ERIKA LIA BRUNETTO RACT

**Participação da triiodotironina (T3) na regulação da
expressão de genes em cardiomiócitos de ratos: estudos *in*
vivo e *in vitro***

São Paulo
2012

ERIKA LIA BRUNETTO RACT

**Participação da triiodotironina (T3) na regulação da
expressão de genes em cardiomiócitos de ratos: estudos *in*
vivo e *in vitro***

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza Nunes

Versão Corrigida. A versão Original se encontra arquivada no Serviço de Comunicações do ICB

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 não autorizada pelo autor

Brunetto-Ract, Erika Lia.

Participação da triiodotironina (T3) na regulação da expressão de genes em cardiomiócitos de ratos: estudo *in vivo* e *in vitro* / Erika Lia Brunetto Ract. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Maria Tereza Nunes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Bases moleculares da ação de hormônios tireoidianos no controle da expressão de genes

Versão do título para o inglês: Role of triiodothyronine (T3) on the regulation of rat cardiomyocyte genes expression: *in vivo* and *in vitro* studies

Descritores: 1. triiodotironina 2. coração 3. cultura de células 4. expressão gênica I. Nunes, Maria Tereza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0171/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Erika Lia Brunetto Ract.

Título da Tese: Participação da triiodotironina (T3) na regulação da expressão de genes em cardiomiócitos de ratos: estudo *in vivo* e *in vitro*.

Orientador(a): Maria Tereza Nunes.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
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 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **028** nas fls. **43** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de **Maria Tereza Nunes** Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Ação não genômica dos hormônios tiroideanos sobre o músculo cardíaco: repercussões sobre o metabolismo energético"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Érika Lia Brunetto Tact**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **17.05.2007**.

São Paulo, 18 de maio de 2007.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária -Suplente
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 - telefax : (55) (011) 3091 7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.015.11

São Paulo, 29 de março de 2011.

REF.: Protocolo nº028/07.

"Ação não genômica dos hormônios tiroideanos sobre o músculo cardíaco: repercussões sobre o metabolismo energético"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 17.05.2013.**

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

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da Comissão de Ética
no Uso de Animal - ICB /USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. **MARIA TEREZA NUNES**

Departamento de Fisiologia e Biofísica

Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Dedico esse trabalho aos meus pais,
José Luiz e Rosana, por seu amor e
apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Ricardo por toda a compreensão, amor, companheirismo e apoio. Sem ele, meus caminhos teriam sido mais tortuosos. Eu não teria conseguido sem você, amor. Te amo.

À minha filha Ana Beatriz, que desde dentro de mim foi responsável pela minha imensa alegria e vontade de viver. É por você, minha filha, que eu busco me aprimorar cada vez mais. Te amo profundamente.

À minha família, pai, mãe, irmão e Jú, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava. Amo vocês.

À Marlene e Hildo, pelo carinho, apoio e amor.

À Renata e Renato, por cuidarem da minha filha sempre que eu precisei, amando-a, como se fosse seus. Meu coração ficava em paz.

À minha orientadora Maria Tereza Nunes, pelo acolhimento durante todos esses anos em seu laboratório, pelos ensinamentos e orientação, que tanto contribuíram para a minha formação profissional e pessoal. Muito obrigada.

À Leonice, pelas palavras amigas, pelo conforto e por estar sempre do nosso lado.

À Paulinha, que aos poucos, conseguiu entrar no meu coração e se tornar, além de minha companheira de bancada e discussões científicas, uma grande amiga. À Renata, por manter meus pés no chão, pelas risadas e pelos debates em torno de nossos experimentos. Vocês duas acrescentaram muito em minha vida.

Aos colegas de laboratório contribuíram, direta ou indiretamente para que essa tese fosse possível.

À Prof. Maria Luiza Barreto-Chaves por me receber em seu laboratório sempre de portas abertas e com um sorriso e à Gabriela, pelos ensinamentos, disposição e ajuda com as culturas.

Ao Prof. Cicogna e ao Dijon, responsável pela cirurgia de estenose aórtica. Sem eles, essa tese não seria possível.

Aos laboratórios vizinhos e seus técnicos, principalmente, às técnicas Julieta e Rosângela, que sempre me receberam, ensinaram e comprovaram que pesquisa, não se faz sozinho.

À FAPESP, que com o apoio financeiro permitiu a realização deste trabalho.

À Deus, por me levantar e me manter em pé, todas as vezes que eu cai.

Muito obrigada!

RESUMO

BRUNETTO, E.L. **Participação da triiodotironina (T3) na regulação da expressão de genes em cardiomiócitos de ratos: Estudos *in vivo* e *in vitro*.** 2011. 107 f. Tese. (Doutorado em Fisiologia Humana). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

Os hormônios tireoidianos (HTs) participam do controle de funções essenciais do organismo relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e metabolismo. Através de ações nucleares, eles controlam a expressão de vários genes cardíacos, como Slc2a1, Slc2a4, mioglobina (Mb), Myh6, Myh7, dentre outros. Além das ações genômicas, há inúmeras evidências de que o HT também promove efeitos que ocorrem em curto espaço de tempo (poucos minutos), e que independem de interação com seus receptores nucleares específicos ligados aos elementos responsivos ao HT presentes em seus genes alvo, as quais são conhecidas como ações não genômicas ou extranucleares. Sabe-se ainda que, na insuficiência cardíaca ocorre uma menor expressão dos receptores nucleares de T3, o que reduz em muito os efeitos cardioestimulantes deste hormônio, o que é extremamente vantajoso numa situação de contenção energética. Assim, o presente estudo visa avaliar o efeito agudo (não genômico) da administração de T3 sobre a translocação e expressão do GLUT4, e de proteínas-chave da atividade cardíaca, como GLUT1, Mb, SERCa2a, α e β miosina, em: (1) ratos submetidos ou não à insuficiência cardíaca através de cirurgia de estenose aórtica, bem como em (2) cultura primária de cardiomiócitos neonatos e adultos. A avaliação da expressão dos mRNAs de interesse foi feita por PCR em tempo real, das proteínas, por Western e o estado de poliadenilação do mRNA por RACE-PAT. Os resultados obtidos com os genes GLUT1, GLUT4 e mioglobina, no modelo *in vivo*, demonstraram que, após 30 min da administração do T3 no grupo portador de ICC, há um aumento da expressão do mRNA dos três genes, e que tanto o GLUT1 quanto o GLUT4 também tiveram um aumento de suas proteínas. Já a proteína Mb somente teve um aumento após 60 min da administração do T3. O ensaio de RACE-PAT demonstrou que, tanto o transcrito de GLUT1 quanto de Mb apresentaram um aumento do comprimento da cauda poli(A), enquanto que o do GLUT4 não se alterou. Quanto aos genes relacionados à função cardíaca, Atp2a2, Myh6 e Myh7, observamos que o tratamento com T3 por 30 min nos ratos portadores de ICC promoveu redução do conteúdo de mRNA dos três genes, bem como da proteína da beta MHC. O conteúdo de SERCa2a e da alfa MHC não se alterou em 30 min, mas aumentou após o tratamento com T3 por 60 min. Já no modelo *in vitro* de cardiomiócitos de neonatos, tivemos evidências de modulação do conteúdo de mRNA e proteínas, após 30 e 45 min, após a adição de T3 nas diferentes doses (de 10^{-9} a 10^{-6} M). Quando avaliamos o efeito do T3 sobre o conteúdo de mRNA nos cardiomiócitos de adultos em cultura, também observamos uma resposta aleatória, não dependente de dose. O conjunto dos dados obtidos até o momento aponta para a existência de um controle pós-transcricional do T3 sobre a expressão dos genes alvo desse estudo, o que poderia induzir uma melhora na função cardíaca, na vigência de uma ICC, uma vez que essas ações são rapidamente desencadeadas e fugazes, impedindo que os efeitos cardioestimulantes persistam, o que poderia ser deletério.

Palavras Chave: T3. Ação não genômica. Insuficiência cardíaca congestiva. Cultura de cardiomiócitos.

ABSTRACT

BRUNETTO, E.L. **The role of triiodothyronine (T3) on the regulation of rat cardiomyocyte genes expression: *in vivo* and *in vitro* studies.** 2011. 107 p. Ph. D. Thesis. (Ph. D. in Physiology). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

Thyroid hormones (TH) are involved in the control of essential functions of the body related to growth, development and metabolism. Through nuclear actions, they control the expression of several cardiac genes, such as Slc2a1, Slc2a4, myoglobin (Mb), Myh6, MYH7, among others. In addition to genomic actions, there are several evidences that TH also promotes effects that occur in a short time (few minutes), and which are independent of its interaction with specific nuclear receptors attached to the TH-responsive elements, present in their target genes, known as non-genomic or extranuclear actions. It is known that, in heart failure, there are a lower expression of nuclear T3 receptors, which reduce the cardiostimulating effects of the hormone, which is extremely advantageous in an energy contention. Thus, this study aims to evaluate the acute (nongenomic) administration of T3 on the expression and translocation of GLUT4, and key proteins of the cardiac activity, such as GLUT1, Mb, SERCa2a, α and β myosin in: (1) rats with or without heart failure after aortic stenosis surgery, as well as (2) primary cultured cardiomyocytes neonates and adults. Evaluation of the expression of mRNAs of interest was made by real-time PCR, protein by Western Blotting and mRNA polyadenylation state by RACE-PAT. The results obtained with the genes GLUT1, GLUT4 and myoglobin in '*the vivo*' model demonstrated that, after 30 min of the administration of T3 in the group with CHF, there is an increased in the mRNA expression of the three genes, and that, GLUT1 and GLUT4 also had an increase on their proteins. The protein Mb only had an increase after 60 min of T3 administration. The RACE-PAT assay demonstrated that GLUT1 and Mb transcript showed an increase in tail length poly(A), while GLUT4's did not change. As for genes related to cardiac function, Atp2a2, Myh6 and MYH7, we observed that, the treatment with T3 for 30 min in rats with CHF promoted a decrease of the mRNA of three genes as well as the beta MHC protein. The content of alpha-MHC and SERCa2a did not change in 30 min, but increased after T3 treatment for 60 min. In the '*in vitro*' model of neonatal cardiomyocytes, we had evidence of modulation of mRNA and protein content after 30 and 45 min after the addition of T3 in different doses (from 10^{-9} to 10^{-6} M). When evaluating the effect of T3 on the mRNA content in adult cardiomyocytes in culture, we also observed a random response, not dependent on dose. All the data obtained so far points to the existence of a post-transcriptional control of T3 on the expression of target genes of this study, which could induce an improvement in cardiac function in the presence of an CHF, since these actions are elicited and fleeting, preventing cardiostimulating effects persist, which could be deleterious.

Key Words: T3. Non genomic action. Congestive Heart Failure. Cardiomyocyte Culture.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AMPK	Monofosfato de Adenosina Quinase
ATP	Adenosina trifosfato
CAMK	Cálcio Calmodulina Quinase
DMEM	Modificação Dulbecco de Eagles Medium
GH	Hormônio do Crescimento
GLUT1	Transportador de Glicose do tipo 1
GLUT4	Transportador de Glicose do tipo 4
HCN2	Canal de Sódio e Potássio ativado por hiperpolarização
HS	Soro fetal de Cavalo
HT	Hormônios Tireoideanos
ICC	Insuficiência Cardíaca Crônica
Km	Capacidade de transporte de glicose
MAPK	Proteína Quinase Mitógeno Ativada
Mb	Gene da mioglobina
Myh6	Gene da subunidade alfa da miosina de cadeia pesada
Myh7	Gene da subunidade beta da miosina de cadeia pesada
NCS	Soro fetal de Bezerro
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
rT3	T3 reverso
SERCA	Bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático
Slc2a1	Gene do transportador de glicose do tipo 1
Slc2a4	Gene do transportador de glicose do tipo 4
T2	Diiidotironina
T3	3,5,3' - Triiodotironina
T4	3,5,3',5' - Tetraiodotironina
TR	Receptor de Hormônio Tireoidiano
TRE	Elemento Responsivo ao Hormônio Tireoidiano
TSH	Hormônio Tireotrofina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	25
4	ESTUDO 1: MODELO IN VIVO	25
4.1	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1.1	Indução de estenose aórtica supravalvar	25
4.1.2	Grupos experimentais	26
4.1.3	Extração do RNA	27
4.1.4	Realização do RT-PCR	27
4.1.5	Extração de Proteínas Totais	29
4.1.6	Fracionamento Subcelular	29
4.1.7	Western Blotting	30
4.1.8	RACE PAT (Rapid Amplification of cDNA Ends - Poly A Test)	32
4.1.9	Análise Estatística	33
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.2.1	Estudo dos parâmetros para caracterização da insuficiência crônica congestiva (ICC) mediante a cirurgia de Estenose da Aorta (Eao)	34
4.2.2	Dosagem de T3 e TSH	35
4.2.3	Estudo dos TRs	36
4.2.4	Estudo sobre a expressão dos transportadores de glicose 1 e 4 em animais portadores de ICC	37
4.2.4.1	<i>Avaliação da expressão gênica do SLC2A1</i>	<i>37</i>
4.2.4.2	<i>Avaliação do conteúdo protéico do GLUT 1.....</i>	<i>38</i>
4.2.4.3	<i>Avaliação da cauda poli(A) do GLUT1</i>	<i>39</i>
4.2.4.4	<i>Avaliação da expressão do SLC2A4</i>	<i>40</i>
4.2.4.5	<i>Avaliação do conteúdo protéico e da translocação de GLUT4</i>	<i>41</i>
4.2.4.6	<i>Avaliação da cauda poli(A) do GLUT4</i>	<i>42</i>
4.2.4.7	<i>Discussão: GLUT1 e GLUT4</i>	<i>42</i>

4.2.5	Estudo sobre a expressão da mioglobina (Mb) em animais portadores de ICC	45
4.2.5.1	<i>Avaliação da expressão gênica da Mb</i>	46
4.2.5.2	<i>Avaliação do conteúdo protéico de Mb</i>	46
4.2.5.3	<i>Avaliação da cauda poli(A) da Mb</i>	47
4.2.5.4	<i>Discussão: mioglobina</i>	47
4.2.6	Estudo sobre a expressão do Atp2a2 em animais portadores de ICC	48
4.2.6.1	<i>Avaliação da expressão gênica do Atp2a2</i>	48
4.2.6.2	<i>Avaliação do conteúdo protéico da SERCa2a</i>	49
4.2.7	Estudo sobre a expressão do Myh6 em animais portadores de ICC	50
4.2.7.1	<i>Avaliação da expressão do Myh6</i>	50
4.2.7.2	<i>Avaliação do conteúdo protéico da α-MHC</i>	51
4.2.8	Estudo sobre a expressão do Myh7 em animais portadores de ICC	51
4.2.8.1	<i>Avaliação da expressão gênica do Myh7</i>	51
4.2.8.2	<i>Avaliação do conteúdo protéico da β-MHC</i>	52
4.29	<i>Discussão: SERCa2a, α-MHC e β-MHC</i>	53
5	ESTUDO 2: MODELOS IN VITRO	55
5.1	MATERIAL E MÉTODOS	55
5.1.1	Cultura primária de cardiomiócitos de neonatos	55
5.1.2	Grupos experimentais	56
5.1.3	Cultura primária de cardiomiócitos de adultos	57
5.1.4	Grupos experimentais	57
5.1.5	Extração do RNA	58
5.1.6	Realização do RT-PCR	58
5.1.7	Extração de Proteínas Totais	58
5.1.8	Western Blotting	59
5.1.9	Análise Estatística	59
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.2.1	Estudo sobre a expressão do Slc2a1 (GLUT1) em cultura primária de cardiomiócitos	60
5.2.1.1	<i>Expressão gênica e protéica do GLUT1 em cardiomiócitos de neonatos</i>	60
5.2.1.1.A	<i>Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre a expressão do Slc2a1</i>	60

5.2.1.1.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre o Slc2a1</i>	61
5.2.1.1.C	<i>Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre o conteúdo protéico de GLUT1</i>	61
5.2.1.1.D	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre o conteúdo protéico de GLUT1 ..</i>	62
5.2.1.2	<i>Expressão gênica do Slc2a1 em cardiomiócitos de adultos</i>	63
5.2.1.2.A	<i>Efeito da administração de T3 a curto prazo sobre o Slc2a1</i>	63
5.2.1.2.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre o Slc2a1</i>	64
5.2.2	Estudo sobre a expressão do SLC2A4 (GLUT4) em cultura primária de cardiomiócitos	65
5.2.2.1	<i>Expressão gênica e protéica do GLUT4 em cardiomiócitos neonatos</i>	65
5.2.2.1.A	<i>Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre a expressão gênica do Slc2a ..</i>	65
5.2.2.1.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre a expressão de Slc2a4</i>	66
5.2.2.1.C	<i>Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre o conteúdo protéico de GLUT4</i>	67
5.2.2.1.D	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre o conteúdo protéico de GLUT4 ..</i>	68
5.2.2.2	<i>Expressão do SLC2A4 em cardiomiócitos adultos</i>	69
5.2.2.2.A	<i>Efeito da administração de T3 a curto prazo sobre o Slc2a4</i>	69
5.2.2.2.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre o Slc2a4</i>	70
5.2.3	Discussão: transportadores de glicose: isoformas 1 e 4	71
5.2.4	Estudo sobre a expressão da mioglobina (Mb) em cultura primária de cardiomiócitos	76
5.2.4.1	<i>Expressão gênica e protéica da Mb em cardiomiócitos de neonatos</i>	76
5.2.4.1.A	<i>Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre a expressão gênica da Mb</i>	76
5.2.4.1.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre o mRNA da Mb</i>	77
5.2.4.1.C	<i>Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre o conteúdo protéico da Mb</i>	77
5.2.4.1.D	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre o conteúdo total de Mb</i>	78
5.2.4.2	<i>Expressão gênica da Mb em cardiomiócitos de adultos</i>	79
5.2.4.2.A	<i>Efeito da administração T3 a curto prazo sobre a Mb</i>	79
5.2.4.2.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre a Mb</i>	79
5.2.5	Discussão: mioglobina	80
5.2.6	Estudos sobre a expressão da SERCa2a em cultura primária de cardiomiócitos	82

5.2.6.1	<i>Expressão gênica e protéica da Mb em cardiomiócitos de neonatos</i>	82
5.2.6.1.A	<i>Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre a expressão do Atp2a2</i>	82
5.2.6.1.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre a expressão do Atp2a2</i>	82
5.2.6.1.C	<i>Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre o conteúdo protéico da SERCa2a</i>	83
5.2.6.1.D	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre o conteúdo protéico da SERCa2a</i>	84
5.2.6.2	<i>Expressão gênica da SERCa2a em cardiomiócitos de adultos</i>	85
5.2.6.2.A	<i>Efeito da administração a curto prazo de T3 sobre a expressão gênica do Atp2a2</i>	85
5.2.6.2.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre o Atp2a2</i>	86
5.2.7	Discussão: Atp2a2 (SERCa2a)	87
5.2.8	Estudos sobre a expressão da Myh6 em cultura primária de cardiomiócitos	88
5.2.8.1	<i>Expressão gênica e protéica da α-MHC em cardiomiócitos de neonatos</i>	88
5.2.8.1.A	<i>Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre a expressão do Myh6</i>	88
5.2.8.1.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre a expressão do Myh6</i>	89
5.2.8.1.C	<i>Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre o conteúdo protéico da α-MHC</i>	90
5.2.8.1.D	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre o conteúdo protéico da α-MHC ..</i>	90
5.2.8.2	<i>Expressão do Myh6 em cardiomiócitos de adultos</i>	91
5.2.8.2.A	<i>Efeito da administração a curto prazo de T3 sobre a expressão do Myh6</i>	91
5.2.8.2.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre a expressão do Myh6</i>	92
5.2.9	Estudos sobre a expressão do Myh7 em cultura primária de cardiomiócitos	93
5.2.9.1	<i>Expressão do Myh7 em cardiomiócitos de neonatos</i>	93
5.2.9.1.A	<i>Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre a expressão do Myh7</i>	93
5.2.9.1.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre a expressão do Myh7.....</i>	93
5.2.9.2	<i>Expressão do Myh7 em cardiomiócitos de adultos</i>	94
5.2.9.2.A	<i>Efeito da administração de T3 a curto prazo sobre a expressão do Myh7</i>	94
5.2.9.2.B	<i>Efeito da administração aguda de T3 sobre a expressão do Myh7</i>	95
5.2.10	Discussão: cadeia pesada da miosina (MHC): isoformas α e β	96

6	CONCLUSÕES	97
	REFERÊNCIAS	98

1 INTRODUÇÃO

Os Hormônios Tireoidianos

Os hormônios tireoidianos (HT) participam do controle de funções essenciais do organismo relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e metabolismo. Eles são sintetizados pela glândula tireóide, o maior órgão especializado em função endócrina do corpo humano, que secreta principalmente o T4 (3,5,3',5'-tetraiodotironina) e T3 (3,5,3'-triiodotironina), além do T2 e rT3, considerados biologicamente inativos. Embora o T4 seja o principal hormônio secretado pela tireóide, o T3 é o responsável pela maior parte dos seus efeitos biológicos, uma vez que as ações genômicas do HT decorrem basicamente da interação deste com o receptor nuclear de hormônios tireoidianos, proteína que tem cerca de 10 vezes maior afinidade pelo T3 que pelo T4.

A atividade sintética e secretória da glândula tireóide é basicamente regulada ou controlada pela tirotrófina (TSH). Na ausência do TSH, a tireóide torna-se hipoativa, diminuindo acentuadamente a disponibilidade plasmática dos hormônios tireoidianos. Em condições normais, uma diminuição dos hormônios tireoidianos circulantes leva a um aumento da síntese e secreção hipofisária de TSH, o que, por estimular a glândula tireóide, restaura os níveis circulantes de T4 e T3, cessando o estímulo inicial que desencadeou o aumento da secreção de TSH. Da mesma forma, uma elevação dos níveis circulantes dos hormônios tireoidianos resulta em diminuição ou supressão imediata da síntese e secreção hipofisária de TSH.

A maior parte do T3 presente na corrente sanguínea provém da conversão do T4 feita pelas desidases D1 e D2. A D1 (5'-desiodase tipo 1) é a enzima mais abundante encontrada principalmente no fígado e rins, mas em quantidades menores na glândula tireóide, nos músculos esqueléticos e cardíacos, enquanto que a D2 (5'-desiodase do tipo 2) é encontrada principalmente no cérebro e na hipófise, porém também está presente na pele, coração, tireóide, entre outros tecidos.

A enzima 5-desiodase tipo 3 é encontrada em vários órgãos e é responsável pela inativação dos HT, tanto do T4 pela sua conversão em rT3 e quanto do T3 em T2, já que ela remove o iodo do anel tirosil. Cerca de 80% do T4 é metabolizado por desidatação, sendo

35% em T3 e 45% em rT3. Os níveis intracelulares de T3 dependem da atividade dessas 3 enzimas (BIANCO et al., 2002).

A maioria dos efeitos do HT é mediada pela modulação da transcrição gênica, por meio da ligação do T3 ao seu receptor nuclear (TR). Este processo é complexo e envolve a participação de proteínas co-ativadoras e co-repressoras, que se associam ou se dissociam dos TRs, e dele resulta a indução ou diminuição da síntese de proteínas específicas, responsáveis pelos efeitos biológicos do HT (JEPSEN; ROSENFELD, 2002; FONDELL et al., 1999). Tais efeitos do HT são denominados de transcricionais, genômicos ou nucleares e se manifestam em um período de tempo longo o suficiente, para permitir a transcrição de genes específicos, processamento de mRNAs até a sua forma madura e tradução subsequente dos mesmos em proteínas específicas.

Por outro lado, é crescente na literatura o número de evidências de que o HT também promove efeitos que ocorrem em curto espaço de tempo (poucos minutos) e que se manifestam mesmo na presença de inibidores da transcrição gênica, o que demonstra que algumas ações do HT independem da interação do hormônio com o seu receptor nuclear específico ligado ao elemento responsivo ao HT presente em genes alvo do hormônio e se realizam por intermédio de outro mecanismo, que não o nuclear, sendo, portanto, conhecidas como ações não genômicas (DAVIS; DAVIS, 1996; CAO et al., 2005; MEZOSI et al., 2005). Outra particularidade dessas ações não genômicas é que podem ser desencadeadas também pelo T4, rT3 e T2, bem como pelo T3, ao contrário das ações genômicas que são determinadas basicamente pelo T3 (MEZOSI et al., 2005).

Há evidências de ações não genômicas dos HT: (a) na membrana plasmática, onde são descritos efeitos estimulantes do mesmo sobre o transporte de glicose, Ca^{++} e Na^{+} (SEGAL; INGBAR, 1989; DAVIS; DAVIS, 1992; INCERPI et al., 1999); (b) em várias organelas celulares, como mitocôndria, onde facilitaria o transporte de ADP para o seu interior e a formação de ATP (DAVIS; DAVIS, 1996) e retículo sarcoplasmático, onde aumentaria a atividade da bomba de cálcio (SERCA) (ZINMAN et al., 2006), efeito que se somaria ao seu efeito transcricional bastante conhecido sobre a expressão gênica da SERCA; (c) no citoesqueleto, promovendo polimerização da actina em células gliais (LEONARD et al., 1990), ósseas (LUEGMAYR et al., 1996) e hipofisárias (GOULART DA SILVA et al., 2006); (d) sobre a atividade de quinases específicas, como a proteína quinase C (PKC), a proteína quinase A (PKA), a piruvato quinase M2 (PKM2) e a *mitogen activated protein*

kinase (MAPK), que parecem ser as mediadoras dos efeitos não genômicos desses hormônios (DAVIS; DAVIS, 1996; LIN et al., 1999; DAVIS et al., 2000) e (e) em mRNAs específicos, alterando sua estabilidade e sua taxa de tradução (DAVIS; DAVIS, 1996), dentre outras.

Ações não-genômicas do HT já foram descritas no miocárdio e no leito vascular, como o estudo de Schmidt e colaboradores, em 2002, que demonstraram que em apenas 3 minutos, o T3 aumenta o débito cardíaco e reduz a resistência vascular periférica em ratos adultos. Estudos também foram realizados em cultura celular e sugerem que o HT, rapidamente e não genomicamente, regula a enzima Ca^{2+} ATPase, o canal de Na^{+} via PKC, o canal de K^{+} via PI3 quinase, o trocador $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ via PKC e MAPK (Davis; Davis, 2002).

O coração

O coração é um órgão único no sentido de que suas células estão adaptadas para contrações ininterruptas, de uma forma altamente coordenada, o que é vital para o organismo, dado o papel central que ele desempenha na distribuição de O_2 , substratos metabólicos e hormônios para os tecidos. Para que ele exerça essa função, deve receber constante suprimento de substratos metabólicos para gerar ATP, a fim de manter sua atividade contrátil sem entrar em fadiga. Desta forma o coração é capaz de utilizar uma variedade de substratos metabólicos e de se adaptar rapidamente à utilização dos mesmos face às alterações do seu suprimento (KORZICK, 2003).

Os ácidos graxos são o principal substrato metabólico do coração, entretanto, em situações fisiológicas, até 30% do ATP do miocárdio é gerado pela glicose e lactato, com menores contribuições dos corpos cetônicos e aminoácidos. Estima-se que a taxa de utilização de glicose no coração seja maior que a do músculo esquelético, tecido adiposo ou pulmão, apesar da capacidade do miocárdio de usar outros substratos energéticos (BECKER et al., 2001).

Embora a glicose não seja o principal substrato metabólico do coração no repouso, ela assume grande importância em muitas circunstâncias, tais como na insuficiência cardíaca, onde adaptações metabólicas ocorrem como: diminuição da beta oxidação mitocondrial, aumento da utilização de glicose como fonte de energia e aumento da atividade das enzimas glicolíticas (LOPASCHUK, 2004).

A disponibilidade de glicose para os tecidos depende do seu fluxo, o que é determinado pelo seu transporte, que se dá por meio de proteínas específicas transportadoras de glicose, os GLUTs (*glucose transporters*). Há 14 isoformas de GLUTs descritas (GLUT1 ao GLUT 14) com graus de expressão variáveis nos diferentes tecidos. O transporte de glicose também ocorre acoplado ao Na⁺ no território intestinal e renal (JOOST; THORENS, 2001).

O GLUT1 é expresso em todos os tecidos, ou seja, tem distribuição ubíqua, e apresenta um baixo Km, sendo, portanto, o principal transportador de glicose quando esta se encontra em níveis fisiológicos ou reduzidos na corrente sanguínea. Desta forma, garante o transporte basal de glicose a todos os tecidos (GOROVITS; CHARRON, 2003).

Já o GLUT4 é expresso no tecido muscular esquelético, cardíaco, adiposo branco e marrom. O GLUT4 apresenta elevado Km, sendo a única isoforma cuja translocação para a membrana plasmática é induzida pela insulina. É responsável pela captação de glicose quando esta se encontra em níveis elevados na circulação sanguínea, situação em que ocorre aumento da secreção de insulina. Essas proteínas encontram-se inseridas na membrana de vesículas intracelulares, presentes na região perinuclear e no citoplasma das células, as quais, sob estímulo insulínico, são direcionadas à membrana plasmática, onde se fundem. Esse processo, denominado translocação, resulta na incorporação de várias moléculas de GLUT4 na membrana plasmática, possibilitando assim o influxo de glicose para o interior das células que as expressam (GOROVITS; CHARRON, 2003). Ainda, a translocação do GLUT4 representa o principal mecanismo pelo qual a captação de glicose pelo cardiomiócito pode ser aumentada (TIAN; ABEL, 2001). Essa proteína vem sendo alvo de muitos estudos, considerando o aumento alarmante da incidência da resistência insulínica na população mundial.

No tecido muscular esquelético e cardíaco há uma via alternativa de translocação de GLUT4 que depende da contração muscular, a qual, por mecanismos ainda não completamente conhecidos, promove a ativação da AMPK. Todavia, há estudos que demonstram que a translocação de GLUT4 pode ocorrer por uma via independente da AMPK, bem como por meio da ativação da CaMK (cálcio calmodulina-quinase) (WITCZAK et al., 2007). Acredita-se que a isquemia e a hipóxia sejam os sinais que levariam à ativação da translocação de GLUT4 para a membrana plasmática (SUN et al., 1994).

No músculo cardíaco somente os GLUTs 1 e 4 são expressos. Em condições normais, estima-se que 70% da captação de glicose pelo coração ocorram através do GLUT4, enquanto 30% ocorram por meio do GLUT1 (BECKER et al., 2001). Como já foi salientado, o transporte de glicose é um passo limitante para a sua utilização no músculo cardíaco em determinadas condições como: hipertrofia por sobrecarga de pressão, cardiomiopatia diabética e insuficiência cardíaca, conforme indicam estudos clínicos e em animais de experimentação (MCVEIGH; LOPASCHUK, 1990; TAEGTMEYER, 1995).

Pacientes portadores de insuficiência cardíaca crônica (ICC) apresentam resistência insulínica em todo o organismo (PAOLISSO et al., 1991; SWAN et al., 1997; KEMPPAINEN et al., 2003), incluindo o miocárdio, onde se demonstrou uma diminuição da captação de fluordeoxiglicose, durante o *clamp* de insulina (PATERNOSTRO et al., 1996; PATERNOSTRO et al., 1999). Sabe-se também que a atividade transportadora de glicose encontra-se diminuída nessa condição (FRIEHS et al., 1999), o que poderia ser decorrente de uma redução do conteúdo ou da translocação do GLUT4, visto que na hipertrofia cardíaca por sobrecarga de pressão há uma diminuição do mRNA que codifica essa proteína (MINAKAWA et al., 2003).

Dessa maneira, a proteína GLUT4 detém um papel chave no fluxo de glicose para o coração, na homeostase glicêmica, bem como no estabelecimento do quadro de resistência periférica à insulina, razão pela qual, estudos que levem à compreensão dos fatores envolvidos na regulação da expressão desse gene, bem como da translocação desta proteína para a membrana plasmática, são de fundamental importância.

O coração como órgão alvo dos hormônios tireoidianos

O hormônio tireoidiano produz 2 tipos de efeitos biológicos: promoção do crescimento e diferenciação celular e estimulação do metabolismo energético.

Uma vez que o HT promove aumento da taxa metabólica na grande maioria dos tecidos, observa-se, como decorrência direta dessa ação, uma vasodilatação capilar, visando o aumento das trocas gasosas e dos substratos energéticos. Além de efeitos indiretos, o HT age diretamente no coração, atuando como um importante regulador da função cardíaca e da hemodinâmica cardiovascular através de ações diretas sobre os miócitos cardíacos, células musculares lisas e endotélio (KLEIN; OJAMAA, 2001; BIONDI; KLEIN, 2004).

O T3 atua sobre a diferenciação do coração através do controle da expressão de determinados genes. Essas ações decorrem da interação do T3 com receptores localizados em regiões específicas do DNA, conhecidas como elementos responsivos ao hormônio tireoidiano (TREs), que são trechos de 10-20 nucleotídeos localizados na região reguladora dos genes alvo do T3. A interação do complexo T3/receptor nuclear com os TREs leva à ativação ou inibição da transcrição de genes específicos e da síntese das proteínas que eles codificam (BRENT et al., 1991; LAZAR, 1993; HARVEY; WILLIAMS, 2002).

São descritas várias isoformas de receptores de T3, que são diferentemente expressas nos tecidos. Os elementos responsivos aos hormônios tireoidianos já foram identificados em muitos genes, como o do transportador de glicose sensível à insulina (GLUT4), da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA) e do seu próprio receptor (HARVEY; WILLIAMS, 2002), dentre outros.

Um dos efeitos mais conhecidos do T3 sobre o ventrículo é a regulação da composição das isoformas da miosina (MORKIN et al., 1983). Sabe-se que o T3 aumenta a expressão da subunidade alfa da cadeia pesada da miosina (α -MHC) e diminui a da beta (β -MHC), conferindo, portanto, maior velocidade de contração ao miocárdio (DILLMANN, 1996). O HT também exerce um efeito cronotrópico positivo através do aumento da expressão gênica de um dos canais iônicos específicos localizados no nodo sinusal no átrio direito (HCN2). Outras proteínas importantes para função cardíaca, como a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2) e fosfolambam, têm sua expressão elevada e diminuída, respectivamente, pelo hormônio tireoidiano, do que resulta o seu efeito aumentando a performance contrátil do coração (DILLMANN, 2002; BIONDI et al., 2002). Sendo assim, em situações de hipotireoidismo ocorre diminuição da expressão da HCN2, α -MHC e da SERCA 2 e aumento da β -MHC, o que reduz a frequência, velocidade e o tempo de contração ventricular (NUNES et al., 1985; ROHRER; DILLMANN, 1988; NADALGINARD; MAHDAVI, 1993).

Outro efeito dos HT sobre o coração é o de induzir a síntese de receptores β adrenérgicos (WILLIAMS; LEFKOWITZ, 1977). Como consequência, nos estados de hipertireoidismo observa-se um aumento da atividade β adrenérgica, que tem sido atribuído tanto a um aumento no número quanto da responsividade desses receptores às catecolaminas, provocando no músculo cardíaco um aumento da frequência, velocidade e força de contração

(BILEZEKIAN; LOEB, 1983; DILLMANN, 1993; HOMCY et al., 1991; MARTIN III, 1993).

Genes cardíacos regulados pelos HT

Um dos primeiros focos de estudo da regulação do Slc2a4 foi a musculatura esquelética. Neste tecido demonstrou-se que o GLUT4 apresenta-se diferencialmente expresso nas fibras musculares oxidativas e glicolíticas, sendo as oxidativas as que apresentam maior abundância dessa proteína (HENRIKSEN et al., 1990). Observou-se, ainda, que a sua expressão apresenta-se aumentada por hormônio tireoidiano (WEINSTEIN et al., 1994) e reduzida na desnervação (DIDYK et al., 1994; HOLMES et al., 2004) e no diabetes (ZIERATH et al., 1996).

Nosso laboratório vem investigando o papel do hormônio tireoidiano na expressão do Slc2a4, não só no músculo esquelético, mas também no cardíaco e tecido adiposo. Nossos estudos dão suporte aos trabalhos da literatura que demonstraram que, nesses tecidos, cuja expressão do GLUT4 é normalmente bastante elevada, o tratamento crônico com T3 provoca aumento ulterior da mesma, ocorrendo o contrário nos estados de hipotireoidismo (CASLA et al., 1990).

Nosso grupo também evidenciou que o HT aumenta a expressão do mRNA e da proteína GLUT4 no ventrículo de ratos, efeito que é dependente de dose e do tempo de tratamento o que sugere a importância desse hormônio para a disponibilidade de glicose nesse tecido. (GIANNOCCO et al., 2000).

Estudos realizados no nosso laboratório demonstraram que, além de induzir a expressão de GLUT4, o T3 é capaz de promover translocação dessa proteína para a membrana plasmática (BRUNETTO; TEIXEIRA et al., 2011). Esses estudos foram desenvolvidos em tecido muscular esquelético e cardíaco, e mostraram que ratos tireoidectomizados apresentam redução da translocação de GLUT4, que é incrementada após 30 minutos da administração de doses suprafisiológicas de T3 (100 µg/100 g, PC). Considerando que os efeitos desencadeados pelas ações nucleares dos HT ocorrem em períodos de tempo que variam, em geral, de 1,5 a 2 h, e que os efeitos observados transcorreram em 30 min, associado ao fato de que, a translocação dessa proteína depende de vias de sinalização que envolvem a ativação de quinases específicas, os dados obtidos pelo

nosso grupo sugerem, fortemente, que esse efeito resultou de uma ação não genômica do T3. É interessante o fato de que, estudos *in vitro*, realizados em cardiomiócitos há 22 anos, demonstraram que o HT, adicionado ao meio de incubação contendo glicose marcada, provocou aumento de captação de glicose, em um curto espaço de tempo (SEGAL, 1989), o que parece vir de encontro aos nossos dados.

Esse achado torna-se significativo, no sentido em que cerca de 30% dos pacientes portadores de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) apresentam baixos níveis de T3 circulante (KLEIN; OJAMAA, 2001; HENDERSON et al., 2009) e também mudanças na expressão das isoformas de seus receptores no miocárdio (KINUGAWA et al., 2001a, b), o que tem sido atribuído como a mecanismo de ajuste, no sentido de proteger esse tecido dos efeitos cardioestimulantes do HT nessa situação. Observa-se, em paralelo, uma diminuição do conteúdo de SERCA2 (responsável pela remoção do Ca^{++} citosólico e conseqüente relaxamento muscular cardíaco), de GLUT4 e proteínas fundamentais para a manutenção da atividade cardíaca já comprometida (MINAKAWA et al., 2003).

A Síndrome do T3 Baixo é a primeira e mais comum alteração do metabolismo do HT em pacientes com insuficiência cardíaca. Ela é caracterizada por uma redução dos níveis circulantes de T3 livre e total, acompanhada dos níveis normais de T4 e TSH (PINGITORE et al., 2005). De acordo com a NYHA (New York Heart Association), pacientes que possuem graus III e IV de insuficiência cardíaca, têm maior probabilidade de incidência da síndrome (HAMILTON, et al., 1990).

Com isso, estudos acerca da ICC, além de serem importante para a clínica médica, poderiam se constituir em um bom modelo de estudo para as ações não genômicas do HT, uma vez que essa doença vem acompanhada da síndrome do T3 baixo, associada com uma baixa expressão dos receptores nucleares, e uma alteração das desidases (aumento da D3 e diminuição da D2).

Dessa forma, as ações não genômicas dos HT, que independem de interação com TRs, e que, como já foi comentado, aumentam a atividade da SERCA2, e a translocação de GLUT4, poderiam ser um importante recurso para beneficiar o desempenho cardíaco, em situações em que o aporte de O_2 esteja reduzido, como na insuficiência cardíaca.

Com base nessa relação entre HT e ICC, e a importância desse quadro clínico na saúde humana, procuramos verificar a influência do HT na expressão dos genes dos transportadores de glicose, da miosina, da SERCa e da mioglobina, responsáveis pela função e manutenção da homeostase cardíaca, explorando a possibilidade dessas alterações serem desencadeadas independentemente dos receptores nucleares. Como modelo experimental utilizou-se ratos com insuficiência cardíaca congestiva, desenvolvida após estenose aórtica cirúrgica, situação onde há menor expressão de receptores nucleares para HT. Outro modelo experimental utilizado foi o cultivo celular primário de cardiomiócito, obtido tanto de ratos neonatos quanto de adultos. Esses modelos têm a vantagem de apresentar somente o miócito cardíaco, sem a presença dos fibroblastos, que estão presentes no coração íntegro.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ação da administração aguda de T3 sobre a expressão/atividade de proteínas importantes para a manutenção da atividade cardíaca. Para tal, utilizamos como modelo in vivo, ratos portadores ou não à insuficiência cardíaca congestiva (ICC) (estudo in vivo) e cultura primária de cardiomiócitos neonatos e adultos (estudo in vitro).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, nos modelos in vivo, os efeitos da administração de T3 após 30 e 60 minutos e nos modelos in vitro, a ausência de HT e a adição do T3 em 30 e 45 min, e também após 6 horas sobre:

- (i) a expressão do GLUT1;
- (ii) a expressão do GLUT4 e sua translocação;
- (iii) a expressão da mioglobina (Mb);
- (iv) a expressão da α e β miosina;
- (v) a expressão da SERCa2a.

3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O estudo foi dividido em duas partes:

Estudo 1: modelo *in vivo*: onde estão apresentados os materiais e métodos, resultados e discussão sobre os genes pesquisados em coração de ratos portadores (ou não) de insuficiência cardíaca congestiva.

Estudo 2: modelo *in vitro*: onde estão apresentados os materiais e métodos, resultados e discussão sobre os genes pesquisados em cultura primária de cardiomiócitos neonatos e adultos.

4 ESTUDO 1: MODELO *IN VIVO*

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Indução de estenose aórtica supravalvar

A estenose aórtica supravalvar foi induzida de acordo com o método previamente descrito (BREGAGNOLLO et al., 2007).

Para a realização da cirurgia, foram utilizados ratos Wistar jovens, com 60-70 g de peso corporal (~ 3 a 4 semanas de idade). Eles foram anestesiados com cloridrato de ketamina (60 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), via intramuscular e sofreram tricotomia mediana na região do tórax. Os animais foram então posicionados em decúbito dorsal em mesa cirúrgica e foi realizada dissecação da aorta ascendente e a colocação de um clipe de prata, com 0,6 mm de diâmetro interno, a, aproximadamente, 3 mm da raiz da aorta (BAUAD et al., 2005). A parede torácica foi fechada, sendo o esterno, as camadas musculares e a pele suturados com fio *mononylon* 4-0. Durante a cirurgia, os animais foram ventilados manualmente com pressão positiva e ar a 100 %. Animais de mesma idade foram submetidos à mesma cirurgia, mas sem a colocação do clipe (grupo controle - C). Todos os ratos tiveram acesso à água e alimentação *ad libitum* e foram mantidos sob condições padronizadas de temperatura ambiental (23 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro (12/12 h diárias).

4.1.2 Grupos experimentais

Após 21 semanas da colocação do *clip*, os ratos começam a desenvolver taquipnéia e dispnéia, caracterizando a transição entre a hipertrofia compensada e a falência cardíaca (MOREIRA *et al.*, 2006). Como o nosso objetivo era a obtenção de um quadro já estabelecido de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), esperamos até a piora do quadro clínico dos animais (evolução da taquidispnéia e perda acentuada de peso), o que ocorreu por volta de 29 semanas.

Após esse tempo, os ratos foram anestesiados com cloridrato de ketamina (60 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg), via intramuscular, e submetidos ao tratamento com T₃ (100 ug/100 g PC) ou salina, via intra venosa, 30 min antes da decapitação, constituindo os diferentes grupos experimentais:

1. **Grupo Controle (C):** animais falso-operados, que receberam salina;
2. **Grupo Controle + T3 (C+T3):** animais falso-operados, que receberam T₃;
3. **Grupo Eao (E):** animais submetidos à estenose aórtica, que receberam salina;
4. **Grupo Eao + T3 30' (E+T3 30):** animais submetidos à estenose aórtica, que receberam T₃ 30 minutos antes do sacrifício;
5. **Grupo Eao + T3 60' (E+T3 60):** animais submetidos à estenose aórtica, que receberam T₃ 60 minutos antes do sacrifício.

Após o sacrifício, o coração foi rapidamente removido e dissecado como descrito a seguir. Ainda, o sangue do tronco foi coletado, centrifugado, e o soro estocado a -20 °C para posterior dosagem dos hormônios tireoidianos.

Os átrios foram extirpados e pesados. Os ventrículos separados em massa muscular do ventrículo esquerdo (VE) e ventrículo direito (VD) sendo os pesos destas estruturas normalizados para o peso corporal dos respectivos animais. Um fragmento do fígado e o pulmão inteiro também foram retirados para medir o teor de água, calculados a partir dos pesos úmidos e secos destes órgãos colocados para dessecação em estufa a 37 °C durante 72 h.

Um fragmento do VE foi utilizado para extração de RNA, como descrito abaixo, e outros dois fragmentos utilizados para a extração de proteínas totais e fracionamento subcelular, respectivamente.

4.1.3 Extração do RNA

Um fragmento do VE, pesando aproximadamente 0,1 g, foi homogeneizado em 1 ml de solução D (4 M isotiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sódio pH 7.0, 0,5 % lauril sarcosinato de sódio, 0,1 M de 2-mercaptoetanol) no aparelho *Polytron PT 3000* (Kinematica AG) a 30000 rpm durante 30 seg.

A extração do RNA total foi feita com base no método da extração por guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI & SACCI, 1987). A concentração do RNA foi estimada pela densidade óptica da solução, através de espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm. a leitura também se deu no espectro de 280 nm e somente foram usadas as amostras cuja relação 260/280 foi maior que 1,8.

Para a avaliação da expressão dos mRNAs específicos, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real.

4.1.4 Realização do RT-PCR

Para a síntese do cDNA complementar de interesse foi usado 1 µg de RNA total, oligo dT (100 µg/mL), 10 mM de cada dNTP, 5X First-Strand buffer e 1 µl de enzima (200 U/µl) M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). A reação de transcrição reversa foi realizada num ciclo de 65 °C por 10 min, seguido por 42 °C por 75 min e a 95 °C por 10 min.

As amplificações dos cDNAs de interesse foram executadas utilizando-se 1 µl do produto da reação de transcrição reversa diluído em tampão de reação contendo 12 µl de Platinum®SYBR®Green qPCR (Invitrogen, Caresbad, CA, USA) e 2,5 µM de cada primer (sense e antisense). Todos os primers usados foram otimizados para análise por Real time RT-PCR (temperatura de anelamento para todos os primers: 58 °C) e estão listados na tabela 1, na qual também se encontram os referentes à ciclofilina, nosso controle interno. As condições dos ciclos consistiram de duas etapas a 50 °C por 2 min (ativação da enzima) e a 95 °C por 10 min (desnaturação), seguidos por 50 ciclos de três fases cada: a primeira a 95 °C, por 20 seg (desnaturação), a segunda a 58 °C, por 30 seg (anelamento) e a terceira a 72 °C, por 30 seg (extensão). Ao final dos ciclos partiu-se para uma etapa de dissociação da curva (melt ou temperatura de fusão), que consistiu do aquecimento lento das amostras de 58 °C

(pareamento/alongamento) para 95 °C e resultou em somente 1 amplicon (pico) por amostra. A presença de mais de um amplicon por amostra indicaria a contaminação por DNA genômico.

O ponto inicial do ciclo do real-time RT-PCR foi avaliado em duplicata para cada amostra. Os valores de CT (threshold cycle) correspondem ao número do ciclo do PCR e representam a intensidade da fluorescência emitida pelo produto do RT-PCR amplificado do gene alvo, sendo inversamente proporcionais ao conteúdo de mRNA da amostra. O valor da variação de CT (Δ CT) foi calculado subtraindo-se o valor do CT do gene de interesse do valor do CT do gene usado como referência (ciclofilina). Para reduzir as variações entre as amostras, todas elas foram normalizadas pela média da variação do valor de CT (Δ CT) dos animais controle, originando um valor chamado de $\Delta\Delta$ CT. A expressão relativa do gene de interesse foi calculada usando-se a expressão $2^{-\Delta\Delta CT}$ e foi representada em unidades arbitrárias (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1: Relação dos primers utilizados na técnica de PCR tempo real nos estudos in vivo e in vitro.

primer	Sequência	no GenBank	posição	tamanho (bp)
GLUT4 sense	gggctgtgagtgagtgcttc	NM012751-1	2017-2037	150
GLUT4 antisense	cagcgaggcaaggctaga	NM012751-1	2150-2167	
GLUT1 sense	acgtccattctccgttaac	BC061873-1	81-97	149
GLUT1 antisense	caccgggtgttatagccgaac	BC061873-1	211-230	
Mioglobina sense	cctgggtaccatcctgaaga	NM021588	216-235	159
Mioglobina antisense	ccaaagtccccggaatatct	NM021588	355-374	
SERCA 2 sense	gtgggagcagctgcctggtg	NM058213	2710-2729	148
SERCA 2 antisense	tcatgggctcgggggcttca	NM058213	2838-2857	
Alfa MHC sense	acaaggttaaaacctgacagagg	NM017239-2	2961-2984	359
Alfa MHC antisense	tactgttctgctgactgatgtcaa	NM017239-2	3297-3320	

primer	Sequência	no GenBank	posição	tamanho (bp)
Beta MHC sense	agcgaggctccacccacat	NM017240-1	452-471	206
Beta MHC antisense	caaggtgcccttgccctgggg	NM017240-1	639-658	
Ciclofilina sense	ggattcatgtgccagggtgg	BC059141-1	222-241	206
Ciclofilina antisense	cacatgcttgccatccagcc	BC059141-1	409-428	

4.1.5 Extração de proteínas totais

Para as proteínas Mb, α e β -MHC, SERCa2a utilizamos o protocolo de extração de extrato protéico total.

O ventrículo esquerdo (~ 0,1 g) foi homogeneizado em 1 ml de tampão (0,25 M sacarose, 0,1 M KCl, 20 mM Tris-HCl) e, em seguida, centrifugado à 12000 g, por 40 minutos a 4 °C.

A concentração das proteínas foi avaliada pelo método de Bradford (Bio-Rad, Dye Reagent Concentrate). Assim, foi preparada uma solução de albumina bovina para a confecção de uma curva (pontos: 0,2 μ g/ μ l; 0,4 μ g/ μ l; 0,6 μ g/ μ l; 0,8 μ g/ μ l e 1,0 μ g/ μ l), cujas amostras correspondentes foram aplicadas na placa de Elisa (6 μ l da amostra e 300 μ l do reagente de Bradford diluído em água deionizada na proporção 1:5). Após incubação por 10 min, na ausência de luz, realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro a 595 nm.

4.1.6 Fracionamento Subcelular

Para os transportadores de glicose, GLUT1 e GLUT4, utilizamos o protocolo de extração para fracionamento subcelular a fim de separarmos as proteínas de membrana plasmática (PM) e microssomal (M). Um fragmento do ventrículo esquerdo (~ 0,1 g) foi homogeneizado em tampão específico (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, sacarose 250 mM) numa relação de 1 g de tecido/6 ml de solução tampão.

Foram, então, feitas as centrifugações necessárias para o fracionamento subcelular de acordo com o método de Mitsumoto e Klip (1992) com pequenas modificações especificadas em Yonemitsu *et al.* (2001). Em resumo, foram feitas 2 centrifugações a 1000 g, a 4 °C, de 5 min cada, para descarte do material nuclear presente no precipitado. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 31000 g, a 4 °C por 60 minutos. O precipitado resultante, que é enriquecido em proteínas de membrana plasmática, foi ressuspensão com 300 µl de solução tampão de homogeneização e constituiu a fração PM (proteínas de membrana) e o sobrenadante foi centrifugado a 190000 g, a 4 °C por 60 min. O precipitado obtido foi ressuspensão em 200 µl de tampão de homogeneização e constituiu a fração M (proteínas microssomais).

Foi realizado o cálculo das proteínas GLUT1 e GLUT4 na PM e M por grama de tecido (UA/g tecido) e, considerando o conteúdo protéico total de cada fração subcelular (PM e M) e o respectivo peso do tecido, a soma desses dados determinou o conteúdo total por grama de tecido. A porcentagem do GLUT total presente na PM foi calculada através do cálculo: $(100 \times \text{PM GLUT}) / (\text{PM GLUT} + \text{M GLUT})$.

4.1.7 Western Blotting

Amostras, contendo 50 µg de proteínas, foram previamente aquecidas por 5 min a 100 °C em uma mistura contendo 0,05 M Tris, 15% glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 9 % SDS e 6% de mercapto-etanol (Laemmli). Em seguida, elas foram aplicadas em gel de poliacrilamida composto por: um gel de empacotamento, Stacking Gel (6%) contendo 30% de acrilamida, 1,0 M Tris (pH= 6,8), 10% de SDS, 10% de persulfato de amônia (APS), Temed e Água Milli-Q (qsp) e por um gel de separação, *Resolving Gel* (cuja porcentagem variou de 6% para α e β-MHC, 10% para GLUT1, 4 e SERCa2a ou 15% para Mb) constituído por 30% de acrilamida, 1,5 M Tris (pH= 8,8), 10% de SDS, 10% de persulfato de amônia, Temed, e Água Milli-Q (qsp). Posteriormente foram submetidas à eletroforese em tampão contendo 25 mM de Tris – Base, 192 mM de Glicina (ácido aminoacético), 0,1% de SDS, 0,001 M de EDTA, pH=8,3]. Uma amostra padrão, com proteínas de pesos moleculares conhecidos, foi aplicada em uma das colunas do gel para se estimar a localização da banda correspondente à proteína de interesse.

Após a eletroforese, realizou-se a transferência das proteínas do gel para uma membrana de PVDF. A transferência foi feita por electroblotting, em tampão 25 mM de Tris – Base, 192 mM de Glicina e 20% de Metanol, em aparelho semi-dry por 1 h e 15 min à 15 V. Após a transferência, o sistema foi desmontado cuidadosamente e a membrana foi corada com Vermelho Ponceau, por, aproximadamente, 3 min e, imediatamente, lavada com TBST 1X para retirar o excesso de corante, etapa esta realizada para avaliar a qualidade da transferência. Em seguida a membrana foi colocada em solução bloqueadora (concentração de 3% - Mb, α e β -MHC, SERCA2 ou 8% - GLUT1 e 4 BSA/TBST 1x) onde permaneceu por 2 h sob agitação constante, à temperatura ambiente (essa solução tem por objetivo saturar a membrana para minimizar as ligações inespecíficas que possam ocorrer ao longo das etapas seguintes). O gel também foi corado com *Staining Solution* por 30 min e descorado para a análise comparativa das quantidades de proteínas aplicadas no mesmo.

Após o bloqueio, seguiu-se à incubação com anticorpo primário (tabela 2), overnight a 4 °C, sob agitação constante. Posteriormente, a membrana foi lavada 4 vezes em TBST, sendo a duração de cada lavagem correspondente a 15 min. Seguiu-se a incubação da membrana com anticorpo secundário (tabela 3), por 1 h em temperatura ambiente, sob agitação constante. Em seguida, a membrana foi lavada novamente 4 vezes com TBST, por 15 min cada lavagem.

A detecção das bandas foi obtida em auto-radiografias, por quimioluminescência, após exposição em filmes de raios X, por tempo aproximado de 5 min.

Tabela 2: Relação dos anticorpos primários utilizados para Western Blotting nos estudos in vitro e in vivo.

ANTICORPO	FORNECEDOR	GERADO EM	DILUIÇÃO	KDa
GLUT4	Chemicon	coelho	1:4000	54
GLUT1	Chemicon	coelho	1:500	54
Mioglobina	Sigma	coelho	1:5000	18
SERCa2a	Cedido pelo Prof. Dillmann	coelho	1:10000	114
α - MHC	Santa Cruz	camundongo	1:500	200
TR α 1	Santa Cruz	cabra	1:1000	52

ANTICORPO	FORNECEDOR	GERADO EM	DILUIÇÃO	KDa
GAPDH	Santa Cruz	camundongo	1:1000	43
α - actinina	Santa Cruz	coelho	1:1000	100

Tabela 3: Relação dos anticorpos secundários utilizados para Western Blotting nos estudos *in vivo* e *in vitro*.

anticorpo	FORNECEDOR	diluição
Anti-coelho	GE healthcare	1:10000
Anti-camundongo	GE healthcare	1:5000
Anti-cabra	GE healthcare	1:10000

4.1.8 RACE-PAT (Rapid Amplification of cDNA ends - Poly A Test)

O tamanho da cauda poli(A) é um dos pré-requisitos para a formação de um mRNA estável, visando à eficiência no seu processo de tradução (GALLIE, 1998). Para análise do estado de poliadenilação desses mRNAs foi utilizado o método RACE-PAT, descrito por Salles et al., 1999 e modificado por Serrano-Nascimento et al. (2010). O RACE-PAT envolve a amplificação da porção terminal 3' do mRNA, onde se localiza a cauda poli-A do mRNA. Esta região é transcrita reversamente, utilizando-se um excesso de oligo(dT) ligado a um oligonucleotídeo ancorador (sequência ancoradora de G/C). A fita de DNA formada é submetida ao PCR com um *primer* específico para o gene de estudo, localizado próximo à região da cauda poli(A) ao sítio de poliadenilação, e novamente com oligo(dT) ancorador (5'-GCGAGCTCCGCGGCCGCGT12), desta vez servindo como *primer* antisense do ensaio.

Esse ensaio é extremamente acurado para a quantificação do comprimento da cauda poli-A, independentemente do tamanho do mRNA. Por fim, como o ensaio RACE-PAT utiliza como *primers* os oligos(dT), os resultados obtidos indicam, de fato, o estado de poliadenilação do transcrito (SALLÉS et al., 1999).

Para a reação de transcrição reversa usamos 2 μ g de RNA que foram preincubados com 200 ng de oligo (dT) âncora (5'-GCGAGCTCCGCGGCCGCG-T12) por 5 minutos a 70

°C, seguido de 1 hora a 42 °C em uma mistura contendo 10 mM de cada dNTP, 5X *first-strand* buffer, 0,01 M de DTT, 1 µl de 200 U/µl de *transcriptase reverse* MMLV (Invitrogen Life Technologies, Camarillo, CA, USA). Três microgramas do produto da reação de RT foram misturados numa reação contendo 25 mM MgCl₂, 10 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada *primer* (GLUT1: 5'- GCCCTGCTGTGTATAGATGGA; GLUT4: 5'- GATAGGGAGCAGAAACCTGG; Mb: 5'- ATTTGACCCCAAATGCAAGT; Ciclofilina: 5'- TGCGGGCATTTTACCCATCAAACC e âncora: 5'- GCGAGCTCCGCGGCCGCGT12), 1,25 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase e 5X Green GoTaq Flexi Buffer Migration Pattern (Promega Corp., Madison, WI, EUA). As condições de PCR foram as seguintes: 5 min a 95 °C (denaturação inicial), seguidos por 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 68 °C (anelamento), 1 min a 72 °C (extensão), e terminando com 7 min de extensão final a 72 °C. Os produtos de PCR foram analisados eletroforéticamente em gel de agarose-TBE a 2,5% e corado por brometo de etídeo.

O fragmento mínimo esperado (*amplicon*) foi de 157 pb para o GLUT1, 111 pb para o GLUT4 e 176 bp para a mioglobina. A análise das amostras foi estimada por densitometria e comparada com DNA *ladder* de 100 pb (Invitrogen Life Technologies, Camarillo, CA, USA), utilizando-se o software ImageMaster 1D-Pharmacia Biotech SW (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

4.1.9 Análise Estatística

Os dados foram expressos por média $\pm$ EPM, e as diferenças foram consideradas significativas para um valor de $p < 0,05$. A análise dos dados foi realizada por meio da análise de variância one-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls, ou teste-T não pareado (*Package: GraphPad Prism, v. 4.03, Graphpad Software Inc., San Diego, California, USA*).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Estudo dos parâmetros para caracterização da insuficiência crônica congestiva (ICC) mediante a cirurgia de Estenose da Aorta (Eao)

A cirurgia de Eao é bastante complexa, e para verificar se os ratos evoluíram para um quadro de ICC foram avaliados alguns parâmetros, tais como, peso do VE e do VD normalizados pelo peso corpóreo (hipertrofia ventricular direita), peso dos átrios, aumento do teor de água nos pulmões e no fígado, e os seguintes sinais clínicos: taquipnéia (aumento da frequência da respiração mesmo após a completa anestesia do animal), ascite, derrame pleural e/ou pericárdico e trombo no átrio esquerdo (BING et al., 1995, NORTON et al., 2002).

Os dados colhidos estão apresentados na tabela 4 onde podemos comprovar a instalação do quadro de insuficiência cardíaca após 29 semanas da cirurgia de estenose aórtica.

Tabela 4: VE/PC: ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corpóreo, VD/PC: ventrículo direito normalizado pelo peso corpóreo, TAP: teor de água nos pulmões, TAF: teor de água no fígado. X/6: número de animais que apresentam o sintoma/número total de animais do grupo controle; X/12: número de animais que apresentam o sintoma/número total de animais do grupo estenose. *p<0,01; **p<0,001 e ***p<0,0001 vs controle.

	Controle (n=6)	Eao (n=12)
Peso corpóreo (g)	510 ± 15,62	401,8 ± 17,7**
VE/PC (mg/g)	1,77 ± 0,05	3,05 ± 0,14***
VD/PC	0,60 ± 0,034	1,065 ± 0,1*
Átrios	0,21 ± 0,012	0,63 ± 0,053***
TAP	78,98 ± 0,14	80,58 ± 0,29*
TAF	69,09 ± 0,41	69,98 ± 0,62
Taquipnéia	0/6	12/12
Ascite	0/6	4/12
Derrame pleural/pericárdio	0/6	10/12
Trombo no átrio	0/6	4/12

Podemos notar que, em relação aos animais do grupo controle, os animais Eao apresentam diminuição do peso corpóreo, aumento do peso dos ventrículos e dos átrios, aumento do teor de água nos pulmões, bem como sinais clínicos característicos de um estado

de insuficiência cardíaca (todos os animais apresentavam taquipnéia, 10 animais apresentavam derrame pleural/pericárdio e somente 4 animais apresentavam ascite e trombo nos átrios).

4.2.2 Dosagem de T3 e TSH

O T3 foi dosado através do *kit* comercial T3 Total Coat-A-Count (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, USA) por radioimunoensaio. O hormônio marcado com ^{125}I compete por um período fixo de tempo com o hormônio da amostra para os sítios do anticorpo. O tubo é decantado, para separar a forma ligada da livre, e contado em um contador gama acoplado a um microcomputador. A concentração de hormônio presente na amostra é determinada a partir de uma curva obtida pela dosagem de amostras com concentrações conhecidas de T3, que fazem parte do *kit*. Os resultados foram expressos em ng/mL, sendo o coeficiente de variação intraensaio $< 4,7\%$ e a sensibilidade mínima 0,41 ng/mL.

O TSH sérico foi analisado por radioimunoensaio específico utilizando-se TSH de rato para iodação e preparação de curva padrão. O anticorpo primário foi obtido do *National Hormone and Peptide Program/NIDDK* (Bethesda, MD, USA). A sensibilidade foi de 0,18 ng/mL e o coeficiente intraensaio foi $< 4.3\%$. Esse ensaio foi realizado no laboratório da Prof.^a Dr.^a Carmen Cabanelas Pazos de Moura, docente na UFRJ.

Esses dados estão apresentados na figura 1 A, onde observamos que o T3 total sérico apresentou-se reduzido no grupo Eao e aumentado após o tratamento por 30 min tanto no grupo controle quanto no estenose. Já o TSH, não houve nenhuma alteração entre os grupos controles e estenose (figura 1 B).

Figura 1: **A)** Representação gráfica da dosagem de T_3 sérico nos grupos C (controle), C+T3 (controle tratado com T_3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T_3 por 30 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo.* $p < 0,001$ vs C; # $p < 0,0001$ vs C e Eao. **B)** Representação gráfica da dosagem de TSH sérico nos grupos C (controle) e Eao (grupo estenose).

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.3 Estudo dos TRs

Avaliamos também o conteúdo dos receptores nucleares de hormônios tireoidianos presentes no coração de ratos normais (controle), de ratos com ICC (grupo Eao), assim como desses mesmos grupos tratados com T_3 por 30 minutos. Os dados estão presentes na figura 2 A e B, onde o gráfico A representa o TR- $\alpha 1$ e o gráfico B, o TR- $\beta 1$.

Portanto, observamos que, no grupo estenose há uma diminuição na proteína TR- $\alpha 1$ e um aumento da proteína TR- $\beta 1$. Quando esses ratos são tratados por 30 min com T_3 , essa proteína retorna aos níveis dos ratos controles, ou seja, aumenta o TR- $\alpha 1$ e diminui o TR- $\beta 1$.

Figura 2: A) Representação gráfica do conteúdo protéico total do TR- α 1 normalizado pela α -actinina nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). B) Representação gráfica do conteúdo protéico total do TR- β 1 normalizado pela α -actinina nos mesmos grupos citados anteriormente. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs . Acima dos gráficos, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total dos TRs e α -actinina.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.4 Estudo sobre a expressão dos transportadores de glicose 1 e 4 em animais portadores de ICC

4.2.4.1 Avaliação da expressão do *Slc2a1*

A figura 3 mostra os dados correspondentes à expressão do *Slc2a1* por PCR em tempo real, em amostras de animais controles (C), controles que receberam T3 (C+T3), animais com estenose aórtica (Eao) e animais com Eao que receberam T3 (E+T3).

Notamos que o grupo C que recebeu T₃, na concentração de 100 μ g/100 g PC, via *i.v.*, 30 min antes do sacrifício (C+T3), teve um aumento no mRNA do GLUT1 se comparado ao grupo C tratado com salina, embora não significativo. O grupo com Eao apresentou expressão do GLUT11 similar a dos grupos C e C+T3; porém, 30 min após a administração de T3 (E+T3) foi observado um grande aumento da expressão do mRNA do GLUT1.

Figura 3: Representação gráfica da expressão do mRNA do GLUT1 normalizado pelo mRNA da ciclofilina nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo.* $p < 0,001$ vs todos.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.4.1 Avaliação do conteúdo protéico do GLUT1

Concomitante com a avaliação do mRNA do GLUT1, estudamos o conteúdo dessa proteína. Quando realizamos a metodologia de separação das frações de membrana plasmática e microsomal para estudar uma possível translocação das vesículas de GLUT1, o que notamos foi que, o GLUT1 só apareceu na fração de membrana plasmática, portanto, só temos os dados relacionados ao seu conteúdo protéico total, apresentados na figura 4.

E como podemos ver, o conteúdo da proteína GLUT1 está aumentado nos grupo Eao e estenose tratado com T₃ por 30 minutos (E+T3 30') em relação ao controle e controle tratado com T₃ (C e C+T3 respectivamente).

Figura 4: Representação gráfica do conteúdo protéico do GLUT1 por g de tecido nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min).. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo.* $p < 0,01$ vs C e C+T3. Acima do gráfico, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total do GLUT1.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

Além do tratamento dos animais Eao com T3 por 30 min, realizamos um estudo adicional de animais Eao tratados com T3, na mesma concentração, por 60 minutos. E o que observamos na figura 5 é que o aumento do tempo não aumentou significativamente o conteúdo de GLUT1 em relação ao grupo E+T3 30 min, mas seu conteúdo protéico está aumentado em relação ao grupo Eao.

Figura 5: Representação gráfica do conteúdo protéico do GLUT1 normalizado pela α -actinina nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs todos. Acima do gráfico, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total da α -actinina e do GLUT1.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.4.3 Avaliação da cauda poli(A) do GLUT1

A análise do comprimento da cauda poli(A) do mRNA do GLUT1 realizada pelo método de RACE-PAT mostrou que não houve alteração nos grupos C+T3 e Eao, entretanto, no grupo E+T3 (por 30 min) houve um aumento do seu comprimento em relação ao controle e Eao ($p < 0,05$). A figura 6 do lado esquerdo representa o comprimento da cauda poli(A) nos quatro grupos experimentais e o lado direito da figura, mostra o padrão de *smear* dos produtos de PCR em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo. O tamanho mínimo do *amplicon* esperado foi de 157 pares de bases, que é relativo ao tamanho do fragmento de mRNA amplificado a partir da posição 389 da sua sequência gênica, até o sítio de poliadenilação. A cauda poli(A), portanto, corresponde ao comprimento total do fragmento gerado na amplificação do mRNA da amostra, subtraindo-se 157 pb.

Figura 6: **A)** Representação gráfica da análise da cauda poli(A) do GLUT1 pelo método de RACE-PAT nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). Os resultados representam a média $\pm$ SEM de 4 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs C e Eao. **B)** Imagem típica obtida em gel de agarose não desnaturante (2,5%) com o peso molecular (PM) e os produtos do ensaio de RACE-PAT.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.4.4 Avaliação da expressão do *Slc2a4*

A figura 7 mostra que a expressão de mRNA de GLUT4 foi similar entre os C e C+T3 e, ao contrário do mRNA do GLUT1, os animais Eao apresentaram diminuição da expressão do GLUT4 em relação aos grupos C e C+T3. A administração de T₃ por 30 min nos animais Eao provocou aumento do mRNA do GLUT4.

Figura 7: Representação gráfica da expressão do mRNA do GLUT4 normalizado pelo mRNA da ciclofilina nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). Os resultados representam a média $\pm$ SEM de 7 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs todos; # $p < 0,01$ vs C e C+T3.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.4.5 Avaliação do conteúdo protéico e da translocação de GLUT4

Com esse estudo visamos avaliar se o T3 administrado em apenas 30 minutos é capaz de promover o direcionamento das vesículas de GLUT4 para a membrana plasmática. Esse resultado está apresentado na figura 8.

Podemos observar que não houve qualquer alteração na quantidade de GLUT4 presente na fração de membrana plasmática (PM) em nenhum grupo estudado, porém, quando estudamos o conteúdo protéico total (que obtivemos através da soma do GLUT4 presente na fração PM com a do GLUT4 presente na fração microssomal –M), na figura 9, notamos que há uma diminuição no grupo Eao e um aumento após o tratamento com o T3 por 30 min (E+T3).

Figura 8: A) Representação gráfica do conteúdo de GLUT4 presente na membrana plasmática nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. B) Imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo de GLUT4 presente na membrana plasmática (PM) e no microssoma (M) no momento da coleta do tecido.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

Figura 9: Representação gráfica do conteúdo total de GLUT4 (GLUT4 na PM + GLUT4 na M) nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs todos; # $p < 0,05$ vs Eao.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

Resolvemos estender o tempo de tratamento com T3 no grupo Eao para 60 min, para ver se haveria alguma alteração no conteúdo protéico e/ou na translocação do GLUT4, mas, como vemos nas figuras 10 e 11, não houve nenhum aumento da translocação (figura 10) e o aumento observado no grupo E+T3 30 min na figura 9 manteve-se no grupo E+T3 60 min (figura 11).

Figura 10: Representação gráfica do conteúdo total de GLUT4 presente na membrana plasmática (translocação) nos grupos C (controle); Eao (grupo estenose) e E+T360' (grupo estenose que recebeu T3 por 60 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. **B)** Imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo de GLUT4 presente na membrana plasmática (PM) e no microssoma (M) no momento da coleta do tecido.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

Figura 11: Representação gráfica do conteúdo total de GLUT4 (GLUT4 na PM + GLUT4 na M) nos grupos C (controle); Eao (grupo estenose) e E+T3 60' (grupo estenose que recebeu T3 por 60 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. [#] $p < 0,05$ vs todos.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.4.6 Avaliação da cauda poli(A) do GLUT4

Na figura 12, painel A, está o gráfico representativo com o número de bases correspondentes ao número de adeninas da cauda poli(A) do mRNA do GLUT4 e no painel B, a imagem obtida através do ensaio de RACE-PAT, imagem esta que teve suas cores invertidas em um programa de análise para melhor visualização do *smear*. Vale lembrar que o

comprimento da cauda poli-A do mRNA do GLUT4 equivale ao valor máximo do comprimento do *smear* menos 111, que corresponde ao tamanho do fragmento gerado desde a ligação do *primer* sense até o início da cauda poli-A propriamente dita.

E como podemos observar, não houve diferença do tamanho da cauda poli-A em nenhum dos grupos estudados.

Figura 12: A) Representação gráfica da análise da cauda poli(A) do GLUT4 pelo método de RACE-PAT nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). B) Imagem típica obtida em gel de agarose não desnaturante (2,5%) com o peso molecular (PM) e os produtos do ensaio de RACE-PAT.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.4.7 Discussão: GLUT1 e GLUT4

Quanto aos estudos *in vivo*, observamos que a cirurgia de estenose aórtica (Eao) foi bem sucedida, uma vez que nos animais que foram a ela submetidos houve a caracterização do quadro de insuficiência cardíaca congestiva (ICC), após 29 semanas, comprovado pela diminuição do peso corpóreo dos ratos e também pelo significativo aumento do tamanho (peso) do VE, VD, átrios e do teor de água do pulmão. Além dessas alterações, sinais clínicos como taquipnéia, ascite, derrame pleural e/ou pericárdio e trombo no átrio foram detectados, o que completou o quadro. Ainda, quando o quadro de insuficiência cardíaca congestiva (ICC) encontra-se instalado, desenvolve-se uma síndrome chamada “síndrome do T3 baixo” que se caracteriza pela baixa concentração de T3 circulante, o aumento do T3 reverso (rT3) e TSH normal (BAUAD et al., 2005). E como pudemos observar pela dosagem sérica de T3 e TSH, os animais submetidos à cirurgia de estenose aórtica (Eao) desse estudo apresentaram uma concentração sérica de T3 menor que as do grupo controle e um TSH inalterado, comprovando que os animais são portadores da síndrome do T3 baixo.

Sabe-se que, quando se estabelece uma condição de ICC, o coração passa por um processo de reprogramação de genes que codificam algumas proteínas-chave envolvidas com o metabolismo da glicose, como GLUTs e a piruvato desidrogenase quinase (PDK), o que faz com que ele apresente um aumento da expressão de proteínas que são normalmente detectadas no período fetal (RAZEGHI et al., 2001). Nessa condição verificou-se também que a isoforma β dos receptores de HT (TR β) torna-se mais expressa que a α (KINUGAWA, 2001), o que torna o coração menos susceptível às ações do T3 normalmente deflagradas pela sua interação com o TR α , que levariam a um aumento da frequência e débito cardíacos. Frente a essa afirmação, realizamos o estudo do conteúdo protéico dessas isoformas de receptores de hormônio tireoidianos ($\alpha 1$ e $\beta 1$). E nossos resultados corroboraram os dados da literatura, uma vez que observamos uma diminuição do conteúdo protéico do receptor $\alpha 1$ e um aumento do $\beta 1$ nesse coração deficiente.

Sabe-se também, que o HT é um dos fatores responsáveis pela transição do GLUT1 para o GLUT4 no início do período pós-natal (CASTELLO et al., 1994), e que na ICC há uma diminuição na concentração desse hormônio na corrente sanguínea (HAMILTON et al., 1998; KLEIN; OJAMAA, 2001), sendo uma das causas dessa diminuição o aumento da expressão da desidrase do tipo 3 no coração, que converte o hormônio ativo T3 à T2. Portanto, sob essa condição patológica, conforme indica a literatura, há um aumento do conteúdo de GLUT1 e diminuição do GLUT4 nesse tecido, o que também foi observado no nosso estudo (figuras 4 e 9). Essas alterações parecem fazer parte de um mecanismo de ajuste, que garante o aporte de glicose ao músculo cardíaco debilitado.

Pudemos observar que após 30 minutos da administração *e.v.* de doses supra-fisiológicas de T3, houve um aumento significativo da expressão gênica tanto do GLUT1, quanto do GLUT4, dado indicativo de que esse procedimento pode ser um recurso potencialmente benéfico para aumentar o aporte de glicose para o coração, melhorando o seu desempenho. Quando avaliamos a proteína GLUT4, notamos que há uma diminuição no grupo Eao e um aumento de seu conteúdo quando tratamos os animais com T3. Essa diminuição também foi observada nos estudos de Murray em 2006. Por outro lado, não observamos alterações na taxa de translocação de GLUT4 em nenhum dos grupos estudados. No entanto, o aumento de conteúdo, ou seja, do *pool* de GLUT4 nos animais com estenose tratados agudamente com T3 pode assegurar que, mesmo sob uma taxa de translocação do GLUT4 que não varie, tenhamos maior inserção desta proteína na membrana.

Devido ao fato do mRNA do GLUT4 aumentar, assim como a sua proteína já em 30 min, fomos investigar se existia alguma correlação desse aumento com o comprimento da cauda poli(A), o qual tem uma relação direta com a estabilidade do transcrito. Por meio da figura 12 observamos que não houve alteração na poliadenilação desse transcrito, levando-nos a pensar, que o T3 induz essa alteração por outro mecanismo. Sabe-se que, além da cauda poli(A), ao longo de toda a sequência dos mRNAs existem elementos que estão envolvidos com a regulação do decaimento do próprio mRNA, como a estrutura de *cap* na região 5'UTR, estruturas secundárias à região 5'UTR, códons prematuros de terminação (UGA, UAG ou UAA) e sequências desestabilizadoras dentro das sequências *open reading frame* (ORF), descritas por Sachs, em 1993. Porém, ainda pouco se sabe sobre essas estruturas, a influência que exercem sobre a estabilidade do mRNA e quais os mecanismos que as regulam. Assim, é possível que o HT atue em um desses processos promovendo alterações na estabilidade do transcrito.

Quanto à proteína GLUT1, notamos que ela também se encontra aumentada após o tratamento com o T3 em 60 min, fato que pode ser devido à tradução de um mRNA mais estável (dado esse que pode ser comprovado pelo aumento da cauda poli(A) do grupo E+T3 30 min- figura 6). Assim, apesar de se saber que o *Slc2a1* é regulado negativamente pelo T3, nossos estudos demonstram que há uma regulação pós-transcricional da expressão dele, ao menos nessa condição, que leva a um aumento da sua expressão, uma vez que tanto seu mRNA quanto sua proteína estão aumentadas em 30 e 60 min após o tratamento com T3, respectivamente, e sua cauda poli(A) está aumentada.

4.2.5 Estudo sobre a expressão da mioglobina (Mb) em animais portadores de ICC

4.2.5.1 Avaliação da expressão gênica da Mb

Na figura 13 apresentamos os dados obtidos sobre a expressão gênica da Mb frente ao efeito da estenose aórtica e da administração de T3 em 30 minutos.

Como podemos observar, há uma diminuição do mRNA da Mb no grupo Eao e que após a administração do T3 em 30 min, há um aumento significativo desse transcrito (vs todos os grupos).

Figura 13: Representação gráfica da expressão gênica da Mb normalizada pela ciclofilina nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs todos; # $p < 0,001$ vs C e C+T3.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.5.2 Avaliação do conteúdo protéico de Mb

O conteúdo protéico da Mb foi avaliado 30 e 60 minutos após a administração de T3. Na figura 14 A estão representados os dados relativos aos 30 min da adição do hormônio, e no lado B, após os 60 min. Enquanto nenhuma alteração na proteína tenha sido observada no gráfico A, vê-se que após 60 min da administração de T3, o conteúdo da proteína Mb se apresenta elevado.

Esses dados foram normalizados pelo GAPDH.

Figura 14: A) Representação gráfica do conteúdo total de Mb normalizado pelo GAPDH nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 30' (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). B) Representação gráfica do conteúdo total de Mb normalizado pelo GAPDH nos grupos C (controle); Eao (grupo estenose) e E+T3 60' (grupo estenose que recebeu T3 por 60 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. * $p < 0,01$. Acima dos gráficos, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total do GAPDH e da Mb.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.5.3 Avaliação da cauda poli(A) da mioglobina (Mb)

A análise do comprimento da cauda poli(A) do mRNA da Mb realizada pelo método de RACE-PAT mostrou que houve uma diminuição no grupo Eao, e que após 30 min da administração de T3 (E+T3 30 min) houve um aumento do seu comprimento em relação ao Eao. A figura 15 A ilustra o comprimento da cauda poli(A) nos quatro grupos experimentais e a 15 B, o padrão de *smear* dos produtos de PCR em gel de agarose a 2,5% corado com brometo de etídeo. O tamanho mínimo do *amplicon* esperado foi de 176 pares de bases, que é relativo ao tamanho do fragmento de mRNA amplificado a partir da posição 776 da sua sequência gênica, até o sítio de poliadenilação. A cauda poli(A), portanto, corresponde ao comprimento total do fragmento gerado na amplificação do mRNA da amostra, subtraindo-se 176 pb.

Figura 15: A) Representação gráfica da análise da cauda poli(A) da mioglobina pelo método de RACE-PAT nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs C e Eao, # $p < 0,01$ vs Eao. B) Imagem típica obtida em gel de agarose não desnaturante (2,5%) com o peso molecular (PM) e os produtos do ensaio de RACE-PAT.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.5.4 Discussão: mioglobina

Como já comentado anteriormente, a mioglobina (Mb) é uma proteína altamente expressa no músculo cardíaco e é regulada pelo hormônio tireoidiano, fazendo desse hormônio um agente importante para a capacidade oxidativa desse tecido. Uma vez que nesse estudo utilizamos ratos portadores de ICC, seria de grande utilidade uma ação rápida do T3 sobre a mioglobina e com isso garantir a disponibilidade de O_2 para esse tecido.

E como demonstramos na figura 13, o grupo Eao apresentou uma menor expressão gênica de Mb, que após 30 min do T3, teve seu mRNA significativamente aumentado, inclusive em relação aos grupos C e C+T3.

Apesar do aumento do conteúdo de mRNA não ocorreu aumento do conteúdo da proteína Mb com a administração de T3 por 30 min, porém, quando estendemos o tempo de tratamento para 60 min pudemos observar um aumento significativo em sua proteína.

Quando analisamos o comprimento da cauda poli(A), há uma diminuição do seu comprimento no grupo Eao e um aumento no grupo E+T3. Isso significa que, após 30 min, há um aumento da poliadenilação/estabilidade desse mRNA mensageiro, o que poderia contribuir para a maior taxa de tradução dessa proteína, o que foi claramente detectado no tempo de 60 minutos.

Considerando os dados que obtivemos com relação aos genes do GLUT1, GLUT4 e Mb, podemos inferir que o T3 atua rapidamente (30 min), no sentido de aumentar a expressão de todos esses mRNAs e, também um aumento da proteína GLUT4 já em 30 min e do GLUT1 e Mb em 60 min. Assim, esses resultados nos parecem extremamente promissores, uma vez que sugerem que o T3 poderia rapidamente prover o coração com maior aporte de glicose e oxigênio, numa situação como a estabelecida nesse modelo.

4.2.6 Estudo sobre a expressão do Atp2a2 em animais portadores de ICC

4.2.6.1 Avaliação da expressão do gene Atp2a2

A figura 16 mostra a expressão do mRNA da SERCa2a nos grupos controle, controle tratado com T3, Eao e Eao tratado com T3 por 30 min. Podemos observar uma diminuição no conteúdo de seu mRNA no grupo Eao. Após administrarmos T3, houve uma diminuição ainda maior na expressão da SERCa2a em relação a todos os grupos estudados.

Figura 16: Representação gráfica da expressão gênica da SERCa2a normalizada pela ciclofilina. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs todos; # $p < 0,05$ vs C e C+T3. Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.6.2 Avaliação do conteúdo protéico da SERCa2a

Após avaliarmos a expressão gênica, seguimos para o estudo do conteúdo protéico nos diferentes grupos. Assim como fizemos com os outros genes já descritos, usamos 2 tempos de tratamento de T₃ no grupo com estenose aórtica: 30 e 60 min. Esses dados estão representados na figura 17, painel A e B, onde o A representa o tratamento com T₃ por 30 min e o B, por 60 min.

Observa-se na figura 51 A, uma diminuição da proteína SERCa2a no grupo estenose (Eao) e estenose tratado com T₃ por 30 min (E+T3 30') em relação ao C e C+T3. Já no gráfico B, observa-se que o conteúdo da proteína SERCa2a sofreu um aumento significativo tanto em relação ao grupo C quanto ao grupo Eao.

Figura 17: A) Representação gráfica do conteúdo total de SERCa2a normalizado pelo GAPDH nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 30' (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). Representação gráfica do conteúdo total de SERCa2a normalizado pelo GAPDH nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 60' (grupo estenose que recebeu T3 por 60 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs C e C+T3. Acima dos gráficos, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total do GAPDH e da SERCa2a.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.7 Estudo sobre a expressão do Myh6 em animais portadores de ICC

4.2.7.1 Avaliação da expressão do Myh6

Nesse estudo também avaliamos a expressão gênica da α -MHC nos grupos C, C+T3, Eao, E+T3 (T3 administrado por 30 min), por meio do PCR em tempo real, dado que pode ser observado na figura 18.

Houve uma significativa diminuição do mRNA da α -MHC no grupo que sofreu estenose aórtica (Eao). O tratamento com hormônio tireoidiano T3 não foi capaz de alterar o mRNA da α -MHC no grupo controle (C+T), porém, diminuiu seu mRNA no grupo E+T3.

Figura 18: Representação gráfica da expressão gênica da α -MHC normalizada pela ciclofilina nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. * $p < 0,001$ vs todos.

4.2.7.2 Avaliação do conteúdo protéico de α -MHC

As figuras 19 A e B mostram o conteúdo protéico de α -MHC nos diferentes grupos, sendo que no painel A, o grupo estenose tratado recebeu T3 por 30 min (E+T3 30') e no painel B, o T3 foi administrado por 60 min (E+T3 60'). Como podemos notar, diferentemente com o que ocorreu com o mRNA, não houve mudança na proteína no grupo Eao nem no grupo tratado com T3 por 30 min, porém, quando o tempo de tratamento foi aumentado para 60 min, houve um aumento da proteína α -MHC.

Esses dados foram normalizados pela proteína α -actinina.

Figura 19: **A)** Representação gráfica do conteúdo total da α -MHC normalizado pela α -actinina nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 30' (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). **B)** Representação gráfica do conteúdo total da α -MHC normalizado pela α -actinina nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 60' (grupo estenose que recebeu T3 por 60 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs Eao e C+T3. Acima dos gráficos, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total da α -actinina e da α -MHC.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.8 Estudo sobre a expressão do Myh7 em animais portadores de ICC

4.2.8.1 Avaliação da expressão do Myh7

Nesse estudo também avaliamos a expressão gênica da β -MHC, gene regulado negativamente pelo hormônio tireoidiano, via ação genômica. Na figura 20 podemos ver que, no grupo Eao há um aumento significativo do mRNA em relação ao C e E+T3, e que, após 30

min da administração do T3, ocorre uma diminuição acentuada, inclusive em relação a todos os grupos estudados. Entre o C e o C+T3 não há diferença estatística.

Figura 20: Representação gráfica da expressão gênica de β -MHC normalizada pela ciclofilina nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. * $p < 0,001$ vs todos, # $p < 0,05$ vs C.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.8.2 Avaliação do conteúdo protéico da β -MHC

A figura 21 A e B mostra o conteúdo protéico da β -MHC nos diferentes grupos, sendo que em A, o grupo estenose tratado recebeu T₃ por 30 min (E+T3 30') e em B, o T3 foi administrado por 60 min (E+T3 60'). O painel A mostra um padrão de resposta protéica muito similar ao que ocorreu com o mRNA, ou seja, aumento da proteína nos grupos com estenose (Eao) e uma significativa diminuição da proteína já em 30 minutos após o T3. E quando estendemos o tempo de tratamento para 60', o que encontramos foi um aumento do conteúdo protéico da β -MHC.

Esses dados foram normalizados pela proteína α -actinina.

Figura 21: **A)** Representação gráfica do conteúdo total da β -MHC normalizado pela α -actinina nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 30' (grupo estenose que recebeu T3 por 30 min). **B)** Representação gráfica do conteúdo total da β -MHC normalizado pela α -actinina nos grupos C (controle); C+T3 (controle tratado com T3 por 30 min); Eao (grupo estenose) e E+T3 60' (grupo estenose que recebeu T3 por 60 min). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 7 amostras por grupo. # $p < 0,05$ vs C e E+T3 30', * $p < 0,05$ vs todos. Acima dos gráficos, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total da α -actinina e da β -MHC.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

4.2.9 Discussão: SERCa2a, α e β -MHC

Sabe-se que o T3 ativa a transcrição de genes como a Atp2a2, Myh6, Na^+/K^+ ATPase, receptores β -adrenérgicos (DANZI; KLEIN, 2002) e fator natriurético atrial (GARDNER et al., 1987) e reduz a do Myh7 e fosfolambam. Portanto, uma queda na concentração de T3, traz como consequência o aumento da expressão de genes como Myh7 e fosfolambam (DANZI e KLEIN, 2002).

Assim, nesse nosso modelo de estudo, no grupo de ratos que sofreram Eao, pudemos observar que houve uma diminuição da expressão gênica da SERCa2a e da α -MHC e um aumento da expressão β -MHC, corroborando os dados apontados pela literatura (MINAKAWA et al., 2003; DANZI; KLEIN, 2002). O aumento da expressão da β -MHC é um marcador comum para a ativação de uma programação gênica fetal associada à insuficiência cardíaca.

Observamos que o tratamento por 30 min com T3 (figuras 16, 18 e 20), reduziu a expressão dos 3 transcritos: SERCa2a α e β -MHC. Quanto à diminuição do mRNA da α -

MHC, é uma resposta observada em estudos em modelos de ICC (e também em pacientes) após o tratamento/reposição com HT em longos períodos de tempo (DANZI; KLEIN, 2002). Em nosso modelo, a administração de T3 foi por apenas 30 min e já visualizamos uma queda acentuada na expressão gênica β la -MHC, indicando que provavelmente o T3 esteja provocando essa alteração por meio de mecanismos não genômicos.

A diminuição do mRNA da SERCa2a α -MHC, poderia indicar que, em paralelo às conhecidas ações genômicas do T3 em ativar esses genes, o T3 possa aumentar a taxa de tradução do mRNA gerando, rapidamente, mais proteína, o que implicaria em ganho de função cardíaca. Há estudos que indicam que o T3 aumenta a taxa de tradução de vários mRNAs, dentre eles o do GH (da SILVA et al., 2010). A maior parte dos estudos que dizem respeito à ação do T3 sobre os genes da SERCa2a e α -MHC nos modelos de ICC, se atém a tratamentos a longo prazo, quando então uma melhora na atividade mecânica do coração é observada (HENDERSON et al., 2009).

Por outro lado há evidências de que a expressão gênica da SERCa2a induzida pelo T3 está significativamente diminuída na presença das citocinas fator inibidor da leucemia (LIF) e Interleucina-6 (IL-6) (GLOSS et al., 2000), e que em modelos animais, bem como em pacientes com ICC ocorre aumento dos níveis circulantes e também em alguns tecidos específicos, de citocinas (MATSUMORI, 1997).

Ao analisamos o conteúdo da proteína SERCa2a verificamos que o grupo Eao exibe um menor conteúdo protéico vs C e C+T3, o que era esperado; contudo, o tratamento com T3 por 30 minutos não foi capaz de alterá-lo. Acreditando que esse tempo teria sido insuficiente para que esse mRNA fosse traduzido, aumentamos o tempo de exposição desses animais com o T3 e, de acordo com a figura 17 B, há um aumento de seu conteúdo protéico. Assim, é possível que a redução do mRNA da SERCa2a provocada pela administração aguda de T3 seja decorrente de um aumento na taxa de tradução do mesmo, inclusive, elevando sua proteína acima dos níveis observados no grupo controle.

De qualquer forma é bastante interessante que o conteúdo protéico do α -MHC, que aparentemente não foi alterado pela ICC, se encontrou elevado quando o T3 foi agudamente administrado (somente no tempo de 60 min), o que vai de encontro a nossa hipótese de que o T3 poderia estar aumentando a taxa de tradução desse transcrito.

Curioso também foi quando estudamos a proteína β -MHC, pois mesmo com o conteúdo do seu transcrito e proteína diminuídos pela metade após o T3 ter sido administrado por 30 min, com o aumento do tempo de tratamento para 60 min, o conteúdo da proteína elevou-se aos níveis do grupo Eao.

Com o aumento dessas 3 proteínas com funções contráteis detectadas em apenas 60 minutos após o T3, podemos sugerir que é possível propiciar uma melhora do desempenho cardíaco por mecanismos que são ativados rapidamente por esse hormônio.

5 ESTUDO 2: MODELOS *IN VITRO*

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Cultura primária de cardiomiócitos de neonatos

A cultura primária de cardiomiócitos foi preparada por desagregação enzimática, conforme descrito em Barreto-Chaves *et al.*, 2000. Em resumo, corações de ratos Wistar neonatos (1-3 dias de vida) foram removidos e seus ventrículos cortados e transferidos para um falcon contendo tampão de digestão. Esse tecido foi, então, submetido a múltiplas digestões enzimáticas à 37 °C por meio de uma mistura contendo collagenase tipo II e pancreatina. Foram realizadas de 4 a 5 digestões seguidas, cada uma com a duração de 20 minutos. A solução obtida em cada digestão foi transferida para um tubo contendo 1 ml de soro fetal de bezerro (NCS – *newborn calf serum*) e centrifugada. Cada precipitado foi ressuspenso em NCS. Essas células dissociadas foram colocadas todas juntas em um único tubo.

Para separar os miócitos dos não miócitos, essa suspensão celular foi submetida a um gradiente de Percoll (*Pharmacia LKB Biotechnology Inc.*). Após lavar as células para remover o Percoll, os miócitos foram cultivados em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 100 μ L/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina contendo 5% NCS e 10% de soro de cavalo (HS – *horse serum*).

As células foram plaqueadas numa densidade de 25000/cm² em placas específicas, contendo 6 poços (35mm x 16mm cada) pré-tratados com 1% de gelatina, e mantidas sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a uma temperatura de 37°C. Esse preparado de células contém mais de 95% de miócitos como pode ser visto pela sua morfologia e contração espontânea.

5.1.2 Grupos experimentais

Os cardiomiócitos de neonatos foram submetidos aos tratamentos com T3 especificados adiante, constituindo os diferentes grupos experimentais, segundo procedimento abaixo descrito.

A cultura primária de cardiomiócito foi mantida por 5 dias em DMEM + 5% NCS (*newborn calf serum*) e 10% HS (*horse serum*); ao final deste período, o meio foi substituído por DMEM + 0,5% NCS (esse meio torna as células quiescentes e mais responsivas ao posterior tratamento com hormônio tireoidiano). Na manhã do dia seguinte, realizou-se nova substituição do meio por outro contendo DMEM + 5% NCS e 10% HS, depletado de hormônios tireoidianos de acordo com Samuels et al., 1979. Os miócitos permaneceram por 24 horas, nesse meio, após o que foram divididos nos grupos experimentais descritos a seguir.

1. **Grupo eutireoideo:** células que foram incubadas em meio DMEM + 5% NCS e 10% HS;
2. **Grupo hipotireoideo:** células que foram incubadas em meio DMEM + 5% NCS e 10% HS livre de hormônios tireoidianos por 24 h;
3. **Grupo hipotireoideo + T3 30':** células que foram incubadas em meio livre de hormônios tireoidianos por 24 h, após o que se acrescentou T3 em concentrações crescentes (10^{-10} a 10^{-6} M) por 30 min;
4. **Grupo hipotireoideo + T3 45':** células que foram incubadas em meio livre de hormônios tireoidianos por 24 h, após o que se acrescentou T3 em concentrações crescentes (10^{-10} a 10^{-6} M) por 45 min;
5. **Grupo hipotireoideo + T3 6 h:** células que foram incubadas em meio livre de hormônios tireoidianos por 24 h, após o que se acrescentou T3 na concentração de 10^{-8} M por 6 h.

5.1.3 Cultura Primária de cardiomiócitos de adultos

A cultura primária de cardiomiócitos de adultos foi preparada por perfusão retrógrada do coração do rato adulto, conforme descrito em Peliciari-Garcia et al., 2011.

Em resumo, ratos pesando em torno de 180 g foram eutanasiados e seus corações foram removidos. A aorta foi canulada e o coração submetido a uma perfusão retrógrada com colagenase tipo I por 10 min a temperatura constante de 37 °C. Após esse período os ventrículos foram separados dos átrios e tiveram seus miócitos dissociados por dispersão mecânica. As células foram, então, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura DMEM high glucose (Sigma Biochemical, St. Louis, MO, USA). Para inibir o crescimento de fibroblastos, foi adicionado à cultura citosina-arabinosídeo, conhecido como Ara-C (cytosine Arabinofuranoside - Sigma Biochemical, St. Louis, MO, USA).

As células foram mantidas sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a uma temperatura de 37 °C e incubadas por 24 horas (2 horas em DMEM+5 % de soro fetal bovino e 22 horas em DMEM), sem nenhum tipo de tratamento e/ou estímulo, em placas de 6 poços pré-revestidas com laminina (Becton, Dickinson - Franklin Lakes, NJ USA).

5.1.4 Grupos experimentais

Os cardiomiócitos de adultos foram submetidos aos tratamentos com T3 especificados adiante, constituindo os diferentes grupos experimentais, segundo procedimento abaixo descrito.

A cultura primária de cardiomiócito foi mantida por 24 horas (2 horas em DMEM+5 % de soro fetal bovino e 22 horas em DMEM); ao final deste período, foi acrescentado (ou não) ao meio T3 em diferentes concentrações compondo os seguintes grupos:

1. **Grupo hipotireoideo:** células que foram incubadas em meio DMEM por 24 h;
2. **Grupo hipotireoideo + T3 30':** células que foram incubadas em meio DMEM por 24 h o que se acrescentou T3 em concentrações crescentes (10^{-10} a 10^{-6} M) por 30 min;
3. **Grupo hipotireoideo + T3 45':** células que foram incubadas em meio DMEM por 24 h o que se acrescentou T3 em concentrações crescentes (10^{-10} a 10^{-6} M) por 45 min;

- 4. Grupo hipotireoideo + T3 6 h:** células que foram incubadas em meio DMEM por 24 h, após o que se acrescentou T3 na concentração de 10^{-8} M por 6 h.

Nesses grupos foi avaliada a expressão dos genes: Slc2a1, Slc2a4, Mb, Atp2a2, Myh6 e Myh7.

5.1.5 Extração do RNA

No dia do experimento, retirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas com PBS gelado para retirar o excesso do meio (todos os passos seguintes foram realizados a 4 °C). Em cada poço da placa de cultura foi adicionado 0,2 ml de solução D (4 M isotiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sódio pH 7.0, 0,5% lauril sarcosinato de sódio, 0,1 M de 2-mercaptoetanol) e foram agregados 3 poços para cada grupo. As células foram gentilmente retiradas dos poços e o conteúdo celular foi agitado em vórtex.

A extração do RNA total foi feita com base no método da extração por guanidina-fenol-clorofórmio (CHOMCZYNSKI; SACCI, 1987), e os passos seguintes foram realizados de maneira semelhante à realizada com o ventrículo (descrita na página 26).

5.1.6 Realização do RT-PCR

Para a síntese do cDNA complementar e realização do ensaio de PCR em tempo real usamos a mesma técnica descrita no estudo *in vivo* (página 26). Os genes utilizados nessa etapa também foram os mesmo citados na tabela 1 (página 28).

5.1.7 Extração de proteínas totais

A análise protéica somente foi realizada com a cultura de cardiomiócitos neonatos, pois até o término dessa tese, não havíamos padronizada a técnica para a cultura de cardiomiócitos adultos.

No dia do experimento, retirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas com PBS gelado para retirar o excesso do meio. Em cada poço da placa de cultura foi adicionado 0,1 ml de tampão de lise celular (1% NP40; 10% glicerol; 135mM NaCl 5M; 20mM Tris 100 mM; 1% ortovanato; 0,4% PMSF; 0,2% aprotinina, 0,2% pepstatina; 0,2% leupeptatina), em seguida, elas foram retiradas dos poços e centrifugadas à 12000 g, por 15 minutos a 0 °C.

A concentração das proteínas foi avaliada pelo método de Bradford (*Bio-Rad, Dye Reagent Concentrate*) e a curva padrão preparada conforme descrito na página 29.

5.1.8 Western Blotting

A análise das proteínas foi realizada conforme descrita na secção 4.1.7 (pág. 29), porém, foram utilizadas 100 µg de proteína total por gel.

5.1.9 Análise Estatística

Os dados foram expressos por média $\pm$ EPM, e as diferenças foram consideradas significativas para um valor de $p < 0,05$. A análise dos dados foi realizada por meio da análise de variância one-way ANOVA, seguida pelo teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls, ou teste-T não pareado (Package: GraphPad Prism, v. 4.03, Graphpad Software Inc., San Diego, California, USA).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Estudo sobre a expressão do Slc2a1 (GLUT1) em cultura primária de cardiomiócitos

5.2.1.1 Expressão gênica e protéica do GLUT1 em cardiomiócitos de neonatos

5.2.1.1.A Efeito da depleção e da reposição de T_3 sobre a expressão do Slc2a1

Esse estudo teve o intuito de avaliar a responsividade da cultura de cardiomiócitos ao HT, por meio da avaliação da expressão do Slc2a1, o qual é regulado negativamente por esse hormônio. Foram utilizados 3 grupos experimentais: o eutireoideo (controle), no qual as células foram cultivadas em meio DMEM + 5% NCS e 10% HS, o hipotireoideo (hipo), onde as células foram cultivadas em meio DMEM + 5% NCS e 10% HS depletado de hormônios tireoidianos e o grupo T_3 10^{-8} M 6h, o qual acrescentamos T_3 ao meio depletado na dose de 10^{-8} M (dose descrita na literatura como sendo fisiológica) e as células foram mantidas nesse meio por 6 horas.

Esses dados estão apresentados na figura 22, onde se observa aumento da expressão do mRNA do GLUT1 no grupo hipo ($p < 0,001$) e uma redução da mesma após a adição de T_3 ao meio depletado de hormônios tireoidianos, que atingiu os valores de expressão do grupo eutireoideo. Atribuiu-se o valor de uma unidade arbitrária (1 UA) à expressão gênica do grupo controle (eutireoideo).

Figura 22: Representação gráfica da expressão do GLUT1 normalizado pela ciclofilina nos grupos C (controle); hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8M 6 h (grupo que recebeu adição de T_3 na concentração 10^{-8} M por 6h. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo.* $p < 0,001$ vs todos.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.1.1.B Efeito da administração aguda de T3 sobre o *Slc2a1*

A figura 23 mostra os dados correspondentes à expressão do *Slc2a1* por PCR em tempo real, em amostras de cardiomiócitos neonatos cultivados em meio depletado de hormônios tireoideanos (H) e após 30 min da adição de T3 em doses crescentes (10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M e 10^{-6} M).

Podemos observar que após 30 min da adição de T3 na concentração de 10^{-10} M ao meio de cultura, houve um aumento significativo na expressão do mRNA do GLUT1, a qual foi sendo reduzida gradativamente com o aumento da dose de T3 na cultura, sugerindo ser a diminuição na expressão gênica do GLUT1 pelo T3 um efeito dependente de dose.

Figura 23: Representação gráfica da expressão do GLUT1 normalizado pela ciclofilina nos grupos hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); e nos grupos que receberam T3 no meio de cultura por 30' nas doses crescentes de 10^{-10} M a 10^{-6} M. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,001$ vs todos; # $p < 0,001$ vs hipo, 10^{-10} e 10^{-9} .

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.1.1.C Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre o conteúdo protéico de GLUT1

Após avaliarmos a expressão do *Slc2a1*, seguimos para a análise do seu conteúdo protéico total.

A figura 24 mostra o conteúdo de GLUT1 no grupo controle (cultura de cardiomiócitos neonatos em meio DMEM + 5% NCS e 10% HS), no grupo hipotireoideo (hipo), onde as células foram cultivadas em DMEM + 5% NCS e 10% HS depletado de hormônios tireoidianos e no grupo T3 10^{-8} M 6h, o qual acrescentamos T3 ao meio depletado na dose de 10^{-8} M por 6 horas.

Observamos uma diminuição do GLUT1 no grupo hipo vs controle e que mesmo com o tratamento com T3 por 6 horas, não houve nenhuma modificação.

O conteúdo total de GLUT1 foi normalizado pela α -actinina.

Figura 24: Representação gráfica do conteúdo total de GLUT1 normalizado pela α -actinina nos grupos C (controle); hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8M 6 h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10-8 M por 6h). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo. * $p < 0,001$ vs C. Acima do gráfico, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total da α -actinina e GLUT1.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.1.1.D Efeito da administração aguda de T3 sobre o conteúdo protéico de GLUT1

Avaliamos o conteúdo protéico de GLUT1 nos grupos hipo (onde as células foram cultivadas em DMEM + 5% NCS e 10% HS depletado de hormônios tireoidianos) e tratados com doses crescentes de T3 (10^{-10} a 10^{-6} M) por 30 min ou 45 min .

A figura 25 mostra, em seus 5 gráficos (A a E), as diferentes doses de T3 nos tempos de 30 min e 45 min. Assim, o gráfico A mostra os grupos hipo e o tratamento de T3 na dose 10^{-10} M em ambos os tempos. O quadro B, a dose de 10^{-9} M, e assim sucessivamente.

Observamos que, quando administramos a menor dose de T3 (10^{-10} M), somente após 45 min é que ocorreu uma diminuição da proteína GLUT1. Em todas as outras doses já em 30 min há uma redução dessa proteína; redução essa que persiste mesmo após 15 min nas doses de 10^{-9} e 10^{-6} M. O tratamento de T3 nas doses de 10^{-8} e 10^{-7} M somente diminuiu o conteúdo protéico no tempo de 30 min.

O conteúdo total de GLUT1 foi normalizado pela α -actinina.

Figura 25: Representação gráfica do conteúdo do GLUT1 normalizado pela α -actinina. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs todos; # $p < 0,01$ vs hipo. **A)** Dose de T3 a 10^{-10} M adicionado ao meio por 30 e 45 min. **B)** Dose de T3 a 10^{-9} M adicionado ao meio por 30 e 45 min. **C)** Dose de T3 a 10^{-8} M adicionado ao meio por 30 e 45 min. **D)** Dose de T3 a 10^{-7} M adicionado ao meio por 30 e 45 min. **E)** Dose de T3 a 10^{-6} M adicionado ao meio por 30 e 45 min. Acima dos gráficos, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total da α -actinina e GLUT1.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.1.2 Expressão gênica do *Slc2a1* em cardiomiócitos de adultos

5.2.1.2.A Efeito da administração de T3 a longo prazo sobre o *Slc2a1*

O resultado está representado na figura 26, que mostra uma diminuição significativa na expressão do GLUT1 após a adição de T3 ao meio.

Figura 26: Representação gráfica da expressão do mRNA GLUT1 normalizado pela ciclofilina nos grupos hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos) e 10-8 6h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10-8 M por 6h). O resultado representa a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,0001$ vs hipo.

5.2.1.2.B Efeito da administração aguda de T3 sobre o *Slc2a1*

Na figura 27 estão representados os resultados obtidos em cardiomiócitos adultos que foram previamente mantidos em meio depletado de hormônios tireoidianos e em seguida, tratados com T3 nas doses de 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-6} M (A, B e C respectivamente) por 30 e 45 min.

Observa-se que o tratamento com a dose de 10^{-9} M diminuiu a expressão gênica do GLUT1 em relação ao grupo hipo, já em 30 min, diminuição que persistiu aos 45 min. Nas doses maiores (10^{-8} e 10^{-6} M) a redução do mRNA do GLUT1 só ocorreu aos 45 min. Inclusive, nessas doses de T3, houve um aumento do mRNA do GLUT1 no tempo de 30 min, em comparação ao grupo hipo.

Figura 27: Representação gráfica da expressão do mRNA do GLUT1 normalizado pelo mRNA da ciclofilina nos grupos: **A)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-9 30' e 10-9 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-9 M por 30' ou 45' respectivamente); **B)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 30' e 10-8 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-8 M por 30' ou 45' respectivamente); **C)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-6 30' e 10-6 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-6 M por 30' ou 45' respectivamente). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,0001$ vs hipo; # $p < 0,01$ vs todos.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.2 Estudos sobre a expressão do Slc2a4 em cultura primária de cardiomiócitos

5.2.2.1 Expressão gênica e protéica do GLUT4 em cardiomiócitos de neonatos

5.2.2.1.A Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre a expressão do Slc2a4

Esse estudo avaliou a responsividade da cultura de cardiomiócitos de neonatos ao T3 pela expressão do Slc2a4, o qual é regulado positivamente por esse hormônio. Foram utilizados os mesmos 3 grupos para o ensaio do GLUT1: eutireoideo (controle), hipotireoideo (hipo) e o grupo T3 10^{-8} M 6h, o qual acrescentamos T3 ao meio depleto na dose de 10^{-8} M e as células foram mantidas nesse meio por 6 horas.

Esses dados estão apresentados na figura 28, onde se observa diminuição da expressão do mRNA do GLUT4 no grupo hipo e um aumento após a administração de T3 comparando-

os com o grupo eutireoideo. A expressão gênica do grupo controle foi normalizada para o valor de uma unidade arbitrária (1 UA).

Figura 28: Representação gráfica da expressão do mRNA do GLUT4 normalizado pela ciclofilina nos grupos: controle; hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8M 6h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10-8 M por 6h). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo. * $p < 0,001$ vs todos, # $p < 0,01$ vs C.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.2.1.B Efeito da administração aguda de T3 sobre o *Slc2a4*

A figura 29 mostra os dados correspondentes à expressão gênica do GLUT4 em amostras de cardiomiócitos cultivados em meio depletado de hormônios tireoidianos (H) e após 30 min da adição de T3 em doses crescentes (10^{-10} M a 10^{-6} M).

Podemos observar que após 30 min da adição de T3 na concentração de 10^{-10} M ao meio de cultura, houve uma diminuição significativa na expressão do GLUT4, a qual foi sendo reduzida gradativamente com o aumento da dose de T3 na cultura até a dose 10^{-8} M, atingindo sua menor expressão. Porém, quando o T3 foi administrado na dose de 10^{-7} M, houve um aumento do conteúdo de mRNA se comparado com as doses de 10^{-10} M, 10^{-9} M e 10^{-8} M. A dose de 10^{-6} M aumentou significativamente o mRNA do GLUT4 em relação a todos os grupos.

Figura 29: Representação gráfica da expressão do GLUT4 normalizado pela ciclofilina nos grupos: hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); e 10-10 a 10-6 (grupos que receberam adição de T3 nas concentrações de 10-10 M a 10-6 M, respectivamente por 30'). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs todos; # $p < 0,05$ vs todos exceto 10⁻⁸; Δ $p < 0,05$ vs todos exceto 10⁻⁹.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.2.1.C Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre o conteúdo protéico de GLUT4

A figura 30 mostra o conteúdo de GLUT4 no grupo controle (cultura de cardiomiocitos neonatos em meio DMEM + 5% NCS e 10% HS), no grupo hipotireoideo (hipo), onde as células foram cultivadas em DMEM + 5% NCS e 10% HS depletado de hormônios tireoidianos e no grupo T3 10⁻⁸ M 6h, o qual acrescentamos T3 ao meio depletado na dose de 10⁻⁸ M e as células foram mantidas nesse meio por 6 horas.

Observamos um aumento do GLUT4 no grupo hipo vs controle e um aumento ainda maior quando tratado com T3 por 6 horas. O conteúdo total de GLUT4 foi normalizado pelo GAPDH.

Figura 30: Representação gráfica do conteúdo total de GLUT4 normalizado pelo GAPDH nos grupos C (controle); hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8M 6 h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10-8 M por 6h). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo. * $p < 0,001$ vs todos; # $p < 0,001$ vs controle. Acima do gráfico, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao GAPDH e ao conteúdo total do GLUT4.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.2.1.D Efeito da administração aguda de T3 sobre o conteúdo protéico de GLUT4

A figura 31 mostra o efeito da adição de T3, por 30 e 45 min, no meio de cultura depletado de hormônios tireoidianos, nas concentrações: 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, sobre o conteúdo total de GLUT4.

Não foi observada nenhuma alteração no conteúdo total de GLUT4 em nenhuma dose adicionada ao meio de cultura depletado, mostrando, portanto, que a proteína se mantém inalterada quando tratamos a cultura por 30 minutos. Porém, quando estendemos o tempo de tratamento das células para 45 min, notamos que a maior dose administrada (10^{-6} M) foi capaz de aumentar o conteúdo protéico total do GLUT4, como mostra o gráfico C.

Figura 31: Representação gráfica do conteúdo total de GLUT4 normalizado pelo GAPDH nos grupos: **A)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 30' e 10-9 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-8 M por 30' ou 45' respectivamente); **B)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-7 30' e 10-8 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-7 M por 30' ou 45' respectivamente); **C)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-6 30' e 10-6 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-6 M por 30' ou 45' respectivamente). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo. * $p < 0,0001$ vs hipo; # $p < 0,01$ vs todos. Acima dos gráficos, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total do GAPDH e GLUT4.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.2.2 Expressão do *Slc2a4* em cardiomiócitos de adultos

5.2.2.2.A Efeito da administração de T3 a curto prazo sobre o *Slc2a4*

Esse estudo teve a finalidade de avaliar a resposta de cardiomiócitos adultos em cultura primária ao T3 sobre o gene do GLUT4. É sabido na literatura, que esse gene é regulado positivamente por esse hormônio em músculo cardíaco de ratos *in vivo*. Para isso, administramos ao meio de cultura T₃ na dose de 10⁻⁸ M que permaneceu por 6 horas.

A figura 32 mostra uma elevação significativa na expressão do GLUT4 após a adição de T3 ao meio.

Figura 32: Representação gráfica da expressão do mRNA GLUT4 normalizado pela ciclofilina nos grupos: hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos) e 10-8 6 h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10-8 M por 6h). O resultado representa a média $\pm$ SEM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs hipo.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.2.2.B Efeito da administração aguda de T3 sobre o *Slc2a4*

A figura 33, que contém 3 gráficos, representa os resultados obtidos com relação ao conteúdo do mRNA do GLUT4 após a administração de T3 nas doses 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-6} M (A, B e C respectivamente) em 30 e 45 min.

Observa-se que, após 30 minutos do tratamento com T3, nas 3 doses administradas, o mRNA do GLUT4 sofreu uma diminuição, e que após 45 min, as doses de 10^{-9} e 10^{-8} M foram capazes de aumentar a expressão do mRNA do GLUT4, aos valores do grupo controle.

Figura 33: Representação gráfica da expressão do mRNA do GLUT4 normalizado pela ciclofilina nos grupos: **A)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-9 30' e 10-9 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-9 M por 30' ou 45' respectivamente); **B)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 30' e 10-8 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-8 M por 30' ou 45' respectivamente); **C)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-6 30' e 10-6 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-6 M por 30' ou 45' respectivamente). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,0001$ vs hipo.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.3 Discussão: transportadores de glicose: isoformas 1 e 4

Sabe-se que o Slc2a4, que codifica o GLUT4, tem sua transcrição aumentada pelo T3, enquanto o Slc2a1, que codifica o GLUT1, é regulado negativamente pelo T3 (CASTELLÓ et al., 1994), de modo que alterações nas concentrações plasmáticas de HT podem interferir com a dinâmica do transporte de glicose no tecido cardíaco (CASLA et al. , 1990; WEINSTEIN et al. , 1994).

Enquanto as ações dos HT sobre a transcrição dos genes Slc2a1 e Slc2a4 são bem conhecidas, pouco se sabe acerca das ações não genômicas do HT sobre esses transportadores de glicose. Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a estudar essas ações não genômicas, e vem demonstrando que o T3, administrado agudamente, é capaz de promover aumento do conteúdo e da translocação de GLUT4 em músculo cardíaco, esquelético e tecido adiposo de ratos.

Um dos objetivos que buscamos atingir com o desenvolvimento desse estudo, foi o de pesquisar num modelo “*in vitro*” (cultura de cardiomiócitos neonatos e adultos) se os genes descritos anteriormente têm sua expressão regulada não-genomicamente pelo T3.

Assim, uma primeira abordagem foi avaliar os efeitos da depleção, da reposição com o T3 na dose de 10^{-8} M em 6 horas (o que nos demonstraria o efeito genômico do T3 sobre essas células, considerando que esse efeito, em geral, se estabelece em tempos que variam de 1,5 – 2 h), e do tratamento agudo com T3 (30 e/ou 45 min) sobre a expressão do Slc2a1 e Slc2a4 em cultura primária de cardiomiócitos, obtida a partir de coração de ratos neonatos.

Deve-se ressaltar que, nessa fase do desenvolvimento, os cardiomiócitos ainda não atingiram a sua maturidade, não se comportando, portanto, como os cardiomiócitos adultos. No entanto, nos primeiros estudos, pudemos observar que na ausência de T3 por 24 h, os cardiomiócitos em cultura apresentam redução na expressão de GLUT4 e aumento na de GLUT1, em relação àqueles que foram mantidos com soro não depletado de hormônios tireoidianos, o que corrobora os estudos desenvolvidos em animais adultos, relacionados fundamentalmente com a ação genômica do T3 (CASTELLÓ et al., 1994), sugerindo que a ação do T3 sobre esses genes, nessa fase do desenvolvimento, possa, ao menos no período de tempo estudado, ser similar à ação dele no animal adulto.

Contudo, quando no meio hipotireoideo foi adicionado T3 na concentração de 10^{-10} M, por 30 min, observamos uma resposta não esperada, pelo menos em relação aos dados da literatura relacionados aos efeitos do T3 em coração de adulto, já que ocorreu aumento do mRNA do GLUT1 e queda do de GLUT4. Ainda, observamos que a expressão do mRNA dos dois transportadores de glicose foi reduzida pelo aumento da dose de T3; no entanto, a partir da dose de T3 de 10^{-7} M o mRNA do GLUT1 continuou reduzido, enquanto que o do GLUT4 foi elevado, resposta similar ao efeito crônico do T3 no animal adulto.

O fato desses efeitos terem sido desencadeados em 30 min e variarem de forma não compatível com o efeito dose-resposta observado nos efeitos genômicos do T3, nos sugere que possam resultar de mecanismos acionados não genomicamente pelo HT.

Sabe-se que as ações não genômicas podem ser desencadeadas por meio da ligação do T3 ou T4 à sítios presentes na membrana celular, como a integrina $\alpha V\beta 3$, em ~~mito~~ endoplasmático, mitocôndria, em $TR\beta$ citoplasmático, $TR\alpha$ truncado citoplasmático, os quais podem estar associados à proteínas do citoesqueleto, à maquinaria de tradução de transcritos, à enzimas como a PI3K, dentre outras (DAVIS et al., 2008), o que poderia desencadear respostas diversas à diferentes concentrações do mesmo hormônio, já que esses sítios podem apresentar diferentes graus de afinidade ao HT. Acreditamos que essa seja a razão pela qual observamos respostas diferentes (opostas às esperadas) para os genes em questão quando baixas doses (10^{-10} M) de T3 foram utilizadas, respostas similares nas doses próximas à fisiológica e opostas, mas dentro do padrão adulto esperado, quando doses supra-fisiológicas foram utilizadas.

Aumento do mRNA do GLUT4 e queda concomitante do de GLUT1 também foram evidenciados quando administramos T3 na dose de 10^{-8} M, por 6 h, sugerindo o importante papel do HT na transição entre as isoformas GLUT1 e 4 no coração no período pós-natal (CASTELLÓ et al., 1994).

É importante reiterar que, conforme a concentração do T3 adicionada ao meio de cultivo aumenta, a expressão do mRNA do GLUT1 vai diminuindo, até que na dose de 10^{-8} M (em 30 minutos) se torna igual àquela observada após 6 h da administração de T3. Esse padrão de diminuição da expressão gênica com o aumento do T3 caracteriza um efeito do T3 dependente da dose (efeito dose resposta). O mesmo padrão de resposta é observado com a proteína GLUT1, mostrando que, em apenas após 30 min da adição do T3 na dose de 10^{-9} M,

temos uma resposta de diminuição, que se acentua conforme aumentamos a dose de T3 adicionada. Observamos também redução do GLUT1 quando estendemos o tempo de tratamento para 45 min, nas doses de 10^{-9} e 10^{-6} M.

O que notamos ainda foi que no grupo hipo, o conteúdo total de GLUT1 se encontra diminuído, mesmo tendo sido detectado aumento do seu mRNA. É possível que esteja ocorrendo menor tradução deste mRNA, ou que a proteína GLUT1 tenha sua meia vida encurtada nessa condição experimental. Ainda, quando adicionamos o T3 ao meio de cultura por 6 h, o mRNA cai pela metade e sua proteína se mantém (se compararmos ambos ao grupo hipo). Assim, mesmo o RNA sofrendo mudanças em sua expressão, a proteína, de alguma maneira, está se mantendo.

Já, em relação ao mRNA do GLUT4, observamos um padrão diferente de resposta, quando acrescentamos as doses crescentes de T3. Notamos uma resposta do tipo bifásica, onde há uma diminuição da expressão do gene nas doses de 10^{-10} M a 10^{-8} M, e um aumento do mesmo na dose de 10^{-6} M. Quando as células foram cultivadas na presença de T3 (10^{-8} M) por 6 h, houve também elevação do mRNA do GLUT4. Não temos ainda dados suficientes e nem suporte na literatura para explicar esse fenômeno, embora pareça claro que a partir da dose de 10^{-8} M, as respostas obtidas em relação aos dois genes são muito parecidas com aquelas obtidas no animal adulto, atribuídas a uma ação genômica do T3.

Em relação ao conteúdo protéico do GLUT4, chama à atenção o fato de que o grupo hipotireoideo tenha apresentado conteúdo maior dessa proteína do que o grupo controle, ao contrário do que se esperava, baseando-se nos dados de mRNA que se apresentaram diminuídos, o que não significa, contudo, que o conteúdo de GLUT4 presente na membrana plasmática também esteja aumentado. Infelizmente, essa análise não pode ser realizada por problemas técnicos relativos ao fracionamento subcelular.

A adição de T3, por 30 min, na dose de 10^{-6} M não alterou o conteúdo de GLUT4, embora tenha provocado uma elevação do conteúdo de mRNA, o que indica que o hormônio promoveu alterações no processamento desse transcrito, talvez aumentando a sua estabilidade. Após aumentarmos o tempo de incubação dessas células para 45 min, conseguimos observar um aumento de sua proteína. O aumento concomitante da proteína nessa condição (6h de tratamento) também sustenta o dado mostrado. Assim, o fato de só termos detectado aumento do conteúdo de GLUT4 após 45 min da administração de T3 na

maior dose, nos mostra que para o GLUT4 houve a necessidade de uma grande concentração de T3 para que uma ação não genômica fosse desencadeada.

Assim observamos que a resposta da expressão gênica do GLUT4 ao T3 diferiu da do GLUT1, o qual esteve mais de acordo com os padrões esperados, baseando-se nas ações genômicas do T3. No entanto, apesar da enorme redução do mRNA de GLUT4 nas doses de 10^{-8} M (aproximadamente 75% em relação ao grupo hipo), o conteúdo da proteína GLUT4 manteve-se dentro da normalidade, o que indica que o T3 administrado agudamente promoveu maior tradução do mRNA, ou então reduziu a degradação de GLUT4, ações essas que poderiam garantir a manutenção do seu conteúdo nessa condição experimental.

Seguimos também para a avaliação da expressão gênica desses transportadores de glicose em cultura de cardiomiócitos adultos, modelo que poderia servir de interface entre a cultura de cardiomiócito neonato e o próprio coração *in vivo*. Como é uma técnica de difícil obtenção dos cardiomiócitos, assim como mantê-los em cultura, não existem muitos estudos e dados na literatura que nos dê suporte para esse modelo. Por isso, usamos uma dose de 10^{-8} M ao meio de cultivo por 6 horas e avaliamos a expressão gênica no GLUT1 e 4.

Como pudemos observar na figura 26, para o GLUT1, após 6 h de adição do T3 na dose 10^{-8} M, há uma significativa redução do seu mRNA, ao passo que, para o GLUT4 (figura 32) esse mesmo tempo e dose resultou num aumento do seu mRNA. Portanto, aparentemente, esse modelo nos serviria para analisarmos a ação do T3, per se, uma vez que nesse tipo de cultura, a expressão do GLUT1 e 4 corroboram os estudos desenvolvidos em animais adultos, relacionados fundamentalmente com a ação genômica do T3 (CASTELLÓ et al., 1994).

Partimos então para analisar uma possível ação não genômica do T3 sobre essas células. Para tal, adicionamos o T3 nas doses de 10^{-9} e 10^{-8} M (conhecidas como sendo mais próximas das doses fisiológicas em meio de cultura) e a dose de 10^{-6} M (dose suprafisiológica e saturante de T3) em 30 e 45 minutos.

Observamos que, em 30 minutos, a dose de 10^{-9} M já foi capaz de diminuir a expressão do mRNA do GLUT1, ao passo que, para ter a mesma diminuição nas doses de 10^{-8} e 10^{-6} M, foi necessário um tempo de 45 min. Essas 2 doses, porém, aos 30 minutos, elevou o mRNA do GLUT1. Com esses dados podemos perceber que há um controle muito fino,

provavelmente pós transcricional, pelo T3, regulando em apenas 15 minutos o mRNA do GLUT1.

Em contrapartida, quando avaliamos o mRNA do GLUT4, observamos uma diminuição da sua expressão, em todas as doses administradas, no tempo de 30, voltando aos valores do controle aos 45 min, com a dose de 10^{-9} e 10^{-8} M.

Sabe-se que, em geral, as respostas não genômicas são rapidamente desencadeadas, apresentam baixa amplitude, tem uma duração limitada, isto é, ocorre retorno à condição basal (antes do tratamento hormonal) e, caso o estímulo hormonal se mantenha por período de tempo maior, são seguidas pelas genômicas que persistem por maior período de tempo. De certa forma, esse padrão foi observado em nossos estudos, quando detectamos uma rápida redução do mRNA e da proteína GLUT1, em 30 – 45 min, e uma inalteração do GLUT1 com 6 h de tratamento (retorno a normalidade) o que aponta para uma ação na genômica do T3 na expressão desse gene, que se assemelha a genômica. Embora tenhamos uma resposta aguda ao T3 relacionada ao GLUT4 que não guarda relação com a ação genômica, excetuando-se com a dose maior de tratamento, a manutenção do conteúdo desta proteína frente a redução abrupta do mRNA que a codifica, também é indício de uma ação não genômica do T3. Essa ação, contudo, nos parece ser efetiva apenas quando o T3 é administrado em dose muito superior à fisiológica, o que pode ser considerado interessante em situações de extrema elevação da glicemia em que a translocação de GLUT4 esteja comprometida, já que aumentando-se o conteúdo de GLUT4, poderíamos garantir uma maior inserção de GLUT4 na membrana plasmática, mesmo que a taxa de translocação se mantenha reduzida.

Quanto aos cardiomiócitos adultos, a observação de que houve diminuição do conteúdo do mRNA do GLUT1 após 6 h, bem como após 45 min do tratamento com T3, reitera a possibilidade de uma ação não genômica do T3 precedendo a genômica, conforme esperado, embora ocorram pequenas diferenças, como aumento transitório do conteúdo dos transcritos nas doses maiores no período de 30 min de exposição ao T3. Com relação ao mRNA de GLUT4, observamos elevação do mesmo após 6 h de exposição ao T3, conforme esperado. Por outro lado, obtivemos redução dele quando o T3 foi administrado por 30 min nas 3 doses estudadas, e retorno aos valores do grupo controle quando o T3 foi adicionado ao meio por 45 min nas doses de 10^{-9} e 10^{-8} M. Embora não tenhamos, ainda, os dados da proteína GLUT4, podemos dizer que, de um modo geral, as respostas dos cardiomiócitos de

neonatos ou adultos ao T3 se assemelham, o que valida ambos os modelos de estudo para esse tipo de abordagem.

5.2.4 Estudos sobre a expressão da mioglobina (Mb) em cultura primária de cardiomiócitos

5.2.4.1 Expressão gênica e protéica da Mb em cardiomiócitos de neonatos

5.2.4.1.A Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre a expressão gênica da Mb

Esse estudo teve o intuito de avaliar a responsividade da cultura de cardiomiócitos ao HT, avaliando o gene da mioglobina, o qual é regulado positivamente por esse hormônio. Foram utilizados 3 grupos experimentais: o eutireoideo (controle), no qual as células foram cultivadas em meio DMEM + 5% NCS e 10% HS, o hipotireoideo (hipo), onde as células foram cultivadas em DMEM + 5% NCS e 10% HS depletado de hormônios tireoidianos e o grupo T3 10^{-8} M 6h, o qual acrescentamos T3 ao meio depletado na dose de 10^{-8} M sendo as células mantidas nesse meio por 6 horas.

A figura 34 mostra que, no grupo hipo houve uma redução do mRNA da Mb e um aumento do mesmo após 6 horas da adição de T3 na dose de 10^{-8} M.

Figura 34: Representação gráfica da expressão gênica da Mb normalizada pela ciclofilina grupos controle; hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8M 6 h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10^{-8} M por 6h). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo.* $p < 0,05$ vs todos, # $p < 0,001$ vs C e hipo.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.4.1.B Efeito da administração aguda de T3 sobre o mRNA da Mb

A figura 35 mostra os dados correspondentes à expressão gênica da mioglobina em amostras de cardiomiócitos cultivados em meio depletado de hormônios tireoidianos (H) e após 30 min da adição de T3 em doses crescentes (de 10^{-10} M a 10^{-6} M).

Podemos observar que após 30 min da adição de T3 nas concentrações de 10^{-10} , 10^{-7} e 10^{-6} M ao meio de cultura, ocorre aumento significativo do conteúdo do mRNA da Mb, enquanto que as doses de 10^{-9} e 10^{-8} M não o modificaram.

Figura 35: Representação gráfica da expressão gênica da Mb normalizada pela ciclofilina nos grupos hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); e 10-10 a 10-6 (grupos que receberam adição de T3 nas concentrações de 10^{-10} M a 10^{-6} M, respectivamente, por 30'). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs hipo.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.4.1.C Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre o conteúdo protéico da Mb

A figura 36 mostra o conteúdo de Mb nos grupos controle, hipo e T3 10^{-8} M 6h, no qual acrescentamos T3 ao meio depletado na dose de 10^{-8} M, sendo as células mantidas nesse meio por 6 horas.

Observamos que tanto o grupo hipo quanto o tratado por 6 h com T3 apresentaram elevação do conteúdo protéico de Mb em relação ao C. Normalizamos os dados do conteúdo protéico da mioglobina pelo GAPDH.

Figura 36: Representação gráfica do conteúdo total de Mb normalizado pelo GAPDH no grupo controle; hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos) e 10-8M 6 h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10-8 M por 6h). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs controle. Acima, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo do GAPDH e da Mb.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.4.1.D Efeito da administração aguda de T3 sobre o conteúdo total de Mb

A figura 37 mostra o efeito da adição de T3, por 30 e 45 min, no meio de cultura depletado de hormônios tireoidianos, nas concentrações: 10^{-8} M, 10^{-7} M e 10^{-6} M. Observa-se que a dose de 10^{-6} M foi a única a promover aumento do conteúdo da proteína Mb, após 30 min de tratamento. Com o aumento do tempo de exposição ao hormônio por 45 min, houve elevação da Mb quando as doses utilizadas foram de 10^{-8} e 10^{-6} M.

Figura 37: Representação gráfica do conteúdo total de Mb normalizado pelo GAPDH nos grupos: **A)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 30' e 10-8 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-8 M por 30' ou 45' respectivamente); **B)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-7 30' e 10-7 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-7 M por 30' ou 45' respectivamente); **C)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-6 30' e 10-6 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-6 M por 30' ou 45' respectivamente). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. # $p < 0,001$ vs todos, * $p < 0,01$ vs hipo. Acima dos gráficos, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total do GAPDH e mioglobina.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.4.2 Expressão gênica da Mb em cardiomiócitos de adultos

5.2.4.2.A Efeito da administração T3 a curto prazo sobre a Mb

Esse estudo teve a finalidade de mostrar como as células de cardiomiócitos adultos em cultura primária responderam ao T3 sobre o gene da Mb. Para tal, administramos ao meio de cultura T3 na dose de 10^{-8} M que permaneceu por 6 horas.

A figura 38 mostra uma diminuição significativa na expressão da mioglobina após 6 h da adição de T3 ao meio.

Figura 38: Representação gráfica da expressão do mRNA da Mb normalizado pela ciclofilina no grupo hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos) e 10-8 6 h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10^{-8} M por 6h). O resultado representa a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs hipo.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.4.2.B Efeito da administração aguda de T3 sobre a Mb

Os 3 gráficos presentes na figura 39 representam os resultados obtidos após a administração de T3 nas doses 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-6} M (A, B e C respectivamente) em 30 e 45 min sobre o mRNA da mioglobina em cardiomiócitos adultos em cultura.

Verifica-se que, quando foram utilizadas as doses 10^{-9} e 10^{-6} M de T3, a expressão do mRNA da Mb em cardiomiócitos adultos foi similar a observada no estudo com cardiomiócitos de neonatos, ou seja, só após 45 min é que houve um aumento significativo no mRNA da Mb, enquanto que na dose de 10^{-8} M este aumento é detectado após 30 min do tratamento, mas volta ao normal aos 45 min de exposição de T3.

Figura 39: Representação gráfica da expressão do mRNA da Mb normalizado pela ciclofilina nos grupos: **A)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-9 30' e 10-9 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-9 M por 30' ou 45' respectivamente); **B)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 30' e 10-8 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-8 M por 30' ou 45' respectivamente); **C)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-6 30' e 10-6 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-6 M por 30' ou 45' respectivamente). O resultado representa a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs hipo e 30'; # $p < 0,01$ vs hipo e 45 min.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.5 Discussão: mioglobina

Outro gene alvo de nosso estudo em cultura celular foi a mioglobina (Mb). Essa proteína contribui para o armazenamento de O_2 nesse tecido e para o transporte de O_2 para as mitocôndrias (CHUNG et al., 2006), além de atuar como aceptora de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico (GARRY e MAMMEN, 2007). Sabe-se que o hormônio tireoidiano modula positivamente a expressão desse gene em coração de ratos (GIANNOCCO, et al., 2004), e a possibilidade de que essa ação também se exerça por mecanismos não genômicos torna bastante interessante e promissor esse estudo.

Em nossos estudos com cardiomiócitos neonatos, observamos uma diminuição no conteúdo de mRNA da Mb quando depletamos de HT o meio de cultura e um significativo aumento quando adicionamos a esse meio uma dose de 10^{-8} M por 6 h, mimetizando os dados obtidos em nosso laboratório, in vivo, quando os ratos apresentavam hipotireoidismo e foram tratados com T3 por 5 dias (GIANNOCCO, et al., 2004). Entretanto, quando essa mesma dose de T3 foi adicionada à cultura de cardiomiócitos adultos, observamos uma diminuição da sua expressão gênica, o que fugiu às nossas expectativas.

Quanto ao efeito da adição do T3 no meio de cultura de cardiomiócito neonato por 30 min, obtivemos um aumento da expressão gênica da Mb nas doses de 10^{-10} , 10^{-7} e 10^{-6} M, se comparados à cultura sem HT. As doses de 10^{-9} e 10^{-8} M não alteraram a expressão do mRNA. Baseado nesses achados, podemos inferir que a expressão do mRNA da Mb em resposta ao T3 é aumentada apenas nas doses suprafisiológicas, já que a resposta a dose de 10^{-10} M parece ser inespecífica, já que o efeito não se sustenta com o aumento da dose. O fato da resposta não ser dependente de dose também aponta para uma ação não genômica.

Em relação à proteína, nossos dados obtidos em células diferem daqueles encontrado na literatura em relação ao coração de ratos in vivo. Giannocco, et al., 1994, demonstraram que, ratos hipotireoideos apresentaram um conteúdo diminuído de Mb em relação aos eutireoideos, porém, em nossa cultura de células depletada de HT observamos um aumento da proteína. Sabe-se que a meia-vida da mioglobina é bastante longa (~20 dias), e é possível que na ausência de HT ela possa se prolongar ainda um pouco mais. Contudo, foi observado um aumento da proteína após o tratamento com T3 em 6 h, corroborando os dados observados in vivo.

Todavia, quando as culturas foram tratadas agudamente (30 min) com T3, foi detectado um aumento do conteúdo protéico somente na maior dose administrada, e quando aumentarmos o tempo de exposição para 45 min, conseguimos esse efeito somente com a menor dose adicionada (10^{-8} M), o que nos leva a sugerir que mecanismos não genômicos foram acionados no desencadeamento destas respostas.

Como comentado para o GLUT4, não se pode descartar a possibilidade de utilização aguda de altas doses de T3 para promover aumento da Mb em circunstâncias especiais, quando por exemplo, um aporte reduzido de O_2 possa estar ocorrendo. Como o efeito não genômico é fugaz, é possível que tenhamos um benefício com o seu uso, o que merece ser investigado mais profundamente.

5.2.6 Estudos sobre a expressão da SERCa2a em cultura primária de cardiomiócitos

5.2.6.1 Expressão gênica e protéica da SERCa2a em cardiomiócitos de neonatos

5.2.6.1.A Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre a expressão do Atp2a2

Esse estudo teve o intuito de avaliar a resposta do gene Atp2a2 à depleção do hormônio tireoidiano e à adição de T3 ao meio de cultura na dose de 10^{-8} M, onde permaneceu por 6h. Utilizamos 3 grupos experimentais: o eutireoideo (controle), no qual as células foram cultivadas em meio DMEM + 5% NCS e 10% HS, o hipotireoideo (hipo), onde as células foram cultivadas em DMEM + 5% NCS e 10% HS depletado de hormônios tireoidianos e o grupo T3 10^{-8} M 6h.

A figura 40 mostra uma significativa diminuição da expressão do mRNA da SERCa2a no grupo hipo vs o grupo controle e um aumento após a administração de T3 vs o grupo hipo. A expressão gênica do grupo controle foi normalizada para o valor de uma unidade arbitrária (UA).

Figura 40: Representação gráfica da expressão gênica da SERCa2a normalizada pela ciclofilina nos grupos: C (controle); hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 6h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10^{-8} M por 6h).. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs todos, # $p < 0,001$ vs hipo.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.6.1.B Efeito da administração aguda de T3 sobre a expressão do Atp2a2

A figura 41 mostra os dados correspondentes à expressão do gene Atp2a2 em amostras de cardiomiócitos obtidos de neonatos cultivados em meio depletado de hormônios

tireoideinos (hipo) e após 30 min da adição de T3 em doses crescentes (10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M e 10^{-6} M).

Podemos observar que não houve alteração no mRNA após 30 min da adição de T3 nas doses de 10^{-10} M a 10^{-7} M. Entretanto, quando foi administrada a dose de 10^{-6} M, houve um significativo aumento da expressão desse transcrito em relação ao grupo hipo e ao grupo 10^{-8} M.

Figura 41: Representação gráfica da expressão gênica da SERCA2 normalizada pela ciclofilina nos grupos: hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); e 10-10 a 10-6 (grupos que receberam adição de T3 nas concentrações de 10^{-10} M a 10^{-6} M, respectivamente por 30'). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs hipo e 10^{-8} M.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.6.1.C Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre o conteúdo protéico da SERCa2a

A figura 42 mostra o conteúdo protéico total de SERCa2a nos grupos controle, hipotireoideo (hipo), e hipo + T3 10^{-8} M 6h e pudemos observar um aumento da SERCa2a nos grupos hipo e tratado com T3 em relação ao controle.

Os dados referentes à proteína SERCa2a foram normalizados pela proteína GAPDH.

Figura 42: Representação gráfica do conteúdo protéico total de SERCa2a normalizado pelo GAPDH nos grupos: controle; hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 6h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10-8 M por 6h). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs controle. Acima do gráfico, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total de GAPDH e SERCa2a.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.6.1.D Efeito da administração aguda de T3 sobre o conteúdo protéico da SERCa2a

Após administrarmos o T3 por 6 h, realizamos a adição do hormônio agudamente, isto é, nos tempos de 30 e 45 min.

A figura 43 mostra, em seus 5 gráficos (A a E), as diferentes doses de T3 nos tempos de 30 e 45 min. Assim, o gráfico A mostra os grupos hipo e o tratamento de T3 na dose 10^{-10} M em ambos os tempos. O quadro B, a dose de 10^{-9} M, o C, de 10^{-8} M, o D, de 10^{-7} M e o quadro E, a dose de 10^{-6} M.

Observamos que, quando administramos o T3 em qualquer dose, porém, no tempo de 30 min, nada acontece com o conteúdo protéico da SERCa2a, esse permanece inalterado em relação ao grupo hipo. Porém, quando estendemos o tempo de adição do T3 para 45 min, ocorreu aumento deste transcrito só com a menor dose de T3 utilizada. Doses de T3 de 10^{-9} e 10^{-6} M reduziram a expressão deste transcrito.

O conteúdo total da SERCa2a foi normalizado pelo GAPDH.

Figura 43: Representação gráfica do conteúdo protéico total de SERCa2a normalizado pelo GAPDH. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs hipo e 30'. **A)** Dose de T3 a 10^{-10} M adicionado ao meio por 30 e 45 min. **B)** Dose de T3 a 10^{-9} M adicionado ao meio por 30 e 45 min. **C)** Dose de T3 a 10^{-8} M adicionado ao meio por 30 e 45 min. **D)** Dose de T3 a 10^{-7} M adicionado ao meio por 30 e 45 min. **E)** Dose de T3 a 10^{-6} M adicionado ao meio por 30 e 45 min. Acima dos gráficos, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total do GAPDH e SERCa2a.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.6.2 Expressão gênica e protéica da SERCa2a em cardiomiócitos de adultos

5.2.6.2.A Efeito da administração a curto prazo de T3 sobre a expressão do Atp2a2

Esse estudo teve a finalidade de mostrar como as células de cardiomiócitos de adultos em cultura primária responderam ao T3 sobre o gene Atp2a2. Assim, foi adicionado ao meio de cultura, T3 na dose de 10^{-8} M que permaneceu por 6 horas.

A figura 44 mostra um aumento significativo na expressão da SERCa2a após 6 h da adição de T3 ao meio, o que corresponde aos dados relatados *in vivo*.

Figura 44: Representação gráfica da expressão do mRNA da SERCa2a normalizado pela ciclofilina nos grupos: hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos) e 10-8 6h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10-8 M por 6h). O resultado representa a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs hipo.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.6.2.B Efeito da administração aguda de T3 sobre o ATP2a2

A figura 45 apresenta 3 gráficos onde estão representados os resultados obtidos após a administração de T3 nas doses 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-6} M (A, B e C respectivamente) em 30 e 45 min sobre o mRNA da SERCa2a em cardiomiócitos adultos em cultura.

Observamos que nenhuma dose ou tempo foram suficientes para elevar o conteúdo do mRNA da SERCa2a, porém, as doses de 10^{-9} e 10^{-8} M de T3 provocam um aumento do seu mRNA em relação ao grupo de mesma dose com tempo de 30 min.

Figura 45: Representação gráfica da expressão do mRNA da SERCa2a normalizado pela ciclofilina nos grupos: **A)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-9 30' e 10-9 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-9 M por 30' ou 45' respectivamente); **B)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 30' e 10-8 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-8 M por 30' ou 45' respectivamente); **C)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-6 30' e 10-6 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-6 M por 30' ou 45' respectivamente). O resultado representa a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs todos e # $p < 0,01$ vs hipo.

5.2.7 Discussão: Atp2a2 (SERCa2a)

A SERCa2a (*sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺-transport ATPase*) é uma ATPase do retículo endoplasmático (RE) expressa no músculo cardíaco responsável pelo sequestro do Ca²⁺ do citosol para o interior do RE, assim como pelo seu armazenamento, modulando portanto, a contratilidade cardíaca. Sabe-se que o hormônio tireoidiano aumenta o conteúdo de mRNA e da proteína SERCa2a através da ativação transcricional desse gene (HARTONG et al., 1996).

Nossos estudos corroboraram os presentes na literatura, onde se observa uma diminuição do mRNA no hipotireoidismo (mimetizado pela cultura celular depletada de HT, nos cardiomiócitos neonatos), e um aumento desse transcrito após o tratamento com T3, no nosso caso, por exposição tanto na cultura de neonatos quanto a de adultos ao HT por 6 horas (tempo suficiente para que o efeito observado, seja considerado genômico) (figuras 40 e 44).

Por outro lado, é sabido que algumas proteínas relacionadas com o manejo de Ca⁺⁺ são reguladas não genomicamente pelo T3. Há relatos de efeitos estimulantes do T3 sobre o trocador Na⁺/Ca⁺⁺ (DAVIS et al., 2010) e da SERCa2 (ZINMAN et al., 2006), os quais se somariam ao seu efeito transcricional bastante conhecido sobre sua expressão gênica.

Embora haja estudos sobre o efeito não genômico do T3 sobre a atividade da SERCa2a, não é de nosso conhecimento que haja estudos avaliando se o T3 também atuaria aumentando a expressão do mRNA e da proteína SERCa2a por meio deste mecanismo. Portanto, estudamos essas possíveis ações não genômicas sobre a SERCa2a, adicionando o T3 ao meio de cultura dos cardiomiócitos neonatos, por curto período de tempo (30 min), em diferentes doses (de 10⁻¹⁰ a 10⁻⁶ M) e observamos que, somente a dose de 10⁻⁶ M foi capaz de aumentar a expressão do mRNA.

Porém, quando adicionamos o T3 nas doses de 10⁻⁹, 10⁻⁸ e 10⁻⁶ M na cultura de cardiomiócitos adultos por 30 min, observamos uma diminuição do seu mRNA e quando estendemos o tempo para 45 min houve um aumento do mRNA somente nas doses fisiológicas (10⁻⁹ e 10⁻⁸ M) em relação ao grupo tratado por 30 min, entretanto ainda não atingindo os níveis do grupo hipo. Esses dados nos demonstram que o T3 parece ter um efeito não genômico sobre o mRNA da SERCa2a que difere de acordo com a diferenciação das células, pois, em neonatos só temos um efeito de aumento de expressão na dose

farmacológica (10^{-6} M) e nos cardiomiócitos adultos em cultura há uma diminuição no seu mRNA em todas as doses adicionadas no mesmo tempo.

Quando estudamos o conteúdo protéico da SERCa2a, os resultados que obtivemos foram similares aos demonstrados com a proteína mioglobina; ou seja, a depleção de HT por 24 h na cultura celular não foi capaz de diminuir o conteúdo protéico da SERCa2a nos cardiomiócitos. A adição do hormônio, nas diferentes concentrações, por 30 min, tampouco aumentou o conteúdo da SERCa2a se comparada com o grupo hipo. Todavia, quando aumentamos o tempo de exposição das células de neonatos ao hormônio observamos uma resposta típica de uma ação não genômica, pois não segue nenhum padrão, isto é, quando aumentamos a dose do T3 adicionado ao meio, tivemos resposta do tipo a aumentar a proteína (10^{-10} M), de não alterar (10^{-9} e 10^{-7} M) e a de diminuir (10^{-8} e 10^{-6} M). Aparentemente o T3 se liga de diferentes formas aos seus sítios de ligação desencadeando diferentes respostas, típico de resposta do tipo não genômica.

5.2.8 Estudos sobre a expressão da α -MHC em cultura primária de cardiomiócitos

5.2.8.1 Expressão gênica e protéica da α -MHC em cardiomiócitos de neonatos

5.2.8.1.A Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre a expressão do Myh6

Esse estudo visou avaliar a resposta da cultura celular de cardiomiócitos neonatos frente a uma depleção de HT ao meio de cultura e à reposição com o T3 na dose de 10^{-8} M por 6 horas e quantificar a expressão do gene Myh6 nesses grupos experimentais.

Esses dados estão apresentados na figura 46, onde se observa uma significativa diminuição da expressão do mRNA da α -MHC no grupo hipo e uma restauração da expressão ao nível do grupo controle após a administração de T3 em 6 h, conforme esperado, baseando-se em estudos de ação genômica do T3 sobre a expressão deste transcrito.

Figura 46: Representação gráfica da expressão gênica da α -MHC normalizada pela ciclofilina nos grupos: controle; hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 6h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10-8 M por 6h).. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo. * $p < 0,001$ vs todos.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.8.1.B Efeito da administração aguda de T3 sobre a expressão do Myh6

Na figura 47 estão representados os dados correspondentes à expressão do gene Myh6 em amostras de cardiomiócitos de neonatos cultivados em meio depletado de hormônios tireoideinos (hipo) e após 30 min da adição de T3 em doses crescentes (10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M e 10^{-6} M).

Quando adicionadas as doses de 10^{-10} M até a dose de 10^{-7} M ao meio de cultivo, houve uma diminuição do mRNA do gene em questão. Já, a dose de 10^{-6} M elevou a expressão do mRNA aos valores do controle (grupo hipo).

Figura 47: Representação gráfica da expressão gênica da α -MHC normalizada pela ciclofilina nos grupos: hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); e 10-10 a 10-6 (grupos que receberam adição de T3 nas concentrações de 10-10 M a 10-6 M, respectivamente por 30'). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs hipo e 10^{-6} M.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.8.1.C Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre o conteúdo protéico da α -MHC

A figura 48 mostra o conteúdo total de α -MHC nos grupos controle (C), hipotireoideo (hipo), e hipo + T3 10^{-8} M 6h (10^{-8} 6h). Observamos uma diminuição da proteína α -MHC tanto no grupo hipo quanto no grupo tratado com T3 por 6 horas em relação ao controle. O primeiro dado era esperado, enquanto o segundo não correspondeu as expectativas de elevação do seu conteúdo pelo T3.

Os dados referentes à proteína α -MHC foram normalizados pela proteína α -actinina.

Figura 48: Representação gráfica do conteúdo total de α -MHC normalizado α -actinina nos grupos: C (controle); hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 6h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10^{-8} M por 6h). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs C. Acima do gráfico, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total da α -actinina e α -MHC.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.8.1.D Efeito da administração aguda de T3 sobre o conteúdo protéico da α -MHC

A figura 49 mostra, em seus 5 gráficos (de A a E), o efeito da adição de T3, por 30 e 45 min, no meio de cultura depletado de hormônios tireoidianos, nas concentrações de 10^{-10} M a 10^{-6} M, respectivamente. Estatisticamente, todas as doses administradas no tempo de 30 min foram capazes de elevar o conteúdo da proteína α -MHC. Entretanto, quando aumentamos o tempo de permanência do T3 no meio de cultivo, a proteína retornou aos níveis do grupo hipo. Esses dados apontam para uma ação não genômica ainda não descrita sobre a expressão dessa proteína.

Figura 49: Representação gráfica do conteúdo protéico total de α -MHC normalizado α -actinina. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs hipo e 45'. **A)** Dose de T3: 10^{-10} M nos tempos de 30 e 45 min; **B)** Dose de T3: 10^{-9} M nos tempos de 30 e 45 min; **C)** Dose de T3: 10^{-8} M nos tempos de 30 e 45 min; **D)** Dose de T3: 10^{-7} M nos tempos de 30 e 45 min; **E)** Dose de T3: 10^{-6} M nos tempos de 30 e 45 min. Acima de cada gráfico, imagem típica obtida pela autoradiografia de Western Blot referente ao conteúdo total de α -actinina e α -MHC.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.8.2 Expressão do Myh6 em cardiomiócitos de adultos

5.2.8.2.A Efeito da administração de T3 a curto prazo a expressão do Myh6

Esse estudo teve a finalidade de demonstrar como as células de cardiomiócitos de adultos em cultura primária responderiam ao T3 sobre o gene Myh6. Assim, foi adicionado ao meio de cultura, T3 na dose de 10^{-8} M que permaneceu por 6 horas.

A figura 50 mostra um aumento significativo na expressão da α -MHC após 6 h da adição de T3 ao meio.

Figura 50: Representação gráfica da expressão do mRNA da α -MHC normalizada pela ciclofilina nos grupos: hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos) e 10-8 6 h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10-8 M por 6h). O resultado representa a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs hipo.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.8.2.B Efeito da administração aguda de T3 sobre o Myh6

A figura 51 apresenta 3 gráficos onde estão representados os resultados obtidos após a administração de T3 nas doses 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-6} M (A, B e C respectivamente) em 30 e 45 min sobre o mRNA da α -MHC em cardiomiócitos de adultos em cultura.

Observa-se que, somente a dose de 10^{-9} M, por 45 min não alterou a expressão do mRNA da α -MHC, mantendo-se ao nível do grupo hipo. Enquanto que, as outras doses, no tempo de 45 min e todas as doses administradas em 30 min diminuiram sua expressão gênica.

Figura 51: Representação gráfica da expressão do mRNA da α -MHC normalizado pela ciclofilina nos grupos: **A)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-9 30' e 10-9 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-9 M por 30' ou 45' respectivamente); **B)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 30' e 10-8 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-8 M por 30' ou 45' respectivamente); **C)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-6 30' e 10-6 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-6 M por 30' ou 45' respectivamente). O resultado representa a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. # $p < 0,01$ vs todos e * $p < 0,01$ vs hipo.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.9 Estudos sobre a expressão do Myh7 em cultura primária de cardiomiócitos

5.2.9.1 Expressão do Myh7 em cardiomiócitos de neonatos

5.2.9.1.A Efeito da depleção e da reposição de T3 sobre a expressão do Myh7

Com essa manobra visamos avaliar a resposta da cultura celular de cardiomiócitos neonatos frente a uma depleção de HT ao meio de cultura e à reposição com o T3 na dose de 10^{-8} M por 6 horas sobre a expressão do gene Myh7, o qual é regulado negativamente pelo hormônio tireoidiano.

E como podemos observar na figura 52, há um aumento significativo do mRNA β -MHC quando o meio foi depletado de HT e uma diminuição quando acrescentamos o T3 em 6 h.

Figura 52: Representação gráfica da expressão gênica β -MHC normalizada pela ciclofilina nos grupos: controle; hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 6h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10^{-8} M por 6h).. Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo. * $p < 0,05$ vs todos, # $p < 0,05$ vs controle.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.9.1.B Efeito da administração aguda de T3 sobre do Myh7

Na figura 53 estão representados os dados correspondentes à expressão do gene Myh7 quando adicionamos T3, ao meio de cultura, por 30 min, em doses crescentes (10^{-10} até 10^{-6} M).

E como podemos notar há uma diminuição da expressão do mRNA β -MHC nas doses de 10^{-10} M, 10^{-9} M e 10^{-7} M, um aumento quando administradas a dose de 10^{-6} M e nenhuma alteração quando a dose adicionada foi a de 10^{-8} M.

Figura 53: Representação gráfica da expressão gênica do β -MHC normalizada pela ciclofilina nos grupos: hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); e 10-10 a 10-6 (grupos que receberam adição de T3 nas concentrações de 10^{-10} M a 10^{-6} M, respectivamente por 30'). Os resultados representam a média $\pm$ EPM de 6 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs todos, # $p < 0,05$ vs hipo.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.9.2 Expressão do *Myh7* em cardiomiócitos de adultos

5.2.9.2.A Efeito da administração de T3 a curto prazo na expressão do *Myh7*

Como nos estudos anteriores, realizamos um ensaio com a finalidade de demonstrar como as células de cardiomiócitos adultos em cultura primária responderiam ao T3 sobre o gene *Myh7*. Assim, foi adicionado ao meio de cultura, T3 na dose de 10^{-8} M que permaneceu por 6 horas.

A figura 54 mostra uma significativa diminuição do mRNA da β -MHC após 6 h da adição de T3 ao meio.

Figura 54: Representação gráfica da expressão do mRNA da β -MHC normalizada pela ciclofilina nos grupos hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos) e 10-8 6h (grupo que recebeu adição de T3 na concentração 10-8 M por 6h).. O resultado representa a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs hipo.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.9.2.B Efeito da administração aguda de T3 sobre a expressão do Myh7

A figura 55 apresenta 3 gráficos onde estão representados os resultados obtidos após a administração de T3 nas doses 10^{-9} , 10^{-8} e 10^{-6} M (A, B e C respectivamente) em 30 e 45 min sobre o mRNA da β -MHC em cardiomiócitos adultos em cultura.

Observa-se que, as doses de 10^{-9} M em 30 min e 10^{-6} M de T3 em 45 min não alterou a expressão do mRNA da β -MHC, mantendo-se ao nível do grupo hipo. Enquanto que, as outras doses, nos tempos de 30 min e 45 min diminuiram sua expressão gênica.

Figura 55: Representação gráfica da expressão do mRNA da β -MHC normalizado pela ciclofilina nos grupos: **A)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-9 30' e 10-9 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-9 M por 30' ou 45' respectivamente); **B)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-8 30' e 10-8 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-8 M por 30' ou 45' respectivamente); **C)** hipo (cultura depletada de hormônios tireoidianos); 10-6 30' e 10-6 45' (grupos que receberam adição de T3 na concentração 10-6 M por 30' ou 45' respectivamente). O resultado representa a média $\pm$ EPM de 5 amostras por grupo. * $p < 0,01$ vs hipo e # $p < 0,01$ vs todos.

Fonte: Brunetto, EL (2011)

5.2.10 Discussão: cadeia pesada da miosina (MHC): isoformas α e β

Os HT também têm a capacidade de atuar sobre a diferenciação de genes cardíacos no período embrionário, responsáveis por suas propriedades mecânicas, como o Myh6 e Myh7 (DANZI e KLEIN, 2005), bem como sobre a regulação da expressão delas na idade adulta. A isoforma alfa da cadeia pesada da miosina (α -MHC) tem uma elevada atividade ATPásica e a sua ativação possibilita o rápido encurtamento das miofibrilas cardíacas. Já, β -MHC apresenta baixa atividade ATPásica, de modo a possibilitar contrações cardíacas com menor velocidade, porém com menor gasto energético. O primeiro tem sua transcrição aumentada e o segundo é regulado negativamente pelo T3 (MACHACKOVA et al., 2005).

Utilizando cultura de cardiomiócitos de ratos neonatos, observamos que o grupo composto de células depletadas de HT (hipo) apresentou uma menor expressão gênica de α -MHC e maior de β -MHC (figuras 46 e 52). Após 6 h da adição de T3 (dose de 10^{-8} M) observou-se uma resposta que corrobora os dados da literatura: aumento da expressão gênica da α e uma diminuição da β -MHC. Quando desenvolvemos esse tempo de tratamento com T3 em cultura de cardiomiocitos adultos, observamos um mesmo padrão de resposta na expressão gênica, tanto para α , quanto para a β -MHC, portanto nos mostrando que pelo menos, genomicamente, essas células respondem de maneira igual.

Contudo, nossos achados referentes às doses de T3 administradas em 30 min em cardiomiócitos neonatos mostraram que o conteúdo de mRNA da α -MHC apresentou-se diminuído em relação ao grupo hipo, na dose de 10^{-10} a 10^{-7} M, porém, aumentado, quando foi utilizada a dose de 10^{-6} M. Ou seja, em cardiomiócitos neonatos, a aparente resposta de incremento da expressão gênica da α -MHC frente ao HT só ocorreu com a dose supra-fisiológica de 10^{-6} M de T3. Em contrapartida, em células de cardiomiocitos adultos, nenhuma dose ou tempo (30 min ou 45 min) foi capaz de aumentar o mRNA da α -MHC, muito pelo contrário, houve uma diminuição da sua expressão gênica. Esses resultados nos mostram que, o diferencial da resposta não genômica em relação ao gene da α -MHC é a dose farmacológica de T3 (10^{-6} M) e também o tipo celular envolvido (cardiomiócitos de neonatos).

Quanto à resposta do mRNA da β -MHC ao T3 observamos diminuição do conteúdo deste a medida que doses crescentes de T3 (10^{-10} M, 10^{-9} M e 10^{-8} M) foram utilizadas, conforme esperado; contudo, a dose de 10^{-7} M não provocou qualquer alteração no conteúdo

deste mRNA em relação ao grupo hipo e, na dose 10^{-6} M observamos o mesmo tipo de resposta obtida com o gene da α -MHC, ou seja, um aumento de seu mRNA. Essa última evidência difere da encontrada na literatura, uma vez que o gene da β -MHC é regulado negativamente pelo T3, pelo menos quando se trata de ação genômica. Essa “*downregulation*” da β -MHC pelo T3 se baseia nos achados de Ojamaa, 1996, que descreve a presença de um TRE “negativo” que se liga ao receptor de T3 na ausência de seu ligante. Dados mais recentes encontrados na literatura mostram que a expressão da MHC é modulada por micro RNAs os quais influenciam o *turnover* e a tradução do seu mRNA (van Rooij et al., 2007).

O interessante foi que nos cardiomiócitos adultos, o padrão de resposta encontrado para os neonatos foi o mesmo nas doses de 10^{-9} M e 10^{-8} M tanto no tempo de 30 min quanto no de 45 min. Já para a dose de 10^{-6} M, houve uma diminuição do mRNA da β -MHC em 30 min, e um aumento nos 45 min em relação ao 30 min, porém, sem nenhuma alteração em relação ao grupo hipo, mostrando mais uma vez, que a dose saturante (supra fisiológica de T3) é que está envolvida na resposta da ação não genômica.

Com relação à proteína α -MHC, observamos uma diminuição da proteína no grupo hipo e que, após o acréscimo de T3 por 6 h, não houve alteração no seu conteúdo nem relação ao grupo hipo e nem ao grupo controle. Quanto ao conteúdo protéico nos grupos tratados com T3 por 30 min vs hipo, observamos um aumento já a partir da dose de 10^{-10} M e que se estendeu para todas as outras doses estudadas. No entanto, quando o T3 foi administrado no tempo de 45 min, como observamos na figura 49, nenhuma dose foi capaz de alterar o conteúdo da proteína α -MHC.

6 CONCLUSÕES

O conjunto dos dados obtidos até o momento nos traz boas perspectivas para a identificação e comprovação de um controle pós-transcricional do T3 sobre a expressão dos genes alvo desse estudo, uma vez que a maior dose adicionada à cultura de cardiomiócitos neonatos e também adultos foi capaz de alterar o conteúdo de todos os transcritos em apenas 30 minutos. O T3 adicionado na cultura também foi capaz de promover alterações protéicas significativas, nos indicando a existência de efeito não genômico direto desse hormônio.

Nossos dados também são consistentes nos estudos direcionados em coração de ratos submetidos à estenose aórtica, condição em que esses efeitos não genômicos do T3 poderiam trazer benefícios, a curto prazo, já que por promoverem aumento da expressão dos genes relacionados ao metabolismo energético, contribuiriam para o maior aporte de glicose e oxigenação desse tecido.

Vale comentar que na ICC a diminuição da expressão dos receptores nucleares de T3 indica que esse hormônio possa ser prejudicial nessa condição, a julgar pelos seus efeitos cardioestimulantes, o que implicaria num aumento do trabalho cardíaco e da demanda metabólica. No entanto, o fato de demonstrarmos que, por mecanismos não genômicos, o T3 pode alterar o padrão de expressão de genes, o que poderia induzir uma melhora na função cardíaca, é bastante significativo, uma vez que essas ações são rapidamente desencadeadas e são fugazes, impedindo que os efeitos cardioestimulantes persistam, o que poderia ser deletério. Assim, essa ação não genômica pode ser bastante útil numa situação emergencial.

REFERÊNCIAS

ASTRAND, I. P.; ASTRAND, P. O.; CHRISTENSEN, E. H.; HEDMAN, R. Myoglobin as an oxygen-store in man. **Acta Physiol. Scand.**, v. 48, p. 454-460, 1960.

BALKMAN, C.; OJAMAA, K.; KLEIN, I. Time course of the in vivo effects of thyroid hormone on cardiac gene expression. **Endocrinology**, v. 130, p. 2001-2006, 1992.

BANDA, M.; BOMMINENI, A.; THOMAS, R. A.; LUCKINBILL, L. S.; TUCKER, J. D. Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Mutat. Res.**, v. 8, p.126-134, 2008.

BARRETO-CHAVES, M. L.; HEIMANN, A.; KRIEGER, J.E. Stimulatory effect of dexamethasone on angiotensin-converting enzyme in neonatal rat cardiac myocytes. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, p. 661-664, 2000.

BAUAB, R. C.; PERONE, D.; CASTRO, A. V.; CICOGNA, A. C.; NOGUEIRA, C. R. Low triiodothyronine (T3) or reverse triiodothyronine (rT3) syndrome modifies gene expression in rats with congestive heart failure. **Endocr. Res.**, v. 31, p. 397-405, 2005.

BECKER, C.; SEVILLA, L.; TOMAS, E.; PALACIN, M.; ZORZANO, A.; FISCHER, Y. The endosomal compartment is an insulin-sensitive recruitment site for GLUT4 and GLUT1 glucose transporters in cardiac myocytes. **Endocrinology**, v. 142, p. 5267-5276, 2001.

BENSON, D. A.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; WHEELER, D. L. GenBank. **Nucleic Acids Res.**, v. 33: p. D34-D38, 2005.

BIANCO, A.C., SALVATORE, D., GEREKEN, B., BERRY, M.J., LARSEN, P.R. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. **Endocr. Rev.**, v. 23, p. 38–89, 2002.

BILEZIKIAN, J. P.; LOEB, J. The influence of hyperthyroidism and hypothyroidism on α - and β -adrenergic receptor system and adrenergic responsiveness. **Endocrinology**, v. 4, p. 378-388, 1983.

BING, O. H.; BROOKS, W. W.; ROBINSON, K. G.; SLAWSKY, M. T.; HAYES, J. A.; LITWIN, S. E.; SEN, S.; CONRAD, C. H. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. **Mol. Cell. Cardiol.**, v. 27, p. 383-396, 1995.

BIONDI, B.; KLEIN, I. Hypothyroidism as a risk factor for cardiovascular disease. **Endocrine**, v. 24, p. 1-13, 2004.

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, p. 968-974, 2002.

BREGAGNOLLO, E. A.; ZORNOFF, L. A.; OKOSHI, K.; SUGIZAKI, M.; MESTRINEL, M. A.; PADOVANI, C. R.; CICOGNA, A. C. Myocardial contractile dysfunction contributes to the development of heart failure in rats with aortic stenosis. **Int. J. Cardiol.**, v. 117, p. 109-114, 2007.

BRENT, G. A.; MOORE, D. D.; LARSEN, P. R. Thyroid hormone regulation of gene expression. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 53, p. 17-35, 1991.

BRUNETTO, E.L., TEIXEIRA S.S., GIANNOCO, G., MACHADO, U.F., NUNES, M.T. T3 rapidly increases solute carrier family 2 facilitated glucose transporter member 4 (Slc2a4) gene expression and glucose transporter 4 (GLUT4) trafficking to the plasma membrane in skeletal muscle of rat and improves glucose homeostasis. **Thyroid. In press**, 2011.

CAO, X.; KAMBE, F.; MOELLER, L. C.; REFETOFF, S.; SEO, H. Thyroid hormone induces rapid activation of AKT/protein kinase b-mammalian target of rapamycin-p70s6k cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. **Molecular Endocrinology**, v. 16, p. 102-112, 2005.

CASLA, A.; ROVIRA, A.; WELLS, J. A.; DOHM, G. L. Increase glucose transporter (GLUT4) protein expression in hyperthyroidism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 171, p. 182-188, 1990.

CASTELLÓ, A.; RODRIGUEZ-MANZANEQUE, J. C.; CAMPS, M.; PEREZ- CASTILLO, A.; TESTAR, A.; PALACÍN, M.; SANTOS, A.; ZORZANO, A. Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of Glut-4 and Glut-1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 5905–5912, 1994.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CHUNG, Y.; HUANG, S. J.; GLABE, A.; JUE, T. Implication of CO inactivation on myoglobin function. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 290, p. 1616-1624, 2006.

da SILVA, F. G.; GIANNOCO, G.; LUCHESSI, A. D.; CURI, R.; NUNES, M. T. T3 acutely increases GH mRNA translation rate and GH secretion in hypothyroid rats. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 317, p. 1-7, 2010.

DALLNER, O. S.; CHERNOGUBOVA, E.; BROLINSON, K. A.; BENGTSSON, T. Beta3-adrenergic receptors stimulate glucose uptake in brown adipocytes by two mechanisms independently of glucose transporter 4 translocation. **Endocrinology**, v. 147, p. 5730-5739, 2006.

DANZI, S.; KLEIN, I. Thyroid hormone-regulated cardiac gene expression and cardiovascular disease. **Thyroid**, v. 12, p. 467-472, 2002.

DANZI, S.; KLEIN, I. Posttranscriptional regulation of myosin heavy chain expression in the heart by triiodothyronine. **Am. J. Physiol. Circ. Physiol.**, v. 288, p. H455-H460, 2005.

DAVIS, P. J.; DAVIS, F.B. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. **Thyroid**. V. 12, p. 459-466. 2002

DAVIS, P. J.; LEONARD, J. L.; DAVIS, F. B. Mechanisms of non genomic actions of thyroid hormone. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 29, p. 211-218, 2008.

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, p. 38032–38039, 2000.

DAVIS, P. J.; ZHOU, M.; DAVIS, F. B.; LANSING, L.; MOUSA, S. A.; LIN, H. Y. Mini-review: Cell surface receptor for thyroid hormone and nongenomic regulation of ion fluxes in excitable cells. **Physiology & Behavior**, v. 99, p. 237-239, 2010

DIDYK, R. B.; ANTON, E. E.; ROBINSON, K. A.; MENICK, D. R.; BUSE, M. G. Effect of immobilization on glucose transporter expression in rat hindlimb muscles. **Metabolism**, v. 43, p. 1389-1394, 1994.

DILLMANN, W.H. Cardiac function in thyroid disease: clinical features and management considerations. **Ann Thorac Surg**, v. 56, p. 9-15, 1993.

DILLMANN, W.H. Editorial: Thyroid Hormone Action and Cardiac Contractility - A Complex Affair. **Endocrinology**, v. 137, p.799-801, 1996.

DILLMANN, W.H. Cellular action of thyroid hormone on the heart. **Thyroid**, v. 12, p. 447-452, 2002.

DILLMANN, W.H. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. **Heart Fail Rev**, v. 15, p. 125-132, 2010.

FLÖGEL, U, GÖDECKE, A, SCHRADER, J. Myoglobin is important for postischemic recovery in the heart. **Circulation**, v. 104, p. II -227, 2001a.

FLÖGEL U, MERX MW, GÖDECKE A, DECKING UKM, SCHRADER J. Myoglobin: a scavenger of bioactive NO. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, p. 735 -740, 2001b.

FRIEHS I, MORAN A, STAMM C, COLAN S, TAKEUCHI KD, HUNG C. Impaired glucose transporter activity in pressure-overload hypertrophy is an early indicator of progression to failure. **Circulation**, v. 100, p. 187–193, 1999.

GALLIE, D. R. A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. **Gene**, v. 216, n. 1, p. 1-11, 1998.

GARDNER, D. G.; GERTZ, B. J.; HANE, S. Thyroid hormone increases rat atrial natriuretic peptide messenger ribonucleic acid accumulation in vivo and in vitro. **Mol. Endocrinol.**, v. 1, p.260-265, 1987.

GARRY, D. J.; MAMMEN, P. P. Molecular insights into the functional role of myoglobin. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 618, p. 181-193, 2007.

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

GIANNOCCO, G.; SANTOS, R. A.; MACHADO UB, Nunes MT. Thyroid hormone increases GLUT4 gene expression in rat cardiac muscle. **Diabetes Res. Clin. Pract.**, v. 50, p. S157, 2000.

GLOSS, B.; VILLEGAS, S.; VILLARREAL, F. J.; MORISCOT, A.; DILLMANN, W. H. Thyroid hormone-induced stimulation of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase gene is inhibited by LIF and IL-6. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 278, p. 738-743, 2000.

GOROVITS, N.; CHARRON, M. J. Mini-Series: Modern Metabolic Concepts. What we know about facilitative glucose transporters. **Biochem. Educ.**, v. 31, p. 163-172, 2003.

GOULART-DA-SILVA, F.; GIANNOCCO, G.; SANTOS, M. F.; NUNES, M. T. Thyroid hormone induction of actin polymerization in somatotrophs of hypothyroid rats: Potential repercussions in growth hormone (GH) synthesis and secretion. **Endocrinology**, v. 147, p. 5777-5785, 2006.

HAMILTON, M. A.; STEVENSON, L. W.; FONAROW, G. C.; STEIMLE, A.; GOLDHABER, J. I.; CHILD, J. S.; CHOPRA, I. J.; MORIGUCHI, J. D.; HAGE, A. Safety and hemodynamic effects of intravenous triiodothyronine in advanced congestive heart failure. **Am. J. Cardiol.**, v. 81, p. 443-447, 1998.

HARTONG, R.; VILLARREAL, F. J.; GIORDANO, F.; HILAL-DANDAN, R.; MC-DONOUGH, P. M.; DILLMAN, W. H. Phorbol myristate acetate induced hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes is associated with decreased sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCa2a) gene expression and calcium reuptake. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 28, p. 2467-2477, 1996.

HARVEY, C. B.; WILLIAMS, G. Mechanism of thyroid hormone action. **Thyroid**, v. 12 p. 441-446, 2002.

HEID C.A.; STEVENS J.; LIVAK K.J.; WILLIAMS P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Res**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HENDERSON, K. K.; DANZI, S.; PAUL, J. T.; LEYA, G.; KLEIN, I.; SAMAREL, A. M. Physiological replacement of T3 improves left ventricular function in an animal model of myocardial infarction-induced congestive heart failure. **Circ. Heart Fail.**, v. 2, p. 243-252, 2009.

HENRIKSEN, E. J.; BOUREY, R. E.; RODNICK, K. J.; KORANYI, L.; PERMUTT, M. A.; HOLLOSZY, J. O. Glucose transporter protein content and glucose transport capacity in rat skeletal muscles. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. 593-598, 1990.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific dna-sequences. **Bio-Technology**, v. 10, p. 413-417, 1992.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis - real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Bio-Technology**, v.11, .1026-1030, 1993.

HOLMES, B. F.; LANG, D. B.; BIRNBAUM, M. J.; UM, J.; DOHM, G. L. AMP Kinase is not required for the GLUT4 response to exercise and denervation in skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 287, p. E739-E743, 2004.

HOMCY, C. J.; VATNER, S. F.; VATNER, D. E. β -adrenergic receptor regulation in the heart in pathophysiologic states: abnormal adrenergic responsiveness in cardiac disease. **Annu Rev Physiol**, v. 53, p. 137-159, 1991.

INCERPI, S.; LULY, P.; VITO, P. D.; FARIAS, R. N. Short-Term Effects of thyroid hormones on the Na/H antiport in L-6 myoblasts: high molecular specificity for 3,3,5-Triiodo-L-Thyronine. **Endocrinology**, v. 140, p. 683–689, 1999.

JEPSEN, K.; ROSENFELD, M. G. Biological roles and mechanistic actions of corepressor complexes. **Journal of Cell Science**, v. 115, p. 689-698, 2002.

JOOST, H. G.; THORENS, B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). **Mol. Membr. Biol.**, v. 18, p. 247-256, 2001.

KEMPPAINEN, J.; TSUCHIDA, H.; STOLEN, K.; KARLSSON, H.; BJORNHOLM, M.; HEINONEN, O. Insulin signalling and resistance in patients with chronic heart failure. **J Physiol**, v. 550, p. 305–315, 2003.

KINUGAWA, K.; YONEKURA, K.; RIBEIRO, R. C.; ETO, Y.; AOYAGI, T.; BAXTER, J. D.; CAMACHO, S. A.; BRISTOW, M. R.; LONG, C. S.; SIMPSON, P. C. Regulation of thyroid hormone receptor isoforms in physiological and pathological cardiac hypertrophy. **Circ. Res.**, v. 89, p. 591-598, 2001.

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

KORZICK, D. H. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling: a cellular update. **Adv. Physiol. Educ.**, v. 27, p. 192-200, 2003.

LAZAR, M. A. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. **Endocr. Rev.**, v. 14, p. 184-193, 1993.

LEONARD, J. L.; SIEGRIST-KAISER, C. A.; ZUCKERMAN, C. J. Regulation of type II iodothyronine 5'-deiodinase by thyroid hormone. Inhibition of actin polymerization blocks enzyme inactivation in cAMP-stimulated glial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 940-946, 1990.

LIN, H-Y.; DAVIS, F. B.; GORDINIER, J. K.; MARTINO, L. J.; DAVIS, P. J. Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. **Am. J. Physiol.**, v. 276, p. C1014-C1024, 1999.

LOPASCHUK, G. D. Targets for modulation of fatty acid oxidation in the heart. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v. 5, p. 290-294, 2004.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LUEGMAYR, E.; VARGA, F.; FRANK, T.; ROSCHGER, P.; KLAUSHOFER, K. Effects of triiodothyronine on morphology, growth behavior, and the actin cytoskeleton in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1). **Bone**, v. 18, p. 591-599, 1996.

MACHACKOVA, J.; BARTA, J.; DHALLA, N. S. Molecular defects in cardiac myofibrillar proteins due to thyroid hormone imbalance and diabetes. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 83, p. 1071-1091, 2005.

MARTIN III, W. H. Triiodothyronine, β -adrenergic receptors, agonist responses, and exercise capacity. **Ann. Thorac. Surg.**, v. 56, p. 24-34, 1993.

MATSUMORI, A. The use of cytokine inhibitors. A new therapeutic insight into heart failure. **Int. J. Cardiol.**, v. 62, p. S3-S12, 1997.

MCVEIGH, J. J.; LOPASCHUK, G. D. Dichloroacetate stimulation of glucose oxidation improves recovery of ischemic rat hearts. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. H1079-H1085, 1990.

MEZOSI, E.; SZABO, J.; NAGY, E. V.; BORBELY, A.; VARGA, E.; PARAGH, G.; VARGA, Z. Nongenomic effect of thyroid hormone on free-radical production in human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Endocrinology**, v. 185, p. 121–129 2005.

MINAKAWA, M.; TAKEUCHI, K.; ITO, K.; TSUSHIMA, T.; FUKUI, K.; TAKAYA, S.; FUKUDA, I. Restoration of sarcoplasmic reticulum protein level by thyroid hormone contributes to partial improvement of myocardial function, but not to glucose metabolism in an early failing heart. **Eur. J. Cardiothorac. Surg.**, v. 24, p. 493-501, 2003.

MITSUMOTO, Y.; KLIP, A. Developmental regulation of the subcellular distribution and glycosylation of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters during myogenesis of L6 muscle cells. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 4957-4962, 1992.

MOREIRA, V. O.; de CASTRO, A. V.; YAEGASCHI, M.Y.; CICOGNA, A. C.; OKOSHI, M. P.; PEREIRA, C. A.; ARAGON, F. F.; BRUNO, M. B.; PADOVANI, C. R.; OKOSHI, K. Echocardiographic criteria for the definition of ventricular dysfunction severity in aortic banded rats. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 86, p. 432-438, 2006.

MORKIN, E.; FLINK, I. L.; GOLDMAN S. Biochemical and physiologic effects of thyroid hormone on cardiac performance. **Progress Cardiovasc. Dis.**, v. 25, p. 435-458, 1983.

MORRISON, T. B.; WEIS, J.J.; WITTEWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR (R) green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, v. 24, p. 954-962, 1998.

MURRAY AJ, LYGATE CA, COLE MA, CARR CA, RADDA GK, NEUBAUER S, CLARKE K. Insulin resistance, abnormal energy metabolism and increased ischemic damage in the chronically infarcted rat heart. **Cardiovasc Res**, 71:149-157, 2006.

NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. Basic mechanisms of cardiac gene expression. **Eur Heart J**. v. 14, p. 2-11. 1993.

NORTON, G. R.; WOODIWISS, A. J.; GAASCH, W. H.; MELA, T; CHUNG, E. S.; AURIGEMMA, G. P.; MEYER, T. E. Heart failure in pressure overload hypertrophy. The relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 39, p. 664-671, 2002.

NUNES, M. T.; BIANCO, A. C.; MIGALA, A.; AGOSTINI, B.; HASSELBACH, W. Thyroxine induced transformation in sarcoplasmic reticulum of rabbit soleus and psoas muscles. **Z Naturforsch C**. v. 40, p. 726-734, 1985

OJAMAA, K.; KLEMPERER, J. D.; MACGILVRAY, S. S.; KLEIN, I.; SAMAREL, A. Thyroid hormone and hemodynamic regulation of beta-myosin heavy chain promoter in the heart. **Endocrinology**, v. 137, p. 802-808, 1996.

OLIVARES, E. L.; MARASSI, M. P.; FORTUNATO, R. S.; da SILVA, A. C.; COSTA-E-SOUSA, R. H.; ARAÚJO, I. G.; MATTOS, E. C.; MASUDA, M. O.; MULCAHEY, M. A.; HUANG, S. A.; BIANCO, A. C.; CARVALHO, D. P. Thyroid function disturbance and type

3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats a time course study. **Endocrinology**, v. 148, p. 4786-4792, 2007.

ONO, T.; MAEKAWA, K.; WATANABE, S.; OKA, H.; KUBOKI, T. Muscle contraction accelerates IL-6 mRNA expression in the rat masseter muscle. **Arch. Oral. Biol.**, v. 52, p. 479-486, 2007.

PANTOS. C.; MOUROUZIS, I.; SARANTEAS, T.; PAIZIS, I.; XINARIS, C.; MALLIOPOULOU, V.; COKKINOS, D. V. Thyroid hormone receptors $\alpha 1$ and $\beta 1$ are downregulated in the post-infarcted rat heart: consequences on the response to ischaemia-reperfusion. **Basic. Res. Cardiol.**, v. 100, p. 422–432, 2005.

PAOLISSO, G.; de RIU, S.; MARRAZZO, G.; VERZA, M.; VARRICCHIO, M.; D'ONOFRI, F. Insulin resistance and hyperinsulinemia in patients with chronic congestive heart failure. **Metabolism**, v. 40, p. 972–977, 1991.

PATERNOSTRO, G.; CAMICI, P.; LAMMERSTMA, A.; MARINHO, N.; BALIGA, R.; KOONER, J. Cardiac and skeletal muscle insulin resistance in patients with coronary heart disease. **J. Clin. Invest.**, v. 98, p. 2094–2099, 1996.

PATERNOSTRO, G.; PAGANO, D.; GNEECHI-RUSCONE, T.; BONSER, R.; CAMICI, P. Insulin resistance in patients with cardiac hypertrophy. **Cardiovasc. Res.**, v. 42, p. 246–253, 1999.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

PURDOM-DICKINSON, S. E.; SHEVELEVA, E. V.; SUN, H.; CHEN, Q. M. Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants. **Mol. Pharmacol.**, v. 72, p. 1074-1081, 2007.

RAZEGHI, P.; YOUNG, M.; ALCORN, J.; MORAVEC, C.; FRAZIER, O.; TAEGTMEYER, H. Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. **Circulation**, v. 104, p. 2923-2931, 2001.

ROHRER, D. K.; DILLMANN W. H. Thyroid hormone markedly increases the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum Ca^{++} ATPase in the rat heart. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p.6941-6944, 1988.

SACHS, A. B. Messenger RNA degradation in eukaryotes. **Cell**, v. 74, p. 413-421, 1993.

SALLÉS, F. J.; RICHARDS, W. G.; STRICKLAND, S. Assaying the polyadenylation state of mRNAs. **Methods**, v. 7, n. 1, p. 38-45, 1999.

SAMUELS, H. H.; STANLEY, F.; CASANOVA, J. Depletion of L-3,5,3'-triiodothyronine and L-thyroxine in euthyroid calf serum for use in cell culture studies of the action of thyroid hormone. **Endocrinology**, v. 105, p. 80-85, 1979.

SANTALÚCIA, T.; MORENO, H.; PALACIN, M.; YACOUN, M. H.; BRAND, N. J.; ZORZANO, A. A novel functional co-operation between MyoD, MEF2 and TRalpha1 is sufficient for the induction of GLUT4 gene transcription. **J. Mol. Biol.**, v. 314, p. 195-204, 2001.

SCHMIDT, B. M.; MARTIN, N.; GEORGENS, A. C.; TILLMANN, H. C.; FEURING, M.; CHRIST, M.; WEHLING, M. Nongenomic cardiovascular effects of triiodothyronine in euthyroid male volunteers. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, p. 1681–1686, 2002.

SEGALL, J.; INGBAR, S. H. Evidence that an increase in cytoplasmic calcium is the initiating event in certain plasma membrane-mediated responses to 3,5,3'- triiodothyronine in rat thymocytes. **Endocrinology**, v. 124, p. 1949–1955, 1989.

SERRANO-NASCIMENTO, C.; CALIL-SILVEIRA, J.; NUNES, M. T. Posttranscriptional regulation of sodium-iodide symporter mRNA expression in the rat thyroid gland by acute iodide administration. American Journal of Physiology. **Cell Physiology**, v. 298, n. 4, p. C893-C899, 2010.

SHENOY, R.; KLEIN, I.; OJAMAA, K. Differential regulation of SR calcium transporters by thyroid hormone in rat atria and ventricles. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 281, p. H1690- H1696, 2001.

SUN, D.; NGUYEN, N.; DEGRADO, T. R.; SCHWAIGER, M.; BROSIUS, F.C. 3rd. Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. **Circulation**, v. 89, p. 793-798, 1994.

SWAN, J.; ANKER, S.; WALTON, C.; GODSLAND, I.; CLARK, A.; LEYVA, F. Insulin resistance in chronic heart failure: relation to severity and etiology of heart failure. **JACC.**, v. 30, p. 527–532, 1997.

TAEGETMEYER, H. Metabolic support for the postischemic heart. **Lancet**, v. 345, p. 1552–1555, 1995.

TIAN, R.; ABEL, E. Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis. **Circulation**, v. 103, p. 2961–2966, 2001.

TORRANCE, C. J.; DEVENTE, J. E.; JONES, J. P.; DOHM, G. L. Effects of thyroid hormone on GLUT4 glucose transporter gene expression and NIDDM in rats. **Endocrinology**, v. 138, p. 1204–1214, 1997a.

TORRANCE, C. J.; USALA, S. J.; PESSIN, J. E.; DOHM, G. L. Characterization of a low affinity thyroid hormone receptor binding site within the rat GLUT4 gene promoter. **Endocrinology**, v. 138, p. 1215–1223, 1997b.

VAN ROOIJ, E.; SUTHERLAND, L. B.; QI, X.; RICHARDSON, J. A.; HILL, J.; OLSON, E. N. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. **Science**, v. 27, p. 575-579, 2007.

WEINSTEIN, S. P.; HABER, R. S. Differential regulation of glucose transporter isoforms by thyroid hormone in rat heart. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1136, p. 302–308, 1992.

WEINSTEIN, S. P.; O'BOYLE, E.; HABER, R. S. Thyroid hormone increases basal and insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle. The role of GLUT4 glucose transporter expression. **Diabetes**, v. 43, p. 1185–1189, 1994.

WILLIAMS, L. T.; LEFKOWITZ, R. J. Thyroid hormone regulation of β -adrenergic receptor number. **J. Biol. Chem.**, v. 252, p. 2787-2789, 1977.

WITCZAK, C. A.; FUJII, N.; HIRSHMAN, M.F.; GOODYEAR, L. J. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase- α regulates skeletal muscle glucose uptake independent of AMP-activated protein kinase and Akt activation. **Diabetes**, v. 56, p. 1403 –1409, 2007.

WITTENBERG, J. B. Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle. **Physiol. Rev.**, v. 50, p. 559-636, 1970.

YONEMITSU, S.; NISHIMURA, H.; SHINTANI, M.; INOUE, R.; YAMAMOTO, Y.; MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; HOSODA, K.; INOUE, G.; HAYASHI, T.; NAKAO, K. Troglitazone induces GLUT4 translocation in L6 myotubes. **Diabetes**, v. 50, p. 1093-1101, 2001.

ZIERATH. J. R.; HE, L.; GUMA, A.; ODEGOARD-WAHLSTROM, E.; KLIP, A.; WALLBERG-HENRIKSSON, H. Insulin action on glucose transport and plasma membrane GLUT4 content in skeletal muscle from patients with NIDDM. **Diabetologia**, v. 39, p. 1180-1189, 1996.

ZINMAN T, SHNEYVAYS V, TRIBULOVA N, MANOACH M, SHAINBERG A. Acute, nongenomic effect of thyroid hormones in preventing calcium overload in newborn rat cardiocytes. **J. Cell. Physiol.**, 207:220-31, 2006.

ZORZANO, A.; PALACIN, M.; GUMÀ, A. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. **Acta Physiol. Scand.**, v. 183, p. 43-58, 2005.