PRISCILLA DE SOUZA MONTEIRO

**O efeito do hipotireoidismo experimental sobre os componentes
da matriz extracelular de aortas torácicas de ratos**

Dissertação apresentada ao Departamento
de Anatomia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2012

Priscilla de Souza Monteiro

**O EFEITO DO HIPOTIROIDISMO EXPERIMENTAL SOBRE OS COMPONENTES
DA MATRIZ EXTRACELULAR DE AORTAS TORÁCICAS DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Departamento
de Anatomia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Ciências
Morfofuncionais

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

Versão original

São Paulo
2012

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

© reprodução total

Monteiro, Priscilla de Souza.

O efeito do hipotireoidismo experimental sobre os componentes da matriz extracelular de aortas torácicas de ratos / Priscilla de Souza Monteiro. -- São Paulo, 2012.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Estudo morfofuncional do sistema renina-angiotensina.

Versão do título para o inglês: The effect of experimental hypothyroidism on components of the extracellular matrix of rats thoracic aortas.

1. Hipotireoidismo 2. Aorta torácica 3. Colágeno 4. Elastina 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/SBIB0100/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscilla de Souza Monteiro.

Título da Dissertação: O efeito do hipotireoidismo experimental sobre os componentes da matriz extracelular de aortas torácicas de ratos.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

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. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.023.07.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 114/04/CEEA, aprovo a inclusão dos alunos: **Amanda Cândido da Silva, Arnaldo Luiz Galvão Júnior, Caroline Emy Rodrigues Shibata, Dayane Aparecida Gomes, Priscilla de Souza Monteiro**, ao protocolo intitulado: *"Papel do sistema renina-angiotensina na hipertrofia cardíaca e/ou renal induzida pelos hormônios tiroideanos"*, para uso da espécie animal utilizado e métodos semelhantes, mediante solicitação da Profa. Dra. MARIA LUIZA MORAIS BARRETO DE CHAVES, responsável pela linha de Pesquisa.

São Paulo, 22 de agosto de 2007.

PROF. DR. CARLOS PELLESCI TABORDA
Vice-Coordenador da CEEA- ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

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 minha mãe e avós, por toda força, a minha
filha por toda paciência e compreensão e ao
Paulo, por todo o carinho. Eu não
conseguiria sem vocês!*

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Luiza, que me recebeu como iniciação científica possibilitando a execução deste trabalho e todo o aprendizado profissional até este momento. Obrigada pelas dicas, conselhos, e confiança depositada.

À minha mãe e avós, pelo carinho, amor, estímulo, compreensão, orações e suporte.

À minha filha querida, pelo amor, compreensão e ajuda sempre, nunca se esqueça de que eu te amo mais que tudo no mundo.

Ao Paulo, pessoa muito importante na minha vida, influenciando cada momento de forma positiva desde o início, obrigada por sempre me apoiar.

À Maria Alicia, pela paciência e por me ensinar praticamente tudo que sei e desenvolvo hoje em minha vida científica. Obrigada por ser minha mentora e amiga de horas desesperadoras.

A Carol Lino e a Cristina pela dosagem dos HTs e por toda força e ajuda com os blots e demais probleminhas experimentais...

A Carol Emy, minha querida irmã de coração, obrigada pela força, paciência e horas de conversa e desabafos... obrigada por me emprestar sua Hemi-cabeça, Carol Lino.

A Carol Lino, minha querida e grande amiga, obrigada por toda a paciência e por ser a luz que clareava meus dias no laboratório, desculpe pelos desabafos e reclamações, só você sabe o quanto isso foi importante para mim.

Ao pessoal do laboratório, pelos desabafos, pela força e ajuda sempre. Obrigada a Gabi, Carol Emy, Carol Lino, Marcela, Dayane, Maria Alicia, Ana Paula, Cristina, Félix, Ivson, Vanessa, Maria, Mari, Ana Cláudia e professora Maria Luiza.

Aos professores e funcionários do Departamento de Anatomia que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Em especial ao Profº Renato Chopard, Mary, Ana Cláudia e Lincoln.

Ao apoio financeiro da CNPq e FAPESP.

“A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, na força que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

MONTEIRO, P. S. **O efeito do hipotireoidismo experimental nos componentes da matriz extracelular de aortas torácicas de ratos.** 2012. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do hipotireoidismo experimental sobre o leito vascular da aorta torácica. Ratos wistar machos foram tireoidectomizados para simular o estado de hipotireoidismo, o grupo sham foi submetido a uma simulação da tireoidectomia sem a remoção da glândula. Depois de 6 semanas foram realizadas as análises histológicas usando colorações de hematoxilina-eosina, picrossirius e Weigert. Na análise de expressão proteica, foram realizadas as quantificações para colágeno I e III, elastina, MMP-9 e MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2. As análises histológicas demonstraram uma diminuição da área da seção transversal das aortas dos animais hipo e juntamente a esta alteração, foi constatada a diminuição da expressão proteica de colágeno do tipo I. Em relação à elastina, foi possível observar aumento da expressão deste elemento nas aortas dos animais hipotireóides. Na avaliação da expressão proteica para MMP-9, foi possível verificar uma redução desta proteína no grupo hipotireóide, assim como um aumento da expressão de TIMP-2. Frente aos presentes resultados, é possível sugerir que o estado hipometabólico desencadeado pelo hipotireoidismo afeta as CMLVs comprometendo mecanismos de síntese/degradação, alterando o importante arranjo da MEC presente na aorta torácica.

Palavras-chave: Hipotireoidismo. Aorta torácica. Colágeno. Elastina.

ABSTRACT

MONTEIRO, P. S. **The effect of experimental hypothyroidism on components of the extracellular matrix of rats thoracic aortas.** 2012. 60 p. Masters thesis (Morphofunctional Sciences) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The subject of this study was to investigate the effects of experimental hypothyroidism on extracellular matrix deposition in vascular wall of thoracic aorta. Male Wistar rats were thyroidectomized to mimic hypothyroidism, the sham group was submitted to surgery procedure without the thyroid removal. After 6 weeks, histological analyses were performed using hematoxylin-eosin staining (for morphometric measurements), picrosirius and Weigert (for collagen and elastin deposition, respectively). Additionally, Western blotting was used to evaluate collagen I and III, elastin MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 protein expression. Serum T3 and T4 levels as well as heart weight (g)/ tibia's length (mm) ratio confirmed the characteristic decrease in cardiac mass found in hypothyroidism condition. Hemodynamic parameters (blood pressure and heart rate) showed a decrease in hypothyroid animals, as already reported in the literature. Histological analyses demonstrated a significant diminution in aorta cross-sectional area in hypothyroidism state. Along with this result, protein expression of collagen type I was also decreased while elastin was augmented in hypothyroid aortas. Besides, we observed an increase of nuclei density per mm² and a decrease in nuclear volume in hypothyroid group. MMP-9 protein expression was decreased and TIMP-2 was increased in hypothyroid aortas. Our data strongly suggest that hypothyroidism alters the extracellular matrix deposition/ degradation in rat aorta, which may indicate a possible fragility of the vascular wall.

Keywords: Hypothyroidism. Thoracic aorta. Collagen. Elastin.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Parede do leito vascular	14
1.1.1 Túnica íntima	15
1.1.2 Túnica média	16
1.1.3 Túnica adventícia	17
1.1.4 Matriz extracelular vascular	18
1.1.4.1 Elastina	18
1.1.4.2 Colágeno	19
1.1.4.3 Glicoproteínas adesivas e integrinas	19
1.2 Hipotireoidismo	20
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	23
4 METODOLOGIA	24
4.1 Animais	24
4.2 Grupos experimentais	24
4.3 Caracterização do modelo experimental	25
4.4 Dosagem sérica dos HTs	25
4.5 Histologia	26
4.5.1 Quantificação do volume de lamelas elásticas	26
4.5.2 Análise morfométrica da aorta torácica	27
4.6 Análise da expressão de proteínas da MEC associadas ao remodelamento vascular	28
4.7 Análise estatística	29
5 RESULTADOS	30
5.1 Caracterização do modelo experimental	30
5.2 Análise morfológica das aortas torácicas dos grupos experimentais	34
5.2.1 Análise morfométrica das aortas torácicas dos grupos experimentais	35
5.3 Análise do remodelamento das aortas torácicas dos grupos experimentais	41
6 DISCUSSÃO	46
6.1 Confirmação e caracterização do modelo experimental	46
6.2 Avaliação morfológica das aortas torácicas	48

6.3 Avaliação do remodelamento nas aortas torácicas	50
7 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

O sistema circulatório abrange o sistema vascular, que por sua vez, divide-se em sanguíneo e linfático. Atendo-se ao sistema vascular sanguíneo, sua composição é dada pelo coração, as artérias, os vasos capilares e as veias. Os vasos de forma geral podem ser divididos conforme o seu diâmetro, em componentes da macrocirculação (com diâmetro superior a 0,1 mm), e da microcirculação (com diâmetro inferior a 0,1 mm), sendo que a partir deste ponto serão abordadas as características morfológicas para o sistema arterial de macrocirculação.

Dentro da macrocirculação, de acordo com as diferentes características morfológicas, os vasos podem ainda ser classificados em artérias musculares ou elásticas. As artérias musculares, devido à espessa camada muscular que apresentam (túnica média), são responsáveis por controlar o fluxo sanguíneo para os vários órgãos, contraindo ou relaxando essa musculatura. Já as artérias elásticas, também denominadas artérias de condutância, apresentam em sua camada média, a qual será descrita a seguir, grande deposição de elastina organizada na forma de lamelas elásticas. A distensão dessas lamelas na camada média é a responsável pela estabilização do fluxo sanguíneo, garantindo a propriedade mecânica estática característica deste tipo de vaso. Assim, a pressão arterial e a velocidade do sangue diminuem e tornam-se menos variáveis à medida que este se distancia do coração.

Esses aspectos funcionais que diferenciam as artérias musculares das elásticas são pautados em alterações estruturais quanto à composição e disposição dos vários elementos celulares e da matriz extracelular (MEC) que formam a parede desses vasos e, desta forma, uma descrição mais detalhada da constituição dessa parede se faz necessária.

1.1 Parede do leito vascular

O leito vascular é um órgão ativo, cujos componentes interagem e sofrem alterações dinâmicas no sentido de se reorganizar em resposta a diferentes estímulos fisiopatológicos (DUBEY et al., 1997). Como citado previamente, a parede dos vasos sanguíneos apresenta-se composta por camadas de tecido concêntricas

denominadas túnica íntima, média e adventícia, as quais se encontram dispostas da luz para a periferia, respectivamente como pode ser observado na **figura 1**.

Figura 1 – Esquema representativo das três camadas que compõem o leito vascular.

Fonte: Modificado de School of Anatomy and Human Biology – The University of Western Austrália: Blue Histology – Vascular System, 2009.

1.1.1 Túnica íntima

A túnica íntima é composta por uma monocamada de células endoteliais (CEs) achatadas, que revestem internamente a parede vascular e estão em contato direto com o fluxo sanguíneo. Durante a formação do vaso, as células endoteliais existentes apresentam importante papel tanto na definição do padrão vascular embrionário como no recrutamento de células musculares lisas à parede vascular (BECK JR; D'AMORE, 1997; RISAU; FLAMME, 1995; SURI et al., 1996).

Além das CEs que formam o endotélio vascular, a túnica íntima também é constituída por uma área subendotelial, a qual se sedimenta em uma lâmina elástica interna (LEI), componente mais externo desta camada (CANTOR et al., 1980; CARNES; ABRAHAM; BUONASSISI, 1979; DAMIANO et al., 1984).

A área subendotelial é formada por uma matriz de material amorfo chamada de matriz subendotelial, esta por sua vez, contém filamentos de conexão e

ancoragem constituídos por fibrilina e fibras de colágeno (DAVIS, 1993; GERRITY; CLIFF, 1972; SCHWARTZ; BENDITT, 1972). Em animais de pequeno porte esta matriz subendotelial é normalmente acelular; no entanto, em humanos, ela pode conter uma pequena população de células musculares lisas vasculares (CMLVs) (SCHWARTZ; BENDITT, 1972; SCHWARTZ; MAJESKY; MURRY, 1995).

A capacidade das células endoteliais em produzir componentes da matriz extracelular como a elastina sugere que elas contribuam para a formação da LEI (WAGENSEIL; MECHAM, 2009), porém, sabe-se que animais de pequeno porte como ratos e camundongos não apresentam LEI, somente várias lamelas que separam as diversas camadas de CMLVs presentes na camada média que será abordada a seguir.

1.1.2 Túnica média

A túnica média é basicamente constituída por camadas concêntricas de CMLVs organizadas helicoidalmente e interpostas a quantidades variáveis de matriz extracelular (MEC). A MEC desta túnica encontra-se organizada em folhas fenestradas, formando uma rede contínua tridimensional, composta por fibras e lamelas elásticas, entre as quais se dispõem as fibras de colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas, sendo todas estas moléculas sintetizadas e secretadas pelas CMLVs (DAVIS et al., 1993; DINGEMANS et al., 2000; O'CONNELL et al., 2008). O número de unidades lamelares, geralmente definidas como uma lamela elástica e as CMLVs adjacentes, está relacionado diretamente às forças de tensão da parede (HARKNESS; HARKNESS; MCDONALD, 1957; O'CONNELL et al., 2008) e, curiosamente, o número de unidades lamelares em um determinado segmento vascular não muda após o nascimento (CLARK; GLAGOV, 1985; LEUNG; GLAGOV; MATHEWS, 1977; WOLINSKY; GLAGOV, 1967).

A importância da MEC é tão expressiva na túnica média que estudos da literatura já demonstraram que, em adultos, a perda de CMLVs dessa camada não altera significativamente a propriedade mecânica estática de vasos como a aorta (BERRY; GREENWALD; RIVETT, 1975), sugerindo, portanto, que esta propriedade se deve basicamente à presença da elastina e do colágeno da MEC (WAGENSEIL; MECHAM, 2009).

Delimitando morfológicamente a túnica média, existe a lâmina elástica externa (LEE), que serve de camada de transição à túnica adventícia.

1.1.3 Túnica adventícia

A túnica adventícia corresponde à camada mais externa da parede arterial e encontra-se com a sua face luminal apoiada sobre a LEE, definida anteriormente. Esta camada apresenta uma matriz extracelular muito rica em colágeno, principalmente do tipo III, produzido por uma população heterogênea de miofibroblastos, componente celular da adventícia (KARRER, 1961; STENMARK et al., 2006).

A deposição de colágeno apresenta um importante papel funcional na adventícia, fortalecendo a parede do vaso e ajudando a prevenir a ruptura do mesmo (BURTON, 1954). Entretanto, em estados patológicos como quadros de hipertensão arterial, o aumento da deposição de colágeno em longo prazo pode gerar um enrijecimento da parede arterial, comprometendo a distensibilidade vascular e contribuindo para uma retroalimentação do processo hipertensivo.

Na adventícia se originam pequenos vasos sanguíneos acessórios, também denominados de *vasa vasorum*, os quais são responsáveis pela nutrição da parede arterial e têm alcance até à parte exterior da túnica média (WOLINSKY; GLAGOV, 1964). Devido a esta rede vascular única, a adventícia é um ponto de destaque na inflamação vascular, onde estudos têm demonstrado que esta túnica pode se comportar como um sensor de lesões vasculares (WOLINSKY; GLAGOV, 1964) sendo capaz de estimular células progenitoras a se diferenciarem em células vasculares, reparando as camadas média e íntima (HOOFNAGLE; WAMHOFF; OWENS, 2004; HU et al., 2004; PASSMAN et al., 2008; TORSNEY; HU; XU, 2005).

Considerando a importância da MEC na função da parede vascular, a sua organização e os componentes que dela fazem parte, seus principais constituintes serão abordados com maior detalhe no tópico seguinte.

1.1.4 Matriz extracelular vascular

A matriz extracelular que forma a parede vascular é, de modo geral, formada por complexos de grandes moléculas de diferentes naturezas, relativamente estáveis, as quais são produzidas, exportadas e organizadas pelas células das diferentes túnicas, modulando a estrutura, fisiologia e funcionalidade do vaso. A MEC é composta por 3 componentes principais: componentes fibrilares (colágenos fibrilares e fibras elásticas), componentes não fibrilares (proteoglicanas e glicoproteínas não colagênicas) e microfibrilas (colágeno tipo VI e microfibrilas associadas à elastina). A produção organizada desses componentes pela MEC é a condição essencial para que esta desempenhe o seu papel funcional e, para tal, requer a expressão coordenada, tanto temporal quanto espacial, do conjunto de genes que codificam tanto as suas proteínas integrantes como as enzimas responsáveis pela sua montagem e degradação. Com a manutenção precisa e organizada desses componentes, é garantido à MEC o desempenho de suas várias propriedades mecânicas, tais como conferir alta resistência à parede do vaso suportando a distensão sistólica e a retração elástica durante a diástole; permitir alta capacidade de deformação seguida de normalização às dimensões originais (baixa histerese) e contribuir com a elasticidade não-linear ao considerar a pequena histerese do vaso.

Avaliando a importância dos diferentes componentes da MEC sobre as suas propriedades funcionais, alguns de seus constituintes serão abordados a seguir.

1.1.4.1 Elastina

A elastina corresponde à principal proteína responsável pela propriedade elástica da parede dos vasos (PATRIDGE, 1962); é distensível e tem baixa resistência à tração, funcionando basicamente como um reservatório elástico distribuindo uniformemente o estresse pelas fibras de colágeno e por toda parede arterial. Este elemento funciona como um polímero reticulado formando fibras, e sua montagem fora da célula, requer associação a inúmeras outras proteínas extracelulares (WAGENSEIL; MECHAM, 2009). Ao abordar a constituição e distribuição do elemento elastina, é importante estabelecer a diferença entre este

componente e a fibra elástica propriamente dita. Fibras elásticas são estruturas complexas que contêm a elastina como seu principal componente, assim como microfibrilas. Microfibrilas, por sua vez, são filamentos de 10 a 15 nm que são mobilizados para facilitar a montagem de elastina e fornecer uma estrutura para a fibra elástica durante o seu crescimento (FAHRENBACH; SANDBERG; CLEARY, 1966; ROSS, 1973; ROSS; BORNSTEIN, 1969).

1.1.4.2 Colágeno

Embora já tenham sido identificados mais de 17 tipos diferentes de colágeno na parede vascular, os que apresentam maior expressão são os colágenos: I, III, IV, V e VI (KELLEHER; MCLEAN; MECHAM, 2004; MCLEAN et al., 2005). Os colágenos I e III são os maiores responsáveis pela resistência da parede arterial e sua distribuição varia de acordo com a região do vaso (HOWARD; MACARAK, 1989). Em aortas ascendentes de origem bovina, os colágenos I e III estão colocalizados nas túnica média e adventícia. Na aorta torácica descendente e em artérias musculares, o colágeno do tipo I é distribuído principalmente na túnica média e está presente em menor quantidade na camada adventícia, na qual predomina o colágeno do tipo III. A expressão de colágeno do tipo VI em aortas de rato é similar à da elastina e à do colágeno do tipo I, entretanto, embora corresponda a um constituinte de formação fibrilar, não se apresenta colocalizado em grandes feixes com os colágenos I e III e sim associado à fibrilina-1 em fibras elásticas. O colágeno VI, tem a função de ligar lamelas elásticas ou conectar as CMLVs a outras estruturas da MEC (DINGEMANS et al., 2000).

Além da elastina e do colágeno, os quais, como citado previamente, correspondem a componentes fibrilares, outras proteínas não fibrilares são estruturalmente muito importantes na MEC e serão abordadas a seguir.

1.1.4.3 Glicoproteínas adesivas e integrinas

As glicoproteínas adesivas e as integrinas são proteínas com capacidade de se ligar a outros componentes da MEC, ligando-os uns aos outros e estes às células (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000). Uma dessas glicoproteínas corresponde à

fibronectina, uma proteína adesiva multifuncional que está associada às superfícies celulares, às membranas e à MEC, sendo na parede vascular produzida por fibroblastos ou pelas células endoteliais (HYNES, 1992; WOJCIAK-STOTHARD et al., 1997). Esta glicoproteína liga-se a diversos componentes da matriz extracelular (incluindo colágeno, fibrina e proteoglicanas) através de domínios específicos, bem como às células, através de receptores que reconhecem a sequência específica do aminoácido do tripeptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). O elemento de reconhecimento do RGD desempenha um papel chave na adesão entre células e matriz.

Outra glicoproteína importante na MEC é a laminina, uma proteína que se liga por um lado a receptores específicos na superfície das células e, por outro, a componentes da MEC, como colágeno tipo IV e heparan-sulfato, apresentando funções como adesão, proliferação e migração celular (LOCHTER; BISSEL, 1995).

Ainda com relação às proteínas da MEC da parede vascular podemos citar as integrinas, uma família de proteínas integrais de membrana presentes na superfície de praticamente todos os tipos de células de vertebrados. As integrinas são compostas por duas cadeias de polipeptídeos, sendo uma cadeia α e uma cadeia β , ligadas não-covalentemente (WAGENSEIL; MECHAM, 2009). As integrinas estão associadas a duas funções principais, adesão da célula a seu substrato e sinalização intracelular (ALBERTS et al., 2002). A ligação do domínio extracelular de uma integrina a um ligante, como a fibronectina ou a laminina, pode induzir uma mudança conformacional na extremidade citoplasmática da integrina, que por sua vez, altera o modo como a mesma interage com proteínas citoplasmáticas. Assim, as integrinas constituem a principal família de receptores de superfície celular que medeiam a fixação da célula à MEC (ALBERTS et al., 2002).

1.2 Hipotireoidismo

Partindo dos conceitos introduzidos anteriormente e relacionando-os às várias patologias que podem acometer o leito vascular, sabe-se que a parede do vaso, assim como o coração, correspondem a importantes alvos dos hormônios tireoidianos (HT) nos quais atuam sobre a resistência vascular periférica e

freqüência/débito cardíaco, respectivamente (OJAMAA; KLEMPERER; KLEIN, 2001).

O estudo do papel biológico dos HT no leito vascular e em outros tecidos, normalmente tem se baseado nos efeitos observados através do excesso ou deficiência desses hormônios, isto é, através de estados de hiper e hipotireoidismo, respectivamente, e nas últimas décadas foram realizados progressos importantes para definir as bases bioquímicas e moleculares da ação dos HT em nível celular.

O hipotireoidismo é uma condição relativamente comum, afetando em torno de 15% das mulheres no climatério e até 5% da população mundial (CANARIS et al., 2000; EMPSON et al., 2007) . Esta patologia apresenta sintomas como fadiga, intolerância ao frio, distúrbios cognitivos, mudanças de humor abruptas, diminuição da temperatura corporal, assim como elevados níveis de triglicerídeos e colesterol (CANARIS et al. 2000; VARGAS et al., 2006). Devido às ações do hipotireoidismo implicarem em diversas alterações do leito vascular, é crescente o número de estudos que tem como objetivo investigar estas alterações relacionando-as a problemas vasculares (DONG et al., 1992; FARWELL; BRAVERMAN, 1996; GUYTON et al., 1986). Estudos a respeito do hipotireoidismo severo investigam quais os possíveis mecanismos que envolvem a ausência dos hormônios tireoideanos (HTs) na circulação e sua contribuição para sintomas como a bradicardia, aumento da resistência vascular periférica e hipotensão arterial (BILEZIKIAN; LOEB, 1983).

Relatos bibliográficos trazem evidências de que o hipotireoidismo prolongado, de 2 a 6 semanas em ratos, prejudica a função contrátil das CMLVs sendo constatada a diminuição da sensibilidade a vários vasoconstritores, como norepinefrina e KCl, e explicando alguns dos sintomas observados nestes animais como a hipotensão arterial e o aumento da resistência vascular periférica (BROWN et al., 1994; DELP; MCALLISTER; LAUGHLIN, 1995; GRIEVE et al., 1999; RAHMANI et al., 1987; GUNASEKERA; KURIYAMA, 1990; SABIO et al., 1994;). Porém, apesar de existir uma relação clara do hipotireoidismo com alterações do leito vascular, e mesmo este ponto sendo alvo de um número de estudos crescentes, ainda são poucas e contraditórias as informações a respeito das ações fisiológicas e morfológicas implicadas nesta patologia, principalmente em suas ações diretas sobre leitos vasculares de grande calibre como a aorta.

2 JUSTIFICATIVA

Diversas patologias promovem alterações na composição e na organização da MEC, pois alteram o balanço entre síntese e degradação de seus componentes. Estas alterações, por sua vez, dependendo de sua intensidade, podem acarretar mudanças estruturais da parede vascular que comprometem o seu estado funcional, agravando ainda mais o remodelamento causado pelo hipotireoidismo. Neste sentido, o nosso grupo vem estudando a algum tempo as consequências cardiovasculares decorrentes de alterações nos níveis plasmáticos dos hormônios tiroideanos, simulando situações de hiper e hipotireoidismo experimental e tentando desvendar os mecanismos celulares e moleculares associados a estas patologias.

3 OBJETIVO

Diante do exposto, considerando o vaso como um importante “órgão alvo” dos hormônios tiroideanos, os quais atuam sobre os diferentes tipos celulares que dele fazem parte, a presente dissertação teve como objetivo investigar as alterações estruturais do leito vascular de aortas torácicas em situações de hipotireoidismo experimental, avaliando esta patologia como um possível fator de remodelamento vascular.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) mantidos no Biotério do Departamento de Anatomia do ICB-III. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do ICB-USP e estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas, com livre acesso à água e ração sendo mantidos em sala com temperatura controlada (24 ± 1 °C). A umidade das salas de acondicionamento foi controlada e ciclo claro/escuro (intervalo de 12 horas) foi mantido.

4.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais:

- 1) Grupo Controle: animais eutiroideos;
- 2) Grupo SHAM: animais eutiroideos submetidos à cirurgia sem tireoidectomia;
- 3) Grupo Hipotiroideo: animais eutiroideos tireoidectomizados por 6 semanas submetidos à administração de metimazole 0,05% adicionado à água de beber (GIANNOCCO; DOS SANTOS; NUNES, 2004).

Foram realizados grupos experimentais em duplicata, sendo um grupo utilizado para a coleta do material destinado à expressão protéica e o outro utilizado nas análises histológicas.

Em relação às análises histológicas, foi avaliada a organização geral da parede da aorta (arranjo das fibras colágenas e elásticas) e no que se refere ao remodelamento vascular, foram avaliadas as expressões das seguintes proteínas: metaloproteinases (MMP-9, MMP-2) e seus inibidores teciduais (TIMP-1, TIMP-2), além dos colágenos I/III e elastina, nas aortas torácicas dos animais dos grupos experimentais.

Ao longo do período experimental, foi realizado o acompanhamento da evolução do peso corpóreo (g) dos animais dos diferentes grupos, bem como consumo de ração (g) e água (ml), sendo consideradas todas as medidas realizadas desde o início ao término do tratamento.

4.3 Caracterização do modelo experimental

O estado hipotiroideo dos animais foi confirmado através do acompanhamento das alterações de alguns parâmetros hemodinâmicos que caracterizam esta patologia. A pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca (FC) de ratos acordados foram determinadas por um método indireto através de pletismografia de cauda. Os animais foram previamente aquecidos por 3 a 5 minutos e colocados em um cilindro acrílico de contenção, com aberturas para a cauda e focinho. Um oclisor e um sensor foram ajustados na porção proximal da cauda do rato e acoplados ao pletismógrafo elétrico (PE-300 – Kent Scientific Corporation, Torrington, Connecticut, USA), conectado a um fisiógrafo (MK III-WINDAQ). Para cada valor de PAS e FC foram considerados no mínimo a média de cinco medidas.

Todos os animais passaram por um período inicial de adaptação ao sistema de aferição da PAS e FC de no mínimo uma semana, antes do início do período experimental.

Outro dado utilizado para a confirmação do modelo experimental foi a razão peso do coração/comprimento da tíbia, esta razão indica se houve alteração do trofismo cardíaco, sendo a diminuição da massa cardíaca uma característica do hipotiroidismo, assim como a hipertrofia cardíaca um indício do hipertiroidismo. A análise do peso seco pulmonar foi avaliada com o intuito de observar se o tratamento promovia congestão pulmonar.

4.4 Dosagem sérica dos HTs

Após o período experimental, os animais foram decapitados, o sangue coletado e submetido à centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Após esta etapa, o soro isolado foi utilizado para as dosagens de T3 e T4 total utilizando-se o

kit de radioimunoensaio comercial (Coat-a-Count, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, N.Y., USA). Para os ensaios foram construídas curvas-padrão utilizadas na determinação das dosagens.

4.5 Histologia

Após a submissão dos animais ao estado de hipotireoidismo por 6 semanas, os ratos foram anestesiados intraperitonealmente com coquetel de xilazina e ketamina nas proporções de 0,1ml de ketamina e 0,033 ml de xilazina para cada 100 g de animal. Quando anestesiados, os animais foram submetidos à toracotomia e perfundidos com solução salina seguida de solução fixadora de paraformaldeído 4% através de bomba peristáltica com pressão semelhante a normal. Após o período de perfusão de 30 minutos com solução fixadora, as aortas torácicas foram extraídas e delas foram separados anéis de 5 mm da porção medial sendo os segmentos arteriais fixados em solução de paraformaldeído tamponado a 4% durante 24 h. Em seguida, os tecidos foram desidratados em seqüência crescente de etanol (60%, 70%, 80%, 90% até absoluto III) e incluídos em parafina. Foram realizados cortes transversais de 5 µm, semiseriados os quais foram corados utilizando os seguintes métodos de coloração:

- a) resorcina-fucsina, após oxidação com solução aquosa a 1% de oxona, para evidenciação de lamelas elásticas;
- b) hematoxilina-eosina, para análise morfométrica da túnica média da aorta;
- c) picrossírius, para visualização qualitativa dos colágenos I/III.

As seções histológicas das aortas foram analisadas ao microscópio de luz e os aumentos padronizados favorecendo a visualização das estruturas de interesse.

4.5.1 Quantificação do volume de lamelas elásticas

As seções histológicas das aortas foram analisadas ao microscópio de luz com objetiva de 40x com ocular de compensação Kf 10x18, com graticulos de integração de 100 pontos, exibindo 10 retas paralelas. A distância entre os pontos neste sistema é de 5 µm e a distância entre as linhas é de 4,94 µm.

Para se obter a fração do volume do sistema de lamelas elásticas nas aortas, o sistema teste é acoplado ao campo do microscópio, permitindo contar o número de pontos que incidem sobre o sistema de fibras (P_i) e o número total de pontos no sistema teste (P_u). A densidade de volume (V_{vi}) ocupada pelo sistema fibroso em seções histológicas longitudinais das aortas é dada pela equação $V_{vi} = P_i/P_u$. A medida de densidade de volume (V_{vi}) é semelhante ao fator de correção (f) que permite analisar a densidade linear de seções histológicas não-homogêneas (anisotrópicas) (MANDARIN DE LACERDA, 2003).

Além da determinação da densidade de volume elástico, também foram realizadas as medidas de espessura média das lamelas elásticas das aortas torácicas, sendo as imagens selecionadas capturadas e medidas utilizando o sistema computadorizado acoplado ao microscópio (Nikon Eclipse E600, Nikon Instruments Inc., Melville, N.Y., USA), com o software específico para medidas morfométricas NIS-Elements F 3.0.

4.5.2 Análise morfométrica da aorta torácica

Os cortes corados com a técnica de Hematoxilina-eosina foram analisados em diferentes aumentos, o que permitiu uma melhor visualização dos cortes analisados. A escolha dos cortes foi feita adotando-se os seguintes critérios: a lâmina foi observada inicialmente em objetiva de 2x, selecionando-se o corte apropriado (sem ranhuras, dobras ou bolhas). Foram escolhidos 6 cortes de cada vaso por grupo sendo 2 lâminas de 6 ou 5 animais diferentes dentro de cada grupo, onde então foram realizadas as medidas. Foi selecionada a área externa (AE) e área interna (AI), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE) do corte analisado. As medidas finais de diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE) foram obtidas através da média de 4 medidas perpendiculares entre si devido aos anéis de aorta não se tratarem de formas circulares regulares. A área de seção transversal (AST) foi obtida pela diferença entre AE-AI ($AST = AE - AI$).

Além das medidas morfométricas padrão, foi realizada a contagem de núcleos de CMLVs e determinação do volume nuclear das mesmas. Para a estimativa da quantidade de núcleos da camada média, foi utilizada a razão entre o número de células e a área do campo utilizado (células/mm^2) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO,

2004). Na determinação do volume nuclear das CMLVs, foram realizadas medidas de 50 núcleos elipsoides em 6 cortes representativos dos animais do grupo controle e hipotioideo, utilizado a equação $(V)=(a^2).b/1,91$, onde (V) é o volume, (a) é o valor da medida referente a altura, (b) é o valor da medida referente a largura e a constante 1,91, sendo o valor do volume dado em μm^3 .

As imagens selecionadas foram capturadas e medidas utilizando o sistema computadorizado acoplado ao microscópio (Nikon Eclipse E600), com o software específico para medidas morfométricas NIS-Elements F 3.0. Todas as medidas morfométricas foram expressas em micrometros (μm) ou milímetros (mm).

4.6 Análise da expressão de proteínas da MEC associadas ao remodelamento vascular

A análise da expressão das proteínas de interesse: MMP-9 (92KDa) (Abcam, Cambridge, M.A., USA), MMP-2 (72KDa) (Abcam), Elastina (68KDa) (Abcam), Colágeno I (140-210 KDa) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, USA), Colágeno III (110-140 KDa) (Santa Cruz Biotechnology), TIMP-1 (22KDa) (Santa Cruz Biotechnology) e TIMP-2 (21 KDa) (Santa Cruz Biotechnology) foram realizadas a partir de extratos de aorta sem adventícia dos animais dos diferentes grupos experimentais e avaliadas por Western Blotting. Inicialmente foi realizada a extração da proteína das aortas, seguida da sua quantificação pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Estas proteínas foram submetidas à eletroforese em gel denaturante de poliacrilamida, cuja concentração utilizada também foi padronizada de acordo com o peso molecular das proteínas em questão. A quantidade de proteínas utilizada no carregamento dos géis variou entre 20 e 30 μg . Após a eletroforese, as proteínas totais presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Trans Blot Transfer Medium Purê Membrane – BIO-RAD, Hercules, California, USA) em um sistema semi-seco (Trans-Blot Semi-Dry Cell – BIO-RAD, Hercules, California, USA). Após a transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau para identificar a homogeneidade das amostras.

Após esta etapa, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para as proteínas de interesse. Em seguida, foram adicionados

os anticorpos secundários ligados à peroxidase. Após a ligação do anticorpo secundário, foi acrescentada uma solução de ECL (Pierce, Rockford, IL, USA) ou Luminata (Millipore, Bilerica, MA, USA) reagindo com a peroxidase dos anticorpos secundários, oxidando o filme de raio X (T-MAT G/RA Film – KODAK, Rochester, NY, USA) e promovendo a marcação de bandas que serão posteriormente quantificadas por sistema de fotodocumentação ImageJ.

Todos os parâmetros utilizados na eletroforese, na transferência das proteínas do gel para a membrana, bem como a titulação dos anticorpos foram previamente padronizados neste estudo. Cabe ressaltar que foi utilizado como normalizador das reações de western blotting o anticorpo primário contra α -actinina (Santa Cruz Biotechnology), uma vez que trabalhos demonstram que esta proteína não é modulada pelo hormônio tiroideano (KUZMAN et al., 2005).

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados como média $\pm$ desvio-padrão. O valor de n correspondeu ao número de animais utilizados. Os resultados foram analisados e comparados utilizando-se o Teste t de “Student” ou a Análise de Variância (ANOVA) two-way, seguida do pós-teste de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização do modelo experimental

A confirmação do modelo experimental foi avaliada através de dois parâmetros importantes: a dosagem hormonal sérica de T3 e T4 totais e a razão do peso do coração pelo comprimento das respectivas tíbias. Esses parâmetros podem ser visualizados na **tabela 1** e **figura 2**, respectivamente.

O hipotireoidismo experimental determinou uma redução significativa nos níveis totais de T3 e T4, em relação ao grupo sham (controle cirúrgico) ($12,34 \pm 3,18$ & vs $50,77 \pm 10,61$ ng/dL para T3 e valores inferiores aos detectáveis pelo método vs $5,30 \pm 0,55$ µg/dL para T4). O mesmo ocorreu com a razão peso do coração/comprimento da tíbia ($22,04 \pm 1,19$ vs $13,35 \pm 1,33$ mg/mm).

Tabela 1 - Quantificação dos níveis séricos de T3 e T4 total

	Sham (controle)	Hipo
T3 ng/dL	$50,77 \pm 10,61$	$12,34 \pm 3,18$ &
T4 µg/dL	$5,3 \pm 0,55$	< nível de detecção &

Dosagem de T3 e T4 séricos totais em relação aos grupos experimentais. Grupo sham (n=4) e grupo hipo (n=6). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. & vs sham ($p < 0,001$).
Fonte: Monteiro (2012).

Figura 2 - Influência do hipotireoidismo na razão peso do coração/comprimento da tíbia em relação aos grupos experimentais.

Grupo controle (n=8), grupo sham (n=8) e grupo hipo (n=14). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle ($p < 0,001$); & vs sham ($p < 0,001$).
Fonte: Monteiro (2012).

O acompanhamento do consumo de água, ração e peso dos animais, bem como a avaliação de parâmetros hemodinâmicos (frequência cardíaca e pressão arterial sistólica) foi realizado nos grupos, ao longo do período de tratamento.

A respeito do consumo de água, na **figura 3**, pode-se observar o consumo médio diário por animal e a redução significativa deste parâmetro no grupo hipo, em relação ao respectivo grupo controle ($40,37 \pm 7,29$ vs $58,89 \pm 3,47$ ml do controle).

Figura 3 - Consumo médio diário de água (em ml), por rato, nos diferentes grupos experimentais.

Grupo controle (n=7 medidas), grupo sham (n=7 medidas), grupo hipo (n=7 medidas), medidas realizadas semanalmente durante 7 semanas. Os valores representam média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle, & vs sham ($p < 0,01$).

Fonte: Monteiro (2012).

Em relação ao consumo de ração, podemos observar na **figura 4** o consumo diário por animal, onde houve uma redução significativa, em relação ao grupo controle ($21,55 \pm 4,93$ g vs $33,06 \pm 1,91$ g no grupo controle).

Figura 4 - Consumo médio diário de ração (em g) por rato nos diferentes grupos experimentais.

Grupo controle (n=7 medidas), grupo sham (n=7 medidas), grupo hipo (n=7 medidas), medidas realizadas semanalmente durante 7 semanas. Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle ($p < 0,001$), & vs sham ($p < 0,001$).

Fonte: Monteiro (2012).

As medidas de peso corpóreo, assim como a avaliação de parâmetros hemodinâmicos, foram coletadas semanalmente, tendo início na semana anterior ao tratamento e sendo finalizadas no dia anterior ao sacrifício dos grupos experimentais. A evolução do peso dos animais submetidos às condições de tratamento também foi monitorada durante o experimento e pode ser avaliada na **figura 5**.

Conforme podemos observar há uma diminuição significativa do peso corpóreo dos animais do grupo hipotiroideo, a partir da segunda semana após a tireoidectomia, em relação ao grupo controle no mesmo período.

Figura 5 - Evolução do peso corpóreo (em g) em relação ao tempo de tratamento.

Grupo controle (n=8), grupo sham (n=8), grupo hipo (n=14). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle 2 semanas ($p<0,05$); & vs controle 3 semanas ($p<0,05$); # vs controle 4 semanas, \$ vs controle 5 semanas ($p<0,05$) e ** vs controle 6 semanas ($p<0,05$).

Fonte: Monteiro (2012).

Na **figura 6**, podemos observar a evolução temporal da pressão arterial sistólica nos diferentes grupos experimentais. Conforme podemos observar, há uma diminuição significativa da pressão arterial no grupo hipotiroideo, a partir da primeira semana após a tireoidectomia, em relação ao grupo controle no mesmo período.

Figura 6 - Evolução da pressão arterial (em mmHg) em relação ao tempo de tratamento.

Grupo controle (n=8), grupo sham (n=8), grupo hipo (n=13). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle 1 semana ($p<0,05$); & vs controle 2 semanas ($p<0,05$); # vs controle 3 semanas ($p<0,05$); \$ vs controle 4 semanas ($p<0,05$); ** vs controle 5 semanas ($p<0,05$) e && vs controle 6 semanas.

Fonte: Monteiro (2012).

A **figura 7** apresenta a evolução temporal da frequência cardíaca obtida nos diferentes grupos experimentais. Como pode ser observado, o grupo hipotiroideo apresentou uma diminuição significativa deste parâmetro, a partir da primeira semana após a tireoidectomia, em relação ao controle no mesmo período.

Figura 7 - Evolução da frequência cardíaca (em bpm) em relação ao tempo de tratamento.

Grupo controle (n=8), grupo sham (n=8), grupo hipo (n=14). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle 1 semana ($p<0,05$); & vs controle 2 semanas ($p<0,05$) e # vs controle 3 semanas ($p<0,05$); \$ vs controle 4 semanas ($p<0,05$); ** vs controle 5 semanas e (p<0,05) e && vs controle 6 semanas ($p<0,05$).

Fonte: Monteiro (2012).

Dentro da caracterização experimental, também foi avaliada a porcentagem de água de uma fração pulmonar para que fosse possível saber se havia indícios de congestão pulmonar, um dos parâmetros que pode acompanhar a insuficiência cardíaca, porém não houve diferença entre a quantidade de água encontrada nas frações pulmonares do grupo hipo em relação ao grupo controle ($78,99\pm0,46$ vs $78,64\pm0,58\%$ de água).

5.2 Análise morfológica das aortas torácicas dos grupos experimentais

Após coleta dos parâmetros hemodinâmicos, consumo e confirmação do modelo experimental, foram realizadas as análises morfológicas para as aortas torácicas dos grupos hipotiroideo e controle.

Em virtude de não terem sido observadas diferenças significativas entre os grupos controle e sham, a partir deste ponto, optamos por expressar os efeitos obtidos no grupo hipotiroideo sempre o comparando apenas ao grupo controle.

5.2.1 Análise morfométrica das aortas torácicas dos grupos experimentais

As **figuras 8A e B** ilustram as diferenças morfológicas encontradas nas seções transversais das aortas torácicas entre os grupos experimentais.

Figura 8 - Fotomicrografias representativas das seções de aortas torácicas.

(A) (aumento de 200x). **(B)** (aumento de 100x). L (Luz), a (adventícia), TM (túnica média).
Fonte: Monteiro (2012).

Foram realizadas ainda medidas de parâmetros morfométricos, contagem de núcleos e determinação do volume nuclear das CMLVs nas aortas torácicas. Neste

sentido, as **figuras 9A e B** apresentam os valores referentes ao diâmetro interno e externo das aortas torácicas dos diferentes grupos experimentais. Conforme pode ser observado, não houve alteração significativa em relação ao diâmetro interno ($1664,31 \pm 34,24$ vs $1689,63 \pm 23,15$ μm), porém o diâmetro externo apresenta-se significativamente diminuído em relação ao controle ($1808,41 \pm 37,74$ vs $1876,14 \pm 24,25$ μm).

Figura 9 - **(A)** Média dos diâmetros internos das aortas torácicas dos diferentes grupos experimentais. **(B)** Média dos diâmetros externos das aortas torácicas dos diferentes grupos experimentais.

Grupo controle (n=4), grupo hipo (n=5). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle ($p < 0,05$).

Fonte: Monteiro (2012).

Na **figura 10**, é possível observar uma diminuição da área de seção transversal da aorta do grupo hipotiroideo, em relação ao grupo controle ($0,49 \pm 0,04$ vs $0,67 \pm 0,04$ mm^2 no controle).

Figura 10 - Área de seção transversal das aortas torácicas dos diferentes grupos experimentais.

Grupo controle (n=4), grupo hipo (n=5). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão.* vs controle ($p < 0,05$).

Fonte: Monteiro (2012).

Como pode ser observado na **figura 11A**, não houve alteração do número de núcleos de CMLVs por campo de observação em relação ao controle ($180,4 \pm 13,46$ vs $171,8 \pm 6,68$ núcleos celulares por campo), em relação a **figura 11B** houve um aumento significativo da densidade de núcleos das CMLVs ($5753,79 \pm 419,57$ vs $4133,54 \pm 227,70$ núcleos celulares por mm^2) e a figura **11C** ilustra a diminuição significativa do volume nuclear das mesmas CMLVs da camada média no grupo hipo em relação ao controle ($1,70 \pm 0,53$ vs $4,94 \pm 1,26 \mu\text{m}^3$).

Figura 11 - (A) Número de núcleos das CMLVs por campo de observação. **(B)** Densidade de núcleos das CMLVs por mm². **(C)** Determinação do volume dos núcleos das células musculares lisas nos diferentes grupos experimentais.

Grupo controle (n=5) e grupo hipo (n=5). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle ($p < 0,05$).
Fonte: Monteiro (2012).

Após a avaliação dos parâmetros morfométricos, foi avaliada a expressão e a distribuição de proteínas constitutivas, como colágeno I e III e a densidade do volume elástico das aortas torácicas submetidas ao hipotireoidismo.

A **figura 12** ilustra, de forma qualitativa, as alterações de deposição de colágeno tipo I e III nas seções transversais das aortas torácicas entre os diferentes grupos experimentais.

Figura 12 - Fotomicrografia de segmentos da aorta torácica nos diferentes grupos experimentais corados com Picrossírius para visualização de colágeno I (corado em vermelho) e colágeno III (corado em verde).

Controle

Hipo

Representação do grupo controle e hipo em aumento de 100x da parede do vaso. L (Luz), a (adventícia), TM (túnica média).

Fonte: Monteiro (2012).

Outro parâmetro avaliado nas seções transversais das aortas dos grupos experimentais foi a densidade de volume elástico em relação às lamelas elásticas.

A **figura 13** ilustra, de forma qualitativa, as lamelas elásticas nas seções transversais das aortas torácicas entre os diferentes grupos experimentais.

Figura 13 - Fotomicrografia de segmentos da aorta torácica nos diferentes grupos experimentais corados com Weigert para visualização de lamelas elásticas.

Aumento de 200x da parede do vaso. L (Luz), a (adventícia), TM (túnica média).
Fonte: Monteiro (2012).

Na **figura 14 A** é possível observar um aumento significativo da densidade de volume elástico do grupo hipotiroideo em relação ao grupo controle ($93,96 \pm 3,6\%$ vs $84,10 \pm 4,70\%$) e na **Figura 14 B**, podemos observar o reflexo deste na espessura média das lamelas elásticas nas seções transversais das aortas torácicas dos grupos experimentais ($2,02 \pm 0,17$ vs $1,54 \pm 0,03$ μm). O número de unidades lamelares também foi contado, porém não apresentou diferença entre o grupo hipo e controle ($10,5 \pm 1,04$ vs $11 \pm 0,89$ por aorta).

Figura 14 - **(A)** Densidade de volume elástico das seções de aorta dos diferentes grupos experimentais. Grupo controle (n=3), grupo hipo (n=3). **(B)** Quantificação da espessura média (μm) das lamelas elásticas das aortas dos grupos experimentais.

Grupo controle (n=6), grupo hipo (n=6). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle ($p < 0,05$).

Fonte: Monteiro (2012).

5.3 Análise do remodelamento das aortas torácicas dos grupos experimentais

Paralelamente à análise estrutural já apresentada até aqui, foi avaliado o efeito do hipotireoidismo na expressão protéica de colágeno I/III e de elastina.

Conforme observamos na **figura 15 A** houve uma diminuição significativa da expressão protéica de colágeno tipo I no grupo submetido ao hipotireoidismo, em relação ao grupo controle ($0,59 \pm 0,16$ vs $0,91 \pm 0,02$ em UA). Porém, no que se refere ao colágeno do tipo III, a **figura 15 B** demonstra que não houve alteração significativa da expressão protéica dessa proteína no grupo submetido ao hipotireoidismo, em relação ao grupo controle ($1,78 \pm 0,34$ vs $1,82 \pm 0,46$ em UA).

Figura 15 - (A) Influência do hipotireoidismo na expressão protéica de colágeno I em aortas torácicas dos grupos experimentais. **(B)** Influência do hipotireoidismo na expressão protéica do colágeno tipo III nas aortas torácicas dos grupos experimentais.

Grupo controle (n=4), grupo hipo (n=4). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle ($p < 0,05$).

Fonte: Monteiro (2012).

Também foi avaliada a expressão protéica da elastina, um dos principais e mais abundantes constituintes da MEC. Conforme podemos observar pela análise da **figura 16**, houve um aumento significativo da expressão protéica de elastina no grupo submetido ao hipotireoidismo, em relação ao grupo controle ($0,47 \pm 0,1$ vs $0,16 \pm 0,02$ em UA).

Figura 16 - Influência do hipotireoidismo na expressão protéica da elastina nas aortas torácicas dos diferentes grupos experimentais.

Grupo controle (n=4), grupo hipo (n=4). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle ($p < 0,05$).

Fonte: Monteiro (2012).

Além de avaliarmos a expressão de componentes de MEC como o colágeno e a elastina, também avaliamos a expressão das metaloproteinases 2 e 9.

Conforme pode ser observado na **figura 17 A**, não houve alteração significativa na expressão proteica de MMP-2 no grupo submetido ao hipotireoidismo em relação ao grupo controle ($0,69 \pm 0,10$ vs $0,57 \pm 0,26$ em UA). Também foi avaliada expressão proteica da MMP-9. Com base na **figura 17 B** é possível observar uma diminuição significativa da expressão protéica de MMP-9 no grupo submetido ao hipotireoidismo em relação ao grupo controle ($0,22 \pm 0,23$ vs $0,71 \pm 0,08$ em UA).

Figura 17 - (A) Influência do hipotireoidismo na expressão protéica da MMP-2 em aortas torácicas dos grupos experimentais. **(B)** Influência do hipotireoidismo na expressão protéica da MMP-9 nas aortas torácicas dos grupos experimentais.

Grupo controle (n=4), grupo hipo (n=4). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle (p<0,05).

Fonte: Monteiro (2012).

Assim como foram avaliadas as MMPs-2 e 9 reguladoras da degradação de colágeno, avaliamos também os inibidores teciduais mais relacionados a estas MMPs, as TIMPs 2 e 1 respectivamente, conforme pode ser observado na **figura 18 A e B**. Na **figura 18 A**, observamos um aumento de TIMP-2 do grupo hipotiroideo em relação controle ($0,45 \pm 0,14$ vs $0,14 \pm 0,07$ em UA) e na **figura 18 B**, não houve alteração significativa da expressão protéica de TIMP-1 no grupo hipotiroideo em relação ao controle ($2,79 \pm 0,71$ vs $3,18 \pm 1,12$ em UA).

Figura 18 - (A) Influência do hipotireoidismo na expressão protéica da TIMP-2 em aortas torácicas dos grupos experimentais. **(B)** Influência do hipotireoidismo na expressão protéica da TIMP-1 nas aortas torácicas dos grupos experimentais.

Grupo controle (n=4), grupo hipo (n=4). Os valores são representados por média $\pm$ desvio-padrão. * vs controle ($p < 0,05$).

Fonte: Monteiro (2012).

Partindo do corpo de resultados gerados por este estudo, é possível verificar que o hipotireoidismo severo é capaz de gerar uma série de alterações morfológicas na parede vascular, sendo relevante inclusive em artérias de grande calibre como a aorta e também em porções retificadas da mesma como é a porção torácica. Desta forma, será realizada a discussão dos dados obtidos no tópico a seguir.

6 DISCUSSÃO

6.1 Confirmação e caracterização do modelo experimental

Inicialmente, para garantir o estado proposto de hipotiroidismo foram realizados alguns ensaios para a confirmação do modelo experimental. A dosagem sérica de T3 e T4 confirmou o estado de hipotiroidismo encontrando resultados semelhantes à maioria dos trabalhos realizados nesta área (MORENO et al., 1997; OZHAN et al., 2005; SCHENKLER et al., 2008). Outro parâmetro também utilizado para a confirmação deste modelo foi a realização da razão peso do coração/comprimento da tíbia, evidenciando a diminuição da massa cardíaca no grupo hipo, já esperada, como amplamente descrito em literatura (BIONDI et al., 2002; KLEIN, 2003; OHGA et al., 2002). Esta última, utilizada em substituição à razão peso do coração/peso corpóreo, deixa de incluir possíveis variações de peso em decorrência do consumo diário de ração e água dos animais (HSU et al., 2009).

Além da confirmação do modelo experimental que garantiu o estado hipotiroideo, foi realizada a caracterização de peso, consumo de ração/água e parâmetros hemodinâmicos deste grupo. Dentre estes parâmetros, as medidas de pressão arterial sistólica e frequência cardíaca mostraram redução significativa a partir da primeira semana experimental. Baixos níveis séricos de T3, causados pelo hipotiroidismo severo, causam efeitos sistêmicos como hipotermia, supressão da atividade cardíaca, bradicardia e hipotensão (BILEZIKIAN; LOEB, 1983). Adaptações neurovasculares incluindo vasoconstrição periférica, e diminuição do volume sanguíneo, ocorrem no sentido de manter as funções fisiológicas (GARDNER; SHOBACK, 2007; LADENSON; GOLDENHEIM; RIDGWAY, 1988). Como descrito anteriormente, os resultados encontrados nos parâmetros hemodinâmicos corroboram com as alterações hemodinâmicas características do hipotiroidismo severo (OJAMAA; KLEMPERER; KLEIN, 2001), sendo estas reflexo do estado hipometabólico induzido pelo hipotiroidismo (STREETEN; ANDERSON JR, 1988).

Alterações de peso corpóreo neste estado são comuns e, dependendo da espécie que constitui os grupos experimentais, podem apresentar diferenças. Em humanos, sabidamente, o hipotiroidismo causa aumento de peso corpóreo por

diminuição da taxa metabólica e aumento da retenção de fluidos (DORR; VOLZKE, 2005; STREETEN; ANDERSON JR, 1988), no entanto, relatos de casos de hipotireoidismo por períodos prolongados e sem tratamento em humanos, também descrevem as mesmas alterações fisiológicas encontradas em ratos, como a hipotensão arterial, bradicardia e perda de peso (MATHEW et al., 2011). No tocante às variações de peso em ratos submetidos ao hipotireoidismo, muitas são as controvérsias. O grau e o tempo de hipotireoidismo podem alterar a massa corpórea dos animais, mas em geral, a maioria dos estudos que se utilizam deste modelo apresentam perda de peso dos animais submetidos a este estado (CARNEIRO-RAMOS et al., 2007; MOULAKAKIS et al., 2008; MOULAKAKIS et al., 2010). Estudos realizados por períodos mais prolongados (acima de 28 dias) também demonstraram uma diminuição do peso corpóreo dos animais hipotireóides (DAGRE et al., 2005; MCALLISTER et al., 2005; MORENO et al., 1997). Desta forma, os animais do grupo experimental hipotireóideo apresentaram perda de peso de 23% na última semana de tratamento, assim como caquexia e alterações comportamentais (letargia e debilidade), corroborando com dados previamente descritos (CARNEIRO-RAMOS et al., 2007; MOULAKAKIS et al., 2008; MOULAKAKIS et al., 2010).

Estudos que investigam a atuação dos HT no metabolismo basal descrevem que além do T3 exercer efeitos sobre a síntese de alguns componentes mitocondriais particulares (enzimas respiratórias associadas à membrana e transporte de metabólitos), ainda regula o trofismo celular (hipertrofia ou hiperplasia) de órgãos que são muito ativos metabolicamente como o fígado, o coração e tecido muscular. Ratos submetidos ao hipotireoidismo por 2 e 3 semanas já demonstram perda de peso corporal (CARNEIRO-RAMOS et al., 2007; MORENO et al., 1997) e voltam a recuperá-lo somente após administração de T3. No entanto, considerando o exposto acima, se por um lado ocorre a diminuição do metabolismo basal, dada em função da redução nos níveis de HT e, por consequência, a síntese proteica também é afetada, o tempo de hipotireoidismo, assim como a espécie animal são determinantes no que se refere ao ganho ou perda de peso.

Para avaliar se o procedimento cirúrgico (tireoidectomia total) poderia ser responsável pela diminuição do consumo observado, foi realizado paralelamente neste estudo o grupo sham, que simula a tireoidectomia sem a remoção da glândula tireóide. Os resultados obtidos pelo grupo sham demonstraram que a cirurgia não

interferiu no consumo dos animais após 1 semana da realização do procedimento, provando então que a diminuição do consumo observada no grupo hipo ocorreu em decorrência da ausência do HT.

6.2 Avaliação morfológica das aortas torácicas

As artérias de condutância proporcionam o amortecimento da pressão arterial sistólica durante o ciclo cardíaco e, desta forma, apresentam um papel chave no sistema cardiovascular. Alterações na constituição morfológica dos grandes vasos, em consequência de patologias como o hipotireoidismo severo, podem resultar em comprometimento funcional dos mesmos. Parâmetros morfométricos como área de seção transversal, volume nuclear e quantidade de núcleos de CMLVs foram avaliados sob esta condição e demonstraram alterações significativas.

Apesar de não ter sido observada alteração no diâmetro interno dos vasos, a diminuição do diâmetro externo, corrobora com a alteração da espessura da parede vascular através da diminuição de 26% da área de seção transversal, dado que é consistente com relatos bibliográficos já consolidados (GIANNATASSIO et al., 1997; MOULAKAKIS et al., 2008).

Partindo destes resultados foi avaliado se a diminuição da AST era decorrente do comprometimento das CMLVs, para tanto, foi determinado o número de núcleos por mm², assim como os volumes nucleares das CMLVs da camada média.

A contagem de núcleos da CMLVs não demonstrou apoptose, pois dentro do mesmo campo de contagem não houve diferença entre os grupos controle e hipo, no que se refere ao número de núcleos contados. Quando foi realizada a relação de número de núcleos por mm², foi possível constatar um aumento da densidade nuclear nas seções das aortas dos animais hipotiroídeos. O aumento da densidade nuclear é mais um dado que comprova o “achatamento” da AST, sem a participação de morte celular.

Depois de determinada a densidade nuclear das células da camada média, foi avaliado o estado geral dos núcleos celulares das CMLVs, através da medida de volume nuclear. Tal medida demonstrou uma redução significativa de 65% deste parâmetro no grupo hipotiroídeo, caracterizando o estado de comprometimento sintético destas células. Estes dados corroboram com estudos que relacionam o

hipotireoidismo ao estado hipometabólico, afetando o nível de muitas enzimas envolvidas em reações metabólicas, assim como enzimas mitocondriais envolvidas em fosforilação (LODISH et al., 1995). Este estado hipometabólico afeta a capacidade de celularidade (trofia) do HT sobre as células, refletindo no comprometimento da síntese celular e consequentemente diminuindo o volume nuclear. Esta diminuição, ou achatamento nuclear, são efeitos da ausência dos HT que podem ter contribuído para a redução da área de seção transversa.

Após avaliação histomorfométrica dos efeitos do hipotireoidismo sobre o leito aórtico e sobre a população das CMLVs contida na camada média, os componentes de MEC foram avaliados no intuito de verificar possíveis alterações quanto à deposição dos seus principais componentes. Em relação aos componentes fibrosos, o colágeno e elastina são os principais elementos responsáveis pelas propriedades mecânicas passivas dos grandes vasos, particularmente da aorta e de seus principais ramos. Alterações nestes componentes são relatadas juntamente a alterações de parâmetros hemodinâmicos e hormonais como o hipotireoidismo (DOBRIN, 1978; ROACH; BURTON, 1957) e conhecidas por contribuir para mudanças na complacência vascular. Em avaliação histológica para colágeno I e III não foi possível verificar qualquer tipo de alteração destes componentes, porém através da análise de expressão proteica, foi possível constatar diminuição significativa do colágeno I, sendo que não houve alteração dos níveis de colágeno do tipo III. A diminuição do colágeno do tipo I da ordem de 34% em relação ao observado no grupo controle pode trazer prejuízos à parede vascular, uma vez que o colágeno é o principal responsável pela resistência à tensão da mesma. Dados referentes à composição da MEC sob ação do hipotireoidismo ainda são controversos. Em estudo com modelo de hipotireoidismo prolongado muito semelhante ao utilizado neste trabalho, foi constatado através de testes de esforço mecânico, como distensibilidade, que as aortas dos animais hipo se encontravam mais rígidas suportando tensões elevadas até acima de níveis fisiológicos de tensão, apresentavam maior densidade de colágeno, com diminuição significativa da espessura das lamelas elásticas, assim como diminuída densidade de elastina (MOULAKAKIS et al., 2010).

Depois da avaliação das quantidades de colágenos I/III, também foi quantificada a elastina presente nestes vasos. Os resultados da avaliação da

densidade volumétrica das lamelas elásticas das aortas submetidas ao hipotireoidismo apresentaram um aumento significativo da ordem de 10%, este resultado foi confirmado pelo aumento da expressão proteica da elastina nestas aortas sendo este de 180% em relação ao grupo controle. Estudo realizado em humanos em condições experimentais não tão severas, não encontraram variações na elasticidade de aortas ascendentes (OZHAN et al., 2005), e poucos são os estudos que avaliam morfologicamente os componentes da MEC neste estado. Partindo do aumento da densidade de volume para elastina, foi avaliado se havia alteração em relação à espessura das lamelas elásticas dos grupos experimentais, sendo constatado um aumento de 30% da espessura média das lamelas.

Os resultados obtidos da quantificação do elemento elastina também são importantes dentro da investigação da diminuição da área de seção transversa das aortas do grupo hipo, pois é um dos principais constituintes da parede vascular. O aumento da elastina é um dado contraditório, porém pode representar um mecanismo menos afetado pela deficiência de HT ou até mesmo um mecanismo compensatório para o comprometimento da deposição de colágeno I encontrado. Relatos bibliográficos relacionam o hipotireoidismo e suas ações morfológicas nos vasos com a fragilização da aorta torácica, comprometendo o funcionamento deste vaso (GUTIERREZ; REINES; WULF-GUTIERREZ, 2004; ROSENMAN; YAROM, 1994).

6.3 Avaliação do remodelamento nas aortas torácicas

Outros fatores importantes dentro deste corpo de resultados referem-se à degradação dos componentes da MEC. A redução significativa de colágeno I, encontrada neste estudo, torna de suma importância à avaliação de agentes implicados na degradação de proteínas de matriz. Além da ação proteolítica sobre elementos como o colágeno, não podemos descartar, que também podem ser responsáveis pela diminuição significativa deste abundante elemento da MEC, o próprio comprometimento sintético celular revelando uma menor velocidade de manutenção e síntese deste elemento. O resultado que demonstra a diminuição do volume nuclear das CMLVs pode de forma indireta, reafirmar o comprometimento da

capacidade sintética celular remetendo a uma menor capacidade de deposição de elementos da MEC.

Para avaliar o componente degradação das proteínas de MEC, foram quantificadas as expressões protéicas da MMP-2 e MMP-9, devido à forte associação destas MMPs a vasculopatias (DEVERAJ; O'KEEFE, 2005; FUKUDA et al., 2006; MORGAN et al., 2003).

Em relação à quantificação de expressão proteica para a MMP-9, foi possível verificar uma redução significativa de 68% desta proteinase no grupo hipotiroideo, sendo que a expressão proteica da MMP-2 não apresentou variações. Diante destes resultados, se sabe que a MMP-9 é expressa em forma latente, necessitando de ativação para que se torne funcional. Em contrapartida, a MMP-2 é constitutiva e assim como outras proteases, tripsina e sistema ativador plasmina/plasminogênio, pode ativar e regular a síntese de MMP-9. Ligações de colágeno I da MEC e fibronectina também podem levar à ativação de MMP-9 latente (MOOK; FREDERIKS; NOORDEN, 2004). Levando em consideração as colocações expostas anteriormente, a diminuição do colágeno I pode estar atuando como elemento regulatório da expressão proteica de MMP-9 e, conseqüentemente, a sua ativação.

A regulação das MMPs também pode ocorrer através de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e se sabe que existe um mecanismo regulatório mais específico relacionando TIMP-1 com ação inibitória sobre MMP-9, assim como TIMP-2 inibindo MMP-2. Desta forma, foram avaliadas as expressões proteicas das TIMPs 1 e 2, sendo constatado o aumento significativo da expressão proteica de TIMP-2, porém sem alteração dos níveis proteicos de TIMP-1. A normalidade da TIMP-1 é um indicativo de que devido aos baixos níveis de MMP-9, a síntese desta proteína não está sendo estimulada fora dos níveis basais. Se relacionarmos os resultados encontrados na quantificação da expressão proteica das MMPs aos encontrados para as TIMPs, é possível entender que o aumento encontrado para TIMP-2 pode justificar de forma indireta a normalidade da expressão de MMP-2 e também pode atuar como possível inibidor da atividade de outras MMPs que podem estar envolvidas neste processo, uma vez que as TIMPs podem inibir vários tipos de MMPs concomitantemente. A hiporegulação do sistema proteolítico das metaloproteinases, representada pela diminuição dos níveis proteicos de MMP-9 e o aumento da expressão proteica de TIMP-2, também pode explicar o aparente

aumento da expressão de elastina, uma vez que este elemento pode ser degradado pela ação da MMP-2 entre outras MMPs (MMP-3/7 e 12) (SOMERVILLE; OBLANDER; APTE, 2003). Muitos são os dados que demonstram o sistema inibitório das TIMPs sobre as MMPs, porém os modelos mais utilizados são baseados no estudo da hipertensão, onde os níveis das MMPs se elevam em demasia. No modelo experimental utilizado neste estudo, não encontramos aumento da degradação de colágeno I através da atuação de MMPs, o que leva a crer que o comprometimento metabólico desencadeado pelo hipotireoidismo é o principal responsável pelas alterações encontradas.

Partindo de resultados como a diminuição da área de seção transversal da aorta, corroborando com a redução de volume nuclear assim como a alteração encontrada na deposição de elastina e a diminuição de um dos principais constituintes da MEC, o colágeno I; o comprometimento do sistema proteolítico envolvendo a participação das metaloproteinases veio confirmar o corpo de resultados encontrados. Neste momento, pode-se entender cada vez mais claramente que o severo comprometimento metabólico imposto pelo hipotireoidismo pode comprometer o balanço síntese/degradação das CMLVs e consequentemente alterar a importante constituição da MEC das aortas torácicas submetidas a este estado.

7 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos podemos concluir que o hipotireoidismo experimental induzido por 6 semanas é capaz de:

- alterar as características morfológicas e morfométricas da parede da artéria aorta torácica, diminuindo a área de seção transversal, aumentando a densidade de volume elástico e diminuindo o volume nuclear das CMLVs;
- alterar a deposição dos componentes da MEC representada pela redução da expressão proteica de colágeno I, e aumento da expressão de elastina;
- alterar a expressão proteica de metaloproteinases e seus inibidores teciduais representadas pela diminuição da expressão proteica de MMP-9 e aumento da expressão de TIMP-2.

A ação do hipotireoidismo prolongado leva a diminuição da seção transversal da aorta torácica modulando a deposição e degradação de elementos da matriz extracelular.

REFERÊNCIAS¹

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York. Garland Science, 2002.
- BECK JR, L.; D'AMORE, P. A. Vascular development: cellular and molecular regulation. **FASEB J.**, v. 11, n. 5, p. 365-373, 1997.
- BERRY, C. L.; GREENWALD, S. E.; RIVETT, J. F. Static mechanical properties of the developing and mature rat aorta. **Cardiovasc. Res.**, v. 9, n. 5, p. 669-678, 1975.
- BILEZIKIAN, J. P.; LOEB, J. N. The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha- and beta-adrenergic receptor systems and adrenergic responsiveness. **Endocr. Rev.**, v. 4, n. 4, p. 378-388, 1983.
- BIONDI, B.; PALMIERI, E. A.; LOMBARDI, G.; FAZIO, S. Subclinical hypothyroidism and cardiac function. **Thyroid.**, v. 12, n. 6, p. 505-510, 2002.
- 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.
- BROWN, S. P.; CLEMONS, J. M.; HE, Q.; LIU, S. Effects of resistance exercise and cycling on recovery blood pressure. **J. Sports Sci.**, v. 12, n. 5, p. 463-468, 1994.
- BURTON, A. C. Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. **Physiol. Rev.**, v. 34, p. 619-642, 1954.
- CANARIS, G. J.; MANOWITZ, N. R.; MAYOR, G.; RIDGWAY, E. C. The Colorado thyroid disease prevalence study. **Arch. Intern. Med.**, v. 160, p. 526-534, 2000.
- CANTOR, J. O.; KELLER, S.; PARSHLEY, M. S.; DARNULE, T. V.; DARNULE, A. T.; CERRETA, J. M.; TURINO, G. M.; MANDL, I. Synthesis of crosslinked elastin by an endothelial cell culture. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 95, n. 4, p. 1381-1386, 1980.
- CARNEIRO-RAMOS, M. S.; DINIZ, G. P.; ALMEIDA, J.; VIEIRA, R. L. P.; PINHEIRO, S. V. B.; SANTOS, R. A.; BARRETO-CHAVES, M. L. M. Cardiac angiotensin II type I and type II receptors are increased in rats submitted to experimental hypothyroidism. **J. Physiol.**, v. 15, n. 583, pt. 1, p. 213-223, 2007.
- CARNES, W. H.; ABRAHAM, P. A.; BUONASSISI, V. Biosynthesis of elastin by an endothelial cell culture. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 90, n. 4, p. 1393-1399, 1979.

¹ De acordo com:

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

CLARK, J. M.; GLAGOV, S. Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited. **Arteriosclerosis**, v. 5, p. 19–34, 1985.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

DAGRE, A. G.; LEKAKIS, J. P.; PAPAIOANNOU, T. G.; PAPAMICHAEL, C. M.; KOUTRAS, D. A.; STAMATELOPOULOS, S. F.; ALEVIZAKI, M. Arterial stiffness is increased in subjects with hypothyroidism. **Int. J. Cardiol.**, v. 103, n. 1, p. 1-6, 2005.

DAMIANO, V.; TSANG, A.; WEINBAUM, G.; CHRISTNER, P.; ROSENBLOOM, J. Secretion of elastin in the embryonic chick aorta as visualized by immunoelectron microscopy. **Coll. Relat. Res.**, v. 4, n. 2, p. 153-164, 1984.

DAVIS, C. A.; PEARCE, W. H.; HAINES, G. K.; SHAH, M.; KOCH, A.E. Increased ICAM-1 expression in aortic disease. **J. Vasc. Surg.**, v. 18, n. 5, p. 875-880, 1993.

DAVIS, E. C. Endothelial cell connecting filaments anchor endothelial cells to the subjacent elastic lamina in the developing aortic intima of the mouse. **Cell Tiss. Res.**, v. 272, p. 211–219, 1993.

DELP, M. D.; MCALLISTER, R. M.; LAUGHLIN, M. H. Exercise training alters aortic vascular reactivity in hypothyroid rats. **Am. J. Physiol.**, v. 268, n. 4, pt. 2, p. 1428-1435, 1995.

DEVARAJ, S.; O'KEEFE, G. Defining the proinflammatory phenotype using high sensitive C-reactive protein levels as the biomarker. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, p. 4549–4554, 2005.

DINGEMANS, K. P.; TEELING, P.; LAGENDIJK, J. H.; BECKER, A. E. Extracellular matrix of the human aortic media: an ultrastructural histochemical and immunohistochemical study of the adult aortic media. **Anat. Rec.**, v. 258, n. 1, p. 1-14, 2000.

DOBRIN, P. Mechanical properties of arteries. **Physiol. Rev.**, v. 58, n. 2, p. 397-460, 1978.

DONG, H.; LEE, C. M.; HUANG, W. L.; PENG, S. X. Cardiovascular effects of substituted tetrahydroisoquinolines in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, n. 1, p. 262-268, 1992.

DÖRR, M.; VÖLZKE, H. Cardiovascular morbidity and mortality in thyroid dysfunction. **Minerva Endocrinol.**, v. 30, p. 199-216, 2005.

DUBEY, R. K.; JACKSON, E. K.; RUPPRECHT, H. D.; STERZEL, B. Factors controlling growth and matrix production in vascular smooth muscle and glomerular mesangial cells. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.**, v. 6, n. 1, p. 88-105, 1997.

EMPSON, M.; FLOOD, V.; MA, G.; EASTMAN, C. J.; MITCHELL, P. Prevalence of thyroid disease in an older Australian population. **Intern. Med. J.**, v. 7, n. 37, p. 448-455, 2007.

FAHRENBACH, W. H.; SANDBERG, L. B.; CLEARY, E. G. Ultrastructural studies on early elastogenesis. **Anat. Rec.**, v. 155, p. 563–576, 1966.

FARWELL, A. P.; BRAVERMAN, L. E. Inflammatory thyroid disorders. **Otolaryngol. Clin. North Am.**, v. 29, n. 4, p. 541-556, 1996.

FUKUDA, D.; SHIMADA, A.; TANAKA, T.; KUSUYAMA, H.; YAMASHITA, S.; EHARA, Y.; NAKAMURA, T.; KAWARABAYASHI, H.; IIDA, M. Comparison of levels of serum matrix metalloproteinase- 9 in patients with acute myocardial infarction versus unstable angina pectoris versus stable angina pectoris. **Am. J. Cardiol.**, v. 97, p. 175–180, 2006.

GARDNER, D. G.; SHOBACK, D. **Endocrine emergencies, in Greenspan's basic and clinical endocrinology**. 8th ed. New York: McGraw-Hill, USA, 2007.

GERRITY, R. G.; CLIFF, W. J. The aortic tunica intima in young and aging rats. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 16, n. 3, p. 382-402, 1972.

GIANNATTASIO, C.; RIVOLTA, M. R.; FAILLA, M.; MANGONI, A. A.; STELLA, M. L.; MANCIA, G. Large and medium sized artery abnormalities in untreated and treated hypothyroidism. **Eur. Heart J.**, v. 18, n. 9, p. 1492-1498, 1997.

GIANNOCCO, G.; DOS SANTOS, R. A.; NUNES, M. T. Thyroid hormone stimulates myoglobin gene expression in rat cardiac muscle. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 1-2, n. 226, p. 19-26, 2004.

GRIEVE, D. J.; FLETCHER, S.; PITSILLIDES, A. A.; BOTHAM, K. M.; ELLIOTT, J. Effects of oral propylthiouracil treatment on nitric oxide production in rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, v. 127, n. 1, p. 1-8, 1999.

GUNASEKERA, R. D.; KURIYAMA, H. The influence of thyroid states upon responses of the rat aorta to catecholamines. **Br. J. Pharmacol.**, v. 99, n. 3, p. 541-547, 1990.

GUTIERREZ, G.; REINES, H. D.; WULF-GUTIERREZ, M. E. Clinical review: hemorrhagic shock. **Crit. Care**, v. 8, n. 5, p. 373-381, 2004.

GUYTON, A. C.; MANNING JR, R. D.; NORMAN JR, R. A.; MONTANI, J. P.; LOHMEIER, T. E.; HALL, J. E. Current concepts and perspectives of renal volume regulation in relationship to hypertension. **J. Hypertens. Suppl.**, v. 4, n. 4, p. S49-56, 1986.

HARKNESS, M. L.; HARKNESS, R. D.; MCDONALD, D. A. The collagen and elastin content of the arterial wall in the dog. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 146, n. 925, p. 541-551, 1957.

HOOFNAGLE, M. H.; WAMHOFF, B. R.; OWENS, G. K. Lost in transdifferentiation. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 1249–1251, 2004.

HOWARD, P. S.; MACARAK, E. J. Localization of collagen types in regional segments of the fetal bovine aorta. **Lab. Invest.**, v. 61, p. 548–555, 1989.

HSU, S.; NAGAYAMA, T.; KOITABASHI, N.; ZHANG, M.; ZHOU, L.; BEDJA, D.; GABRIELSON, K. L.; MOLKENTIN, J. D.; KASS, D. A.; TAKIMOTO, E. Phosphodiesterase 5 inhibition blocks pressure overload-induced cardiac hypertrophy independent of calcineurin pathway. **Cardiovasc. Res.**, v. 81, n. 2, p. 301–309, 2009.

HU, Y.; ZHANG, Z.; TORSNEY, E.; AFZAL, A. R.; DAVISON, F.; METZLER, B.; XU, Q. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. **J. Clin. Invest.**, v. 113, p. 1258–1265, 2004.

HYNES, R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, v. 69, n. 1, p. 11–25, 1992.

KARRER, H. E. An electron microscope study of the aorta in young and aging mice. **J. Ultrastruct. Res.**, v. 5, p. 1–27, 1961.

KELLEHER, C. M.; MCLEAN, S. E.; MECHAM, R. P. Vascular extracellular matrix and aortic development. **Curr. Top Dev. Biol.**, v. 62, p. 153–188, 2004.

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

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran: bases patológicas das doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

KUZMAN, J. A.; GERDES, A. M.; KOBAYASHI, S.; LIANG, Q. Thyroidhormone 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.

LADENSON, P. W.; GOLDENHEIM, P. D.; RIDGWAY, E. C. Prediction and reversal of blunted ventilator responsiveness in patients with hypothyroidism. **Am. J. Med.**, v. 84, n. 5, p. 877–883, 1988.

LEUNG, D. Y.; GLAGOV, S.; MATHEWS, M. B. Elastin and collagen accumulation in rabbit ascending aorta and pulmonary trunk during postnatal growth. Correlation of cellular synthetic response with medial tension. **Circ. Res.**, v. 41, n. 3, p. 316–23, 1977.

LOCHTER, A.; BISSELL, M. J. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. **Semin. Cancer Biol.**, v. 6, n. 3, p. 165–173, 1995.

LODISH, H.; BALTIMORE, D.; BORK, A.; ZIPURSKI, S. L.; MATSUDARIRE, P.; DARNELL, S. **Molecular cell biology**. 3rd ed. New York: Scientific American Books, USA, 1995.

MCALLISTER, R. M.; ALBARRACIN, I.; PRICE, E. M.; SMITH, T. K.; TURK, J. R.; WYATT, K. D. Thyroid status and nitric oxide in rat arterial vessels. **J. Endocrinol.**, v. 185, p. 111-119, 2005.

MANDARIM DE LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MATHEW, V.; MISGAR, R. A.; GHOSH, S.; MUKHOPADHYAY, P.; ROYCHOWDHURY, P.; MUKHOPADHYAY, S.; CHOWDHURY, S. Myxedema coma: a new look into an old crisis. **J. Thyroid. Res.**, v. 2011, p. 462-493, 2011.

MCLEAN, S. E.; MECHAM, B. H.; KELLEHER, C. M.; MARIANI, T. J.; MECHAM, R. P. **Extracellular matrix gene expression in developing mouse aorta**: extracellular matrices and development. New York: Elsevier, 2005.

MONTEIRO, P. S. O efeito do hipotireoidismo experimental nos componentes da matriz extracelular de aortas torácicas de ratos. 2012. 60 f.

MOOK, O. R. F.; FREDERIKS, W. M.; NOORDEN, C. V. The role of gelatinases in colorectal metastasis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 4, n. 1705, p. 69-89, 2004.

MORENO, M.; LANNI, A.; LOMBARDI, A.; GOGLIA, F. How the thyroid controls metabolism in the rat: different roles for triiodothyronine and diiodothyronines. **J. Physiol.**, v. 505, pt. 2, p. 529-538, 1997.

MORGAN, A. R.; ZHANG, B.; TAPPER, W.; COLLINS, A.; YE, S. Haplotypic analysis of the MMP-9 gene in relation to coronary artery disease. **J. Mol. Med.**, v. 81, n. 5, p. 321-326, 2003.

MOULAKAKIS, K. G.; POULAKOU, M. V.; DOSIOS, T.; DONTAS, J.; SOKOLIS, D. P.; VLACHOS, I. S.; SAFIOLEAS, M. C.; PAPACHRISTODOULOU, A.; KARAYANNACOS, P. E.; PERREA, D. N. Hypothyroidism and the aorta: evidence of increased oxidative DNA damage to the aorta of hypothyroidism rats. **In Vivo**, v. 22, n. 5, p. 603-608, 2008.

MOULAKAKIS, K. G.; SOKOLIS, D. P.; PERREA, D. N.; DONTAS, I.; DOSIOS, T.; POULAKOU, M. V.; MYLONAS, S. N.; DIMITRIOU, C. A.; KARAYANNACOS, P. E. The effects of hypothyroidism on the mechanical properties and histomorphological structure of the thoracic aorta. **Angiology**, v. 61, n. 3, p. 259-268, 2010.

O'CONNELL, M. K.; MURTHY, S.; PHAN, S.; XU, C.; BUCHANAN, J.; SPILKER, R.; DALMAN, R. L.; ZARINS, C. K.; DENK, W.; TAYLOR, C. A. The threedimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. **Matrix Biol.**, v. 27, p. 171-181, 2008.

OHGA, Y.; SAKATA, S.; TAKENAKA, C.; ABE, T.; TSUJI, T.; TANIGUCHI, S.; TAKAKI, M. Cardiac dysfunction in terms of left ventricular mechanical work and energetics in hypothyroid rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, n. 2, p. H631-641, 2002.

OJAMAA, K.; KLEMPERER, J. D.; KLEIN, I. Acute effects of thyroid hormone on vascular smooth muscle. **Thyroid**, v. 6, n. 5, p. 505-512, 2001.

OZHAN, H.; YAZICI, M.; ALBAYRAK, S.; ERBILIN, E.; BULUR, S.; AKDEMIR, R.; UYAN, C. Elastic properties of the ascending aorta left ventricular function in patients with hypothyroidism. **Echocardiography**, v. 22, n. 8, p. 649-656, 2005.

PARTRIDGE, S. M. Elastin. **Adv. Prot. Chem.**, v. 17, p. 227–302, 1962.

PASSMAN, J. N.; DONG, X. R.; WU, S. P.; MAGUIRE, C. T.; HOGAN, K. A.; BAUTCH, V. L.; MAJESKY, M. W. A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1₊ smooth muscle progenitor cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 9349–9354, 2008.

RAHMANI, M. A.; CHEEMA, I. R.; SEN, S.; PEOPLES, B.; RILEY, S. R. The effect of hyperthyroidism and hypothyroidism on alpha 1- and alpha 2-adrenergic responsiveness in rat aortic smooth muscle. **Artery**, v. 14, n. 6, p. 362-383, 1987.

RISAU, W.; FLAMME, I. Vasculogenesis. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 11, p. 73-91, 1995.

ROACH, M. R.; BURTON, A. C. The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 35, n. 8, p. 681-690, 1957.

ROSENMAN, E.; YAROM, R. Dissecting aneurysm of the aorta and hypothyroidism. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 30, n. 7, p. 510-513, 1994.

ROSS, R. The elastic fiber. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 21, p. 199–208, 1973.

ROSS, R.; BORNSTEIN, P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. **J. Cell Biol.**, v. 40, p. 366–381, 1969.

SABIO, J. M.; RODRIGUEZ-MARESCA, M.; LUNA, J. D.; GARCÍA DEL RÍO, C.; VARGAS, F. Vascular reactivity to vasoconstrictors in aorta and renal vasculature of hyperthyroid and hypothyroid rats. **Pharmacology**, v. 49, n. 4, p. 257-264, 1994.

SCHLENKER, E. H.; HORA, M.; LIU, Y.; REDETZKE, R. A.; MORKIN, E.; GERDES, A. M. Effects of thyroidectomy, T4 and DITPA replacement on brain blood vessel density in adult rats. **Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 294, n. 5, p. R1504-1509, 2008.

SCHWARTZ, S. M.; BENDITT, E. P. Postnatal development of the aortic subendothelium in rats. **Lab. Invest.**, v. 26, n. 6, p. 778-786, 1972.

SCHWARTZ, S. M.; MAJESKY, M. W.; MURRY, C. E. The intima: development and monoclonal responses to injury. **Atherosclerosis**, v. 118, p. S125-140, 1995.

SOMERVILLE, R.; OBLANDER, S.; APTE, S. Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. **Genome Biol.**, v. 4, p. 216, 2003.

STENMARK, K. R.; DAVIE, N.; FRID, M.; GERASIMOVSKAYA, E.; DAS, M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. **Physiology**, v. 21, p. 134–145, 2006.

STREETEN, D. H.; ANDERSON JR, G. H. Hypertension: relating drug therapy to pathogenetic mechanisms. **Prog. Drug Res.**, v. 32, p. 175-194, 1988.

SURI, R. K.; RATNA, M. S.; DHAWAN, V.; GUPTA, A.; GUPTA, R.; SHARMA, K.; THINGNAM, S. K.; PURI, G. D.; MADHULIKA, S.; GANGULY, N. K. Reactive oxygen species. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants in patients undergoing open heart surgery. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 30, n. 793, p. 366-370, 1996.

THE UNIVERSITY OF WESTERN AUSTRALIA. Blue histology – vascular system. Available in: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/vascular/vascular.htm>. Access: 20/10/2010.

TORSNEY, E.; HU, Y.; XU, Q. Adventitial progenitor cells contribute to arteriosclerosis. **Trends. Cardiovasc. Med.**, v. 15, p. 64–68, 2005.

VARGAS, F.; MORENO, J. M.; RODRIGUEZ-GOMEZ, I.; WANGENSTEEN, R.; OSUMA, A.; ALVAREZ-GUERRA, M.; GARCIA-ESTAN, J. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 154, p. 197-212, 2006.

WAGENSEIL, J. E.; MECHAM, R. P. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. **Physiol. Rev.**, v. 89, n. 3, p. 957-989, 2009.

WÓJCIAK-STOTHARD, B.; DENYER, M.; MISHRA, M.; BROWN, R. A. Adhesion, orientation, and movement of cells cultured on ultrathin fibronectin fibers. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.**, v. 33, n. 2, p. 110-117, 1997.

WOLINSKY, H.; GLAGOV, S. Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. **Circ. Res.**, v. 20, p. 409–421, 1967.

WOLINSKY, H.; GLAGOV, S. Structural basis for the static mechanical properties of the aortic media. **Circ. Res.**, v. 14, p. 400–413, 1964.