

DENIVAL NASCIMENTO VIEIRA JÚNIOR

**EFEITO DO HORMÔNIO TIROIDEANO NA FUNÇÃO CARDÍACA
APÓS INJÚRIA DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM CAMUNDONGOS
COM BLOQUEIO ESPECÍFICO DE NF-kB NO CARDIOMIÓCITO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Morfofuncional

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza de Moraes Barreto-Chaves

**SÃO PAULO
2023**

DENIVAL NASCIMENTO VIEIRA JÚNIOR

***VERSÃO CORRIGIDA**

**EFEITO DO HORMÔNIO TIROIDEANO NA FUNÇÃO CARDÍACA APÓS INJÚRIA
DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM CAMUNDONGOS COM BLOQUEIO
ESPECÍFICO DE NF-kB NO CARDIOMIÓCITO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Morfofuncional

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza de Moraes Barreto-Chaves

SÃO PAULO

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Denival Nascimento Vieira Júnior

Titulo da Dissertação: EFEITO DO HORMÔNIO TIROIDEANO NA FUNÇÃO CARDÍACA APÓS INJÚRIA DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO EM CAMUNDONGOS COM BLOQUEIO ESPECÍFICO DE NF-kB NO CARDIOMIÓCITO

Orientador: Dra. Maria Luiza de Moraes Barreto-Chaves

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o candidato:

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DA SUPRESSÃO CARDÍACA DE NF-KB EM MODELO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO DE ANIMAIS HIPERTIROIDEOS", protocolada sob o CEUA nº 8434020221, sob a responsabilidade de **Maria Luiza Morais Barreto de Chaves** e equipe; *Marina Reingruber Faveiro*; *Denival Nascimento Vieira Júnior* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 13/05/2021.

We certify that the proposal "EFFECT OF CARDIAC NF-KB SUPPRESSION IN HYPERTHYROID MICE ON ISCHEMIA-REPERFUSION MODEL", utilizing 80 isogenics mice (80 males), protocol number CEUA 8434020221, under the responsibility of **Maria Luiza Morais Barreto de Chaves** and team; *Marina Reingruber Faveiro*; *Denival Nascimento Vieira Júnior* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 05/13/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigilância da Proposta: **24 meses**

Depto/Setor: **Anatomia**

Origem: **Biotério Central FMUSP**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade ou peso: **4 a 6 semanas**

Linhagem: **C57BL/6**

N amostral: **40**

Origem: **Biotério do Departamento de Anatomia**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

idade ou peso: **4 a 6 semanas**

Linhagem: **3M (OGM)**

N amostral: **40**

São Paulo, 14 de maio de 2021



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Coroni

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dedico este trabalho ao meu tio Edvan
Evangelista (*in memoriam*), aos meus
pais, à minha família e amigos!

AGRADECIMENTOS

Gratidão ao meu Abba, porque sem Ele, eu nada seria, a sua bondade e o seu amor me alcançou. “Ebenézer, até aqui me ajudou o Senhor!”

Gratidão aos meus pais Elisângela e João, vocês são a minha base, e nem mesmo que por 1 segundo, não conseguiria imaginar a minha caminhada sem a ajuda, o amparo e o amor de vocês. Obrigado! Às minhas irmãs, minhas principais incentivadoras, aquelas que sempre compartilharam comigo, momentos de tristeza, mas, principalmente momentos de felicidades, as que sempre festejaram cada passo meu, mesmo que pequeno, elas estavam ali, compartilhando e comemorando comigo, obrigado a vocês por me darem as alegrias mais lindas, meus sobrinhos. Obrigado!

Agradeço à minha avó Minininha, minha tia Suzy e à minha madrinha Joice, amo vocês, obrigado por tanto. Quero agradecer especialmente à tia Irene, quando cheguei em São Paulo, pensava em voltar para o Nordeste todos os dias, e ela com toda calma e paciência, conversava comigo e me fazia lembrar dos motivos que me fizeram chegar até aqui. Obrigado, tia.

Gratidão aos meus amigos do nordeste, que mesmo de longe, sempre se fizeram presentes, foram meu suporte e acalento nos momentos mais complicados, principalmente quando pensei em desistir, não estava fácil; a canulação da artéria aorta de camundongo me fez repensar muitas vezes sobre os meus planos de vida. Obrigado ao Júnior Costa, a Emyle Horrana, George Guilherme, Gabriela Rocha, Renata Kelly, Igor Palhares, Ingrid Hariel, Vicente Reges, João Victor, Marília Costa, Thaisa Maria, Mayriane Santos, Robert Rhamon, Laiane Monteiro, Priscila da Silva, Kamilla Barros, Gabrieli Batista e Sara Serra.

Meu planejamento na carreira acadêmica iniciou bem lá atrás, quando conheci uma professora chamada Sarah Nilkece, ela me ensinou a dar os primeiros passos na academia, escrever meus primeiros resumos, com muita paciência e com toda competência; ela me ensinou a escrever do resumo simples a um artigo completo. Além disso, quando a conheci, ela foi uma das pessoas que me fizeram acreditar na minha profissão, não somente como arte, mas como ciência. Estendo ainda esses agradecimentos a outros professores que encontrei ao longo da caminhada, que me ajudaram a construir o Denival de hoje. Obrigado professores Iolanda (*in memoriam*), Amenaide, Fredson, Anaide, Inara Sena, Andressa Suely, Emidio Matos, Ana Larissa, Itallo Rossi, Rumão Carvalho e Antonio Mendes vocês não fazem ideia de como

impactaram a minha vida pessoal e profissional.

O meu apego e interesse pela Anatomia se iniciou lá em 2016, quando cheguei ao interior do Piauí e comecei a cursar Enfermagem. Tive o privilégio de conhecer o grande Prof. Dr. Jodonai Barbosa; ele me mostrou uma oportunidade, e eu a agarrei. Iniciamos a primeira liga oficialmente registrada na UFPI, a Liga Acadêmica de Anatomia Humana da UFPI, e estou aqui hoje, finalizando o Mestrado no Departamento de Anatomia da 85ª melhor Universidade do Mundo. Tenho grande admiração por você, meu amigo, quando eu crescer quero ser igual a você; lembro-me de uma frase que você colocou em uma avaliação "Tu és o rastro que deixas." Obrigado por contribuir e apostar em mim.

A minha chegada ao Departamento de Anatomia foi diretamente culpa da profa. Dra. Kássia Oliveira (UFPE), à época, profa. do curso de Nutrição da UFPI; tive o privilégio de fazer parte do seu projeto de extensão Anatomia nas Escolas. Um belo dia, conversando, ela me falou da JANATO USP; me inscrevi, fui selecionado e participei das duas semanas mais interessantes que tive durante a minha formação. Obrigado Profa. Kássia, talvez se você não tivesse passado pela UFPI, eu não estivesse aqui.

Agradeço ao Dr. Márcio Ribeiro (Marcinho), despretensioso eu falei contigo, você me escutou e me deu a oportunidade de acompanhá-lo na sua rotina de laboratório por uma semana, após a JANATO 2018. Obrigado, meu amigo, através de você, conheci o Prof. Dr. Júlio Ferreira (USP) que abriu as portas do seu laboratório para que eu fizesse um estágio fragmentado durante as minhas férias, nunca imaginei que um simples convite para acompanhar uma cirurgia experimental no laboratório mudaria os rumos da minha vida. Obrigado!

Agradeço ao Dr. Luiz Bechara, por toda disponibilidade e conversas, antes e depois que entrei na pós-graduação; agradeço ainda ao Dr. Luiz Bozi por me oportunizar o primeiro contato com canulação de artéria aorta de camundongos; nunca imaginei que anos depois eu estaria canulando e ensinando outras pessoas.

Gratidão ao meu co-orientador Prof. Dr. Ivson Bezerra (UFPB), sem a sua ajuda, a sua paciência em me ensinar, responder cada dúvida, estar disposto mesmo que à distância para atender chamadas de vídeo, ver vídeos, até aos domingos, reuniões depois das 22:00 horas (quando colocava seus filhos para dormir); tenho grande admiração e apreço por você, você é uma pessoa incrível, desejo que Deus o

abençoe grandiosamente. Obrigado!

Agradeço à Dra. Naira Mansano, pelas conversas, pelo carinho e por me deixar acompanhá-la na sua rotina de laboratório, quando ainda estava tendo os primeiros contatos com o ICB; você não faz ideia de como nossas conversas direcionaram minhas decisões. Agradeço ainda à Profa. Dra. Renata Frazão (USP) por abrir as portas do seu laboratório para acompanhar a rotina de laboratório e conhecer um pouco mais da sua linha de pesquisa, em 2018.

Agradeço ao Dr. Denicio Gonçalves, por todas as conversas e momentos de discussão anatômica e de dissecação, obrigado meu amigo. Agradeço ainda a toda equipe do Museu de Anatomia Humana da USP, por toda acolhida e disponibilidade no período em que fiz parte do Conselho Gestor do MAH.

Às comissões das quais fiz parte, a todos os colegas e professores que tive a oportunidade de partilhar momentos ricos de discussão: Comissão de Acolhimento à Comunidade do ICB; Congregação do ICB; Grupo de Apoio Pedagógico do ICB. Agradeço ainda às minhas supervisoras do PAE, minha orientadora Profa. Dra. Maria Luiza, com quem aprendi muito sobre anatomia geral e, principalmente, sobre o Sistema Urinário. À Profa. Dra. Patrícia Castelucci, com quem tive a grande oportunidade de trocar conhecimentos sobre o Sistema Digestório; e à Profa. Dra. Ana Takano, com quem tive a oportunidade de trocar muito conhecimento, para além da anatomia humana, obrigado!

Aos meus colegas de laboratório, amigos de cafés e bandejões: Henrique Vieira, Maria Eduarda, Pedro Henrique, Amanda Almeida, Mayara Mendonça e Roberta Figueiroa. Gratidão a todos os colegas que estão e passaram pelo Laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional (LBCAF): Wenddy Sougey, Eloisa Olher, Beatriz Almeida, Joice Mota, Camila Balbino, Carol Lino, Karine Panico, Felipe Saltão, Vanessa Lima, Guilherme Lunardon e Juliana Braga. À profa. Dra. Gabriela Placoná por todas as conversas e conselhos e trocas de conhecimento, obrigado professora!

À Andrea Bandeira, uma amiga pela qual tenho uma eterna gratidão e admiração; lembro-me de quando estávamos frequentando as reuniões do LBCAF e a gente sempre se reunia antes para discutir e tirar dúvidas um do outro, por todas as conversas e conselhos; que Deus esteja sempre te guiando. Gratidão às pessoas que o Senhor foi misericordioso em colocar em minha vida, as quais me ajudaram, não só

profissionalmente, mas na vida pessoal também; vocês fazem parte da minha família: Lisley Ramalho, Larissa Zacarias, Marcos Antônio, Tabatha Oliveira, Mariana Makuch, Leticia Urçulino, Augusto César, Rafael Pimentel, Vinicius Afonso e Danilo Guimarães.

À Dra. Nathalia Senger, pessoa de uma ética e conhecimento admirável; te admiro e me inspiro em você, minha amiga. Obrigado por se dispôr em contribuir tanto com esse trabalho, você é uma pessoa ímpar, com quem, tive a sorte de compartilhar não somente os perrengues da canulação e inserção de balonete, como também conhecer a sua linda família; te desejo sempre todo sucesso possível.

À Marina Fevereiro, minha eterna gratidão, você é sem dúvidas uma das maiores pessoas que eu já conheci, obrigado por todo conhecimento, broncas e risadas compartilhadas, obrigado por iluminar meus dias com seu afeto, sou grato por fazer parte da sua família. Às minhas amigas Claudia Gasparini e Dunia Waked; vocês não imaginam o quanto foram importantes nesse processo; obrigado por tudo e por tanto!

Um parágrafo especial para minha duplinha, minha amiga e irmã, serei eternamente grato a Deus pela sua misericórdia em escolher você para me acompanhar nesse processo de formação, obrigado por me incentivar, puxar minha orelha, dar conselhos e ensinar sempre que pedia; você é uma das minhas inspirações, Aline Cristina. Sou grato por você e sua família fazerem parte da minha vida.

Gratidão à principal responsável por fazer tudo isso acontecer, aquela que tem me ensinado a trilhar meu caminho na ciência, minha orientadora Profa. Dra. Maria Luiza de Moraes Barreto-Chaves, um ser humano incrível, uma profissional admirável. Obrigado professora, por muitas vezes me mostrar o caminho, pelas vezes que me deixou fazer minhas próprias escolhas, pelas vezes que me incentivou, que me deu broncas e, principalmente, por nunca ter me deixado desistir. Eu tenho um sentimento enorme de gratidão; a senhora é um exemplo a ser seguido. OBRIGADO POR TUDO E POR TANTO.

À Patrícia Rocha, a melhor secretária e uma pessoa excelente e paciente; muito obrigado por todas as orientações e cuidado! A todos os animais de experimentação que utilizei para a realização desse estudo. Obrigado! Aos profissionais técnicos, bioteristas e terceirizados, muito obrigado!

AGRADECIMENTO A AGÊNCIA DE FOMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

*“Eu sou de uma terra que o povo padece
Mas não esmorece e procura vencer...”
_ Patativa do Assaré.*

RESUMO

As doenças da tireoide estão intimamente relacionadas a alterações na função e estrutura cardíaca. O hipertireoidismo induz hipertrofia cardíaca (HC) como resposta compensatória, mas pode evoluir para um fenótipo descompensado com comprometimento do relaxamento cardíaco e arritmias. A lesão de isquemia-reperfusão miocárdica (I-R) está associada à morte de cardiomiócitos, o que resulta em comprometimento funcional. Alguns estudos mostram que o hipertireoidismo melhora a função contrátil do coração após injúria por I-R, em ratos e camundongos. Anteriormente, nosso grupo demonstrou que a ativação da via TLR4/MyD88/NF- κ B é crucial para a hipertrofia cardíaca observada no hipertireoidismo, porém o papel do NF- κ B na função cardíaca ainda não foi elucidado. O objetivo deste estudo é avaliar o papel do NF- κ B na função cardíaca de camundongos hipertireoideos, após lesão por I-R. Os protocolos experimentais foram aprovados conforme Comitê de Ética Animal do Instituto de Ciências Biomédicas – USP (nº 8434020221). Camundongos machos jovens (C57BL/6NTac ou 3M) foram tratados com T3 (7ug/100g) por 14 dias, intraperitoneal. O modelo de perfusão de coração isolado foi utilizado para avaliar a função cardíaca. Após o tratamento, o coração foi removido e perfundido em sistema Langendorff e os parâmetros cardíacos (LVDP; dP/dt+, dP/dt-, frequência cardíaca e pressão de perfusão) foram registrados continuamente, seguindo o protocolo de 30 minutos de estabilização, 20 minutos de isquemia e 45 minutos de reperfusão. Os dados foram analisados por ANOVA de dois fatores ou teste t de Student e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Foi comprovada a funcionalidade do modelo animal, através da expressão gênica das interleucinas IL-1B e IL-10, genes alvos para o NF- κ B, após estímulo com LPS. Os animais tratados com T3 desenvolveram hipertrofia cardíaca independente da ativação ou não do NF- κ B. Por fim, foi observado uma possível relação entre a ativação do NF- κ B e alterações do cronotropismo cardíaco, nos animais hipertireoideos.

Palavras-chave: Hormônios tireoidianos; Hipertrofia cardíaca; Modelo de I/R; Função cardíaca, NF- κ B.

ABSTRACT

Thyroid diseases are closely related to changes in cardiac function and structure. Hyperthyroidism induces cardiac hypertrophy (CH) as a compensatory response, but it can evolve into a decompensated phenotype with relaxation impairment and arrhythmia. The myocardial ischemia-reperfusion (I-R) injury is associated with cardiomyocyte death and necrosis, which results in functional impairment. Some studies show that hyperthyroidism improves the contractile function of the heart after I-R in rats and mice. Previously, we demonstrated that activation of TLR4/MyD88/NF- κ B pathway is crucial to cardiac hypertrophy observed in the hyperthyroidism, however the role of NF- κ B in the cardiac function has not yet been elucidated. To evaluate the role of NF- κ B in the cardiac function of hyperthyroid mice after I-R injury. Experimental protocols were approved according to the Animal Ethics Committee of the Institute of Biomedical Sciences – USP (number 8434020221). Male mice (C57BL/6NTac or 3M strain containing NF- κ B specific inactivation in the cardiomyocyte) were treated with T3 (7ug/100g) for 14 days (intraperitoneal, n=5-8). The perfusion model of isolated heart was used to evaluate cardiac function. After treatment, the heart was removed and perfused in a Langendorff system and cardiac parameters: Left ventricular developed pressure (LVDP); +dP/dt, -dP/dt, heart rate (HR) and perfusion pressure (PP) were continuously recorded following the protocol of 30 minutes of stabilization, 20 minutes of ischemia and 45 minutes of reperfusion. Data were analyzed by two-way ANOVA or Student's t test and $p < 0.05$ was considered statistically significant. The functionality of the animal model was proven, through gene expression of interleukins IL-1B and IL-10, target genes for NF- κ B, after LPS treatment. Animals treated with T3 developed cardiac hypertrophy regardless of NF- κ B activation or not. Finally, a possible relationship was observed between NF- κ B activation and changes in cardiac chronotropism in hyperthyroid animals.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via clássica de sinalização do NF-kB (via canônica)	26
Figura 2. Produtos da reação de PCR, na genotipagem dos animais 3M.....	30
Figura 3 – Expressão de RNAm para IL1B e IL-10, expresso no tecido cardíaco, após ativação de NF-kB (administração de LPS).....	36
Figura 4 – Níveis séricos de tireotrofina (TSH) nos grupos experimentais.....	37
Figura 5 - Acompanhamento da massa corpórea (g) dos animais nos diferentes grupos experimentais, ao longo do tratamento	38
Figura 6 - Análise do trofismo cardíaco, avaliado sobdiferentes parâmetros	39
Figura 7 – Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP), nos experimentos de coração isolado.....	41
Figura 8 – Primeira derivada positiva de pressão por tempo (+dP/dt).....	42
Figura 9 – Primeira derivada negativa de pressão por tempo (-dP/dt).....	43
Figura 10 - Frequência cardíaca (FC).....	45
Figura 11 – Pressão de perfusão.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Sequência dos primers utilizados em camundongos.....	35
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

HT - hormônios tireoidianos

T3 – triiodotironina

T4 – tiroxina

TSH – tireotrofina

NF-KB – fator de transcrição nuclear kappa B

IkB – proteína inibitória do NF-kB

IKK – quinase da IκB

TLR4 – receptor toll like 4

MyD88 – fator de diferenciação mielóide 88

LPS – lipopolissacarídeo

TNF – fator de transcrição tumoral

IL-1B - interleucina 1 beta

IL-10 – interleucina 10

HC – hipertrofia cardíaca

BNP – peptídeo natriurético cerebral

FC – frequência cardíaca

DC – débito cardíaco

VE – ventrículo esquerdo

PA – pressão arterial

PAS – pressão arterial sistólica

PAD – pressão arterial diastólica

LVDP – pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo

+dP/dt - primeira derivada positiva de pressão ventricular

-dP/dt – primeira derivada negativa de pressão ventricular

Ang II – angiotensina II

DNA – ácido desoxirribonucleico

RNA – ácido ribonucleico

I-R – isquemia-reperfusão

IAM – infarto agudo do miocárdio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Função Cardíaca e Hormônios Tiroideanos	19
1.2 Injúria por Isquemia-Reperfusão (I-R)	22
1.3 Factor Nuclear kappa B (NF-kB)	25
2 OBJETIVO	27
2.1 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Animais e Grupos Experimentais	28
3.1.1 Camundongos Geneticamente Modificados (3M).....	28
3.1.2 Grupos Experimentais	29
3.2 Genotipagem por Reação em Cadeia de Polimerase.....	29
3.2.1 Coleta de tecido e extração do DNA	29
3.2.2 Reação de PCR e Gel de Agarose.....	29
3.3 Validação do modelo experimental	30
3.4 Indução ao Hipertireoidismo	30
3.5 Dosagem de hormônios tiroidianos	31
3.6 Análises Morfológicas	31
3.6.1 Determinação do trofismo cardíaco	31
3.6.2 Avaliação Histológica	31
3.7 Análises Funcionais.....	31
3.7.1 Preparação do Coração Isolado.....	32
3.7.2 Aquisição de dados de Função Cardíaca.....	32
3.7.3 Função ventricular esquerda	33
3.7.4 Pressão de Perfusão	33
3.8 Análises moleculares.....	33
3.8.1 Análise de expressão gênica	34
3.8.1.1 Extração do RNA e preparação do cDNA.....	34
3.8.1.2 PCR em Tempo Real (RT-PCR)	34
3.9 Análise estatística	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Validação do modelo animal (camundongos 3M)	36
4.2 Validação do modelo experimental	36

4.2.1 Dosagem sérica de tireotrofina (TSH)	36
4.2.2 Acompanhamento da massa corporal.....	37
4.2.3 Análise do trofismo cardíaco, em resposta ao hipertireoidismo experimental	38
4.3 Papel da supressão do NF-kB nos parâmetros de função cardíaca de coração isolado	39
4.3.1 Parâmetros de função cardíaca	40
4.3.1.1 Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP)	40
4.3.1.2 Primeira derivada positiva de pressão ventricular esquerda (+dP/dT) ..	41
4.3.1.3 Primeira derivada negativa de pressão ventricular esquerda (-dP/dT) ..	42
4.3.1.4 Frequência cardíaca (FC).....	44
4.3.1.5 Pressão de Perfusão	45
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Função Cardíaca e Hormônios Tiroideanos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019), as doenças isquêmicas do coração são as principais causas de morte no mundo, sendo responsáveis pela morte de 8,9 milhões de pessoas ao redor mundo (16% do número total de mortes por ano). Assim, a investigação mais aprofundada de mecanismos celulares e moleculares que possam estar envolvidos à instalação ou manutenção dessas doenças cardiovasculares, visando a sua atenuação e/ou prevenção, ainda correspondem a um foco importante de estudo na atualidade.

O sistema cardiovascular é constituído pelo coração, um órgão muscular capaz de gerar pressão e por uma vasta rede vascular, que oferece resistência e permite o estabelecimento do fluxo sanguíneo. O coração funciona como uma bomba e trabalha de forma cíclica, de modo que cada ciclo cardíaco é composto basicamente pela contração (sístole) e relaxamento (diástole) dos ventrículos. A cada ciclo cardíaco, o ventrículo esquerdo ejeta um volume de sangue, sendo o volume ejetado por minuto representado pelo débito cardíaco (DC). Do ponto de vista matemático, o DC corresponde ao volume sistólico (VS) x frequência cardíaca (FC), sendo, portanto, o DC influenciado por esses dois parâmetros. O VS é o volume de sangue bombeado pelo coração após uma sístole, e esse volume refere-se aos dois ventrículos (volume de sangue ejetado do ventrículo direito para os pulmões e o sangue ejetado do ventrículo esquerdo para o organismo). Já a FC corresponde ao número de ciclos cardíacos por minuto (GRUZDEVA, *et al.*, 2019; SEO, *et al.*, 2020; PARK, *et al.*, 2019; ROSSIGNOL, *et al.*, 2019; VOORHEES; HAN, 2015).

Do ponto de vista da rede vascular, esta irriga e drena o sangue dos órgãos periféricos, garantindo a sua perfusão, e encontra-se sob regulação de mecanismos capazes de manter o suprimento adequado ao tecido, mesmo em condições de estresse (NAKAMURA; SADOSHIMA, 2018; VOORHEES; HAN, 2015).

Ao falar em função cardíaca, faz-se referência à capacidade que o coração apresenta de atender às demandas metabólicas do corpo, e assim possibilitar a condição de homeostase. A entrega de sangue oxigenado e a remoção de resíduos celulares são fundamentais para a vida (CARRERO, 2009). Fatores de origem neural, mecânica e hormonal (ou endócrina) podem alterar os parâmetros que determinam a função cardíaca. No que se refere aos fatores neurais, o sistema nervoso autônomo pode modular a função cardíaca principalmente através dos receptores beta-

adrenérgicos, sendo que o aumento da atividade desses receptores no coração leva ao aumento do trabalho cardíaco (POLAK-IWANIUK, *et al.*, 2019; HUANG, *et al.*, 2019; TSIBULNIKOV, *et al.*, 2019).

No coração, estão presentes receptores adrenérgicos do tipo beta-1, beta-2 e beta-3, sendo a expressão de beta-1 a predominante (75-80% do número total de receptores beta-adrenérgicos cardíacos) (WOO; XIAO, 2012). Além disso, o aumento das catecolaminas atua promovendo aumento do cálcio intracelular e sódio extracelular, levando à redução do tempo de relaxamento do ventrículo e aumento de sua força de contração, o que contribui diretamente com o aumento da FC (citado por REHMAN, *et al.*, 2022)

Fatores mecânicos relacionam-se, por exemplo, com o aumento do volume sanguíneo que chega aos ventrículos e pode sobrecarregar o coração, promovendo alterações estruturais e funcionais cardíacas. Assim, como fatores mecânicos encontram-se os relacionados a alterações hemodinâmicas, uma vez que o aumento do volume sanguíneo que chega ao ventrículo, pode acarretar na distensão sarcomeral e assim, sobrecarregar o coração. Além disso, o aumento da resistência vascular também pode influenciar na sobrecarga cardíaca, um exemplo clássico dessas alterações pode ser observado em indivíduos diagnosticados com hipertensão arterial sistêmica (GRUZDEVA, *et al.*, 2019; SEO, *et al.*, 2020; PARK, *et al.*, 2019; ROSSIGNOL, *et al.*, 2019; VOORHEES; HAN, 2015).

Quanto aos fatores humorais, diversos hormônios podem modular a função cardíaca, dentre eles, podemos destacar os hormônios tireoidianos, os quais vêm sendo objeto de estudo de nosso grupo já há algum tempo. Quando presentes na circulação em níveis fora da faixa de normalidade, seja abaixo (hipotireoidismo) ou acima (hipertireoidismo), são capazes de aumentar o fator de risco para o desenvolvimento e a progressão das doenças cardiovasculares (PANTOS *et al.*, 2007; SCHMIDT-OTT, ASCHEIM, 2006).

A glândula tiroide foi descrita pela primeira vez em 1656 por Thomas Warton. Essa glândula é responsável pela produção, armazenamento e secreção dos hormônios tireoidianos. A biossíntese desses hormônios é dependente do eixo hipotálamo-hipófise-tiroide, e regulado pelo mecanismo de *feedback* negativo. O hormônio liberador de tireotrofina hipotalâmico (TRH) estimula a produção do hormônio estimulante da tiroide (TSH) pela glândula adenohipófise que estimula a glândula tiroide a secretar os hormônios tireoidianos, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). Cerca de

90% de todo hormônio produzido corresponde ao T4, no entanto, o T4 pode ser convertido em T3 por ação de desidases presentes em diversos tecidos, sendo o T3 a forma que exerce maior atividade biológica no organismo (BRENT, 1994; ZANG, 2000; NUNES, 2003; CHIAMOLERA, 2009).

Já foi descrito na literatura que esses hormônios tem como principal órgão-alvo o coração, em função da expressão e atividade de seus receptores nas células cardíacas, estando as suas ações associadas aos níveis circulantes desses hormônios. Quando aumentados, esses hormônios promovem, entre outros efeitos, a sobrecarga hemodinâmica no organismo, que acaba cooperando com o aumento da massa muscular cardíaca ou hipertrofia cardíaca (KLEIN; OJAMAA, 2001). Além disso, o T3 tem a capacidade de agir diretamente sobre os cardiomiócitos, regulando a transcrição de diversos genes e aumentando a síntese de proteínas intracelulares, o que resulta no aumento de volume da célula (KLEYN; LEVEY, 1984), bem como, tem ações diretas sobre os parâmetros de função cardíaca.

As ações que os HT exercem sobre o coração podem ser classificadas de duas formas, ações genômicas e não genômicas. As ações genômicas ocorrem após essas moléculas atingirem o núcleo das células e se ligarem a sequências específicas do DNA, denominadas de TREs, ou elementos específicos aos hormônios tireoideanos. Como consequência dessa ligação, os HT deflagram alterações na transcrição gênica de gene alvos que codificam proteínas específicas, como, por exemplo, a expressão de proteínas miofibrilares, como as miosinas de cadeia pesada do tipo alfa-MHC e beta-MHC, as quais se encontram diretamente associadas à contração cardíaca. Esse mecanismo, até à síntese da proteína, acontece no período de horas (DAVIS et al., 2000; DAVIS e DAVIS, 2002; KAHALY; DILLMANN, 2005; DAVIS *et al.*, 2007).

No entanto, existem ações dos HT que acontecem mais rapidamente, a partir de segundos e/ou minutos, as ações não-genômicas. Essas ações acontecem sem que haja a translocação dos HT para o núcleo, podendo ser mediadas tanto por receptores de membranas, como receptores citoplasmáticos, sendo que esses efeitos não são alterados por inibidores de transcrição ou tradução (síntese proteica). Como exemplo de ações não-genômicas, algumas vias de sinalização já foram descritas, como a das MAPK/ERK 1/2 e a via de sinalização da AMPK (DAVIS e DAVIS, 2002; BERGH, *et al.*, 2005; DE VITO, *et al.*, 2012; TAKANO; DINIZ; BARRETO-CHAVES, 2013).

Alterações no estado da tireoide podem influenciar a atividade elétrica e contrátil cardíaca; essas alterações podem culminar em distúrbios cardiovasculares relevantes. Quando em situação de hipertireoidismo, são observados sintomas cardíacos e hemodinâmicos, como palpitações, aumento da pressão de pulso, dispneia ao esforço, taquicardia, intolerância ao exercício e fibrilação atrial (FA) (YAMAKAWA, *et al.*, 2021; DAHL, *et al.*, 2008). Um efeito do HT nos cardiomiócitos é controlar a contratilidade cardíaca e a fração de ejeção. A contratilidade cardíaca, assim como a frequência cardíaca em repouso, sofrem alterações de acordo com os níveis de HTs. Assim, o débito cardíaco pode aumentar de 50 a 300% no hipertireoidismo em comparação com o normal. Este aumento do débito cardíaco é baseado em efeitos sinérgicos de aumento da frequência cardíaca, aumento da contratilidade cardíaca e dilatação dos vasos sanguíneos periféricos (BIONDI, *et al.*, 2002).

Além dos efeitos diretos sobre parâmetros de função, os HTs atuam regulando positivamente a expressão de genes codificam proteínas envolvidas na mecânica cardíaca, como a cadeia pesada de α -miosina (cadeia pesada de miosina 6; codificada por MYH6) e cálcio sarcoplasmático (SERCA2; codificada por ATP2A2) e regulam negativamente a transcrição da cadeia pesada de β -miosina (cadeia pesada de miosina 7; codificada por MYH7) e fosfolambam (YAMAKAWA, *et al.*, 2021; HE, *et al.*, 1997; KAASIK, *et al.*, 1997; HOLT, *et al.*, 1999).

Embora alguns trabalhos venham sugerindo a utilização dos HTs como agentes cardioprotetores, em função das suas ações relacionadas ao aumento da contratilidade cardíaca, por outro lado, os efeitos sobre a atividade elétrica, levando ao aumento da frequência cardíaca e à maior incidência de arritmias, deve ser considerado. Neste sentido faz-se necessário o entendimento dos mecanismos envolvidos nesses efeitos arritmicos, a fim de reduzir e/ou saná-los, além disso, é importante avaliar como o coração se comporta frente a diferentes agentes estressores, como por exemplo, a lesão provocada por I-R.

1.2 Injúria por Isquemia-Reperfusão (I-R)

As doenças cardiovasculares, entre elas aquelas relacionadas à deficiência da irrigação do tecido cardíaco (isquemia), levando ao infarto agudo do miocárdio, ainda correspondem atualmente a uma das principais causas de óbito na população em geral (LINDSEY, *et al.*, 2018; MENSAH, *et al.*, 2019). A isquemia miocárdica é

resultante de um comprometimento do fluxo sanguíneo coronariano, gerado a partir de um desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio. Em teoria o processo é bastante simples, a falta de oxigenação e de substratos metabólicos adequados diminui rapidamente a energia disponível para a célula, levando à lesão celular, que pode ser de natureza reversível ou irreversível. Na prática, o processo é muito complexo, uma vez que a extensão da lesão é determinada por uma gama de fatores, como: gravidade da isquemia (baixo fluxo versus fluxo zero), duração da isquemia, sequência temporal da isquemia (isquemia curta seguida de isquemia longa), mudanças no ambiente físico e metabólico (normotemia versus hipotermia; conteúdo de glicogênio no miocárdio antes da isquemia, composição do perfusato), bem como a resposta inflamatória (COKKINOS, *et al.*, 2006).

Terapias de reperfusão coronária, por sua vez, são estabelecidas ainda nos dias de hoje como o “padrão-ouro” para o tratamento do infarto agudo do miocárdio (LU, *et al.*, 2020) e representam um pré-requisito para a sobrevivência do tecido. No entanto, estudos clínicos e experimentais também evidenciam que, embora essas terapias sejam necessárias ao reestabelecimento do fluxo sanguíneo ao miocárdio, a reperfusão pode não recuperar a função e morfologia cardíacas, como ainda promover uma lesão mais intensa, com a ocorrência de hipóxia e aumento de radicais livres, além de inflamação (KOEPPEN, *et al.*, 2018; IBAÑEZ, *et al.*, 2015, ALGOET, *et al.*, 2022).

Vale contextualizar que a lesão de isquemia e reperfusão miocárdica (I/R) foi descrita pela primeira vez por Jennings e cols., em 1960, utilizando um coração canino como modelo de ligadura coronária. Naquele estudo, os autores observaram que a reperfusão parecia acelerar o desenvolvimento da necrose, uma vez que, após 30-60 minutos de I/R, o perfil necrótico já era similar àquele normalmente observado após 24 horas de oclusão coronariana permanente (JENNINGS, *et al.*, 1960). Portanto, a reperfusão miocárdica pode agravar ainda mais a morte de cardiomiócitos isquêmicos em animais ou pacientes com infarto do miocárdio. Além dos aspectos cardíacos, o restabelecimento do fluxo sanguíneo após um evento isquêmico ocorre de modo não uniforme, resultando numa restauração “caótica” do fluxo tissular, que leva a um círculo vicioso de disfunção endotelial vascular, redução da perfusão local, edema, ruptura de membranas celulares seguida de apoptose, entre outras complicações, para diferentes tecidos, além da intensificação da resposta inflamatória (EVORA, *et al.*, 1996).

É importante ressaltar que, de modo geral, o coração também possui diferentes mecanismos intrínsecos contra essas lesões, mecanismos estes deflagrados em consequência de breves episódios isquêmicos que ocorrem ao longo da vida, o pré-condicionamento isquêmico. Ao longo dos últimos anos, diferentes estudos sobre fenótipos de maior tolerância contra I-R tornaram-se importante ferramenta na busca de evidências sobre a resposta adaptativa do coração a esse estresse. Apesar do rápido progresso em estudos farmacológicos e no papel da atividade física com potencial cardioprotetor, os efeitos clínicos que se tem conhecimento até o momento ainda demandam maior conhecimento nessa área.

Os HTs desempenham um papel importante na resposta do coração à isquemia. Neste sentido, estudos utilizando ratos como modelo animal demonstraram, em experimentos de coração isolado (Langendorff), que os HT exercem um efeito cardioprotetor bastante similar àquele observado com o pré-condicionamento, ou seja, melhoram a recuperação da função cardíaca pós-isquemia (PANTOS, *et al.*, 2002). Pelo menos em parte, esse efeito protetor poderia ser explicado pelas várias ações que os HT apresentam sobre o metabolismo cardíaco, uma vez que, durante a isquemia, se observa diminuição do ATP, redução da produção do lactato e, em menor grau, diminuição do pH, nos corações hipertiroideos (BUSER, *et al.*, 1990; BAK, *et al.*, 2003). Esses efeitos podem ser atribuídos à diminuição dos níveis de glicogênio do miocárdio, que ocorrem como consequência ao pré-tratamento crônico com T3 (PANTOS, *et al.*, 2004).

É interessante observar que alguns estudos demonstraram que a combinação dessas duas intervenções (tratamento com HT e o pré-condicionamento) potencializaram a recuperação pós-isquêmica (KOLOCASSIDES, *et al.*, 1999; PANTOS, *et al.*, 1999). Com base nessas evidências, foi então proposto à época que a diminuição dos níveis de glicogênio no miocárdio, antes da isquemia, influenciam a resposta funcional cardíaca dos corações hipertiroideos, durante a injúria de I-R. Hoje se sabe que, além dos aspectos puramente metabólicos, deflagrados pelo tratamento com os HT, o hipertiroidismo se caracteriza ainda por promover aumento da expressão de proteínas contráteis, indução de angiogênese, e, principalmente, intensa vasodilatação; ações todas importantes para os efeitos descritos.

Nesse sentido, estudos do nosso grupo, utilizando o modelo de I-R, demonstraram que o tratamento com T3, além de induzir significativa hipertrofia cardíaca, promoveu melhora da função contrátil do músculo cardíaco, em resposta ao

estresse isquêmico em ratos (TAVARES, *et al.*, 2013) e em camundongos (SILVA, *et al.*, 2017). Ainda, o tratamento com T3 induziu à recuperação (de até 100%) de parâmetros como LVDP, o qual representa a função ventricular esquerda (contratilidade), após três diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos), em relação ao grupo controle (SILVA, *et al.*, 2017). No entanto, vale ressaltar que, se por um lado se observa um efeito positivo no que tange à contratilidade cardíaca, por outro, são frequentes os episódios de arritmia cardíaca, o que pode comprometer a função do órgão.

Ainda na linha dos progressos atuais para o entendimento da patogênese da isquemia miocárdica, a prevenção e a redução da injúria de I-R vem sendo considerada como um dos “hotspots” na área da pesquisa em doenças cardiovasculares (DONG, *et al.*, 2022). Vários estudos farmacológicos recentes têm mostrado que a ocorrência de inflamação e hipóxia, além dos fatores já citados, parecem ter um papel-chave na injúria de I-R (DONG, *et al.*, 2022). Neste contexto, o fator nuclear kappa B (NF-κB) é o fator de transcrição mais importante e bem estudado, agindo como um “hub” central no citoplasma, integrando sinais da superfície celular a sensores intracelulares (ZHANG, *et al.*, 2017; MULERO, *et al.*, 2019), responsáveis por regular a indução e a progressão da resposta inflamatória. A inibição da atividade do NF-κB e de suas vias de sinalização, as quais incluem moléculas associadas a dano celular, podem proteger os cardiomiócitos de lesão por I-R, melhorando o prognóstico da doença (YE, *et al.*, 2019; WANG, *et al.*, 2020).

1.3 Factor Nuclear kappa B (NF-κB)

O fator nuclear kappa B (NF-κB) foi descoberto por Sen e Baltimore, em 1986, e desde então vem sendo relacionado a diferentes funções celulares, tanto em situações fisiológicas como patológicas. A família NF-κB consiste em 5 membros: p50/p105 (NF-κB1), p52/p100 (NF-κB2), p65 (RelA), RelB e c-Rel. Esses 5 membros formam homo ou heterodímeros, sendo o heterodímero p50/p65 o mais abundante e responsável pela maior parte da atividade transcricional canônica do NF-κB (GORDON; SHAW; KIRSHENBAUM, 2011; SATOU, *et al.*, 2010).

Classicamente, o NF-κB (p50-p65) está presente de forma inativa no citoplasma, formando um complexo com uma proteína inibitória da família IκB. Embora existam sete membros conhecidos da família das proteínas IκB, a regulação da atividade do NF-κB é mais frequentemente mediada pelas duas isoformas que são

mais comuns: I κ B α e I κ B β (BROWN et al., 2005; JONES, et al., 2005).

A ativação do NF- κ B se dá pela degradação de I κ B, mediada por sua quinase IKK; essa quinase fosforila I κ B, levando à sua subsequente degradação, o que resulta na liberação do NF- κ B, que transloca para o núcleo, onde regula a expressão de vários genes alvos, como genes relacionados à inflamação (IL-1 β , IL-6) (GHOSH; BALTIMORE, 1990; GUPTA, *et al.*, 2002). Assim, na via canônica de ativação do NF- κ B, o I κ B- α é fosforilado no resíduo serina (Ser)32,36 e/ou Tyr42 e separado do dímero p50/p65, permitindo que o dímero seja translocado para o núcleo e se ligue a sequências específicas do DNA (Figura 1) (BRASIER, A. R., 2006; KUMAR, *et al.*, 2013).

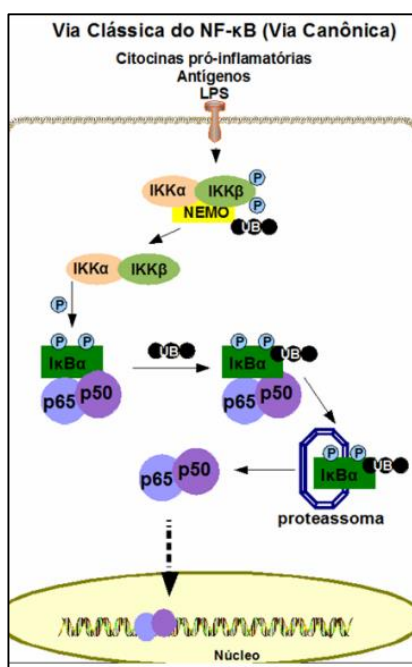


Figura 1 – Via clássica de sinalização do NF- κ B (via canônica). (FRANCO, D. G., 2010).

Recentemente, tem sido descrito que padrões moleculares associados a dano celular, também conhecidas como DAMPS, levam à injúria de I-R por ativar o NF- κ B. Uma vez ativado, este fator induz a transcrição de componentes do inflamassoma NLRP3 nas células cardíacas (DAVIDSON, *et al.*, 2020). O NLRP3 induz a morte dos cardiomiócitos logo nas primeiras horas de reperfusão, através da indução da inflamação e produção de IL-1 β (MEZZAROMA *et al.*, 2011; TOLDO *et al.*, 2019). Além disso, o NF- κ B também demonstrou estar envolvido com a alteração da função cardíaca após infarto agudo do miocárdio (IAM), contribuindo para a ocorrência de arritmias, as quais podem estar associadas à inflamação mediada por TLR4/NF- κ B e

hiperativação simpática, o que contribui para diminuída fração de ejeção cardíaca. Após a inibição de TLR4/NF- κ B, a incidência de arritmias pós infarto diminui significativamente (WANG, *et al.*, 2022; WANG, *et al.*, 2019).

Os principais mecanismos associados ao agravamento do IAM mediado pela via TLR4/NF- κ B incluem inflamação, estresse oxidativo, piroptose e apoptose (LI, *et al.*, 2020; WANG, *et al.*, 2019; CHEN, *et al.*, 2021; SU, *et al.*, 2018).

Em trabalho recente do nosso grupo observamos que o NF- κ B mostrou-se ativado em corações de animais hipertiroideos, assim como em culturas isoladas de cardiomiócitos tratados com T3 (TAKANO, *et al.*, 2017). A ativação do NF- κ B foi associada a aumento da calgranulina, uma DAMP que após secretada do cardiomiócito, se liga aos receptores TLR4 ativando o NF- κ B. A ativação deste fator foi determinante para o aumento da síntese proteica no cardiomiócito, bem como para o ganho de massa muscular induzida pelos hormônios tiroideanos. O potencial papel do NF- κ B sobre parâmetros de função cardíaca em condições normais ou após injúria de I-R, no hipertiroidismo, não foi ainda explorado na literatura e é neste contexto que o presente estudo pretende contribuir.

2 OBJETIVO

Avaliar a contribuição do fator nuclear kappa B (NF- κ B) nas ações cardíacas deflagradas pelos hormônios tiroideanos.

2.1 Objetivos específicos

Em camundongos com inibição seletiva da atividade cardíaca de NF- κ B no cardiomiócito (animais 3M), avaliar:

- O remodelamento cardíaco induzido pelos hormônios tiroidianos;
- Os parâmetros de função cardíaca no modelo de coração isolado (Langendorff);
- Os parâmetros de função cardíaca, após os corações serem desafiados à Isquemia-Reperusão (I-R), em modelo de coração isolado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Grupos Experimentais

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, junto ao Protocolo 8434020221, seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizados 40 camundongos geneticamente modificados, com inibição seletiva da atividade cardíaca de NF-kB (3M) desde o nascimento, e 40 selvagens (C57BL/6NTac), machos, com idade entre 8 e 10 semanas. Os animais C57BL, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), bem como os 3M, foram mantidos durante todo o protocolo experimental no biotério do Departamento de Anatomia, com temperatura controlada (22°C e 25°C), ciclo de claro-escuro (12 horas) e com livre acesso à água e comida.

3.1.1 Camundongos Geneticamente Modificados (3M)

A linhagem de animais 3M foi desenvolvida pelo grupo do Dr. Keith Jones, da Universidade de Cincinnati, Ohio, e gentilmente cedida pelo Prof. Sudhiranjan Gupta (Baylor University), nosso colaborador, estando sob nossa responsabilidade no Biotério do Departamento de Anatomia – ICB. Como mencionado anteriormente, essa proteína forma um complexo com o NF-kB no citoplasma da célula, resultando na sua inativação. O complexo I κ B quinase fosforila Ser32/Ser36 de I κ B α e leva à ubiquitinação e degradação imediata de I κ B, já foi descrito anteriormente os animais 2M que apresentavam dupla mutação nessas serinas, levando assim, a inativação do NF-kB no cardiomiócito, no entanto, observou-se que essa mutação não bloqueava totalmente a ativação desse fator de transcrição (SCHERER, *et al.*, 1995).

Os mecanismos de ativação do NF-kB estão associados à fosforilação da I κ B- α , os animais 3M apresentam a proteína I κ B- α com tripla mutação no seu terminal amino nas Serinas 32A e 36A e na tirosina 42F nas células musculares cardíacas, mantendo o NF-kB no citoplasma, impedindo a sua translocação e ativação no núcleo dos cardiomiócitos (BROWN, *et al.*, 2005). Como consequência, tem-se o bloqueio desse fator de transcrição especificamente nos miócitos cardíacos desde o nascimento.

3.1.2 Grupos Experimentais

Para execução dos experimentos cada linhagem foi dividida em dois grupos: Controles e Tratados com T3, obtendo 4 grupos experimentais: Controle, Controle + T3, 3M, 3M + T3. Ao final do protocolo de hipertiroidismo, parte dos animais seguiu o para os experimentos de coração isolado e parte foi destinada aos experimentos de análise histológica e análises moleculares.

3.2 Genotipagem por Reação em Cadeia de Polimerase

Os animais obtidos a partir dos cruzamentos realizados no Biotério do Departamento de Anatomia – ICBIII/USP foram genotipados ao atingirem 4 semanas de vida, para verificar a presença da alteração genética que tem como resultado o bloqueio do NF- κ B. Somente animais provindos de ninhadas entre 6 e 8 filhotes e com massa corporea similares foram selecionados para compôr os grupos experimentais.

3.2.1 Coleta de tecido e extração do DNA

Para a extração do DNA e posterior genotipagem foram coletadas amostras de aproximadamente 3 mm da extremidade caudal dos camundongos, as quais foram homogeneizadas em solução alcalina (NaOH, EDTA 0,5M-pH 8,0 e água MilliQ) e extraídas seguindo protocolo do laboratório.

3.2.2 Reação de PCR e Gel de Agarose

Para reação de PCR foi utilizado o kit comercial GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, EUA) contendo a enzima TaqDNA polimerase, sendo ainda adicionados água livre de RNase, o DNA coletado e os primers sense e anti-sense. Para a amplificação dos fragmentos de DNA foi utilizado 1 μ l de DNA e utilizados os seguintes primers: 5'-GAA GCC TAG CCC ACA CCA GAA ATG ACA GAC AGA TC-3' e 5'-CAC AGC CAG CTC CCA GAA GTG CCT CAG CAA TTTC-3' (primers sense e anti-sense, respectivamente). A reação da polimerase em cadeia foi realizada com os seguintes parâmetros: 1 ciclo de desnaturação na condição de 95 °C por 2 min e 30 seg, 1 ciclo de 63 °C por 30 seg, 1 ciclo de 72 °C por 1 min, seguido de 35 ciclos (72 °C – 5 min) e finalizado com 4 °C no termociclador (MJ Research – PTC200).

O gel de agarose foi preparado logo após o término da reação de PCR, utilizando-se 1,5 g de agarose diluída em 100 mL de Tampão sódio-boreto, 1X e 2 μ L

de brometo de etídio (10 mg/mL). As amostras foram pipetadas nos poços do gel (12 μ L da amostra), sendo o primeiro poço preenchido com 2 μ L de Ladder - GeneRuler 1 kb DNA (Thermo Scientific®). O gel foi então submetido a um campo elétrico de 200W por 15 minutos para fracionamento do DNA. O gel foi posteriormente fotografado (Kodak 1D Image Analysis Software Version 3.6), como mostrado na Figura 2.

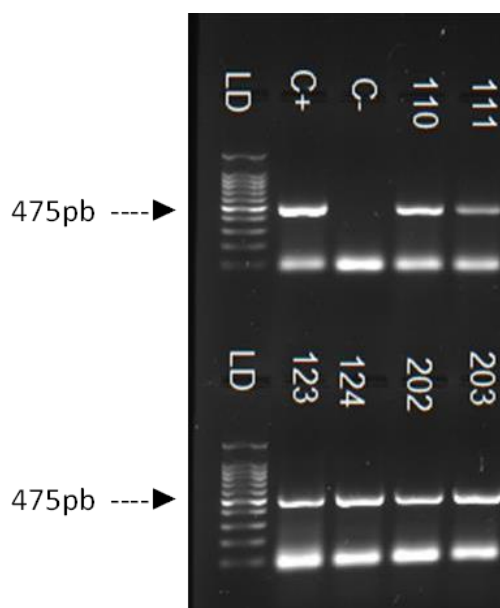


Figura 2. Produtos da reação de PCR da sequência dos animais 3M, apresentados numa corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo. Mutações dos animais 3M (aproximadamente 475pb) os animais WT (C-) (não apresenta marcação). WT C57BL/6NTAC (C-); Animais 3M (C+, 110, 111, 123, 124, 202, 203) (Fonte: Vieira Jr, 2022).

3.3 Validação do modelo experimental

Embora os animais 3M apresentassem a mutação que leva à inativação do NF- κ B, como observado na genotipagem descrita anteriormente, foi utilizado um protocolo de tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) em alguns animais, uma vez que este estímulo sabidamente ativa NF- κ B e leva ao aumento da secreção de citocinas inflamatórias (MAO, *et al.*, 2013). Assim LPS foi administrado intraperitonealmente (1 μ g/g de massa corpórea), em camundongos machos C57/BL6Tac e 3M, com idade de 9 semanas. Os animais foram pesados e em seguida foram eutanasiados; os corações foram retirados, pesados e, posteriormente, guardados a -80°C.

3.4 Indução ao Hipertireoidismo

O hipertireoidismo foi induzido nos camundongos pela administração de triiodotironina via intraperitoneal (T3, 7 μ g/100 g de peso corpóreo; Sigma – Aldrich)

por um período de 14 dias. O T3 foi previamente dissolvido em NaOH (0,04 M), diluído em solução salina e armazenado a 4°C. Esse protocolo foi previamente utilizado e padronizado em trabalhos do nosso grupo (CARRILLO-SEPÚLVEDA, *et al.* 2010; TAVARES, *et al.*, 2013). Os animais dos grupos controle (WT-C e 3M-C) receberam a solução veículo, via intraperitoneal, por 14 dias.

3.5 Dosagem de hormônios tireoidianos

Os níveis séricos de TSH foram mensurados utilizando um kit comercial (Milliplex, Millipore), seguindo as orientações do fabricante. O ensaio é baseado na ligação de anticorpos conjugados a beads magnéticas e a leitura foi feita em equipamento Luminex.

3.6 Análises Morfológicas

3.6.1 Determinação do trofismo cardíaco

A avaliação do trofismo cardíaco, resultante do efetivo tratamento com T3, foi realizada pela análise da razão da massa total do coração pela massa corpórea do camundongo (mg/g) e ainda pela razão da massa total do coração, pelo comprimento da tíbia (mg/mm). No momento da eutanásia, foi avaliado o comprimento das tíbias dos animais, permitindo o cálculo da razão massa do coração/comprimento da tíbia, assegurando a eficiência do tratamento com T3 na instalação do fenótipo de hipertrofia cardíaca.

3.6.2 Avaliação Histológica

A morfologia cardíaca foi analisada em cortes histológicos. As amostras de coração foram fixadas em formol 10% por 24 horas e então mantidas em álcool 70% até à continuidade do experimento. Foi feita a passagem do tecido em concentrações crescentes de álcool para desidratação. Em seguida, foi utilizado xilol para a diafanização, possibilitando a impregnação da parafina no tecido. Por fim, o coração foi banhado em parafina e emblocado. Foram feitos cortes com espessura de 5 micrômetros do tecido utilizando um micrótomo. As lâminas com os cortes foram processadas e coradas com picrossirius, para avaliação de fibrose, e com WGA (*wheat germ agglutinin*), para avaliar a morfologia dos cardiomiócitos.

3.7 Análises Funcionais

As análises funcionais foram realizadas com outros grupos de animais hipertiroideos destinados à análise de coração isolado, visto que a eutanásia destes

animais deveria ser por decapitação e sem a utilização de anestésicos. Os corações foram retirados, pesados e utilizados para perfusão de coração isolado, conforme descrição a seguir. A decapitação se fez necessária em virtude da impossibilidade do uso de anestésico para a técnica de perfusão de coração isolado, uma vez que este age sobre parâmetros da função cardíaca e interfere diretamente na qualidade dos dados (BARBOZA, 2022).

3.7.1 Preparação do Coração Isolado

Os corações foram excisados e limpos em solução modificada de Krebs-Henseleit (KH) contendo: NaCl (118 mM), KCl (4,7 mM), CaCl₂ (1,75 mM), MgSO₄ (1,66 mM), NaHCO₃ (24,88 mM), KH₂PO₄ (1,18 mM), dextrose 2 g/L e água bi-distilada, pH 7,4. O pH foi ajustado por contínua gaseificação com uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂. O perfusato foi preparado no momento do experimento e filtrado (Swinnex® 47mm, poro da membrana 0,22 µM) imediatamente antes da perfusão (SILVA, *et al.*, 2016).

Os corações foram rapidamente montados no Sistema de Langendorff (Radnoti-ADInstruments) e perfundidos retrogradamente, de acordo com o Método de Langendorff (LANGENDORFF, 1895), através da aorta ascendente, em solução KH, a 37 °C, a fluxo constante de 3 ml/min e sem recirculação. Trata-se de um modelo clássico para estimar alterações funcionais cardíacas sem a influência neuro-humoral. Menos de 3 minutos foi o tempo utilizado entre a retirada do coração do animal e a canulação da aorta no sistema. Quando o período de preparação excedeu esse tempo, o coração foi descartado.

Todos os corações foram submetidos ao processo de Isquemia/Reperusão obedecendo a um protocolo experimental de 30 minutos de estabilização, 20 minutos de isquemia global (fluxo=0) e posterior restauração do fluxo, com 45 minutos de reperusão (CASTRO, *et al.*, 2006; SILVA, *et al.*, 2016). Vale acrescentar que todos os grupos experimentais foram tratados ao mesmo tempo e para os experimentos de coração isolado era sempre selecionado um coração de cada grupo.

3.7.2 Aquisição de dados de Função Cardíaca

Cinco parâmetros foram aferidos: a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP – Left Ventricular Developed Pressure), que corresponde à diferença entre a pressão sistólica (LVSP – Left Ventricular Systolic Pressure) e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (LVEDP – Left Ventricular End Diastolic

Pressure). A $+dP/dt$ e $-dP/dt$, que são índices de contratilidade e de relaxamento do coração, respectivamente, a frequência cardíaca e pressão de perfusão. Todos estes parâmetros foram monitorados continuamente por um sistema de registro (PowerLab-Lab Chart 7, ADInstruments, USA).

3.7.3 Função ventricular esquerda

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

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

3.7.4 Pressão de Perfusão

Para mensurar a pressão de perfusão, foi utilizado um transdutor de pressão conectado à cânula da artéria aorta. O coração foi suprido pelo perfusato gaseificado através de uma bomba peristáltica de fluxo pulsátil e constante, que foi capaz de gerar uma pressão de perfusão correspondente variável, que dependeu da resistência imposta pelas coronárias de cada animal.

Ao término do experimento o coração foi pesado, os átrios desprezados e os ventrículos separados em ventrículo direito e ventrículo esquerdo + septo e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior processamento das amostras.

3.8 Análises moleculares

Ao final do protocolo de indução do hipertireoidismo os animais foram

eutanasiados com a utilização de cetamina e xilazina e os corações foram guardados a -80°C para realização de experimentos de biologia molecular.

3.8.1 Análise de expressão gênica

3.8.1.1 Extração do RNA e preparação do cDNA

A extração de RNA total das amostras foi realizada através da lise mecânica das amostras submersas em trizol (Invitrogen). Então foi adicionado clorofórmio e as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm (rotações por minuto), durante 15 minutos, a 4°C , para separação das fases. A fase aquosa, correspondente ao RNA, foi coletada e transferida para um novo tubo. Nesse novo tubo foi adicionado álcool isopropílico, as amostras foram centrifugadas novamente e ao fim da centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e o pellet foi lavado com etanol 75%. Por fim, o homogenato de RNA foi ressuspendido em água MilliQ autoclavada. O RNA total foi então dosado no espectrofotômetro de alta sensibilidade (Nanodrop, Biotek), através de um programa específico para análise de ácidos nucleicos (Gen5 Data Analysis Software, BioTek), em comprimento de onda 260 e 280 nm. A integridade do RNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, sendo observadas sob luz ultravioleta duas subunidades de RNA ribossomal (18s e 20s). Confirmada a integridade do RNA, prosseguiu-se com a reação de transcrição reversa para a síntese da fita simples do DNA complementar (cDNA), mediante utilização de $1\mu\text{g}$ de RNA total e da enzima M-MLV (Reverse Transcriptase, Invitrogen), em termociclador (MJ Research – PTC200).

3.8.1.2 PCR em Tempo Real (RT-PCR)

A fim de determinar a concentração ideal de cDNA, bem como evitar a saturação das amostras durante a reação, foram realizadas curvas com quantidades progressivas de cDNA para cada gene a ser avaliado. Todas as análises foram realizadas em duplicatas. Nas reações foi utilizado SYBR Green PCR Master Mix (coquetel de reagentes – Invitrogen), primer ($2,5\mu\text{M}$), cDNA e água para completar um volume final de $12\mu\text{l}$. Para cada reação, foi utilizado um controle negativo, contendo todos os reagentes descritos, mas sem cDNA. As amostras foram submetidas a ciclos com temperatura de denaturação inicial de 95°C por 15 segundos, temperatura de anelamento de 60°C por 1 minuto e temperatura de extensão de 72°C por 15 segundos, utilizando 40 ciclos. Os resultados obtidos foram expressos com base na relação do RNAm de cada gene de interesse com os níveis de RNAm de

GAPDH, utilizado como controle interno. Estão listados na tabela 01 os primers utilizados para expressão gênica nos camundongos.

Tabela 01 – Sequência dos primers utilizados em camundongos.

Genes	Origem	Sequência dos primers
BNP	Exxtend	Fw - 5' CAGAACAATCCACGATGCAG 3'
		Rv - 5' GCTGTCTCTGAGCCATTTCC 3'
IL-1 β	Exxtend	Fw - 5' AGTGAACCCCAGACCAGACTGA 3'
		Rv - 5' CCCTCCCCACCTAACTTTGATGTA 3'
IL-10	Exxtend	Fw - 5' TTA CAG CCA AGG CAC ACT CA 3'
		Rv - 5' TAC CGT CCT TTT GCC AGT TCC 3'
GAPDH	Exxtend	Fw - 5' ACTCCACTCACGGCAAATTC 3'
		Rv - 5' TCTCCATGGTGGTGAAGACA 3'

3.9 Análise estatística

Os dados obtidos encontram-se apresentados na forma de média \pm erro-padrão. O valor amostral (n) corresponde ao número de animais utilizados em cada grupo. Os resultados foram analisados e comparados utilizando-se o Teste t de "Student" ou a Análise de Variância (ANOVA) de dois caminhos (Two-way), seguida do pós-teste de Tukey. Em algumas análises os valores de p foram apresentados. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Validação do modelo animal (camundongos 3M)

Os animais 3M apresentam uma inativação específica do NF- κ B no cardiomiócito que se dá pela tripla mutação no seu terminal amino nas Serinas 32A e 36A e na tirosina 42F, como descrito anteriormente (item 3.1.1). Já é descrito na literatura que o NF- κ B quando ativado transcreve diversos genes anti e pró-inflamatórios, dentre eles podemos mencionar aqueles que codificam as interleucinas IL-1 β e IL-10.

Com isso, avaliamos como se apresentava a expressão gênica dessas interleucinas nos animais 3M com estímulo inflamatório por LPS (figura 3). Foi observado que, após o estímulo com agente inflamatório (LPS), os animais 3M apresentaram menor expressão de IL-1B e IL-10 (figura 3A e B), sugerindo a inativação do NF- κ B, principal fator de transcrição de ativação dessas interleucinas na inflamação.

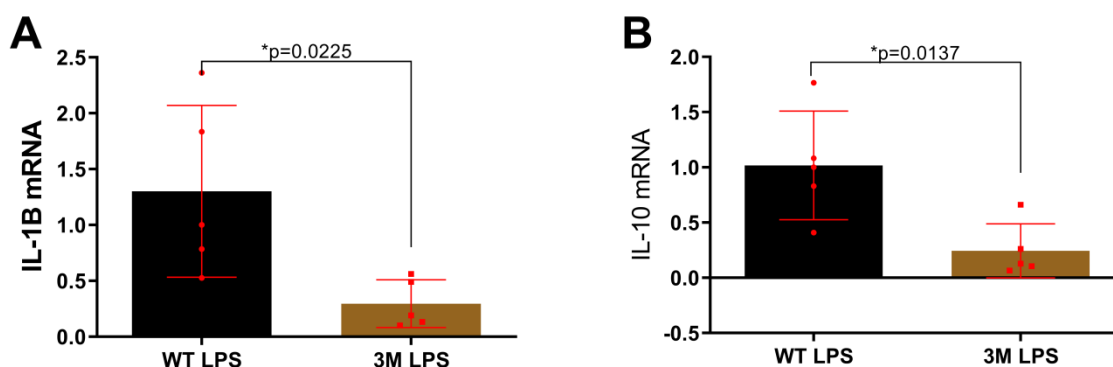


Figura 3 – Expressão de RNAm expresso no tecido cardíaco após ativação de NF- κ B (administração de LPS). A) Expressão gênica de IL-1B B) Expressão gênica de IL-10 Grupo WT-LPS (n=5); 3M-LPS (n=5). *vs. WT-LPS (p<0,05).

4.2 Validação do modelo experimental

O protocolo de indução ao hipertireoidismo (T3, 7 ug/100 g de peso corpóreo/ 14 dias, i.p.) utilizado neste estudo já foi descrito em trabalhos prévios do grupo. Contudo, os dados coletados confirmaram a eficiência do modelo experimental.

4.2.1 Dosagem sérica de tireotrofina (TSH)

Os animais tratados com T3 mostraram níveis significativamente inferiores de TSH, confirmando a eficiência da alça de regulação dos hormônios tiroideanos por feed-back negativo e o estado hipertiroideo dos animais (figura 4).

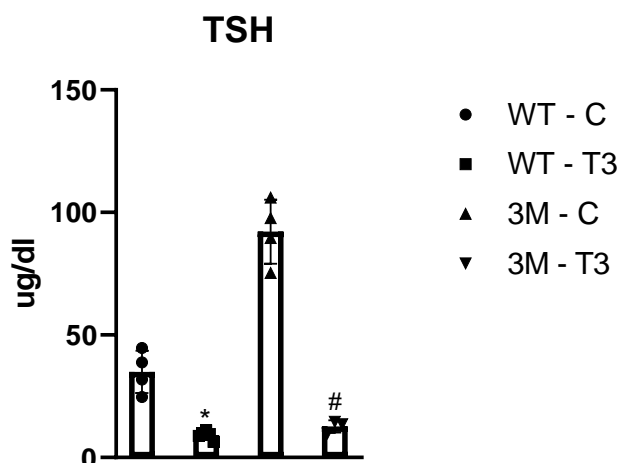


Figura 4 – Níveis séricos de tireotrofina. Os valores são expressos como média \pm desvio-padrão. WT – C (n=4); WT – T3 (n=5); 3M – C (n=4); 3M – T3 (n=3). * vs. seu próprio controle ($p < 0,05$).

Assim, foi observado que os grupos tratados com T3, independentemente do seu genótipo, foram induzidos à condição de hipertiroidismo, apresentando os níveis séricos de tireotrofina reduzidos (WT-T3 $p = 0.0023$; 3M-T3 $p < 0.0001$).

4.2.2 Acompanhamento da massa corporal

A análise da evolução da massa corpórea foi realizada ao longo dos 14 dias de tratamento com T3. Como pode ser observado na Figura 5, não foram observadas diferenças significativas, neste parâmetro, entre os grupos experimentais. Embora os HT levem ao aumento do metabolismo basal, de modo geral, o que poderia implicar em menor ganho de massa corpórea nos dois grupos tratados com T3 (WT e 3M), por outro lado, esses hormônios estimulam o aumento do consumo de alimento, o que pode justificar a ausência de diferenças observadas entre os grupos. Resultados similares foram observados em trabalhos prévios de nosso grupo, tanto em camundongos como em ratos.

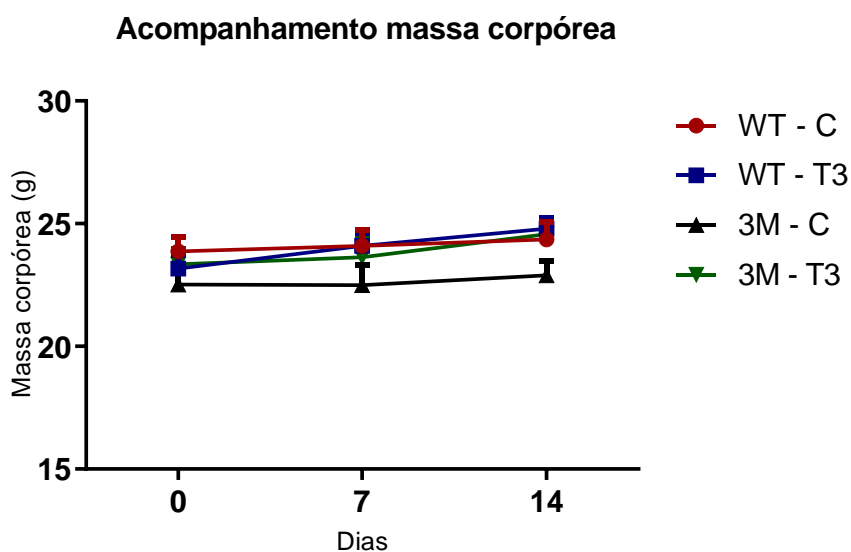


Figura 5 - Acompanhamento da massa corpórea (g) dos animais nos diferentes grupos experimentais ao longo do tratamento. Os valores são expressos como média \pm desvio-padrão. WT – C (n=10); WT – T3 (n=10); 3M – C (n=10); 3M – T3 (n=10).

4.2.3 Análise do trofismo cardíaco, em resposta ao hipertireoidismo experimental

A análise do trofismo cardíaco foi realizada com base na razão da massa cardíaca, em miligramas (mg), pelo comprimento da tíbia, em milímetros (mm), bem como na razão da massa cardíaca, pela massa corpórea. Conforme pode ser observado, os grupos tratados com T3 (WT e 3M) apresentaram razão massa cardíaca/massa corpórea (Figura 6A) e razão massa cardíaca/comp. da tíbia (Figura 6B) significativamente maiores que aquelas observadas nos respectivos grupos controles ($p < 0,05$), comprovando a ação dos HT como indutores de hipertrofia cardíaca.

Ainda, o grupo 3M–T3 apresentou maior aumento de massa cardíaca, quando comparada àquela observada no grupo WT – T3, indicando que, contrariamente ao esperado, a supressão de NF- κ B no cardiomiócito, influenciou positivamente o ganho de massa muscular cardíaca induzida pelo tratamento com T3. Ao realizar análise da área do cardiomiócito por histologia, foi observado o aumento neste parâmetro nos grupos tratados com T3 (Figura 6C-D). A análise da expressão gênica de BNP, um marcador de hipertrofia cardíaca, mostrou-se significativamente aumentado no grupo de animais 3M submetidos ao tratamento com T3 (Figura 6E).

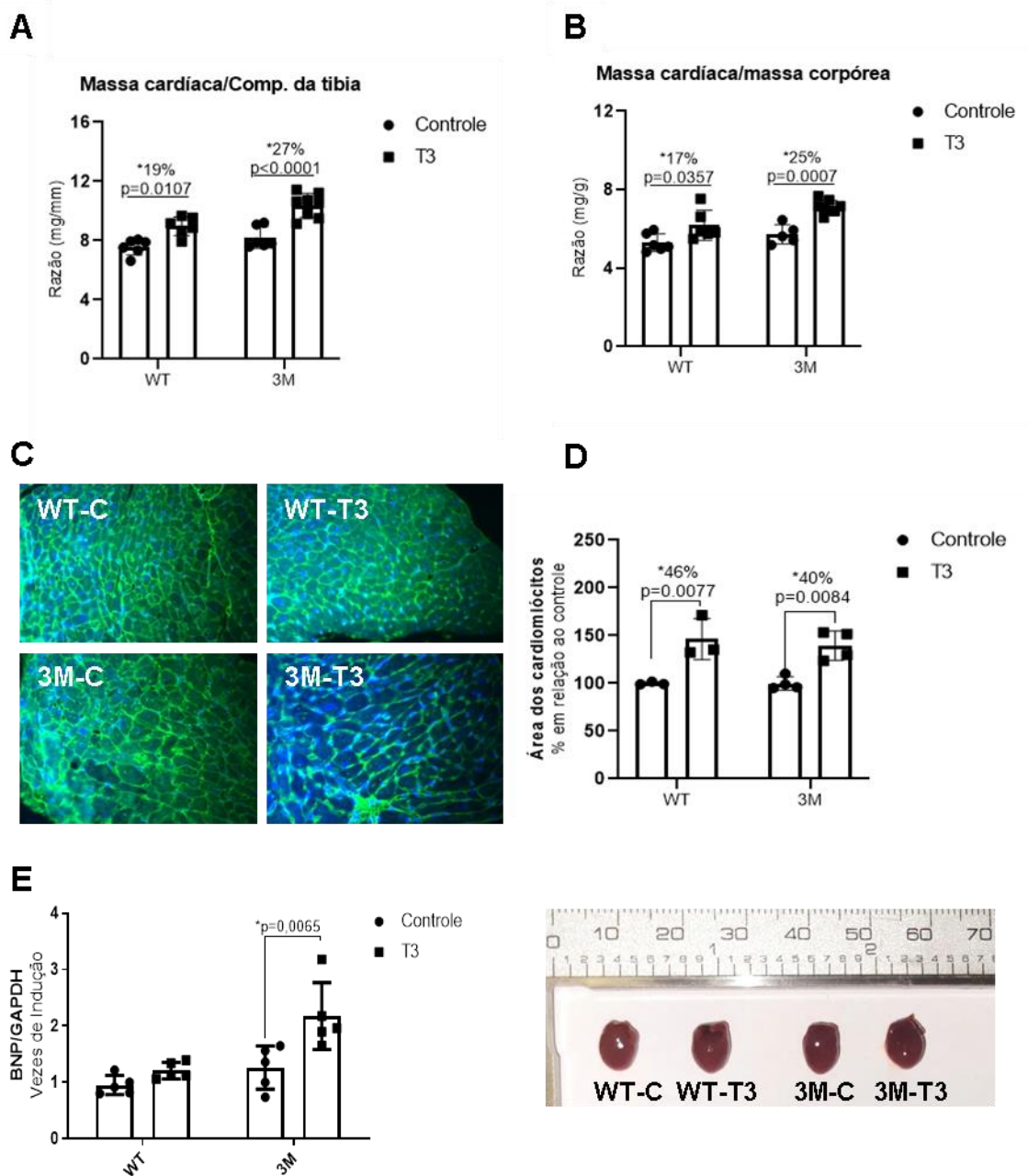


Figura 6 - Análise do trofismo cardíaco. A) Análise da razão massa cardíaca/massa corpórea, nos diferentes grupos experimentais. B) Análise da razão massa cardíaca/comprimento da tíbia, nos diferentes grupos experimentais. C) Imagem representativa de lâminas histológicas marcadas com WGA (*wheat germ agglutinin*) (40x). D) Quantificação da área de cardiomiócitos em lâminas marcadas com WGA (n=3-4). E) Expressão gênica de BNP (peptídeo natriurético cerebral) (n=5). WT-C (n=5); WT-T3 (n=6); 3M-C (n=6); 3M-T3 (n=8).

4.3 Papel da supressão do NF- κ B nos parâmetros de função cardíaca de coração isolado

Os dados referentes a LVDP, +dP/dt, -dP/dt e FC foram obtidos a partir dos experimentos de coração isolado, conforme descrito na metodologia (item 3.8). A

mensuração desses parâmetros foi registrada durante todo o experimento (95 minutos) e, para a avaliação, foram selecionados os últimos 5 minutos referentes tanto ao período de estabilização (com duração de 30 minutos), como aos diferentes tempos de reperfusão (25, 35 e 45 minutos após a realização da isquemia).

4.3.1 Parâmetros de função cardíaca

4.3.1.1 Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP)

A LVDP é um parâmetro fundamental para avaliação da função cardíaca; esse dado é calculado a partir da diferença entre o pico de pressão sistólica e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Conforme pode ser observado, os grupos experimentais não apresentam diferença estatística no período de estabilização, demonstrando que todos os grupos se comportam de maneira similar, independentemente da linhagem dos animais (WT ou 3M) e/ou tratamento (Figura 7A).

Após o período de isquemia, foi observado que o grupo WT-T3 apresentou piora quanto à sua recuperação, após 25 e 35 minutos de reperfusão, quando comparado com o grupo WT-T3 (Figura 7B – C). No entanto, após 45 minutos, a diferença na recuperação não foi mais observada (Figura 7D). Os grupos 3M não apresentaram diferença estatística quanto à recuperação no período de reperfusão.

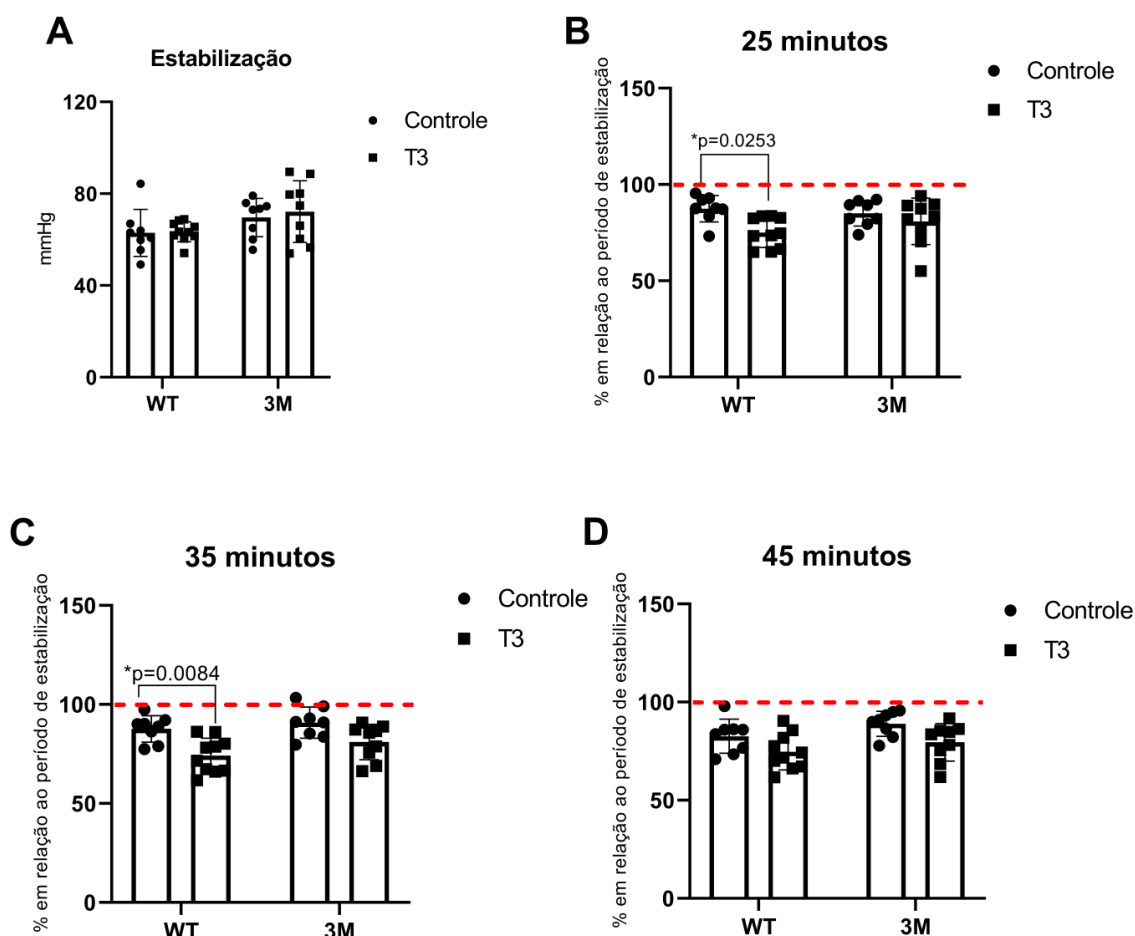


Figura 7 – Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDP). A) LVDP no período de estabilização. B) LVDP 25 minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). C) LVDP 35 minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). D) LVDP 45 minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). Dados expressos em média \pm desvio-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=8), WT-T3 (n=10), 3M-C (n=8) e 3M-T3 (n=9). *vs. WT-C ($p < 0,05$).

4.3.1.2 Primeira derivada positiva de pressão ventricular esquerda (+dP/dt)

A variação da pressão por unidade de tempo (dP/dt), também denominada de primeira derivada temporal da pressão ventricular, corresponde a um dos parâmetros utilizados para avaliação da função do ventrículo esquerdo; essa variável apresenta dois índices a derivada positiva e a derivada negativa. A +dP/dt é um índice de contratilidade que possibilita avaliar, mesmo que indiretamente, o inotropismo cardíaco, o qual corresponde à força de contração muscular do coração.

Durante o período de estabilização (Figura 8A) os dados demonstraram

comportamentos parecidos, indicando que em uma condição estável os grupos apresentam o mesmo comportamento, independentemente do tratamento e/ou linhagem. No entanto, foi observado que após 35 minutos de reperfusão o grupo WT-T3 apresentou-se com uma porcentagem de recuperação menor que aquela do grupo WT-C (Figura 8C). Não foi observada nenhuma diferença estatística nos demais grupos, independente do tratamento ou genótipo, durante a reperfusão (Figura 8B, D).

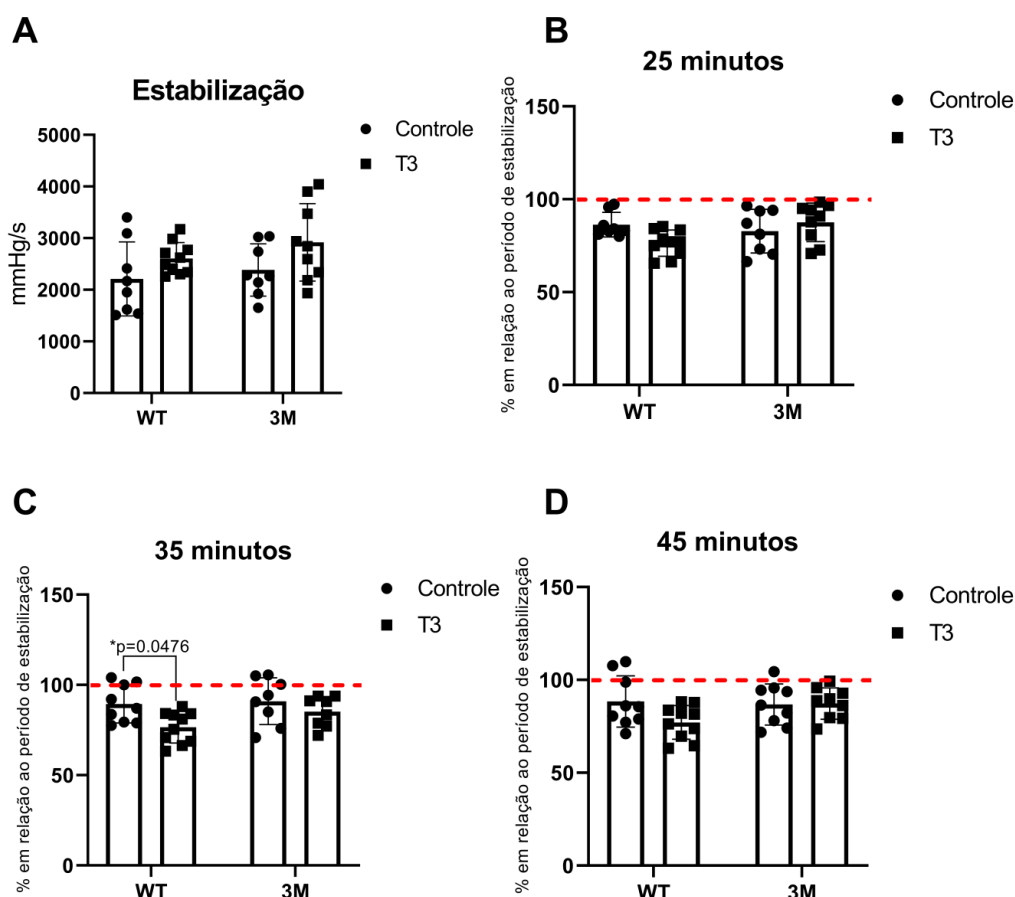


Figura 8 – Primeira derivada positiva de pressão por tempo. A) $+dP/dt$ no período de estabilização. B) $+dP/dt$ após 25 minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). C) $+dP/dt$ após 35 minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). D) $+dP/dt$ após minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). Dados expressos em média \pm desvio-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=8), WT-T3 (n=10), 3M-C (n=8) e 3M-T3 (n=9). *vs. WT-C ($p < 0,05$).

4.3.1.3 Primeira derivada negativa de pressão ventricular esquerda ($-dP/dT$)

A dP/dt negativa também corresponde a um índice utilizado para avaliação da função ventricular esquerda e corresponde à capacidade de relaxamento cardíaco

global do coração ou lusitropismo. Esta propriedade está relacionada ao relaxamento diastólico; esse período é determinado pelo fim do processo de contração e início do enchimento ventricular.

Durante o período de estabilização, os dados demonstram que os grupos controles (não tratados) já apresentavam diferença significativa na $-dP/dt$ no seu valor basal, sugerindo um efeito relacionado à linhagem dos camundongos (Figura 9A). Entretanto, durante o período de reperfusão, essa diferença não foi mais observada. Os animais WT-T3 apresentaram porcentagem de recuperação menor que seu grupo controle, após 25 e 35 minutos de reperfusão (Figura 9B e C), a qual desapareceu após 45 minutos de reperfusão, momento em que todos os grupos se comportaram de forma semelhante (Figura 9D). Assim, os dados demonstram que os animais WT tratados com T3 apresentaram prejuízo na recuperação da $-dP/dt$ até 35 minutos após o início da reperfusão.

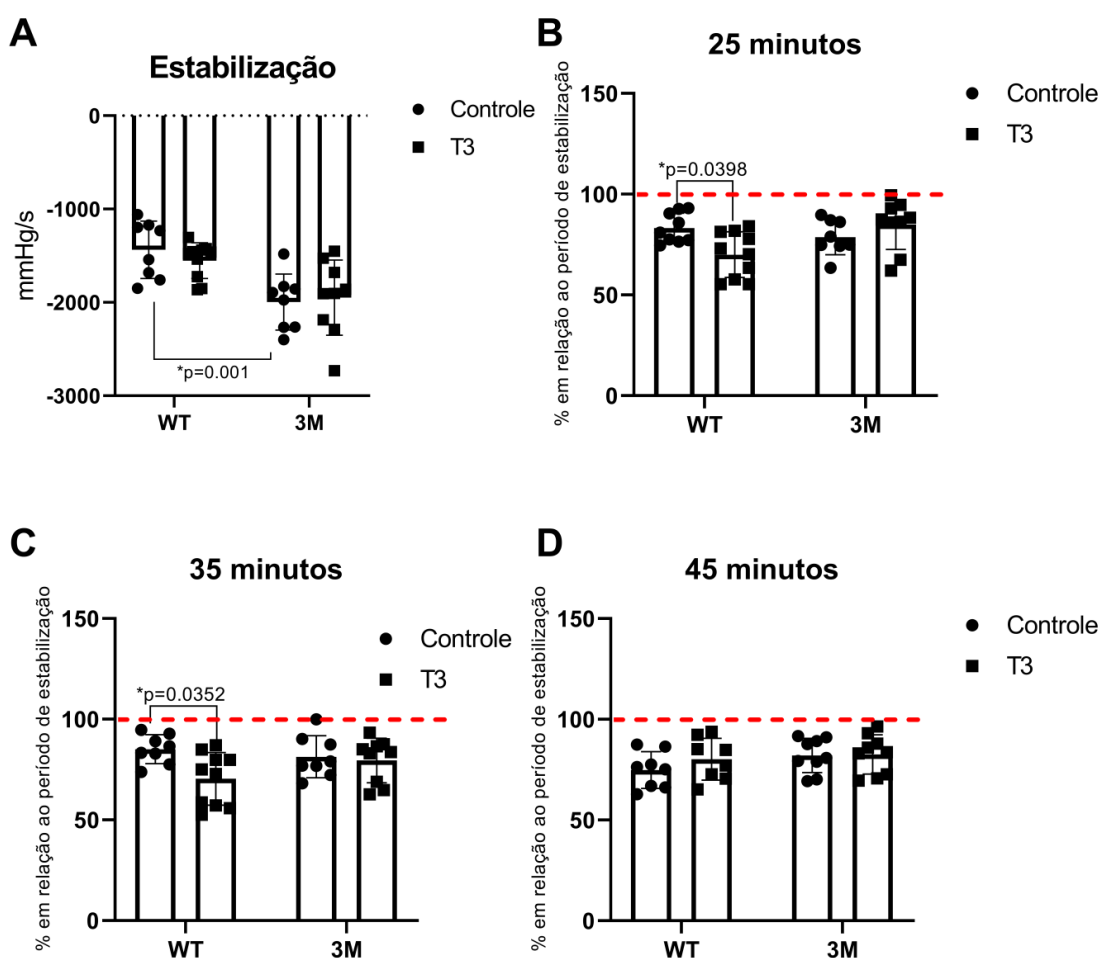


Figura 9 – Primeira derivada negativa de pressão por tempo. A) $-dP/dt$ no período de estabilização. B) $-dP/dt$ após 25 minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). C) $-dP/dt$ após 35

minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). D) $-dP/dt$ após minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). Dados expressos em média \pm desvio-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=8), WT-T3 (n=10), 3M-C (n=8) e 3M-T3 (n=9). *vs. WT-C (p<0,05).

4.3.1.4 Frequência cardíaca (FC)

A frequência cardíaca corresponde a outro parâmetro cardíaco avaliado, o cronotropismo. Esse parâmetro corresponde à capacidade do coração em gerar seus próprios impulsos elétricos, de maneira independente de fatores estimulantes extrínsecos a ele, fatores neuro-endócrinos. O cronotropismo sofre influência de diversos fatores, como íons plasmáticos, temperatura e irrigação coronariana. Com isto, nos experimentos com o coração isolado (*ex-vivo*), os parâmetros de temperatura, fluxo e a solução de perfusão foram rigidamente controlados, garantindo que a FC não sofresse influências extrínsecas, seguindo o processo metodológico descrito anteriormente (item 3.8).

De acordo com o que pode ser observado em relação ao período de estabilização (Figura 10A), o tratamento com T3 apresentou um aumento significativo da FC nos animais WT (grupo WT-T3). Apesar da consolidação da influência dos HT na FC, os animais 3M não apresentaram alterações nesse parâmetro, mesmo após tratamento com T3, em situação basal (período de estabilização) (Figura 9A). No entanto, quando os animais foram submetidos ao protocolo de I-R, os animais 3M apresentaram uma melhora na recuperação relacionada a este parâmetro nos tempos de 25, 35 e 45 minutos (Figura 10B, C e D).

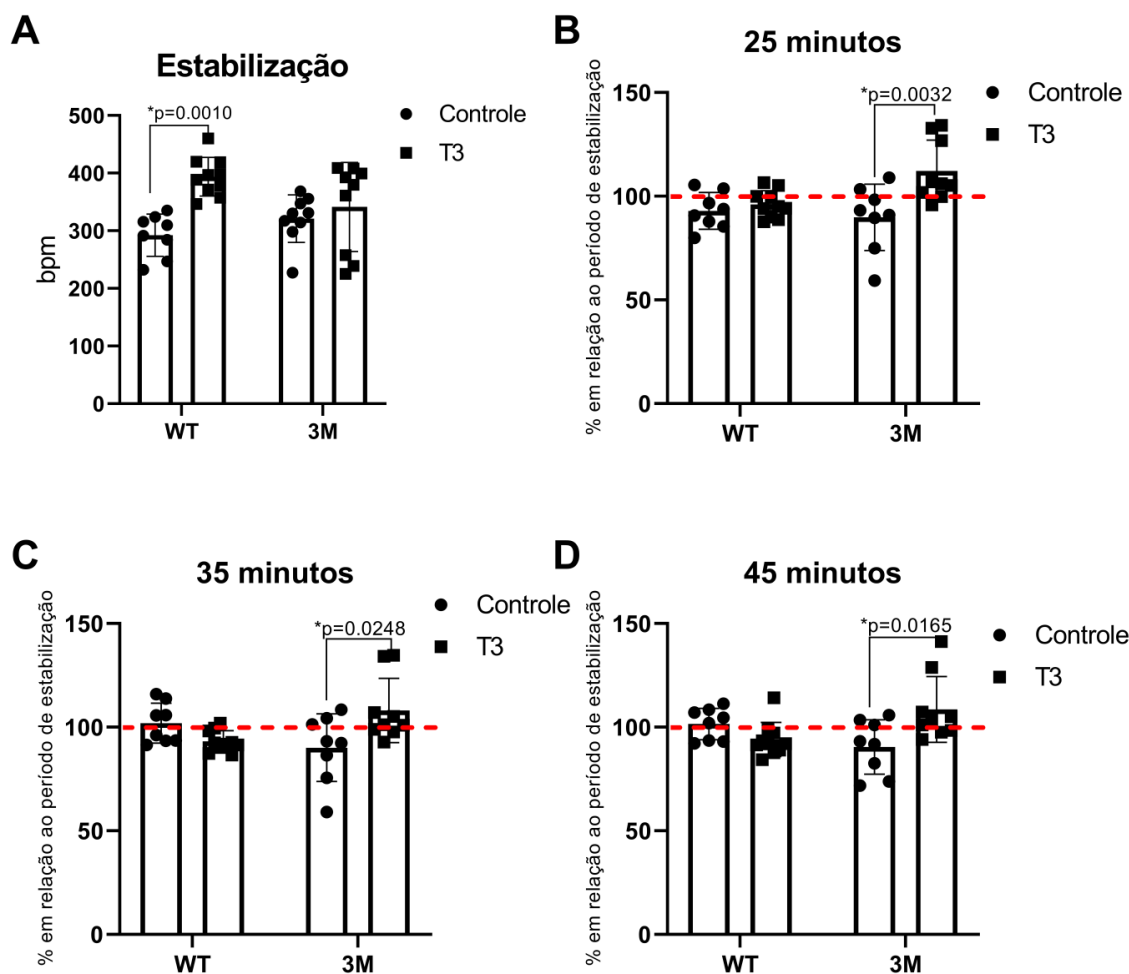


Figura 10 - Frequência cardíaca. A) FC no período de estabilização. B) FC após 25 minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). C) FC após 35 minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). D) FC após minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). Dados expressos em média \pm desvio-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=8), WT-T3 (n=10), 3M-C (n=8) e 3M-T3 (n=9). *vs. 3M-C ($p < 0,05$).

4.3.1.5 Pressão de Perfusão

A pressão de perfusão corresponde ao índice resultante da adaptação vascular das artérias coronárias ao fluxo constante exercido pela bomba peristáltica do sistema de perfusão isolado – Langendorff (3ml/min). O fluxo coronariano se ajusta de maneira dinâmica, a partir das necessidades metabólicas do coração. Este parâmetro possibilita a análise indireta do estado de reatividade das artérias coronárias (vasodilatação e vasoconstrição) dos animais submetidos às diferentes condições experimentais.

Como pode ser observado (Figura 11A), os grupos controle apresentaram diferença estatística durante o período de estabilização. Após o período de isquemia e com o reestabelecimento da perfusão, foi observado que os grupos que não receberam tratamento com T3 (WT-C e 3M-C) permaneceram diferentes significativamente após 25 minutos de reperfusão (figura 11B). O experimento analisou ainda os tempos 35 e 45 minutos de reperfusão, no entanto, esse parâmetro apresentou comportamento similar entre os grupos (Figura 11C e D).

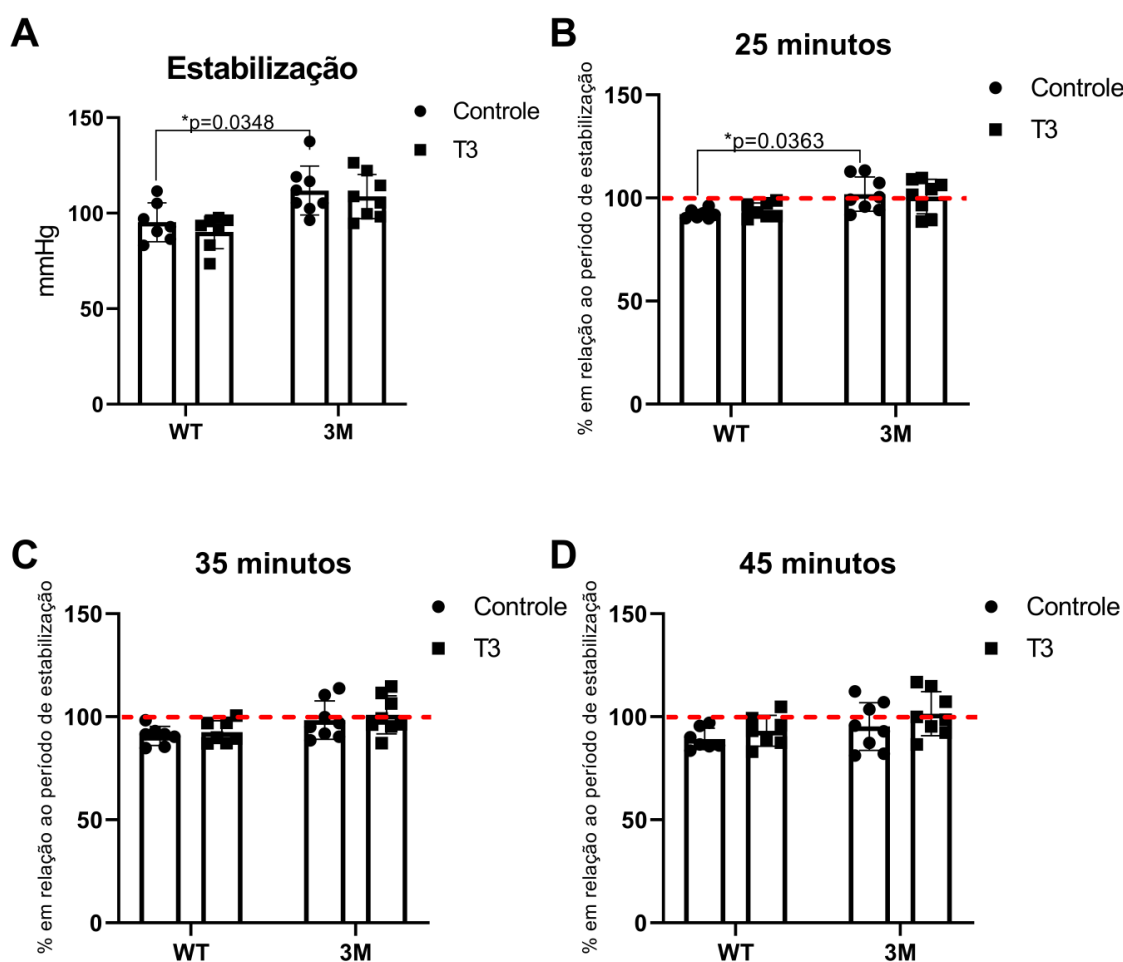


Figura 11 – Pressão de perfusão. A) Pressão de perfusão no período de estabilização. B) Pressão de perfusão após 25 minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). C) Pressão de perfusão após 35 minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). D) Pressão de perfusão após 45 minutos de reperfusão, apresentada como % em relação ao seu próprio valor controle (no período de estabilização). Dados expressos em média \pm desvio-padrão da porcentagem de alteração dos parâmetros avaliados nos diferentes tempos, sendo o 100% correspondente ao período de estabilização. WT-C (n=7), WT-T3 (n=7), 3M-C (n=8) e 3M-T3 (n=8). *vs. 3M-C (p<0,05).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o papel do Fator de Transcrição *Kappa B* na função cardíaca de animais hipertiroideos, no modelo de coração isolado (Sistema Langendorff), bem como avaliar o comportamento desses parâmetros após os corações serem desafiados à injúria de isquemia-reperfusão (I-R). Esse estudo foi direcionado a partir de evidências da literatura que apontam o envolvimento de vias de inflamação envolvidas nas disfunções cardiovasculares. Além disso, diversos trabalhos tem apontado a participação do NF- κ B no remodelamento cardíaco induzido por AngII e sobrecarga de pressão (LI, *et al.*, 2004; XU, *et al.*, 2011) Ainda, tem-se evidenciado na literatura uma possível participação desse fator de transcrição nas lesões de isquemia-reperfusão por constricção de ramo descendente de coronária (*in vivo*) (TRANTER, *et al.*, 2010; WILHIDE, *et al.*, 2011).

Para responder os objetivos propostos, foram utilizados animais geneticamente modificados que apresentam bloqueio da ativação do NF- κ B específica no cardiomiócito de camundondos, desde o seu nascimento. Para comprovação da funcionalidade da linhagem dos animais, foi realizada a genotipagem desses animais. Além disso, sabendo que a ativação do NF- κ B é um dos mecanismos de regulação da transcrição de genes próinflamatórios, foram analisadas a expressão gênica da IL-1B e da IL-10, em animais expostos à ativação clássica do NF- κ B por injeção de LPS, evidenciando assim, uma menor expressão desses genes nos corações dos animais 3M.

O modelo de hipertiroidismo em roedores vem sendo usado pelo nosso grupo; neste estudo foi confirmado o estado hipertiroideo dos animais com base nos níveis reduzidos do hormônio estimulante da tireoide (TSH), da massa cardíaca e da área do cardiomiócito, nos animais tratados com T3. Esses dados reproduzem resultados apresentados anteriormente por nosso grupo em ratos e camundongos (CARNEIRO-RAMOS, *et al.*, 2010; TAVARES, *et al.*, 2013; SILVA, *et al.*, 2016; TAKANO, *et al.*, 2017).

Esse estudo estabeleceu a condição de hipertiroidismo, que foi evidenciado pela mensuração dos níveis de TSH circulantes. Já é descrito que o TSH é extremamente sensível às alterações nas concentrações circulantes dos HTs, com isso, a utilização de ensaios de TSH de alta sensibilidade tem sido utilizada pelos médicos para detectar alterações sutis na função tireoidiana, levando ao conceito de

doença subclínica da tireoide (SALMAN RAZVI, *et al.*, 2018).

Posteriormente, a confirmação da eficácia do modelo experimental de hipertireoidismo em camundongos, iniciou-se as avaliações morfológicas e de função cardíaca pré e pós-isquemia global em corações isolados. O protocolo experimental foi realizado em animais C57/BL6Tac e animais 3M, visto que, as duas linhagens apresentam o mesmo background. É importante ressaltar que foi realizado o protocolo de hipertireoidismo em animais C57/BL6J, e comparada a hipertrofia dos dois grupos de animais (C57/BL6Tac vs C57/BL6J) e não apresentaram diferença estatística, comprovando assim que os dois modelos de animais selvagens se comportam de forma similares quanto ao fenótipo de hipertrofia induzida por T3 (dados não publicados).

Os hormônios tireoidianos têm como principal órgão alvo o coração, isso se dá devido à expressão e afinidade dos receptores desse hormônio nas células cardíacas. Os receptores do hormônio tireoidiano estão presentes no miocárdio e no tecido endotelial vascular, permitindo assim que alterações na concentração circulante de hormônios tireoidianos modulem a atividade do órgão-alvo. (BIONDI & COOPER, 2008). Sabe-se que os HT atuam sobre o cardiomiócito aumentando a transcrição gênica e a síntese proteica, resultando no aumento de seu volume celular e da sua contratilidade, como já foi demonstrado anteriormente (CARNEIRO-RAMOS, *et al.*, 2010; OJAMAA, 2010; DINIZ; CARNEIRO-RAMOS; BARRETO-CHAVES, 2009; HU; LIBERTI; BARRETO-CHAVES, 2005). Neste estudo nossos dados demonstraram aumento do volume celular, da razão massa cardíaca/massa corpórea e razão massar cardíaca/massar corporal, onde foi observado que independentemente da linhagem dos animais, os grupos tratados com T3 apresentaram maior hipertrofia. É importante destacar que esses dados referentes a hipertrofia cardíaca diferiram de resultados prévios do nosso grupo utilizando o mesmo modelo animal, onde foi observado que a HC induzida pelos HT nos animais 3M foi atenuada (TAKANO, *et al.*, 2017). No entanto, no trabalho de Takano foi utilizada uma dose de T3 5 vezes superior àquela utilizada no presente estudo, o que talvez explique a diferença quanto à ação da supressão do NF observada entre esses resultados.

Os HT atuam diretamente na estrutura miocárdica, regulando o conteúdo de colágeno intersticial no miocárdio, favorecem o desenvolvimento da angiogênese coronariana, aumentando assim a reserva de fluxo coronariano, e regulam a função cardíaca por meio de efeitos cronotrópicos, inotrópicos e dromotrópicos (MASTORCI,

et al., 2020). Já foi demonstrado que os hormônios tireoidianos atuam como cardioprotetores, melhorando a contração cardíaca e a recuperação funcional após isquemia global, em ratos e em camundongos selvagens (PANTOS, *et al.*, 2005; TAVARES, *et al.*, 2013; Silva, *et al.*, 2016).

O protocolo de isquemia global é considerado um modelo de infarto do miocárdio. Para análise da área infartada é frequentemente utilizada a técnica de cloreto de trifeniltetrazólio a 1% (TTC). Essa técnica se baseia na coloração vermelho escuro quando o tecido apresenta-se viável, isso se dá devido a interação do TTC com as moléculas de NADH2 e com as enzimas desidrogenases presentes no tecido não infartado. Além disso, a área que sofreu prejuízo durante o infarto apresenta coloração pálida ou cinza, devido a incapacidade da interação TTC com NADH2 e as enzimas desidrogenases (SILVA, *et al.*, 2016).

Em nossos experimentos, nos utilizamos dessa mesma técnica, mas não observamos qualquer indicação de área infartada nos corações dos camundongos submetidos ao protocolo de I/R. Apesar disso, resultados similares foram observados previamente por outros autores, em corações de ratos e camundongos submetidos a 20 minutos de isquemia e 45 minutos de reperfusão, nos quais os corações não apresentaram área de infarto do miocárdio (RAGONE, *et al.*, 2015; SILVA, *et al.*, 2016).

Nossos dados apontaram aumento da frequência cardíaca nos animais selvagens tratados com T3, esse dado corrobora os observados na literatura. Sabe-se que diversos fatores influenciam na FC, dentre eles destaca-se o sistema nervoso autônomo (através das ações simpáticas e parassimpáticas), regulando a expressão de proteínas relacionadas aos canais iônicos como ocorre com a regulação negativa do canal de sódio (Nav1.5) e a ação hormonal, como ocorre pelos HT (MITTAG, *et al.*, 2010; DILLMANN, 2002; SRIDHAR, *et al.*, 2019). Nosso grupo vem demonstrando a ação dos HT no coração, evidenciando o seu potencial para promover arritmias cardíacas (SILVA, *et al.*, 2016; LINO, *et al.*, 2015; TAVARES, *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que o NF- κ B é cardioprotetor durante hipóxia aguda e lesão de reperfusão (MUSTAPHA, *et al.*, 2000). No entanto, a ativação prolongada de NF- κ B parece ser prejudicial e promover insuficiência cardíaca ao provocar sinais que desencadeiam inflamação crônica, através da ativação da expressão de citocinas, incluindo fator de necrose tumoral α , interleucina-1 e interleucina-6, levando a respostas de estresse do retículo endoplasmático e morte celular (MAEKAWA, *et al.*,

2002; MISRA, *et al.*, 2003). Nosso grupo demonstrou que animais com inativação do NF- κ B no cardiomiócito, associado ao tratamento com hormônios tireoidianos, apresentaram atenuação da hipertrofia cardíaca, além disso, foi observado *in vitro* que o silenciamento da calgranulina S100A8 preveniu a hipertrofia induzida por T3 (TAKANO, *et al.* 2017).

O papel do NF- κ B no remodelamento e na função cardíaca ainda não está bem estabelecidos, por essa razão, o objetivo desse estudo foi tentar entender e contribuir na investigação da participação desse fator de transcrição na função cardíaca em coração isolado, submetidos ou não à injúria de I-R. Além disso, avaliar se a combinação do tratamento com T3, demonstrado anteriormente como um agente que melhora a função cardíaca no modelo de coração isolado (PANTOS, *et al.*, 2005; TAVARES, *et al.*, 2013; SILVA, *et al.*, 2016), com a inativação do NF- κ B desempenha alguma ação na determinação do fenótipo de hipertrofia e melhora dos parâmetros de função cardíaca.

Já se sabe que a ativação do NF- κ B regula transcrição de mais de 200 genes, principalmente os relacionados as respostas inflamatórias, o aumento da atividade desse fator de transcrição desempenha diferentes papéis no coração. Já foi demonstrado que a ativação aguda do NF- κ B no modelo de I-R por constrição do ramo descendente da artéria coronária desempenha papel cardio protetor em ratos, no mesmo modelo em condições crônicas, foi demonstrado que a exacerbação das respostas inflamatórias apresentou prejuízo no remodelamento e função cardíaca de ratos (CHANDRASEKAR, *et al.*, 1997; MISRA, *et al.*, 2003; HAMID, *et al.*, 2011).

Estudos clínicos mostraram que a ativação do NF- κ B está aumentada na insuficiência cardíaca humana e há uma associação entre a atividade reduzida do NF- κ B e o remodelamento cardíaco desses pacientes. O NF- κ B suprime a apoptose e favorece a sobrevivência celular em miócitos ventriculares de ratos isolados e após oclusão coronária permanente *in vivo*. No entanto, estudos farmacológicos apontam que o NF- κ B favorece a morte celular na lesão de I/R (IREM, *et al.*, 1991; SASAKI, *et al.*, 1999; MISRA, *et al.*, 2003; ONAI, *et al.*, 2004). Além disso, Timmers e cols (2009) mostrara, que a deleção do NF- κ B (subunidade p50) resulta em maior remodelação cardíaca e deterioração funcional após infarto do miocárdio, aumentando a remodelação da matriz e a inflamação (TIMMERS, *et al.*, 2009).

Brown e cols (2005) mostraram que os animais 3M bloqueiam completamente a ativação do NF- κ B após administração aguda de TNF- α e após lesão de I/R, o que

sugere que a fosforilação de I κ B α em Ser32/Ser36 é a via predominante para a ativação do NF- κ B. Após esses estímulos agudos, foi demonstrado ainda que a ativação do NF- κ B no coração contribui para a morte celular e infarto do miocárdio em resposta à lesão de I-R *in vivo* (BROWN, *et al.*, 2005). No entanto, nosso estudo não avaliou vias de morte celular.

Os animais 3M foram caracterizados quanto à função cardíaca por ecocardiografia; esses animais não apresentaram diferença estatística nos parâmetros de morfológicos e de função do coração. Ao realizar o protocolo de I-R por constricção do ramo descendente da artéria coronária, esses animais apresentaram diferença estatística frente à área infartada, demonstrando o papel cardioprotetor do NF- κ B no IAM (BROWN, *et al.*, 2005). É importante destacar que a inativação do NF- κ B nesses animais está presente desde o nascimento, o que pode resultar em uma adaptação ao longo do tempo.

A técnica de Langendorff é uma técnica sensível e que requer uma habilidade fina muito específica, principalmente quando realizada em camundongos. Essa técnica apresenta grande importância para compreensão de respostas isoladas quanto à mecânica cardíaca, bem como, respostas imediatas frente a algum estímulo, seja ele, farmacológico, lesão de isquemia-reperfusão ou apenas função fisiológica. Como descrito anteriormente, a função cardíaca sofre influência de diversos fatores: mecânicos, neurais e/ou humorais. Esse modelo de coração isolado permite a análise do coração sem estímulos extrínsecos. Visto isso, evidencia-se a importância da comprovação do bom funcionamento desse equipamento, antes da realização dos nossos experimentos. Neste sentido, realizamos previamente um teste de sensibilidade no equipamento, utilizando agonista beta-adrenérgico (isoproterenol), de forma aguda, e foi possível observar disfunção cardíaca acompanhada de aumento da frequência cardíaca, conforme esperado (dados não publicados).

Durante um período de aumento de demanda cardíaca, o coração busca estratégias de compensação para a manutenção da homeostase, dentre esses mecanismos de compensação, a frequência cardíaca exerce um papel fundamental, nosso estudo demonstrou o aumento da frequência cardíaca no período de estabilização nos animais do grupo selvagem tratado com T3, como já foi demonstrado anteriormente em ratos e em camundongos (PANTOS, *et al.*, 2005; TAVARES, *et al.*, 2013; SILVA, *et al.*, 2016). No entanto, o grupo com 3M hipertiroideo não apresentou essa característica no período de estabilização, apresentando assim,

uma possível participação de vias relacionadas a ativação do NF- κ B com a frequência cardíaca, nós investigamos a expressão gênica e protéica dos receptores Beta-adrenergicos do tipo 1 e 2, não apresentaram diferença significantes entre os grupos.

Curiosamente, após a isquemia global, os animais selvagens tratados com T3 retornaram a similaridade na porcentagem de recuperação com seu grupo controle, no entanto, o grupo 3M hipertiroideo apresentaram um aumento na frequência cardíaca no período de reperfusão, com isso, reforça ainda mais a participação do NF- κ B no cronotropismo cardíaco. Diversos estudos têm apontado para a possível participação do cálcio na recuperação pós-injúria isquêmica (ZHANG, *et al.*, 2005; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2011). A lesão cardíaca secundária à sobrecarga intracelular de Ca^{2+} tem sido indiretamente atribuída ao aumento da produção de TNF e conseqüentemente a ativação do NF- κ B, no entanto, ainda não foi estabelecida uma relação direta entre ativação de NF- κ B e o transiente de cálcio intracelular, o que se tem são relações indiretas que demonstraram a influência do NF- κ B na manutenção do cálcio em cardiomiócitos (ZHANG, *et al.*, 2005; ZHANG, *et al.*, 2013).

A utilização de um sistema de Langendorff que apresenta a possibilidade da manutenção do fluxo constante possibilita a análise do remodelamento das artérias coronárias, Nosso estudo não apresentou diferença estatística frente a pressão de perfusão, seja nos animais controles ou nos animais tratados com T3, independente da ativação ou não do NF- κ B, nosso grupo já demonstrou que o tratamento com T3 em ratos e em camundongos selvagens diminui a pressão de perfusão no período de estabilização, devido a ação vasodilatadora dos HT dependentes e independentes do endotélio vascular (TAVARES, *et al.*, 2013; SILVA, *et al.*, 2016).

Ainda não se sabe qual o papel do NF- κ B nas doenças cardiovasculares, e se a associação com outras estratégias farmacológicas podem prevenir ou reestabelecer os parâmetros de homeostase cardiovascular. Nosso estudo objetivou analisar os parâmetros de função cardíaca em coração isolado, sem a interferência de qualquer outro estímulo. No entanto, para que haja a melhor compreensão dos dados encontrados, faz-se necessário a realização de estudos de vias de morte celular, deposição de colágeno e acompanhamento de função cardiovascular *in vivo*, visto que, o NF- κ B é um fator de transcrição ubíquo e pleiotrópico, podendo assim desempenhar ações determinantes para a função cardíaca através de outros fatores que atuam direta ou indiretamente nos parâmetros de funcionais do coração, como por exemplo o SNA e o equilíbrio iônico.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e descritos neste estudo foi possível concluir que a inativação específica do NF-kB no cardiomiócito mantém os parâmetros de função cardíaca sem alteração, mesmo após o estímulo com elevados níveis de T3. No entanto, curiosamente, após infúria de isquemia-reperfusão, os animais com bloqueio do NF-kB no cardiomiócito apresentam aumento do cronotropismo cardíaco, o que poderá vir a ser futuro objeto de estudo.

REFERÊNCIAS

- Barboza, A. R. A.; Fazan Jr, R. Análise da variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial, em ratos, durante a anestesia por ketamina e xilazina, uretana ou isoflurano. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto - SP. 2022.
- Bergh, J. J.; Lin, H. Y.; Lansing, L.; Mohamed, S. N.; Davis, F. B.; Mousa, S.; Davis, P. J. Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. **Endocrinology**. n . 46, v. 7, p. 2864-71, 2005.
- Biondi, B.; Cooper, D. S. The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction. **Endocr Rev**. 2008.
- Brasier, A. R. The NF-kappaB regulatory network. **Cardiovasc Toxicol**. 6(2) 111-130. 2006.
- Brent, G. A. The molecular basis of thyroid hormone action. **N. Engl. J. Med.**, v. 331, n. 13, p.847-853, 1994.
- Brown, M.; Mcguinness, M.; Wright, T.; Ren, X.; Wang, Y.; Boivin, G. P.; Hahn, H.; Feldman, A. M.; Jones, W. K. Cardiac-specific blockade of NF- κ B in cardiac pathophysiology: differences between acute and chronic stimuli in vivo. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol*. v. 289. n. 3. p. 973-4. 2005.
- Carneiro-Ramos, M. S.; Diniz, G. P.; Nadu, A. P.; Almeida, J.; Vieira, R. L.; Santos, R. A.; Barreto-Chaves, M. L. Blockage of angiotensin II type 2 receptor prevents thyroxine-mediated cardiac hypertrophy by blocking Akt activation. **Basic Res Cardiol**. 2010
- Carrillo-Sepúlveda MA, Barreto-Chaves ML. Phenotypic modulation of cultured vascular smooth muscle cells: a functional analysis focusing on MLC and ERK1/2 phosphorylation. **Mol Cell Biochem**. v. 341, n. 1-2, p. 279-89, 2010.
- Chen, F.; Chen, Z. Q.; Zhong, G. L.; Zhu, J. J. Nicorandil inhibits TLR4/MyD88/NF kappaB/NLRP3 signaling pathway to reduce pyroptosis in rats with myocardial infarction. **Exp Biol Med (Maywood)**. 2021.
- Chiamolera, M. I.; Wondisford, F. E. Minireview: thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. **Endocrinology**, n. 150, p. 1091-1096, 2009.
- Da Silva, I. B. **The cardioprotective effect of thyroid hormone in ischemia reperfusion experimental model: role of renin angiotensin system**. [Ph.D. thesis (Morphofunctional Sciences)]. Sao Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo; 2016.
- Da Silva, I. B.; Gomes, D. A.; Alenina, N.; Bader, M.; Dos Santos, R. A.; Barreto-Chaves, M. L. M. Cardioprotective effect of thyroid hormone is mediated by AT2 receptor and involves nitric oxide production via Akt activation in mice. **Heart Vessels**. 2017.
- Davis, P. J.; Davis, F. B. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. **Thyroid**. v.12, n. 6, p. 459-66, 2002.
- Davis, P. J.; Leonard, J. L.; Davis, F. B. Mechanisms of nongenomic actions of

thyroid hormone. **Front Neuroendocrinol.** n. 29, p. 211–8, 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, n. 48, p. 38032-9, 2000.

De Vito, P.; Balducci, V.; Leone, S.; Percario, Z.; Mangino, G.; Davis, P. J.; Davis, F. B.; Affabris, E.; Luly, P.; Pedersen, J. Z.; Incerpi, S. Nongenomic effects of thyroid hormones on the immune system cells: New targets, old players. **Steroids.** v. 77, n. 10, p. 988-95, 2012.

Dillmann, W. H. Cellular Action of Thyroid Hormone on the Heart. **Thyroid.** v.12 n. 6. p.447-52, 2002.

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

Gruzdeva, O. V.; Borodkina, D. A.; Belik, E. V.; Akbasheva, O. E.; Palicheva, E. I.; Barbarash, O. L. [Ghrelin Physiology and Pathophysiology: Focus on the Cardiovascular System]. **Kardiologiia.** 2019.

Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. **J Clin Invest.** 123:92–100. 2013.

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

Huang, Y.; Hu, D.; Huang, C.; Nichols, C. G. Descoberta Genética de Canais de K + Sensíveis a ATP em Doenças Cardiovasculares. **Circ Arritmia Eletrofisiológica.** 2019.

Irem, S. O.; Eyer, C. L.; Smith, J. R.; Anderson, A. C. Efeitos protetores de compostos contendo sulfidril selecionados contra isquemia global em corações de ratos perfundidos isolados. **Proc West Pharmacol Soc.** 34 : 161–165, 1991.

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

Klein, I.; Ojamaa, K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. **N Engl J Med.**, 2001.

Kumar, R.; Yong, Q. C.; Thomas, C. M. Do multiple nuclear factor kappa B activation mechanisms explain its varied effects in the heart?. **Ochsner J.** 2013.

Langendorff, O. Untersuchungen an uberlebenden Säugethierherzen. **Pflügers Arch.** 1895.

Li, H.; Yang, H.; Wang, D.; Zhang, L.; Ma, T. Peroxiredoxin2 (Prdx2) reduces oxidative stress and apoptosis of myocardial cells induced by acute myocardial infarction by inhibiting the TLR4/nuclear factor kappa B (NF-kappaB) signaling pathway. **Med Sci Monit.** 2020.

Li, Y.; Ha, T.; Gao, X.; Kelley, J.; Williams, D. L.; Browder, I. W.; Kao, R. L.; Li, C. NF-kappaB activation is required for the development of cardiac hypertrophy in vivo. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2004.

- Lino, C. A.; Da Silva, I. B.; Shibata, C. E.; Monteiro, P.; Barreto-Chaves, M. L. Maternal hyperthyroidism increases the susceptibility of rat adult offspring to cardiovascular disorders. **Mol. Cell. Endocrinol.** p. 1–8, 2015.
- Maekawa, N.; Wada, H.; Kanda, T.; Niwa, T.; Yamada, Y.; Saito, K.; Fujiwara, H.; Sekikawa, K.; Seishima, M. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α . **J Am Coll Cardiol.** 2002
- Mao, K.; Chen, S.; Chen, M. *et al.* Nitric oxide suppresses NLRP3 inflammasome activation and protects against LPS-induced septic shock. **Cell Res.** 23, 201–212. 2013.
- Misra, A.; Haudek, S. B.; Knuefermann, P.; Vallejo, J. G.; Chen, Z. J.; Michael, L. H.; Sivasubramanian, N.; Olson, E. N.; Entman, M. L.; Mann, D. L. Nuclear factor- κ B protects the adult cardiac myocyte against ischemia-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. **Circulation** 108: 3075–3078, 2003.
- Mittag, J.; Davis, B.; Vujovic, M.; Arner, A.; Vennström, B. Adaptations of the autonomous nervous system controlling heart rate are impaired by a mutant thyroid hormone receptor- α 1. **Endocrinology.** v. 151. n. 5. p. 2388-95, 2010.
- Mustapha, S.; Kirshner, A.; De Moissac, D.; Kirshenbaum, L. A. A direct requirement of nuclear factor- κ B for suppression of apoptosis in ventricular myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2000.
- Nakamura, M.; Sadoshima, J. Mecanismos de hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica. **Nat Rev Cardiol** 15 , 387–407. 2018.
- Ogura, Y.; Ouchi, N.; Ohashi, K.; Shibata, R.; Kataoka, Y.; Kambara, T.; Kito, T.; Maruyama, S.; Yuasa, D.; Matsuo, K., *et al.* Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models. **Circulation.** 2012.
- Onai, Y.; Suzuki, J. I.; Kakuta, T.; Maejima, Y.; Haraguchi, G.; Fukasawa, H.; Muto, S.; Itai, A.; Isobe, M. Inhibition of I κ B phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. **Cardiovasc Res** 63: 51–19, 2004.
- Pantos, C.; Dritsas, A.; Mourouzis, I.; Dimopoulos, A.; Karatasakis, G.; Athanassopoulos, G.; Mavrogeni, S.; Manginas, A.; Cokkinos, D. V. Thyroid hormone is a critical determinant of myocardial performance in patients with heart failure: potential therapeutic implications. **Eur. J. Endocrinol.**, v. 157, n. 4, p. 515-520, 2007b.
- Pantos, C.; Mourouzis, I.; Saranteas, T.; Brozou, V.; Galanopoulos, G.; Kostopanagiotou, G.; Cokkinos, D. V. Acute T3 treatment protects the heart against ischemia-reperfusion injury via TR α 1 receptor. **Mol. Cell. Biochem.** p. 235–241, 2012.
- Pantos, C.; Paizis, I.; Mourouzis, I.; Moraitis, P.; Tzeis, S.; Karamanoli, E.; Mourouzis, C.; Karageorgiou, H.; Cokkinos, D. V. Blockade of angiotensin II type 1 receptor diminishes cardiac hypertrophy, but does not abolish thyroxin-induced preconditioning. **Horm Metab Res.** 2005.
- Pantos, C.; Xinaris, C.; Mourouzis, I.; Malliopoulou, V.; Kardami, E.; Cokkinos, D. V. Thyroid hormone changes cardiomyocyte shape and geometry via ERK signaling pathway: potential therapeutic implications in reversing cardiac remodeling? **Mol. Cell. Biochem.**, v. 297, n. 1-2, p. 65-72, 2007a.
- Park, S.; Nguyen, N. B.; Pezhouman, A.; Ardehali, R. Cardiac fibrosis: potential

therapeutic targets. **Transl Res.** 2019.

Polak-Iwaniuk, A.; Harasim-Symbor, E.; Gołaszewska, K.; Chabowski, A. Como a hipertensão afeta o metabolismo do coração. **Front Physiol.** 2019.

Roger, V. L.; Go, A. S.; Lloyd-Jones, D. M.; Adams, R. J.; Berry, J. D.; Brown, T. M.; Carnethon, M. R.; Dai, S.; De Simone, G.; Ford, E. S.; *et al.* Heart disease and stroke statistics-2011 update: A report from the American Heart Association. **Circulation.** 2011.

Rosignol, P.; Hernandez, A. F.; Solomon, S. D.; Zannad, F. Heart failure drug treatment. **Lancet.** 2019.

Sasaki, H.; Galang, N.; Maulik, N. Redox regulation of NF-kappaB and AP-1 in ischemic reperfused heart. **Antioxid Redox Signal.** 1: 317–324, 1999.

Satou, R.; Miyata, K.; Katsurada, A.; Navar, L. G.; Kobori, H. Tumor necrosis factor- α suppresses angiotensinogen expression through formation of a p50/p50 homodimer in human renal proximal tubular cells. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2010.

Scherer, D. C.; Brockman, J. A.; Chen, Z.; Maniatis, T.; Ballard, D. W. A degradação induzida por sinal de IkappaB-alfa requer ubiquitinação específica do local. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 92, p. 11259–11263, 1995.

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

Seo, D. Y.; Kwak, H. B.; Kim, A. H.; Park, S. H.; Heo, J. W.; Kim, H. K.; Ko, J. R.; Lee, S. J.; Bang, H. S.; Sim, J. W.; Kim, M.; Han, J. Cardiac adaptation to exercise training in health and disease. **Pflugers Arch.** 2020.

Su, Q.; Li, L.; Sun, Y.; Yang, H.; Ye, Z.; Zhao, J. Effects of the TLR4/Myd88/NF-kappaB signaling pathway on NLRP3 inflammasome in coronary microembolization-induced myocardial injury. **Cell Physiol Biochem.** 2018.

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

Takano, A. P.; Diniz, G. P.; Barreto-Chaves, M. L. AMPK signaling pathway is rapidly activated by T3 and regulates the cardiomyocyte growth. **Mol Cell Endocrinol.** v. 376, n. 1-2, p. 43-50, 2013.

Takano, A.P.C.; Munhoz, C.D.; Moriscot, A.S.; Gupta, S.; Barreto-Chaves, M.L.M. S100A8/MYD88/NF-B: a novel pathway involved in cardiomyocyte hypertrophy driven by thyroid hormone. **J. Mol. Med.** v. 95. n. 6. p. 671-682. 2017.

Tavares, F. M.; Da Silva, I. B.; Gomes, D. A.; Barreto-Chaves, M. L. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) is associated with increased tolerance of the hyperthyroid heart to ischemia-reperfusion. **Cardiovasc. Drugs. Ther.**, v. 27, n. 5, p. 393-402, 2013.

Timmers, L.; Van Keulen, J. K.; Hoefler, I. E.; Meijis, M. F.; Van Middelaar, B.; Den Ouden, K.; Van Echteld, C. J.; Pasterkamp, G.; De Kleijn, D. P. Targeted deletion of nuclear factor kappaB p50 enhances cardiac remodeling and dysfunction following myocardial infarction. **Circ Res.** 2009

Tranter, M.; Ren, X.; Forde, T.; Wilhide, M. E.; Chen, J.; Sartor, M. A.; Medvedovic,

- M.; Jones, W. K. NF-kappaB driven cardioprotective gene programs; Hsp70.3 and cardioprotection after late ischemic preconditioning. **J Mol Cell Cardiol** 49: 664–672, 2010.
- Tsibulnikov, S. Y.; Maslov, L. N.; Gorbunov, A. S.; Voronkov, N. S.; Boshchenko, A. A.; Popov, S. V.; Prokudina, E. S.; Singh, N.; Downey, J. M. Uma revisão dos fatores humorais no pré-condicionamento remoto do coração. **J Cardiovasc Pharmacol Ther.** 2019.
- Verma, S.; Fedak, P. W.; Weisel, R. D.; Butany, J.; Rao, V.; Maitland, A.; Li, R. K.; Dhillon, B.; Yau, T. M. Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist. **Circulation.** 105:2332–2336. 2002.
- Voorhees, A. P.; Han, H. C. Biomechanics of Cardiac Function. **Compr Physiol.** 2015.
- Wang, K.; You, S.; Hu, H.; Li, X.; Yin, J.; Shi, Y., *et al.* Effect of TLR4/MyD88/NF-kB axis in paraventricular nucleus on ventricular arrhythmias induced by sympathetic hyperexcitation in post-myocardial infarction rats. **J Cell Mol Med.** 2022.
- Wang, X. Z.; Yu, Z. X.; Nie, B.; Chen, D. M. Perindopril inhibits myocardial apoptosis in mice with acute myocardial infarction through TLR4/NF-kappaB pathway. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 2019.
- Wang, Y.; Hu, H.; Yin, J.; Shi, Y.; Tan, J.; Zheng, L. *et al.* TLR4 participates in sympathetic hyperactivity post-MI in the PVN by regulating NF-kappaB pathway and ROS production. **Redox Biol.** 2019.
- Wilhide, M. E.; Tranter, M.; Ren, X.; Chen, J.; Sartor, M. A.; Medvedovic, M.; Jones, W. K. Identification of a NF-kappaB cardioprotective gene program: NF-kappaB regulation of Hsp70.1 contributes to cardioprotection after permanent coronary occlusion. **J Mol Cell Cardiol** 51: 82–89, 2011
- Zhang, J.; Lazar, M. A. The mechanism of action of thyroid hormones. **Annu Rev Physiol**, n. 62, p. 439-466, 2000.
- Zhang, M.; Xu, Y. J.; Saini, H. K.; Turan, B.; Liu, P. P.; Dhalla, N. S. TNF-alpha as a potential mediator of cardiac dysfunction due to intracellular Ca²⁺-overload. **Biochem Biophys Res Commun** 327: 57–63, 2005
- Zhang, X. Q.; Tang, R.; Li, L.; Szucsik, A.; Javan, H.; Saegusa, N.; Spitzer, K. W.; Selzman, C. H. Cardiomyocyte-specific p65 NF-kB deletion protects the injured heart by preservation of calcium handling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2013
- Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. Calcium and cell death mechanisms: a perspective from the cell death community. **Cell Calcium** 50: 211–221, 2011