., 1981), aumento da atividade de renina plasmática (BASSET et al., 2001), os quais resultam em produção de Ang II plasmática e cardíaca (CARNEIRO-RAMOS et al., 2010; MARCHANT; BROWN; SERNIA, 1993) podendo assim contribuir para a hipertrofia cardíaca e efeitos hemodinâmicos observados nesta condição experimental. Adicionalmente, há um aumento da expressão de receptores AT1 e AT2 no coração de ratos induzidos ao hipertireoidismo e em cardiomiócitos em cultura estimulados com T3 (CARNEIRO-RAMOS et al., 2010; DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2009).

Ainda neste contexto, a utilização de antagonistas dos receptores AT1 e AT2, bem como o uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina, é capaz de atenuar o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelos HT (BASSET et al., 2001; CARNEIRO-RAMOS et al., 2010; DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2009; DINIZ et al., 2013; HU et al., 2003), o que permite concluir que, além dos efeitos hipertróficos diretos dos HT sobre a célula cardíaca, os quais foram já discutidos anteriormente, a hipertrofia também ocorre como consequência à ativação do SRA cardíaco.

Vale ressaltar que, além do papel do SRA na hipertrofia cardíaca deflagrada pelo hipertireoidismo, este sistema foi ainda verificado como um importante mediador do aumento da expressão do fator de transformação de crescimento-beta 1 (TGF- β 1) no coração de ratos tratados com HT (DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2007). Este fator, além de exercer um importante papel no remodelamento cardíaco, está diretamente envolvido com o processo inflamatório, sugerindo que a hipertrofia cardíaca induzida pelos HT possa ter alguma relação com a ativação de vias ligadas à inflamação e estas venham assim a contribuir com o próprio processo hipertrófico.

Estes dados demonstram a importante conversa entre estes dois sistemas hormonais, evidenciando que o SRA possa atuar como crucial mediador das ações fisiopatológicas bem como de mecanismos celulares e moleculares desencadeados pelos HT.

2.4 Mecanismos associados à resposta inflamatória no coração: Calgranulinas e via de sinalização do fator NF- κ B

Muitos dos efeitos que os HT exercem no tecido cardíaco, do ponto de vista estrutural e funcional, são bem estabelecidos. No entanto, os mecanismos e bases moleculares envolvidos nestes processos ainda precisam ser mais e melhor explorados, uma vez que os trabalhos da literatura a respeito deste tema são ainda escassos.

Assim, com intuito de buscar pistas que nos ajudassem a aprofundar o conhecimento dos mecanismos moleculares dos HT no tecido cardíaco, foi realizada, por *microarray*, uma análise do perfil global de genes expressos no coração de ratos submetidos a diferentes tempos de tratamento com T3. Os dados mostraram que uma gama de genes relacionados ao metabolismo, à modulação de vias de sinalização intracelular e ao processo inflamatório encontra-se aumentada frente à estimulação com T3 (Figura 1).

Figura 1 - Análise do perfil global de genes expressos no coração de ratos submetidos a diferentes tempos de tratamento com T3. Representação das principais categorias de genes ativados em corações de ratos adultos tratados com T3 (20x a dose fisiológica) por 12 e 24 horas ou 7 dias, baseada na análise por *microarray*. Dados descritos em estudo ainda não publicado (em colaboração com Moriscot, AS).

O número de genes relacionados à inflamação e que foram ativados no coração após tratamento com T3 nos chamou a atenção para um possível envolvimento de vias ligadas à inflamação com o processo hipertrófico deflagrado

pelo hormônio, a exemplo do que é observado em outros modelos experimentais de hipertrofia cardíaca, como aqueles deflagrados por sobrecarga de pressão (EHRENTAUT et al., 2015; HA et al., 2006; MIGUEL-CARRASCO et al., 2010). Além disso, considerando a importante ação inflamatória da Ang II e a ação que os HT apresentam sobre a ativação do SRA cardíaco, já mencionada anteriormente, seria plausível esperar que também na hipertrofia observada no hipertireoidismo houvesse importante contribuição de vias inflamatórias, justificando a melhor investigação destes achados.

Ainda com relação aos dados obtidos após os experimentos de *microarray*, a análise do perfil de expressão dos genes inflamatórios que se encontram aumentados no tecido cardíaco após tratamento com T3 mostra aumento notável da expressão de calgranulina A (ou também conhecida como S100A8) e calgranulina B (também descrita como S100A9), cujos níveis de RNAm também se mostraram aumentados após validação por PCR (Figura 2).

Figura 2 - Expressão de calgranulinas A e B em ratos tratados com T3 (20x a dose fisiológica) por 12 e 24 horas ou 7 dias. Níveis de RNAm de calgranulina A (A) e calgranulina B (B) determinados por análise de *microarray* (linha tracejada) ou por PCR (linha contínua). * $p < 0,05$ vs. 0h (n=3). Dados descritos em estudo ainda não publicado (em colaboração com Moriscot, AS).

Estas duas calgranulinas S100A8 e S100A9, membros da família S100 de proteínas de ligação ao cálcio, são apontadas como moléculas primariamente envolvidas na homeostase celular e que podem também agir como “sinalizadoras” de danos celulares, sendo que nessas condições são liberadas para o meio

extracelular (EHRCHEN et al., 2009). Ambas S100A8 e S100A9 são predominantemente expressas em granulócitos e monócitos, mas também podem ser encontradas em tipos celulares não mielóides, como em células do sistema cardiovascular incluindo células endoteliais vasculares e cardiomiócitos (BOYD et al., 2008; VOLZ et al., 2012; WU et al., 2014; YEN et al., 1997). Estas calgranulinas foram identificadas como marcadores bioquímicos de inflamação aguda e crônica, especialmente em artrite reumatóide e doença inflamatória do intestino (FOELL et al., 2004). No entanto, outro estudo sugeriu que o aumento dos níveis plasmáticos de S100A8 e S100A9 em indivíduos saudáveis poderia estar associado a um maior risco de futuros eventos cardiovasculares (HEALY et al., 2006). Neste sentido, já foi descrito o aumento destas calgranulinas, por exemplo, na síndrome coronariana aguda, aterosclerose e disfunção cardíaca associada à sepse (BOYD et al., 2008; KATASHIMA et al., 2010; MCCORMICK et al., 2005).

Algumas funções intracelulares dessas proteínas S100A8 e S100A9 já se encontram descritas, principalmente em células mielóides (DONATO, 2001). Além disso, estas calgranulinas podem ser consideradas como moléculas endógenas DAMP (padrões moleculares associados a danos), cuja liberação para o meio extracelular pode resultar em ativação dos receptores *Toll-like 4* (TLR4) e receptores para produtos de glicação avançada (RAGE), os quais iniciam a transdução de sinalizações que modulam processos inflamatórios, em resposta à injúria sofrida pela célula (AVERILL; KERKHOFF; BORNFELDT, 2012; IONITA et al., 2010; VOLZ et al., 2012).

Já bem descrito na literatura, o TLR4 interage com moléculas adaptadoras, como por exemplo, o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), o qual transmite o sinal a outras proteínas intracelulares e levam então à ativação do fator nuclear NF- κ B (EHRCHEN et al., 2009).

O NF- κ B consiste em uma família de fatores de transcrição que, ao se ligarem ao DNA, regulam a expressão de genes principalmente envolvidos na resposta imune inata, inflamação, sobrevivência celular e proliferação (BALDWIN, 2001). São cinco subunidades, as quais incluem p65 (ou também conhecida como RelA), RelB, c-Rel, p50 e p52, que formam combinações como homo e heterodímeros, para se ligarem ao DNA. De forma geral, muitos trabalhos da literatura nomeiam como NF- κ B o heterodímero p50-p65, por ser o complexo mais abundante desta família, e também predominante no coração (GORDON; SHAW; KIRSHENBAUM, 2011). Além

disso, a proteína p65 é amplamente estudada por conter um domínio de transativação, necessário para iniciar a atividade transcricional do NF- κ B (O'SHEA; PERKINS, 2008).

Classicamente, o NF- κ B (p50-p65) está presente de forma inativa no citoplasma, formando um complexo com a proteína inibitória I κ B. Após estimulação, a quinase do I κ B (IKK) é ativada por fosforilação e em seguida fosforila e permite a subsequente degradação de I κ B, o que resulta na liberação do NF- κ B que transloca para o núcleo onde regula a expressão de vários genes alvos (GHOSH; BALTIMORE, 1990; GUPTA et al., 2002). Assim como os TLR4, os receptores RAGE também participam da ativação da via clássica do NF- κ B (BIERHAUS et al., 2005). A Figura 3 mostra um esquema simplificado desta sinalização.

Figura 3 - Esquema com possíveis vias de sinalização ativadas por S100A8/S100A9. À esquerda, destaque para as proteínas classicamente relacionadas à translocação nuclear e ativação de NF- κ B (p50/p65), como descrito previamente. Adaptado de Ehrchen et al., 2009.

Desta forma, esta conversa entre S100A8/S100A9, TLR4 e/ou RAGE e via de sinalização do NF- κ B pode ser um mecanismo de defesa existente no cardiomiócito,

capaz de modular a maquinaria contrátil desta célula, intimamente relacionada ao estado trófico do tecido cardíaco. Esta premissa baseia-se em evidências da literatura mostrando que cardiomiócitos apresentam propriedades intrínsecas as quais conferem a estas células a capacidade de responder a sinais de “perigo”, ativando respostas inflamatórias e funcionais muito similares às respostas do sistema imune inato (DAVANI et al., 2004; MEHRA; RAMGOLAM; BENDER, 2005).

Neste sentido, resultados obtidos em ratos hipertensos (SHR) mostraram uma correlação direta entre a hipertrofia cardíaca e a ativação de vias pró-inflamatórias, sugerindo que a inflamação possa ser um evento importante e antecipatório de outros mecanismos que irão deflagrar o aumento da célula muscular cardíaca (MIGUEL-CARRASCO et al., 2010; SAVOIA; SCHIFFRIN, 2006). E por fim, trabalhos já demonstraram o envolvimento de outros membros da família S100 (MOST et al., 2007; TSOPORIS et al., 1997, 2005), bem como de S100A8/ S100A9 (WEI et al., 2015; WU et al., 2014), e também do NF- κ B (GUPTA et al., 2002; JAVAN et al., 2015; LI et al., 2004) na hipertrofia cardíaca resultante de distintos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

Assim, com base nos resultados de *microarray* e nos dados apontados na literatura, uma questão importante permanece indefinida, ou seja, a existência ou não da contribuição de mecanismos relacionados ao processo inflamatório, com atenção especial às calgranulinas (S100A8 e S100A9) além da via de sinalização do NF- κ B, no processo de hipertrofia cardíaca deflagrado por elevados níveis de HT. Adicionalmente, as ações pró-inflamatórias e pró-hipertróficas desencadeadas pela Ang II, assim como o fato de haver ativação do SRA no modelo de hipertiroidismo, também nos induziu à suposição do envolvimento deste sistema, mediando não só o processo hipertrófico, mas ainda um possível efeito no contexto inflamatório desencadeado pelo HT.

A contribuição deste trabalho visa, de forma geral, ampliar o conhecimento a respeito dos fatores moleculares que podem influenciar a função cardiovascular, podendo estes representar potenciais subsídios que auxiliem na busca de estratégias terapêuticas para o controle da progressão de doenças cardiovasculares.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Determinar se fatores relacionados ao processo inflamatório são acionados pelos HT e se são determinantes para o estabelecimento da hipertrofia dos cardiomiócitos. Ainda, a possível contribuição do SRA neste processo.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de citocinas inflamatórias após tratamento com HT *in vivo* e *in vitro*.
- Avaliar o envolvimento das calgranulinas A e/ ou B, relacionadas à resposta inflamatória, na hipertrofia do cardiomiócito induzida pelos HT.
- Investigar a ação dos HT em via de sinalização relacionada à inflamação: possível ativação de TLR4 e/ ou RAGE e da via clássica do fator NF- κ B, bem como a contribuição desta sinalização para a hipertrofia do cardiomiócito em resposta aos HT.
- Verificar a possível participação do SRA, via receptor AT1, nas ações desencadeadas pelos HT, ou seja, ações sobre a expressão das calgranulinas e sobre a via de sinalização relacionada à inflamação, abordada neste estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Protocolo experimental *in vivo*

4.1.1 Animais

Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - protocolo n. 030/fls.126/ I.2) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Neste estudo foram utilizados ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, pesando em torno de 250 ± 20 g, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP) e mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia (ICB-USP). Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas e mantidos em sala climatizada com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12 horas.

4.1.2 Grupos experimentais

Os ratos foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos experimentais:

- **Controle:** ratos sem tratamento, os quais receberam injeções diárias de solução veículo por 14 dias.
- **Hipertiroideo:** os ratos foram induzidos ao hipertiroidismo ao longo de 14 dias, através de duas injeções intraperitoneais diárias de T3 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha), totalizando a dose de 7 µg/ 100 g de peso corpóreo/ dia, o correspondente a 20 vezes a dose fisiológica (BIANCO; SILVA, 1987; TROST et al., 2000).

O T3 foi solubilizado em NaOH 0,34 M e diluído em solução salina 0,09% para tratamento dos ratos. A dose e o tempo de tratamento com T3 utilizados neste estudo foram similares aos utilizados em trabalhos prévios do grupo (CARRILLO-SEPÚLVEDA et al., 2013; TAVARES et al., 2013).

4.1.3 Dosagem sérica dos hormônios tiroideanos

Após o período experimental, os ratos foram decapitados, o sangue foi coletado e submetido à centrifugação por 10 min, 2000 rcf, a 4 °C, para obtenção do soro necessário para as dosagens de T3 e T4. Os níveis destes hormônios foram mensurados através do uso de um kit de radioimunoensaio (Coat-a-Count, Siemens, Los Angeles, CA, EUA). O protocolo de dosagem foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, e a quantificação foi feita em contador gama do Laboratório Multiusuário do Departamento de Anatomia-ICB-USP.

4.1.4 Determinação do trofismo cardíaco

A avaliação do trofismo cardíaco, ou seja, a hipertrofia cardíaca resultante do efetivo tratamento com T3, foi realizada pela análise da razão da massa total do coração pela massa corpórea do rato (mg/ g) e ainda pela razão da massa total do coração pelo comprimento da tíbia (mg/ mm).

4.1.5 Avaliação de parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC)

Através da pletismografia de cauda, os parâmetros de PAS e FC foram mensurados indiretamente antes do início, no sétimo e último dia de tratamento. Um oclisor e um sensor foram ajustados na porção proximal da cauda do rato e acoplados ao pletismógrafo elétrico (PE-300 – Kent Scientific), conectado a um fisiógrafo (MK III-Windaq). Para cada valor de PAS e FC foram feitas as médias de cinco medidas. Vale ressaltar que, duas semanas antes do início do período experimental, os animais passaram por um período de adaptação ao sistema utilizado para a análise destes parâmetros hemodinâmicos.

4.1.6 Medida dos níveis de citocinas inflamatórias

Os níveis de citocinas no soro e em homogenato cardíaco foram medidos e analisados no sistema Bioplex. As amostras de soro utilizadas foram coletadas como previamente descrito no item 4.1.3, enquanto que as amostras cardíacas foram obtidas com o uso de tampão contendo 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,1% SDS, 40 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 1 mM NaF, 1% desoxicolato de sódio, e mix de inibidores de

proteases (Roche, Mannheim, Alemanha). O kit Bioplex utilizado (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) permitiu a dosagem de 23 citocinas: EPO, G-CSF, GM-CSF, GRO-KC, INF- γ , IL-1 α , IL-1 β , MCP-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12 p70, IL-13, IL-17a, IL-18, M-CSF, MIP-3a, RANTES, TNF- α e VEGF. O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as *beads* magnéticas conjugadas com os anticorpos anti-citocinas foram adicionadas à placa e lavadas com tampão apropriado (*bioplex wash buffer*). Em seguida, 50 μ l do soro ou do homogenato proteico cardíaco foram adicionados e incubados *overnight* a 4 °C. Após este período, a placa foi lavada novamente com a solução tampão e então incubada com o anticorpo biotinilado de detecção, por 30 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada e foi adicionada estreptavidina por 10 minutos. A placa foi lavada novamente e as *beads* ressuspensas em outra solução tampão (*bioplex assay buffer*), para enfim ser analisada pelo software Bioplex Manager, versão 4.0. Os níveis de citocinas séricas foram expressos em pg/ ml, e os níveis teciduais foram corrigidos pela dosagem proteica (μ g/ ml) do extrato cardíaco.

4.2 Protocolo experimental *in vitro*

4.2.1 Culturas primárias de cardiomiócitos

Para a obtenção das culturas primárias de cardiomiócitos foram utilizados ratos neonatos Wistar de 1 a 3 dias. Após exposição do coração, os átrios foram descartados e os ventrículos foram submetidos a um processo de digestão enzimática a 37 °C em tampão à base de collagenase (Worthington, Lakewood, N.J., USA) e pancreatina (GIBCO, Grand Island, N.Y., USA). Após sucessivas digestões enzimáticas, os homogenatos celulares foram submetidos à centrifugação em um gradiente descontínuo de Percoll (GE Healthcare, Uppsala, Suécia), permitindo então a separação dos cardiomiócitos dos demais tipos celulares presentes no coração. A viabilidade celular foi estimada pelo uso do corante *Trypan Blue Stain 0.4%* (Amresco, Solon, Ohio, USA). Em seguida, os cardiomiócitos foram contados em hemocítômetro e cultivados em placas de seis poços a uma densidade aproximada de $2,5 \times 10^4$ células/ cm^2 , em meio DMEM (GIBCO) contendo 5% de soro de bezerro neonato (NCS, GIBCO) e 10% de soro de cavalo (HS, GIBCO). As placas

foram mantidas em estufa de CO₂ (5%), a 37 °C, sob condições estéreis, até a realização dos experimentos.

4.2.2 Tratamento das células

Todos os fármacos utilizados foram preparados em meio DMEM sem soro. Previamente ao tratamento, os cardiomiócitos foram mantidos em meio com apenas 0,5% de NCS, por cerca de 15 a 18 horas.

Para avaliar o efeito do T3 sobre a expressão de citocinas, de S100A8 e S100A9, e de componentes da via de sinalização do NF-κB, os cardiomiócitos foram submetidos a curva tempo-resposta de T3, numa concentração de 10 nM. A concentração e tempos selecionados basearam-se em trabalhos prévios de nosso laboratório (DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2009; TAKANO; DINIZ; BARRETO-CHAVES, 2013). Os diferentes tempos de tratamento com T3 (de minutos a 6h) tiveram como respectivo controle, células mantidas em DMEM pelo tempo máximo utilizado para os experimentos, no caso 6h. Já o tratamento mais longo com T3 (24 horas) foi comparado ao grupo no qual as células controles foram mantidas em meio de cultura por também 24 horas.

Para avaliar a participação do NF-κB na hipertrofia induzida pelo T3, os cardiomiócitos foram submetidos ao tratamento com T3 (10 nM), tratamento com JSH-23 (10 mM, Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha), pré-tratamento com JSH-23 por 1 hora, seguida do tratamento conjunto de T3 e JSH-23, além do grupo controle mantido em DMEM por 24 horas.

Na avaliação da participação do SRA, via receptor AT1, nas ações do T3, as células foram tratadas com T3 (10 nM), tratadas com Losartan (1 uM, Sigma-Aldrich), pré-tratadas com Losartan por 30 minutos e então tratadas com T3 e Losartan, ou ainda, as células controles foram mantidas em meio de cultura.

4.2.3 Transfecção das células com RNA de interferência (RNAi)

Para avaliar a possível participação de S100A8 bem como de MyD88 na hipertrofia dos cardiomiócitos induzida pelo T3, foi realizado o silenciamento gênico através da técnica de RNA de interferência (RNAi). Todas as transfecções foram realizadas com o uso de lipofectamina (Lipofectamina 2000; Invitrogen, Carlsbad,

CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os cardiomiócitos foram mantidos com o meio de transfecção contendo o complexo oligo-lipofectamina por 6 horas, de acordo com o protocolo padronizado em nosso laboratório, o qual não demonstra toxicidade às células.

Inicialmente foi observada a eficiência de transfecção nas células, através do uso de um oligo de RNAi, cuja sequência é não homóloga a nenhum gene e ligada a uma molécula fluorescente (BLOCK-iT™ *fluorescent oligo*, Invitrogen). A visualização e análise qualitativa foram realizadas em microscópio de fluorescência. Em seguida, foram testadas três sequências-alvo distintas e específicas para cada gene de interesse (S100A8 e MyD88), com o intuito de avaliar qual delas proporcionaria o maior grau de silenciamento do gene, e, por consequência, menor expressão de RNAm e proteica. Nestes experimentos de transfecção, curvas concentração-resposta e tempo-resposta foram realizadas para cada uma das sequências. Para silenciamento de S100A8 foi selecionado o oligo com as sequências 5'- GGU CAC UAC UGA GUG CCC UCA GUU U -3' e 5'- AAA CUG AGG GCA CUC AGU AGU GAC C -3'; e para MyD88 foi utilizado 5'- GAG AUG GGU UUC GAG UAC UUG GAG A -3' e 5'- UCU CCA AGU ACU CGA AAC CCA UCU C -3'. A concentração padronizada para ambos os oligos de RNAi (S100A8 e MyD88) foi de 50 nM e a extração das células foi feita após 72 horas de transfecção.

Assim, resumidamente, para avaliação da participação de S100A8 e MyD88 na hipertrofia do cardiomiócitos em resposta ao T3, as células receberam os seguintes tratamentos:

- **Controle:** células transfectadas com RNAi controle negativo (50 nM, Stealth™ RNAi Negative Control Duplex, Invitrogen) e mantidas em DMEM;
- **T3:** células transfectadas com RNAi controle negativo e, após 48 horas, tratadas com T3 (10 nM) por 24 horas;
- **RNAi para S100A8:** células transfectadas com RNAi para S100A8 e mantidas por 72 horas;
- **RNAi para S100A8 + T3:** 48 horas após transfecção com RNAi para S100A8, as células foram tratadas com T3 por 24 horas.
- **RNAi para MyD88:** células transfectadas com RNAi para MyD88 e mantidas por 72 horas;
- **RNAi para MyD88 + T3:** 48 horas após transfecção com RNAi para MyD88, as células foram tratadas com T3 por 24 horas.

4.2.4 Avaliação da hipertrofia de cardiomiócitos

Para avaliar a hipertrofia destas células foram empregadas três técnicas complementares e amplamente utilizadas na literatura:

- Análise da síntese proteica, através do ensaio de incorporação de leucina triciada;
- Avaliação da expressão de RNAm de marcadores de hipertrofia cardíaca, como o fator natriurético atrial (ANF) e o peptídeo natriurético cerebral (BNP), através da técnica de PCR em Tempo Real;
- Mensuração da área da superfície destas células.

A descrição mais detalhada de cada método será abordada nos próximos itens.

4.3 Análise da expressão de RNAm: Extração de RNA, transcrição reversa e PCR em tempo real

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. Ao término deste processo, o pellet de RNA foi diluído em água ultrapura e homogeneizado. Em seguida, as amostras foram dosadas em espectrofotômetro de alta sensibilidade (Nanodrop, Biotek). Após a quantificação do RNA total, foi realizada uma eletroforese para a verificação da integridade do RNA extraído, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. A partir de 1 ug de RNA total extraído foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese de uma fita de DNA complementar ao RNAm, o cDNA. Em seguida, os níveis de RNAm de genes marcadores de hipertrofia cardíaca (ANF e BNP), além da expressão de S100A8, S100A9, IL-1 β e TNF- α foram analisados através da técnica de PCR em Tempo Real. Após a padronização dos diferentes *primers*, foram escolhidas as concentrações ideais de cDNA para cada *primer*, com o objetivo de que não houvesse saturação de amostra durante a reação. Para cada reação foi também utilizado um controle negativo, o qual não continha cDNA. As reações foram realizadas utilizando 300 nM de cada *primer*, cDNA, H₂O ultrapura e 6 μ l de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), em um volume final de 12 μ l/reação. Os ciclos foram realizados utilizando-se temperatura de denaturação inicial de 95 °C por 15 segundos, temperatura de anelamento de 60 °C por 1 minuto e temperatura de extensão de 72 °C por 15 segundos, utilizando 40 ciclos. Com base no Ct, o qual

representa a linha de base de detecção de fluorescência, correspondente à fase exponencial, é possível estimar a quantidade inicial de cDNA aplicado nas diferentes amostras. Os resultados obtidos foram expressos com base na relação do RNAm de cada gene de interesse com os níveis de RNAm do GAPDH, utilizado como controle interno. As amostras foram processadas em duplicata e em no mínimo 3 experimentos independentes. A seguir, a Tabela 1 descreve as sequências dos *primers* utilizados.

Tabela 1 - Sequência dos diferentes *primers* utilizados nos experimentos de PCR em Tempo Real.

Genes analisados	Sense	Antisense
S100A8	5'- CTG AGT GCC CTC AGT TTG TGC AG -3'	5'- GCT CTG TTA CTC CTT GTG GCT GTC -3'
S100A9	5'- CAT CAT GGA GGA CCT GGA CAC -3'	5'- CCC TTT AGA CTT GGT TGG GCA CA -3'
ANF	5'- AGT GCG GTG TCC AAC ACA G -3'	5'- CTT CAT CGG TCT GCT CGC T -3'
BNP	5'- CAG AAC AAT CCA CGA TGC AG -3'	5'- GCT GTC TCT GAG CCA TTT CC -3'
IL-1β	5'- GCT TCC TTG TGC AAG TGT CT -3'	5'- TCT GGA CAG CCC AAG TCA AG -3'
TNF-α	5'-TGG GCT CCC TCT CAT CAG TT -3'	5'-TCC GCT TGG TGG TTT GCT AC -3'
GAPDH	5'- TGG TGG ACC TCA TGG CCT AC -3'	5'- CAG CAA CTG AGG GCC TCT CT -3'

4.4 Ensaio de incorporação de leucina triciada

Este procedimento foi utilizado para avaliar a incorporação deste aminoácido (leucina) em proteínas que estão sendo sintetizadas pelos cardiomiócitos, permitindo desta forma, estimar o crescimento hipertrófico destas células. As células receberam os tratamentos por 24 horas, conforme descrito anteriormente nos itens 4.2.2 e 4.2.3. Seis horas antes do término do tratamento, o meio foi retirado e novo meio contendo 5 μ Ci/ml de L-[4,5- 3 H] Leucina (GE Healthcare) foi adicionado às células. Ao final do tratamento, o meio foi descartado, as células foram lavadas com PBS e lisadas com ácido tricloroacético (TCA) a 10%. O homogenato coletado foi centrifugado a 4 °C, por 10 minutos, a 14000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, o pellet foi ressuspensionado em NaOH 0,2 N e as amostras foram então incubadas a 60 °C por 30 minutos. Em seguida, em um tubo de cintilação foram acrescentados 400 μ l da amostra e 3,6 ml do líquido de cintilação

(Perkin Elmer, Shelton, C.T., USA). As amostras foram contadas em Cintilador para a quantificação da incorporação de leucina triciada em cada amostra.

4.5 Medida da área de superfície celular

Para confirmação do efeito hipertrófico do T3 nas células transfectadas com RNAi para S100A8, RNAi para MyD88, ou ainda tratadas com JSH-23, a medida da área dos cardiomiócitos foi também avaliada. Para tal, as células receberam os tratamentos descritos nos itens 4.2.2 e 4.2.3 e, para cada grupo, foram aleatoriamente obtidas imagens de 50 a 100 células em pelo menos 3 culturas distintas. Estas imagens foram capturadas usando um microscópio invertido (Axio Observer D1, Zeiss, Jena, Alemanha) com câmera acoplada, com magnificação de 200x e a área da superfície dos cardiomiócitos foi mensurada usando o programa Axio Vision 4.

4.6 Ensaio de gene repórter de NF- κ B através da determinação da atividade da luciferase

Esta abordagem foi realizada, pois avalia o efeito que uma sequência regulatória do NF- κ B, artificialmente inserida a montante de um gene "repórter", no caso a luciferase, exerce sobre o nível de transcrição deste último. Desta forma, este ensaio permite estimar o grau de transcrição gênica dependente de NF- κ B, cujos dados dão um indicativo da atividade deste fator de transcrição.

Os cardiomiócitos foram transfectados com o vetor pGL4.32[luc2P/NF- κ B-RE/Hygro] (Promega, Madison, WI, EUA), com uso de lipofectamina (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Este vetor contém cinco cópias de um elemento responsivo a NF- κ B que direciona a transcrição do gene repórter luciferase (*luc2P*). Um plasmídeo controle (pGL4.15[luc2P/Hygro]) foi usado como controle de eficiência de transfecção. Seis horas após as transfecções, um novo meio contendo os apropriados tratamentos foi adicionado às células por 24 h. O ensaio de atividade da luciferase foi realizado de acordo com as instruções do kit *Dual Luciferase Reporter Assay System* (Promega). De forma sucinta, após o período de tratamento, o meio foi removido e as células lavadas com PBS. Então foram adicionados 250 μ l do tampão de lise 1x em cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 15 min, sob agitação, para permitir a lise celular. Após a lise, uma alíquota de 20

ul de cada amostra foi transferida para uma placa de 96 poços, a qual foi inserida em um luminômetro (Biotek, Winooski, VT, USA). O equipamento possui injetores e foi programado para adicionar dois reagentes a cada poço com as amostras contendo luciferase: primeiramente 100 ul de tampão contendo o substrato da luciferase de vaga-lume (reagente LAR II), e em seguida, foi adicionado 100 ul do reagente contendo substrato da luciferase de Renilla (reagente Stop & Glo). A razão entre a primeira e a segunda leitura fornece a atividade relativa da luciferase, cuja atividade enzimática foi medida a partir da quantidade de luz emitida em RLUs (*relative light units*).

4.7 Dosagem de S100A8 (Calgranulina A) por ELISA

Os níveis de S100A8 do meio de cultura dos cardiomiócitos e também de homogenatos proteicos dos cardiomiócitos foram mensurados por um kit de ELISA (MyBiosource, San Diego, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Os valores foram detectados na absorbância a 450 nm, e os níveis de S100A8 calculados em pg/ ml. Os valores obtidos em homogenatos celulares foram corrigidos pela concentração proteica.

4.8 Análise da expressão proteica – Western Blot

Para avaliar a expressão de S100A8, TLR4, MyD88, IKK, I κ B e NF- κ B fosforilado foi realizada a extração de proteína total utilizando um tampão com 1% NP40, 10% glicerol, 135 mM NaCl, 20 mM Tris, 20 mM aprotinina, 20 mM pepstatina, 20 mM leupeptatina, 40 uM PMSF e 100 mM ortovanadato, sendo em seguida feita a centrifugação das amostras a 14000 rpm, por 15 minutos, a 4 °C e coletado o sobrenadante.

Além disso, a expressão de NF- κ B (p65) foi avaliada em frações citoplasmáticas e nucleares de cardiomiócitos. De forma sucinta, as células foram removidas da placa de cultura com uso de solução tripsina/ EDTA (Cultilab, Campinas – SP, Brasil) e centrifugadas a 1000 g, a 4 °C, por 5 minutos. Após lavagem com solução PBS, o pellet foi homogeneizado com tampão contendo 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% de deoxicolato de sódio, 1% de NP40, 10 mM de NaF, 10 mM de pirofosfato e mix de inibidores de protease (Roche). Uma nova

centrifugação foi realizada a 16000 g, a 4 °C, por 5 minutos, para obter o sobrenadante com proteínas citoplasmáticas. Em seguida o pellet foi ressuspendido em novo tampão, igual ao anterior, adicionado de 0,3% de SDS e 1 ug/ul de DNase e submetido à centrifugação de 16000 g, a 4 °C, por 10 minutos, para obtenção das proteínas nucleares.

A quantificação da concentração proteica das amostras foi obtida pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Em seguida, 50 ug de proteína foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida:bisacrilamida (de 10 a 15%, dependendo do peso molecular da proteína analisada), utilizando-se tampão de corrida (25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% SDS), sob voltagem de 140 Volts, durante 1 hora e 30 minutos. Após este processo, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em um sistema de transferência úmida com tampão contendo 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% SDS e 20% metanol, por 1 hora e 30 minutos, sob corrente elétrica a 400 mA. A membrana foi corada com solução *Ponceau* para demonstrar que a concentração de proteínas era similar entre as diferentes amostras. Em seguida, foi incubada com o anticorpo primário específico para cada proteína avaliada (Tabela 2), em agitação, *overnight*, a 4 °C. Após a lavagem da membrana, esta então foi incubada com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (Jackson Immuno Research, West Grove, P.A., USA). Novamente, esta foi lavada e incubada com solução de ECL (Thermo Scientific, Rockford, I.L., USA), a qual tem como função promover uma reação de luminescência, cujo produto final é visualizado em filme de raio X. A banda correspondente à proteína de interesse foi então quantificada no programa ImageJ, sendo os valores expressos em porcentagem em relação ao controle. As amostras foram normalizadas pelos níveis de expressão da proteína GAPDH, para proteínas totais e citoplasmáticas, e pela expressão de histona H2B, para proteínas nucleares.

Tabela 2 - Lista de anticorpos primários utilizados para a análise de expressão proteica nos experimentos de Western Blot.

Proteínas analisadas	Origem	Peso molecular	Titulação
Calgranulina A	Santa Cruz (sc-81113)	11 kDa	1:500
Calgranulina B	Santa Cruz (sc-81114)	14 kDa	1:500
RAGE	Cell Signaling (4679)	58, 52, 48 kDa	1:1000
TLR4	Santa Cruz (sc-30002)	95 kDa	1:1000
MyD88	Cell Signaling (4283)	33 kDa	1:1000
IKKα/β-p (Ser176/180)	Cell Signaling (2697)	85-87 kDa	1:1000
IKKα/β	Santa Cruz (sc-7607)	85-87 kDa	1:1000
IκB-p (Ser32/36)	Cell Signaling (9246)	40 kDa	1:1000
IκB	Cell Signaling (9242)	39 kDa	1:1000
NF-κB (p65)	Abcam (ab7970)	69 kDa	1:1000
NF-κB (p65)-p (Ser536)	Cell Signaling (3033)	65 kDa	1:1000
GAPDH	Santa Cruz (sc-32233)	37 kDa	1:1000
Histona H2B	Santa Cruz (sc-8650)	18 kDa	1:500

4.9 Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram descritos em média $\pm$ erro-padrão. O valor de n corresponde ao número de diferentes culturas de cardiomiócitos que foram preparadas, ou de animais utilizados em cada grupo experimental. Os dados foram analisados e comparados utilizando-se o Teste t de “Student” ou a Análise de Variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey, quando mais de dois grupos foram analisados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados *in vivo*

5.1.1 Validação do modelo experimental *in vivo*

O protocolo de indução ao hipertiroidismo utilizado neste estudo já foi descrito em trabalhos prévios do grupo (CARRILLO-SEPÚLVEDA et al., 2013; TAVARES et al., 2013). No entanto, os dados coletados e apresentados a seguir tiveram como finalidade a confirmação da eficiência do modelo experimental.

Inicialmente, o comportamento dos grupos experimentais em relação à evolução da massa corpórea, ao longo dos 14 dias de tratamento, pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Evolução da massa corpórea (g) dos animais dos grupos controle e hipertiroideo (Hiper) ao longo do tratamento. Os valores são expressos como média $\pm$ EP (n=10). Análise estatística realizada por ANOVA Two-Way. * $p < 0,05$ vs. grupo Hiper no mesmo dia experimental.

Pode-se observar que no início do protocolo todos os animais apresentavam a mesma massa corporal, no entanto, os animais do grupo hipertiroideo apresentaram menor ganho de massa corporal a partir do 4º dia de tratamento, em relação ao grupo controle no mesmo período ($p < 0,05$).

As dosagens séricas de T3 e T4 total foram também avaliadas nos grupos experimentais (Tabela 3). Os dados mostram que não houve modulação dos níveis de T3 total no grupo hipertiroideo. No entanto, estes animais apresentaram diminuição significativa dos níveis séricos de T4 total, em relação aos níveis

observados no grupo controle ($p < 0,01$ vs. controle), evidenciando que a alça de retroalimentação negativa existente para a regulação dos níveis de HT está funcionando (GARDNER; SHOBACK, 2012). Esta dosagem confirma, portanto, que o tratamento foi eficiente em induzir os animais ao hipertireoidismo experimental.

Tabela 3 - Níveis séricos de T3 e T4 total.

	Controle	Hiper
T4 total (ug/dl)	5,48±0,48	0,90±0,10*
T3 total (ug/dl)	45,63±2,52	49,68±5,19

Os valores são expressos como média $\pm$ EP. Grupos controle (n=10) e hipertireoideo (Hiper) (n=10). * $p < 0,01$ vs. controle.

Outro parâmetro avaliado foi a razão massa do coração/ comprimento da tíbia, assim como a razão massa do coração/ massa corpórea nos grupos experimentais (Figura 5), uma vez que estas razões dão a ideia do trofismo cardíaco. Tanto a razão da massa do coração/ massa corpórea (Figura 5-A) assim como a razão da massa do coração/ comprimento da tíbia (Figura 5-B) indicaram que os animais submetidos ao hipertireoidismo desenvolveram significativo ganho de massa muscular cardíaca, ou hipertrofia cardíaca, aproximadamente em torno de 40%, em relação ao grupo controle ($p < 0,01$).

Figura 5. Avaliação da hipertrofia cardíaca em resposta ao hipertireoidismo experimental. A) Análise da razão massa do coração/ comprimento da tíbia. B) Razão massa do coração/ massa corpórea ao final do tratamento por 14 dias com T3 (Hiper) ou solução veículo (Controle), n=10. * $p < 0,01$ vs. controle.

Ainda, o tratamento com T3, embora tenha resultado na hipertrofia de ambos os ventrículos, não ocorreu de forma simétrica nos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) (Tabela 4). Assim, considerando a razão massa do ventrículo/comprimento da tibia, a hipertrofia do VE foi de 27% e a do VD foi de 60%, em relação ao grupo controle. Esta hipertrofia é confirmada ainda pela análise da razão massa do ventrículo/ massa corpórea, mostrando um significativo aumento tanto no VE quanto no VD (43% e 82%, respectivamente) quando comparado ao dos respectivos controles.

Tabela 4 - Análise da massa muscular cardíaca nos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD).

	Massa ventrículo/ tibia mg/mm		Massa ventrículo/ massa corpórea mg/g	
	VE	VD	VE	VD
Controle	17,53 ± 0,63	4,27 ± 0,32	2,06 ± 0,03	0,50 ± 0,01
Hiper	22,27 ± 0,48*	6,87 ± 0,20*	2,96 ± 0,07*	0,91 ± 0,03*

Os valores são expressos como média ± EP. Grupos controle (n=5) e hipertiroideo (Hiper) (n=5).
*p<0,01 vs. respectivo controle.

O processo de hipertrofia cardíaca resultante de diferentes estímulos hormonais, como elevados níveis de angiotensina II e fenilefrina, ou ainda resultante de procedimentos que geram sobrecarga de volume ou pressão, desencadeia preferencialmente o aumento da parede do ventrículo esquerdo. Embora a hipertrofia pelo HT resulte também numa hipertrofia ventricular direita, nossas análises foram realizadas no ventrículo esquerdo, uma vez que é o VE aquele diretamente associado ao processo de insuficiência cardíaca que se desenvolve a posteriori nesses modelos experimentais, conforme já abordado previamente na literatura (ROZANSKI et al., 2013; TAVARES et al., 2013; XU et al., 2012). Com relação à hipertrofia promovida pelo hipertiroidismo no VD, pelo que se conhece até o momento, esta resposta está diretamente relacionada à hipertensão pulmonar que acomete esse estado patológico e estudos adicionais se fazem necessários para

entender melhor os seus mecanismos moleculares associados (VALLABHAJOSULA et al., 2011).

5.1.2 Análise de parâmetros hemodinâmicos

A frequência cardíaca (FC) e a pressão de cauda, indicativa da pressão arterial sistólica (PAS), foram mensuradas indiretamente através de pletismografia de cauda, como previamente descrito. Como pode ser observado na Figura 6-A, a FC está aumentada de maneira significativa nos ratos hipertiroideos no 7^o e 14^o dia de tratamento, quando comparada à FC inicial, assim como quando comparada àquela do grupo controle no mesmo período experimental ($p < 0,05$). A PAS também se mostrou elevada nos animais tratados com T3, quando comparada ao grupo controle (Figura 6-B).

Figura 6 - Avaliação de parâmetros hemodinâmicos. A) Frequência cardíaca (FC) e B) pressão arterial sistólica (PAS). Foram mensuradas antes do início (0), após uma semana (7) e ao final do tratamento (14), nos grupos controle e hipertiroideo (Hiper), $n=8$. Análise estatística realizada por ANOVA Two-Way. * $p < 0,05$ vs. controle do mesmo dia de avaliação.

5.1.3 Análise do perfil de citocinas inflamatórias

Como já citado anteriormente, os dados prévios, nos quais foi baseado o presente estudo (dados obtidos na análise por *microarray*), detectaram o aumento de genes pró-inflamatórios em corações de ratos, após diferentes tempos de tratamento com T3. Adicionalmente a estes achados, trabalhos prévios da literatura demonstraram que alguns estímulos hipertróficos influenciam a expressão de

citocinas classicamente descritas na resposta inflamatória. Assim, no intuito de iniciarmos a investigação sobre os possíveis efeitos do T3 neste contexto inflamatório, foram analisados os níveis de algumas citocinas inflamatórias tanto no soro (Tabela 5) como no lisado proteico do ventrículo esquerdo (Tabela 6), dos animais controles e submetidos ao hipertiroidismo.

Tabela 5 - Perfil de citocinas dosadas no soro dos grupos experimentais.

Citocinas avaliadas (pg/ml)	Controle (n)	Hiper (n)
EPO (eritropoietina)	171,96 ± 23,72 (5)	195,85 ± 47,33 (8)
G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos)	11,21 ± 3,05 (5)	13,79 ± 2,44 (7)
GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos/monócitos)	306,91 ± 56,76 (6)	355,08 ± 42,72 (8)
GRO-KC (oncogene relacionado a crescimento- quimiocina)	86,39 ± 22,90 (8)	150,03 ± 21,61 (8) *
M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos)	70,09 ± 13,38 (8)	99,29 ± 12,69 (9)
IL-1α (interleucina 1 α)	84,35 ± 20,23 (5)	159,87 ± 20,05 (6) *
MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos 1)	542,25 ± 86,64 (8)	522,25 ± 77,39 (8)
IL-2 (interleucina 2)	171,55 ± 23,28 (5)	236,26 ± 55,87 (7)
IL-4 (interleucina 4)	43,95 ± 3,14 (5)	36,58 ± 5,79 (7)
IL-5 (interleucina 5)	168,58 ± 32,35 (8)	218,73 ± 21,85 (9)
IL-6 (interleucina 6)	23,12 ± 10,40 (4)	17,44 ± 3,78 (7)
IL-1β (interleucina 1 β)	249,48 ± 29,90 (5)	272,05 ± 39,69 (9)
IL-7 (interleucina 7)	209,14 ± 51,08 (5)	147,64 ± 20,78 (7)
IL-10 (interleucina 10)	374,11 ± 76,76 (7)	382,84 ± 41,40 (7)
IL-12p70 (interleucina 12p70)	29,94 ± 4,27 (5)	32,64 ± 5,59 (8)
IL-13 (interleucina 13)	60,61 ± 10,15 (6)	69,81 ± 5,94 (8)
IL-17a (interleucina 17a)	124,19 ± 18,51 (8)	163,17 ± 8,41 (8)
IL-18 (interleucina 18)	255,97 ± 49,00 (5)	444,23 ± 78,51 (7)
INF-γ (interferon γ)	11,02 ± 4,80 (4)	14,60 ± 3,53 (7)
MIP-3a (proteína inflamatória de macrófago 3a)	40,86 ± 8,75 (8)	70,45 ± 6,34 (8) *
RANTES (quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por cél. T normais)	305,56 ± 57,17 (8)	478,89 ± 51,79 (8) *
TNF-α (fator de necrose tumoral α)	7,46 ± 1,43 (4)	11,65 ± 2,58 (5)
VEGF (fator de crescimento endotelial vascular)	52,78 ± 8,22 (6)	54,37 ± 5,07 (8)

Os valores das citocinas em pg/ml são expressos como média ± EP. Grupos controle (Controle) e hipertiroideo (Hiper). *p<0,05 vs. controle. Os valores entre parêntesis representam o número de amostras utilizadas.

As dosagens de citocinas foram realizadas e quantificadas no sistema Bio-Plex. Embora as curvas de padronização para cada citocina, no soro e no tecido, tenham sido de excelente qualidade, houve certa variabilidade nas amostras de soro, o que parece ocorrer frequentemente nesta metodologia. Os níveis séricos de IL-1 α , GRO-KC, MIP-3a e RANTES mostraram-se significativamente aumentados no grupo hipertiroideo, em relação ao grupo controle (Tabela 5). As demais citocinas não se mostraram diferentes entre os grupos experimentais.

No tecido cardíaco, das 23 citocinas dosadas, somente sete delas foram detectadas dentro da curva de padronização, o restante teve valores muito baixos, não detectados pelo sistema de dosagem. Dentre as citocinas analisadas, houve uma diminuição dos níveis de IL-5 e aumento significativo de M-CSF no coração dos ratos hipertiroideos, quando comparados aos encontrados nos animais controles (Tabela 6).

Tabela 6 - Perfil de citocinas dosadas no tecido cardíaco dos grupos experimentais.

Citocinas (pg/ml)/ prot (ug/ul)	Controle (n)	Hiper (n)
EPO (eritropoietina)	395,92 $\pm$ 16,38 (9)	384,41 $\pm$ 21,51 (10)
IL-4 (interleucina 4)	2,83 $\pm$ 0,12 (9)	2,48 $\pm$ 0,13 (10)
IL-5 (interleucina 5)	10,01 $\pm$ 0,53 (9)	7,46 $\pm$ 0,47 (10) *
IL-6 (interleucina 6)	3,96 $\pm$ 0,26 (9)	3,96 $\pm$ 0,24 (9)
M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos)	0,48 $\pm$ 0,06 (9)	0,79 $\pm$ 0,11 (10) *
TNF-α (fator de necrose tumoral α)	3,68 $\pm$ 0,21 (9)	3,55 $\pm$ 0,19 (10)
VEGF (fator de crescimento endotelial vascular)	107,26 $\pm$ 6,55 (9)	107,29 $\pm$ 6,85 (10)

Os valores da razão citocinas (pg/ml)/ proteína total (ug/ul) são expressos como média $\pm$ EP. Grupos controle (Controle) e hipertiroideo (Hiper). *p<0,05 vs. controle. Os valores entre parêntesis representam o número de amostras utilizadas.

Embora os dados de *microarray* obtidos previamente tivessem mostrado um aumento na expressão de alguns genes ligados à resposta inflamatória após 12 e 24 horas, assim como após 7 dias de tratamento com T3, os resultados relativos aos níveis de citocinas circulantes e cardíacas não se mostraram muito diferentes entre os animais dos grupos controle e tratado com T3 por 14 dias.

5.1.4 Efeitos do T3 na expressão de S100A8 e S100A9 no coração

Como já mencionado no texto introdutório, os dados de *microarray* indicaram aumento de S100A8 e S100A9 (calgranulina A e calgranulina B, respectivamente), após tratamento com T3, cujos níveis de RNAm foram validados por PCR em tempo real. Diante desses resultados, o efeito do tratamento por 14 dias com T3 sobre a expressão destas calgranulinas foi avaliado. A seguir, na figura 7, pode-se notar que os níveis de RNAm de S100A8 e S100A9 encontram-se aumentados de forma significativa no grupo hipertiroideo, quando comparados aos do grupo controle ($p < 0,01$).

Figura 7 - Expressão de RNAm de S100A8 ou calgranulina A (A) e S100A9 ou calgranulina B (B) no tecido cardíaco. Análise realizada por PCR em tempo real a partir de RNA extraído de ventrículo esquerdo de corações dos grupos controle e hipertiroideo (Hiper), $n=6$. * $p < 0,01$ vs. controle.

Paralelamente à análise da expressão gênica, a expressão proteica de S100A8 foi também avaliada (Figura 8-A). Após várias tentativas, com adaptações e mudanças do protocolo de western blot, não foi possível analisar a expressão de S100A9, a partir dos homogenatos proteicos de tecido cardíaco. Segundo a folha de dados do anticorpo utilizado, o homogenato proteico de baço de camundongo pode ser usado como uma amostra controle positivo para esta calgranulina. Desta forma, como observado a seguir, a amostra controle positivo apresenta uma banda no peso molecular de S100A9, enquanto a amostra de tecido cardíaco não expressa níveis de proteína suficientes para detecção na técnica de western blot (Figura 8-B).

Figura 8 - Expressão proteica de S100A8 e S100A9 (calgranulina A e calgranulina B, respectivamente) em tecido cardíaco. A) Análise da expressão proteica por western blot de S100A8, em homogenato proteico de ventrículo esquerdo de coração dos grupos controle e hipertiroideo (Hiper), n=6. Em B, membrana corada com Ponceau à esquerda e blot à direita de homogenato proteico de baço de camundongo, controle positivo (C+) do anticorpo anti-S100A9, e ventrículo esquerdo (VE) de rato controle. A seta indica a banda da calgranulina B presente no controle positivo e ausente na amostra cardíaca. *p<0,01 vs. controle.

A partir destes dados de expressão gênica e proteica, podemos afirmar que o HT estimula a produção local, principalmente de S100A8, no coração.

5.1.5 Análise do efeito do T3 em componentes da via de sinalização do NF- κ B no coração

Como já mencionado previamente, alguns trabalhos evidenciam que tanto S100A8 como S100A9 podem ser considerados ligantes endógenos de receptores TLR4 ou ainda de receptores RAGE. Estes, por consequência, ativam algumas sinalizações intracelulares, como por exemplo, a via que resulta na translocação para o núcleo, e consequente ativação de fator de transcrição NF- κ B (VOGL et al., 2007; EHRCHEN et al., 2009). A seguir, o esquema simplificado da sequência das proteínas envolvidas na sinalização avaliada foi novamente ilustrado, juntamente com os resultados de expressão proteica obtidos em amostras de tecido cardíaco de ratos dos grupos controle e hipertiroideo (Figura 9).

Figura 9 - Análise da via de sinalização ativada por S100A8/ S100A9 no tecido cardíaco. Esquema com os componentes da via de sinalização avaliada (A). Blots representativos das proteínas avaliadas a partir de homogenato proteico cardíaco dos grupos controle e hipertireoideo (Hiper) (B). Quantificação da expressão proteica de TLR4 (C), RAGE (D), MyD88 (E), IKK-p/ IKK total (F), IκB-p/ IκB total (G), e NF-κB-p (H), n=6-8. Os valores foram normalizados pela expressão proteica de GAPDH. *p<0,05 vs. controle.

Com relação aos receptores de membrana, tanto a expressão proteica de TLR4 como de RAGE foram semelhantes entre os grupos controle e hipertiroideo (Figura 9-C e D). No entanto, a expressão de MyD88, uma proteína citoplasmática adaptadora do receptor TLR4, está significativamente aumentada no tecido cardíaco de ratos hipertiroideos, quando comparada àquela do grupo controle (Figura 9E).

Na sequência foram verificadas duas proteínas classicamente associadas à ativação do fator NF- κ B e que participam desta sinalização: a proteína inibitória I κ B e a sua quinase, IKK. Com relação à IKK, a razão desta proteína fosforilada nos resíduos Ser 176/180 pela expressão de IKK total, não apresenta alteração significativa entre os grupos experimentais (Figura 9-F). Além disso, a expressão da I κ B, proteína inibitória do NF- κ B, também demonstrada pela razão de I κ B fosforilada (Ser 32/36) pelos níveis totais de I κ B, não foi alterada em corações de ratos após o tratamento com T3 por 14 dias (Figura 9-G).

Embora seja importante avaliar a expressão dos diferentes componentes desta via de sinalização, o principal componente que de fato atua diretamente na regulação da expressão de genes alvos, é o fator de transcrição NF- κ B. Dessa forma, foi quantificada a expressão de NF- κ B (p65) fosforilado no resíduo Ser 536 em homogenato proteico total de tecido cardíaco e não foi verificada alteração dos níveis desta proteína fosforilada entre os grupos experimentais (Figura 9-H).

Em resumo, embora houvesse um aumento da expressão de S100A8 e S100A9 no coração de ratos hipertiroideos, os dados apontaram que, após 14 dias de tratamento com T3, não se observaram profundas alterações na sinalização ativada por estas calgranulinas, com exceção da expressão de MyD88, a qual mostrou-se elevada no grupo hipertiroideo em relação ao controle.

Talvez a modulação desta via de sinalização tenha ocorrido em algum momento ao longo dos 14 dias de tratamento com HT. Desta forma, um acompanhamento do efeito temporal do T3 nesta sinalização foi mais bem investigado em cardiomiócitos em cultura.

5.2 Resultados *in vitro*

5.2.1 Análise do efeito do T3 sobre a expressão de citocinas inflamatórias, S100A8 e S100A9 em cardiomiócitos em cultura

Em paralelo à análise *in vivo*, foi avaliada a expressão de RNAm de algumas citocinas em cardiomiócitos em cultura, tratados por diferentes tempos com T3. Dentre as citocinas investigadas, a expressão de RNAm de IL-1 α , IL-6, IL-10 e INF- γ não foi detectada nem nas células controles nem nas tratadas com T3. Por outro lado, apesar da baixa expressão de IL-1 β e TNF- α , os níveis destas citocinas foram mensurados. Novamente, grande variabilidade foi encontrada entre as amostras levando, portanto, à ausência de alterações significativas entre as células submetidas ao tratamento com T3 e as células controles (Figura 10).

Figura 10 - Curva tempo-resposta de T3 na expressão de RNAm de IL-1 β (A) e TNF- α (B) em cardiomiócitos em cultura. As células foram mantidas em DMEM (células controle, representadas com a letra C nos gráficos) ou tratadas com T3 por 30 minutos ou ainda por 1, 6 e 24 horas (n=4).

Em seguida, foi avaliado se a produção de S100A8 e S100A9 após o estímulo com T3 ocorreria em cardiomiócitos em cultura. Para tal, foi também realizada uma curva tempo-resposta de T3 para avaliar a expressão de RNAm de S100A8 e S100A9. Conforme pode ser observado, a expressão das duas calgranulinas encontra-se significativamente aumentada nas células tratadas com T3 após 24 h, sem alterações nos tempos de tratamento mais curtos, quando comparada àquela das células controle (Figura 11).

Figura 11 - Curva tempo-resposta de T3 sobre a expressão de RNAm de S100A8 (A) e S100A9 (B) (calgranulinas A e B, respectivamente) em cardiomiócitos em cultura. As células foram mantidas em DMEM (células controle, representado com a letra C) ou tratadas com T3 por 10, 30 e 60 minutos ou ainda por 6 e 24 horas. * $p < 0,05$ vs. controle (n=4).

A quantificação da expressão proteica das calgranulinas por western blot nas amostras de cardiomiócitos não foi detectada. Com isso, os níveis de S100A8 tanto no extrato proteico como no meio de cultura de células foram então determinados através do uso de um kit de ELISA. O tratamento com T3 estimulou o aumento dos níveis de S100A8 no homogenato proteico de cardiomiócitos após 24 h, sem alterações significativas nos níveis desta calgranulina no sobrenadante celular (Figura 12).

Figura 12 - Efeito do T3 nos níveis proteicos de S100A8 em cardiomiócitos e no sobrenadante celular. As células foram mantidas em DMEM (células controle, representado com a letra C) ou tratadas com T3 por 24 horas. Os níveis de S100A8 foram mensurados em (A) homogenato proteico, n=4, e em (B) meio de cultura celular, n=8, através de um kit de ELISA. * $p < 0,05$ vs. controle.

5.2.2 Avaliação da participação de S100A8 na hipertrofia do cardiomiócito promovida pelo T3

A partir dos resultados evidenciando a influência do T3 principalmente na expressão de S100A8, passamos a avaliar se existiria a participação desta calgranulina na hipertrofia do cardiomiócito induzida pelo T3. Para abordar essa questão, o silenciamento, através da técnica de RNA de interferência (RNAi), do gene que codifica esta proteína foi realizado. Os resultados referentes à padronização destes experimentos encontram-se a seguir (Figura 13).

Inicialmente foi utilizado um indicador de eficiência de transfecção para experimentos de silenciamento com RNAi, ou seja, uma sequência não homóloga a nenhum gene, ligada com um fluoróforo (BLOCK-iTTM Fluorescent Oligo). Após 6 horas de transfecção é possível visualizar, através de microscopia de fluorescência, as células contendo moléculas fluorescentes em seu interior, confirmando a eficácia da transfecção (Figura 13-A).

Em seguida, no intuito de conseguir a melhor condição de silenciamento de S100A8, foram testadas três sequências de silenciamento desta calgranulina (nomeadas como 1, 2 e 3), com duas concentrações diferentes (50 e 70 nM), por 48 e 72h após transfecção. Conforme pode ser observado, todas as condições testadas resultaram na diminuição da expressão de S100A8, quando comparada à expressão nas células controle (Figura 13-B). No entanto, o maior silenciamento (em torno de 70%) foi observado no tempo de 72 horas pós-transfecção, com a sequência número 1, na menor dosagem testada, 50 nM.

Para avaliar a especificidade da sequência escolhida (sequência 1), a expressão de RNAm da S100A9 (calgranulina B), nas amostras silenciadas para S100A8, foi também avaliada e os resultados confirmam ter havido especificidade no silenciamento para S100A8, uma vez que não houve influência na expressão de S100A9 nas condições avaliadas (Figura 13-C).

A

B

C

Figura 13 - Padronização do silenciamento de S100A8 (calgranulina A) por RNA de interferência. A) Avaliação da eficiência de transfecção no cardiomiócito através do uso de um RNAi fluorescente (Alexa flúor) visualizado em microscopia de fluorescência. B) Quantificação dos níveis de RNAm de S100A8 após transfecção com oligo controle negativo (C-) ou com 3 diferentes sequências (1, 2, 3), nas concentrações de 50 e 70 nM, por 48 e 72 h. A seta indica a condição escolhida para os experimentos de transfecção destas células. C) Avaliação dos níveis de RNAm de S100A9 (calgranulina B) para confirmação da especificidade da sequência escolhida.

Padronizadas as condições de silenciamento, a análise do envolvimento de S100A8 na hipertrofia induzida pelo T3 foi avaliada. Nesta etapa, foram utilizados três métodos complementares para avaliar a hipertrofia do cardiomiócito, os quais se encontram já bem estabelecidos e aceitos na literatura: a avaliação da expressão de RNAm de marcadores de hipertrofia cardíaca (ANF e BNP), através da técnica de RT-PCR em Tempo Real, a análise dos níveis de incorporação de leucina triciada pelas células, e ainda a mensuração da área da superfície destas células (Figura 14).

Figura 14 - Prevenção da hipertrofia dos cardiomiócitos tratados com T3, após silenciamento de S100A8. Análise da expressão de RNAm de ANF e BNP, $n=4$ (A). Incorporação de leucina triciada pelas células, $n=3$ (B). Imagem representativa (C) e quantificação da área dos cardiomiócitos, $n=3$ (D). Para todas estas análises, as células foram tratadas com T3, transfectadas com RNAi para S100A8 (RNAi), transfectadas e tratadas com T3 (R+T3), ou ainda transfectadas com RNAi controle negativo *scramble* (controle, representado com a letra C). Os resultados são expressos em porcentagem em relação às células controle. * $P<0.05$ vs. controle; # $P<0.05$ vs. T3.

Como esperado, as células tratadas com T3 apresentaram um aumento significativo da expressão de ANF e BNP, bem como um aumento da síntese proteica e da área de superfície celular, confirmando o seu estado hipertrófico (Figura 14). No entanto, o silenciamento de S100A8 preveniu completamente o efeito trófico induzido pelo T3.

Pouquíssimos trabalhos recentes descrevem a relação entre esta proteína da família S100 e o trofismo cardíaco. Os dados observados neste estudo indicam a importante atuação desta calgranulina na resposta hipertrófica em cardiomiócitos, mediada pelo T3. Como consequência destes resultados, a etapa seguinte buscou então investigar o possível envolvimento da via de sinalização do fator de transcrição

NF- κ B, no sentido de avaliar um possível mecanismo através do qual S100A8 participaria do processo hipertrófico dos cardiomiócitos, após estímulo com HT.

5.2.3 Análise do efeito do T3 em componentes da via de sinalização do NF- κ B *in vitro*

Embora os níveis de S100A8 dosados no meio de cultura não tivessem sido alterados, a influência do T3 sobre esta via de sinalização foi avaliada também nos cardiomiócitos. Novamente, os dados de avaliação da expressão proteica de componentes desta sinalização, como TLR4, MyD88 e I κ B estão agrupados na Figura 15.

Figura 15 - Efeito do T3 na expressão proteica de TLR4, MyD88 e I κ B em cardiomiócitos em cultura. Blots representativos (A) das proteínas avaliadas em cardiomiócitos mantidos em DMEM (controle) ou tratados com T3 por 5, 10, 15 e 30 minutos ou ainda por 24 horas. Expressão proteica e quantificação de TLR4, n=4 (B), MyD88, n=6 (C), e razão I κ B-p/ I κ B total, n=3-6 (D). Os valores foram normalizados pela expressão proteica de GAPDH. *p<0,05 vs. controle.

Primeiramente, foram mensurados os níveis proteicos do receptor TLR4 após o tratamento com T3. O tratamento com T3 por 24 horas não resultou em modulação

da expressão deste receptor. No entanto, ao avaliar a ação rápida deste hormônio, foi notado um aumento significativo após 10 minutos de tratamento, quando comparado ao observado nas células controle (Figura 15-B). Em paralelo, a expressão de RAGE foi também verificada. A expressão proteica deste receptor após tratamento de 24 h com T3 também não mostrou diferença significativa em comparação aos cardiomiócitos controle (dados não mostrados). Já a expressão deste receptor em amostras de cardiomiócitos estimulados por minutos com T3, não foi detectada a níveis quantificáveis.

Com relação a MyD88, além do aumento desta proteína, observado no tecido cardíaco dos animais hipertiroideos, houve um aumento da expressão proteica com 10, 15 e 30 minutos, assim como após 24 horas de tratamento com T3 quando comparado ao observado nos cardiomiócitos controle (Figura 15-C).

Dando seguimento à cascata de sinalização, a expressão de IKK fosforilada praticamente não foi detectada em homogenatos proteicos de cardiomiócitos em cultura, apresentando um sinal muito fraco nos blots, o que dificultou a sua quantificação. Além disso, embora o sinal de I κ B fosforilada (Ser 32/36) tivesse sido bem baixo, foi possível determinar a razão de I κ B fosforilada pelos níveis totais de I κ B. No entanto, os cardiomiócitos apresentaram ausência de modulação destas proteínas mesmo após diferentes tempos de estimulação com T3 (Figura 15-D).

O efeito do T3 na atividade do NF- κ B foi mais bem abordada nos experimentos *in vitro*. Paralelamente à quantificação da expressão de NF- κ B fosforilado, foi avaliada a expressão deste fator nuclear em frações proteicas nucleares e citoplasmáticas de cardiomiócitos em cultura. E ainda, a atividade deste fator nuclear foi verificada através do ensaio de gene repórter.

Em relação aos níveis de NF- κ B fosforilado (Ser 536), a rápida estimulação com T3 por 5 min levou ao aumento de fosforilação desta proteína em cardiomiócitos, sem alterações nos outros períodos avaliados da curva tempo-resposta com T3 (Figura 16-A e B). Ao avaliar a expressão de NF- κ B em frações citoplasmáticas e nucleares (Figura 16-D, E, F), observa-se que não houve modulação dos níveis citoplasmáticos desta proteína, no entanto, a expressão nuclear de NF- κ B esteve significativamente aumentada após 30 minutos de tratamento com T3. Estes resultados sugerem uma rápida translocação deste fator para o núcleo após estimulação com T3, onde então deve ser agir na regulação e/ou ativação da transcrição de genes alvos.

Figura 16 - Efeito do T3 na ativação de NF-κB em cardiomiócitos em cultura. Imagem representativa (A) e quantificação de NF-κB (p65) fosforilado (Ser 536) (B). Atividade de NF-κB (p65) mensurado pela atividade da luciferase, através do ensaio de gene repórter (C). Imagem representativa (D) e quantificação da expressão nuclear (E) e citosólica (F) de NF-κB. As células foram mantidas em meio de cultura (controle, representado com a letra C) ou ainda tratadas com T3 pelos tempos indicados, n=4. *p<0,05 vs. controle.

Para confirmar a atividade de NF-κB, a curva tempo-resposta de T3 seguida de experimentos de gene repórter (atividade da luciferase) mostrou que o rápido tratamento por 30 min não modula a atividade deste fator nuclear. No entanto, o aumento da atividade de NF-κB foi observado após 18 e 24 h de tratamento com T3 (Figura 16-C).

Os dados obtidos na avaliação desta sinalização em cardiomiócitos evidenciam a importância em se fazer uso de modelos *in vitro*, no intuito de avaliar os efeitos diretos do HT em sinalizações intracelulares, os quais podem deixar de ser detectados nos experimentos *in vivo*.

5.2.4 Avaliação da participação de MyD88 na hipertrofia do cardiomiócito promovida pelo T3

Como a expressão de MyD88 foi estimulada pelo tratamento com T3 tanto *in vivo* como *in vitro*, passamos a avaliar se esta proteína estaria também envolvida na hipertrofia dos cardiomiócitos. Assim, novamente foram realizados experimentos de silenciamento do gene que codifica a proteína MyD88, através da técnica de RNA de interferência (RNAi). Mais uma vez foram testados três oligos de silenciamento de MyD88 (denominamos como oligos 1, 2 e 3). Cada oligo foi testado em duas concentrações diferentes (50 e 70 nM), por 48h e 72h após transfecção. Em seguida, foi avaliada a expressão proteica de MyD88 por western blot.

Figura 17 - Padronização do silenciamento de MyD88 por RNA de interferência. As células transfectadas com os oligos 1, 2 e 3, cada um com duas concentrações diferentes (50 e 70 nM) e mantidas em cultura por 48 h e 72 h até o momento da extração proteica. As células controles (representadas pela letra C) foram transfectadas com um oligo inespecífico, *scramble*. A) Imagem representativa de blot para MyD88 após 72 h de transfecção, cuja condição escolhida para o silenciamento de MyD88 está indicada pela seta. B) Quantificação da expressão proteica de MyD88 após 72 h de transfecção com o oligo 1 (50 nM). * $p < 0,05$ vs. C, $n = 3$.

Praticamente todas as condições testadas resultaram na diminuição da expressão de MyD88 quando comparada à expressão das células controle. A figura 17-A exibe uma imagem representativa das condições testadas após 72 h de transfecção. Como resultado da padronização, optamos em utilizar o oligo 1, na

concentração de 50 nM após 72 h de transfecção, cujo silenciamento foi em torno de 72% (Figura 17-B).

Uma vez padronizada a condição de melhor silenciamento de MyD88, foi iniciada a análise do envolvimento desta proteína na hipertrofia induzida pelo T3. Foi realizada avaliação da expressão de RNAm de marcadores de hipertrofia cardíaca (ANF e BNP), através da técnica de RT-PCR em Tempo Real, além da análise dos níveis de incorporação de leucina triciada pelas células e medida da área de superfície celular.

Figura 18 - Avaliação da participação de MyD88 na hipertrofia dos cardiomiócitos, resultante do tratamento com T3. A) Análise da expressão de RNAm de ANF e BNP (n=6). B) Ensaio de síntese proteica através da quantificação de incorporação de leucina triciada pelas células (n=3). C) Imagem representativa e D) quantificação da área de superfície das células (n=4). Os cardiomiócitos foram transfectados com oligo controle negativo ou RNAi para MyD88 por 48 h seguido do tratamento com T3 ou mantidos em DMEM por mais 24h. *p<0,05 vs. C; #p<0.05 vs. T3.

Os cardiomiócitos tratados com T3 apresentaram aumento da expressão de RNAm de ANF e BNP, bem como um aumento da síntese proteica e área celular em relação às células controle, como já esperado. A inibição de MyD88 preveniu o aumento de todos os parâmetros analisados. Os cardiomiócitos transfectados com RNAi para MyD88 e que foram tratados com T3 (RNAi+T3) mostraram uma atenuada expressão de ANF e BNP em relação às células tratadas com T3, porém sem diferença estatisticamente significativa. No entanto, tanto a taxa de síntese proteica como a área dos cardiomiócitos foram significativamente diminuídas quando comparadas àquelas do grupo T3, evidenciando que MyD88 também atua para a resposta hipertrófica do cardiomiócito poder ocorrer, frente ao tratamento com T3 (Figura 18).

5.2.5 Avaliação da participação de NF- κ B na hipertrofia do cardiomiócito promovida pelo T3

A análise do envolvimento de NF- κ B na hipertrofia dos cardiomiócitos em resposta ao T3 foi também realizada. Para o estudo de perda de função deste fator nuclear, embora trabalhos reportem o uso de intervenção farmacológica com PDTC (CHEN et al., 2008; GUPTA et al., 2002), este inibidor do NF- κ B mostrou-se tóxico aos cardiomiócitos em cultura, mesmo após algumas tentativas nas quais foram testadas diferentes concentrações de PDTC. Com isso, foi sugerido o uso de JSH-23, um inibidor da translocação do NF- κ B para o núcleo (WANG et al., 2012; WU et al., 2013).

Os mesmos parâmetros, como avaliação da expressão de marcadores de hipertrofia, quantificação da incorporação de leucina e área dos cardiomiócitos confirmaram, mais uma vez, a resposta hipertrófica induzida pelo tratamento com T3. A inibição de NF- κ B, mesmo com o tratamento concomitante com T3 (JSH+T3), reduziu significativamente a expressão de ANF e BNP, a área celular e a síntese proteica em relação às células estimuladas somente com T3. De forma interessante, o tratamento com JSH ainda diminuiu a expressão de ANF e BNP em comparação às células controle (Figura 19), sugerindo que este fator possa ter um papel importante na manutenção da homeostasia celular, mesmo em condições basais.

Assim, com estes dados pode-se afirmar a importante contribuição de NF- κ B para a hipertrofia dos cardiomiócitos estimulados com T3.

Figura 19 - Prevenção da hipertrofia dos cardiomiócitos tratados com T3, após inibição do NF- κ B. A) Análise da expressão de RNAm de ANF e BNP por PCR em tempo real (n=3); B) Incorporação de leucina triciada pelas células (n=4); C) Imagem representativa e D) Medida da área de cardiomiócitos (n=4). As células foram tratadas com T3, JSH, T3 juntamente com JSH (JSH+T3), ou ainda mantidas em DMEM (controle, representado pela letra C) por 24 horas. *P<0,05 vs. controle; #P<0,05 vs. T3.

5.2.6 Efeito do silenciamento da calgranulina A e de MyD88 na ativação do fator NF- κ B

Dando seguimento a estes achados da participação de S100A8, MyD88 e NF- κ B para a resposta hipertrófica induzida pelo T3, foi questionado em seguida se S100A8 e MyD88 seriam necessários para a ativação de NF- κ B pelo T3. Assim, as células foram transfectadas com RNAi para S100A8 ou para MyD88 e a expressão nuclear de NF- κ B foi avaliada por western blot após 30 min de estimulação ou não com T3. Adicionalmente, os cardiomiócitos foram transfectados com os mesmos oligos de RNAi, além da transfecção com o plasmídeo contendo o gene repórter NF- κ B/ luciferase para avaliação da atividade de NF- κ B após 24 h de tratamento com T3.

Figura 20 - Ativação de NF-κB pelo T3 é mediada por S100A8 e MyD88. A) Blot representativo e quantificação da expressão nuclear de NF-κB em células transfectadas com RNAi controle negativo *scramble* (controle, representado com a letra C), transfectadas com RNAi para S100A8 (RNAi A8), transfectadas com RNAi para MyD88 (RNAi MyD88), transfectadas e tratadas com T3, ou ainda tratadas com T3 (n=3-5). B) Atividade de NF-κB através do ensaio gene repórter (luciferase) em células que receberam as mesmas transfecções descritas, além de receberem o plasmídeo com luciferase seguido do tratamento ou não com T3 por 24h (n=4). *p<0,05 vs. C; #p<0,05 vs. T3.

Como esperado, houve um aumento da expressão nuclear e da atividade de NF-κB após a estimulação de cardiomiócitos com T3. No entanto, ambos os grupos de células com inibição de S100A8 e também as que tiveram inibição de MyD88 diminuíram a atividade deste fator nuclear em relação às células do grupo T3 (Figura 20-B). Já em relação à expressão proteica nuclear de NF-κB, somente as células transfectadas com RNAi para MyD88 resultaram em significativa redução dos níveis de NF-κB, quando comparados àqueles das células estimuladas apenas com T3 (Figura 20-A).

Estes resultados confirmam que NF-κB é um importante sinal a jusante de S100A8 e MyD88 em cardiomiócitos em cultura. Além disso, estes dados sugerem que ambos S100A8 e MyD88 devem contribuir para a hipertrofia cardiomiocítica em resposta ao T3 através do acionamento de NF-κB, uma vez que este fator nuclear apresenta estreita relação com o processo hipertrófico.

5.2.7 Participação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA), via receptor AT1, mediando as ações do T3 no eixo S100A8/ MyD88/ NF- κ B

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa evidenciam que os efeitos dos HT na ativação de algumas vias de sinalização, assim como na resposta hipertrófica ou ainda na modulação de parâmetros hemodinâmicos e funcionais no sistema cardiovascular são mediados pelo SRA. Baseado nestes relatos e considerando que o receptor AT1 tem participação fundamental em alguns mecanismos relacionados à resposta inflamatória, nós hipotetizamos que a ação do T3 na expressão de S100A8, bem com na via de sinalização TLR4/ MyD88/ NF- κ B em cardiomiócitos, poderia contar com a participação do receptor AT1.

Assim, com o intuito de avaliar o efeito do AT1 mediando os efeitos do T3, os cardiomiócitos foram tratados com Losartan, um antagonista farmacológico deste receptor.

A análise dos resultados evidenciou que o aumento de S100A8 e também S100A9 após tratamento com T3 foi abolido quando as células foram tratadas em paralelo com losartan (Figura 21). Este dado confirma que a ação do T3 no aumento da expressão destas calgranulinas é mediada pelo receptor AT1.

Figura 21 - O aumento da expressão de S100A8 e S100A9 pelo T3 é mediado pelo receptor AT1 em cardiomiócitos. Expressão de RNAm de S100A8 (A) e S100A9 (B) por real time PCR, de células pré-tratadas com losartan por 30 min sendo em seguida tratadas com T3 e losartan (Los+T3), tratadas apenas com losartan (Los) ou apenas T3 (T3), ou ainda mantidas em DMEM (controle), por 24 horas, n=5. *p<0,05 vs. controle, #p<0,05 vs. T3.

Em seguida, também foi avaliado se o receptor AT1 também atuaria no aumento da expressão de MyD88 pelo T3 em cardiomiócitos. O resultado desta análise sugere que o efeito do T3 na rápida ativação de MyD88 tende a ser atenuado pelo tratamento com losartan. No entanto, esta resposta não foi estatisticamente diferente em comparação às células estimuladas somente com T3 (Figura 22).

Figura 22 - Expressão de MyD88 após tratamento com T3 e/ou losartan em cardiomiócitos. As células foram pré-tratadas com Losartan por 30 min sendo em seguida tratadas com Losartan juntamente com T3 (Los+T3), somente Losartan (Los), somente T3, ou ainda mantidas em DMEM (controle) por 10 min. *p<0,05 vs. controle, n=6.

Por último, foi analisada a influência do receptor AT1 na ativação de NF- κ B. Os resultados mostram que a expressão nuclear de NF- κ B está reduzida nas células tratadas com T3 e losartan, quando comparadas às células que receberam somente T3 (Figura 23-A). Mais uma vez, quando verificamos a atividade de NF- κ B pelo ensaio de gene repórter, a ação do T3 na ativação deste fator nuclear é mediada, de alguma maneira pelo receptor AT1, considerando que o tratamento com losartan e T3 atenuou a atividade da luciferase, em relação às células estimuladas apenas com T3 (Figura 23-B).

Figura 23 - A ativação de NF-κB pelo T3 é mediada pelo receptor AT1 em cardiomiócitos. A) As células foram pré-tratadas com Losartan por 30 min sendo em seguida tratadas com Losartan juntamente com T3 (Los+T3), somente Losartan (Los), somente T3, ou ainda mantidas em DMEM (controle) por 30 min para avaliação da expressão proteica nuclear de NF-κB por western blot. B) Ensaio de gene repórter de células transfectadas com plasmídeo contendo gene da luciferase e que em seguida receberam os mesmos tratamentos descritos, no entanto, por 24 h. * $p < 0,05$ vs. controle, # $p < 0,05$ vs. T3, $n = 5$.

Estes últimos dados apresentados evidenciam a importante contribuição do receptor AT1 mediando os efeitos do HT nesta via de sinalização. No entanto, os mecanismos celulares através dos quais o AT1 intercede na ação do T3 e que poderiam explicar estes resultados ainda não foram esclarecidos em nossos estudos.

Para finalizar, embora as análises iniciais do presente estudo tivessem avaliado mecanismos moleculares responsáveis pelos efeitos dos HT tanto *in vivo* como *in vitro*, os dados obtidos frente aos experimentos utilizando as culturas de cardiomiócitos permitiram um melhor entendimento e controle, em termos temporais, do momento ideal para observação de fenômenos biológicos. Assim, os principais resultados obtidos neste estudo, a partir de experimentos em culturas de cardiomiócitos, encontram-se sumarizados na Figura 24.

Figura 24 - Modelo proposto para ilustrar a participação do eixo S100A8/ TLR4/ MyD88/ NF- κ B na hipertrofia cardiomiocítica induzida pelos HT. O esquema ilustra a ação do T3 estimulando S100A8 e S100A9 (ou calgranulinas A e B, respectivamente), TLR4, MyD88 e NF- κ B (p65) em cardiomiócitos (setas na cor verde). Já a expressão de I κ B não foi alterada pelo tratamento com T3 (seta horizontal na cor azul). Ainda, a ativação do NF- κ B mostrou-se dependente de S100A8 e MyD88. Os ensaios de perda de função, seja pelo uso de RNAi (para S100A8 e MyD88) ou seja pela intervenção farmacológica (inibidor de NF- κ B), demonstraram a importante contribuição destas moléculas na resposta hipertrófica do cardiomiócito decorrente do estímulo com T3. Os mecanismos moleculares diretamente envolvidos neste processo ainda precisam ser mais bem investigados, sugerindo uma possível conversa entre NF- κ B e outros fatores de transcrição como o NFAT. Além disso, embora todos estes resultados possam ter ocorrido pela ação dos HT por si, o SRA, via receptor AT1, contribui de forma crucial mediando os efeitos do T3 nesta sinalização. O mecanismo através do qual o AT1 interfere nos efeitos do T3 é motivo de outros trabalhos em andamento no laboratório.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar aspectos relacionados ao contexto inflamatório na hipertrofia cardíaca induzida pelos HT. De forma sucinta, três principais evidências direcionaram este estudo: 1) o número crescente de trabalhos mostrando mecanismos envolvidos com o processo inflamatório em disfunções cardiovasculares; 2) o aumento de genes pró-inflamatórios no coração de ratos hipertirodeos; 3) e o fato do SRA, com o seu principal peptídeo a Angiotensina II, ter importante ação inflamatória e atuar como mediador de ações cardiovasculares resultante de elevados níveis de HT.

Assim, investigamos a possível ação dos HT nos níveis de citocinas inflamatórias; na expressão de S100A8 e S100A9 (calgranulinas), consideradas importantes moléculas associadas ao dano celular; e também na via de sinalização TLR4/ MyD88/ NF- κ B, no tecido cardíaco de ratos induzidos ao hipertiroidismo experimental. Ainda, a necessidade de destrinchar e isolar mecanismos moleculares complexos e rapidamente ativados pelos HT motivou o uso de culturas primárias de cardiomiócitos, preparadas a partir de ratos neonatos, as quais vêm representando um modelo muito profícuo para estudos de sinalização intracelular. Assim, a contribuição destas moléculas na sinalização para a hipertrofia, em resposta aos elevados níveis de HT, foi também verificada nos experimentos *in vitro*.

Vale ressaltar que, embora os cardiomiócitos sejam fundamentais e contribuam expressivamente para o aumento da massa cardíaca, outros tipos celulares cardíacos assim como células do sistema imune são capazes de participar da regulação da hipertrofia e remodelamento cardíaco (AOYAGI; MATSUI, 2011; FRIELER; MORTENSEN, 2015; GHIGO et al., 2014), o que sugere que estas estejam também sob influência dos HT e possam ser alvo de futuras investigações.

6.1 A respeito dos modelos experimentais utilizados

Diferentes protocolos de indução ao hipertiroidismo experimental, como aquele utilizado no presente estudo, já foram utilizados em nosso laboratório (ANJOS-RAMOS et al., 2006; CARNEIRO-RAMOS et al., 2006; HU et al., 2003; TAVARES et al., 2013). No entanto, embora bem estabelecido, realizamos mais uma vez a confirmação da eficiência do tratamento com HT.

Algumas características dos efeitos provocados pelos elevados níveis de HT são bem peculiares, tornando-se discutível a ação benéfica ou prejudicial deste hormônio no sistema cardiovascular.

Com relação aos dados obtidos, o menor ganho de massa corpórea dos animais hipertiroideos ao longo do tratamento é de certa forma esperado, uma vez que os HT promovem um aumento do metabolismo geral do animal (KROTKIEWSKI, 2002) associado, portanto, à alteração de massa e gasto energético (FELDT-RASMUSSEN, 2007). Outro fato também já observado antes é, proporcionalmente, o maior aumento do ventrículo direito, quando comparado ao do ventrículo esquerdo (GERDES; MOORE; HINES, 1987; HU et al., 2003; ZIEGELHÖFFER-MIHALOVICOVÁ et al., 2003), o que parece estar diretamente relacionado à hipertensão pulmonar que frequentemente é decorrente do hipertiroidismo (VALLABHAJOSULA et al., 2011).

No presente estudo, já a partir do sétimo dia de tratamento de indução ao hipertiroidismo, houve um aumento significativo da pressão arterial sistólica (PAS), em relação àquela observada nos animais do grupo controle. Este efeito não havia sido registrado em trabalhos prévios do laboratório com uso de outro protocolo de tratamento com T4 (ANJOS-RAMOS et al., 2006; HU et al., 2003), cujo aumento da PAS foi somente reportado ao final de 14 dias (DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2007). Esta comparação permite inferir que o efeito do tratamento com T3 talvez seja considerado mais eficiente em relação ao T4, uma vez que o T3 está pronto para agir, sem que necessite sofrer influência da ação de desidratação necessárias para conversão de T4 em T3. Além disso, a administração de duas injeções diárias de T3 mantém os níveis circulantes deste hormônio mais constantes, uma vez que a meia-vida de T3 no soro de ratos é em torno de 7 horas (DANZI; DUBON; KLEIN, 2005).

Em paralelo aos efeitos dos HT na PAS de ratos adultos, recentemente foi demonstrado que o hipertiroidismo induzido durante o período gestacional também está associado a consequências cardiovasculares na prole, incluindo o desenvolvimento de hipertensão (LINO et al., 2015). A partir de todas essas observações, é possível que em nosso estudo a hipertrofia cardíaca mediada por elevados níveis de HT possa ter ocorrido com a participação da aumentada sobrecarga de pressão observada nos animais, embora outros fatores estejam também associados ao aumento da massa muscular cardíaca (HU et al., 2003).

Desta forma, é importante ressaltar que, independentemente das possíveis alterações que os HT promovam sobre a PAS, estes hormônios também agem diretamente sobre o cardiomiócito, aumentando a transcrição gênica e a síntese proteica, promovendo aumento de seu volume celular e da sua contratilidade (CARNEIRO-RAMOS et al, 2010; DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2009).

O aumento da frequência cardíaca (FC) nos animais hipertiroideos também foi notado neste presente estudo. Este efeito ocorre como consequência tanto do aumento da expressão de receptores adrenérgicos no coração, como em função do aumento da expressão de canais iônicos no nodo sinoatrial, em resposta aos elevados níveis de HT (BIONDI et al., 2002; KAHALY; DILLMANN, 2005). Ainda, trabalhos clínicos corroboram o aumento da atividade simpática, e relatam também uma diminuição da modulação vagal no controle da frequência cardíaca em pacientes com hipertiroidismo, conjuntamente descrito como um desbalanço simpatovagal, resultante do hipertiroidismo (CHEN et al., 2006).

De forma geral, estes resultados observados até então não são totalmente inéditos quando comparados a alguns dados já obtidos em nosso laboratório e na literatura. Porém, estas avaliações iniciais são importantes para confiabilidade aos resultados obtidos e segurança para o prosseguimento dos protocolos experimentais.

Com relação às análises *in vitro*, o modelo de cultura primária de cardiomiócitos neonatos é amplamente utilizado na pesquisa básica em cardiologia. Este modelo permite uma avaliação mais específica dos efeitos diretos do T3 nestas células, sem influência de fatores hemodinâmicos existentes *in vivo*. Assim, o uso destas culturas contribui para a caracterização das vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento de hipertrofia, como abordado neste presente estudo, além de ser um modelo para estudos de contração, isquemia e hipóxia a nível celular (ROZANSKI et al., 2013; YANG et al., 2016) ou ainda para estudos relacionados à toxicologia de fármacos e seu transporte (LIMAYE; SHAIKH, 1999; WANG; KANG, 1999).

6.2 Perfil de citocinas inflamatórias após tratamento com T3

Mecanismos que resultam na ativação da resposta imune, como a liberação de citocinas inflamatórias, podem ser desencadeados por fatores neuro-humorais, sobrecarga hemodinâmica e ativação do sistema imune secundária a um stress cardíaco (BAUMGARTEN et al., 2006; MANN, 2003).

Tendo como tema do presente estudo a avaliação de fatores envolvidos com a resposta inflamatória, a análise global de várias citocinas na circulação e no tecido cardíaco dos animais com ou sem tratamento com T3, foi inicialmente verificada. O aumento sérico de GRO-KC, IL-1 α , MIP-3a e RANTES foi acompanhado do aumento de M-CSF e diminuição de IL-5 no coração do grupo hipertiroideo. Considerando o número total de citocinas avaliadas, pode-se notar que estes resultados, de certa forma, apontaram poucas alterações de citocinas circulantes e teciduais pelo tratamento com T3.

Diante dos resultados obtidos, sabe-se que, assim como as calgranulinas, a IL-1 α , aumentada no soro do grupo hipertiroideo, pode ser referida como uma proteína intracelular secretada e reconhecida como um sinal de perigo para as células (BIANCHI, 2007). No entanto, o aumento dos níveis desta interleucina, de GRO-KC e de RANTES, além da diminuição de IL-5 nos ratos hipertiroideos pode representar uma resposta não muito favorável a estes animais. Isto porque que estas alterações foram descritas em casos de insuficiência cardíaca (AUKRUST et al., 1998; CAPPUZZELLO et al., 2011), o que sugere um possível papel destas citocinas correlacionado às desordens implicadas na progressão desta patologia.

De maneira geral, as citocinas que foram detectadas no tecido cardíaco de ambos os grupos experimentais, controle e hipertiroideo, porém sem diferença significativa, apresentam relação com mecanismos de angiogênese (ANJOS-RAMOS et al., 2006; JAQUET et al., 2002) e fibrose (KANELLAKIS et al., 2012). As interleucinas IL-6 e IL-1 β , por exemplo, participam de sinalizações que resultam na formação de tecido fibroso durante a hipertrofia cardíaca estimulada por norepinefrina (BARTH et al., 2000), assim como a IL-4 também contribui para o processo de fibrose cardíaca em camundongos submetidos à constricção da aorta (KANELLAKIS et al., 2012). O tempo de indução ao hipertiroidismo utilizado em nosso trabalho resulta em hipertrofia cardíaca sem alterações na deposição de colágeno, ou seja, não há um processo de fibrose significativo adjunto a esta

condição experimental (LEVICK; FENNING; BROWN, 2005). Tal associação poderia em parte explicar a ausência de modulação destas citocinas citadas no presente estudo.

Com relação a alguns achados descritos na literatura, um trabalho prévio avaliou a expressão de RNAm de algumas citocinas inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em ambos ventrículos esquerdo e direito de ratos tratados com T3 por 6, 24, 48, 72 h, e por 7 e 14 dias e também não encontrou diferença significativa entre os vários grupos e o grupo controle (ZIEGELHÖFFER-MIHALOVICOVÁ et al., 2003). Por outro lado, numa outra condição de hipotireoidismo em ratos, foi notado um aumento de TNF- α e IL-6 no soro destes animais, e ainda, o tratamento de reposição hormonal com LT4 agravou esta resposta (HAJJE et al., 2014). Um outro trabalho ainda mostrou que o tratamento com T3 estimulou a produção e liberação de citocinas, em uma linhagem celular com aumentada expressão do receptor de HT, TR α 1, além de ter sido descrito um aumento de 28 genes relacionados à inflamação nestas células (SHIH et al., 2004). Já do ponto de vista clínico, há um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e RANTES no soro de pacientes hipertiroideos devido à doença auto-imune da glândula tireóide (CELIK et al., 1995; DÍEZ et al., 2002; LABAN-GUCEVA; BOGOEV; ANTOVA, 2007; SENTURK et al., 2003).

De forma geral, os dados encontrados neste estudo, em conjunto como os relatados em trabalhos prévios, embora um pouco diversos, indicam certa influência na produção e/ou liberação de citocinas pelos HT. Assim, as implicações diretas entre a produção de citocinas, bem como outros efeitos no contexto inflamatório nas alterações cardiovasculares desencadeadas pelo hipertireoidismo merecem mais detalhamentos.

Ainda, evidências crescentes sugerem que diferentes células, sob estímulos de estresse ou injúria, têm a capacidade de desencadear uma resposta inflamatória local, que em conjunto com a resposta imune circulante, determina a consequência do dano celular. Embora os cardiomiócitos fossem considerados “expectadores” sem envolvimento ativo na resposta inflamatória decorrente de injúrias cardiovasculares, sabe-se hoje que estas células são capazes de sintetizar e liberar citocinas e quimiocinas. Este fato foi demonstrado, por exemplo, em cardiomiócitos sob estímulo de hipóxia, estresse mecânico e da endotoxina, sendo então capazes de produzir esses peptídeos biológicos (FRANTZ et al., 1999; WESTPHAL et al., 2007;

YANG et al., 2016; YU et al., 2014). Neste contexto, foram avaliadas também algumas citocinas associadas a distúrbios cardiovasculares, e que pudessem ser produzidas localmente pelos cardiomiócitos isolados em cultura quando estimulados com T3. Os resultados demonstraram que a expressão de RNAm de algumas citocinas como IL-6, IL-10 e INF- γ não foi detectada em ambos os grupos de cardiomiócitos controles ou tratados com T3. Já a expressão de IL-1 β e TNF- α , embora quantificada, não mostrou nenhuma alteração frente ao T3.

Mesmo que o coração sob condições normais não expresse constitutivamente algumas citocinas inflamatórias (KAPADIA et al., 1997), uma variedade de estímulos como já mencionado, podem causar a produção destas moléculas. Ainda, já foi evidenciado que embora os cardiomiócitos também contribuam para o estabelecimento do contexto inflamatório no miocárdio, são os fibroblastos e as células endoteliais que parecem ser a principal fonte de sinais inflamatórios (AOYAGI; MATSUI, 2011; MCCARTHY et al., 2014). Considerando estes fatos, os HT talvez não representem um estresse a ponto de deflagrar a produção de citocinas em cardiomiócitos. No entanto, não sabemos se estes hormônios apresentam efeitos a este respeito nos outros tipos celulares presentes no tecido cardíaco, os quais poderiam afetar diretamente a função do cardiomiócito.

6.3 Influência do T3 na expressão de S100A8 e S100A9

O miocárdio responde a uma variedade de injúrias provocadas por diferentes causas não só através da produção e liberação de citocinas, mas também de outros mediadores inflamatórios. As células submetidas a um estresse, por exemplo, são capazes de sintetizar e liberar moléculas endógenas conhecidas como DAMPs (padrões moleculares associados a danos). Neste sentido, dois membros da família de proteínas S100, S100A8 e S100A9, também denominadas respectivamente como calgranulina A e calgranulina B, são apontadas como importantes moléculas primariamente envolvidas na homeostase celular e que podem também agir como sinalizadores de perigo extracelular, quando liberadas como resultado de dano celular (EHRCHEN et al., 2009). Podem ser encontradas em ambos os espaços intra e extracelular e o aumento da sua produção e liberação, geralmente sob condições inflamatórias, resulta na ativação de sinalizações a partir dos receptores de

membrana TLR4 e RAGE, no intuito de amplificar a cascata pró-inflamatória (SCHIOPU; COTOI, 2013; VOLZ et al., 2012).

Além disso, por terem um domínio de ligação ao cálcio, as duas calgranulinas A e B, bem como outros membros desta família de proteínas S100, são amplamente distribuídas de forma específica nos mais diversos tecidos e tipos celulares. Embora sejam constitutivamente expressas em células mielóides (EDGEWORTH et al., 1991; KERKHOFF; KLEMP; SORG, 1998), podem ter sua expressão induzida em células cardíacas, como fibroblastos (RAHIMI et al., 2005), células endoteliais (MCCORMICK et al, 2005; YEN et al., 1997) e cardiomiócitos. (BOYD et al., 2008; WU et al., 2014).

Adicionalmente aos dados preliminares de *microarray*, foi confirmado no presente estudo que as expressões de S100A8 e S100A9 estão aumentadas no tecido cardíaco dos animais hipertiroideos, assim como nos cardiomiócitos tratados com T3. Somente pela avaliação da produção e liberação de citocinas nestas condições experimentais, não podemos afirmar que os HT tenham muitas ações no contexto inflamatório no coração. No entanto, associando o efeito dos HT com relação às calgranulinas, estes dados sugerem que os HT sejam sim considerados um estímulo que funcione como uma ameaça à homeostase celular.

O aumento da expressão da S100A8 não foi acompanhado do aumento desta calgranulina no meio de cultura dos cardiomiócitos tratados com T3, contrariando a nossa expectativa de que a sua liberação ao meio extracelular atuasse diretamente na ativação de vias relacionadas a uma condição inflamatória desencadeada por este hormônio. Apesar disso, trabalhos experimentais que investigaram a ação de S100A8 em cardiomiócitos não mostraram nenhuma dosagem desta calgranulina no sobrenadante celular e mesmo assim descrevem uma relação de S100A8 no contexto inflamatório (BOYD et al., 2008) e na resposta hipertrófica (WEI et al., 2015).

Até recentemente, apenas indicativos, mas não uma direta relação entre S100A8 e modulação do trofismo cardíaco havia sido relatada. No entanto, já se sabe que esta calgranulina está envolvida com a progressão da hipertrofia e disfunção diastólica em um modelo de doença renal crônica (YAN et al., 2014). Ainda, existe uma importante contribuição de S100A9 no estabelecimento da fibrose e hipertrofia cardíaca induzida pela Ang II, uma vez que a administração de anticorpo neutralizante para esta calgranulina reduz a área de cardiomiócitos e o

depósito de colágeno no tecido cardíaco (WU et al., 2014). Na mesma linha a estes achados, no presente estudo foi verificado que a inibição de S100A8 atenuou a hipertrofia do cardiomiócito, sugerindo que o aumento da expressão desta calgranulina pelo T3 contribua para a resposta hipertrófica promovida pelo hormônio.

Entretanto, foi também descrito que a expressão de S100A8 e S100A9 encontra-se aumentada logo após a remoção do estímulo hipertrófico em modelo de constrição da aorta e em cardiomiócitos estimulados com norepinefrina. Este efeito foi considerado favorável, pois o aumento destas calgranulinas contribuiu para a regressão da hipertrofia cardíaca e fibrose gerada nestes modelos (WEI et al., 2015; YANG et al., 2007).

A partir destes dados, é interessante notar que o papel de S100A8 e S100A9 parece não ser homogêneo e o envolvimento destas calgranulinas no contexto da hipertrofia e na patogênese de doenças cardiovasculares tem atraído muito interesse recentemente. Neste sentido, alguns mecanismos pelos quais essas proteínas influenciam a resposta hipertrófica e outras atividades biológicas, como por exemplo, atuação na contratilidade do cardiomiócito, ainda são estudados. Evidências mostram que S100A8 ativa algumas vias como ERK, p38 MAPK e PKC (EHRCHEN et al., 2009). Além disso, após a exposição de cardiomiócitos a endotoxinas, ambas S100A8 e S100A9 interagem com a proteína SERCA2a (cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático), sugerindo a associação de calgranulinas com a regulação da homeostase de cálcio intracelular (BOYD et al., 2008). Aquelas sinalizações bem como algumas proteínas que agem modulando a concentração de cálcio são também influenciadas pelos HT (CARR; KRANIAS, 2002; DAVIS et al., 2000; HAMASAKI et al., 2000). Desta forma, além da investigação da relação entre S100A8 e a via do NF- κ B, a qual foi alvo deste presente estudo, é também provável que exista uma conversa entre S100A8 e outras sinalizações deflagradas pelo T3 em cardiomiócitos. Uma análise mais detalhada pode vir a ser alvo de futuras investigações de nosso grupo.

6.4 Efeito do T3 na expressão de TLR4 e na via de sinalização do NF- κ B

Atualmente a literatura sugere a existência de um sistema intrínseco de resposta ao estresse, mediado em parte por uma família de receptores conhecida como receptores *Toll-like* (TLR). No coração de humanos e de ratos já foram

identificados até o momento 10 TLRs, numerados de 1 a 10, sendo o TLR4 o mais expresso neste tecido, quando comparado aos demais receptores desta família (FRANTZ et al., 1999; MANN, 2011; NISHIMURA; NAITO, 2005).

Como o T3 estimula o aumento de calgranulinas, e estas são consideradas ligantes endógenos destes receptores TLR4, assim como dos receptores RAGE, foi plausível a investigação da expressão destes receptores. Neste estudo, no entanto, somente um rápido aumento de TLR4 foi observado em cardiomiócitos tratados com T3 por 10 minutos, com ausência de efeitos na expressão do receptor RAGE nestas células e também de ambos os receptores no tecido cardíaco dos grupos experimentais. Ainda, a expressão do TLR4 encontrou-se inalterada em corações de ratos tratados por tempos mais agudos (12 e 24 horas, e 7 dias de tratamento com T3), quando comparada àquela do grupo controle (dados não mostrados). Dados da literatura apoiam estes achados, pois o aumento de S100A8 e S100A9 estimulado por Ang II também não foi acompanhado de alteração na expressão proteica de receptores TLR4 e RAGE em cardiomiócitos (WU et al., 2014). No entanto, também já foi demonstrado que a expressão de TLR4 está significativamente aumentada no miocárdio insuficiente de humanos e ratos (BIRKS et al., 2004; FRANTZ et al., 1999; LIU et al., 2015). Talvez os HT sejam capazes de modular os níveis proteicos deste receptor em tratamentos mais prolongados, o que não foi avaliado no presente estudo. É interessante salientar que, embora o hormônio praticamente não tenha alterado o padrão de expressão dos receptores aos quais as calgranulinas se ligam, a expressão basal desses receptores pode não representar um fator limitante para os efeitos desencadeados por elas.

Como tem sido já descrito na literatura, os receptores TLR interagem com moléculas adaptadoras, as quais transmitem o sinal a outras proteínas intracelulares intimamente associadas à ativação do NF- κ B. Dentre estas proteínas adaptadoras está o fator MyD88, o qual então coordena a resposta celular a diferentes agonistas dos TLR.

Neste contexto, o aumento expressivo de MyD88 em resposta ao tratamento com T3, observado tanto nos experimentos *in vivo* como *in vitro*, indicaram a possível deflagração de subseqüentes sinalizações, como a via que resulta na ativação do NF- κ B. Embora a expressão das proteínas envolvidas com a clássica ativação do NF- κ B, como IKK e I κ B, não tenham sido alteradas de forma significativa pelo T3, a atividade do NF- κ B foi demonstrada através da rápida translocação

nuclear e também aumento da atividade da luciferase, utilizada como gene repórter da ação transcricional deste fator.

Os métodos complementares empregados para avaliar a ativação de NF- κ B também mostraram efeitos após diferentes tempos de tratamento com T3. Com relação à avaliação da translocação do NF- κ B para o núcleo, assim como também ocorre em cardiomiócitos expostos a Ang II, endotelina e fenilefrina (PURCELL et al., 2001), um rápido efeito do T3 foi observado. Já a atividade do NF- κ B, mensurada pela técnica de gene repórter com luciferase, mostrou-se aumentada após o tratamento mais prolongado, de 18 e 24 horas com T3. Este fato, também mostrado em outros estudos (GUPTA et al., 2002; SORRIENTO et al., 2010), ocorre provavelmente porque os níveis suficientes da proteína luciferase traduzidos, e portanto disponíveis para que ocorra a reação química e seja detectada a luminescência, precise de um tempo mais longo. Vale a pena ressaltar também que os eventos intracelulares são dinâmicos, e o próprio NF- κ B, assim com outros fatores envolvidos com sinalizações, podem ser ativados e desativados várias vezes em um determinado período de tempo.

Além disso, mostramos que essa ativação de NF- κ B em cardiomiócitos tratados com T3 está intimamente associada à ação de S100A8 e MyD88. E tendo como foco a resposta hipertrófica, evidenciamos que todo esse eixo S100A8, MyD88 e NF- κ B tem crucial participação na hipertrofia do cardiomiócito, sob estímulo do T3.

A estreita relação existente entre S100A8/ S100A9, TLR4, MyD88 e ativação do NF- κ B no miocárdio foi reportada em trabalhos prévios. Em corações de camundongos *knockout* para MyD88 e *knockout* para NF- κ B, a expressão de ambas S100A8 e S100A9 é quase nula, e mesmo estimulando estes animais com LPS, não há aumento destas calgranulinas, como ocorre com os animais selvagens (BOYD et al., 2008). Adicionalmente, além do envolvimento de S100A8/ S100A9 previamente já abordado, todos os outros componentes deste eixo estão implicados em disfunções cardiovasculares, incluindo o processo de hipertrofia cardíaca.

Com relação ao TLR4, tanto o silenciamento local destes receptores em área infartada, como o uso de animais deficientes de TLR4, mostraram melhora da função cardíaca após o infarto do miocárdio, acompanhada da redução da fibrose e remodelamento (LIU et al., 2015; TIMMERS et al., 2008). No modelo de sobrecarga de pressão, camundongos deficientes de TLR4 apresentaram diminuição de NF- κ B, associado à redução da pressão sistólica, da hipertrofia cardíaca e apoptose de

cardiomiócitos, quando comparados aos animais selvagens submetidos ao mesmo insulto (EHRENTAUT et al., 2015; HA et al., 2005). Estes dados sugerem que o TLR4 medeia a ativação de NF- κ B, o qual tem um importante papel nestes parâmetros apontados.

A respeito de MyD88, o bloqueio da ação deste fator, através da inibição farmacológica ou pela transfecção com plasmídeo dominante negativo, também atenuou a hipertrofia decorrente de sobrecarga de pressão e pós-infarto, assim como em cardiomiócitos estimulados com fibrinogênio (HA et al., 2006; LI et al., 2009; VAN TASSELL et al., 2010).

Por último, além de todos estes fatores, a participação de NF- κ B no desenvolvimento da resposta hipertrófica por angiotensina II, fenilefrina, endotelina, miotrofina, dentre outros estímulos, é fundamental (GUPTA et al., 2002; HA et al., 2006; PURCELL et al., 2001; RAJAPUROHITAM et al., 2012; YOUNG et al., 2008). A ausência ou inibição deste fator resulta no efeito regulatório da hipertrofia decorrente destes diferentes estímulos, assim como ocorreu nos cardiomiócitos após tratamento com T3, como demonstrado neste presente estudo. Embora sejam inúmeros os trabalhos mostrando a relação do NF- κ B com a resposta hipertrófica, não havia relatos a respeito da influência que os HT exercem na ativação deste fator de transcrição em cardiomiócitos, bem como da contribuição de toda a sinalização na hipertrofia destas células cardíacas.

Uma importante questão que ainda necessita ser esclarecida é o fato de não sabermos exatamente por quais mecanismos o NF- κ B atua no processo hipertrófico. Por se tratar de um fato de transcrição, a primeira suposição seria a de que o NF- κ B regulasse diretamente a transcrição de genes tipicamente envolvidos com a hipertrofia cardíaca como, por exemplo, ANF, BNP, α -MHC e β -MHC. Entretanto, já foi reportada a ausência de sequências regulatórias específicas na região promotora destes genes, onde o NF- κ B, consequentemente, se ligaria (GORDON; SHAW; KIRSHENBAUM, 2011). Ainda neste contexto, foi demonstrada uma interação física do NF- κ B com o NFAT, um conhecido fator de transcrição relacionado à resposta hipertrófica, capaz de interagir de forma direta na região promotora de genes hipertróficos (LIU et al., 2012). Esta interação pode, de certa forma, explicar um possível mecanismo pelo qual NF- κ B regularia a hipertrofia do cardiomiócito. É possível, inclusive, hipotetizar que este mecanismo esteja ocorrendo após tratamento com T3, pois este hormônio além de ativar o NF- κ B, como descrito neste

presente estudo, também aciona sinalizações que influenciam a translocação de NFAT para o núcleo (dados do laboratório não publicados). No entanto, estudos adicionais devem ainda ser realizados para permitir aprofundar melhor este entendimento.

6.5 Participação do SRA mediando os efeitos dos HT

Uma vez estabelecidos os efeitos dos hormônios tiroideanos no eixo S100A8/S100A9, TLR4, MyD88 e NF- κ B, bem como o envolvimento desta sinalização na hipertrofia do cardiomiócito, o passo seguinte finalmente proposto neste estudo, foi verificar um possível papel do sistema renina angiotensina (SRA) mediando tais ações. Este questionamento a respeito da participação do SRA nas ações dos HT é amplamente abordado em trabalhos da literatura. De fato, essa relação do SRA com HT vem sendo relatada há mais de três décadas (BARRETO-CHAVES et al., 2010) e a avaliação desta interação em implicações fisiopatológicas no sistema cardiovascular é inclusive, considerada como principal alvo de estudo do nosso grupo de pesquisa.

Neste sentido, uma situação de ativação do SRA circulante no hipertiroidismo já é conhecida (BASSET et al., 2001; BOUHNİK et al., 1981; KOBORI et al., 1997; MARCHANT; BROWN; SERNIA, 1993). As ações sistêmicas do SRA, em conjunto com o aumento da produção local de componentes deste sistema em cardiomiócitos, tem um papel crítico no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca decorrente dos elevados níveis de HT. O uso de antagonista do receptor AT1, por exemplo, atenua ou previne a hipertrofia cardíaca induzida pelos HT *in vivo* (DINIZ et al., 2013) e *in vitro* (DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2009). Além disso, estes trabalhos apontam a participação deste receptor de angiotensina II (Ang II) como mediador de eventos celulares e moleculares intimamente associados com a hipertrofia, como a ativação da via da Akt/ mTOR e o aumento da expressão do miR-208a (microRNA-208a) estimulados pelos HT.

No presente estudo, logo na primeira análise foi observado que o aumento da expressão gênica de S100A8 e S100A9 pelo T3 em cardiomiócitos foi totalmente prevenido pelo tratamento com losartan (inibidor do receptor AT1). Do mesmo modo, a ativação do NF- κ B, demonstrada como adjacente à ação de S100A8, foi também atenuada nos cardiomiócitos que receberam aquele fármaco. Embora o aumento da

expressão de MyD88 pelo T3 não tenha sido significativamente reduzida pela inibição do AT1 nos cardiomiócitos, é bem nítido que este processo tende a ocorrer. Apesar disso, estes dados em conjunto comprovam o papel do receptor AT1 mediando os efeitos do HT nesta sinalização.

Estes resultados podem ser explicados considerando todas as evidências já citadas: o fato do receptor AT1 ter papel fundamental na hipertrofia pelos HT, regulando sinalizações envolvidas neste processo; este eixo S100A8/ MyD88/ NF- κ B ser intimamente responsável pela resposta trófica do cardiomiócito sob estímulo com T3; e adicionalmente, os efeitos pelos quais a Ang II, via receptor AT1, medeia respostas inflamatórias são em parte devido à ativação do NF- κ B (BENIGNI; CASSIS; REMUZZI, 2010; BHATT; LOKHANDWALA; BANDAY, 2014; BRASIER, 2010; LAHERA; CACHOFEIRO; DE LAS HERAS, 2011; MACKENZIE, 2011).

Além da relação entre S100A8 e NF- κ B mostrada neste estudo, outros aspectos interessantes são notados neste contexto. A associação direta existente entre esta calgranulina e moléculas atuantes na homeostase do cálcio intracelular, como a SERCA2a (BOYD et al., 2008) suspeitamente pode também estar sendo estimulada no cardiomiócito sob efeito do T3. Esta suposição se faz, pois o HT aumentou a expressão de S100A8, como reportado neste estudo, além de também aumentar a expressão de SERCA2a, efeito inclusive parcialmente dependente do receptor AT1 (DINIZ et al., 2015). Outros dados em andamento no laboratório apontam também a participação do receptor AT1 envolvido nas sinalizações que regulam o fluxo de cálcio intracelular, fundamental para a contratilidade dos cardiomiócitos e que interferem diretamente na reposta hipertrófica destas células. Assim, todos estes efeitos talvez se entrelacem, merecendo então ser investigados.

Neste estudo, a investigação da participação do AT1 como mediadora dos efeitos do T3 foi feita somente *in vitro*, levando em consideração que os principais resultados referentes aos mecanismos moleculares ocorreram nos experimentos com as culturas de cardiomiócitos. Além disso, os dados a respeito das alterações hemodinâmicas observados no hipertiroidismo experimental, como o aumento da pressão arterial sistólica, já foram previamente demonstrados serem mediados pela ação do SRA, via receptores AT1 e também AT2 (DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2007).

A partir de todos estes dados, são questionáveis os mecanismos pelos quais o SRA influencia estas ações geradas inicialmente pelos HT. Como os HT

aumentam a expressão de AT1 e ainda os níveis circulantes e cardíacos de Ang II no hipertiroidismo (BARALDI et al., 2013; CARNEIRO-RAMOS et al., 2010; MARCHANT; BROWN; SERNIA, 1993) e também em cardiomiócitos (DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2009; DINIZ et al., 2012), uma das primeiras hipóteses levantadas seria a de que a hipertrofia pelos HT fosse resultante do aumento dos níveis de Ang II, e este peptídeo operasse então como o grande responsável pelos efeitos iniciados pelos HT. No entanto, este fato não pode ser afirmado, uma vez que o padrão de respostas celulares, teciduais e funcionais por estes dois agentes hipertróficos nem sempre são os mesmos. Um exemplo clássico e evidente a respeito disso, seria em relação à fibrose cardíaca, característica resultante do tratamento com Ang II por apenas duas semanas (KIM et al., 2014; PANG et al., 2015). O tratamento com T3, mesmo com doses bastante elevadas (100 x a dose fisiológica) e por um período de quatro semanas não resulta em significativo depósito de colágeno e fibrose do tecido cardíaco (dados ainda não publicados).

Além disso, as sinalizações deflagradas pelo receptor AT1 são muito mais amplas e complexas do que suposto inicialmente. Podem ser influenciadas por outros receptores, uma vez que o receptor AT1 pode formar heterodímeros com outros receptores do SRA, ou também com o receptor β -adrenérgico (ABDALLA et al., 2001; BARKI-HARRINGTON; LUTTRELL; ROCKMAN, 2003). Este fato, inclusive, pode ter influenciado os efeitos observados neste presente estudo. Ainda, a clássica ligação da Ang II no receptor AT1 que, acoplado à proteína G ativa múltiplas sinalizações, já não é mais considerada a única forma pela qual o AT1 medeia seus efeitos. Este receptor também pode estimular sinalizações independentes de proteína G, como o recrutamento de β -arrestinas, levando à internalização do AT1 (RAKESH et al., 2010). E também, sabe-se que o AT1 pode ser ativado pelo estresse mecânico, na ausência do ligante Ang II (ZOU et al., 2005). Diante destes e de outros mecanismos os quais estão sendo descobertos e relatados, pode-se dizer que é cada vez mais intrigante e desafiador a busca da compreensão das ações do AT1 mediando os efeitos dos HT.

No presente estudo, a análise a respeito da interação entre SRA e HT foi realizada no intuito de contribuir com a descrição de efeitos a partir do receptor AT1, em mais uma importante via ativada na hipertrofia do cardiomiócito pelo T3. Ainda, estes achados dão suporte aos dados já demonstrados previamente evidenciando o

papel crítico do receptor AT1 para o desenvolvimento da hipertrofia dos cardiomiócitos promovida pelos HT.

Estudos mais específicos a respeito dos mecanismos moleculares que explicariam parte dos efeitos desta interação estão atualmente em andamento em nosso laboratório.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e descritos neste estudo, podemos resumidamente concluir que:

Os HT, através de S100A8 e S100A9 (ou calgranulinas A e B), estimulam a via de sinalização TLR4/ MyD88/ NF- κ B, a qual apresenta papel crucial na hipertrofia dos cardiomiócitos, tendo o SRA, via AT1, função mediadora dos efeitos dos HT na ativação desse eixo.

Esses dados em conjunto indicam um novo mecanismo associado a vias ligadas à inflamação através das quais os HT atuam para induzir a hipertrofia dos cardiomiócitos, com participação do receptor AT1.

REFERÊNCIAS¹

- ABDALLA, S.; LOTHER, H.; ABDEL-TAWAB, A. M.; QUITTERER, U. The angiotensin II AT2 receptor is an AT1 receptor antagonist. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 43, p. 39721-39726, 2001.
- ANJOS-RAMOS, L.; CARNEIRO-RAMOS, M. S.; DINIZ, G. P.; MARTINS-SILVA, J.; BARRETO-CHAVES, M. L. Early cardiac hypertrophy induced by thyroxine is accompanied by an increase in VEGF-A expression but not by an increase in capillary density. **Virchows Arch.**, v. 448, n. 4, p. 472-479, 2006.
- ANVERSA, P.; KAJSTURA, J.; OLIVETTI, G. Myocyte death in heart failure. **Curr. Opin. Cardiol.**, v. 11, n. 3, p. 245-251, 1996.
- AOYAGI, T.; MATSUI, T. The cardiomyocyte as a source of cytokines in cardiac injury. **J. Cell. Sci. Ther.**, S5, pii. 003, 2011.
- AUKRUST, P.; UELAND, T.; MULLER, F.; ANDREASSEN, A. K.; NORDOY, I.; AAS, H.; KJEKSHUS, J.; SIMONSEN, S.; FRØLAND, S. S.; GULLESTAD, L. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. **Circulation**, v. 97, n. 12, p. 1136-1143, 1998.
- AVERILL, M. M.; KERKHOFF, C.; BORNFELDT, K. E. S100A8 and S100A9 in cardiovascular biology and disease. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 32, n. 2, p. 223-229, 2012.
- BAKER, K. M.; BOOZ, G. W.; DOSTAL, D. E. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 54, p. 227-241, 1992.
- BALAKUMAR, P.; JAGADEESH, G. A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. **Cell. Signal.**, v. 26, n. 10, p. 2147-2160, 2014.
- BALDWIN, A. S. JR. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. **J. Clin. Invest.**, v. 107, n. 1, p. 3-6, 2001.
- BANERJEE, I.; FUSELER, J. W.; PRICE, R. L.; BORG, T. K.; BAUDINO, T. A. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 293, n. 3, p. H1883-H1891, 2007.
- BARALDI, D.; CASALI, K.; FERNANDES, R. O.; CAMPOS, C.; SARTÓRIO, C.; CONZATTI, A.; COUTO, G. K.; SCHENKEL, P. C.; BELLÓ-KLEIN, A.; ARAUJO, A. R. The role of AT1-receptor blockade on reactive oxygen species and cardiac autonomic drive in experimental hyperthyroidism. **Auton. Neurosci.**, v. 177, n. 2, p. 163-169, 2013.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARKI-HARRINGTON, L.; LUTTRELL, L. M.; ROCKMAN, H. A. Dual inhibition of beta-adrenergic and angiotensin II receptors by a single antagonist: a functional role for receptor-receptor interaction in vivo. **Circulation**, v. 108, n. 13, p. 1611-1618, 2003.

BARRETO-CHAVES, M. L. M.; CARRILLO-SEPÚLVEDA, M. A.; CARNEIRO-RAMOS, M. S.; GOMES, D. G.; DINIZ, G. P. The crosstalk between thyroid hormones and the Renin–Angiotensin System. **Vascul. Pharmacol.**, v. 52, n. 3-4, p. 166–170, 2010.

BARTH, W.; DETEN, A.; BAUER, M.; REINOHS, M.; LEICHT, M.; ZIMMER, H. G. Differential remodeling of the left and right heart after norepinephrine treatment in rats: studies on cytokines and collagen. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.32, n. 2, p. 273-284, 2000.

BASSET, A.; BLANC, J.; MESSAS, E.; HAGÈGE, A.; ELGHOZI, J. L. Renin-angiotensin system contribution to cardiac hypertrophy in experimental hyperthyroidism: an echocardiographic study. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 37, n. 2, p. 163-172, 2001.

BASSO, N.; TERRAGNO, N. A. History about the discovery of the renin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 38, n. 6, p. 1246-1249, 2001.

BAUMGARTEN, G.; KIM, S. C.; STAPEL, H.; VERVÖLGYI, V.; BITTIG, A.; HOEFT, A.; MEYER, R.; GROHÉ, C.; KNUEFERMANN, P. Myocardial injury modulates the innate immune system and changes myocardial sensitivity. **Basic. Res. Cardiol.**, v. 101, n. 5, p. 427-435, 2006.

BENIGNI, A.; CASSIS, P.; REMUZZI, G. Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. **EMBO. Mol. Med.**, v. 2, n. 7, p. 247-257, 2010.

BERGH, J. J.; LIN, H. Y.; LANSING, L.; MOHAMED, S. N.; DAVIS, F. B.; MOUSA, S.; DAVIS, P. J. Integrin alphaVbeta3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. **Endocrinology**, v. 146, p. 2864-2871, 2005.

BERNARDO, B. C.; WEEKS, K. L.; PRETORIUS, L.; MCMULLEN, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. **Pharmacol. Ther.**, v. 128, n. 1, p. 191-227, 2010.

BHATT, S. R.; LOKHANDWALA, M. F.; BANDAY, A. A. Vascular oxidative stress upregulates angiotensin II type I receptors via mechanisms involving nuclear factor kappa B. **Clin. Exp. Hypertens.**, v. 36, n. 6, p. 367-373, 2014.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J. Leukoc. Biol.**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.

BIANCO, A. C.; SILVA, J. E. Nuclear 3,5,3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. **Endocrinology**, v. 120, p. 55-62, 1987.

BIERHAUS, A.; HUMPERT, P. M.; MORCOS, M.; WENDT, T.; CHAVAKIS, T.; ARNOLD, B.; STERN, D. M.; NAWROTH, P. P. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. **J. Mol. Med. (Berl)**, v. 83, n. 11, p. 876-886, 2005.

BIONDI, B.; PALMIERI, E. A.; LOMBARDI, G.; FAZIO, S. Effects of thyroid hormone on cardiac function: the relative importance of heart rate, loading conditions, and myocardial contractility in the regulation of cardiac performance in human hyperthyroidism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 3, p. 968-974, 2002.

BIRKS, E. J.; FELKIN, L. E.; BANNER, N. R.; KHAGHANI, A.; BARTON, P. J.; YACOUB, M. H. Increased toll-like receptor 4 in the myocardium of patients requiring left ventricular assist devices. **J. Heart Lung Transplant.**, v. 23, n. 2, p. 228-235, 2004.

BOHELER, K. R.; CHASSAGNE, C.; MARTIN, X.; WISNEWSKY, C.; SCHWARTZ, K. Cardiac expressions of alpha- and beta-myosin heavy chains and sarcomeric alpha-actins are regulated through transcriptional mechanisms. Results from nuclear run-on assays in isolated rat cardiac nuclei. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 18, p. 12979-12985, 1992.

BOUHNİK, J.; GALEN, F. X.; CLAUSER, E.; MENARD, J.; CORVOL, P. The renin-angiotensin system in thyroidectomized rats. **Endocrinology**, v. 108, n. 2, p. 647-650, 1981.

BOYD, J. H.; KAN, B.; ROBERTS, H.; WANG, Y.; WALLEY, K. R. S100A8 and S100A9 mediate endotoxin-induced cardiomyocyte dysfunction via the receptor for advanced glycation end products. **Circ. Res.**, v. 102, n. 10, p. 1239-1246, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIER, A. R. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. **Cardiovasc. Res.**, v. 86, n. 2, p. 211-218, 2010.

BRASIER, A. R.; JAMALUDDIN, M.; HAN, Y.; PATTERSON, C.; RUNGE, M. S. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) transcription factor. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 212, n. 1-2, p. 155-69, 2000.

BRENT, G. A. The molecular basis of thyroid hormone action. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, n. 13, p. 847-853, 1994.

CANARIS, G. J.; MANOWITZ, N. R.; MAYOR, G.; RIDGWAY, E. C. The Colorado thyroid disease prevalence study. **Arch. Intern. Med.**, v. 160, n. 4, p. 526-534, 2000.

CAPPUZZELLO, C.; DI VITO, L.; MELCHIONNA, R.; MELILLO, G.; SILVESTRI, L.; CESAREO, E.; CREA, F.; LIUZZO, G.; FACCHIANO, A.; CAPOGROSSI, M. C.; NAPOLITANO, M. Increase of plasma IL-9 and decrease of plasma IL-5, IL-7, and IFN- γ in patients with chronic heart failure. **J. Transl. Med.** v. 9, p. 28-34, 2011.

CARNEIRO-RAMOS, M. S.; DINIZ, G. P.; NADU, A. P.; ALMEIDA, J.; VIEIRA, R. L.; SANTOS, R. A.; BARRETO-CHAVES, M. L. M. Blockage of angiotensin II type 2 receptor prevents thyroxine-mediated cardiac hypertrophy by blocking Akt activation. **Basic. Res. Cardiol.**, v. 105, n. 3, p. 325-335, 2010.

CARNEIRO-RAMOS, M. S.; SILVA, V. B.; SANTOS, R. A.; BARRETO-CHAVES, M. L. Tissue-specific modulation of angiotensin-converting enzyme (ACE) in hyperthyroidism. **Peptides**, v. 27, n. 11, p. 2942-2949, 2006.

CARR, A. N.; KRANIAS, E. G. Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. **Thyroid**, v. 12, n. 6, p. 453-457, 2002.

CARRILLO-SEPÚLVEDA, M. A.; CERAVOLO, G. S.; FURSTENAU, C. R.; MONTEIRO, P. DE S.; BRUNO-FORTES, Z.; CARVALHO, M. H.; LAURINDO, F. R.; TOSTES, R. C.; WEBB, R. C.; BARRETO-CHAVES, M. L. Emerging role of angiotensin type 2 receptor (AT2R)/Akt/NO pathway in vascular smooth muscle cell in the hyperthyroidism. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e61982, 2013.

CELIK, I.; AKALIN, S.; ERBAŞ, T. Serum levels of interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha in hyperthyroid patients before and after propylthiouracil treatment. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 132, n. 6, p. 668-672, 1995.

CHAN, A. Y. M.; SOLTYS, C. L. M.; YOUNG, M. E.; PROUD, C. G.; DYCK, J. R. B. Activation of AMP-activated Protein Kinase Inhibits Protein Synthesis Associated with Hypertrophy in the Cardiac Myocyte. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 31, p. 32771-32779, 2004.

CHEN, J. L.; CHIU, H. W.; TSENG, Y. J.; CHU, W. C. Hyperthyroidism is characterized by both increased sympathetic and decreased vagal modulation of heart rate: evidence from spectral analysis of heart rate variability. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, v. 64, n. 6, p. 611-616, 2006.

CHEN, J.; CHEN, Y.; ZHU, W.; HAN, Y.; HAN, B.; XU, R.; DENG, L.; CAI, Y.; CONG, X.; YANG, Y.; HU, S.; CHEN, X. Specific LPA receptor subtype mediation of LPA-induced hypertrophy of cardiac myocytes and involvement of Akt and NFkappaB signal pathways. **J. Cell. Biochem.**, v. 103, n. 6, p. 1718-1731, 2008.

DAHL, P.; DANZI, S.; KLEIN, I. Thyrotoxic cardiac disease. **Curr. Heart Fail. Rep.**, v. 5, n. 3, p. 170-176, 2008.

DANZI, S.; DUBON, P.; KLEIN, I. Effect of serum triiodothyronine on regulation of cardiac gene expression: role of histone acetylation. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 289, n. 4, p. H1506-H1511, 2005.

DAVANI, E. Y.; DORSCHIED, D. R.; LEE, C. H.; VAN BREEMEN, C.; WALLEY, K. R. Novel regulatory mechanism of cardiomyocyte contractility involving ICAM-1 and the cytoskeleton. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 287, p. H1013-H1022, 2004.

DAVIS, F. B.; MOUSA, S. A.; O'CONNOR, L.; MOHAMED, S.; LIN, H. Y.; CAO, H. J.; DAVIS, P. J. Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. **Circ. Res.**, v. 94, n. 11, p. 1500-1506, 2004.

DAVIS, P.J.; SHIH, A.; LIN, H.Y.; MARTINO, L.J.; DAVIS, F.B. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 48, p. 38032-38039, 2000.

DÍEZ, J. J.; HERNANZ, A.; MEDINA, S.; BAYÓN, C.; IGLESIAS, P. Serum concentrations of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and soluble TNF-alpha receptor p55 in patients with hypothyroidism and hyperthyroidism before and after normalization of thyroid function. **Clin. Endocrinol. (Oxf)**, v. 57, n. 4, p. 515-521, 2002.

DINIZ, G. P.; CARNEIRO-RAMOS, M. S.; BARRETO-CHAVES, M. L. Angiotensin type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors mediate the increase in TGF-beta1 in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. **Pflugers. Arch.**, v. 454, n. 1, p. 75-81, 2007.

DINIZ, G. P.; CARNEIRO-RAMOS, M. S.; BARRETO-CHAVES, M. L. M. Angiotensin type 1 receptor mediates thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy through the Akt/GSK-3 β /mTOR signaling pathway. **Basic. Res. Cardiol.**, v. 104, n. 6, p. 653-667, 2009.

DINIZ, G. P.; LINO, C. A.; GUEDES, E. C.; MOREIRA, L. DO N.; BARRETO-CHAVES, M. L. Cardiac microRNA-133 is down-regulated in thyroid hormone-mediated cardiac hypertrophy partially via Type 1 Angiotensin II receptor. **Basic. Res. Cardiol.**, v. 110, n. 5, p. 49, 2015.

DINIZ, G. P.; TAKANO, A. P. C.; BARRETO-CHAVES, M. L. MiRNA-208a and miRNA-208b are triggered in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy - role of type 1 Angiotensin II receptor (AT1R) on miRNA-208a/ α -MHC modulation. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 374, n. 1-2, p. 117-124, 2013.

DINIZ, G. P.; TAKANO, A. P.; BRUNETO, E.; SILVA, F. G.; NUNES, M. T.; BARRETO-CHAVES, M. L. New insight into the mechanisms associated with the rapid effect of T3 on AT1R expression. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 49, n. 1, p. 11-20, 2012.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 33, n. 7, p. 637-668, 2001.

DORN, G. W. 2ND; ROBBINS, J.; SUGDEN, P. H. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. **Circ. Res.**, v. 92, n. 11, p. 1171-1175, 2003.

DZAU, V. J. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. **Circulation**, v. 77, n. 6, p. 14-13, 1988.

EHRCHEN, J. M.; SUNDERKÖTTER, C.; FOELL, D.; VOGL, T.; ROTH, J. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, auto-immunity, and cancer. **J. Leukoc. Biol.**, v. 86, n. 3, p. 557-566, 2009.

EHRENTAUT, H.; FELIX EHRENTAUT, S.; BOEHM, O.; EL AISSATI, S.; FOLTZ, F.; GOELZ, L.; GOERTZ, D.; KEBIR, S.; WEISHEIT, C.; WOLF, M.; MEYER, R.; BAUMGARTEN, G. Tlr4 Deficiency Protects against Cardiac Pressure Overload Induced Hyperinflammation. **PLoS One**, v. 10, n. 11, e0142921, 2015.

ELNAKISH, M. T.; SCHULTZ, E. J.; GEARINGER, R. L.; SAAD, N. S.; RASTOGI, N.; AHMED, A. A.; MOHLER, P. J.; JANSSEN, P.M. Differential involvement of various sources of reactive oxygen species in thyroxine-induced hemodynamic changes and contractile dysfunction of the heart and diaphragm muscles. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 83, p. 252-261, 2015.

FAZIO, S.; PALMIERI, E. A.; LOMBARDI, G.; BIONDI, B. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. **Recent Prog. Horm. Res.**, v. 59, p. 31-50, 2004.

FELDT-RASMUSSEN, U. Thyroid and leptin. **Thyroid**, v. 17, n. 5, p. 413–419, 2007.

FERREIRA, P. J.; L'ABBATE, C.; ABRAHAMSOHN, P. A.; GOUVEIA, C. A.; MORISCOT, A. S. Temporal and topographic ultrastructural alterations of rat heart myofibrils caused by thyroid hormone. **Microsc. Res. Tech.**, v. 62, n. 5, p. 451-459, 2003.

FOELL, D.; FROSCH, M.; SORG, C.; ROTH, J. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. **Clin. Chim. Acta.**, v. 344, n. 1-2, p. 37-51, 2004.

FRANTZ, S.; KOBZIK, L.; KIM, Y. D.; FUKAZAWA, R.; MEDZHITOV, R.; LEE, R. T.; KELLY, R. A. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. **J. Clin. Invest.**, v. 104, n. 3, p. 271-280, 1999.

FRIELER, R. A.; MORTENSEN, R. M. Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. **Circulation**, v. 131, n. 11, p. 1019-1030, 2015.

FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. **J. Intern. Med.**, v. 264, n. 3, p. 224-236, 2008.

GARDNER, D. G.; SHOBACK, D. **Endocrinologia básica e clínica de Greenspan**. 9. ed. São Francisco: McGraw Hill, 2012. 896 p.

GERDES, A. M. Remodeling of ventricular myocytes during cardiac hypertrophy and heart failure. **J. Fla. Med. Assoc.**, v. 79, n. 4, p. 253-255, 1992.

GERDES, A. M.; MOORE, J. A.; HINES, J. M. Regional changes in myocyte size and number in propranolol-treated hyperthyroid rats. **Lab. Invest.**, v. 57, n. 6, p. 708–713, 1987.

GHIGO, A.; FRANCO, I.; MORELLO, F.; HIRSCH, E. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. **Cardiovasc. Res.**, v. 102, n. 2, p. 270-280, 2014.

GHOSH, S.; BALTIMORE, D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. **Nature**, v. 344, n. 6267, p. 678-682, 1990.

GORDON, J. W.; SHAW, J. A.; KIRSHENBAUM, L. A. Multiple facets of NF-κB in the heart: to be or not to NF-κB. **Circ. Res.**, v. 108, n. 9, p. 1122-1132, 2011.

GRIENDLING, K. K.; LASSEGUE, B.; ALEXANDER, R. W. Angiotensin receptors and their therapeutic implications. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 36, p. 281-306, 1996.

GUPTA, S.; PURCELL, N. H.; LIN, A.; SEN, S. Activation of nuclear factor-kappaB is necessary for myotrophin-induced cardiac hypertrophy. **J. Cell. Biol.**, v. 159, n. 6, p. 1019-1028, 2002.

HA, T.; HUA, F.; LI, Y.; MA, J.; GAO, X.; KELLEY, J.; ZHAO, A.; HADDAD, G. E.; WILLIAMS, D. L.; BROWDER, I. W.; KAO, R. L.; LI, C. Blockade of MyD88 attenuates cardiac hypertrophy and decreases cardiac myocyte apoptosis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in vivo. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 290, n. 3, p. H985–H994, 2006.

HA, T.; LI, Y.; HUA, F.; MA, J.; GAO, X.; KELLEY, J.; ZHAO, A.; HADDAD, G. E.; WILLIAMS, D. L.; WILLIAM BROWDER, I.; KAO, R. L.; LI, C. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload. **Cardiovasc. Res.** v. 68, n. 2, p. 224-234, 2005.

HAJJE, G.; SALIBA, Y.; ITANI, T.; MOUBARAK, M.; AFTIMOS, G.; FARÈS, N. Hypothyroidism and its rapid correction alter cardiac remodeling. **PLoS One**, v. 9, n. 10, e109753, 2014.

HAMASAKI, Y.; SHINOHARA, O.; ISHIDA, H.; HAYASHI, Y.; NAKAZAWA, H. Decreased protein kinase C-epsilon expression in hypertrophied cardiac ventricles induced by triiodothyronine treatment in the rat. **Life Sci.**, v. 67, n. 15, p. 1859-1868, 2000.

HASHIKATA, T.; YAMAOKA-TOJO, M.; NAMBA, S.; KITASATO, L.; KAMEDA, R.; MURAKAMI, M.; NIWANO, H.; SHIMOHAMA, T.; TOJO, T.; AKO, J. Rivaroxaban Inhibits Angiotensin II-Induced Activation in Cultured Mouse Cardiac Fibroblasts Through the Modulation of NF-κB Pathway. **Int. Heart. J.**, v. 56, n. 5, p. 544-550, 2015.

HE, Z.; ZHANG, X.; CHEN, C.; WEN, Z.; HOOPES, S. L.; ZELDIN, D. C.; WANG, D. W. Cardiomyocyte-specific expression of CYP2J2 prevents development of cardiac remodelling induced by angiotensin II. **Cardiovasc. Res.**, v. 105, n. 3, p. 304-317, 2015.

HEALY, A. M.; PICKARD, M. D.; PRADHAN, A. D.; WANG, Y.; CHEN, Z.; CROCE, K.; SAKUMA, M.; SHI, C.; ZAGO, A. C.; GARASIC, J.; DAMOKOSH, A. I.; DOWIE, T. L.; POISSON, L.; LILLIE, J.; LIBBY, P.; RIDKER, P. M.; SIMON, D. I. Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. **Circulation**, v. 113, n. 19, p. 2278-2284, 2006.

HEINEKE, J.; MOLKENTIN, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 7, n. 8, p. 589-600, 2006.

HU, L. W.; BENVENUTI, L. A.; LIBERTI, E. A.; CARNEIRO-RAMOS, M. S.; BARRETO-CHAVES, M. L. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 285, p. 1473-1480, 2003.

HU, L. W.; LIBERTI, E. A.; BARRETO-CHAVES, M. L. M. Myocardial ultrastructure in cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone--an acute study in rats. **Virchows. Arch.**, v. 46, n. 3, p. 265-269, 2005.

IONITA, M. G.; ARSLAN, F.; DE KLEIJN, D. P.; PASTERKAMP, G. Endogenous inflammatory molecules engage Toll-like receptors in cardiovascular disease. **J. Innate. Immun.**, v. 2, p. 307-315, 2010.

JAQUET, K.; KRAUSE, K.; TAWAKOL-KHODAI, M.; GEIDEL, S.; KUCK, K. H. Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. **Microvasc. Res.**, v. 64, n. 2, p. 326-333, 2002.

JAVAN, H.; SZUCSIK, A. M.; LI, L.; SCHAAF, C. L.; SALAMA, M. E.; SELZMAN, C. H. Cardiomyocyte p65 nuclear factor- κ B is necessary for compensatory adaptation to pressure overload. **Circ. Heart. Fail.**, v. 8, n. 1, p. 109-118, 2015.

KAHALY, G. J.; DILLMANN, W. H. Thyroid hormone action in the heart. **Endocr. Rev.**, v. 26, n. 5, p. 704-728, 2005.

KANELLAKIS, P.; DITIATKOVSKI, M.; KOSTOLIAS, G.; BOBIK, A. A pro-fibrotic role for interleukin-4 in cardiac pressure overload. **Cardiovasc. Res.**, v. 95, n. 1, p. 77-85, 2012.

KAPADIA, S. R.; ORAL, H.; LEE, J.; NAKANO, M.; TAFFET, G. E.; MANN, D. L. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor- α gene and protein expression in adult feline myocardium. **Circ. Res.**, v. 81, n. 2, p. 187-195, 1997.

KATASHIMA, T.; NARUKO, T.; TERASAKI, F.; FUJITA, M.; OTSUKA, K.; MURAKAMI, S.; SATO, A.; HIROE, M.; IKURA, Y.; UEDA, M.; IKEMOTO, M.; KITAURA, Y. Enhanced expression of the S100A8/A9 complex in acute myocardial infarction patients. **Circ. J.**, v. 74, n.4, p. 741-748, 2010.

KENESSEY, A.; OJAMAA, K. Thyroid hormone stimulates protein synthesis in the cardiomyocyte by activating the Akt-mTOR and p70S6K pathways. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 30, p. 20666-20672, 2006.

KERKHOFF, C.; KLEMPT, M.; SORG, C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1448, n. 2, p. 200-211, 1998.

KIM, Y. S.; KANG, W. S.; KWON, J. S.; HONG, M. H.; JEONG, H. Y.; JEONG, H. C.; JEONG, M. H.; AHN, Y. Protective role of 5-azacytidine on myocardial infarction is associated with modulation of macrophage phenotype and inhibition of fibrosis. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 18, n. 6, p. 1018-1027, 2014.

KLEIN, I. E.; OJAMAA, K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 7, p. 501-509, 2001.

KLEIN, I. Thyroid hormone and cardiac contractility. **Am. J. Cardiol.**, v. 91, n. 11, p. 1331-1332, 2003.

KLEIN, I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **Am. J. Med.**, v. 88, n. 6, p. 631-637, 1990.

KOBORI, H.; ICHIHARA, A.; SUZUKI, H.; TAKENAKA, T.; MIYASHITA, Y.; HAYASHI, M.; SARUTA, T. Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy induced in rats by hyperthyroidism. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 2 Pt 2, p. H593-H599, 1997.

KROTKIEWSKI, M. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 440, n. 2-3, p. 85-98, 2002.

KUMAR, R.; SINGH, V. P.; BAKER, K. M. The intracellular renin-angiotensin system in the heart. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 11, n. 2, p. 104-110, 2009.

KUMAR, R.; THOMAS, C. M.; YONG, Q. C.; CHEN, W.; BAKER, K. M. The intracrine renin-angiotensin system. **Clin. Sci. (Lond)**, v. 123, n. 5, p. 273-284, 2012.

KUZMAN, J. A.; O'CONNELL, T. D.; GERDES, A. M. Rapamycin prevents thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy. **Endocrinology**, v. 148, n. 7, p. 3477-3484, 2007.

KUZMAN, J. A.; GERDES, A. M.; KOBAYASHI, S.; LIANG, Q. Thyroid hormone activates Akt and prevents serum starvation-induced cell death in neonatal rat cardiomyocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 39, n. 5, p. 841-844, 2005.

LABAN-GUCEVA, N.; BOGOEV, M.; ANTOVA, M. Serum concentrations of interleukin (IL-)1alpha, 1beta, 6 and tumor necrosis factor (TNF) alpha in patients with thyroid eye disease (TED). **Med. Arh.**, v. 61, n. 4, p. 203-206, 2007.

LAHERA, V.; CACHOFEIRO, V.; DE LAS HERAS, N. Interplay of Hypertension, Inflammation, and Angiotensin II. **Am. J. Hypertens.**, v. 24, n. 10, p.1059, 2011.

LEVICK, S.; FENNING, A.; BROWN, L. Increased calcium influx mediates increased cardiac stiffness in hyperthyroid rats. **Cell. Biochem. Biophys.**, v. 43, n. 1, p. 53-60, 2005.

LEVY, D.; GARRISON, R. J.; SAVAGE, D. D.; KANNEL, W. B.; CASTELLI, W. P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, n. 22, p. 1561-1566, 1990.

LI, R.; XIAO, J.; QING, X.; XING, J.; XIA, Y.; QI, J.; LIU, X.; ZHANG, S.; SHENG, X.; ZHANG, X.; JI, X. Sp1 Mediates a Therapeutic Role of MiR-7a/b in Angiotensin II-Induced Cardiac Fibrosis via Mechanism Involving the TGF- β and MAPKs Pathways in Cardiac Fibroblasts. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, e0125513, 2015.

LI, T.; WANG, Y.; LIU, C.; HU, Y.; WU, M.; LI, J.; GUO, L.; CHEN, L.; CHEN, Q.; HA, T.; LI, C.; LI, Y. MyD88-dependent nuclear factor-kappaB activation is involved in fibrinogen-induced hypertrophic response of cardiomyocytes. **J. Hypertens.**, v. 27, n. 5, p. 1084-1093, 2009.

LI, Y.; HA, T.; GAO, X.; KELLEY, J.; WILLIAMS, D. L.; BROWDER, I. W.; KAO, R. L.; LI, C. NF-kappaB activation is required for the development of cardiac hypertrophy in vivo. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 287, n. 4, p. H1712-20, 2004.

LIMAYE, D. A.; SHAIKH, Z. A. Cytotoxicity of cadmium and characteristics of its transport in cardiomyocytes. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 154, n. 1, p. 59-66, 1999.

LIN, L.; KNOWLTON, A. A. Innate immunity and cardiomyocytes in ischemic heart disease. **Life Sci.**, v. 100, n. 1, p. 1-8, 2014.

LINO, C. A.; DA SILVA, I. B.; SHIBATA, C. E.; MONTEIRO, P. DE S.; BARRETO-CHAVES, M. L. Maternal hyperthyroidism increases the susceptibility of rat adult offspring to cardiovascular disorders. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 416, p. 1-8, 2015.

LIU, L.; WANG, Y.; CAO, Z. Y.; WANG, M. M.; LIU, X. M.; GAO, T.; HU, Q. K.; YUAN, W. J.; LIN, L. Up-regulated TLR4 in cardiomyocytes exacerbates heart failure after long-term myocardial infarction. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 19, n. 12, p. 2728-2740, 2015.

LIU, Q.; CHEN, Y.; AUGER-MESSIER, M.; MOLKENTIN, J. D. Interaction between NF κ B and NFAT coordinates cardiac hypertrophy and pathological remodeling. **Circ. Res.**, v. 110, n. 8, p. 1077-1086, 2012.

LYU, L.; WANG, H.; LI, B.; QIN, Q.; QI, L.; NAGARKATTI, M.; NAGARKATTI, P.; JANICKI, J. S.; WANG, X. L.; CUI, T. A critical role of cardiac fibroblast-derived exosomes in activating renin angiotensin system in cardiomyocytes. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 89, p. 268-279, 2015.

MACKENZIE, A. Endothelium-derived vasoactive agents, AT1 receptors and inflammation. **Pharmacol. Ther.**, v. 131, n. 2, p. 187-203, 2011.

MANN, D. L. Stress-activated cytokines and the heart: from adaptation to maladaptation. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 65, p. 81-101, 2003.

MANN, D. L. The emerging role of innate immunity in the heart and vascular system: for whom the cell tolls. **Circ. Res.**, v. 108, n. 9, p. 1133-1145, 2011.

MARCHANT, C.; BROWN, L.; SERNIA, C. Renin-angiotensin system in thyroid dysfunction in rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 22, n. 3, p. 449-455, 1993.

MCCARTHY, C. G.; GOULOPOULOU, S.; WENCESLAU, C. F.; SPITLER, K.; MATSUMOTO, T.; WEBB, R. C. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v. 306, n. 2, p. H184-196., 2014.

MCCORMICK, M. M.; RAHIMI, F.; BOBRYSHV, Y. V.; GAUS, K.; ZREIQAT, H.; CAI, H.; LORD, R. S.; GECZY, C. L. S100A8 and S100A9 in human arterial wall: Implications for atherogenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 50, p. 41521-41529, 2005.

MCMULLEN, J.R.; JENNINGS, G.L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 34, n. 4, p. 255-262, 2007.

MEHRA, V. C.; RAMGOLAM, V. S.; BENDER, J. R. Cytokines and cardiovascular disease. **J. Leukoc. Biol.**, v. 78, p. 805-818, 2005.

MIGUEL-CARRASCO, J. L.; ZAMBRANO, S.; BLANCA, A. J.; MATE, A.; VÁZQUEZ, C. M. Captopril reduces cardiac inflammatory markers in spontaneously hypertensive rats by inactivation of NF-kB. **J. Inflamm. (Lond)**, v. 12, p. 7-21, 2010.

MONTECUCCO, F.; PENDE, A.; MACH, F. The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies. **Mediators. Inflamm.**, v. 2009, p. 1-13, 2009.

MORKIN, E. Stimulation of cardiac myosin adenosine triphosphatase in thyrotoxicosis. **Circ. Res.**, v. 44, n. 1, p. 1-7, 1979.

MOST, P.; REMPPIS, A.; PLEGER, S. T.; KATUS, H. A.; KOCH, W. J. S100A1: a novel inotropic regulator of cardiac performance. Transition from molecular physiology to pathophysiological relevance. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 293, n. 2, p. R568-577, 2007.

MUSCOGIURI, G.; CHAVEZ, A. O.; GASTALDELLI, A.; PEREGO, L.; TRIPATHY, D.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L.; FOLLI, F. The crosstalk between insulin and renin-angiotensin-aldosterone signaling systems and its effect on glucose metabolism and diabetes prevention. **Curr. Vasc. Pharmacol.**, v. 6, n. 4, p. 301-312, 2008.

NAG, A. C. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. **Cytobios**, v. 28, n. 109, 41-61, 1980.

NISHIMURA, M.; NAITO, S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 28, p. 886-892, 2005.

NUNES, M. T. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 47, n. 6, p. 639-643, 2003.

OJAMAA, K. Signaling mechanisms in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy **Vascul. Pharmacol.**, v. 52, n. 3-4, p. 113-119, 2010.

O'SHEA, J. M.; PERKINS, N. D. Regulation of the RelA (p65) transactivation domain. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 36, (Pt 4), p. 603-608, 2008.

PACHER, P.; NAGAYAMA, T.; MUKHOPADHYAY, P.; BATKAI, S.; KASS, D. A. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. **Nat. Protoc.**, v. 3, n. 9, p. 1422-1434, 2008.

PANG, X. F.; ZHANG, L. H.; BAI, F.; WANG, N. P.; GARNER, R. E.; MCKALLIP, R. J.; ZHAO, Z. Q. Attenuation of myocardial fibrosis with curcumin is mediated by modulating expression of angiotensin II AT1/AT2 receptors and ACE2 in rats. **Drug. Des. Devel. Ther.**, v. 9, p. 6043-6054, 2015.

PANTOS, C.; DRITSAS, A.; MOUROUZIS, I.; DIMOPOULOS, A.; KARATASAKIS, G.; ATHANASSOPOULOS, G.; MAVROGENI, S.; MANGINAS, A.; COKKINOS, D. V. Thyroid hormone is a critical determinant of myocardial performance in patients with heart failure: potential therapeutic implications. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 157, n. 4, p. 515-520, 2007b.

PANTOS, C.; MOUROUZIS, I.; MARKAKIS, K.; TSAGOULIS, N.; PANAGIOTOU, M.; COKKINOS, D. V. Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. **Basic. Res. Cardiol.**, v. 103, n. 4, p. 308-318, 2008.

PANTOS, C.; XINARIS, C.; MOUROUZIS, I.; MALLIOPOULOU, V.; KARDAMI, E.; COKKINOS, D. V. Thyroid hormone changes cardiomyocyte shape and geometry via ERK signaling pathway: potential therapeutic implications in reversing cardiac remodeling? **Mol. Cell. Biochem.**, v. 297, n. 1-2, p. 65-72, 2007a.

POPESCU, L. M.; GHERGHICEANU, M.; HINESCU, M. E.; CRETOIU, D.; CEAFALAN, L.; REGALIA, T.; POPESCU, A. C.; ARDELEANU, C.; MANDACHE, E. Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). **J. Cell. Mol. Med.**, v. 10, n. 2, p. 429-458, 2006.

PURCELL, N. H.; TANG, G.; YU, C.; MERCURIO, F.; DIDONATO, J. A.; LIN, A. Activation of NF-kappa B is required for hypertrophic growth of primary rat neonatal ventricular cardiomyocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 98, n. 12, p. 6668-6673, 2001.

RAHIMI, F.; HSU, K.; ENDOH, Y.; GECZY, C. L. FGF-2, IL-1beta and TGF-beta regulate fibroblast expression of S100A8. **FEBS J.**, v. 272, n. 11, p. 2811-2827, 2005.

RAIZADA, V.; HILLERSON, D.; AMARAM, J. S.; SKIPPER, B. Angiotensin II-mediated left ventricular abnormalities in chronic kidney disease. **J. Investig. Med.**, v. 60, n. 5, p. 785-791, 2012.

RAJAPUROHITAM, V.; KILIC, A.; JAVADOV, S.; KARMAZYN, M. Role of NF- κ B and p38 MAPK activation in mediating angiotensin II and endothelin-1-induced stimulation in leptin production and cardiomyocyte hypertrophy. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 366, n. 1-2, p. 287-297, 2012.

RAKESH, K.; YOO, B.; KIM, I. M.; SALAZAR, N.; KIM, K. S.; ROCKMAN, H. A. beta-Arrestin biased agonism of the angiotensin receptor induced by mechanical stress. **Sci. Signal.**, v. 3, n. 125, ra46, 2010.

ROZANSKI, A.; TAKANO, A. P.; KATO, P. N.; SOARES, A. G.; LELLIS-SANTOS, C.; CAMPOS, J. C.; FERREIRA, J. C.; BARRETO-CHAVES, M. L.; MORISCOT, A. S. M-protein is down-regulated in cardiac hypertrophy driven by thyroid hormone in rats. **Mol. Endocrinol.**, v. 27, n. 12, p. 2055-2065, 2013.

SABBAH, H. N.; SHAROV, V. G.; GOLDSTEIN, S. Cell death, tissue hypoxia and the progression of heart failure. **Heart Fail. Rev.**, v. 5, n. 2, p. 131-138, 2000.

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiacfibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. **Circ. Res.**, v. 73, n.3, p. 413-423, 1993.

SATA, M.; FUKUDA, D. Crucial role of renin–angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. **J. Med. Invest.**, v. 57, n. 1-2, p. 12-25, 2010.

SAVOIA, C.; SCHIFFRIN, E. L. Inflammation in hypertension. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 15, n. 2, p. 152-158, 2006.

SCHAEFER, A.; KLEIN, G.; BRAND, B.; LIPPOLT, P.; DREXLER, H.; MEYER, G. P. Evaluation of left ventricular diastolic function by pulsed Doppler tissue imaging in mice. **J. Am. Soc. Echocardiogr.**, v. 16, n. 11, p. 1144-1149, 2003.

SCHIOPU, A.; COTOI, O. S. S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease. **Mediators. Inflamm.**, v. 2013, n. 828354, p. 1-10, 2013.

SCHMIDT-OTT, U. M.; ASCHEIM, D. D. Thyroid hormone and heart failure. **Curr. Heart. Fail. Rep.**, v. 3, n. 3, p. 114-119, 2006.

SENTURK, T.; KOZACI, L. D.; KOK, F.; KADIKOYLU, G.; BOLAMAN, Z. Proinflammatory cytokine levels in hyperthyroidism. **Clin. Invest. Med.**, v. 26, n. 2, p. 58-63, 2003.

SHIRANI J.; BARRON, M. M.; PIERRE-LOUIS, M. L.; ROBERTS, W. C. Congestive heart failure, dilated cardiac ventricles, and sudden death in hyperthyroidism. **Am. J. Cardiol.**, v. 72, n. 3, p. 365-368, 1993.

SORRIENTO, D.; SANTULLI, G.; FUSCO, A.; ANASTASIO, A.; TRIMARCO, B.; IACCARINO, G. Intracardiac injection of AdGRK5-NT reduces left ventricular hypertrophy by inhibiting NF-kappaB-dependent hypertrophic gene expression. **Hypertension**, v. 56, n. 4, p. 696-704, 2010.

SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 35, n. 6, p. 881-900, 2003.

TAKANO, A. P. C.; DINIZ, G. P.; BARRETO-CHAVES, M. L. AMPK signaling pathway is rapidly activated by T3 and regulates the cardiomyocyte growth. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 376, n. 1-2, p. 43-50, 2013.

TAVARES, F. M.; DA SILVA, I. B.; GOMES, D. A.; BARRETO-CHAVES, M. L. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) is associated with increased tolerance of the hyperthyroid heart to ischemia-reperfusion. **Cardiovasc. Drugs. Ther.**, v. 27, n. 5, p. 393-402, 2013.

TIMMERS, L.; SLUIJTER, J. P.; VAN KEULEN, J. K.; HOEFER, I. E.; NEDERHOFF, M. G.; GOUMANS, M. J.; DOEVENDANS, P. A.; VAN ECHTELD, C. J.; JOLLES, J. A.; QUAX, P. H.; PIEK, J. J.; PASTERKAMP, G.; DE KLEIJN, D. P. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. **Circ. Res.**, v. 102, n.2, p. 257-264, 2008.

TROST, S. U.; SWANSON, E.; GLOSS, B.; WANG-IVERSON, D. B.; ZHANG, H.; VOLODARSKY, T.; GROVER, G. J.; BAXTER, J. D.; CHIELLINI, G.; SCANLAN, T. S.; DILLMANN, W. H. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. **Endocrinology**, v. 141, n. 9, p. 3057-3064. 2000.

TSOPORIS, J. N.; MARKS, A.; KAHN, H. J.; BUTANY, J. W.; LIU, P. P.; O'HANLON, D.; PARKER, T. G. S100beta inhibits alpha1-adrenergic induction of the hypertrophic phenotype in cardiac myocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 50, p. 31915-31921, 1997.

TSOPORIS, J. N.; MARKS, A.; HADDAD, A.; O'HANLON, D.; JOLLY, S.; PARKER, T. G. S100A6 is a negative regulator of the induction of cardiac genes by trophic stimuli in cultured rat myocytes. **Exp. Cell. Res.**, v. 303, n. 2, p. 471-481, 2005.

VALLABHAJOSULA, S.; RADHI, S.; CEVIK, C.; ALALAWI, R.; RAJ, R.; NUGENT, K. Hyperthyroidism and pulmonary hypertension: na importante association. **Am. J. Med. Sci.**, v. 342, n. 6, p. 507-512, 2011.

VAN TASSELL, B. W.; SEROPIAN, I. M.; TOLDO, S.; SALLOUM, F. N.; SMITHSON, L.; VARMA, A.; HOKE, N. N.; GELWIX, C.; CHAU, V.; ABBATE, A. Pharmacologic inhibition of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) prevents left ventricular dilation and hypertrophy after experimental acute myocardial infarction in the mouse. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 55, n. 4, p. 385-390, 2010.

VLIEGEN, H. W.; VAN DER LAARSE, A.; CORNELISSE, C. J.; EULDERINK, F. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy: a study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. **Eur. Heart J.**, v. 12, n. 4, p. 488-494, 1991.

VOGL, T.; TENBROCK, K.; LUDWIG, S.; LEUKERT, N.; EHRHARDT, C.; VAN ZOELLEN, M. A.; NACKEN, W.; FOELL, D.; VAN DER POLL, T.; SORG, C.; ROTH, J. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. **Nat. Med.**, v.13, n. 9, p. 1042-1049, 2007.

VOLZ, H. C.; LAOHACHEWIN, D.; SEIDEL, C.; LASITSCHKA, F.; KEILBACH, K.; WIENBRANDT, A. R.; ANDRASSY, J.; BIERHAUS, A.; KAYA, Z.; KATUS, H. A.; ANDRASSY, M. S100A8/A9 aggravates post-ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF- κ B signaling. **Basic Res. Cardiol.**, v. 107, n. 2, p. 250, 2012.

WANG, G. W.; KANG, Y. J. Inhibition of doxorubicin toxicity in cultured neonatal mouse cardiomyocytes with elevated metallothionein levels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 288, n. 3, p. 938-944, 1999.

WANG, X.; KHAIDAKOV, M.; DING, Z.; MITRA, S.; LU, J.; LIU, S.; MEHTA, J. L. Cross-talk between inflammation and angiotensin II: studies based on direct transfection of cardiomyocytes with AT1R and AT2R cDNA. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 237, n. 12, p. 1394-1401, 2012.

WEI, X.; WU, B.; ZHAO, J.; ZENG, Z.; XUAN, W.; CAO, S.; HUANG, X.; ASAKURA, M.; XU, D.; BIN, J.; KITAKAZE, M.; LIAO, Y. Myocardial Hypertrophic Preconditioning Attenuates Cardiomyocyte Hypertrophy and Slows Progression to Heart Failure Through Upregulation of S100A8/A9. **Circulation**, v. 131, n. 17, p. 1506-1517, 2015.

WESTPHAL, E.; CHEN, L.; PILOWSKI, C.; KOCH, S.; EBELT, H.; MÜLLER-WERDAN, U.; WERDAN, K.; LOPPNOW, H. Endotoxin-activated cultured neonatal rat cardiomyocytes express functional surface-associated interleukin-1 α . **J. Endotoxin. Res.**, v. 13, n. 1, p. 25-34, 2007.

WOLLERT, K. C.; DREXLER, H. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. **Cardiovasc. Res.**, v. 43, n. 4, p. 838-849, 1999.

WU, X.; HUANG, W.; LUO, G.; ALAIN, L. A. Hypoxia induces connexin 43 dysregulation by modulating matrix metalloproteinases via MAPK signaling. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 384, n. 1-2, p. 155-162, 2013.

WU, Y.; LI, Y.; ZHANG C. A. X.; WANG, Y.; CUI, W.; LI, H.; DU, J. S100a8/a9 released by CD11b+Gr1+ neutrophils activates cardiac fibroblasts to initiate angiotensin II-Induced cardiac inflammation and injury. **Hypertension**, v. 63, n. 6, p. 1241-1250, 2014.

XU, T.; ZHANG, B.; YANG, F.; CAI, C.; WANG, G.; HAN, Q.; ZOU, L. HSF1 and NF- κ B p65 participate in the process of exercise preconditioning attenuating pressure

overload-induced pathological cardiac hypertrophy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 460, n. 3, p. 622-627, 2015.

XU, W.; HOU, D.; JIANG, X.; LU, Z.; GUO, T.; LIU, Y.; WANG, D.; ZEN, K.; YU, B.; ZHANG, C. Y. The protective role of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α in hyperthyroid cardiac hypertrophy. **J. Cell. Physiol.**, v. 227, n. 9, p. 3243-3253, 2012.

YAN, L.; MATHEW, L.; CHELLAN, B.; GARDNER, B.; EARLEY, J.; PURI, T. S.; HOFMANN BOWMAN, M. A. S100/Calgranulin-mediated inflammation accelerates left ventricular hypertrophy and aortic valve sclerosis in chronic kidney disease in a receptor for advanced glycation end products-dependent manner. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 34, n. 7, p. 1399-1411, 2014.

YANG, D. K.; CHOI, B. Y.; LEE, Y. H.; KIM, Y. G.; CHO, M. C.; HONG, S. E.; KIM DO, H.; HAJJAR, R. J.; PARK, W. J. Gene profiling during regression of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. **Physiol. Genomics**, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2007.

YANG, J.; CHEN, L.; DING, J.; ZHANG, J.; FAN, Z.; YANG, C.; YU, Q.; YANG, J. Cardioprotective effect of miRNA-22 on hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocyte injury in neonatal rats. **Gene**, v. 579, n. 1, p. 17-22, 2016.

YEN, T.; HARRISON, C. A.; DEVERY, J. M.; LEONG, S.; IISMAA, S. E.; YOSHIMURA, T.; GECZY, C. L. Induction of the S100 chemotactic protein, CP-10, in murine microvascular endothelial cells by proinflammatory stimuli. **Blood**, v. 90, n. 12, p. 4812-4821, 1997.

YOUNG, D.; POPOVIC, Z. B.; JONES, W. K.; GUPTA, S. Blockade of NF-kappaB using IkappaB alpha dominant-negative mice ameliorates cardiac hypertrophy in myotrophin-overexpressed transgenic mice. **J. Mol. Biol.**, v. 381, n. 3, p. 559-568, 2008.

YU, C. M.; SANDERSON, J. E.; MARWICK, T. H.; OH, J.K. Tissue Doppler imaging a new prognosticator for cardiovascular diseases. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 49, n. 19, p. 1903-1914, 2007.

YU, X.; JIA, B.; WANG, F.; LV, X.; PENG, X.; WANG, Y.; LI, H.; WANG, Y.; LU, D.; WANG, H. α_1 adrenoceptor activation by norepinephrine inhibits LPS-induced cardiomyocyte TNF- α production via modulating ERK1/2 and NF- κ B pathway. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 18, n. 2, p. 263-273. 2014.

ZELARAYAN, L.; RENGGER, A.; NOACK, C.; ZAFIRIOU, M. P.; GEHRKE, C.; VAN DER NAGEL, R.; DIETZ, R.; DE WINDT, L.; BERGMANN, M. W. NF-kappaB activation is required for adaptive cardiac hypertrophy. **Cardiovasc. Res.**, v. 84, n. 3, p. 416-424, 2009.

ZHANG, L.; LIU, M.; JIANG, H.; YU, Y.; YU, P.; TONG, R.; WU, J.; ZHANG, S.; YAO, K.; ZOU, Y.; GE, J. Extracellular high-mobility group box 1 mediates pressure overload-induced cardiac hypertrophy and heart failure. **J. Cell. Mol. Med.**, 2015. [In press]

ZIEGELHÖFFER-MIHALOVICOVÁ, B.; BRIEST, W.; BABA, H. A.; RASSLER, B.; ZIMMER, H. G. The expression of mRNA of cytokines and of extracellular matrix proteins in triiodothyronine-treated rat hearts. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 247, n.1-2, p. 61-68, 2003.

ZOU, Y.; AKAZAWA, H.; QIN, Y.; SANO, M.; TAKANO, H.; MINAMINO, T.; MAKITA, N.; IWANAGA, K.; ZHU, W.; KUDOH, S.; TOKO, H.; TAMURA, K.; KIHARA, M.; NAGAI, T.; FUKAMIZU, A.; UMEMURA, S.; LIRI, T.; FUJITA, T.; KOMURO, I. Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. **Nat. Cell. Biol.**, v. 6, n. 6, p. 499-506, 2004.