

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto De Ciências Básicas Da Saúde
Departamento De Fisiologia

Programa De Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

TESE DE DOUTORADO

**EFEITO DOS HORMÔNIOS DA TIREOIDE SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO, A BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO E A EXPRESSÃO
DE PROTEÍNAS PRÓ-APOPTÓTICAS NO CORAÇÃO DE RATOS
INFARTADOS**

Alexandre Luz de Castro

Porto Alegre, 29 outubro de 2015

Alexandre Luz de Castro

**EFEITO DOS HORMÔNIOS DA TIREOIDE SOBRE O ESTRESSE
OXIDATIVO, A BIODISPONIBILIDADE DO ÓXIDO NÍTRICO E A EXPRESSÃO
DE PROTEÍNAS PRÓ-APOPTÓTICAS NO CORAÇÃO DE RATOS
INFARTADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Fisiologia.

Orientador: Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Porto Alegre
2015

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento é a Deus por estar ao meu lado ao longo de toda esta trajetória.

Agradeço imensamente a minha família (Mãe, Pai, Fernanda, Judite, Larissa e os meus avós e tios) por todo o apoio nessa trajetória. Vocês são o bem mais precioso que eu tenho.

Agradeço a Larissa, minha companheira, minha amiga, meu amor já de muitos anos, pela presença e o apoio sempre constantes nessa caminhada. Agradeço também a sua família pelo apoio.

Agradeço ao meu orientador, Alex Sander da Rosa Araujo. O Alex foi mais que um orientador nestes anos de doutorado. Foi alguém que me apoiou nas minhas decisões e me deu suporte e orientação para que eu conseguisse realizar este trabalho com tranquilidade e serenidade. Obrigado pela oportunidade de ser teu orientado e obrigado por torceres por mim. Levo deste doutorado um amigo com quem eu sei que posso contar!

Agradeço a professora Adriane Belló-Klein por todo o apoio, pela confiança em meu trabalho e por ser um exemplo de pesquisadora, dedicada ao nosso laboratório e aos seus alunos.

Agradeço de forma especial a Angela por todos os ensinamentos e oportunidades que me proporcionou ao longo dessa caminhada. Este trabalho não seria possível sem a tua ajuda.

Agradeço aos colegas do laboratório (Rafael Colombo, Rafael Fernandes, Jéssica, Vanessa, Adriana, Rafaela, Tânia, Giana, Cristina, Carmem, Paulo Schenkel, Patrick, Denise, Bruna, Alexsandra, Rayane, Dalvana) por todos os momentos de descontração e de trabalho sério. Por toda a ajuda. Por estarem dispostos a me auxiliar finais de semana, fazendo isto sempre com muita boa vontade e amizade. Obrigado pela amizade que construímos ao longo desses anos.

Agradeço especialmente ao Rafael Fernandes, a Giana, a Vanessa e a Rafaela por me permitirem auxiliá-los em seus trabalhos, me permitindo aprender mais.

Agradeço aos funcionários do PPG Fisiologia, aos funcionários do CREAL, e demais setores do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, que contribuem para o andamento dos trabalhos.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERGS por apoiarem a realização deste trabalho de pesquisa.

RESUMO

Introdução: Após o infarto agudo do miocárdio, inicia no coração um processo de remodelamento mal-adaptativo, ocasionando dilatação ventricular, perda da espessura de parede e prejuízo na função cardíaca. Este quadro culmina com o desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Nesse processo, ocorre um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), uma diminuição na biodisponibilidade do óxido nítrico (NO) e uma maior expressão de proteínas pró-apoptóticas no tecido cardíaco. Em relação a isso, muitos estudos demonstram um efeito benéfico dos hormônios da tireoide, atenuando os mecanismos envolvidos na progressão do infarto para a insuficiência cardíaca. No entanto, não existem trabalhos avaliando se estes hormônios poderiam modular a geração de EROs ou a biodisponibilidade de NO no tecido cardíaco infartado. Não existem também dados na literatura avaliando se estes hormônios poderiam modular o processo de apoptose em um período após o infarto.

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração dos hormônios da tireoide sobre a morfologia e a função cardíaca, sobre parâmetros de estresse oxidativo e sobre parâmetros que avaliam a biodisponibilidade do NO, ao longo de 28 dias após o infarto. Além disso, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos dos hormônios da tireoide sobre a morfologia e a função cardíaca, sobre parâmetros de estresse oxidativo e sobre a expressão de proteínas relacionadas ao processo de apoptose no tecido cardíaco aos 14 dias pós-infarto.

Materiais e Métodos: Ratos Wistar machos foram divididos em quatro grupos: grupo sham (SHAM), grupo infarto (IAM), grupo sham tratado (SHAMT) e grupo infarto tratado (IAMT). Os animais dos grupos IAM e IAMT foram submetidos à cirurgia de infarto através da ligadura da artéria coronária, ao passo que os animais dos grupos SHAM e SHAMT foram submetidos a todas as etapas da cirurgia exceto à ligadura da artéria coronária. Os grupos SHAMT e IAMT receberam T3 e T4 nas doses de 2 e 8 µg/100g por dia, respectivamente, por gavagem, enquanto que os animais dos grupos SHAM e IAM receberam apenas salina. Aos 14 ou aos 28 dias após a cirurgia, os animais foram avaliados por ecocardiografia, foi realizada a coleta de sangue e os mesmos foram eutanasiados. O coração foi retirado para realização de análises morfométricas, bioquímicas e moleculares. Análise estatística: ANOVA de uma ou duas vias seguida dos pós-teste de Student-Newmann-Keuls. O projeto para a realização deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética No Uso de Animais da UFRGS sob o número de 23262.

Resultados e Discussão: Os animais do grupo IAM apresentaram, tanto aos 14 como aos 28 dias pós-infarto, dilatação da câmara cardíaca, perda da espessura de parede e diminuição da fração de ejeção, indicando o desenvolvimento de um remodelamento cardíaco mal-adaptativo. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo, 28 dias pós-infarto, os animais infartados apresentaram um aumento de 38% nos níveis de EROs, além de desequilíbrio redox e dano oxidativo à lipídios. Analisando os parâmetros de biodisponibilidade do NO, não houve modificações na atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS), na expressão da isoforma endotelial desta enzima (eNOS) e nem nos níveis de nitritos no coração destes animais. Já aos 14 dias pós-infarto, os animais IAM apresentaram um aumento de 111% e de 71% na expressão das proteínas pró-apoptóticas p53 e JNK, respectivamente, indicando uma maior sinalização para

a morte celular. A administração dos hormônios da tireoide no grupo IAMT promoveu efeitos benéficos sobre o remodelamento cardíaco, prevenindo a dilatação cardíaca e a perda da espessura de parede aos 28 dias pós-infarto. Além disso, o tratamento hormonal promoveu uma melhora em parâmetros de função cardíaca aos 14 e aos 28 dias pós-infarto. Em relação às análises de estresse oxidativo, o grupo IAMT não apresentou aumento nos níveis de EROs nem no dano oxidativo à lipídios. Nestes animais houve diminuição da expressão da enzima xantina oxidase, uma importante fonte de EROs no coração, 28 dias após o infarto. Além disso, este grupo apresentou aumento da atividade da NOS, bem como da expressão da eNOS, ocasionando um aumento nos níveis de nitritos no coração. O aumento nos níveis de NO juntamente com a diminuição nos níveis de EROs pode indicar uma melhora na biodisponibilidade do NO no coração dos animais IAMT, aos 28 dias pós-infarto. Além disso, estes animais apresentaram maior expressão da proteína PGC-1 α , um importante fator regulador do metabolismo mitocondrial no coração. Já aos 14 dias, os animais IAMT apresentaram menor expressão das proteínas p53 e JNK no tecido cardíaco, indicando um efeito benéfico dos hormônios da tireoide sobre a sinalização para apoptose.

Conclusão: O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que a administração dos hormônios da tireoide em ratos, ao longo de 28 dias após o infarto, apresenta efeitos positivos sobre parâmetros de estresse oxidativo no tecido cardíaco, além de melhorar parâmetros morfológicos e funcionais. Além disso, estes hormônios promovem um aumento na biodisponibilidade do NO no coração. Já em um período mais precoce pós-infarto (14 dias), essa administração hormonal também apresenta efeitos positivos sobre a morfologia e a função cardíaca, além de diminuir a expressão de proteínas envolvidas com a sinalização para apoptose. Estes resultados corroboram estudos prévios que demonstram efeitos benéficos da administração dos hormônios da tireoide no período pós-infarto.

ABSTRACT

Introduction: Myocardial infarction causes a remodeling process in the heart, leading to cardiac dilatation, loss of ventricular wall thickness and prejudice in the function. This scenario leads to the development of heart failure. In this process, there are an increased reactive oxygen species (ROS) levels, a decreased nitric oxide (NO) bioavailability and an induction of proapoptotic proteins expression in the heart. Several studies have demonstrated a positive effect of thyroid hormones, attenuating the progression of myocardial infarction to heart failure. However, there are no studies evaluating whether these hormones could modulate ROS generation or NO bioavailability in the heart tissue. Besides that, there are no data in the literature evaluating whether these hormones could affect the apoptotic process in an early period after infarction.

Aim: The aim of the present study was to evaluate the effect of thyroid hormones administration on parameters of cardiac morphology and function, on oxidative stress and on NO bioavailability parameters, 28 days after myocardial infarction in rats. Besides that, this study also aims to evaluate the effect of thyroid hormones on parameters of cardiac morphology and function, on parameters of oxidative stress and on the expression of proapoptotic proteins in the heart tissue, 14 days after myocardial infarction.

Material and Methods: Male Wistar rats were divided into four groups: Sham-operated (SHAM), infarcted (AMI), sham-operated + TH (SHAMT), and infarcted + TH (AMIT). The animals from SHAMT and AMIT received T3 (2 µg/100 g/day) and T4 (8 µg/100 g/day) by gavage. SHAM and AMI groups received saline by gavage. Echocardiographic parameters were assessed 14 and 28 days after the surgery. Blood was collected for hormonal measurements and heart was collected for morphometric, biochemical and molecular analysis. Statistic analysis: One or two way ANOVA with Student-Newmann-Keuls post-hoc test. The study and animal care procedures were approved by the Ethics Committee for animal research at UFRGS; process number 23262.

Results and Discussion: The animals in the AMI group showed cardiac dilatation, loss of ventricular wall thickness and decreased ejection fraction, in 14 and 28 days after infarction, indicating the development of a maladaptive cardiac remodeling. Regarding oxidative stress parameters, AMI animals showed increased ROS levels (38%), redox imbalance and oxidative damage to lipids, 28 days after the injury. In terms of NO bioavailability parameters, there were no changes in nitric oxide synthase (NOS) enzymatic activity, in the endothelial isoform of NOS (eNOS) expression or in nitrites levels in the heart of these animals. In 14 days post-infarction, AMI animals showed an increase in p53 (111%) and JNK (71%) expression, indicating higher signaling for cell death. In AMIT rats, thyroid hormones administration promoted benefic effects on cardiac remodeling, preventing the dilatation and the loss of ventricular wall thickness, 28 days post-infarction. In addition, the hormonal treatment promoted an improvement in cardiac function parameters, 14 and 28 days post-infarction. In relation to oxidative stress, the AMIT group did not show increase in ROS levels or in oxidative damage to lipids, 28 days after the infarction. These animals showed decreased xanthine oxidase expression, which is an important source of ROS in the heart. In addition, these animals present an increase in NOS activity and in eNOS expression, leading to higher nitrite levels in the heart. The increase in NO and the decrease in ROS levels may indicate an improvement in NO

bioavailability in the heart of AMIT animals at 28 days post-infarction. Moreover, these animals showed increased PGC-1 α expression, which is an important factor related with mitochondrial metabolism in the heart. In 14 days after the infarction, the AMIT group showed lower expression of p53 and JNK proteins in the cardiac tissue, indicating a benefic effect of thyroid hormones on signaling to apoptosis.

Conclusion: The present study showed, for the first time, that thyroid hormones administration has positive effects in terms of oxidative stress in the heart tissue and improve morphological and functional parameters. In addition, these hormones promote and increase in NO bioavailability in the heart, 28 days after the infarction. In an early period of cardiac injury (14 days), the hormonal administration presents positive effects in terms of cardiac morphology and function and decrease proapoptotic proteins expression. These results corroborate previous studies that showed a benefic effect of thyroid hormones after myocardial infarction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Desenho experimental dos **Estudos 1 e 2**.

Figura 2: Desenho experimental do **Estudo 3**.

Figura 3: Resumo esquemático dos achados do presente trabalho. Legenda: (IM) infarto do miocárdio; (↑) aumento; (↓) diminuição; (↔) sem modificação.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados ecocardiográficos, 14 dias pós-cirurgia.

Tabela 2: Parâmetros de estresse oxidativo, 14 dias pós-cirurgia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína cinase B
Bax	Proteína pró-apoptótica da família da Bcl-2
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica da família da Bcl-2
DITPA	Ácido 3,5-diiodotiropropiónico
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
ERK	Enzima cinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPx	Glutaciona peroxidase
GRX	Enzima glutarredoxina
GRX-3	Isoforma 3 da enzima glutarredoxina
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IM	Infarto do miocárdio
JNK 1/2	c-Jun N-terminal kinases
NO	Óxido nítrico
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
Nrf-2	Fator relacionado ao NF-E2
O ₂ ^{•-}	Ânion Superóxido
p38	P38 mitogen-activated protein kinases
p53	Proteína pró-apoptótica p53
PGC-1 α	Coativador 1- α do receptor gama ativador da proliferação de peroxissomos
SOD	Enzima superóxido dismutase
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TRX	Enzima tiorredoxina
TRX-1	Isoforma 1 da enzima tiorredoxina
TR α 1	Isoforma alfa do receptor nuclear dos hormônios da tireoide
TR β 1	Isoforma beta do receptor nuclear dos hormônios da tireoide
XO	Enzima xantina oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Infarto agudo do miocárdio e remodelamento cardíaco	13
1.2. Estresse oxidativo	14
1.2.1. Espécies reativas de oxigênio.....	14
1.2.2. Defesas antioxidantes e estresse oxidativo.....	16
1.3. Espécies reativas de oxigênio e infarto agudo do miocárdio	18
1.4. Óxido nítrico	19
1.5. Óxido nítrico e infarto agudo do miocárdio	21
1.6. Apoptose	22
1.7. Apoptose e infarto agudo do miocárdio	23
1.8. Hormônios da tireoide	24
1.9. Hormônios da tireoide e infarto agudo do miocárdio	25
2. HIPÓTESE	30
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos.....	30
4.0. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Animais.....	32
4.2. Grupos experimentais.....	32
4.3. Procedimentos cirúrgicos.....	33
4.4. Protocolo experimental.....	34
4.5. Análises ecocardiográficas.....	36
4.6. Análises hemodinâmicas.....	37
4.7. Morte dos animais e coleta de sangue e tecidos.....	37
4.8. Dosagem sérica de T4 e T3.....	38
4.9. Índices de hipertrofia cardíaca.....	38
4.10. Índices de congestão pulmonar e hepática.....	39
4.11. Análises Bioquímicas.....	39
4.11.1. Medida de peróxido de hidrogênio.....	39
4.11.2. Medida de espécies reativas de oxigênio totais.....	39
4.11.3. Determinação da concentração de GSH e GSSG.....	39
4.11.4. Atividade da enzima glutathione peroxidase.....	40
4.11.5. Atividade da enzima superóxido dismutase.....	40
4.11.6. Atividade da enzima catalase.....	40
4.11.7. Atividade da enzima óxido nítrico sintase.....	40
4.11.8. Atividade da enzima glutarredoxina.....	41
4.11.9. Atividade da enzima tioredoxina redutase.....	41
4.11.10. Determinação dos níveis de nitritos totais.....	41
4.11.11. Determinação da peroxidação lipídica.....	41
4.11.12. Dosagem de proteínas.....	42
4.12. Análise da expressão proteica por Western blot.....	42
4.13. Análise estatística.....	43
4.14. Descarte de materiais biológicos e químicos.....	43
4.15. Considerações éticas.....	44
5. RESULTADOS	45
5.1. Artigo I.....	46
5.2. Artigo II.....	71
5.3. Artigo III.....	95
5.4. Resultados do estudo 3 não submetidos para a publicação.....	119

5.4.1. Resultados de morfologia e função cardíaca dos animais aos 14 dias pós- infarto.....	119
5.4.2. Parâmetros de estresse oxidativo no tecido cardíaco aos 14 dias pós- infarto.....	121
6. DISCUSSÃO.....	122
7. CONCLUSÃO.....	130
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
9. ANEXOS.....	140

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infarto agudo do miocárdico e remodelamento cardíaco

No Brasil, as doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade (DATASUS 2012). Entre essas doenças, destaca-se o infarto agudo do miocárdio, como a principal causa de morte isolada no país (DATASUS 2012). Além disto, esta doença isquêmica é responsável por grande parte dos casos de insuficiência cardíaca, um problema de saúde pública que acarreta muitos custos para o Sistema Único de Saúde (SUS) (DATASUS 2012).

O infarto do miocárdio (IM) é uma cardiopatia isquêmica e ocorre por uma deficiência na perfusão do tecido cardíaco, levando à necrose dos cardiomiócitos (PFEFFER *et al.*, 1985). Em resposta a esta lesão isquêmica, o tecido cardíaco necrótico é substituído por tecido cicatricial, fazendo com que as células cardíacas remanescentes sejam expostas a uma maior carga de trabalho. O aumento da demanda sobre estas células desencadeia, então, uma resposta de hipertrofia adaptativa, visando à manutenção do débito cardíaco (FRANCIS *et al.*, 2001; LIBBY *et al.*, 2007). Simultaneamente a este processo inicial de remodelamento cardíaco, os cardiomiócitos passam a expressar genes do período fetal, os quais permitem uma maior economia de energia (ALPERT *et al.*, 2002). No entanto, o longo período de hipertrofia pós-infarto mostrou-se estar relacionado ao posterior desenvolvimento de um remodelamento mal adaptativo, levando à disfunção ventricular e à progressão para a insuficiência cardíaca (PFEFFER *et al.*, 1985). Nessa situação, os cardiomiócitos remanescentes sofrem apoptose, ocasionando disfunção contrátil do coração (BAINES *et al.*, 2005). Além disso, a morte dessas células leva a uma redução da espessura das paredes ventriculares e ao processo de dilatação, dois fatores que acabam por aumentar o estresse de parede da câmara cardíaca (GROSSMAN *et al.*, 1975; PANTOS *et al.*, 2008). O conjunto destas alterações estruturais e funcionais resulta no aumento do risco de desenvolvimento de arritmias e de tromboembolismo e na progressão para a insuficiência cardíaca congestiva (FRANCIS *et al.*, 2001; LIBBY *et al.*, 2007).

Para o estudo experimental da insuficiência cardíaca pós-infarto, John & Olson, e posteriormente Pfeffer e colaboradores, desenvolveram e

aperfeiçoaram a cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior em ratos (JOHN & OLSON, 1954; PFEFFER *et al.*, 1985). Através deste modelo em animais, é possível estudar as diferentes etapas do processo de remodelamento cardíaco e a progressão para a insuficiência cardíaca (SCHENKEL *et al.*, 2010; TAVARES *et al.*, 2012). Um estudo avaliando ratos infartados, 28 dias após a injúria, demonstrou que os mesmos apresentavam diminuição significativa da fração de ejeção do ventrículo esquerdo e dilatação cardíaca, juntamente com alterações hemodinâmicas na pressão sistólica e na pressão diastólica final da câmara esquerda (PANTOS *et al.*, 2010, SCHENKEL *et al.*, 2012;). Neste período pós-infarto (28 dias) é possível também evidenciar hipertrofia cardíaca e congestão pulmonar nestes animais (SCHENKEL *et al.*, 2010). Estudos realizados em ratos aos 14 dias pós-infarto demonstraram resultados semelhantes em termos de alterações em parâmetros ecocardiográficos e hemodinâmicos (PANTOS *et al.*, 2007). Cabe salientar, no entanto, que neste período mais precoce pós-infarto (14 dias), os animais não apresentaram hipertrofia do ventrículo esquerdo (PANTOS *et al.*, 2007). Outros estudos em ratos também demonstram diferenças morfológicas e funcionais do coração entre um período precoce e um período mais tardio pós-infarto (SCHENKEL *et al.*, 2012). Estes dados salientam a importância de avaliar o remodelamento cardíaco em diferentes momentos pós-injúria. Em relação a este processo de remodelamento, muitos estudos tem avaliado também a influência das espécies reativas de oxigênio e do estresse oxidativo nas diferentes etapas da progressão do infarto para a insuficiência cardíaca (SINGH *et al.*, 1985; SCHENKEL *et al.*, 2012).

1.2. Estresse oxidativo

1.2.1. Espécies reativas de oxigênio

Os radicais livres são espécies químicas capazes de existir de forma independente, que contêm um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Por esse motivo, os mesmos sofrem uma atração por campos magnéticos, o que pode torná-los altamente reativos, capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, tendo uma função

oxidante ou redutora (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Os radicais livres podem ser formados pela adição de um elétron a um elemento não radical ou através da quebra homolítica de uma ligação covalente (SYMONS, 1996). As espécies químicas geradas a partir do oxigênio são, coletivamente, denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs). A molécula de O_2 é considerada um radical livre, pois a mesma possui dois elétrons desemparelhados, os quais estão em spins paralelos. Nesse sentido, o oxigênio é um potente agente oxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Essas espécies são continuamente produzidas no organismo durante o metabolismo celular e podem desempenhar funções fisiológicas importantes quando em concentrações baixas ou moderadas. As principais fontes de radicais livres são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Nesse sentido, o metabolismo mitocondrial é uma importante fonte de EROs nas células. O processo de redução do oxigênio a água ocorre em grande escala na mitocôndria, e é realizado com a participação da enzima citocromo oxidase (BABCOCK, 1999). O oxigênio, no entanto, pode sofrer uma redução univalente, recebendo apenas um elétron. Nesse processo, pode ocorrer a formação de outra forma de ERO, o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A adição de outro elétron a esse anion leva, por sua vez, à formação do íon peróxido (O_2^{-2}), gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esta reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio, na presença de metais, tais como os íons Fe^{+2} , pode sofrer uma reação não enzimática chamada reação de Fenton, gerando uma das mais potentes EROs, o radical hidroxila ($\cdot OH$) (FRIDOVICH, 1995).

As EROs são capazes de desfazer ligações entre átomos de carbono e hidrogênio presentes em ácidos graxos poliinsaturados. Ao reagirem com essas moléculas, deixam-nas com elétrons desemparelhados, gerando o radical peroxil. Esses radicais são reativos o suficiente para oxidar outros lipídios insaturados adjacentes, presentes nas membranas celulares, gerando uma reação em cadeia. Esse processo é conhecido como peroxidação lipídica (FAM e MORROW, 2003). As consequências da peroxidação lipídica são a diminuição na fluidez da membrana celular, o aumento da sua permeabilidade e danos a proteínas, receptores e canais iônicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984). A continuação do processo de oxidação das cadeias de ácidos graxos presentes

nos fosfolípidios de membrana pode levar a perda da integridade da membrana celular, assim como da membrana de organelas, tais como lisossomos e mitocôndria (FAM e MORROW, 2003). O dano lipídico na membrana mitocondrial promove a formação de poros nessa membrana, os quais estão associados à liberação de fatores pró-apoptóticos, levando à morte celular (TRACHOOTHAM *et al.*, 2008).

1.2.2. Defesas antioxidantes e estresse oxidativo

Por causa dos danos do processo oxidativo, os organismos aeróbicos desenvolveram um conjunto complexo de sistemas antioxidantes para controlar essas reações e reparar ou substituir as moléculas danificadas. As defesas antioxidantes existentes são constituídas de elementos enzimáticos e não-enzimáticos (DEAN e JONES, 2006). Entre as defesas enzimáticas existentes, uma importante defesa é a enzima superóxido dismutase (SOD). Em animais, há duas isoformas dessa enzima: uma isoforma que contém sítios de ligação ao manganês, presente na matriz mitocondrial, e outra que contém sítios de ligação ao cobre e ao zinco, presente no citosol. Essas enzimas são responsáveis pela conversão do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (FRIDOVICH, 1995). O H_2O_2 , por sua vez, é metabolizado pela enzima catalase, outra importante enzima antioxidante, gerando H_2O e O_2 . Esse processo é importante, pois previne a formação do radical OH^\cdot , através das reações de Fenton ou de Haber-Weiss (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Outras proteínas antioxidantes importantes para os sistemas biológicos são a peroxirredoxina (PRX), a tiorredoxina (TRX) e a glutarredoxina (GRX) (RHEE *et al.*, 2005). A PRX atua na remoção do peróxido de hidrogênio, visto que essa espécie reativa é capaz de oxidar os grupos tiólicos dessa proteína. Nesse processo, o H_2O_2 é reduzido e a PRX é recuperada através da redução dos seus grupos tiólicos pela TRX. Este processo gera tiorredoxina oxidada, a qual é regenerada pela enzima tiorredoxina redutase (RHEE *et al.*, 2005). Em mamíferos, é possível encontrar uma isoforma citoplasmática da enzima tiorredoxina (TRX 1) e uma isoforma mitocondrial (TRX 2) (BERNDT *et al.*, 2007). Semelhante à TRX, a enzima GRX também é essencial para a recuperação de grupos tiólicos presentes em resíduos de cisteína de diversas proteínas celulares (TAO *et al.*, 2006). Esta

enzima pode catalisar tanto a formação como a redução de dissulfetos (S-S) mistos entre estes grupos tióis proteicos e a forma reduzida do tripeptídeo glutaciona (GSH). Em mamíferos, existem três isoformas desta enzima, que são as seguintes: GRX1 e GRX 3 (isoformas citoplasmática) e GRX2 (isoforma mitocondrial) (BERNDT *et al.*, 2007).

Em relação à expressão destas enzimas antioxidantes, a mesma pode ser controlada pelo fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2) (FERNANDES *et al.*, 2015). Em relação a isso, a geração de EROs pode levar a ativação do Nrf2 (ISHII, 2000 ; FERNANDES *et al.*, 2015). Este fator de transcrição encontra-se no citoplasma associado a proteína Keap1, a qual inibe a sua translocação para o núcleo. Na presença de EROs, ocorre a oxidação dos resíduos de cisteína da proteína Keap1, a qual se dissocia do Nrf2, permitindo a migração deste fator para o núcleo. A ligação do Nrf2 com sequências gênicas denominadas elementos responsivos aos antioxidantes (do inglês *antioxidant responsive elements* ou ARE) promove a transcrição de diversas enzimas antioxidantes essenciais para o equilíbrio redox da célula (ISHII, 2000).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, existem também nas células as defesas antioxidantes não-enzimáticas (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2006). Entre as defesas antioxidantes não-enzimáticas, o tripeptídeo glutaciona é um dos principais mecanismos de remoção do peróxido de hidrogênio e de outros radicais livres. Composta por aminoácidos que contêm grupos tióis (glutamato, cisteína e glicina), a GSH sofre a ação da enzima glutaciona peroxidase (GPx), sendo convertida em glutaciona oxidada (GSSG). Nessa reação ocorre a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, protegendo a célula do dano oxidativo gerado por essa espécie reativa (BRIGELIUS-FLOHE 1999). Através da enzima glutaciona redutase (GR), ocorre, posteriormente, à transferência de elétrons para a GSSG, dessa forma recuperando a GSH (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2006). Além da glutaciona, outras defesas não enzimáticas são a vitamina C e a vitamina E (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2006).

Nesse contexto, o estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento significativo da concentração intracelular de espécies oxidantes, acompanhado simultaneamente pela diminuição das defesas antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). O mesmo pode, também, ser definido como um

desequilíbrio entre fatores pró-oxidantes e antioxidantes, com um aumento dos primeiros, levando a um potencial dano à célula (SIES, 1991). Diferentes estudos mostram que as alterações no estado redox contribuem para muitas consequências do envelhecimento e para muitos processos patológicos, incluindo doenças cardiovasculares (SANTILLI *et al.*, 2015), doenças pulmonares (COLOMBO *et al.*, 2015), diabetes (ROBERTSON e HAMON, 2006), doenças neurodegenerativas (BAHT *et al.*, 2015) e câncer (PINTI *et al.*, 2015).

1.3. Espécies reativas de oxigênio e infarto agudo do miocárdio

Após o infarto agudo do miocárdio, estudos demonstraram um aumento da produção de EROs e a geração de estresse oxidativo no tecido cardíaco (SINGH *et al.*, 1985; SCHENKEL *et al.*, 2012). A injúria isquêmica leva à degradação do conteúdo celular de adenosina trifosfato, deixando os carreadores de elétrons da mitocôndria em um estado reduzido. Neste contexto, ocorre um desvio de elétrons da cadeia respiratória, os quais reagem com o oxigênio mitocondrial, levando à produção de espécies reativas (SINGH *et al.*, 1985).

Trabalhos avaliando a progressão do infarto para a insuficiência cardíaca demonstram um papel relevante das EROs neste processo (HILL *et al.*, 2005; SCHENKEL *et al.*, 2012). Em um estágio compensado do remodelamento cardíaco, a reserva antioxidante tecidual é aumentada, enquanto que, em um estágio descompensado/insuficiente do remodelamento do músculo cardíaco, essa reserva encontra-se reduzida. Essa redução compromete o balanço redox, e conseqüentemente, favorece o estresse oxidativo (SINGAL *et al.* 1999). Corroborando com isso, um estudo avaliando um período precoce pós-infarto (2 dias após a injúria) demonstrou níveis reduzidos de H₂O₂ no tecido cardíaco, provavelmente em função de um aumento adaptativo da enzima TRX-1. No entanto, em um período mais tardio (28 dias pós-infarto), houve uma redução na expressão da TRX-1, levando a um aumento dos níveis de EROs e ao dano oxidativo cardíaco (SCHENKEL *et al.* 2012).

Os níveis elevados de EROs, após o infarto, estão diretamente relacionados com os processos de fibrose cardíaca, de hipertrofia e de apoptose dos cardiomiócitos (ZHANG *et al.*, 2012). Em relação à fibrose, um estudo demonstrou o papel dessas espécies reativas na modulação de fibroblastos e na

síntese de colágeno no tecido cardíaco pós-infarto, promovendo o processo de remodelamento da matriz extracelular (SIWIK *et al.*, 2004). Além disso, proteínas envolvidas com o processo de hipertrofia cardíaca pós-injúria isquêmica, tais como a enzima cinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) e a proteína cinase B (AKT/PKB), são diretamente moduladas pelos níveis de H₂O₂ (SCHENKEL *et al.*, 2010). Em relação ao processo de morte celular, baixas concentrações de H₂O₂ são capazes de ativar vias de sobrevivência nos cardiomiócitos, enquanto que altas concentrações podem ativar proteínas envolvidas com o processo de apoptose, tais como a enzima JNK (c-Jun N-terminal kinases) e as proteínas p38 e p53 (KUSTER *et al.*, 2005; CHATTERJEE *et al.*, 2010).

Uma importante fonte de EROs no coração infartado é a enzima xantina oxidoreductase (NISHINO *et al.*, 2008). Esta enzima pode existir nas seguintes formas: xantina desidrogenase e xantina oxidase (XO). Apenas a forma XO é capaz de gerar espécies reativas, produzindo mais O₂^{•-} ou H₂O₂ dependendo de fatores como hipóxia, dano celular, etc. (KELLEY *et al.*, 2010). Estudos em modelos animais de infarto e em pacientes com insuficiência cardíaca demonstraram que a inibição da XO é capaz de melhorar parâmetros de remodelamento cardíaco (SAAVEDRA *et al.*, 2002, MINHAS *et al.*, 2006).

Além das espécies reativas de oxigênio, o óxido nítrico (NO) é outra molécula considerada essencial para a homeostase do sistema cardiovascular (BAUERSACHS *et al.*, 1999). Esta molécula é considerada uma espécie reativa de nitrogênio e apresenta importantes implicações para o coração pós-infarto (HEUSCH *et al.*, 2000).

1.4. Óxido nítrico

A síntese do NO ocorre nas células endoteliais dos vasos sanguíneos através da oxidação da região n-terminal do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico síntase (NOS), resultando no aminoácido L-citrulina e em NO (HEUSCH *et al.*, 2000). Os principais estímulos para a síntese do NO são a ativação de receptores de mediadores químicos, tais como a acetilcolina e a bradicinina, nas células endoteliais, ou o aumento no estresse de cisalhamento do vaso. Estas situações levam a ativação da isoforma endotelial da enzima

NOS (eNOS), a qual fica ancorada na membrana plasmática da célula endotelial (LI *et al.*, 2002). Após a sua síntese, o NO é capaz de se difundir das células endoteliais em direção às células da musculatura lisa dos vasos. Nestas células, esta molécula interage com o grupo heme da enzima guanilato ciclase, ativando-a e gerando a síntese de guanosina monofosfato cíclico, um importante segundo mensageiro intracelular. A síntese desta molécula resulta em uma menor liberação de cálcio do retículo endoplasmático, levando ao relaxamento da célula muscular lisa do vaso e à vasodilatação (FORSTERMANN *et al.*, 2004).

Em relação à enzima NOS, além da isoforma endotelial (eNOS ou tipo III), existem outras duas isoformas importantes, que são as seguintes: a NOS induzível (iNOS ou tipo II) e a NOS neuronal (nNOS ou tipo I). Destas isoformas, a nNOS está presente principalmente em células nervosas, enquanto que a iNOS é produzida em macrófagos e outras células do sistema imune, tendo a sua expressão induzida por citocinas (FORSTERMANN *et al.*, 1994; LI *et al.*, 2002).

Além de suas funções nos vasos sanguíneos, tais como o efeito vasodilatador, o efeito antiplaquetário, a ação inibitória sobre a agregação de monócitos e neutrófilos no endotélio e o efeito antiproliferativo, o NO também apresenta um efeito antioxidante, estimulando a expressão da enzima SOD e, conseqüentemente, reduzindo os níveis do ânion superóxido (FORSTERMANN *et al.*, 2006). Além disso, Cote e colaboradores demonstraram o papel inibitório do NO sobre a atividade da enzima xantina oxidase, uma importante fonte de espécies reativas no coração (COTE *et al.*, 1996). Este é um efeito protetor, uma vez que altos níveis de espécies reativas de oxigênio podem levar a uma maior degradação do NO, podendo acarretar em um prejuízo importante para a função vascular (BAUERSACHS *et al.*, 1999). Por outro lado, ao combinar-se com o ânion superóxido, o NO é convertido a peróxido nítrico, um potente agente oxidante, podendo levar a um dano celular (FORSTERMANN *et al.*, 2006). O balanço entre os níveis de NO e os níveis de espécies reativas de oxigênio podem, portanto, determinar a biodisponibilidade do NO (ARAUJO *et al.*, 2011).

1.5. Óxido nítrico e infarto agudo do miocárdio

Além de sua ação protetora sobre o vaso, o NO apresenta importantes ações sobre o tecido cardíaco, principalmente no contexto da doença isquêmica (HEUSCH *et al.*, 2000). No coração, o NO é capaz de regular a função dos cardiomiócitos, a vascularização e a perfusão tecidual. Em condições fisiológicas, a enzima eNOS é a principal fonte de NO para o tecido cardíaco. No entanto, após o infarto ocorre uma redução significativa da biodisponibilidade do NO sintetizado pela eNOS (HEUSCH *et al.*, 2000). Este quadro leva à disfunção endotelial da circulação coronariana e ao prejuízo na angiogênese cardíaca (SHI *et al.*, 2012). Este cenário foi associado a uma maior progressão do infarto do miocárdio para a insuficiência cardíaca (SHI *et al.*, 2012). Corroborando com isto, um estudo em camundongos infartados *knockout* para enzima eNOS demonstrou um aumento no diâmetro sistólico e no volume diastólico do coração destes animais, assim como um prejuízo significativo na função sistólica e na contratilidade do ventrículo esquerdo, em comparação com os animais que expressavam normalmente esta enzima (SCHERRER-CROSBIE *et al.*, 2001). Além disso, os animais *knockout* apresentaram não somente menor densidade capilar, mas também hipertensão arterial pulmonar (SCHERRER-CROSBIE *et al.*, 2001).

Em animais infartados, estudos demonstram que o aumento na expressão da enzima eNOS ocasiona efeitos protetores sobre o coração (BRUNNER *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2005). Em ratos infartados, uma maior expressão da eNOS resultou em uma menor geração de ânion superóxido, através da inibição da atividade da enzima NADPH oxidase. Além disso, estes animais apresentaram um melhor remodelamento cardíaco e uma menor expressão de proteínas pró-apoptóticas (SMITH *et al.*, 2005). Em um estudo que realizou o transplante de células-tronco derivadas de adipócitos que superexpressavam a eNOS no tecido cardíaco evidenciou-se uma melhora na vascularização coronária dos animais infartados, resultando em uma redução significativa na área de infarto (SHI *et al.*, 2012).

Além de suas ações sobre a vascularização e o estresse oxidativo cardíaco, o NO também é capaz de atuar sobre a função mitocondrial, estimulando a expressão do coativador 1- α do receptor gama ativador da

proliferação de peroxissomos (PGC-1 α) (NISOLI *et al.*, 2003). Este é um fator de transcrição importante para os cardiomiócitos, uma vez que ele é um potente promotor da biogênese mitocondrial (NISOLI *et al.*, 2003). A sua maior expressão está relacionada com uma redução na apoptose das células cardíaca (FORINI *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2015) e com uma melhora sobre o remodelamento cardíaco pós-infarto (FORINI *et al.*, 2011).

1.6. Apoptose

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo fisiológico muito importante para a regulação do número de células de um tecido, assim como para a eliminação de células velhas ou danificadas (WHELAN *et al.*, 2010). Nesta forma de morte celular, as células sofrem um processo de fragmentação, o qual não gera inflamação tecidual (WHELAN *et al.*, 2010).

O processo de apoptose pode ser ativado por duas vias, quais sejam: a via extrínseca, ativada pela interação de ligantes com receptores de membrana, e a via intrínseca, ativada por proteínas presentes na mitocôndria ou no retículo endoplasmático (WHELAN *et al.*, 2010). Em relação à via intrínseca, a ativação de proteínas da família bcl-2 controla a permeabilidade da membrana mitocondrial, impedindo que fatores pró-apoptóticos saiam da mitocôndria para o citoplasma da célula (ASSALY *et al.*, 2012). Caso haja um dano à membrana mitocondrial, a proteína pró-apoptótica bax pode ocasionar a liberação do citocromo c. Este é um fator pró-apoptótico, responsável por ativar a via das caspases e ocasionar a apoptose (ASSALY *et al.*, 2012). A proteína mitocondrial bcl-2, no entanto, é um fator antiapoptótico, responsável por impedir a liberação do citocromo c da mitocôndria. O balanço entre as proteínas bax e bcl-2, portanto, é um importante parâmetro para determinar a ativação ou não da via intrínseca (BAINES, 2010).

Outras proteínas pró-apoptóticas são a p53 e a JNK. A proteína p53 é codificada por um gene supressor de tumor e pode ser ativada por estímulos como o dano ao DNA, a hipóxia e o estresse oxidativo. Esta proteína é capaz de ativar a bax e iniciar a via intrínseca da apoptose (SAHA *et al.*, 2015). A proteína JNK, por sua vez, pode ser ativada diretamente pela p53 ou também pelo

estresse oxidativo celular. Esta enzima cinase é capaz de fosforilar a proteína bax, ativando a apoptose (MIYASHITA *et al.*, 1995; SAHA *et al.*, 2015).

1.7. Apoptose e infarto agudo do miocárdio

Estudos demonstram um papel central da via intrínseca da apoptose na fisiopatologia do infarto agudo do miocárdio. Em relação a isso, Chen e colaboradores demonstraram que a maior expressão da proteína bcl-2 está relacionada à redução significativa da área de infarto e da disfunção cardíaca em um modelo animal de isquemia e reperfusão (CHEN *et al.*, 2001). Além disso, outro estudo mostrou que a deleção do gene da proteína bax ocasionou uma menor área de infarto em camundongos (HOCHHAUSER *et al.*, 2007). Em relação às proteínas JNK e p53, um trabalho evidenciou, minutos após o infarto, um aumento na expressão de ambas as proteínas pró-apoptóticas, tanto no tecido cardíaco isquêmico como no não isquêmico (YOSHIDA *et al.*, 2001). Esta expressão aumentada, após o infarto, foi correlacionada com maior apoptose dos cardiomiócitos, levando à dilatação cardíaca e a um remodelamento mal-adaptativo (MATSUMOTO-IDA *et al.*, 2006).

No momento inicial após o infarto, os cardiomiócitos da zona próxima à lesão se encontram mais suscetíveis à apoptose. Com o tempo, as células cardíacas da zona mais remota ao infarto também passam a apresentar uma maior tendência à morte celular programada (OLIVETTI *et al.*, 1996; BUSSANI *et al.*, 2003). Em relação a isso, a taxa de apoptose nas primeiras semanas após o infarto parece ser preditiva da severidade do remodelamento cardíaco patológico e, conseqüentemente, da insuficiência cardíaca. Quanto maior esta taxa, pior é este processo de remodelamento (ABBATE *et al.*, 2002).

Apesar da importância do processo de apoptose para a progressão do infarto para a insuficiência cardíaca, existem poucos agentes terapêuticos para doença cardíaca capazes de atuar sobre o processo de morte programada do cardiomiócito. Nesse sentido, diversos trabalhos demonstram um papel positivo dos hormônios da tireoide, atuando como um agente terapêutico no período pós-infarto (PANTOS *et al.*, 2008; FORINI *et al.*, 2014).

1.8. Hormônios da tireoide

A tireoide é uma das maiores glândulas endócrinas e é responsável pela síntese de três hormônios: T4 (tiroxina ou tetraiodotironina), T3 (triiodotironina) e a calcitonina. O T4 representa o principal hormônio liberado por essa glândula, apesar de possuir uma potência biológica inferior ao T3 (KOHRLER, 2000). Por esse motivo, o T4 é transformado periféricamente em T3 através das enzimas deiodinases, presentes nas células-alvo desses hormônios (KOHRLER, 2000). Os hormônios da tireoide, por sua natureza lipofílica, são capazes de atravessar a membrana plasmática e interagir com receptores nucleares. A ligação do T3 a esses receptores leva ao recrutamento de proteínas co-ativadoras da transcrição gênica, levando ao aumento na expressão de inúmeros genes (YEN *et al.*, 2006). Os genes responsivos a esses hormônios possuem sequências de nucleotídeos em sua região promotora, denominadas elementos de resposta aos hormônios da tireoide (TRE) (BASSET *et al.*, 2003). Os receptores nucleares dos hormônios da tireoide (TRs) são codificados por dois genes, TR α e TR β . Esses genes levam à síntese de diferentes isoformas do receptor nuclear (α 1, β 1, β 2 e β 3) que variam conforme o tecido em que estão sendo expressas (BASSET *et al.*, 2003).

Os hormônios da tireoide possuem importantes ações no tecido cardíaco, podendo ocasionar modificações hemodinâmicas, tais como a redução da resistência vascular sistêmica, o aumento da contratilidade cardíaca e do débito cardíaco (KLEIN e OJAMAA, 2001). Muitos dos efeitos destes hormônios sobre os cardiomiócitos ocorrem não somente pela modulação na expressão gênica, mas também pela ação mediada por receptores de membrana (KLEIN e OJAMAA 2001). Estudos avaliando a expressão gênica em células musculares cardíacas demonstraram a influência da tiroxina na expressão de proteínas importantes para o processo contrátil, tais como a bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático, a proteína fosfolambam, os receptores de rianodina e a cadeia pesada da miosina (KAHALY e DILLMANN, 2005). Esses hormônios são igualmente importantes no processo de maturação do miocárdio durante a fase de desenvolvimento fetal (PANTOS *et al.*, 2008).

1.9. Hormônios da Tireoide e Infarto Agudo do miocárdio

Um fenômeno bem descrito na literatura médica é que, na primeira semana após o infarto, muitos pacientes apresentam um rápido declínio nos níveis séricos de T3, desenvolvendo a chamada síndrome do eutireoidiano doente ou síndrome do baixo T3 (GERDES e IERVASI, 2010). Nestes pacientes, os níveis séricos de T3 reverso encontram-se aumentados e os níveis de T4 normais. Esta redução nos níveis de T3 foi correlacionada com uma maior mortalidade e com um pior prognóstico após o infarto (COCEANI *et al.*, 2009). Em relação a isso, Pingitore e colaboradores demonstraram que os níveis séricos de T3 são preditores independentes de mortalidade cardíaca em pacientes com cardiomiopatia dilatada (PINGITORE *et al.*, 2005).

Uma possível explicação para esta síndrome seria uma redução pós-infarto na atividade da enzima deiodinase-1, responsável por converter o hormônio T4 em T3 (OLIVARES *et al.*, 2007). Durante o período de remodelamento cardíaco pós-infarto, estudos em ratos também identificaram uma redução nas concentrações séricas dos hormônios da tireoide e/ou alterações na expressão dos receptores nucleares desses hormônios (PANTOS *et al.*, 2008; PANTOS *et al.*, 2010; FORINI *et al.*, 2011). Avaliando a expressão desses receptores no miocárdio de ratos infartados, Pantos e colaboradores demonstraram níveis reduzidos de TR β 1, sem alteração nos níveis de TR α 1, em uma fase de remodelamento cardíaco compensado, na qual os animais apresentavam hipertrofia cardíaca, porém não haviam desenvolvido ainda insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Já em uma fase em que os ratos desenvolveram ICC, ambos os receptores (TR β 1 e TR α 1) apresentaram uma menor expressão, caracterizando um quadro de “hipotireoidismo” tecidual. Estes resultados demonstraram que a redução na expressão de TR α 1 pode estar implicada na progressão da fase hipertrófica compensatória pós-infarto para a insuficiência cardíaca (PANTOS *et al.*, 2010). De fato, na fase de hipertrofia pós-infarto, a expressão apenas do receptor TR α 1 no coração e a redução dos níveis de T3 levam este receptor a apresentar uma atividade independente de ligante (PANTOS *et al.*, 2008). Este processo é semelhante ao que ocorre no miocárdio durante o período fetal. Neste momento, o receptor TR α 1 estimula a expressão de proteínas relacionadas com a hipertrofia cardíaca patológica (exemplo: ERK

1/2). Além disso, este receptor leva ao aumento da expressão de proteínas presentes no período fetal, tal como a isoforma β da cadeia pesada da miosina, e ao aumento da expressão da proteína fosfolambam, ocasionando uma redução na contratilidade cardíaca (TAVI *et al.*, 2005). Apesar de inicialmente serem adaptativas, estas alterações aceleram a progressão para um estágio de insuficiência cardíaca, na qual há uma redução na expressão do TR α 1. Os níveis reduzidos deste receptor estão relacionados à dilatação da câmara do ventrículo esquerdo, a um prejuízo do fluxo sanguíneo para o miocárdio e à perda de função sistólica (KHALIFE *et al.*, 2005). Em função disso, estudos têm avaliado os efeitos do uso dos hormônios da tireoide no período pós-infarto (PANTOS *et al.*, 2008; FORINI *et al.*, 2011). A utilização destes hormônios teria como objetivo prevenir a instalação do “hipotireoidismo” tecidual e, dessa forma, atenuar as alterações deletérias no coração (PANTOS *et al.*, 2008; PANTOS *et al.*, 2010).

Trabalhos avaliando um efeito destes hormônios sobre o coração infartado demonstraram que a administração de T3 e T4 pode levar à mudança no padrão de hipertrofia cardíaca, alterando de uma forma patológica para uma forma fisiológica (PANTOS *et al.*, 2008). Este mesmo estudo mostrou que a administração destes hormônios pode melhorar a função contrátil, através de alterações na expressão das proteínas de manejo do cálcio no tecido cardíaco (PANTOS *et al.*, 2008). Além disso, trabalhos avaliando as alterações na geometria do ventrículo esquerdo no período pós-isquemia mostraram que os hormônios da tireoide são capazes de prevenir muitas das modificações patológicas desta câmara cardíaca. Os mesmos são capazes de normalizar o estresse de parede através do aumento da massa cardíaca (PANTOS *et al.*, 2007; PANTOS *et al.*, 2008). Em um trabalho com ratos infartados, análises ecocardiográficas revelaram um aumento na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo dos animais tratados com T3 e T4, duas semanas após a lesão. Já nos animais infartados não tratados, somente após treze semanas constatou esse aumento. Nestes mesmos animais, observou-se um aumento no índice de tensão de parede após duas semanas de infarto. Nos ratos tratados, esse índice aumentou somente treze semanas após o infarto (PANTOS *et al.*, 2008). Além disso, em estágios mais avançados do remodelamento cardíaco, esses hormônios induzem mudanças favoráveis na geometria cardíaca,

impedindo que a câmara do ventrículo esquerdo assumira uma forma esférica (PANTOS *et al.*, 2008).

Trabalhos analisando o efeito dos hormônios da tireoide sobre a deposição de colágeno no tecido cardíaco demonstraram que os mesmos reduzem a síntese das fibras de colágeno tipo 1 e previnem a fibrose cardíaca durante o processo de hipertrofia (YAO *et al.*, 1992). Além dos efeitos sobre o colágeno, os hormônios da tireoide apresentam um efeito pró-angiogênico no miocárdio infartado, tanto através de receptores nucleares (TR β), como através de receptores de membrana (LUIDENS *et al.*, 2010). A administração de doses baixas de T3 foi capaz de restaurar a expressão do TR β e do receptor do fator de crescimento vascular endotelial, assim como aumentar a densidade capilar e o fluxo sanguíneo coronariano no coração de camundongos com hipertrofia cardíaca patológica (MAKINO *et al.*, 2009).

Estudos clínicos igualmente demonstram efeitos positivos da administração dos hormônios da tireoide. Em pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática, a administração de T4 por três meses ocasionou a melhora de parâmetros como a fração de ejeção, o débito cardíaco e as dimensões diastólicas do ventrículo esquerdo. Além disso, esses pacientes apresentaram uma redução na resistência vascular sistêmica. Neste estudo, não foram encontrados efeitos adversos da administração hormonal (MORUZZI *et al.*, 1996). Avaliando o efeito e a segurança do tratamento hormonal, Hamilton e colaboradores realizaram a administração intravenosa de T3 em bolus, durante 6 a 12 horas, em pacientes com insuficiência cardíaca severa. Estes pacientes não apresentaram efeitos adversos como o aumento da frequência cardíaca ou arritmias. Como efeito do tratamento houve um aumento significativo do débito cardíaco juntamente com uma redução na resistência vascular periférica. Como conclusão, este trabalho sugere o uso de T3, juntamente com agentes inotrópicos, em pacientes com insuficiência cardíaca avançada (HAMILTON *et al.*, 1998). Em outro estudo, pacientes com cardiomiopatia dilatada isquêmica e não isquêmica, que apresentaram a síndrome do eutireoidiano doente, foram submetidos a três dias de infusão com T3. Este trabalho encontrou um aumento no débito sistólico dos pacientes, além de uma melhora em parâmetros neuroendócrinos, tais como a redução nos níveis de noradrenalina e de aldosterona. Neste estudo, os pacientes apresentaram uma redução na frequência cardíaca, provavelmente

relacionada aos baixos níveis de noradrenalina (PINGITORE *et al.*, 2008). Apesar dos estudos em humanos apresentarem efeitos protetores destes hormônios sobre o coração, não existe nenhum estudo clínico avaliando a administração dos hormônios da tireoide no período pós-infarto (GERDES e IERVASI, 2010).

Além de trabalhos avaliando diretamente o efeito dos hormônios da tireoide, existem estudos utilizando análogos destes hormônios, tal como o ácido 3,5-diiodotiropropionico (DITPA), para o tratamento de cardiopatias (SPOONER *et al.*, 2004; GOLDMAN *et al.*, 2009). Em um trabalho utilizando ratos infartados, a administração do DITPA por três semanas promoveu um aumento dos níveis da enzima eNOS na aorta, aumentando a vasodilatação aórtica, e ocasionou uma redução na pressão diastólica do ventrículo esquerdo (SPOONER *et al.*, 2004). Apesar dos efeitos demonstrados em animais, estudos em humanos não encontraram resultados semelhantes. Em um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e placebo-controlado, Goldman e colaboradores avaliaram 86 pacientes com insuficiência cardíaca, tratados por seis meses com DITPA (GOLDMAN *et al.*, 2009). Este trabalho demonstrou que os pacientes apresentaram uma baixa tolerância ao análogo hormonal, principalmente em função de sintomas como fadiga, perda de peso e desconforto gastrointestinal. Além disto, não houve melhora dos sintomas de insuficiência cardíaca (GOLDMAN *et al.*, 2009).

Apesar de diversos estudos, tanto em modelos animais como em humanos, demonstrarem um efeito positivo dos hormônios da tireoide, na cardiopatia dilatada e no infarto do miocárdio (PANTOS *et al.*, 2008; PINGITORE *et al.*, 2008; FORINI *et al.*, 2011), muitos aspectos da ação destes hormônios no coração ainda precisam ser esclarecidos. Um desses aspectos é o envolvimento das EROs na ação cardioprotetora dos hormônios da tireoide. Apesar de essas espécies reativas apresentarem um papel essencial no processo de remodelamento cardíaco pós-infarto (SCHENKEL *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012), não há trabalhos avaliando se a administração do T3 e do T4 pode modular os níveis de EROs e prevenir o dano oxidativo no coração infartado. Além das EROs, o NO também apresenta um papel fundamental no miocárdio pós-infarto (SHI *et al.*, 2012). Em relação a isso, Spooner e colaboradores evidenciaram que o DITPA pode atuar modulando os níveis de eNOS na aorta

(SPOONER *et al.*, 2009), no entanto, não existem trabalhos que avaliam o efeito do T3 e do T4 sobre a biodisponibilidade do NO no coração infartado. Outro tópico importante que deve ser esclarecido é qual é o efeito destes hormônios no processo de apoptose após o infarto. Em relação a isso, um trabalho de Forini e colaboradores demonstrou um papel antiapoptótico do T3 em um período tardio (28 dias) pós-infarto (FORINI *et al.*, 2011). Além disso, um estudo utilizando um modelo de isquemia e reperfusão demonstrou que o tratamento com T3 e T4 é capaz de diminuir a expressão da proteína p53 no coração (FORINI *et al.*, 2014). Apesar destes dados, não existem estudos avaliando se a administração dos hormônios da tireoide é capaz de influenciar o processo apoptótico que ocorre em uma fase mais precoce da injúria isquêmica. Nesta fase precoce, a apoptose dos cardiomiócitos parece ser um evento chave para a progressão de um estágio de remodelamento cardíaco compensado para a insuficiência cardíaca (ABBATE *et al.*, 2002; QIN *et al.*, 2005).

2. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo foi que os hormônios da tireoide promovem um efeito cardioprotetor, no período pós-infarto, através da redução do estresse oxidativo cardíaco e do aumento da biodisponibilidade do óxido nítrico. Além disso, estes hormônios exercem efeitos benéficos pós-infarto regulando o processo de apoptose no coração.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos hormônios da tireoide sobre o estresse oxidativo e a biodisponibilidade do óxido nítrico no tecido cardíaco após o infarto agudo do miocárdio. Além disso, avaliar o efeito desses hormônios sobre a expressão de proteínas pró-apoptóticas após o infarto.

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo de tratamento por gavagem com os hormônios da tireoide em ratos infartados e em ratos sham.
- Avaliar o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e de congestão de órgãos em ratos infartados e em ratos sham, submetidos ao tratamento hormonal.
- Avaliar parâmetros ecocardiográficos de ratos infartados e de ratos sham, submetidos ao tratamento hormonal.
- Avaliar parâmetros hemodinâmicos de ratos infartados e de ratos sham, submetidos ao tratamento hormonal.
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo no tecido cardíaco de ratos infartados e de ratos sham, submetidos ao tratamento hormonal.
- Avaliar a expressão de enzimas antioxidantes e pró-oxidantes no tecido cardíaco de ratos infartados e de ratos sham, submetidos ao tratamento hormonal.

- Avaliar a expressão dos receptores nucleares dos hormônios da tireoide no tecido cardíaco de ratos infartados e de ratos sham, submetidos ao tratamento hormonal.
- Avaliar parâmetros de biodisponibilidade do óxido nítrico no tecido cardíaco de ratos infartados e de ratos sham, submetidos ao tratamento hormonal.
- Avaliar a expressão do fator de transcrição PGC-1 α no tecido cardíaco de ratos infartados e de ratos sham, submetidos ao tratamento hormonal.
- Avaliar a expressão de proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas no tecido cardíaco de ratos infartados e de ratos sham, submetidos ao tratamento hormonal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nota: Os métodos descritos abaixo incluem o protocolo experimental e as análises realizadas nos três estudos que compõe esta tese, que são os seguintes:

- **Estudo 1:** Efeito dos hormônios da tireoide sobre parâmetros de estresse oxidativo no coração de ratos infartados.
- **Estudo 2:** Efeito dos hormônios da tireoide sobre a biodisponibilidade do óxido nítrico no coração de ratos infartados.
- **Estudo 3:** Efeito dos hormônios da tireoide sobre a expressão de proteínas pró-apoptóticas e antiapoptóticas no coração de ratos infartados.

Nos estudos 1 e 2 foi utilizado um protocolo experimental de 28 dias e no **estudo 3** foi utilizado um protocolo experimental de 14 dias.

4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com 90 dias de idade, com peso médio de 347 ± 48 gramas. Os animais foram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Durante os dois protocolos experimentais (estudo 1: protocolo de 28 dias pós-infarto; estudo 2: protocolo de 14 dias pós-infarto), os animais foram alojados no Biotério Setorial do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, sendo mantidos em caixas plásticas de 270 x 260 x 310 mm, com três ratos cada, com o assoalho recoberto com serragem. Receberam alimentação e água à vontade e foram mantidos em períodos de 12 horas luz/ 12 horas escuro e em temperatura de 22°C.

4.2. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos:

- Grupo sham (SHAM) – foi submetido a todos os processos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria coronária descendente anterior.

- Grupo infarto do miocárdio (IAM) – foi submetido ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior.
- Grupo sham + tratamento com os hormônios da tireoide (SHAMT) – foi submetido a todos os processos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria coronária descendente anterior, juntamente ao tratamento com T3 e T4.
- Grupo infarto do miocárdio + tratamento com os hormônios da tireoide (IAMT) – foi submetido ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior juntamente ao tratamento com T3 e T4.

4.3. Procedimentos cirúrgicos

O infarto agudo do miocárdio (IAM) foi induzido por um método adaptado ao descrito por Johns e Olson em 1954 (JOHNS e OLSON 1954), no qual foi realizada a ligadura da artéria coronária descendente anterior. Para isso, os animais foram mantidos anestesiados (quetamina (90 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) por via intraperitoneal) e foram tricotomizados. Os mesmos foram então colocados em decúbito dorsal e entubados (Gelko-14G). Um pequeno corte foi realizado na pele e os músculos peitorais foram afastados. Os animais foram submetidos à ventilação artificial (Intermed, Inter 3, São Paulo, SP, Brasil) e foi realizada uma toracotomia esquerda no quarto espaço intercostal, sendo colocado um afastador de tórax entre as costelas para permitir a melhor visualização. O pericárdio foi seccionado e o átrio esquerdo afastado para a visualização da artéria coronária esquerda. Esta foi ligada (fio mononylon 6.0) provocando a isquemia miocárdica. Após a ligadura da coronária, a incisão torácica foi fechada (fio mononylon 5.0) e o pneumotórax retirado mediante a sucção do ar com uma agulha (5x7) conectada a uma seringa de 10 mL. Logo após, os animais foram retirados da ventilação artificial e foi estimulada a sua respiração espontânea. Os músculos afastados foram reposicionados e a pele foi suturada (fio mononylon 5.0). Os ratos foram colocados em local aquecido, e foi iniciada intervenção analgésica para alívio da dor e desconforto. Foi utilizada analgesia opioide com tramadol (5mg/Kg, 8-8horas, i.p.), durante os primeiros 3 dias pós-cirúrgico (SANTOS *et al.*, 2012). A taxa de mortalidade no presente estudo foi de 40%, as quais ocorreram principalmente nas primeiras 24 horas

após o procedimento cirúrgico. Os animais do grupo SHAM e SHAMT foram submetidos a uma cirurgia que consistiu dos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da oclusão coronariana (SCHENKEL *et al.*, 2010).

4.4. Protocolo experimental

O desenho experimental dos **Estudos 1 e 2** abrangeu um período de 28 dias (Figura 1), nos quais foram realizados os seguintes procedimentos:

1º dia: Os animais dos grupos IAM e IAMT foram submetidos ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior. Os animais dos grupos SHAM e SHAMT foram submetidos à cirurgia sham, que consistiu dos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria coronária descendente anterior.

48 horas pós-cirurgia: Após a cirurgia, os animais permaneceram 48 horas em recuperação e, após isso, foi realizada a análise ecocardiográfica para confirmação do infarto e iniciada a administração dos hormônios da tireoide. Os animais dos grupos IAMT e SHAMT receberam diariamente, por gavagem, 2 µg/100 g/dia de T3 e 8 µg/100 g/dia de T4 em solução aquosa (PANTOS *et al.*, 2007; PANTOS *et al.*, 2008). Os animais dos grupos IAM e SHAM, por sua vez, receberam diariamente apenas salina por gavagem. Os animais foram pesados semanalmente para o acompanhamento do ganho de peso corporal.

28º dia: Foi realizada a análises ecocardiográfica nos animais. Após essa análise, com os animais anestesiados, foi realizada a coleta de sangue. Após isso, os animais foram eutanasiados e foram coletados os tecidos (coração, pulmão e fígado) para posteriores análises.

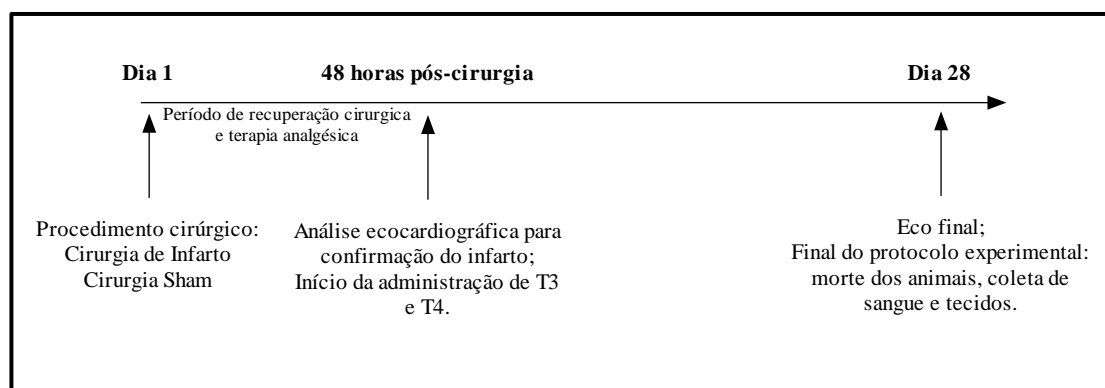


Figura 1: Desenho experimental dos **Estudos 1 e 2**.

O desenho experimental do **Estudo 3** abrangeu um período de 14 dias (Figura 2), nos quais foram realizados os seguintes procedimentos:

1º dia: Os animais dos grupos IAM e IAMT foram submetidos ao infarto pela ligadura da artéria coronária descendente anterior. Os animais dos grupos SHAM e SHAMT foram submetidos à cirurgia sham, que consistiu dos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da ligadura da artéria coronária descendente anterior.

48 horas pós-cirurgia: Após a cirurgia, os animais permaneceram 48 horas em recuperação e, após isso, foi realizada a análise ecocardiográfica para confirmação do infarto e iniciada a administração dos hormônios da tireoide. Os animais dos grupos IAMT e SHAMT receberam diariamente, por gavagem, 2 µg/100 g/dia de T3 e 8 µg/100 g/dia de T4 em solução aquosa. Os animais dos grupos IAM e SHAM, por sua vez, receberam diariamente apenas salina por gavagem. Os animais foram pesados semanalmente para o acompanhamento do ganho de peso corporal.

14º dia: Foram realizadas as análises ecocardiográfica e hemodinâmica nos animais. Após essas análises, com os animais anestesiados, foi realizada a coleta de sangue. Após isso, os animais foram eutanasiados e foram coletados os tecidos (coração, pulmão e fígado) para posteriores análises.

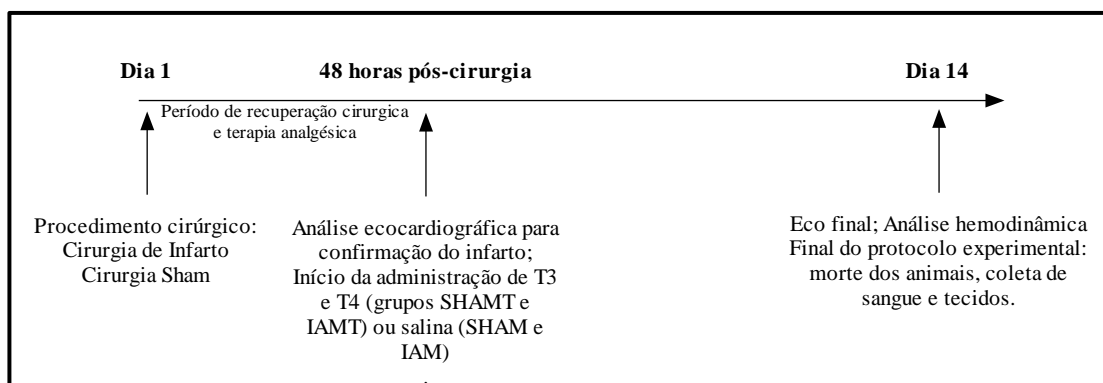


Figura 2: Desenho experimental do **Estudo 3**.

4.5. Análises ecocardiográficas

Os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina e submetidos à avaliação ecocardiográfica. Os mesmos foram posicionados em decúbito lateral para a obtenção das imagens. Foi utilizado o sistema de ultrassom Philips HD XE com um transdutor de 12-13 MHz, numa profundidade de 3 cm, sendo as imagens capturadas por um operador treinado com experiência em ecocardiografia animal. Foram analisados parâmetros morfológicos do ventrículo esquerdo (espessura das paredes posterior e anterior, diâmetros e áreas transversais na sístole e diástole); parâmetros de função sistólica (fração de encurtamento e fração de ejeção); frequência cardíaca; área de infarto; índice de tensão de parede e índice de performance do miocárdio (parâmetro de função global do coração).

Foram avaliadas as áreas transversais do ventrículo esquerdo no final da sístole e no final da diástole em três planos: basal (ao nível dos folhetos da válvula mitral), medial (ao nível dos músculos papilares) e apical (abaixo dos músculos papilares). A área transversal na diástole e na sístole foi calculada utilizando a média dos três planos. Os diâmetros sistólicos e diastólicos, assim como a espessura das paredes cardíacas e a frequência cardíaca, foram igualmente avaliados nesses três planos, através do modo-M. Através da média dos diâmetros foi calculada a Fração de Encurtamento do ventrículo esquerdo (FenVE), utilizando a seguinte equação: $FenVE = (m\u00e9dia\ dos\ di\u00e2metros\ diast\u00f3licos - m\u00e9dia\ dos\ di\u00e2metros\ sist\u00f3licos) / m\u00e9dia\ dos\ di\u00e2metros\ diast\u00f3licos \times 100$ (NOZAWA *et al.*, 2006). Foi calculado tamb\u00e9m o \u00edndice de tens\u00e3o de parede (ITP), atrav\u00e9s da seguinte f\u00f3rmula: $ITP = (m\u00e9dia\ dos\ di\u00e2metros\ diast\u00f3licos / 2 \times m\u00e9dia\ das\ espessuras\ da\ parede\ posterior\ na\ di\u00e1stole)$ (PANTOS *et al.* 2008).

Os volumes card\u00edacos (volume diast\u00f3lico final (VDF) e volume sist\u00f3lico final (VSF)) foram calculados atrav\u00e9s do m\u00e9todo de Simpson modificado (MERCIER *et al.*, 1982). A fra\u00e7\u00e3o de eje\u00e7\u00e3o (FE) foi calculada utilizando os valores dos volumes card\u00edacos, atrav\u00e9s da seguinte equa\u00e7\u00e3o: $FE = (VDF - VSF / VDF \times 100)$. Atrav\u00e9s das an\u00e1lises de fluxo por Eco Doppler, foi medido o tempo entre o final da onda A do fluxo mitral e o in\u00edcio da onda E subsequente (tempo de fechamento da v\u00e1lvula mitral (TFM)) e o tempo de eje\u00e7\u00e3o da aorta (TEA). Com

essas medidas foi calculado o índice de performance miocárdica (IPM): $IPM = (TFM-TEA/TEA)$ (SALEMI *et al.*, 2008). Para a medida da área de infarto (AI) foi utilizado o perímetro correspondente ao segmento infartado (região acinética ou hipocinética (RAH)) e o perímetro endocárdico total (PET). Esses perímetros foram analisados durante a diástole em cada um dos planos ecocardiográficos transversos utilizados (basal, medial e apical). A área de infarto foi calculada através da seguinte equação: $AI = (RAH/PET \times 100)$ (NOZAWA *et al.*, 2006). As imagens bi-dimensionais e os traçados do módulo-M e das curvas Doppler foram registrados em CD para posteriores análises.

4.6. Análises hemodinâmicas

No **Estudo 3**, foram avaliados parâmetros hemodinâmicos dos animais, 14 dias após a cirurgia de ligadura da artéria coronária descendente anterior ou a cirurgia fictícia. Para esse procedimento, os ratos foram anestesiados (quetamina (90 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg)) e a artéria carótida direita foi canulada com um cateter PE 50 conectado a um transdutor Strain Gauge (Narco Biosystem Pulse Transducer RP-155, Houston, Texas, USA), ligado a um amplificador de pressão (HP 8805C, Hewlett Packard, USA). As análises de pressão foram armazenadas em um computador equipado com uma placa de conversão analógico-digital (Biopac 1 kHz sampling frequency, Biopac Systems, Inc., Goleta, California, USA). O cateter foi posicionado no ventrículo esquerdo para os seguintes registros: a pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE), a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) e as derivadas de pressão positivas e negativas ($dP/dt_{max/min}$) (SCHENKEL *et al.*, 2010).

4.7. Morte dos animais e coleta de sangue e tecidos

Após as análises ecocardiográficas e hemodinâmicas, com os animais anestesiados, foi realizada a coleta de sangue retrorbital (volume de aproximadamente 1,5 mL) em tubos com heparina. Os animais foram mortos através de decapitação por guilhotina, procedimento realizado por pessoa treinada. Após isso, o coração, o pulmão e o fígado foram retirados para as análises morfológicas. O tecido cardíaco foi lavado em solução gelada de KCl

1,15%, os átrios foram removidos e a cicatriz da região infartada foi separada e pesada. Os ventrículos direito e esquerdo foram separados e pesados, acondicionados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer – 80°C. O ventrículo esquerdo foi utilizado para as análises bioquímicas e para a análise de expressão proteica por western blot.

4.8. Dosagem sérica de T4 e T3

O sangue coletado com heparina foi centrifugado por 10 minutos a 1000 X g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), e o plasma separado e congelado em freezer a - 80°C para a dosagem dos hormônios tireoidianos. Nos **estudos 1 e 2** foi utilizado o método de imunoquimioluminescência para a dosagem de T3 e T4, realizado no Laboratório Veterinário TECSA, utilizando o sistema automatizado ROCHE, modelo COBAS E-411. Os resultados de T4 foram expressos em µg/dL e os de T3 em ng/dL. **No estudo 3**, a dosagem dos níveis séricos de T4 foi feita através da técnica de radioimunoensaio realizada no Laboratório Antonello. O resultado do T4 foi expresso em µg/dL.

4.9. Índices de hipertrofia cardíaca

Após a morte dos animais foi retirado o tecido cardíaco e pesado para a análise do peso total do coração, peso do ventrículo esquerdo e peso da área de infarto. Foi retirada também a tíbia dos animais para o cálculo do índice de hipertrofia. Para a análise da hipertrofia cardíaca foram utilizados os seguintes índices: a razão do peso de tecido cardíaco (mg) pelo peso corporal (g) e a razão do peso de tecido cardíaco (mg) pelo comprimento da tíbia (cm). Foi calculada também a hipertrofia do ventrículo esquerdo, utilizando os seguintes índices: a razão entre o peso do ventrículo esquerdo (mg) e o peso corporal (g) e a razão entre o peso do ventrículo esquerdo (mg) e o comprimento da tíbia (cm) (SCHENKEL *et al.*, 2010)

4.10. Índices de congestão pulmonar e hepática

Após a morte dos animais, o fígado e o pulmão foram retirados, pesados e acondicionados em estufa em uma temperatura de 65°C. Esses órgãos foram pesados diariamente até atingirem um peso constante para a obtenção do peso seco. Após isso, foram calculadas a congestão pulmonar e a congestão hepática pela razão entre o peso seco e o peso úmido desses órgãos (SINGAL *et al.*, 1999).

4.11. Análises Bioquímicas

4.11.1. Medida de peróxido de hidrogênio

O método está baseado na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete, resultando num produto que absorve em 610 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H₂O₂ por mg de proteína (PICK e KEISARI, 1980).

4.11.2. Medida de espécies reativas de oxigênio totais

As espécies reativas de oxigênio totais foram avaliadas espectrofluorimetricamente através da oxidação do diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) em 2,7-diclorofluoresceína na presença dessas espécies. As amostras foram excitadas em 488 nm e a emissão foi coletada em 525 nm. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína (LEBEL *et al.*, 1992).

4.11.3. Determinação da concentração de GSH e GSSG

Na determinação da glutathiona total, o tecido cardíaco foi desproteinizado com ácido perclórico 2 mol/L e centrifugado por 10 min a 1000 g. O sobrenadante foi neutralizado com hidróxido de potássio 2 mol/L. O meio de reação continha tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7.2), ácido nicotinamida dinucleotídeo fosfato 2 mmol/L, glutathiona redutase 0.2 U/mL, 5,5' ditiobis (2-nitro

ácido benzóico) 70 $\mu\text{mol/L}$. A determinação da GSH baseou-se na reação do sobrenadante neutralizado com 5,5' ditiobis (2-nitro ácido benzóico) 70 $\mu\text{mol/L}$, catalisada pela enzima glutatona redutase, e a leitura foi efetuada a 420 nm. Para medir a GSSG, n-etilmaleimida foi adicionado ao sobrenadante neutralizado para a realização da reação acima descrita. Os resultados foram expressos como GSH, GSSG e como a razão GSH/GSSG (AKERBOOM e SIES, 1981).

4.11.4. Atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução da GSSG à GSH. Foi observada a diminuição de absorbância do NADPH a 340nm. Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína (FLOHÉ e GUNZLER, 1984).

4.11.5. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A medida da atividade desta enzima baseou-se na capacidade de inibição da auto-oxidação do pirogalol pela SOD. Portanto, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor a auto-oxidação do pirogalol. O resultado foi dado em unidades de SOD por mg de proteína (MARKLUND, 1985).

4.11.6. Atividade da enzima catalase

A atividade da catalase foi medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio. O método consistiu em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (AEBI, 1984).

4.11.7. Atividade da enzima óxido nítrico sintase

A atividade da enzima óxido nítrico sintase foi avaliada medindo a conversão de oxihemoglobina (HbO_2) à metahemoglobina induzida pela presença do óxido nítrico como previamente descrito (VALDEZ *et al.*, 2005).

4.11.8. Atividade da enzima glutarredoxina (GRX)

Para avaliar a atividade da enzima GRX foi utilizado o protocolo estabelecido por Holmgren e Åslund (1995). À glutathiona reduzida foi adicionada o hidroximetildissulfeto em 100 mM de tampão Tris/HCL (pH 7,8) contendo 1mM de EDTA, sendo incubada por 2 minutos. Após este procedimento, uma pequena alíquota da amostra foi adicionada reagindo com a mistura pelo próximo minuto. A quantidade de GSSG produzida será medida a partir da adição de NADPH e glutathiona redutase de levedura a 340 nm. A atividade foi expressa em mmol/mg de proteína (HOLMGREN e ÅSLUND, 1995).

4.11.9. Atividade da enzima tiorredoxina (TRX) redutase

A atividade da enzima TRX redutase foi realizada através de uma redução *in vitro* do ácido ditionitrobenzóico (DTNB) ao ácido 50-tionitrobenzóico (TNB). A conversão de DTNB a TNB foi medida espectrofotometricamente a 412 nm. Os resultados foram expressos como unidades por minuto por miligrama de proteína (HOLMEGREN & BJORNSTEDT, 1995).

4.11.10. Determinação dos níveis de nitritos totais (NO_2^-)

Os níveis de nitritos no tecido cardíaco foram medidos pela reação das amostras com o reagente de Griess, pelo método descrito por Granger e colaboradores. (GRANGER *et al.*, 1999).

4.11.11. Determinação da peroxidação lipídica

Avaliação da peroxidação lipídica foi realizada através da técnica de quimiluminescência iniciada por terc-butil-hidroperóxido. O método consistiu na adição de um hidroperóxido orgânico de origem sintética ao homogeneizado de tecido, para avaliação da capacidade de resposta produzida pela amostra. Esta análise baseou-se no fato de que os hidroperóxidos são espécies químicas bastante instáveis, reagindo com lipídios por um mecanismo radicalar que gera

produtos que emitem luz pela amostra em estudo. A QL foi medida em um contador beta (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer-1215; LKB Produkter AB, Bromma, Sweden). Os resultados foram expressos em contagens por segundo (cps) por miligrama (mg) de proteína (GONZALEZ *et al.*, 1991).

4.11.12. Dosagem de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, utilizando como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL. A medida foi efetuada em espectrofotômetro a 625 nm e os resultados foram expressos em mg/mL (LOWRY *et al.*, 1951).

4.12. Análise da expressão proteica por Western blot

A homogeneização do tecido, a eletroforese e a transferência de proteínas foram realizadas conforme descrito anteriormente (ARAUJO *et al.*, 2006). As membranas foram processadas para a imunodeteção utilizando os seguintes anticorpos primários: superóxido dismutase (23 kDa), catalase (60 kDa), glutathione peroxidase (22 kDa), fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2) (55 kDa), xantina oxidase (150 kDa), receptor nuclear dos hormônios da tireoide alfa (TR α) (47 kDa), receptor nuclear dos hormônios da tireoide beta (TR β) (55 kDa), enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (150 kDa); gluraredoxina 3 (37 kDa), tioredoxina 1 (12 kDa), coativador 1- α do receptor gama ativador da proliferação de peroxissomos (PGC-1 α) (90 kDa), p53 (53 kDa), JNK (54/46 kDa), bcl-2 (26 kDa) e bax (20 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA ou Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Os anticorpos primários foram detectados utilizando-se anticorpos secundários de acordo com a origem dos primários e as membranas foram reveladas por quimiluminescência. Os filmes autorradiográficos foram quantitativamente analisados no densitômetro de imagem (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences, Europe, IT). Os pesos moleculares das bandas de proteínas foram determinados em referência a um marcador de peso molecular (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Os resultados de cada membrana foram

normalizados pelo método de coloração com vermelho de Ponceau (KLEIN *et al.*, 1995).

4.13. Análise estatística

A avaliação da normalidade (distribuição Gaussiana) dos dados foi realizada através do método de Shapiro-Wilk. Uma vez que os dados apresentaram distribuição normal, a comparação entre grupos foi feita através da análise de variância (ANOVA) de uma ou de duas vias, complementada com o teste de Student-Newmann-Keuls. Para a comparação entre dados de dois grupos (por exemplo, a área de infarto), foi utilizado o teste t de Student. A correlação entre duas variáveis foi analisada através do teste de correlação de Pearson. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou um $P < 0.05$. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão ou como média \pm erro padrão da média. O software Sigma Plot 11.0 para Windows foi utilizado como ferramenta computacional para análise estatística dos dados.

4.14. Descarte de materiais biológicos e químicos

As carcaças dos animais mortos e os demais resíduos biológicos foram armazenados em sacos brancos, identificados e levados ao biotério setorial da Morfologia, local onde há um freezer onde são acondicionadas as carcaças. Após isso, os técnicos do CREAL ficaram responsáveis por orientar o recolhimento pela empresa especializada no serviço de coleta de materiais biológicos. Os materiais tóxicos foram usados na capela e encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para sua correta eliminação. Todos os procedimentos com os animais e análises posteriores foram feitos com uso de avental, luva cirúrgica, máscara (se necessário), respeitando os devidos cuidados para proteção tanto dos animais como do pesquisador.

4.15. Considerações Éticas

O projeto para a realização deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética No Uso de Animais da UFRGS sob o número de 23262. Todos os procedimentos descritos nesse estudo levaram em consideração as definições da Lei 11.794/08 (conhecida como lei Arouca) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos - DBCA do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5. RESULTADOS

Os resultados dos **estudos 1, 2 e 3** estão expressos na forma de artigo (artigos I, II e III, respectivamente).

ARTIGO I: referente ao **estudo 1**

Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction

Publicado: *Molecular and Cellular Endocrinology* 391 (2014) 22-29

DOI: 10.1016/j.mce.2014.04.010

ARTIGO II: referente ao **estudo 2**

T3 and T4 decrease ROS levels and increase endothelial nitric oxide synthase expression in the myocardium of infarcted rats

Publicado: *Molecular and Cellular Biochemistry* 408 (2015) 235-243

DOI: 10.1007/s11010-015-2501-4.

ARTIGO III: referente ao **estudo 3**

Thyroid hormones improve cardiac function and decrease pro-apoptotic proteins expression in the heart of rats 14 days after infarction

Submetido para a publicação: *Apoptosis Journal*

5.1. Artigo I

Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction

Alexandre Luz de Castro¹, Angela Vicente Tavares¹, Cristina Campos¹, Rafael Oliveira Fernandes¹, Rafaela Siqueira¹, Adriana Conzatti¹, Amanda M. Bicca¹, Tânia Regina G. Fernandes¹, Carmem L. Sartório¹, Paulo Cavalheiro Schenkel², Adriane Belló-Klein¹, Alex Sander da Rosa Araujo¹

¹ Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Corresponding author: Dr. Alex Sander da Rosa Araujo
alsanderaraujo@hotmail.com.

Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite 500, sala 01. Porto Alegre, RS, Brazil. CEP 90050170. Phone: +55 (51) 3308-3621.

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are involved with progression from infarction to heart failure. Studies show that thyroid hormones (TH) present cardioprotective effects. This study aims to evaluate whether TH effects after infarction are associated to redox balance modulation. Male Wistar rats were divided into four groups: Sham-operated (SHAM), infarcted (AMI), sham-operated + TH (SHAMT), and infarcted + TH (AMIT). During 26 days, animals received T3 (2 µg/100 g/day) and T4 (8 µg/100 g/day) by gavage. Echocardiographic parameters were assessed and heart tissue was collected to biochemical analysis. AMIT rats presented absence of lung congestion, less cardiac dilatation, and normalization in myocardial performance index, compared with AMI. AMI rats presented an increase in hydrogen peroxide levels and in lipid peroxidation and a decrease in GSH/GSSG. TH prevented these alterations in AMIT. In conclusion, TH seem to reduce the levels of ROS, preventing oxidative stress, and improving cardiac function in infarcted rats.

Keywords: T3; T4; redox balance; reactive oxygen species.

Introduction

Several studies have shown that reactive oxygen species (ROS) are involved in the process of cardiac remodeling after acute myocardial infarction (Schenkel et al., 2012, 2010; Singal et al., 1999). As early as 48 hours after the ischemic event, there is evidence of changes in oxidative stress parameters in the myocardial tissue (Tavares et al., 2012). After injury, neurohumoral mechanisms start to act in order to maintain cardiac function and the heart goes into a compensated stage of hypertrophy (Francis et al., 2001). In this phase, cellular antioxidant reserve increases (Singal et al., 1999). However, in a decompensated stage of heart muscle, this reserve is reduced, resulting in the occurrence of oxidative stress (Singal et al., 1999). This was demonstrated in experimental models of acute myocardial infarction, 28 days after the ischemic insult (Schenkel et al., 2010). In this work, the reduction in the fractional area change of the heart was positively correlated with a decrease in the reduced to oxidized glutathione ratio (GSH/GSSG) in heart tissue (Schenkel et al., 2010).

It has been recently shown that thyroid hormones may present a protective effect after myocardial infarction (Forini et al., 2011; Mourouzis et al., 2013b; Pantos et al., 2008, 2007). In a heart failure stage, plasma levels of these hormones decrease and/or the expression of both thyroid hormone receptors (TRs), TR α , and TR β , in the myocardium decreases (Forini et al., 2011; Pantos et al., 2011). This scenario is detrimental for the heart, since these receptors, especially TR α 1, seem to be relevant for the cardiomyocytes response against stress (Mourouzis et al., 2013a). Based on this, many studies have evaluated the hypothesis that the administration of thyroid hormones could exert beneficial effects on the heart (Forini et al., 2011; Mourouzis et al., 2013b; Pantos et al., 2008, 2007). Treatment with T3 and T4, in the post-infarction period, could prevent the development of tissue hypothyroidism and, thereby, mitigate deleterious changes in the cardiac tissue (Pantos et al., 2011, 2010). The main mechanism through which thyroid hormones could promote a cardioprotective effect is by a genomic action, involving the binding of these hormones to its intracellular receptors and the modulation of protein synthesis in the cardiomyocyte (Pantos et al., 2011, 2010). T3 and T4 administration, after myocardial infarction, could reduce the expression of beta-myosin heavy chain

(β -MHC) and increase the expression of alpha-myosin heavy chain (α -MHC), preventing fetal-like phenotypic changes in the heart and improving cardiac contractility (Pantos et al., 2008). These hormones can also increase the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2, inducing angiogenesis in the ischemic heart (Makino et al., 2009), and decrease the expression of collagen type I, preventing fibrosis (Ziegelhoffer-Mihalovicova et al., 2003). Echocardiographic analysis of infarcted rats treated with thyroid hormones revealed an improvement in the left ventricular ejection fraction two weeks after the ischemic event (Pantos et al., 2008). Also, 28 days after the infarction, rats treated with T3 presented a preserved left ventricular systolic function, when compared with non-treated animals (Forini et al., 2011).

Although thyroid hormones modulate significantly cardiac tissue redox balance (Araujo et al., 2006; Fernandes et al., 2011), to our knowledge, there are no studies that show the participation of ROS and redox status in the cardioprotective effect of these hormones after myocardial infarction. Due to the significant role of ROS in the progression from infarction to heart failure (Singal et al., 1999), it would be interesting to evaluate its involvement in T3 and T4 positive effects. Based on this, in the present study, we investigated whether the beneficial effects of the administration of T3 and T4, during the post-infarction period, could involve a modulation of redox balance and levels of ROS in the heart.

Material and Methods

Ethical approval

The study and animal care procedures were approved by the Ethics Committee for animal research at this University (Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS; process number 23262).

Animals

Male Wistar rats (347 ± 48 g) were obtained from the Central Animal House of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. Animals were

housed in plastic cages and received water and pelleted food *ad libitum*. They were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21 °C, 12 h light/dark cycle). They were allocated into 4 groups: Sham-operated (SHAM), infarcted (AMI), sham-operated plus treatment (SHAMT), and infarcted plus treatment (AMIT).

Surgical procedure

Animals were anesthetized (ketamine 90 mg kg⁻¹; xylazine 20 mg kg⁻¹, i.p.), and myocardial infarctions were produced by a method similar to that previously described (Johns and Olson, 1954). Animals were submitted to a surgical procedure of ligation of the descending anterior branches of the left coronary artery, or to a sham-operation in which all surgical procedures were performed, except the suture around the coronary artery. The mortality, evaluated 24 hours after the surgical procedure and during the protocol period, was approximately 40%.

Thyroid hormones administration

After surgery, animals were allowed to recover for 2 days. After this, the treated groups, SHAMT and AMIT, received T3 (2 µg/100 g/day) and T4 (8 µg/100 g/day), diluted in saline by gavage, while the control groups, SHAM and AMI, received just saline. The period of treatment was 26 days after the recovery period.

Measurement of thyroid hormones in plasma

Anesthetized animals were submitted to blood collection from retro-orbital plexus. The blood was centrifuged at 1000 X g for 10 min. Plasma L-thyroxine and 3,5,3' triiodothyronine quantitative measurements were performed by chemiluminescence using ROCHE cobas e-411 analyzer kits at TECSA Veterinary Laboratory.

Morphometric analysis

Anesthetized animals were killed by cervical dislocation. The heart, lungs, and liver were rapidly excised and weighted. The cardiac hypertrophy was evaluated by the heart weight (in mg) to body weight (in g) ratio (Araujo et al.,

2006). The scar area of the left ventricle was removed and weighted. The left ventricle was separated for biochemical and western blot analysis and was immediately frozen in liquid nitrogen. Liver and lung congestion were evaluated by wet to dry weight ratio (g/g) (Fernandes et al., 2011; Tavares et al., 2010).

Echocardiographic analysis

Cardiac function was analyzed by echocardiography, 28 days after the surgery. Rats were anesthetized and placed in left lateral decubitus position (45°) to obtain cardiac images. Philips HD7 XE ultrasound system with a L12-13 MHz transducer was used. Left ventricular systolic and diastolic transverse areas (cm²) were obtained by tracing the endocardial border at three levels: basal, middle, and apical. Left ventricular posterior wall thickness (cm) and heart rate (beats/min) were measured using the M-Mode, in the previously described three planes (Nozawa et al., 2006). Left ventricular ejection fraction was calculated using Simpson's rule (Nozawa et al., 2006; Tavares et al., 2010). On each echocardiographic transverse plane the arch corresponding to the segments with infarction (I) and the total endocardial perimeter (EP) were measured at end-diastole. Infarction size (IS) was estimated as % IS=(I/EP)×100 (Peron et al., 2006; Tavares et al., 2010). Final value for each animal was obtained by taking the average of all three planes (Nozawa et al., 2006; Tavares et al., 2010). Left ventricular myocardial performance index (MPI) was calculated through Doppler echocardiography (Cury et al., 2005).

Tissue preparation

The left ventricle was homogenized (1.15% w/v KCl and phenyl methyl sulphonyl fluoride PMSF 20 mmol/l) in Ultra-Turrax. The suspension was centrifuged at 1000 X g for 10 min at 0–4°C to remove the nuclei and cell debris and supernatants were used for the oxidative stress measurements (Llesuy et al., 1985).

Determination of hydrogen peroxide levels

Hydrogen peroxide was measured via its horseradish peroxidase-mediated oxidation of phenol red. The results were expressed in nmoles of H₂O₂ per milligram of protein (Pick and Keisari, 1980).

Determination of oxidized and reduced glutathione concentration

To measure oxidized (GSSG) and reduced glutathione (GSH) concentration, the heart tissue was deproteinized with 2 mol/L perchloric acid, centrifuged for 10 min at 1000 X g, and the supernatant was neutralized with 2 mol/L potassium hydroxide. The determination of GSH was based on the reaction with 5.50 dithiobis (2-nitrobenzoic acid), was catalyzed by glutathione reductase and the absorbance values were measured at 420 nm. To measure GSSG, n-ethylmaleimide was added to the neutralized supernatant to perform the reaction above described (Akerboom and Sies, 1981).

Determination of lipid peroxidation using tert-butyl-hydroperoxide-initiated chemiluminescence

Chemiluminescence was measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB —Produkter AB, Sweden). Homogenates were placed in low-potassium vials at a protein concentration of 0.5–1.0 mg/mL in a reaction medium consisting of 120 mmol/L KCl, 30 mmol/L phosphate buffer (pH = 7.4). Measurements were initiated by the addition of 3 mmol/L tert-butyl hydroperoxide. Data was expressed as counts per second per milligram of protein (cps/mg protein) (Gonzalez et al., 1991).

Determination of antioxidant enzymes activity

Superoxide dismutase (SOD) activity was evaluated on the basis of the inhibition of a superoxide radical reaction with pyrogallol, measured at 420 nm. It was expressed as units per milligram of protein (Marklund, 1985). Catalase activity was measured by following the decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) absorbance at 240 nm. It was expressed as pmoles of H₂O₂ reduced per minute per milligram of protein (Aebi, 1984). Glutathione peroxidase (GPx) activity was based on the consumption of NADPH and was measured at 340 nm. Mainly the non-selenium glutathione peroxidase isoform was analyzed, since terc-butyl was used as a substrate. The activity was expressed as nmols of peroxide/hydroperoxide reduced per minute per milligram of protein (Flohe and Gunzler, 1984).

Determination of protein concentration

Protein was measured through the method of Lowry (Lowry et al., 1951), using bovine serum albumin as standard.

Western blot analysis

Tissue homogenization, electrophoresis, and protein transference were performed as previously described (Laemmli, 1970; Araujo et al., 2006). Fifty micrograms of protein was submitted to one-dimensional sodium docedyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis in a discontinuous system using 8-12% (w/v) separating gel and stacking gel (Laemmli, 1970). The immunodetection was processed using the following primary antibodies: SOD (23 kDa), catalase (64 kDa), GPx (22 kDa), nuclear factor erythroid-derived 2 (Nrf2) (55 kDa), xanthine oxidase (XO) (150 kDa), thyroid hormones receptor alpha (TR α) (47 kDa) and thyroid hormones receptor beta (TR β) (55 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA or Cell Signaling Technology, Beverly, MA). The bound primary antibodies were detected using anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugate secondary antibodies and the membranes were developed using chemiluminescence detection reagents. The autorradiographs generated were quantitatively measured with an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). The results were normalized by Ponceau method (Klein et al., 1995).

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SD. Two way ANOVA with Student-Newmann-Keuls post hoc test was used to compare multiple groups. The correlation between two variables was analyzed by Pearson's correlation. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Thyroid hormone levels in plasma

After 26 days of thyroid hormones administration, the T3 plasma levels was significantly increased in AMIT group when compared with AMI as shown in Table A. In SHAMT rats, however, these levels were not statistically different from other groups. There is also no difference in T3 levels between AMI and SHAM. Levels of T4 were not different between the groups.

Morphometric analysis

Table A shows the morphometric measurements obtained at 28 days after the surgery. The body weight was not different between the groups. There was also no significant difference in the scar weight between AMI and AMIT groups. The heart weight and the heart weight to body weight ratio, which evaluates heart hypertrophy, were increased in AMI and SHAMT groups when compared with SHAM. In AMIT rats, these parameters were increased when compared with AMI and SHAMT. AMI rats presented an increase of 26% in the lung wet to dry weight ratio when compared with SHAM rats, indicating the development of lung congestion. Hormonal treatment prevented this increase in AMIT rats. In this group, the value of this parameter was reduced compared to AMI and it was not different from SHAMT rats (Table A). MPI was positively correlated with lung congestion ($r = 0.60$, $P = 0.013$). The liver wet to dry weight ratio, which indicates liver congestion, was not different between the groups.

Echocardiographic analysis

Table A shows echocardiographic measurements obtained 28 days after surgery. There was no significant difference in the infarct size area between AMI and AMIT groups. Infarcted animals showed a significant cardiac dilatation, evaluated through the measurement of left ventricular systolic and diastolic transverse areas. These parameters were increased in AMI and AMIT rats when compared with SHAM and SHAMT, respectively. However, AMIT group

presented smaller systolic and diastolic areas when compared with AMI (Table A). Twenty-eight days after the surgery, AMI rats showed a decrease of 12% in the left ventricular posterior wall thickness when compared with SHAM group. Hormonal treatment prevented this decrease in AMIT rats (Table A). In this group, this parameter was not different from SHAMT. Twenty-eight days after the infarction, heart rate was not altered in AMI group when compared with SHAM. However, AMIT and SHAMT rats presented an increase in heart rate when compared with AMI and SHAM, respectively. Infarcted animals presented a significant deterioration in cardiac systolic function, evaluated through ejection fraction, when compared with SHAM animals (Table A). On the other hand, global cardiac function, evaluated through MPI, was impaired only in AMI rats. This group showed an increase of 102% in MPI when compared with SHAM group. In AMIT group, however, this parameter was 23% reduced when compared with AMI and was not statistically different from SHAMT ($P = 0.062$) (Fig. A).

Oxidative stress analysis and protein expression

The levels of hydrogen peroxide were measured in the heart tissue. AMI rats presented an increase in these levels when compared with SHAM group. Treatment with thyroid hormones prevented this increase in AMIT rats (Fig. B.1). The levels of GSH (Fig. B.2) were not different between the groups. GSSG levels, however, were increased in AMI group compared with SHAM. T3 and T4 administration reduced significantly these levels in AMIT (Fig. B.3). The GSH/GSSG ratio, representing redox balance, was significantly reduced in AMI and SHAMT groups, when compared with SHAM. In AMIT rats, this ratio was increased compared with AMI and SHAMT groups (Fig. B.4). Lipid peroxidation, a marker of oxidative damage, was 52% increased in AMI when compared with SHAM group. Hormonal treatment prevented this increase in AMIT rats (Fig. B.5). The activity and expression of antioxidant enzymes were also measured in the heart tissue. SOD activity and expression were increased in AMI when compared with SHAM and AMIT groups (Fig. C.1 and C.2). This enzyme activity was positively correlated with the levels of GSSG ($r = 0.42$, $P = 0.021$). The activity and the expression of catalase, however, were not different between the groups (Fig. C.3 and C.4). On the other hand, GPx activity was increased in AMI

and AMIT rats compared with SHAM and SHAMT, respectively. There is no difference in this enzyme activity between both infarcted groups. In SHAMT rats, this enzyme activity was decreased compared to SHAM (Fig. C.5). GPx expression was significantly increased in AMI rats when compared with SHAM and AMIT (Fig. C.6). The expression of Nrf2, XO, and TR α were also analyzed. Nrf2 expression was increased in AMI rats when compared with SHAM. In AMIT rats, however, it was reduced when compared with AMI and it was not different from SHAMT (Fig. D.1). The expression of XO was reduced in AMIT rats when compared with AMI and SHAMT (Fig. D.2). TR α expression was not different between the groups (Fig.D.3). TR β expression, however, was increased in AMIT rats when compared with AMI and SHAMT. In AMI group, this receptor expression was not different from SHAM (Fig. D.4).

Discussion

The main finding of this study was to demonstrate that treatment of infarcted rats with thyroid hormones promoted beneficial effects in the left ventricle, not only decreasing the levels of hydrogen peroxide, but also preventing redox imbalance and lipid peroxidation. This was associated with normalization in MPI, reduction in cardiac dilatation, and absence of lung congestion 28 days after the ischemic insult.

The rats submitted to acute myocardial infarction showed impairment in cardiac function and left ventricular dilatation. These findings are similar to what was previously described (Schenkel et al., 2010; Tavares et al., 2010). The similarity among infarcted areas exhibited in all animals is a good indicative of the reproducibility of the surgical method used in the present study (Schenkel et al., 2010; Tavares et al., 2010). The levels of T3 and T4 were not different in AMI rats when compared with SHAM. Corroborating with this, several studies in rats also did not demonstrate alteration in the plasma levels of these hormones after myocardial infarction (Chen et al., 2013, Pantos et al., 2008, 2007). Analyzing the morphometric measurements, it was found that AMI rats presented heart hypertrophy and lung congestion. These results are in accordance with other studies that found an increase in cardiac mass and a progression to heart failure in this experimental model (Schenkel et al., 2012, 2010). In addition to morphometric data, echocardiographic findings showed that AMI rats presented

cardiac dilatation and loss of posterior wall thickness. This group seems to present a pattern of eccentric pathological hypertrophy (Grossman et al., 1975). These alterations in cardiac morphology were followed by a deterioration in cardiac systolic function, evaluated through ejection fraction. MPI, which is an index of cardiac global function (systolic and diastolic), was also impaired in these animals. An increase in this parameter suggests an adaptive response of the heart in an attempt to keep its pumping ability after myocardial injury (Cury et al., 2005).

The hormonal treatment promoted higher plasma levels of T3 in AMIT rats when compared with AMI. The levels of T4, however, were not increased in treated animals. A conversion of T4 to T3 by deiodinases type-1 (D1) and type-2 (D2) may be a possible explanation for this result (Gereben et al., 2008). However, since this mechanism was not evaluated, it is not possible to confirm it. The higher levels of T3 seem to be the reason for the increase in heart rate found in AMIT rats and it was also described previously (Pantos et al., 2008, 2007). AMIT rats presented the highest values of cardiac hypertrophy when compared with other groups. This finding probably reflects a synergistic effect of hormonal treatment and post-infarction hypertrophic response. In this group, thyroid hormones prevented the loss of the posterior wall thickness, resulting in higher cardiac mass. Treatment with T3 and T4 also prevented the development of lung congestion in infarcted rats (Table A). Similar results were found in infarcted mice that received thyroid hormones (Mourouzis et al., 2012). AMIT rats showed a reduction in cardiac dilatation when compared with AMI. Corroborating these results, Pantos et al., (2008), demonstrated that thyroid hormones are capable of promoting favorable ventricle remodeling and reducing left ventricular chamber dilatation (Pantos et al. 2008). In the present study, the dose of thyroid hormones administrated did not improve ejection fraction in AMIT rats. Nevertheless, many studies have shown an improvement of this parameter in infarcted rats treated with T3 and/or T4 (Pantos et al., 2008, 2007; Forini et al., 2011). The AMIT group, however, presented a normalization in MPI. Since MPI is not influenced by heart rate (Poulsen et al., 2000), which is increased by thyroid hormones, this parameter could be an interesting tool to evaluate cardiac global function in this experimental model. This functional improvement, evaluated through MPI, was correlated with the absence of lung congestion in treated animals. Therefore, the

administration of thyroid hormones produced an improvement in both morphological and functional parameters, as was previously described by other authors (Pantos et al., 2008; Mourouzis et al., 2012).

AMI rats presented an increase in the levels of hydrogen peroxide when compared with other groups. This was associated with redox imbalance, demonstrated through an increase in GSSG levels and a reduction in GSH/GSSG ratio. High levels of hydrogen peroxide were also associated with lipid peroxidation in AMI rats. Treatment with thyroid hormones normalized the levels of hydrogen peroxide and the redox balance, and protected against lipid peroxidation in infarcted rats. In SHAMT group, however, we verified a deterioration in the redox status and a decrease in GPx activity when compared with SHAM. These results demonstrate that positive effects of these hormones occur mainly in a context of heart disease.

As a response to high levels of hydrogen peroxide and to oxidative stress, cellular defenses need to become more activated (Halliwell, 2006). In this scenario, an increase in ROS levels could induce the activation of the transcription factor, Nrf2 (Itoh et al., 2004; Videla, 2010). In the presence of oxidant molecules, the Nrf2 can translocate to the nucleus and interact with the antioxidant response elements (AREs) localized in the promoter region of SOD and GPx genes, increasing the expression of these enzymes (Itoh et al., 2004). In fact, we found an increase in the expression of the Nrf2 and of the antioxidant enzymes, SOD and GPx, in AMI rats. SOD and GPx activity was also higher in this group. Since ROS are the main substrate for these enzymes, high levels of these species may explain the increase in the enzymatic activity (Halliwell, 2006). In AMIT rats, the expression of the Nrf2, and of the enzymes SOD and GPx were not induced. The activity of SOD and catalase was also not increased in these animals when compared with SHAMT. The low levels of hydrogen peroxide found in this group is probably the explanation for these results. GPx activity, however, was increased when compared with SHAMT and it was not different from AMI. In view of that, GPx could present an important part in thyroid hormones protective effect against oxidative stress.

Thyroid hormones administration reduced the expression of the enzyme XO in AMIT rats when compared with AMI and SHAMT. Since XO is an important source of ROS in the heart (Kelley et al., 2010), a decrease in the expression of

this protein could be a possible explanation for the low levels of hydrogen peroxide found in AMIT group. Under physiological conditions, xanthine dehydrogenase form is predominant; however, it can be converted into XO by the oxidation of sulfhydryl residues or by limited proteolysis. This enzyme can generate hydrogen peroxide through the catalytic oxidative hydroxylation of purine substrates (Kelley et al., 2010). An increase in the expression of XO was demonstrated in rats with dilated cardiomyopathy and its inhibition was reported to improve cardiac remodeling (Minhas et al., 2006). In the present study, the decrease in XO expression in AMIT rats could be involved with the positive effects in terms of cardiac remodeling found in this group. A decrease in the levels of hydrogen peroxide promoted by thyroid hormones was also described in the hepatic tissue of rats (Videla, 2010). In the liver, low doses of T3 could stimulate an acceleration of substrate cycles, increasing mitochondrial oxidative phosphorylation, and induce transcriptional upregulation of uncoupling protein genes, leading to less mitochondrial ROS generation (Grant, 2007; Voci et al., 2001). The importance of these mechanisms in the effects of T3 and T4 on cardiac oxidative stress still needs to be investigated.

Thyroid hormones administration did not modify TR α expression in the infarcted myocardium. Despite the fact that this receptor is relevant for T3 and T4 cardioprotective effect (Mourouzis et al., 2013a), the positive effects found in the present study did not seem to involve a modulation of its expression. TR β expression, however, was increased in AMIT rats when compared with AMI and SHAMT. This receptor was described to be decreased in an early phase of myocardial infarction and this was related with a pathological hypertrophy of the heart and with a progression to a heart failure state (Pantos et al., 2010b). Although AMI group did not present a reduction in TR β levels, the hormonal doses used in our protocol were able to increase this receptor expression in the infarcted rats. This result could be involved with the positive effects of T3 and T4 found in AMIT group.

As a limitation of the present study, the lack of a control group using T3 and T4 alone did not permit to isolate the effects of each hormone in terms of cardioprotection after myocardial infarction. Another weakness of this study is the absence of an evaluation of the Nrf2 translocation process to the nuclear compartment, which would add more information about the regulation of ARE-

modulated gene expression. The expression of this transcription factor was performed in cardiac tissue homogenate and cytosolic and nuclear expression were not evaluated separately.

Conclusion

Taken together, our data suggest that hormonal treatment with T3 and T4 promotes an improvement in cardiac function and in redox balance, reducing the levels of ROS and preventing the lipid peroxidation. It seems to be beneficial for cardiomyocytes, since high levels of these species are involved with apoptosis and heart failure (Singal et al., 1999). This process may have a significant implication in the cardioprotective effect of thyroid hormones in the myocardial infarction.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq, CAPES, and FAPERGS, Brazilian Research Agencies.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121–126.
- Akerboom, T.P., Sies, H., 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Meth. Enzymol.* 77, 373–382.
- Araujo, A.S.R., et al. 2006. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 249, 133-139.
- Chen, Y.F., et al. 2013. Improvement of left ventricular remodeling after myocardial infarction with eight weeks L-thyroxine treatment in rats. *J. Transl. Med.* 11, 40.
- Cury, A.F., et al. 2005. Myocardial Performance Index in Female Rats with Myocardial Infarction: Relationship with Ventricular Function Parameters by Doppler Echocardiography. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 18, 454-460.
- Fernandes, R.O., et al. 2011. Redox status and pro-survival/pro-apoptotic protein expression in the early cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *Cell. Biochem. Funct.* 29, 617–623.

Flohe, L., Gunzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* 105, 114–121.

Forini, F., et al. 2011. Early long-term L-T3 replacement rescues mitochondria and prevents ischemic cardiac remodelling in rats. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 514-524.

Francis, J., et al. 2001. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, 1734–1745.

Gereben, B. et al. 2008. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr. Rev.* 29, 898–938.

Gonzalez, F.B., et al. 1991. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 10, 93-100.

Grant, N., 2007. The role of triiodothyronine-induced substrate cycles in the response to overnutrition: thyroid hormone as an antioxidant. *Med. Hypotheses* 68, 641–648.

Grossman, W., et al. 1975. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest.* 56, 56 – 64.

Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 141, 312–322.

Itoh, K., et al. 2004. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1208–1213.

Johns, T.N.P., Olson, B.J., 1954. Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals. *Ann. Surg.* 140, 675-682.

Kelley, E., et al. 2010. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 493–498.

Klein, D., et al. 1995. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36, 59–66.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Llesuy, S.F., et al. 1985. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adramiyacin and 4'-epiadramiyacin in mice. *Tumori* 71, 241–249.

- Lowry, O.H., et al. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Makino, A., et al. 2009. Thyroid hormone receptor-beta is associated with coronary angiogenesis during pathological cardiac hypertrophy. *Endocrinology* 150, 2008–2015.
- Marklund, S.L., 1985. Pyrogallol autooxidation, in: *Handbook of methods for oxygen radical research* CRC. Boca Raton: Press, pp. 243–247.
- Minhas, K. M., et al. 2006. Xanthine oxidoreductase inhibition causes reverse remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Circ. Res.* 98, 271–279.
- Mourouzis, I., et al. 2012. Dose-dependent effects of thyroid hormone on post-ischemic cardiac performance: potential involvement of Akt and ERK signalings. *Mol. Cell. Biochem.* 363, 235–243.
- Mourouzis, I., et al. 2013a. Inhibition of thyroid hormone receptor $\alpha 1$ impairs post-ischemic cardiac performance after myocardial infarction in mice. *Mol Cell Biochem.* 379, 97-105.
- Mourouzis, I., et al. 2013b. Thyroid hormone improves the mechanical performance of the post-infarcted diabetic myocardium: A response associated with up-regulation of Akt/mTOR and AMPK activation. *Metabolism.* 62, 1387-1393.
- Nozawa, E., et al. 2006. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 687–695.
- Pantos, C., et al. 2008. Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Basic Res. Cardiol.* 103, 308-318.
- Pantos, C., et al. 2010. Rebuilding the post-infarcted myocardium by activating ‘physiologic’ hypertrophic signaling pathways: the thyroid hormone paradigm. *Heart Fail. Rev.* 15, 143–154.
- Pantos, C., et al. 2010b. Thyroid hormone receptor alpha1 downregulation in postischemic heart failure progression: the potential role of tissue hypothyroidism. *Horm. Metab. Res.* 42, 718-724.
- Pantos, C., et al. 2011. New insights into the role of thyroid hormone in cardiac remodeling: time to reconsider? *Heart Fail. Rev.* 16, 79–96.

Pantos, C., et al. 2007. Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 32, 333–339.

Peron, A.P., et al. 2006. Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction despite congestive heart failure. *Arq. Bras. Cardiol.* 86, 105–112.

Pick, E., Keisari, Y., 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 38, 161–170.

Poulsen, S.H., et al. 2000. Value of the Doppler index of myocardial performance in the early phase of acute myocardial infarction. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 13, 723-730.

Schenkel, P.C., et al. 2010. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Mol. Cell. Biochem.* 341, 1-8.

Schenkel, P.C., et al. 2012. Time profile of hydrogen peroxide/ thioredoxin balance and its influence in the intracellular signaling post-myocardial infarction. *Exp. Physiol.* 97, 741–749.

Singal, P.K., et al. 1999. Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure. *Heart Fail. Rev.* 4, 353–360.

Tavares, A.M.V., et al. 2010. Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci.* 87, 699–706.

Tavares, A.M.V., et al. 2012. Early loss of cardiac function in acute myocardial infarction is associated with redox imbalance. *Exp. Clin. Cardiol.* 17, 263-267.

Videla, L.A., 2010. Hormetic Responses of Thyroid Hormone Calorigenesis in the Liver: Association with Oxidative Stress. *Life* 62, 460–466.

Voci, A., et al. 2001. Uncoupling protein 2 mRNA expression and respiratory parameters in Kupffer cells isolated from euthyroid and hyperthyroid rat livers. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 317–322.

Ziegelhoffer-Mihalovicova, B., et al. 2003. The expression of mRNA of cytokines and of extracellular matrix proteins in triiodothyronine-treated rat hearts. *Mol. Cell.* 247, 61-68.

Figure Captions

Figure A. Myocardial Performance Index, 28 days after myocardial infarction. Values are expressed as mean \pm SD from 6-8 animals per group. Two way ANOVA (Student Newman–Keuls post hoc test). ^a Significantly different from SHAM group ($P < 0.05$); ^b significantly different from AMI group ($P < 0.05$). MPI (^a $P < 0.001$, ^b $P = 0.010$).

Figure B. Hydrogen peroxide levels, redox balance, and lipid peroxidation in cardiac tissue, 28 days after myocardial infarction. Values are expressed as mean \pm SD from 6-8 animals per group. Two way ANOVA (Student Newman–Keuls post hoc test). ^a Significantly different from SHAM group ($P < 0.05$); ^b significantly different from AMI group ($P < 0.05$); ^c significantly different from SHAMT group ($P < 0.05$). (1) Hydrogen peroxide levels (^a $P = 0.010$, ^b $P < 0.001$). (2) GSH. (3) GSSG (^a $P < 0.001$, ^b $P = 0.013$). (4) GSH/GSSG (SHAM versus AMI ^a $P < 0.001$, SHAM versus SHAMT ^a $P < 0.001$, ^b $P = 0.012$, ^c $P = 0.034$). (5) Lipid Peroxidation (^a $P < 0.001$, ^b $P = 0.015$).

Figure C. Antioxidant enzymes activity and expression in cardiac tissue, 28 days after myocardial infarction. Values are expressed as mean \pm SD from 6-8 animals per group. Two way ANOVA (Student Newman–Keuls post hoc test). ^a Significantly different from SHAM group ($P < 0.05$); ^b significantly different from AMI group ($P < 0.05$); ^c significantly different from SHAMT group ($P < 0.05$). (1) SOD activity (^a $P = 0.009$, ^b $P = 0.017$) and (2) expression (^a $P = 0.007$, ^b $P = 0.009$). (3) Catalase activity and (4) expression. (5) GPx activity (SHAM versus AMI ^a $P = 0.041$, SHAM versus SHAMT ^a $P = 0.016$, ^c $P = 0.005$) and (6) expression (^a $P = 0.002$, ^b $P = 0.001$).

Figure D. Nrf2, XO, TR α and TR β expression in cardiac tissue, 28 days after myocardial infarction. Values are expressed as mean \pm SD from 6-8 animals per group. Two way ANOVA (Student Newman–Keuls post hoc test). ^a Significantly different from SHAM group ($P < 0.05$); ^b significantly different from AMI group ($P < 0.05$); ^c significantly different from SHAMT group ($P < 0.05$). (1) Nrf2 expression

(^a P = 0.002, ^b P = 0.009). (2) XO expression (^b P = 0.006, ^c P = 0.017). (3) TR α expression. (4) TR β expression (^b P = 0.011, ^c P < 0.001).

Table A: Thyroid hormones levels and morphometric and echocardiographic parameters, 28 days after myocardial infarction.

Parameters	Non-Treated		Treated	
	SHAM	AMI	SHAMT	AMIT
Thyroid hormones levels				
T4 (µg/dL)	5.61± 1.01	6.30± 0.46	6.02± 2.38	6.06± 1.57
T3 (ng/dL)	109± 21	114± 19	235± 172	200± 59 b
Morphometric data				
Scar weight (g)	-----	0.09±0.04	-----	0.08± 0.03
Body weight (g)	362± 43	359± 51	361± 51	323± 46
Heart weight (g)	0.87± 0.05	1.04± 0.12 a	1.01± 0.12 a	1.26± 0.12 bc
Heart/body weight (mg/g)	2.43± 0.24	3.00± 0.43 a	2.88± 0.44 a	4.01± 0.82 bc
Lung wet/dry weight (g/g)	1.49±0.27	1.88±0.37 a	1.57±0.24	1.43±0.22 b
Liver wet/dry weight (g/g)	3.36±0.08	3.40±0.02	3.41±0.10	3.54±0.30
Echocardiographic data				
Infarction size (%)	-----	54.2± 15.6	-----	52.7± 8.7
LVDA (cm ²)	0.40± 0.06	0.83± 0.04 a	0.44± 0.12	0.72± 0.10 bc
LVSA (cm ²)	0.17± 0.03	0.62± 0.06 a	0.20± 0.05	0.53± 0.09 bc
LVPW (cm)	0.17± 0.01	0.15±0.01 a	0.17±0.01	0.18±0.02 b
Ejection Fraction (%)	64.7±7.18	38.5±9.23 a	63.0±7.88	38.3±9.84 c
HR (beats/min)	222±42	227±14	279±73 a	320±24 b

Values are expressed as mean ± SD from 6-8 animals per group. LVDA (left ventricular diastolic area), LVSA (left ventricular systolic area), LVPW (left ventricular posterior wall thickness), HR (heart rate). ^a Significantly different from SHAM group (P < 0.05); ^b significantly different from AMI group (P < 0.05); ^c significantly different from SHAMT group (P < 0.05). T3 levels (^b P = 0.008); Heart weight (SHAM versus IAM ^a P = 0.003, SHAM versus SHAMT ^a P = 0.010, ^b P < 0.001, ^c P < 0.001); Heart/body weight (SHAM versus IAM ^a P = 0.025, SHAM versus SHAMT ^a P = 0.047, ^b P < 0.001, ^c P < 0.001); Lung wet/dry weight (^a P = 0.017, ^b P = 0.014); LVDA (^a P < 0.001, ^b P = 0.002, ^c P < 0.001); LVSA (^a P < 0.001, ^b P = 0.017, ^c P < 0.001); LVPW (^a P = 0.021, ^b P = 0.002); Ejection Fraction (^a P < 0.001, ^c P < 0.001); HR (^a P = 0.022, ^b P = 0.003).

Figure A

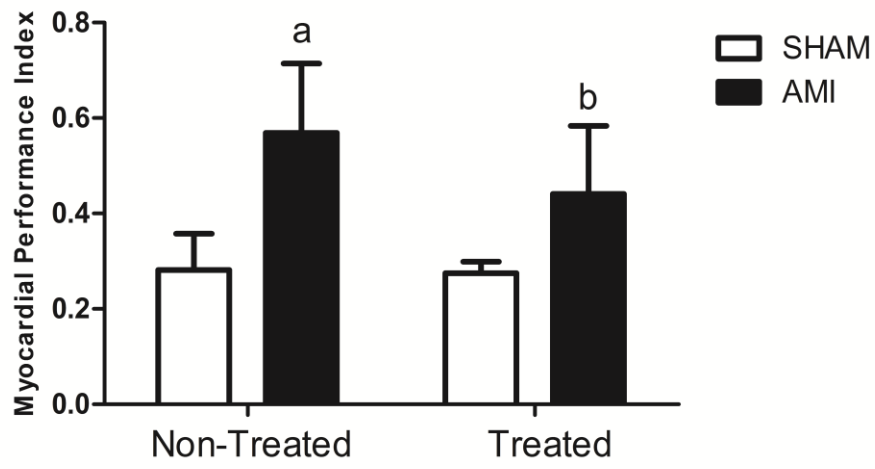
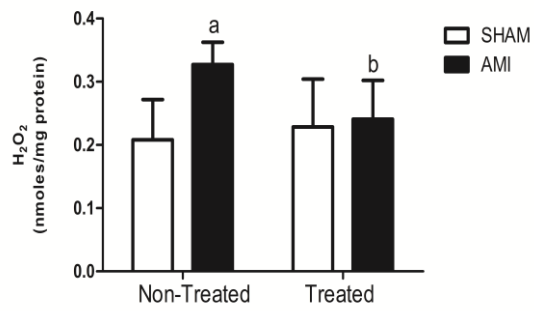
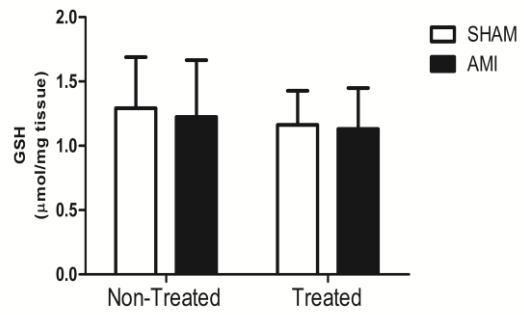


Figure B

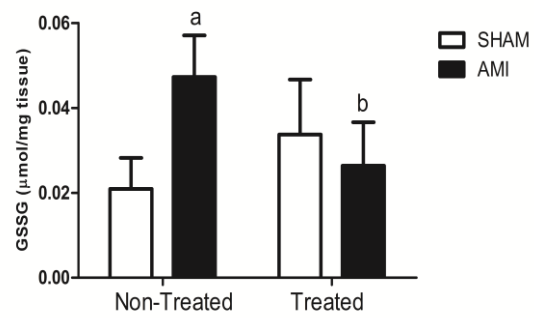
1



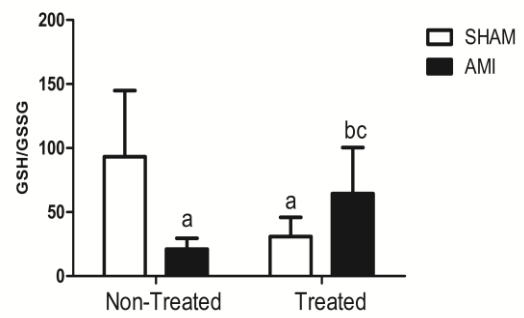
2



3



4



5

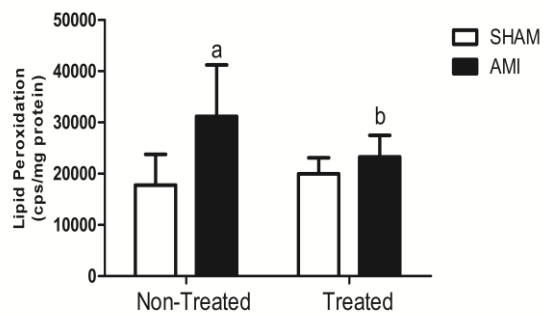
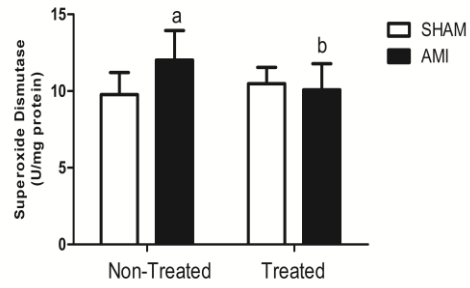
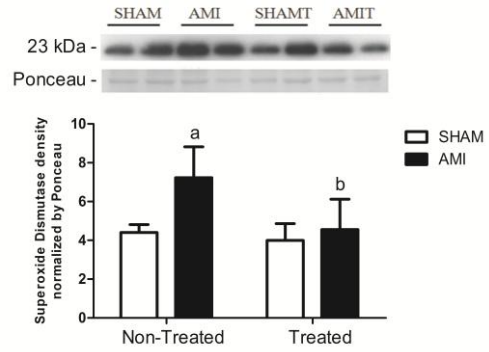


Figure C

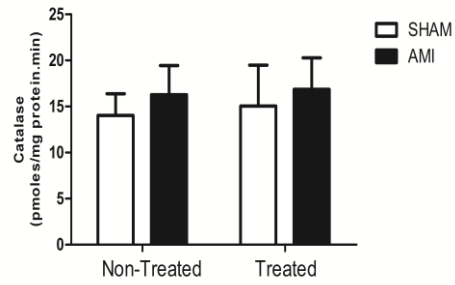
1



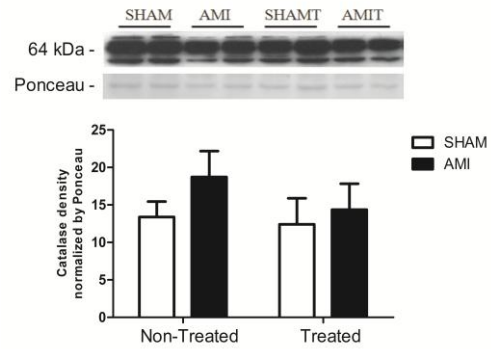
2



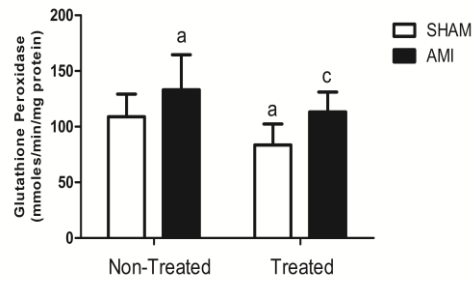
3



4



5



6

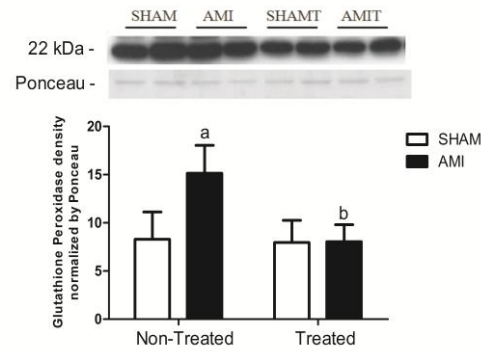
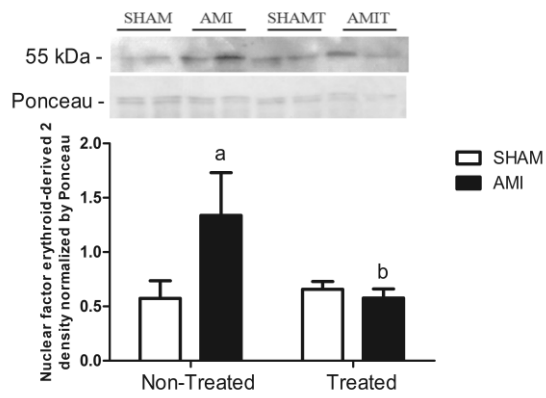
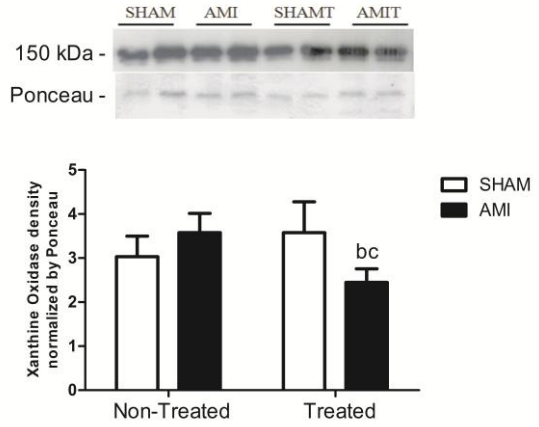


Figure D

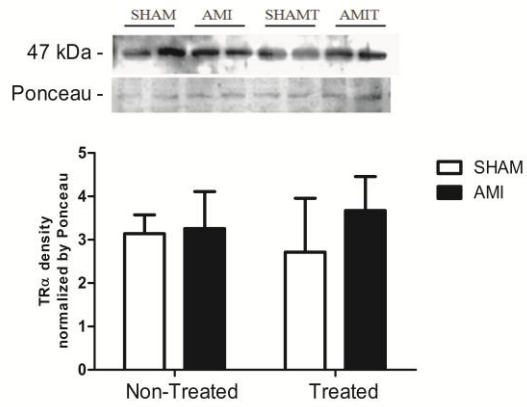
1



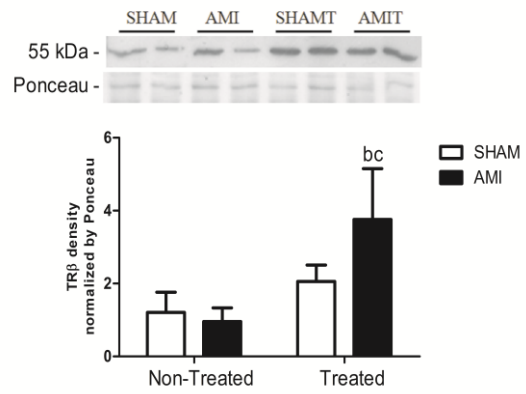
2



3



4



5.2. Artigo II

T3 and T4 decrease ROS levels and increase endothelial nitric oxide synthase expression in the myocardium of infarcted rats

Alexandre Luz de Castro¹, Angela Vicente Tavares¹, Rafael Oliveira Fernandes¹, Cristina Campos¹, Adriana Conzatti¹, Rafaela Siqueira¹, Tânia Regina G. Fernandes¹, Paulo Cavalheiro Schenkel², Carmem L. Sartório¹, Susana Llesuy³, Adriane Belló-Klein¹, Alex Sander da Rosa Araujo^{1*}

¹ Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, CEP 90050170. Porto Alegre, RS, Brazil.

² Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário Capão do Leão, CEP 96900010. Pelotas, RS, Brazil.

³ Universidad de Buenos Aires, C1053ABJ. Buenos Aires, Argentina.

*Corresponding author: Dr. Alex Sander da Rosa Araujo
alsanderaraujo@hotmail.com.

Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite 500, sala 01. Porto Alegre, RS, Brazil. CEP 90050170. Phone: 55 51 3308-3621.

Abstract

Myocardial infarction leads to a reduction in nitric oxide (NO) bioavailability and an increase in reactive oxygen species (ROS) levels. This scenario has been shown to be detrimental to the heart. Recent studies have shown that thyroid hormone (TH) administration presents positive effects after ischemic injury. Based on this, the aim of this study was to evaluate the effect of TH on NO bioavailability as well as on endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression after myocardial infarction. Male Wistar rats were divided into three groups: Sham-operated (SHAM), infarcted (AMI) and infarcted + TH (AMIT). During 26 days, the AMIT group received T3 and T4 (2 and 8 µg/100g/day, respectively) by gavage, while SHAM and AMI rats received saline. After this, the rats underwent ecocardiographic analysis, were sacrificed and the left ventricle was collected for biochemical and molecular analysis. Statistical analysis: one-way ANOVA with Student-Newman-Keuls post test. AMI rats presented a 38% increase in ROS levels. TH administration prevented these alterations in AMIT rats. The AMIT group presented an increase in eNOS expression, in NOS activity and in nitrite levels. TH administration also increased PGC-1α expression in the AMIT group. In conclusion, TH effects seem to involve a modulation of eNOS expression and an improvement in NO bioavailability in the infarcted heart.

Keywords: heart failure; thyroid hormones; oxidative stress; nitric oxide.

Introduction

Myocardial infarction results in the loss of viable cardiomyocytes and the development of heart failure, which is a major cause of mortality and morbidity [1]. Much evidence suggests the involvement of reactive oxygen species (ROS) in the impairment of cardiac function found in the post-infarction period [2, 3]. High levels of ROS are correlated with dilatation of the cardiac chambers and with an increase in left ventricle end-diastolic pressure after ischemic injury [4]. Two important antioxidant defences against ROS in the heart are the thioredoxin (TRX) and glutaredoxin (GRX) systems [5]. In the cells, TRX can act as an antioxidant enzyme, donating hydrogen to oxidized proteins. In this process, this enzyme becomes oxidized and in turn can be regenerated by TRX reductase [5]. In infarcted mice, the exogenous administration of TRX1 was shown to reduce cardiomyocyte apoptosis [6]. GRX, in turn, can catalyse the reduction of mixed disulphides, regenerating the activities of important cellular molecules [5, 7, 8].

Myocardial infarction has also been associated with a decrease in nitric oxide (NO) bioavailability, which can be evaluated by the balance between ROS and NO levels [9, 10]. In fact, high levels of ROS can cause an increase in the ROS/NO balance, which seems to be detrimental to the heart [9]. In the cardiac tissue, NO is mainly produced by endothelial nitric oxide synthase (eNOS), which is an important enzyme in terms of cardioprotection [11]. One study showed that transplantation of adipose tissue-derived stem cells embedded with eNOS was capable of restoring NO bioavailability in the heart [12]. eNOS-derived NO can cause beneficial effects such as an increase in guanosine 3,5-monophosphate (cGMP)-dependent expression of peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR gamma) co-activator 1a (PGC-1 α) [13]. This transcriptional factor is a strong promoter of mitochondrial biogenesis and is related with positive effects on cardiac cell metabolism [14].

Several studies have evaluated the use of thyroid hormones as a therapeutic tool for the treatment of complications of acute myocardial infarction [14-16]. In an experimental model of infarction, thyroid hormone administration was capable of promoting favourable ventricle remodelling and decreasing cardiac wall stress [15]. Recently, the effects of T3 and T4 after myocardial

infarction were associated with an improvement in the redox status of the myocardium [17].

Despite the fact that the ROS/NO balance seems to be relevant for the infarcted heart [9-12], there are no studies evaluating the effects of T3 and T4 in this balance, as well as on eNOS expression, after myocardial infarction. Based on this, the aim of this study was to investigate the effects of thyroid hormones in the ROS/NO balance as well as on eNOS expression after myocardial infarction.

Material and Methods

Ethical approval

The study and animal care procedures were approved by the Ethics Committee for animal research at this University (Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS; process number 23262).

Animals

Male Wistar rats (354 ± 47 g) were obtained from the Central Animal House of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. The animals were housed in plastic cages and received water and pelleted food *ad libitum*. They were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21 °C, 12 h light/dark cycle) and divided into 3 groups (5–7 animals per group): (SHAM), infarcted (AMI) and infarcted plus thyroid hormone administration (AMIT).

Surgical Procedure for Myocardial Infarction

Rats were anesthetized with ketamine (90 mg kg^{-1} , i.p.) and xylazine (20 mg kg^{-1} , i.p.) and myocardial infarction was produced by a method similar to one previously described [18]. Rats were submitted to a surgical ligation of the descending anterior branches of the left coronary artery, or to a sham-operation. The mortality of infarcted rats was approximately 40%.

T3 and T4 administration

Rats were allowed to recover for 48 hours (2 days) after the surgery. After this period, the AMIT group received T3 (2 µg/100 g/day) and T4 (8 µg/100 g/day), diluted in saline by gavage, while the SHAM and AMI groups received just saline. The period of hormonal administration was 26 days after the recovery period.

Measurement of T3 and T4 in plasma

Anesthetized rats were submitted to blood collection from the retro-orbital plexus 28 days after the surgery. The blood was centrifuged at 1000 X g for 10 min. Quantitative plasma T3 and T4 measurements were performed by chemiluminescence using ROCHE cobas e-411 analyser kits at TECSA Veterinary Laboratory.

Morphometric analysis

Twenty-eight days after the surgery, anesthetized rats were killed by cervical dislocation. The heart was rapidly excised and the scar area was removed and discarded. The left ventricle (LV) was separated, weighed and immediately frozen in liquid nitrogen. This tissue was used for biochemical and western blot analysis. LV hypertrophy was evaluated by the LV weight (in mg) to body weight (in g) ratio and the LV weight (in mg) to tibia length (in cm) ratio [19].

Echocardiographic analysis of infarction size

Rats were submitted to echocardiographic analysis 28 days after the surgery. Rats were anesthetized and placed in the left lateral decubitus position (45°) to obtain cardiac images. A Philips HD7 XE ultrasound system with a L2-13 MHz transducer was used. On each echocardiographic transverse plane, basal, middle and apical, the arch corresponding to the segments with infarction (I) and the total endocardial perimeter (EP) were measured at end-diastole. Infarction size (IS) was estimated as $\% IS = (I/EP) \times 100$ [20, 21]. LV systolic and diastolic diameters (cm) and systolic posterior wall thickness (cm) were measured using the M-Mode in three planes: basal, middle and apical. A final value for each animal was obtained by taking the average of all three planes [20, 21]. The wall tension index was evaluated as previously described [15, 16].

Tissue preparation

The LV was homogenized (1.15% w/v KCl and phenyl methyl sulfonyl fluoride PMSF 20 mmol/L) in Ultra-Turrax. The suspension was centrifuged at 1000 X g for 10 min at 4°C to remove nuclei and cell debris and the supernatants were used for biochemical measurements [22].

Determination of ROS levels

ROS generation was measured by 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence emission (Sigma-Aldrich, USA). DCFH-DA is membrane permeable and is rapidly oxidized to the highly fluorescent 2,7-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of intracellular ROS. The samples were excited at 488 nm; emission was collected with a 525 nm long pass filter and expressed as nmols per milligram of protein [23].

GRX activity

GRX activity was assayed through the protocol established by Holmgren and Åslund [24]. The amount of GSSG produced was measured spectrophotometrically at 340 nm after the addition of glutathione reductase and NADPH. It was expressed as nmols per milligram of protein.

TRX reductase activity

TRX reductase activity was assayed by an in vitro reduction of dithionitrobenzoic acid (DTNB) to 5-thionitrobenzoic acid (TNB). The conversion of DTNB to TNB was measured spectrophotometrically at 412 nm. It was expressed as units per minute per milligram of protein [25].

Nitric oxide synthase (NOS) activity

NOS activity was assessed by measuring the NO-induced conversion of oxyhaemoglobin to methaemoglobin, as previously described [26]. The reaction medium was composed of mmol/L: CaCl₂ 1.8, KCl 2.7, MgCl₂ 0.23, NaCl 137, NaH₂PO₄ 3.6, glucose 5.0, HEPES 10, pH 7.4, containing 2 µmol/L HbO₂ and 1 mmol/L L-arginine. It was expressed as nmols of NO per minute per milligram of protein.

Determination of Nitrites

Nitrites (NO_2^-) were determined using the Griess reagent, in which a chromophore with a strong absorbance at 540 nm is formed by the reaction of nitrite with a mixture of naphthylethylenediamine (0.1%) and sulfanilamide (1%). The results were expressed as mmol/L per milligram of protein [27].

Determination of protein concentration

Protein was measured through the method of Lowry [28], using bovine serum albumin as standard.

Western blot analysis

Tissue homogenization, electrophoresis, and protein transfer were performed as previously described [29]. Forty micrograms of protein were subjected to one-dimensional sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis in a discontinuous system using an 8–12% (w/v) separating gel and stacking gel [29]. The immunodetection was processed in PVDF membranes using the following primary antibodies: GRX3 (37 kDa), TRX1 (12 kDa), eNOS (150 kDa) and PGC-1 α (90 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA or Cell Signalling Technology, Beverly, MA). The bound primary antibodies were detected using anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugate secondary antibodies. The membranes were developed using chemiluminescence detection reagents and the autoradiographs generated were quantitatively measured with an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). The results were normalized by the Ponceau method [30].

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM. One-way ANOVA with Student-Newmann-Keuls post hoc test was used to compare multiple groups. Student's t-test was used to compare the infarction size between the AMI and AMIT groups. The correlation between two variables was analysed by Pearson's correlation. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

T3 and T4 levels in plasma

T3 and T4 levels are shown in Table 1. After 26 days of hormonal administration, T3 levels were significantly increased in the AMIT group when compared with AMI and SHAM. There was no difference in T3 levels between AMI and SHAM rats. The levels of T4 were not different among groups.

Morphometric and Echocardiographic data

Body weight was no different between the groups. The LV weight was increased 21% and 44% in AMI and AMIT rats, respectively, when compared with SHAM animals. AMIT rats presented the highest value of this parameter (Table 1). LV hypertrophy indicators (LV weight to body weight and LV weight to tibia length ratios) were increased in both infarcted groups when compared with SHAM. In AMIT rats, these parameters were augmented as compared to both the AMI and SHAM groups. LV diastolic and systolic diameters were also evaluated. These parameters were increased in the infarcted groups when compared with the SHAM group. There were no differences between AMI and AMIT rats in relation to these parameters. In terms of LV systolic posterior wall thickness, the AMI rats presented a decrease in these parameters when compared with SHAM rats. In the AMIT group, the hormonal treatment prevented this decrease. The wall tension index, which is indicative of cardiac wall stress, was also evaluated. This parameter was increased in the AMI rats when compared with the SHAM animals. T3 and T4 administration promoted a reduction of 15% in this parameter in AMIT as compared to AMI rats. There was no significant difference in infarction size between the AMI and AMIT groups (Table 1).

Biochemical and Western Blot data

AMI rats presented an increase of 38% in ROS levels when compared with the SHAM group. Thyroid hormone administration prevented this increase in AMIT rats. In this group, the levels of ROS were no different from those in SHAM animals (Figure 1). The levels of ROS were positively correlated with the wall

tension index ($r = 0.51$, $P = 0.027$). T3 and T4 administration significantly increased eNOS expression and NOS activity in AMIT rats when compared with AMI and SHAM. There was no difference in these parameters between AMI and SHAM animals (Figure 2a and 2b). The levels of nitrites, which are NO metabolites, were also increased in AMIT animals when compared with AMI and SHAM. There was no difference in these levels between the two non-treated groups (Figure 2c). The levels of nitrites were positively correlated with NOS activity ($r = 0.55$, $P = 0.026$). AMI rats also presented an increase of 105% in GRX activity when compared with SHAM. In AMIT rats, this enzyme activity was no different from in SHAM rats (Figure 3a). GRX activity was positively correlated with the levels of ROS ($r = 0.50$, $P = 0.013$). GRX3 expression, however, was no different between groups (Figure 3b). TRX reductase activity (Figure 3c) and TRX1 expression (Figure 3d) were also no different among groups. The protein expression of PGC-1 α was increased in AMIT rats when compared with SHAM animals (Figure 4). The expression of this transcription factor was positively correlated with NOS activity ($r = 0.67$, $P = 0.032$).

Discussion

The main finding of this study was to demonstrate that T3 and T4 administration decreased ROS levels and increased eNOS expression in the infarcted heart. This was associated with an increased PGC-1 α expression in the cardiac tissue.

Left coronary artery ligation promoted cardiac injury in the infarcted rats, leading to the loss of LV viable myocardium and the formation of a scar. The infarction size found in this work was not different between the two infarcted groups, indicating the reproducibility of the surgical method used in the present study [3, 4]. Despite the fact that infarction can induce a decrease in serum T3, a condition called 'low T3-syndrome' [31, 32], in the present study, the levels of thyroid hormones were no different between the AMI and SHAM groups. Other studies using a rat model of myocardial infarction also found no difference in the level of T3 after ischemic injury [15, 16]. In AMI rats, morphometric measurements demonstrated an increased LV mass and left chamber hypertrophy. Similar results have also been described by other authors [3, 21].

Echocardiographic findings from the AMI group showed an increase in LV diastolic and systolic diameters and a decrease in systolic posterior wall thickness when compared with SHAM rats. These results indicate LV chamber dilatation and loss of cardiac wall thickness, which are both related with pathological cardiac remodelling [1, 4]. The alteration in these structural parameters of the heart promotes an increase in LV wall stress [33]. In fact, the wall tension index, which is indicative of cardiac wall stress, was higher in AMI rats when compared with SHAM animals. In AMIT rats, thyroid hormone administration was effective in promoting an increase in T3 levels. T4 levels, however, were unchanged in this group. The hormonal administration increased LV mass and promoted left chamber hypertrophy in AMIT rats. In this group, the LV hypertrophy indices were statistically higher than those presented by AMI. A possible explanation for these results is the fact that T3 and T4 administration prevented the loss of posterior wall thickness in AMIT rats. In this group this parameter was no different from in SHAM animals. Therefore, this could be a possible explanation for the higher LV mass found in the infarcted treated rats when compared with AMI animals. This result was similar to what has been demonstrated in previous studies [15, 16]. LV systolic and diastolic diameters were increased in AMIT rats when compared with SHAM and these parameters were no different from those in AMI rats. However, thyroid hormone administration promoted an improvement in the wall tension index in AMIT rats when compared with AMI. Since thyroid hormones prevented the loss of cardiac wall, it is possible that this response could be compensating for LV dilatation, attenuating cardiac wall stress in AMIT animals. This positive effect of hormonal administration has also been previously described [15, 16].

In the present study, myocardial infarction promoted an increase in ROS levels in the AMI group. In heart cells, mitochondrial electron-transport chain is a major source of ROS [2, 34]. After myocardial infarction, the degradation of the adenine nucleotide cellular pool leaves the mitochondrial electron carriers in a reduced state, leading to an increase in electron leakage from the respiratory chain, that in turn reacts with the residual oxygen trapped in the mitochondria to produce ROS [34]. Previous studies have shown that ROS production is increased after myocardial infarction [2, 3]. As a response to ROS levels, the enzymatic activity of GRX was increased in the AMI group. This protein is a key

player in the defence against oxidative stress in mammalian cells [5]. The GRX system can catalyse both the formation and reduction of mixed disulphides between protein thiols and GSH, and its activity can be induced by oxidative stress [35]. However, in the present study, the expression of isoform GRX3 was no different between groups. In the AMIT group, ROS levels were significantly decreased when compared with AMI and were no different from those in SHAM animals. The activity of GRX was also decreased in AMIT rats when compared with AMI and was no different in SHAM animals. This result probably reflects an adaptation of the antioxidant system to the low levels of ROS [34]. In fact, the levels of ROS were positively correlated with GRX activity. The TRX system, however, was changed neither by myocardial infarction nor by thyroid hormone administration. In the present study, TRX reductase activity and TRX1 expression were no different among groups. In view of this, the decrease in ROS levels caused by T3 and T4 administration does not seem to involve a modulation of the TRX or GRX systems. In previous work from our group, it was demonstrated that T3 and T4 administration was capable of decreasing xanthine oxidase expression [17], which is an important source of ROS. This mechanism could be a possible explanation for the lower levels of ROS found in AMIT rats. Besides that, LV wall stress is also related to ROS production in the heart [36]. A study performed in patients with coronary heart disease showed that cardiac wall stress represents a primary determinant of myocardial oxygen consumption [36], which is related to ROS production. So, it is possible that the decrease in the wall tension index in AMIT rats could also be related to the low levels of ROS in this group. In fact, in the present study, the levels of ROS were positively correlated with the wall tension index.

In the heart, NO levels seem to be relevant for regulating cardiomyocyte function, tissue vascularization and perfusion [9, 37]. Under physiological conditions, eNOS is the major source of NO in cardiac tissue. However, after heart failure, the bioavailability of eNOS-derived NO is severely reduced [38, 39]. In the present study, eNOS expression, NOS activity and nitrite levels were no different between the AMI and SHAM groups. However, since AMI rats presented high levels of ROS, this could cause a change in the ROS/NO balance in favour of ROS, resulting in decreased NO bioavailability in this group. In fact, it was previously suggested that the balance between ROS and NO is a more relevant

parameter to establish NO bioavailability than its individual concentration itself [37]. In AMIT rats, however, T3 and T4 administration promoted an increase in eNOS expression, NOS activity and nitrite levels. In this group, thyroid hormone administration could be directly stimulating eNOS expression and its activity in the heart. This effect could lead to an increase in NO production, as was previously described [37]. In fact, NOS activity was positively correlated with nitrite levels, which are NO metabolites. Corroborating this, Spooner et al. showed that the thyroid hormone analogue 3,5 diiodothyropropionic acid (DITPA) was capable of increasing eNOS expression in the aortic tissue of infarcted rats, as well as increasing NO-dependent vasorelaxation [40]. Therefore, the decrease in ROS levels and increase in NO production indicate an improvement in NO bioavailability in the AMIT rats. Besides that, previous studies have shown that NO can act as an antioxidant molecule by regulating the pro-oxidant enzyme xanthine oxidase [41]. In view of this, an increase in NO bioavailability could be related to the reduction in ROS levels in AMIT rats. Therefore, the increase in eNOS expression and in NO bioavailability seems to represent an important part of T3 and T4 effects in the infarcted heart.

Moreover, thyroid hormone administration increased PGC-1 α expression in AMIT rats. Similar results were also described in infarcted rats treated with T3 alone [14]. PGC-1 α is a transcription factor involved mainly with the mitochondrial biogenesis process and cellular metabolism [42]. An increase in PGC-1 α levels seems to be positive, since this factor's expression was recently related to a decrease in cardiac cell apoptosis [43]. In another study, the absence of this factor was related to pulmonary congestion in a model of heart failure in mice [44]. In addition, previous studies also showed that PGC-1 α is directly involved with the regulation of myocardial mitochondrial antioxidant systems [43, 44]. Therefore, the increase in expression of this transcriptional factor could be another mechanism related to the normalization of ROS levels and, therefore, with the improvement in NO bioavailability in the AMIT rats. PGC-1 α expression was shown to be regulated by eNOS-derived NO [13]. Therefore, in AMIT rats, it is possible that thyroid hormones could be stimulating PGC-1 α expression mainly through an increase in NO levels. In fact, in the present study, NOS activity was positively correlated with PGC-1 α expression. Therefore, the increase in PGC-1 α expression could be a NO-dependent effect of T3 and T4 in the infarcted heart.

A limitation of the present study was the lack of a housekeeper protein expression to normalize western blot analysis. Since several loading proteins (tubulin, GAPDH) are influenced by thyroid hormones administration, or by myocardial infarction [45,46], Ponceau method was used for western blot normalization.

Taken together, our data showed that T3 and T4 administration promoted a reduction in the levels of ROS, an increase in eNOS expression and an improvement in NO bioavailability after myocardial infarction. These effects seem to be beneficial for the heart, since they resulted in PGC-1 α up-regulation [13]. These results may complement other studies that evaluate underlying mechanisms of T3 and T4 administration after myocardial infarction.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian Research Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). We are indebted to Dr. Constantinos Pantos and to Dr. Iordanis Mourouzis for their full assistance.

Compliance with Ethical Standards

The authors declare that there are no conflicts of interest. The authors declare that the experimental procedures were performed taking into consideration the welfare of animals and were approved by the Ethics Committee for animal research at Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

References

1. Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Felder RB (2001) Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:1734–1745.
2. Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK (1995) Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem* 147:77–81.
3. Schenkel PC, Tavares AM, Fernandes RO, Diniz GP, Ludke AR, Ribeiro MF, Araujo AS, Barreto-Chaves ML, Belló-Klein A (2012) Time profile of hydrogen

- peroxide/ thioredoxin balance and its influence in the intracellular signaling post-myocardial infarction. *Exp Physiol* 97:741–749.
4. Schenkel PC, Tavares AM, Fernandes RO, Diniz GP, Bertagnolli M, da Rosa Araujo AS, Barreto-Chaves ML, Ribeiro MF, Clausell N, Belló-Klein A (2010) Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 341:1-8.
 5. Berndt C, Lillig CH, Holmgren A (2007) Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:1227–1236.
 6. Tao L, Gao E, Hu A, Coletti C, Wang Y, Christopher TA, Lopez BL, Koch W, Ma XL (2006) Thioredoxin reduces post-ischemic myocardial apoptosis by reducing oxidative/nitrative stress. *Br J Pharmacol* 149:311–318.
 7. Lind C, Gerdes R, Schuppe-Koistinen I, Cotgreave IA (1998) Studies on the mechanism of oxidative modification of human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by glutathione: catalysis by glutaredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 247:481– 486.
 8. Barrett WC, DeGnore JP, König S, Fales HM, Keng YF, Zhang ZY, Yim MB, Chock PB (1999) Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. *Biochemistry* 38:6699 – 6705.
 9. Bauersachs J, Bouloumie A, Fraccarollo D, Hu K, Busse R, Ertl G (1999) Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation* 100:292–298.
 10. Heusch G, Post H, Michel MC, Kelm M, Schulz R (2000) Endogenous nitric oxide and myocardial adaptation to ischemia. *Circ Res* 87:146–152.
 11. Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasserli B, Aretz HT, Lindsey ML, Vançon AC, Huang PL, Lee RT, Zapol WM, Picard MH (2001) Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 104:1286–1291.
 12. Shi CZ, Zhang XP, Lv ZW, Zhang HL, Xu JZ, Yin ZF, Yan YQ, Wang CQ (2012) Adipose tissue-derived stem cells embedded with eNOS restore cardiac function in acute myocardial infarction model. *Int J Cardiol* 154:2–8.

13. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299:896–899.
14. Forini F, Lionetti V, Ardehali H, Pucci A, Cecchetti F, Ghanefar M, Nicolini G, Ichikawa Y, Nannipieri M, Recchia FA, Iervasi G (2011) Early long-term L-T3 replacement rescues mitochondria and prevents ischemic cardiac remodelling in rats. *J Cell Mol Med* 15:514-524.
15. Pantos C, Mourouzis I, Markakis K, Tsagoulis N, Panagiotou M, Cokkinos DV (2008) Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol* 103:308-318.
16. Mourouzis I, Giagourta I, Galanopoulos G, Mantzouratou P, Kostakou E, Kokkinos AD, Tentolouris N, Pantos C (2013) Thyroid hormone improves the mechanical performance of the post-infarcted diabetic myocardium: A response associated with up-regulation of Akt/mTOR and AMPK activation. *Metabolism* 62:1387-1393.
17. De Castro AL, Tavares AMV, Campos C, Fernandes RO., Siqueira R, Conzatti A, Bicca AM, Fernandes TR, Sartório CL, Schenkel PC, Belló-Klein A, da Rosa Araujo AS (2014) Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. *Mol Cell Endocrinol* 391:22-29.
18. Johns TNP, Olson BJ (1954) Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 140:675-682.
19. Araujo AS, Ribeiro MF, Enzweiler A, Schenkel P, Fernandes TR, Partata WA, Irigoyen MC, Llesuy S, Belló-Klein A (2006) Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrinol* 249:133-139.
20. Peron AP, Saraiva RM, Antonio EL, Tucci PJ (2006) Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction despite congestive heart failure. *Arq Bras Cardiol* 86:105–112.
21. Tavares AM, da Rosa Araújo AS, Baldo G, Matte U, Khaper N, Belló-Klein A, Rohde LE, Clausell N (2010) Bone marrow derived cells decrease

- inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci* 87:699–706.
22. Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S (1985) Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adramiyacin and 4'-epiadramiyacin in mice. *Tumori* 71:241–249.
 23. Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-231.
 24. Holmgren A & Aslund F (1995) Glutaredoxin. *Methods in Enzymol* 252:283-292.
 25. Holmegren A & Björnstedt M (1995) Thioredoxin and Thioredoxin reductase. *Methods in Enzymol* 252:199–208.
 26. Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A (2005) Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods in Enzymol* 396:444-455.
 27. Granger DL, Anstey NM, Miller WC, Weinberg JB (1999) Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymol* 301:49-61.
 28. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
 29. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
 30. Klein D, Kern RM, Sokol RZ (1995) A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol Int* 36:59–66.
 31. Olivares EL, Marassi MP, Fortunato RS, da Silva AC, Costa-e-Sousa RH, Araújo IG, Mattos EC, Masuda MO, Mulcahey MA, Huang SA, Bianco AC, Carvalho DP (2007) Thyroid function disturbance and type 3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats a time course study. *Endocrinology* 148:4786-4792.
 32. Pingitore A, Iervasi G (2008) Triiodothyronine (T3) Effects on Cardiovascular System in Patients with Heart Failure. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 3:19-27.
 33. Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975) Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56:56–64.

34. Halliwell B (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol* 141:312–322.
35. Pineda-Molina E, Klatt P, Vazquez J, Martina A, de Lacoba MG, Perez-Sala D, Lamas S (2011) Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* 40:14134 –14142.
36. Strauer BE, Beer K, Heitlinger K, Höfling B (1977) Left ventricular systolic wall stress as a primary determinant of myocardial oxygen consumption: comparative studies in patients with normal left ventricular function, with pressure and volume overload and with coronary heart disease. *Basic Res Cardiol* 72:306-13.
37. Araujo AS, Diniz G, Seibel F, Branchini G, Ribeiro MF, Brum IS, Khaper N, Barreto-Chaves ML, Belló-Klein A (2011) Reactive oxygen and nitrogen species balance in the determination of thyroid hormones-induced cardiac hypertrophy mediated by Renin-Angiotensin system. *Mol Cell Endocrinol* 333:78-84.
38. Treasure CB, Vita JA, Cox DA, Fish RD, Gordon JB, Mudge GH, Colucci WS, Sutton MG, Selwyn AP, Alexander RW et al. (1999) Endothelium-dependent dilation of the coronary microvasculature is impaired in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 81:772–779.
39. Forstermann U & Munzel T (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation* 113:1708–1714.
40. Spooner PH, Thai HM, Goldman S, Gaballa MA (2004) Thyroid hormone analog, DITPA, improves endothelial nitric oxide and beta-adrenergic mediated vasorelaxation after myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 44:453-459.
41. Cote CG, Yu FS, Zulueta JJ, Vosatka RJ, Hassoun PM (1996) Regulation of intracellular xanthine oxidase by endothelial-derived nitric oxide. *Am J Physiol* 271:869–874.
42. Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V (2008) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha. *Cardiovasc Res* 79:208–217.
43. Fernandes RO, Bonetto JH, Baregzay B, de Castro AL, Puukila S, Forsyth H, Schenkel PC, Llesuy SF, Brum IS, Araujo AS, Khaper N, Belló-Klein A (2015)

Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1 α stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts. *Mol Cell Biochem* 401:61–70.

44. Lu Z, Xu X, Hu X, Fassett J, Zhu G, Tao Y, Li J, Huang Y, Zhang P, Zhao B (2010) PGC-1 α regulates expression of myocardial mitochondrial antioxidants and myocardial oxidative stress after chronic systolic overload. *Antioxid Redox Signal* 13:1011-1022.
45. Vallejo CG, Seguido AM, Testillano PS, Risueño MC (2005) Thyroid hormone regulates tubulin expression in mammalian liver. Effects of deleting thyroid hormone receptor- α or - β . *Am J Physiol Endocrinol and Metabol* 289:1.
46. Samuel JL, Marotte F, Delcayre C, Rappaport L (1986) Microtubule reorganization is related to rate of heart myocyte hypertrophy in rat. *Am J Physiol* 251:1118-1125.

Figure Captions

Fig. 1 Reactive oxygen species (ROS) levels in cardiac tissue. Values are expressed as mean \pm SEM from 5–7 animals per group. One-way ANOVA (Student Newman–Keuls post hoc test). * Significantly different from SHAM group ($P < 0.05$); # significantly different from AMI group ($P < 0.05$)

Fig. 2 Endothelial nitric oxide synthase protein expression (a), nitric oxide synthase activity (b) and nitrite (NO_2^-) levels (c) in cardiac tissue. The representative western blot lanes were derived from the same blot. Values are expressed as mean \pm SEM from 5–7 animals per group. One-way ANOVA (Student Newman–Keuls post hoc test). * Significantly different from SHAM group ($P < 0.05$); # significantly different from AMI group ($P < 0.05$)

Fig. 3 Glutaredoxin activity (a), glutaredoxin-3 protein expression (b), thioredoxin reductase activity (c) and thioredoxin-1 protein expression (d) in cardiac tissue. The representative western blot lanes were derived from the same blot. Values are expressed as mean \pm SEM from 5–7 animals per group. One-way ANOVA (Student Newman–Keuls post hoc test). * Significantly different from SHAM group ($P < 0.05$); # significantly different from AMI group ($P < 0.05$)

Fig. 4 PGC-1 α protein expression in cardiac tissue. The representative western blot lanes were derived from the same blot. Values are expressed as mean \pm SEM from 5–7 animals per group. One-way ANOVA (Student Newman–Keuls post hoc test). * Significantly different from SHAM group ($P < 0.05$); # significantly different from AMI group ($P < 0.05$)

Table: Hormonal levels, morphometric and echocardiographic data of the experimental groups 28 days post-infarction.

Parameters	SHAM	AMI	AMIT
Hormonal levels			
T3 (ng/dL)	98.8± 7.2	105.8± 8.0	218.9± 58.0 *#
T4 (µg/dL)	5.1± 0.4	6.4± 0.3	6.5± 1.3
Morphometric data			
Body weight (g)	352±32	345±37	352±56
LV weight (g)	0.70±0.06	0.85± 0.11 *	1.01± 0.68 **
LV/body weight (mg/g)	1.96±0.021	2.41±0.39 *	3.19±0.59 *#
LV/ tibia length (mg/cm)	22.5±1.2	26.6±2.9 *	33.0±3.9 *#
Echocardiographic data			
LV diastolic diameter (cm)	0.68±0.099	0.90±0.048*	0.91±0.069*
LV systolic diameter (cm)	0.35±0.074	0.73±0.046*	0.77±0.07*
LV systolic posterior wall thickness (cm)	0.25±0.008	0.21±0.019*	0.23±0.015
Wall tension index	2.12±0.41	3.17±0.32*	2.65±0.57*#
Infarction size (%)	-----	50.9± 14.3	54.8± 7.8

Values are expressed as mean ± SD from 5-7 animals per group. LV (left ventricle). One way ANOVA (Student Newman–Keuls Method). * Significantly different from SHAM group (P < 0.05); # significantly different from AMI group (P < 0.05).

Figure 1

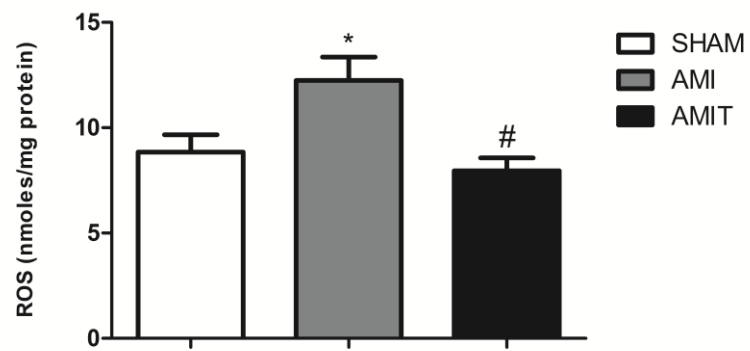


Figure 2

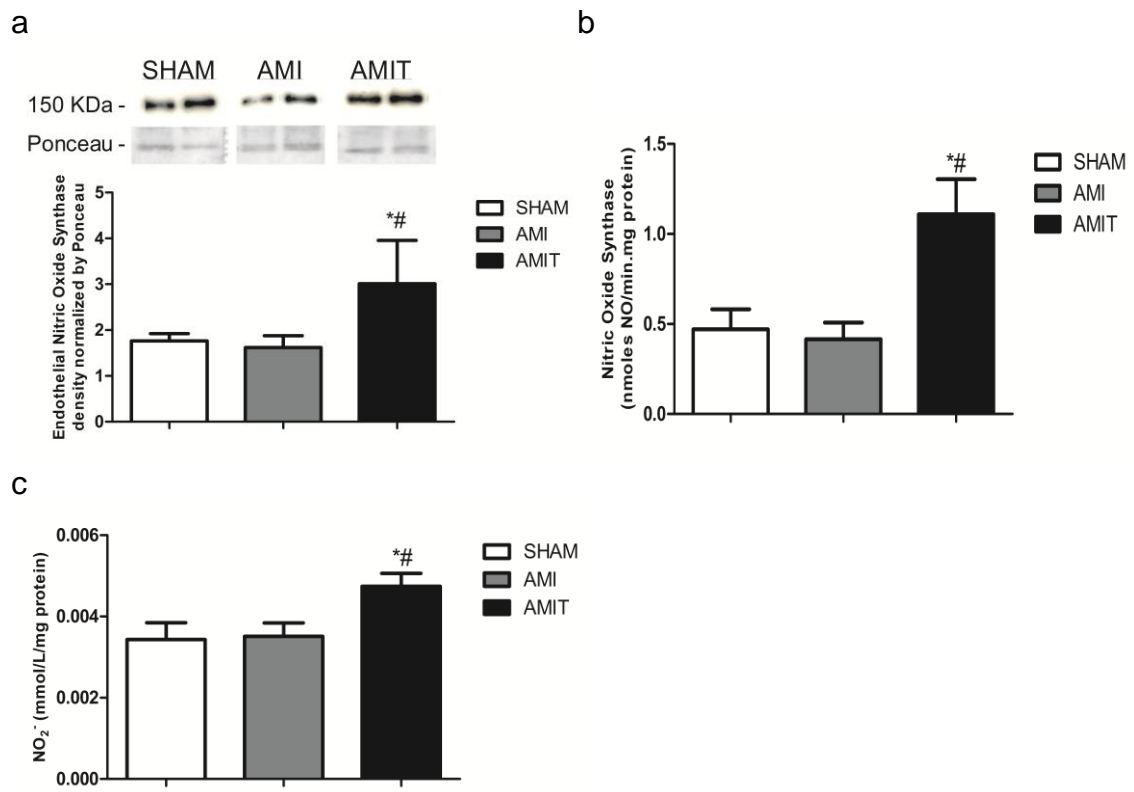
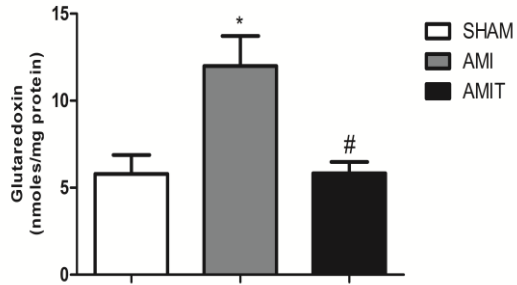
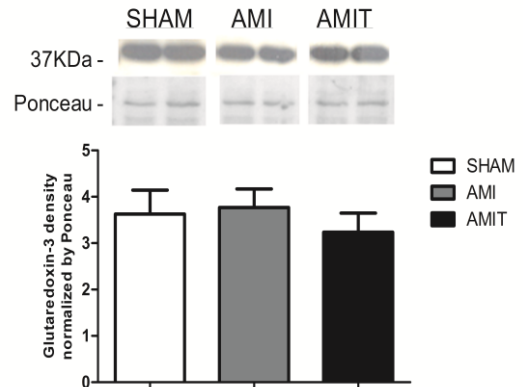


Figure 3

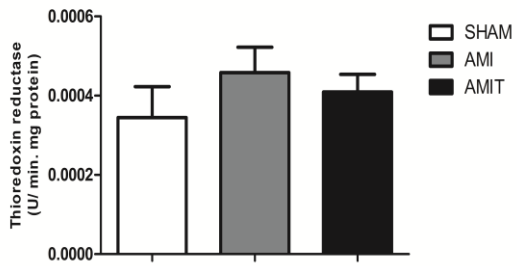
a



b



c



d

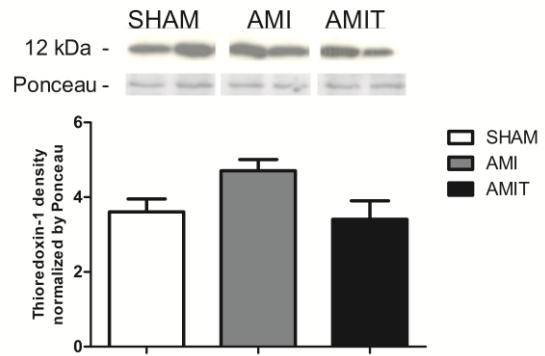
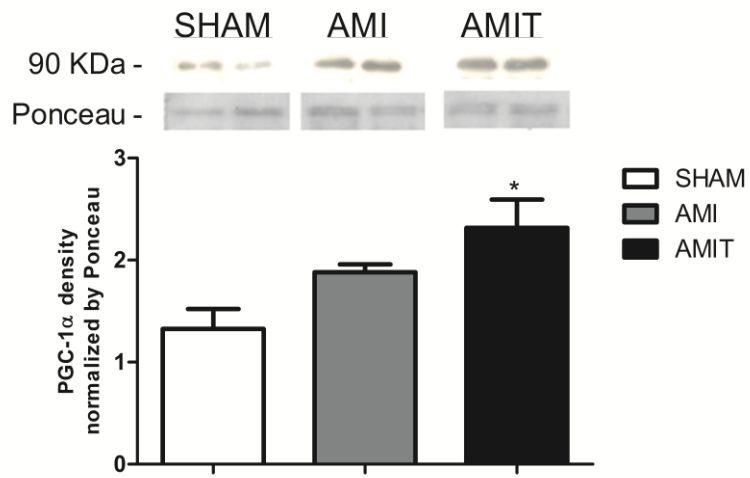


Figure 4



5.3. Artigo III

Thyroid hormones improve cardiac function and decrease expression of pro-apoptotic proteins in the heart of rats 14 days after infarction

Alexandre Luz de Castro¹, Rafael Oliveira Fernandes¹, Vanessa D. Ortiz, Cristina Campos¹, Jéssica H. P. Bonetto, Tânia Regina G. Fernandes¹, Adriana Conzatti¹, Rafaela Siqueira¹, Angela Vicente Tavares¹, Paulo Cavalheiro Schenkel², Adriane Belló-Klein¹, Alex Sander da Rosa Araujo¹

¹ Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

Corresponding author:

Dr Alex Sander da Rosa Araujo

Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, sala 01. Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90050170

Tel.: +55 (51) 3308-3621

Email: alsanderaraujo@hotmail.com.

Abstract

Introduction: Apoptosis is a key process associated with pathological cardiac remodelling in early-phase post-myocardial infarction. In this context, several studies have demonstrated an anti-apoptotic effect of thyroid hormones (TH).

Objective: The aim of this study was to evaluate the effects of TH on the expression of proteins associated with the apoptotic process 14 days after infarction.

Methods: Male Wistar rats (300–350 g) (n = 8/group) were divided into four groups: Sham-operated (SHAM), infarcted (AMI), sham-operated + TH (SHAMT) and infarcted + TH (AMIT). For 12 days, the animals received T3 and T4 (2 and 8 µg/100 g/day) by gavage. After this, the rats were submitted to haemodynamic and echocardiographic analysis, and then were sacrificed and the heart tissue was collected for molecular analysis. Statistical analyses included two-way ANOVA with Student–Newman–Keuls post test. Ethics Committee number: 23262.

Results: TH administration prevented the loss of ventricular wall thickness and improved cardiac function in the infarcted rats 14 days after the injury. AMI rats presented an increase in the pro-apoptotic proteins p53 and JNK. The hormonal treatment prevented this increase in AMIT rats. In addition, TH administration decreased the Bax:Bcl-2 ratio in the infarcted rats.

Conclusion: TH administration improved cardiac functional parameters, and decreased the expression of pro-apoptotic proteins 14 days after myocardial infarction.

Keywords: T3; T4; redox balance; reactive oxygen species.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian Research Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Introduction

Myocardial infarction is an ischaemic pathology of the heart and it is an important cause of death [1]. After cardiac damage, the surviving cardiomyocytes present a hypertrophic response in an attempt to maintain cardiac function. However, two weeks after the infarction, there is an expansion process of the infarcted area [2, 3]. This compromises the non-injured cardiomyocytes, leading to programmed cell death and cardiac remodelling [4, 5]. The loss of these cells is detrimental since it causes a reduction in left ventricle wall thickness, a decrease in myocardium contraction strength and can lead to heart failure [6]. In view of that, strategies to intervene in myocyte apoptosis at this time point after infarction are relevant to avoid the progression to a state of cardiac failure [3].

In the regulation of apoptosis, an important factor is the control of mitochondrial outer-membrane permeability by the Bcl-2 family of proteins [7]. In this scenario, after cellular injury, the pro-apoptotic protein Bax can translocate to the mitochondria, increase membrane permeability, and can promote the release of cytochrome c, caspase activation and apoptosis [8]. On the other hand, the anti-apoptotic protein Bcl-2 protects cardiomyocytes, thus avoiding cytochrome c release [3]. The balance between these two proteins is an important parameter to determine the activation of the mitochondrial apoptotic pathway [3, 8]. The tumour suppressor protein p53 is another important regulator of apoptosis. After infarction, there is an accumulation of this protein in the myocardium, leading to trans-activation of Bax and cellular death [9, 10]. Besides its effects on Bax, p53 can also regulate the pro-apoptotic protein c-jun N-terminal kinase (JNK) [11].

The involvement of reactive oxygen species (ROS) in the apoptotic process that occurs after myocardial infarction is well established [12]. After cardiac injury, these species can cause oxidative stress [13, 14], which alters mitochondrial membrane properties and increases release of pro-apoptotic proteins [12]. Besides that, an increase in ROS levels can activate JNK, which is intimately related with apoptosis signalling [15].

Several studies have shown a cardioprotective effect of thyroid hormones after myocardial infarction [16, 17, 18]. Administration of thyroid hormones in the post-infarction period was shown to preserve the left ventricular systolic function 28 days after the ischaemic injury [16]. In a rat model of myocardial infarction, these hormones were effective in decreasing ROS levels and in improving the

redox balance and nitric oxide bioavailability in the heart [19, 20]. In terms of apoptosis, a recent study showed that T3 administration for 3 days after the ischaemia–reperfusion cardiac injury was capable of inhibiting the p53-dependent activation of apoptosis [21]. In post-ischaemic brain tissue, T4 administration was shown to be protective through regulation of p53 target proteins [22].

Although there is evidence of a cardioprotective effect of thyroid hormones by mitigating cardiomyocyte apoptosis [16, 21], to our knowledge, there are no studies evaluating whether these hormones are capable of decreasing pro-apoptotic signalling protein expression in a rat model of myocardial infarction 14 days after cardiac injury. This effect would prevent the early loss of cardiac wall thickness, resulting in improved function of the heart. In addition, the involvement of oxidative stress in the positive effects of T3 and T4 at this time point has not been explored. In view of that, the aim of this study was to evaluate the effect of thyroid hormones on the expression of proteins associated with the apoptotic process and on oxidative stress parameters in the myocardium of infarcted rats 14 days after the damage.

Material and Methods

Ethical approval

The animal care procedures and the study protocol were approved by the Ethics Committee for animal research at the Federal University of Rio Grande do Sul – UFRGS (process number 23262).

Animals

Male Wistar rats (315 ± 21 g) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. The rats were housed in plastic cages and received pelleted food and water *ad libitum*. They were kept under standard laboratory conditions (12-h light/dark cycle, controlled temperature of 21°C). They were divided into four groups: Sham-operated (SHAM), infarcted (AMI), sham-operated plus treatment (SHAMT), and infarcted plus treatment (AMIT).

Myocardial infarction surgery

Rats (n = 55 animals) were anaesthetised (ketamine 90 mg/kg; xylazine 20 mg/kg, i.p.), and were submitted to a surgical procedure of ligation of the left coronary artery or to a sham-operation in which all surgical procedures were performed except the suture around the coronary artery [23]. After the surgery, the immediate mortality was around 30% (15 animals). After the allocation to groups and during the treatment protocol, the mortality was 10% (6 animals), representing a total rate of mortality of 40%. There was no difference between the groups in terms of mortality. The period of the experimental protocol was 14 days after the surgery.

Hormonal administration

After the cardiac surgery, rats were allowed to recover for 48 hours. After this period, SHAMT and AMIT groups received T4 (8 µg/100 g/day) and T3 (2 µg/100 g/day) diluted in saline by gavage, and SHAM and AMI received just saline [19]. The period of TH administration was for 12 days after recovery.

Hormonal measurement

Anaesthetised animals were submitted to blood collection from the retro-orbital plexus. The blood was centrifuged at 1000 x g for 10 min. Plasma L-thyroxine (T4) quantitative measurement was performed by radioimmunoassay at Laboratório Antonello.

Evaluation of echocardiographic parameters

Echocardiographic parameters were analysed using a Philips HD7 XE ultrasound system with a L12-13 MHz transducer, 14 days after the surgery. Animals were anaesthetised and placed in the left lateral decubitus position (45°) to obtain cardiac images. Left ventricular diastolic and systolic areas (cm²) were measured by tracing the endocardial border in the basal, middle and apical planes. Left ventricle systolic posterior wall thickness (cm) and left ventricle systolic anterior wall thickness (cm) were obtained using the M-Mode in the previously described three planes [24]. The left ventricle fractional shortening was measured as previously described [25, 26]. The arch corresponding to the

segments with myocardial infarction (I) and the total endocardial perimeter (EP) were evaluated at end-diastole in the three planes and infarction size (IS) was estimated as $\% IS = (I/EP) \times 100$ [24, 25, 26].

Evaluation of haemodynamic parameters

Cardiac haemodynamics were evaluated 14 days after the surgery. The animals were anaesthetised (ketamine 90 mg/kg; xylazine 20 mg/kg, i.p.) and the right carotid artery was cannulated with a PE-50 catheter connected to a strain-gauge transducer (Narco Biosystem Pulse Transducer RP-155, Houston, Texas, USA) linked to a pressure amplifier (HP 8805C, Hewlett Packard, USA). Pressure measurements were taken using a microcomputer equipped with an analogue-to-digital conversion board (Biopac 1-kHz sampling frequency, Biopac Systems, Inc., Goleta, California, USA). The pressure catheter was advanced into the left ventricle (LV) to record the left ventricular systolic pressure (LVSP, mmHg), the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP, mmHg), and its positive and negative derivatives (dP/dt_{max/min}, mmHg/s) [14].

Evaluation of morphometric parameters

Anaesthetised rats were killed by cervical dislocation. The heart was rapidly excised and the scar area was completely removed, weighed and discarded. The whole remaining cardiac tissue was used for biochemical and molecular analysis. The cardiac hypertrophy was evaluated by the heart weight (in mg) to tibia length (in cm) ratio [27]. The cardiac tissue was immediately frozen in liquid nitrogen and was used for biochemical and Western blot analysis.

Cardiac tissue preparation

The cardiac tissue was homogenized (phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF) 20 mmol/l and 1.15% w/v KCl) in Ultra-Turrax. The suspension was centrifuged at 1000 x g for 10 min at 0–4°C to remove the nuclei and cell debris. Supernatants were used for the biochemical measurements [28].

Determination of protein concentration

Protein was measured using the Lowry method [29] and bovine serum albumin as the standard.

Western blotting

Tissue homogenization, electrophoresis, and protein transfer were performed as previously described [27, 30]. One hundred micrograms of protein was submitted to one-dimensional sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis in a discontinuous system using an 8–14% (w/v) separating gel and a stacking gel [30]. The immunodetection was processed using the following primary antibodies: JNK (54/46 kDa), p53 (53 kDa), Bcl-2 (26 kDa) and Bax (20 kDa) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA or Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Primary antibodies were detected using anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. The membranes were developed using chemiluminescence detection reagents and the autoradiographs generated were quantitatively measured with an image densitometer (Imagemaster VDS CI, Amersham Biosciences Europe, IT). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (Full-Range Rainbow molecular weight marker, Bio-Rad, CA, USA). The results were normalised using the Ponceau method [20, 31].

Measurement of reactive oxygen species levels

ROS levels were measured using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence emission (Sigma-Aldrich, USA). DCFH-DA is membrane permeable and is rapidly oxidized to the highly fluorescent 2,7-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of intracellular ROS. The samples were excited at 488 nm; emission was collected with a 525-nm long-pass filter and expressed as nmol/mg protein [32].

Determination of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was evaluated using tert-butyl-hydroperoxide-initiated chemiluminescence measured in a liquid scintillation counter in the out-of-coincidence mode (LKB Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, LKB—Produkter AB, Sweden). Homogenates were placed in vials at a protein concentration of 0.5–1.0 mg/mL in a reaction medium consisting of 120 mmol/L KCl, 30 mmol/L phosphate buffer (pH = 7.4). Measurements were initiated by the

addition of 3 mmol/L tert-butyl hydroperoxide. Data are expressed as counts per second per milligram of protein (cps/mg protein) [33].

Evaluation of antioxidant enzymes activity

Superoxide dismutase activity was based on the inhibition of a superoxide radical reaction with pyrogallol, measured at 420 nm, and is expressed as units per milligram of protein [34]. Glutathione peroxidase activity was measured on the basis of the consumption of NADPH and was measured at 340 nm. The activity is expressed as nmols of peroxide/hydroperoxide reduced per minute per milligram of protein [35]. Catalase activity was measured by following the decrease in hydrogen peroxide absorbance, measured at 240 nm. It is expressed as pmoles of H₂O₂ reduced per minute per milligram of protein [36].

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA with Student–Newmann–Keuls *post hoc* test was used to compare multiple groups. The correlation between two variables was analysed by Pearson’s correlation. Values of P < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Hormonal levels and morphometric parameters

After 12 days of hormonal administration, T4 plasma levels were significantly increased in the treated groups (SHAMT and AMIT) when compared with the non-treated rats (SHAM and AMI; Table 1). This hormonal treatment promoted an increase in the heart weight and in the hypertrophy index (heart weight to tibia length) of SHAMT and AMIT groups when compared with SHAM and AMI, respectively. The AMIT group also presented higher values of these parameters when compared with SHAMT animals. The scar weight was not different between infarcted groups (Table 1).

Echocardiographic parameters

In terms of echocardiographic analysis, the left ventricle area was analysed during diastole (LVDA) and systole (LVSA) in order to evaluate cardiac dilatation. These parameters were increased in the infarcted rats when compared with sham animals. There was no difference between the infarcted groups (AMI and AMIT) in terms of cardiac dilatation. The anterior wall thickness was decreased in both infarcted groups when compared with the control groups. There was no difference between AMI and AMIT rats in this parameter. However, TH administration increased the anterior wall thickness in SHAMT animals when compared with SHAM rats. In AMI rats, however, the posterior wall thickness was decreased by 23% when compared with the SHAM group. The hormonal administration prevented this decrease in the AMIT group. In AMIT rats, there was no difference in this parameter when compared with SHAMT animals. The left ventricle fractional shortening – a measure of global cardiac contractility – was also evaluated. In both infarcted groups, this parameter was decreased when compared with control rats. In AMIT rats, however, this parameter was increased by 26% when compared with AMI rats. SHAMT rats also presented an increase in this parameter of contractility when compared with the SHAM group. The infarction size was not different between AMI and AMIT groups (Table 1).

Haemodynamic parameters

Figure 1 shows the haemodynamic parameters of the experimental groups 14 days after surgery. In AMI rats, there was a decrease (11%) in the left ventricle systolic pressure (LVSP) (Fig. 1a) and an increase (112%) in the left ventricle end-diastolic pressure (LVEDP) (Fig. 1b) when compared with the SHAM group. The left ventricle pressure derivatives (dP/dt max and dP/dt min) were also reduced in the AMI group when compared with the SHAM group (Fig. 1c and 1d). These findings are suggestive of a prejudice in the cardiac function. Thyroid hormone administration prevented these alterations in AMIT rats. In this group, there was a 36% increase in the LVSP when compared with AMI rats. In fact, in both treated groups (SHAMT and AMIT), this parameter was increased when compared with non-treated rats. Furthermore, T3 and T4 administration prevented the increase in LVEDP after myocardial infarction. In AMIT rats, this parameter was not different compared with SHAMT animals. The pressure

derivates were also increased in the treated animals when compared with the non-treated groups (Fig. 1).

Expression of pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins

Figure 2 shows the expression of the pro-apoptotic proteins p53 and JNK. In terms of p53 evaluation, myocardial infarction increased (111%) expression of this pro-apoptotic protein in the cardiac tissue of AMI rats. In the AMIT group, however, p53 expression was significantly decreased (41%) when compared with the AMI animals. Surprisingly, SHAMT rats also presented an increase in p53 expression when compared with SHAM animals (Fig. 2a). In AMI rats, the expression of JNK was augmented by 71% when compared with SHAM animals. Thyroid hormone administration prevented this increase. In AMIT rats, JNK levels were reduced (34%) when compared with AMI rats and were not different when compared with the SHAMT group (Fig. 2b). Figure 3 shows the Bcl-2 and Bax expression in the cardiac tissue. In AMI and AMIT rats, the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 was increased when compared with SHAM and SHAMT rats, respectively. However, Bcl-2 levels were significantly higher in AMIT rats when compared with AMI (Fig. 3a). The expression of the pro-apoptotic protein Bax was not different between the groups (Fig. 3b). The Bax:Bcl-2 ratio was significantly decreased in AMIT rats when compared with SHAMT and AMIT rats (Fig. 3c).

Oxidative stress evaluation

Figure 4 shows the evaluation of oxidative stress parameters in the cardiac tissue 14 days after the surgery. Reactive oxygen species levels were not different in AMI rats when compared with SHAM animals. However, SHAMT rats presented an increase in ROS compared with SHAM animals. In AMIT rats, the levels of ROS were reduced when compared with SHAMT rats and were not different from AMI rats (Fig. 4a). Lipid peroxidation was also increased only in SHAMT rats when compared with SHAM. In AMIT rats, this parameter was not different from AMI and was reduced compared with SHAMT rats (Fig. 4b). Lipid peroxidation was positively correlated with ROS levels ($r = 0.54$, $P = 0.0015$; Fig. 4c). The activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase) was not different between groups (Fig. 4d–f).

Discussion

The main finding of this study was that administration of thyroid hormones decreased expression of pro-apoptotic proteins p53 and JNK 14 days after the myocardial infarction. In addition, thyroid hormones increased the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, reduced the Bax:Bcl-2 ratio, and improved cardiac function of infarcted rats.

In the present study, the infarcted groups showed similar infarction area size and scar weight, indicating the reproducibility of the surgical method used [14, 26]. AMI rats did not show an alteration in T4 levels when compared with SHAM animals. Other studies using a rat model of infarction also did not find any difference in the levels of this hormone after the injury [17, 18]. The AMI group did not present an increase in the cardiac hypertrophy index when compared with SHAM rats 14 days after the ischaemic damage. Since these animals were evaluated in an early period after infarction, the compensatory cardiac hypertrophy was not evident, which is similar to what was previously demonstrated [37]. However, these rats presented an increase in the left ventricle diastolic and systolic areas, indicating chamber dilatation, and also presented a decrease in the thickness of the anterior and the posterior ventricle walls. These findings are related with a pathological pattern of cardiac remodelling [38]. AMI rats also presented a decrease in the left ventricle fractional shortening, indicating a significant impairment in cardiac contractility. Different results were found in the treated groups. The hormonal administration was effective in increasing T4 levels in SHAMT and AMIT animals when compared with SHAM and AMI rats, respectively. In both treated groups, the hypertrophy index was significantly increased, demonstrating an augmentation in cardiac mass caused by thyroid hormones. Thyroid hormones did not prevent cardiac dilatation in AMIT rats. Evaluating the cardiac anterior wall thickness, TH administration was not capable of preventing its decrease. Since the anterolateral portion of the left ventricle was the site of the ischaemic insult, which was produced by the ligation of the coronary artery, it was not expected that the hormonal administration could improve this parameter. In SHAMT rats, however, T3 and T4 administration increased the anterior wall thickness, which is in accordance with the morphometric data, indicating a hypertrophic effect of these hormones. In relation

to the posterior wall thickness, the hormonal treatment prevented a decrease in this parameter when compared with AMI, thus avoiding the development of an eccentric remodelling of the heart. These results are similar to those previously described in infarcted treated rats 28 days after the injury [20]. Since cardiomyocyte apoptosis is the main cause of the loss of the ventricular wall thickness after infarction [3], it is possible that this structural improvement observed in AMIT rats may reflect an anti-apoptotic effect of T3 and T4. Left ventricle fractional shortening, a global measurement of cardiac contractility, was evaluated. Thyroid hormone administration improved this parameter in AMIT rats when compared with AMI animals, which corroborates previous studies that demonstrate a positive effect of these hormones in terms of cardiac contractility after the infarction [17, 18].

In the AMI group, the alterations in the morphology of the heart were followed by a significant deterioration in cardiac function, as shown by the haemodynamic parameters. In these animals, the left ventricle systolic pressure was decreased and the diastolic pressure was increased when compared with SHAM rats. Left ventricle indices of contractility and relaxation ($dP/dt_{\max/\min}$) were also markedly reduced in the AMI group. These results suggest the development of cardiac dysfunction in these animals [14]. In AMIT rats, however, hormone administration prevented the development of this dysfunction 14 days after the infarction. In these animals, there was an increase in the left ventricle systolic pressure when compared with AMI rats. In addition, the diastolic pressure was reduced and the $dP/dt_{\max/\min}$ were increased in AMIT rats compared with AMI. Left ventricle systolic pressure and the indexes of contractility and relaxation were also increased in SHAMT rats compared with SHAM animals. These data indicate a beneficial action of T3 and T4 in the heart by improving the development of strength and the relaxation of the cardiac muscle. This may be related to the inotropic and lusitropic effects of thyroid hormones and also to the prevention of the loss of ventricular wall thickness [39]. These results corroborate previous findings that demonstrate a cardioprotective effect of thyroid hormones after infarction [16, 18].

In order to evaluate parameters involved with apoptosis, p53 expression was measured in the heart tissue. In the early phase of cardiac damage, there is an increase in the levels of this tumour suppressor protein, leading to the

activation of the mitochondrial apoptotic pathway [9, 10]. In fact, in AMI rats, there was increased p53 expression when compared with SHAM animals. Thyroid hormone administration, however, decreased this p53 expression in the AMIT group 14 days after the ischaemic insult. Similar results were shown in glioma cells, in which T4 administration decreased apoptosis through regulation of p53 [40]. A recent study in a rat model of ischaemia/reperfusion injury showed that T3 administration for 3 days was able to decrease p53 expression in the heart [21]. According to these studies, thyroid hormones can regulate p53-dependent apoptosis through both genomic and non-genomic mechanisms [21, 40]. In SHAMT rats, however, p53 expression was increased when compared with SHAM animals. This result corroborates previous data [19] and demonstrates that, in healthy heart tissue, thyroid hormone administration seems to be detrimental rather than beneficial. Another pro-apoptotic protein evaluated was c-jun N-terminal kinase. Similar to p53, there is an early activation of the JNK cascade minutes after myocardial infarction, both in the ischaemic and in the non-ischaemic heart tissue [41]. JNK protein expression is involved in apoptosis in the infarction border zone, cardiac dilatation and pathological remodelling [42, 43]. In the present study, JNK levels were increased in AMI rats compared with SHAM animals. Thyroid hormone administration reduced this pro-apoptotic protein expression in AMIT rats. Since p53 can regulate the JNK pathway through a positive feedback loop [11], it is possible that T3 and T4 could be reducing JNK levels through a p53-dependent mechanism. These results seem to be positive for the infarcted heart and indicate an anti-apoptotic effect of thyroid hormones in an early stage (14 days) of the cardiac insult.

In the present study, Bcl-2 expression in the myocardium of infarcted rats was also analysed. Surprisingly, AMI rats presented increased levels of this anti-apoptotic protein when compared with SHAM animals. A possible explanation for this data is the fact that, 14 days after the infarction, the remaining cardiomyocytes could be expressing this anti-apoptotic factor in an attempt to avoid apoptosis and to counterbalance the increased expression of pro-apoptotic mediators. However, since this mechanism was not evaluated, it is not possible to confirm this hypothesis. In AMIT rats, however, thyroid hormones significantly increased Bcl-2 expression when compared with AMI and SHAMT rats. In addition to Bcl-2, Bax expression was also evaluated after myocardial infarction.

Bax is a mitochondrial factor that plays a role in programmed cellular death [10]. In the present study, however, Bax expression was not different between the groups. A previous study also found no difference in the levels of Bax in the remote zone of the injured myocardium of rats, with or without T3 treatment [21]. Nevertheless, the Bax:Bcl-2 ratio, which is a classic parameter to evaluate the mitochondrial apoptotic pathway [3, 44], was significantly decreased in AMIT rats compared with the AMI and SHAMT groups. These results are in accordance with the pro-survival effect of thyroid hormones [16]. Since cardiomyocyte apoptosis is a key process associated with cardiac failure after infarction [5], the modulation of apoptotic signalling proteins could represent an important role in the positive effects of T3 and T4 in terms of cardiac function.

In relation to oxidative stress parameters, the infarcted animals did not show an increase either in ROS levels or in the lipid peroxidation process. Antioxidant enzyme activities were also not different between the groups. In addition, thyroid hormone administration did not promote any alteration in these parameters in AMIT rats. In relation to these data, a previous study demonstrated a decrease in ROS levels 2 days after the infarction, followed by high levels of ROS at 28 days [14]. Since, in the present work, oxidative stress parameters were analysed only after 14 days of injury, it is possible that, at this time point, the levels of ROS were yet to increase. In view of this, during this post-infarction period (14 days), oxidative stress did not seem to play a role either in the apoptotic process or in the cardiac functional impairment found in infarcted rats. At 28 days after infarction, a previous study showed that ROS levels are high and T3 and T4 administration was effective in preventing oxidative damage in the heart [19, 20]. SHAMT rats, however, presented an increase in ROS levels, which was correlated with lipid peroxidation of the cardiac tissue. This result is corroborated by previous data that show deterioration in the redox status in the myocardium of control rats treated with T3 and T4 [19].

In conclusion, our data show that thyroid hormones can modulate expression of apoptotic signalling proteins, leading to a reduction in p53 and JNK levels and an increase in Bcl-2 expression after myocardial infarction. In addition TH administration was positive in terms of cardiac function after the ischaemic injury. These results are relevant since there is a lack of therapeutic agents that may mitigate the apoptotic process after the myocardial infarction. In a clinical

context, thyroid hormone administration in the early phase of cardiac injury could represent an interesting tool to prevent the later development of heart failure.

Compliance with Ethical Standards

The authors declare that they have no conflict of interest. The authors declare that the experimental procedures were performed taking into consideration the welfare of animals and were approved by the Ethics Committee for animal research at Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

References

1. Francis J, Weiss RM, Wei SG, et al (2001) Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:1734–1745.
2. Jackson BM, Gorman JH, Moainie SL, et al (2002) Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 40:1160–1167.
3. Abbate A, Narula J (2012) Role of apoptosis in adverse ventricular remodeling. *Heart Fail Clin* 8(1):79–86.
4. Dispersyn GD, Mesotten L, Meuris B, et al (2002) Dissociation of cardiomyocyte apoptosis and dedifferentiation in infarct border zones. *Eur Heart J* 23:849–857.
5. Qin F, Liang MC, Liang C (2005) Progressive left ventricular remodeling, myocyte apoptosis, and protein signaling cascades after myocardial infarction in rabbits. *Biochim Biophys Acta* 1740:499–513
6. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN (2010) Cell death in the pathogenesis of heart disease mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 72:19–44.
7. Brady NR, Hamacher-Brady A, Gottlieb RA (2006) Proapoptotic BCL-2 family members and mitochondrial dysfunction during ischemia/reperfusion injury, a study employing cardiac HL-1 cells and GFP biosensors. *Biochim Biophys Acta* 1757:667–678.
8. Baines CP (2010) The cardiac mitochondrion: Nexus of stress. *Annu Rev Physiol* 72:61–80.

9. Miyashita T, Reed J (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80:293–299.
10. Pereg D, Cohen K, Mosseri M, et al (2015) Incidence and Expression of Circulating Cell Free p53-Related Genes in Acute Myocardial Infarction Patients. *J Atheroscler Thromb* [Epub ahead of print]
11. Saha MN, Jiang H, Yang Y, et al (2012) Targeting p53 via JNK Pathway: A Novel Role of RITA for Apoptotic Signaling in Multiple Myeloma. *PLoS One* 7(1):e30215.
12. Assaly R, d'Anglemont de Tassigny A, Paradis S, et al (2012) Oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore opening and cell death during hypoxia-reoxygenation in adult Cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 675:6–14.
13. Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, et al (1995) Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem* 147(1-2):77-81.
14. Schenkel PC, Tavares AM, Fernandes RO, et al (2010) Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Mol Cell Biochem* 341:1-8.
15. Muslin AJ (2008) MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin Sci (Lond)* 115(7):203–218.
16. Forini F, Lionetti V, Ardehali H, et al (2011) Early long-term L-T3 replacement rescues mitochondria and prevents ischemic cardiac remodelling in rats. *J Cell Mol Med* 15:514-524.
17. Pantos C, Mourouzis I, Markakis K, et al (2008) Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol* 103:308-318.
18. Mourouzis I, Giagourta I, Galanopoulos G, et al (2013) Thyroid hormone improves the mechanical performance of the post-infarcted diabetic myocardium: A response associated with up-regulation of Akt/mTOR and AMPK activation. *Metabolism* 62:1387-1393.
19. De Castro AL, Tavares AMV, Campos C, et al (2014) Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. *Mol Cell Endocrinol* 391:22-29.
20. De Castro AL, Tavares AMV, Fernandes RO, et al (2015) T3 and T4 decrease ROS levels and increase endothelial nitric oxide synthase expression in

the myocardium of infarcted rats. *Mol Cell Biochem* doi: 10.1007/s11010-015-2501-4.

21. Forini F, Kusmic C, Nicolini G, et al (2014) Triiodothyronine prevents cardiac ischemia/reperfusion mitochondrial impairment and cell loss by regulating miR30a/p53 axis. *Endocrinology* 155:4581–4590.

22. Genovese T, Impellizzeri D, Ahmad A, et al (2013) Post ischaemic thyroid hormone treatment in a rat model of acute stroke. *Brain Res* 1513:92–102.

23. Johns TNP, Olson BJ (1954) Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 140:675-682.

24. Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N, et al (2006) Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Braz J Med Biol Res* 39:687–695.

25. Peron AP, Saraiva RM, Antonio EL, et al (2006) Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction despite congestive heart failure. *Arq Bras Cardiol* 86:105–112.

26. Tavares AM, da Rosa Araújo AS, Baldo G, et al (2010) Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci* 87:699–706.

27. Araujo AS, Ribeiro MF, Enzweiler A, et al (2006) Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrinol* 249:133-139.

28. Llesuy SF, Milei J, Molina H, et al (1985) Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adramiyacin and 4'-epiadramiyacin in mice. *Tumori* 71:241–249.

29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.

30. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.

31. Klein D, Kern RM, Sokol RZ (1995) A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Biochem Mol Biol Int* 36:59–66.

32. Lebel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992) Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5:227-231.

33. Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 10:93-100.
34. Marklund, S.L., 1985. Pyrogallol autooxidation, in: *Handbook of methods for oxygen radical research* CRC. Boca Raton: Press, pp. 243–247.
35. Flohe L, Gunzler WA (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Meth Enzymol* 105:114–121.
36. Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105:121–126.
37. Kalofoutis C, Mourouzis I, Galanopoulos G, et al (2010) Thyroid hormone can favorably remodel the diabetic myocardium after acute myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 345:161–169.
38. Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975) Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56:56–64.
39. Pantos C, Mourouzis I, Cokkinos DV (2010) Rebuilding the post-infarcted myocardium by activating ‘physiologic’ hypertrophic signaling pathways: the thyroid hormone paradigm. *Heart Fail Rev* 15:143-154.
40. Lin HY, Tang HY, Keating T, et al (2008) Resveratrol is pro-apoptotic and thyroid hormone is anti-apoptotic in glioma cells: Both actions are integrin and ERK mediated. *Carcinogenesis* 29:62–69.
41. Yoshida K, Yoshiyama M, Omura T, et al (2001) Activation of mitogen-activated protein kinases in the non-ischemic myocardium of an acute myocardial infarction in rats. *Jpn Circ J* 65:808–814.
42. Yamaguchi O, Higuchi Y, Hirotsu S, et al (2003) Targeted deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates left ventricular remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15883–15888.
43. Matsumoto-Ida M, Takimoto Y, Aoyama T, et al (2006) Activation of TGF-beta1-TAK1-p38 MAPK pathway in spared cardiomyocytes is involved in left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H709–H715.
44. Fernandes RO, Bonetto JH, Baregazy B, et al (2015) Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1 α stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts. *Mol Cell Biochem* 401:61–70.

Figure Captions

Fig1 Hemodynamic parameters evaluation, 14 days after surgery. Values are expressed as mean \pm SEM from 6-10 rats per group. LVSP (left ventricle systolic pressure); LVEDP (left ventricle end-diastolic pressure); LV dP/dt max (maximal value of the first temporal derivate of the left ventricular pressure); LV dP/dt min (minimum value of the first temporal derivate of the left ventricular pressure). ^a Significantly different from SHAM group (P < 0.05); ^b significantly different from AMI group (P < 0.05); ^c significantly different from SHAMT group (P < 0.05)

Fig 2 p53 and JNK expression, 14 days after surgery. Values are expressed as mean \pm SEM from 4-5 rats per group. ^a Significantly different from SHAM group (P < 0.05); ^b significantly different from AMI group (P < 0.05); ^c significantly different from SHAMT group (P < 0.05)

Fig3 Bcl-2 and Bax expression and Bax: Bcl-2 ratio, 14 days after surgery. Values are expressed as mean \pm SEM from 4-5 rats per group. ^a Significantly different from SHAM group (P < 0.05); ^b significantly different from AMI group (P < 0.05); ^c significantly different from SHAMT group (P < 0.05)

Fig4 ROS levels, lipid peroxidation, correlation between ROS and lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity, 14 days after surgery. Values are expressed as mean \pm SEM from 6-10 rats per group. ROS (reactive oxygen species). ^a Significantly different from SHAM group (P < 0.05); ^b significantly different from AMI group (P < 0.05); ^c significantly different from SHAMT group (P < 0.05)

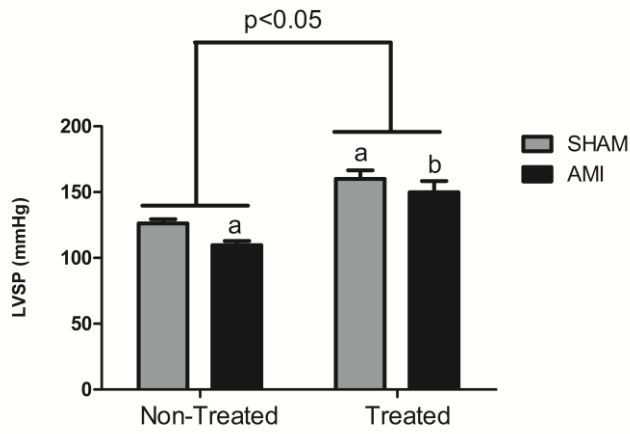
Table 1: Hormonal levels, morphometric and echocardiographic data, 14 days after myocardial infarction.

Parameters	Non-Treated		Treated	
	SHAM	AMI	SHAMT	AMIT
Hormonal levels and morphometric data				
T4 levels ($\mu\text{g/dL}$)	5.38 \pm 0.23	4.54 \pm 0.26	11.28 \pm 0.71 a	11.29 \pm 0.78 b
Heart weight (g)	0.86 \pm 0.01	0.91 \pm 0.02	1.02 \pm 0.02 a	1.18 \pm 0.03 bc
Heart/ tibia length (mg/cm)	23.9 \pm 0.40	25.5 \pm 0.82	27.1 \pm 0.46 a	33.4 \pm 1.53 bc
Scar weight (g)	_____	0.10 \pm 0.01	_____	0.09 \pm 0.02
Echocardiographic data				
LVDA (cm^2)	0.48 \pm 0.014	0.76 \pm 0.023 a	0.46 \pm 0.015	0.72 \pm 0.025 c
LVSA (cm^2)	0.25 \pm 0.016	0.60 \pm 0.022 a	0.22 \pm 0.017	0.54 \pm 0.031 c
AWTs (cm)	0.29 \pm 0.008	0.15 \pm 0.004 a	0.33 \pm 0.019 a	0.16 \pm 0.013 c
PWTs (cm)	0.26 \pm 0.001	0.20 \pm 0.010 a	0.29 \pm 0.010	0.25 \pm 0.012 b
Fractional shortening (%)	47.5 \pm 1.2	17.4 \pm 1.0 a	54.8 \pm 2.2 a	22.0 \pm 1.7 bc
Infarction size (%)	_____	54 \pm 3.0	_____	50 \pm 3.2

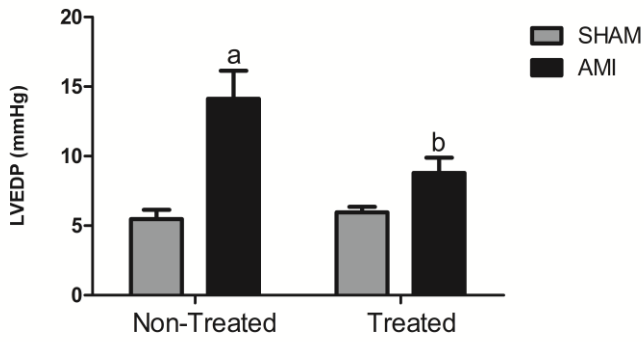
Values are expressed as mean \pm SEM from 6-10 rats per group. LVDA (left ventricular diastolic area), LVSA (left ventricular systolic area), AWTs (systolic anterior wall thickness), PWTs (systolic posterior wall thickness). ^a Significantly different from SHAM group ($P < 0.05$); ^b significantly different from AMI group ($P < 0.05$); ^c significantly different from SHAMT group ($P < 0.05$).

Figure 1

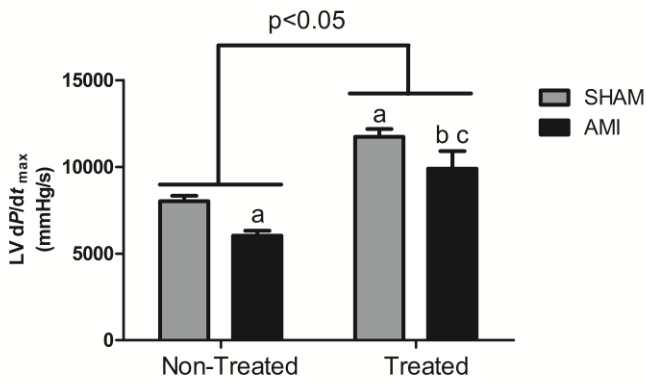
a



b



c



d

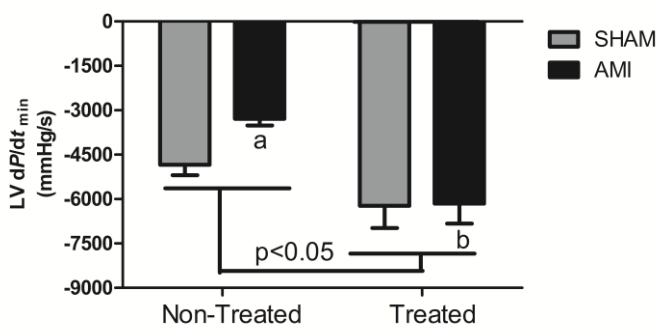
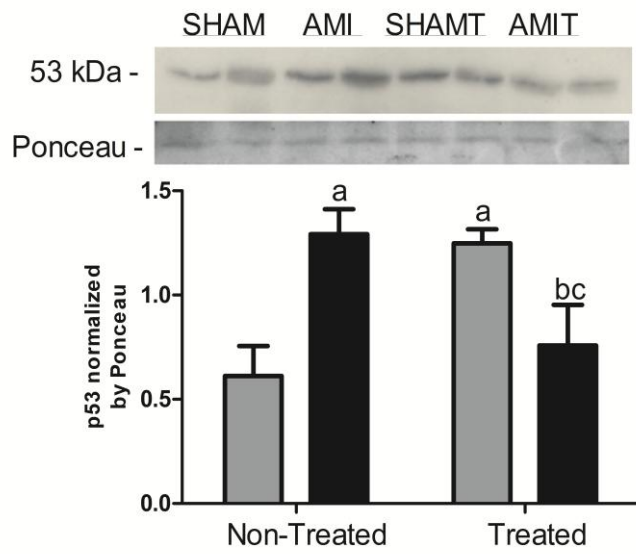


Figure 2

a



b

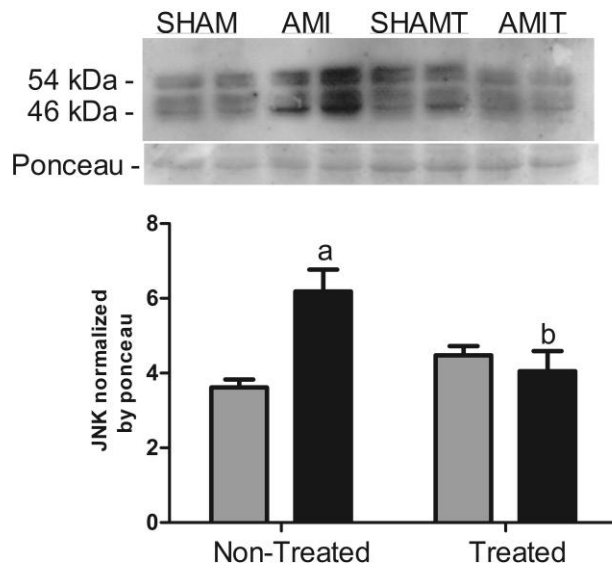
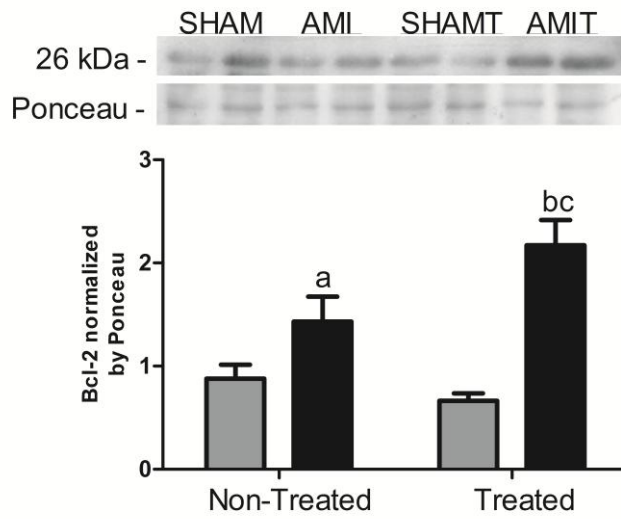
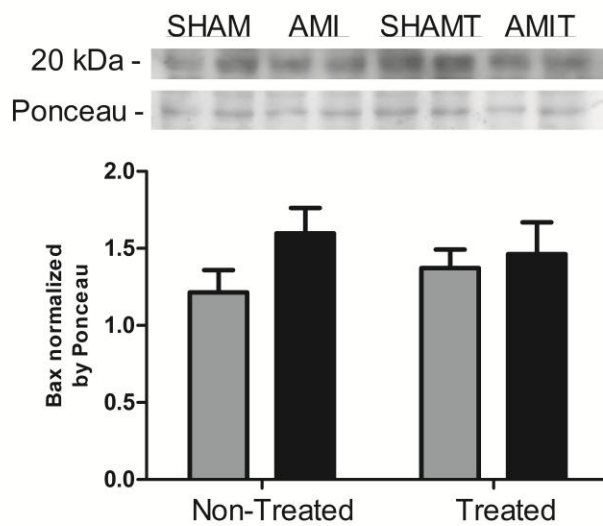


Figure 3

a



b



c

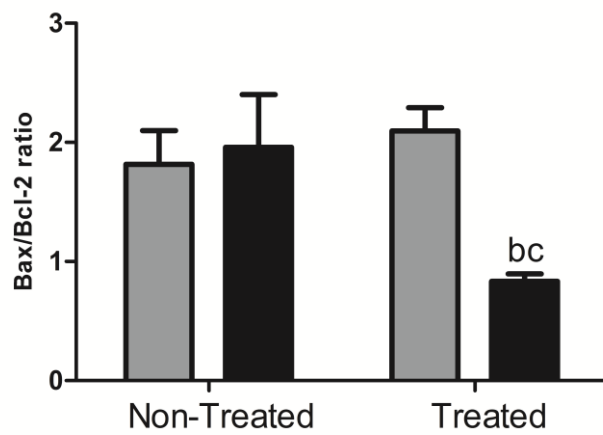
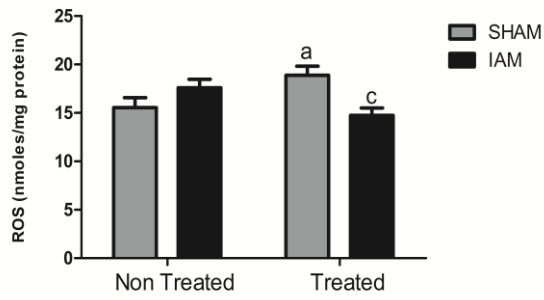
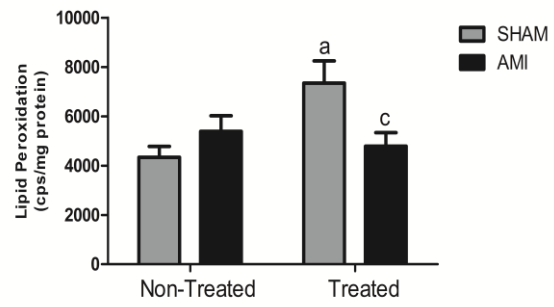


Figure 4

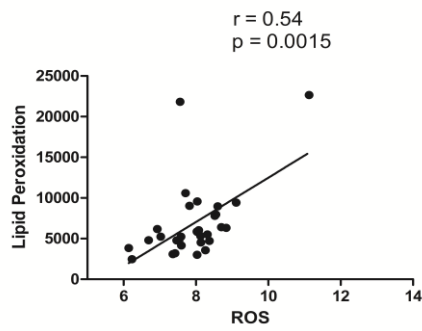
a



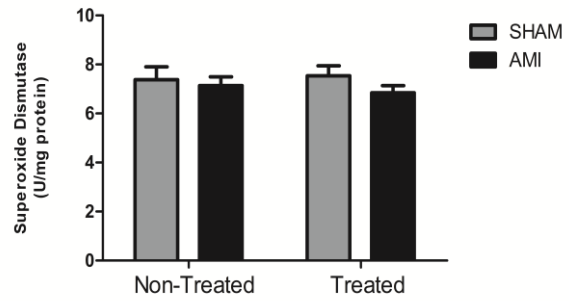
b



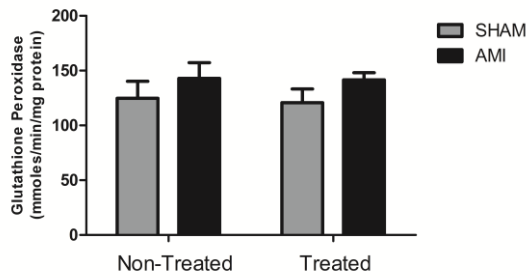
c



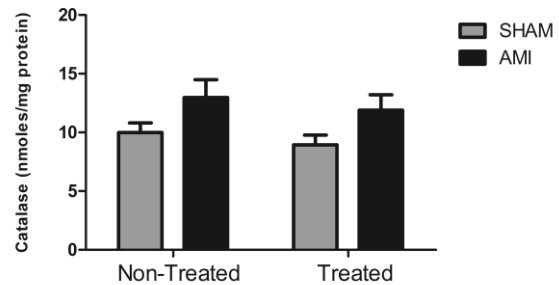
d



e



f



5.4. Resultados do estudo 3 não submetidos para a publicação.

5.4.1. Resultados de morfologia e função cardíaca dos animais aos 14 dias pós-infarto

Na tabela 1 é possível observar alguns dados ecocardiográficos, 14 dias após a cirurgia. Nos animais dos grupos IAM e IAMT, os valores dos diâmetros sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo estão aumentados, quando comparado aos valores dos grupos SHAM e SHAMT, respectivamente, indicando a dilatação da câmara esquerda após o infarto. Não existe, no entanto, diferença entre os animais infartados tratados e não tratados em relação a esses parâmetros. Em relação ao índice de tensão de parede, os animais do grupo IAM apresentam valores elevados desse parâmetro em relação ao grupo SHAM. Resultado semelhante é encontrado quando comparamos os animais do grupo IAMT em relação ao SHAMT. No entanto, nos animais do grupo IAMT, o tratamento hormonal foi capaz de atenuar o aumento deste índice quando comparado aos animais do grupo IAM. Analisando a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, um importante parâmetro de função cardíaca, ambos os grupos infartados apresentaram uma diminuição significativa neste parâmetro quando comparados aos animais sham. O tratamento hormonal, no entanto, promoveu uma menor diminuição na fração de ejeção nos animais do grupo IAMT, quando comparados aos animais do grupo IAM. Quando analisamos a frequência cardíaca, pode-se observar um aumento neste parâmetro nos animais tratados (SHAMT e IAMT) quando comparado aos animais não tratados (SHAM e IAM).

Tabela 1: Dados ecocardiográficos, 14 dias pós-cirurgia.

Parâmetros	Não Tratados		Tratados	
	SHAM	IAM	SHAMT	IAMT
DS (cm)	0,37±0,04	0,72±0,07 a	0,31±0,05	0,70±0,10 c
DD (cm)	0,71±0,04	0,88±0,07 a	0,70±0,06	0,88±0,08 c
ITP	2,38±0,24	2,99± 0,50 a	2,05± 0,17	2,59± 0,49 bc
FE (%)	68,4±4,7	28,5±5,5 a	70,4±2,2	36,6±12,0 bc
FC (bpm)	240±17	242±24	327±23 a	334±26 b

Valores expressos como média ± erro padrão da média. DS (diâmetro sistólico), DD (diâmetro diastólico), ITP (índice de tensão de parede), FE (fração de ejeção), FC (frequência cardíaca). ^a Diferente significativamente do grupo SHAM (P < 0.05); ^b diferente significativamente do grupo IAM (P < 0.05); ^c diferente significativamente do grupo SHAMT (P < 0.05).

5.4.2. Parâmetros de estresse oxidativo no tecido cardíaco aos 14 dias pós-infarto

Na tabela 2 estão presentes também dados de estresse oxidativo do ventrículo esquerdo, tais como os níveis de H₂O₂, de GSH, de GSSG e também a razão entre a GSH e a GSSG, a qual é um indicativo do balanço redox tecidual. Não existem diferenças nesses parâmetros entre os grupos estudados.

Tabela 2: Parâmetros de estresse oxidativo, 14 dias pós-cirurgia.

Parâmetros	Não Tratados		Tratados	
	SHAM	IAM	SHAMT	IAMT
H ₂ O ₂ (nmoles/mg de tecido)	0,07±0,007	0,05±0,006	0,06±0,009	0,07±0,007
GSH (μmoles/mg de tecido)	0,46±0,09	0,62±0,09	0,53±0,15	0,57±0,11
GSSG (μmoles/mg de tecido)	0,06±0,008	0,08±0,019	0,07±0,028	0,08±0,012
GSH/GSSG	9,67±2,9	10,8±3,2	13,8±4,2	8,2±1,54

Valores expressos como média ± erro padrão da média. ^a Diferente significativamente do grupo SHAM (P < 0.05); ^b diferente significativamente do grupo IAM (P < 0.05); ^c diferente significativamente do grupo SHAMT (P < 0.05).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo analisou, pela primeira vez, o efeito dos hormônios da tireoide sobre parâmetros de estresse oxidativo e sobre a biodisponibilidade do NO em animais infartados, ao longo de 28 dias após a injúria cardíaca. Além disso, em um período mais precoce pós-infarto (14 dias), este estudo avaliou a ação destes hormônios sobre a expressão de proteínas relacionadas com o mecanismo de apoptose no tecido cardíaco.

Em relação aos animais do grupo IAM, 28 dias após o infarto, não foi possível observar alterações nos níveis séricos dos hormônios da tireoide, nem na expressão dos receptores nucleares (TR α e o TR β) destes hormônios. Apesar de o infarto poder ocasionar uma redução nos níveis de T3 e T4, bem como uma diminuição na expressão dos receptores hormonais (PINGITORE *et al.*, 2008; MOUROUZIS *et al.*, 2013), no presente estudo não foram evidenciadas estas alterações. Em relação aos dados morfométricos do grupo IAM, foi possível observar o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, de hipertrofia do ventrículo esquerdo e de congestão pulmonar. Além disso, estes animais desenvolveram dilatação da câmara cardíaca, demonstrada através do aumento do diâmetro e da área do ventrículo esquerdo. Esta dilatação foi acompanhada da perda de espessura da parede do ventrículo esquerdo, o que ocasionou um aumento do estresse de parede. Além disto, os animais do grupo IAM apresentaram uma diminuição significativa na fração de ejeção e um aumento do índice de performance do miocárdio, indicando um prejuízo na função sistólica e na função global do coração. Não houve alteração, no entanto, na frequência cardíaca destes animais. Estes achados indicam a presença de um estágio de remodelamento mal-adaptativo do coração e o desenvolvimento de insuficiência cardíaca nestes animais (FRANCIS *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram demonstrados em outros estudos analisando a função cardíaca de ratos 28 dias após o infarto (SCHENKEL *et al.*, 2010; SCHENKEL *et al.*, 2012).

No grupo IAMT, a administração dos hormônios da tireoide, durante 28 dias após o infarto, foi capaz de induzir um aumento nos níveis séricos de T3, sem alterar os níveis de T4. Resultado semelhante foi encontrado nos animais do grupo SHAMT. Nos animais do grupo IAMT, a administração hormonal

promoveu um aumento da expressão do receptor TR β 1 no tecido cardíaco. Uma vez que estudos mostram que uma redução nos níveis deste receptor está associada a um pior processo de remodelamento cardíaco (PANTOS *et al.*, 2010), o aumento da sua expressão parece ser um efeito positivo do tratamento hormonal. Em relação aos parâmetros morfométricos, os animais dos grupos SHAMT e IAMT apresentaram hipertrofia cardíaca. No grupo IAMT, esta hipertrofia foi significativamente maior do que àquela apresentada pelos animais do grupo IAM. Este aumento de massa do ventrículo nesses animais representa provavelmente um efeito sinérgico do infarto e dos hormônios da tireoide sobre o tecido cardíaco. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Pantos e colaboradores (PANTOS *et al.*, 2007). Em relação à congestão pulmonar, a administração dos hormônios da tireoide preveniu o desenvolvimento deste sinal de insuficiência cardíaca nos ratos do grupo IAMT. Resultados semelhantes foram encontrados em camundongos infartados tratados com esses hormônios (MOUROUZIS *et al.*, 2013). Em relação aos parâmetros ecocardiográficos, a administração dos hormônios da tireoide preveniu a dilatação cardíaca, avaliada pela área do ventrículo, bem como a perda de espessura da parede da câmara esquerda. Estas ações promoveram uma redução significativa no estresse de parede cardíaca nos animais do grupo IAMT. Estes dados demonstram um efeito positivo dos hormônios da tireoide sobre a geometria do coração, corroborando resultados encontrados em estudos prévios (PANTOS *et al.*, 2008; FORINI *et al.*, 2011). Apesar da melhora desses parâmetros, no período de 28 dias pós-infarto, estes hormônios não foram capazes de promover melhora na fração de ejeção. Em relação à função cardíaca, apenas o índice de performance do miocárdio apresentou melhora nos animais do grupo IAMT. Este índice é um parâmetro de função cardíaca global (sistólica e diastólica) (SALEMI *et al.*, 2008). Um aumento deste parâmetro significa um maior esforço cardíaco para conseguir bombear o sangue, o que representa um prejuízo funcional do coração (SALEMI *et al.*, 2008). Nos animais IAMT, este índice encontra-se reduzido em comparação ao grupo IAM, indicando um efeito positivo dos hormônios da tireoide sobre a função global do coração.

Uma vez que as EROs estão diretamente envolvidas com a progressão do infarto do miocárdio para a insuficiência cardíaca (ZHANG *et al.*, 2012), no presente estudo foram avaliados alguns parâmetros de estresse oxidativo. No

grupo IAM, 28 dias após o infarto, os níveis de H₂O₂ e de EROs totais estão aumentados quando comparado aos animais SHAM. Além disso, estes animais apresentaram desbalanço redox, demonstrado pela redução na razão GSH/GSSG, e aumento no dano oxidativo a lipídios. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos, demonstrando a presença de estresse oxidativo no tecido cardíaco após o infarto (SCHENKEL *et al.*, 2010; SCHENKEL *et al.*, 2012). Na presença de níveis elevados de EROs, o fator de transcrição Nrf2 é capaz de se dissociar da proteína Keap1 e migrar para o núcleo da célula, promovendo a transcrição de diversas enzimas antioxidantes (JUNG e KWAK, 2010). Em função disso, no presente trabalho, a expressão do Nrf2, bem como das enzimas antioxidantes SOD, GPx, catalase, glutarredoxina-3 e tioredoxina 1, foi avaliada. Os animais do grupo IAM apresentaram um aumento na expressão do Nrf2 e das enzimas SOD e GPx, 28 dias após a injúria isquêmica. Além disso, esses animais apresentaram um aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, GPx e glutarredoxina no coração. Estes dados provavelmente refletem uma resposta adaptativa do sistema antioxidante do tecido cardíaco na tentativa de evitar um maior dano oxidativo causado pelo aumento das EROs (HALLIWELL, 2006). Uma importante fonte de EROs no coração infartado é a enzima xantina oxidase (XO) (NISHINO *et al.*, 2008). Em função disso, no presente estudo, a expressão dessa enzima também foi avaliada. No entanto, nos animais infartados não houve um aumento significativo na sua expressão no tecido cardíaco. Em função disso, é possível que outras fontes de EROs possam também estar contribuindo de maneira importante para o aumento dos níveis dessas espécies após o infarto.

Resultados diferentes foram encontrados nos ratos infartados e tratados com T3 e T4. Nestes animais, o tratamento hormonal preveniu um aumento nos níveis de H₂O₂ e de EROs no tecido cardíaco. Além disso, nesses animais a razão GSH/GSSG não se mostrou alterada, bem como não houve um aumento do dano lipídico. Estes resultados demonstram, pela primeira vez, um efeito benéfico dos hormônios da tireoide sobre parâmetros de estresse oxidativo no coração infartado. Provavelmente em função dos baixos níveis de EROs, no grupo IAMT não houve modificações na expressão da proteína Nrf2 nem na expressão ou na atividade das enzimas antioxidantes. Em relação à expressão da enzima XO, houve uma diminuição nos seus níveis nos animais do grupo

IAMT. Este resultado pode ser uma possível explicação para os menores níveis de EROs nestes animais. Além disso, esta menor expressão pode também estar associada aos efeitos benéficos destes hormônios sobre o remodelamento cardíaco, semelhante aos dados encontrados em estudos prévios (SAAVEDRA *et al.*, 2002; MINHAS *et al.*, 2006).

Além de avaliar parâmetros de estresse oxidativo, o presente trabalho avaliou também parâmetros de biodisponibilidade do NO no coração dos animais infartados, tratados ou não com os hormônios da tireoide. No grupo IAM não houve modificação na atividade da enzima óxido nítrico sintase, na expressão da eNOS e nem nos níveis de nitritos em comparação aos animais do grupo SHAM. Apesar disso, em função do aumento de EROs no tecido cardíaco do grupo IAM, é possível que o balanço entre os níveis dessas espécies e os níveis de NO possa estar prejudicado. Estudos demonstram que, na presença de altos níveis de EROs, o NO é convertido a peróxido nítrico, um potente agente oxidante, podendo levar a um dano celular e diminuindo a biodisponibilidade do NO para os tecidos (FORSTERMANN *et al.*, 2004; ARAUJO *et al.*, 2011). Esta diminuição, por sua vez, acarreta prejuízos importantes para o sistema cardiovascular (BAUERSACHS *et al.*, 1999). Avaliando os parâmetros de biodisponibilidade do NO no grupo IAMT observou-se um aumento na atividade da enzima óxido nítrico sintase e na expressão da eNOS no tecido cardíaco. Além disso, este grupo apresentou um aumento nos níveis de nitritos, os quais são metabólitos do NO. Nestes animais, portanto, é possível que os hormônios da tireoide possam estar exercendo uma ação direta sobre a expressão e a atividade da enzima eNOS no coração (ARAUJO *et al.*, 2011), promovendo uma maior geração de NO. Este aumento nos níveis de NO, juntamente com a redução dos níveis de EROs, representa uma melhora na biodisponibilidade do NO. Este resultado, portanto, indica um efeito benéfico dos hormônios da tireoide, uma vez que uma baixa disponibilidade do NO está associada a um prejuízo na circulação coronariana e a uma maior progressão do infarto para a insuficiência cardíaca (SHI *et al.*, 2012). Além disso, o NO pode atuar regulando a enzima pró-oxidante xantina oxidase (COTE *et al.*, 1996), diminuindo a sua atividade. Em função disso, nos animais IAMT é possível que esta enzima esteja com a sua atividade diminuída, além de estar com a sua expressão reduzida, levando a uma menor geração de EROs. Outro efeito benéfico do NO é o

controle da expressão da proteína PGC-1 α (NISOLI *et al.*, 2003). Ao aumentar os níveis de GMP cíclico celular, o NO ocasiona uma maior expressão deste fator de transcrição, o qual é um importante regulador do metabolismo energético, estimulando a biogênese mitocondrial (NISOLI *et al.*, 2003). Em células cardíacas, o aumento da sua expressão foi relacionado a um aumento na geração de energia, a uma maior sobrevivência celular e a melhora em parâmetros de estresse oxidativo (NISOLI *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2015). Além disso, trabalhos demonstram também um papel positivo deste fator sobre o remodelamento cardíaco pós-infarto (FORINI *et al.*, 2011). Nos animais IAMT houve um aumento na expressão do PGC-1 α e este resultado apresentou uma correlação positiva com o aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase. Esses achados indicam que os hormônios da tireoide são capazes de melhorar a biodisponibilidade do NO e que este efeito, possivelmente, está relacionado com uma melhora no metabolismo das células cardíacas em animais, 28 dias pós-infarto.

No presente trabalho foram analisados também parâmetros funcionais, estruturais e bioquímicos no coração de ratos infartados, 14 dias após o infarto. Nesse sentido, a avaliação de alterações no tecido cardíaco neste período mais precoce após a injúria isquêmica parece ser importante para o estudo de eventos que irão determinar a severidade do remodelamento cardíaco em um momento posterior (ABBATE *et al.*, 2002). Neste período, os animais do grupo IAM não apresentaram modificação nos níveis séricos de T4. Além disso, estes animais não desenvolveram hipertrofia cardíaca. Este resultado difere do que foi observado aos 28 dias, período em que já foi possível evidenciar hipertrofia. Em relação a isso, Pantos e colaboradores também não encontraram um aumento da massa cardíaca nos animais duas semanas após o infarto (PANTOS *et al.*, 2007). Apesar da ausência de hipertrofia, os animais infartados apresentaram dilatação do ventrículo esquerdo e perda da espessura das paredes anterior e posterior desta câmara. Estas alterações morfológicas provavelmente ocasionaram um aumento no índice de tensão de parede destes animais. Já nos animais infartados e tratados com os hormônios da tireoide, foi possível observar o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca aos 14 dias pós-infarto. Este resultado pode estar relacionado a um efeito hipertrófico direto do T3 e do T4 sobre as células cardíacas (KLEIN e OJAMAA, 2001). Além disso, nestes animais a

administração dos hormônios da tireoide não foi capaz de prevenir o desenvolvimento de dilatação cardíaca, no entanto preveniu a perda da espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo, o que provavelmente atenuou o aumento no índice de tensão de parede. Além deste efeito positivo do tratamento hormonal, os animais do grupo IAMT também apresentaram uma melhora na fração de encurtamento e na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, dois importantes parâmetros de função sistólica. Resultados semelhantes foram descritos em estudo prévio de Pantos e colaboradores (PANTOS *et al.*, 2007). Estes resultados são diferentes dos encontrados aos 28 dias pós-infarto, período no qual a administração de T3 e T4 não resultou em melhora na fração de ejeção.

Além de análises morfométricas e ecocardiográficas, aos 14 dias pós-infarto foram realizadas também análises hemodinâmicas do coração dos animais infartados, tratados ou não. Em relação a isso, o grupo IAM apresentou uma diminuição significativa em parâmetros como a pressão sistólica do ventrículo esquerdo e as derivadas de pressão positiva e negativa. Estes resultados indicam uma menor capacidade da câmara cardíaca de gerar força durante a sístole, além de um prejuízo na contratilidade e no relaxamento do coração esquerdo (SCHENKEL *et al.*, 2010). Além disso, estes animais apresentaram um aumento significativo na pressão diastólica final do ventrículo. Em relação a esses parâmetros, o tratamento hormonal promoveu uma melhora significativa nos ratos do grupo IAMT. Esses animais apresentaram um aumento na pressão sistólica do ventrículo esquerdo e nas derivadas de pressão, bem como uma redução significativa da pressão diastólica final. Estes dados corroboram resultados prévios que demonstram um efeito benéfico destes hormônios sobre parâmetros de função cardíaca em ratos duas semanas após o infarto (PANTOS *et al.*, 2007).

Uma vez que a morte por apoptose das células cardíacas ocorre principalmente em um período mais precoce após o infarto (BUSSANI *et al.*, 2003) e este é um evento chave para o remodelamento cardíaco (ABBATE *et al.*, 2002), no presente trabalho foi avaliada a expressão de proteínas próapoptóticas e antiapoptóticas no coração dos animais, 14 dias após o infarto. Nos animais do grupo IAM houve um aumento significativo na expressão das proteínas próapoptóticas p53 e JNK. Em relação a isso, um estudo demonstrou um

aumento nos níveis dessas proteínas minutos após o dano isquêmico (YOSHIDA *et al.*, 2001). Estes resultados podem significar uma maior sinalização para a apoptose, levando a uma maior perda de cardiomiócitos. Isso pode ser uma possível explicação para a perda da espessura da parede posterior apresentada por estes animais já aos 14 dias pós-infarto. Além disso, a expressão aumentada destas proteínas também pode estar relacionada ao desenvolvimento, em um período posterior, de um remodelamento mal-adaptativo do coração (MATSUMOTO-IDA *et al.*, 2006). Nos animais infartados e tratados com T3 e T4 houve uma diminuição significativa na expressão destas proteínas pró-apoptóticas, bem como um aumento na expressão da proteína anti-apoptótica bcl-2, levando à diminuição na razão bax/bcl-2. Estes resultados indicam um efeito benéfico dos hormônios da tireoide, promovendo uma diminuição na sinalização para a apoptose em um período precoce após o infarto. Esta ação dos hormônios poderia levar a uma menor morte de cardiomiócitos, provendo um melhor remodelamento cardíaco pós-infarto (FORINI *et al.*, 2011). Em relação a isso, outros trabalhos também evidenciaram um efeito antiapoptótico dos hormônios da tireoide em modelo de isquemia e reperfusão em ratos (FORINI *et al.*, 2014) e também em células de glioma (LIN *et al.*, 2008).

Avaliando parâmetros de estresse oxidativo, 14 dias pós-infarto, apenas nos animais do grupo SHAMT foi possível evidenciar um aumento nos níveis de EROs e no dano lipídico, quando comparados aos animais do grupo SHAM e IAMT. Em relação a esse grupo, aos 28 dias pós-infarto também foi possível evidenciar alterações em parâmetros de estresse oxidativo, tais como a diminuição da razão GSH/GSSG, indicando desbalanço redox, e uma menor atividade da enzima GPx. Estes dados indicam que, tanto aos 14 como aos 28 dias pós-cirurgia, a administração de T3 e T4 para os animais sham parece ocasionar efeitos deletérios em termos de estresse oxidativo. Em relação a isso, o presente estudo é o primeiro com o modelo de infarto do miocárdio em ratos que avalia a administração destes hormônios em animais controle. Estes dados demonstram que as doses utilizadas neste trabalho, as quais apresentaram efeitos protetores no coração infartado, podem ocasionar efeitos negativos no tecido cardíaco na ausência da injúria isquêmica.

O conjunto dos dados apresentados nesta tese corroboram outros estudos que demonstram um efeito positivo dos hormônios da tireoide em modelos

animais após o infarto (PANTOS *et al.*, 2008; MOUROUZIS *et al.*, 2013) e acrescenta novas informações sobre os mecanismos cardioprotetores destes hormônios. Entre esses mecanismos podemos destacar a modulação dos níveis de EROs e de NO e também da expressão de proteínas ligadas ao mecanismo de apoptose no tecido cardíaco.

Estes resultados apresentam relevância clínica, uma vez que se faz necessária a busca por novas estratégias para mitigar as consequências deletérias do infarto agudo do miocárdio. Embora não existam estudos clínicos evidenciando efeitos benéficos destes hormônios no período pós-infarto, os dados experimentais existentes até o momento indicam que esses hormônios podem representar uma interessante ferramenta terapêutica, capaz de limitar o processo de remodelamento cardíaco patológico pós-infarto e reduzir a progressão para a insuficiência cardíaca.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que a administração dos hormônios da tireoide em ratos, por 28 dias após o infarto, apresenta efeitos positivos sobre parâmetros de estresse oxidativo no tecido cardíaco, além de melhorar parâmetros morfológicos e funcionais. Além disso, estes hormônios promovem um aumento na biodisponibilidade do NO no coração (Figura 3). Já em um período mais precoce pós-infarto (14 dias), essa administração hormonal também apresenta efeitos positivos sobre a morfologia e a função cardíaca, além de diminuir a expressão de proteínas pró-apoptóticas (Figura 3). Esses resultados indicam que os hormônios da tireoide podem representar uma estratégia terapêutica para prevenir alterações funcionais, bioquímicas e moleculares relacionadas com o remodelamento cardíaco patológico no período pós-infarto.

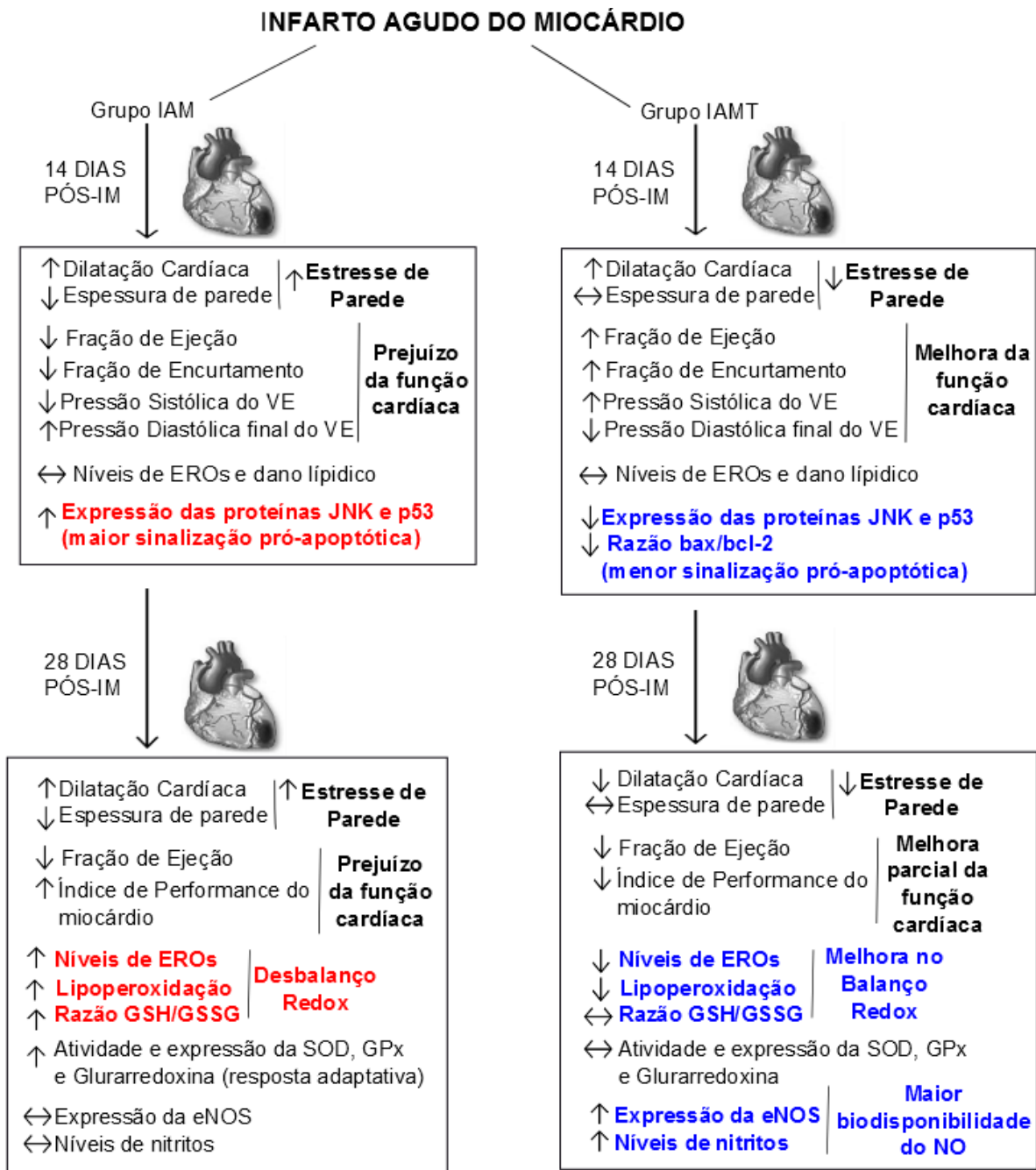


Figura 3: Resumo esquemático dos achados do presente trabalho. Legenda: (IM) infarto do miocárdio; (↑) aumento; (↓) diminuição; (↔) sem modificação.

8. REFERÊNCIAS

- ABBATE A., BIONDI-ZOCCAI G.G., BALDI A. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *Journal of Cell Physiology*, v.193, p.145–53, 2002.
- AEBI H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v.105, p.121-126; 1984.
- AKERBOOM T., SIES H. Assay of glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology*, v.77, p. 373-382, 1981.
- ALPERT N.R., BROSSEAU C., FEDERICO A., KRENS M., ROBBINS J., WARSHAW D.M. Molecular mechanics of mouse cardiac myosin isoforms. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v.283, p.1446–1454, 2002.
- ARAUJO A.S., DINIZ G., SEIBEL F., BRANCHINI G., RIBEIRO M.F., BRUM I.S., KHAPER N., BARRETO-CHAVES M.L., BELLÓ-KLEIN A. Reactive oxygen and nitrogen species balance in the determination of thyroid hormones-induced cardiac hypertrophy mediated by Renin-Angiotensin system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.333, p.78–84, 2011.
- ARAUJO A.S.R., ENZVEILER A.T., SCHENKEL P., FERNANDES T.R.G., RIBEIRO M.F.M., PARTATA W.A., LLESUY S., BELLO-KLEIN A. Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.303, p.89–95, 2007.
- ASSALY R., D'ANGLEMONT DE TASSIGNY A., PARADIS S., JACQUIN S., BERDEAUX A., MORIN D. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition pore opening and cell death during hypoxia-reoxygenation in adult Cardiomyocytes. *European Journal of Pharmacology*, v.675, p.6–14, 2012
- BABCOCK G.T. How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.96, p.13114–1311, 1999.
- BAINES C.P. The cardiac mitochondrion: Nexus of stress. *Annual Review of Physiology*, v.72, p.61–80, 2010.
- BAINES C.P., MOLKENTIN J.D. Stress signaling pathway that modulate cardiac myocyte apoptosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v.38, p.47–62, 2005.
- BASSET J.H., HARVEY C.B., WILLIAMS G.R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.213, n.1, p.1–11, 2003.
- BAUERSACHS J., BOULOUMIE A., FRACCAROLLO D., HU K., BUSSE R., ERTL G. Endothelial dysfunction in chronic myocardial infarction despite increased vascular endothelial nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase expression: role of enhanced vascular superoxide production. *Circulation*, v.100, v.292–298, 1999.
- BERNDT C., LILLIG C.H., HOLMGREN A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v.292, p.1227–1236, 2007.
- BHAT A.H., DAR K.B., ANEES S., ZARGAR M.A., MASOOD A., SOFI M.A., GANIE S.A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v.74, p.101-110, 2015.

BRIGELIUS-FLOHE R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, v.27, p.951–965, 1999.

BRUNNER F., MAIER R., ANDREW P., WOLKART G., ZECHNER R., MAYER, B. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovascular Research*, v.57, p.55–62, 2003.

BUSSANI R., ABBATE A., BIONDI-ZOCCAI G.G., DOBRINA A., LEONE A.M., CAMILOT D., DI MARINO M.P., BALDI F., SILVESTRI F., BIASUCCI L.M., BALDI A. Right ventricular dilatation after left ventricular acute myocardial infarction is predictive of extremely high peri-infarctual apoptosis at postmortem examination in humans. *Journal of Clinical Pathology*, v.56, p.672–676, 2003.

CHATTERJEE A., MIR S.A., DUTTA D., MITRA A., PATHAK K., SARKAR S. Analysis of p53 and NF- κ B Signaling in Modulating the Cardiomyocyte Fate During Hypertrophy. *Journal of Cellular Physiology*, v.226, p.2543-2554, 2010.

CHEN Z., CHUA C.C.,HOY S.,HAMDY R.C., CHUA B.H. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v.280, p.2313–2320, 2001.

COCEANI M., IERVASI G., PINGITORE A., CARPEGGIANI C., L'ABBATE A. Thyroid hormone and coronary artery disease: from clinical correlations to prognostic implications. *Clinical Cardiology*, v.32, p.380–385, 2009.

COLOMBO R., SIQUEIRA R., CONZATTI A., FERNANDES T.R., TAVARES A.M., ARAUJO A.S., BELLO-KLEIN A. Aerobic Exercise Promotes a Decrease in Right Ventricle Apoptotic Proteins in Experimental Cor Pulmonale. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. v.66(3), p.246-253, 2015.

COTE C.G., YU F.S., ZULUETA J.J., VOSATKA R.J., HASSOUN P.M. Regulation of intracellular xanthine oxidase by endothelial-derived nitric oxide. *American Journal of Physiology*, v. 271, p.869–874, 1996.

DATASUS - Ministério Da Saúde/Svs – Sistema de Informações sobre Mortalidade – SIM. Disponível em: www.datasus.gov.br.

DEAN P., JONES. Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 8, p.1865–1879, 2006.

FAM S.S., MORROW J.D. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation - a review. *Current Medicinal Chemistry*, v.10, p.1723–1740, 2003.

FERNANDES R.O., BONETTO J.H., BAREGZAY B., DE CASTRO A.L., PUUKILA S., FORSYTH H., SCHENKEL P.C., LLESUY S.F., BRUM I.S., ARAUJO A.S., KHAPER N., BELLÓ-KLEIN A. Modulation of apoptosis by sulforaphane is associated with PGC-1 α stimulation and decreased oxidative stress in cardiac myoblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.401, p.61–70, 2015.

FLOHÉ L., GUNZLER W.A. Assay of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, v.105, p.14–121, 1984.

FORINI F., KUSMIC C., NICOLINI G., MARIANI L., ZUCCHI R., MATTEUCCI M., IERVASI G., PITTO L. Triiodothyronine prevents cardiac ischemia/reperfusion mitochondrial impairment and cell loss by regulating miR30a/p53 axis. *Endocrinology*, v.155, p.4581–4590, 2014

FORINI F., LIONETTI V., ARDEHALI H., PUCCI A., CECCHETTI F., GHANEFAR M., NICOLINI G., ICHIKAWA Y., NANNIPIERI M., RECCHIA F.A., IERVASI G. Early long-term L-T3 replacement rescues mitochondria and

prevents ischemic cardiac remodelling in rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v.15, p.514–524, 2011.

FÖRSTERMANN U., CLOSS E.I., POLLOCK J.S., NAKANE M., SCHWARZ P., GATH I., KLEINERT H. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, v.23, p.1121–1131, 1994.

FORSTERMANN U., MUNZEL T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*; v.113, p.1708–1714, 2006.

FRANCIS J., WEISS R.M., WEI S.G., JOHNSON A.K., FELDER R.B. Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v.281, p.1734–1745, 2001.

FRIDOVICH I. Superoxide radical and SODs. *Annu Rev Biochem*, v.64, p.97–112, 1995.

GERDES A.M., IERVASI G. Thyroid Replacement Therapy and Heart Failure. *Circulation*, v.122, p.385-393, 2010.

GOLDMAN S., MCCARREN M., MORKIN E., LADENSON P.W., EDSON R., WARREN S., OHM J., THAI H., CHURBY L., BARNHILL J., O'BRIEN T., ANAND I., WARNER A., HATTLER B., DUNLAP M., ERIKSON J., SHIH M.C., LAVORI P. DITPA (3,5-diiodothyropropionic acid), a thyroid hormone analog to treat heart failure: phase II trial veterans affairs cooperative study. *Circulation*, v.119, p.3093–3100, 2009.

GONZALEZ FLECHA B., LLESUY S., BOVERIS A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of liver, heart and muscle. *Free Radicals in Biology and Medicine*, v.10, p.41–47, 1991.

GRANGER D.L., ANSTEY N.M., MILLER W.C., WEINBERG J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymology*, v.301, p.49-61, 1999.

GROSSMAN W., JONES D., MCLAURIN L.P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *Journal of Clinical Investigation*, v.56, p.56–64, 1975.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Ed 4. Clarendon Press, Oxford, 2006.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, v.219, p.1–14, 1984.

HAMILTON M.A., STEVENSON L.W., FONAROW G.C., STEIMLE A., GOLDHABER J.I., CHILD J.S., CHOPRA I.J., MORIGUCHI J.D., HAGE A. Safety and Hemodynamic Effects of Intravenous Triiodothyronine in Advanced Congestive Heart Failure. *The American Journal of Cardiology*, v.81, 1998.

HEUSCH G., POST H., MICHEL M.C., KELM M., SCHULZ R. Endogenous nitric oxide and myocardial adaptation to ischemia. *Circulation Research*, v.87, p. 146–152, 2000.

HILL M.F., PALACE V.P., KAUR K., KUMAR D., KHAPER N., SINGAL P.K. Reduction in oxidative stress and modulation of heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. *Experimental and Clinical Cardiology*, v.10(3), p.146-153, 2005.

HOCHHAUSER E., CHEPORKO Y., YASOVICH N., PINCHAS L., OFFEN D., BARHUM Y., PANNET H., TOBAR A., VIDNE B.A., BIRK E. Bax deficiency reduces infarct size and improves long-term function after myocardial infarction. *Cell Biochemistry and Biophysics*, v.47, p.11–20, 2007.

HOLMEGREN A., BJÖRNSTEDT M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology*, v.252, p.199–208, 1995.

HOLMGREN A. Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry*, v.54, p.237–271, 1985.

HOLMGREN A, ASLUND F. Glutaredoxin. *Methods in Enzymology*, v.252, p.283-292, 1995.

ISHII T., ITOH K., TAKAHASHI S., SATO H., YANAGAWA T., KATOH Y., BANNAI S., YAMAMOTO M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v.275, p.16023-16029, 2000.

ISHII T., ITOH K., TAKAHASHI S., SATO H., YANAGAWA T., KATOH Y., BANNAI S., YAMAMOTO M. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, v.275, p.16023-16029, 2000.

JOHNS T.N.P., OLSON B.J. Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals. *Annals of Surgery*, v.140, p.675-682, 1954.

JUNG K., KWAK M. The Nrf2 System as a Potential Target for the Development of Indirect Antioxidants. *Molecules*, v.15, p.7266-7291, 2010.

KAHALY G.J., DILLMANN W.H. Thyroid hormone action in the heart. *Endocrine Reviews*, v.26, n.5, p.704–728, 2005.

KELLEY E.E., KHOO N.K., HUNDLEY N.J., MALIK U.Z., FREEMAN B.A., TARPEY M.M. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, v.48, p.493–498, 2010.

KHALIFE W.I., TANG Y.D., KUZMAN J.A., THOMAS T.A., ANDERSON B.E., SAID S., TILLE P., SCHLENKER E.H., GERDES A.M. Treatment of subclinical hypothyroidism reverses ischemia and prevents myocyte loss and progressive LV dysfunction in hamsters with dilated cardiomyopathy. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*, v.289, p.2409–2415, 2005.

KLEIN D., KERN R.M., SOKOL R.Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.36, p.59-66, 1995.

KLEIN I., OJAMAA K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *The New England Journal of Medicine*, v.344, n.7, p.5011–5019, 2001.

KOHRLE J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.57, p.1853-1863, 2000.

KUSTER G.M., PIMENTEL D.R., ADACHIT., IDOY., BRENNER D.A., COHEN R.A., LIAO R., SIWIK D.A., COLUCCI W.S. Alpha-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes is mediated via thioredoxin-1-sensitive oxidative modification of thiols on Ras. *Circulation*, v.111, p. 1192–1198, 2005.

LEBEL C.P., ISCHIROPOULOS H., BONDY S.C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research and Toxicology*, v.5, p.227-231, 1992.

LI H., WALLERATH T., MÜNDEL T., FÖRSTERMANN U. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs. *Nitric Oxide – Biology and Chemistry*, v.7, p.149 –164, 2002.

LIBBY P., BONOW R.O., MANN D.L., ZIPES D.P. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, 8th ed. Saunders Elsevier, 2007.

LIN H.Y., TANG H.Y., KEATING T., WU Y.H., SHIH A., HAMMOND D., SUN M., HERCBERGS A., DAVIS F.B., DAVIS P.J. Resveratrol is pro-apoptotic and thyroid hormone is anti-apoptotic in glioma cells: Both actions are integrin and ERK mediated. *Carcinogenesis*, v.29, p.62–69, 2008.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH A.L., FARR A.L., RANDALL R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265–275, 1951.

LUIDENS M.K., MOUSA S.A., DAVIS F.B., LIN H.Y., DAVIS P.J. Thyroid hormone and angiogenesis. *Vascular Pharmacology*, v.52, p.142–145, 2010.

MAKINO A., SUAREZ J., WANG H., BELKE D.D., SCOTT B.T., DILLMANN W.H. Thyroid hormone receptor-beta is associated with coronary angiogenesis during pathological cardiac hypertrophy. *Endocrinology*, v.150, p.2008–2015, 2009.

MARKLUND S. Handbook of methods for oxygen radical research. *Boca Raton. CRC. Press.* 243-247, 1985.

MATSUMOTO-IDA M., TAKIMOTO Y., AOYAMA T., AKAO M., TAKEDA T., KITA T. Activation of TGF-beta1-TAK1-p38 MAPK pathway in spared cardiomyocytes is involved in left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v.290, p.709–715, 2006.

MERCIER J.C., DISESSA T.G., JARMAKANI J.M., NAKANISHI T., HIRAISHI S., ISABEL-JONES J., FRIEDMAN W.F. Two-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular volumes and ejection fraction in children. *Circulation*, v.65, p.962-969, 1982.

MINHAS K.M., SARAIVA R.M., SCHULERI K.H., LEHRKE S., ZHENG M., SALIARIS A.P., BERRY C.E., BAROUCH L.A., VANDEGAER K.M., LI D., HARE J.M. Xanthine oxidoreductase inhibition causes reverse remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Circulation Research*, v.98, p.271–279, 2006.

MIYASHITA T., REED J. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, v.80, p.293–299, 1995.

MORUZZI P., DORIA E., AGOSTONI P.G. Medium-term effectiveness of L-thyroxine treatment in idiopathic dilated cardiomyopathy. *American Journal of Medicine*, v.101, p.461–467, 1996.

MOUROUZIS I., KOSTAKOU E., GALANOPOULOS G., MANTZOURATOU P., PANTOS C. Inhibition of thyroid hormone receptor $\alpha 1$ impairs postischemic cardiac performance after myocardial infarction in mice. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.379, p.97–105, 2013.

NISHINO T., OKAMOTO K., EGER B.T., PAI E.F., NISHINO T. Mammalian xanthine oxidoreductase—mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *FEBS Journal*, v.275, p.3278–3289, 2008.

NISOLI E., CLEMENTI E., PAOLUCCI C., COZZI V., TONELLO C., SCIORATI C., BRACALE R., VALERIO A., FRANCOLINI M., MONCADA S., CARRUBA M.O. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, v.299, p.896–899, 2003.

NOZAWA E., KANASHIRO R., MURAD N., CARVALHO A.C.C., CRAVO S.L., CAMPOS O., TUCCI P.J.F., MOISES V.A. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.39, p.687-695, 2006.

OLIVARES E.L., MARASSI M.P., FORTUNATO R.S., DA SILVA A.C., COSTA-E-SOUSA R.H., ARAÚJO I.G., MATTOS E.C., MASUDA M.O., MULCAHEY

M.A., HUANG S.A., BIANCO A.C., CARVALHO D.P. Thyroid function disturbance and type 3 iodothyronine deiodinase induction after myocardial infarction in rats a time course study. *Endocrinology* v.148, p.4786-4792, 2007.

OLIVETTI G., QUAINI F., SALA R., LAGRASTA C., CORRADI D., BONACINA E., GAMBERT S.R., CIGOLA E., ANVERSA P. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v.28, p. 2005-2016, 1996.

PANTOS C., MOUROUZIS I., GALANOPOULOS G., GAVRA M., PERIMENIS P., SPANOU D., COKKINOS D.V. Thyroid hormone receptor $\alpha 1$ down-regulation in postischemic heart failure progression: the potential role of tissue hypothyroidism. *Hormone and Metabolic Research*, v.42, p.718 – 724, 2010.

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

PANTOS C., MOUROUZIS I., MARKAKIS K., DIMOPOULOS A., XINARIS C., KOKKINOS A.D., PANAGIOTOU M., COKKINOS D.V. Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, v.32, p.333–339, 2007.

PFEFFER M.A., PFEFFER J.M., STEINBERG C., FINN P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation*, v.72, p.406–412, 1985.

PICK E., KEISARI Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal of Immunological Methods*, v.38, p.161-70, 1980.

PINGITORE A., LANDI P., TADDEI M.C., RIPOLI A., L'ABBATE A., IERVASI G. Triiodothyronine levels for risk stratification of patients with chronic heart failure. *American Journal of Medicine*, v.118, p.132–136, 2005

PINGITORE A., GALLI E., BARISON A., IERVASI A., SCARLATTINI M., NUCCI D., L'ABBATE A., MARIOTTI R., IERVASI G. Acute effects of triiodothyronine (T3) replacement therapy in patients with chronic heart failure and low-T3 syndrome: a randomized, placebo-controlled study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.93, p.1351–1358, 2008.

PINTI M., GIBELLINI L., LIU Y., XU S., LU B., COSSARIZZA A. Mitochondrial Lon protease at the crossroads of oxidative stress, ageing and cancer. *Cellular Molecular Life Sciences*, 2015 [Epub ahead of print]

QIN F., LIANG M.C., LIANG C.S. Progressive left ventricular remodeling, myocyte apoptosis, and protein signaling cascades after myocardial infarction in rabbits. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1740(3), p.499-513, 2005.

RHEE S.G., CHAE H.Z., KIM K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radicals in Biology and Medicine*, v.38, p.1543–1552, 2005.

ROBERTSON R.P., HARMON J.S. Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: A case of double jeopardy for the pancreatic islet cell. *Free Radical Biology & Medicine*, v.41, p.177–184, 2006.

SAAVEDRA W.F., PAOLOCCI N.S.T., JOHN M.E., SKAF M.W., STEWART G.C., XIE J.S., HARRISON R.W., ZEICHNER J., MUDRICK D., MARBAN E., KASS D.A., HARE J.M. Imbalance between xanthine oxidase and nitric oxide

synthase signaling pathways underlies mechanoenergetic uncoupling in the failing heart. *Circulation Research*, v.90, p.297–304, 2002.

SAHA M.N., JIANG H., YANG Y., ZHU X., WANG X., SCHIMMER A.D., QIU L., CHANG H. Targeting p53 via JNK Pathway: A Novel Role of RITA for Apoptotic Signaling in Multiple Myeloma. *PLoS One* v.7(1), e30215, 2015.

SALEMI V.M., PIRES M.D., CESTARI I.N., CESTARI I.A., PICARD M.H., LEIRNER A.A., MADY C. Echocardiographic assessment of global ventricular function using the myocardial performance index in rats with hypertrophy. *Artificial Organs*, v.28, p.332-337, 2008.

SANTILLI F., D'ARDES D., DAVI G. Oxidative Stress In Chronic Vascular Disease: From Prediction To Prevention. *Vascular Pharmacology*, 2015. doi: 10.1016/j.vph.2015.09.003.

SANTOS R.P., MAZZANTI A., BECKMANN D.V., AIELLO G., BRUM G.S., LEME JUNIOR P.T., RIPPINGLER A., NETO D.P., MIRANDA T.F. Temperatura de polimerização da resina acrílica odontológica na medula espinhal de ratos Wistar. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.4, p.865-872, 2012.

SCHENKEL P.C., TAVARES A., FERNANDES R., DINIZ G.P., BERTAGNOLLI M., ARAUJO A.S.R., BARRETO-CHAVES M.L., RIBEIRO M.F.M, CLAUSELL N., BELLO-KLEIN A. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.341, p.1-8, 2010.

SCHENKEL P.C., TAVARES A., FERNANDES R.O., DINIZ G.P., LUDKE A.R.L., RIBEIRO M.F.M., ARAUJO A.S.R., BARRETO-CHAVES M.L., BELLO-KLEIN A. Time profile of hydrogen peroxide/ thioredoxin balance and its influence in the intracellular signaling post-myocardial infarction. *Experimental Physiology*, v.97, p.741–749, 2012

SCHERRER-CROSBIE M., ULLRICH R., BLOCH K.D., NAKAJIMA H., NASSERI B., ARETZ H.T., LINDSEY M.L., VANCON A.C., HUANG P.L., LEE R.T., ZAPOL W.M., PICARD M.H. Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation*, v.104, p.1286–1291, 2001.

SHI C.Z., ZHANG X.P., LV Z.W., ZHANG H.L., XU J.Z., YIN Z.F., YAN Y.Q., WANG C.Q. Adipose tissue-derived stem cells embedded with eNOS restore cardiac function in acute myocardial infarction model. *International Journal of Cardiology*, v.154, p.2–8, 2012.

SIES H. Oxidative Stress. *Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, New York, 1991.

SINGAL P.K., KHAPER N., BELLO-KLEIN A., BHAYANA M. Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure. *Heart Failure Reviews*, v.4, p.353–360, 1999

SINGH N., DHALLA A.K., SENEVIRATNE C., SINGAL P.K. Oxidative stress and heart failure. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.147, p.77–81, 1985.

SIWIK D.A., COLUCCI W.S. Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart Failure Reviews*, v.9, p.43–5, 2004.

SMITH R.S., AGATA J., XIA C.F, CHAO L., CHAO J. Human endothelial nitric oxide synthase gene delivery protects against cardiac remodeling and reduces oxidative stress after myocardial infarction. *Life Sciences*, v.76, p.2457–2471, 2005.

SPOONER P.H., THAI H.M., GOLDMAN S., GABALLA M.A. Thyroid hormone analog, DITPA, improves endothelial nitric oxide and beta-adrenergic mediated vasorelaxation after myocardial infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v.44, p.453–459, 2009.

SYMONS M.C.R. Radicals generated by bone cutting and fracture. *Free Radical Biology and Medicine*, v.20, p.831–835, 1996.

TAO L., GAO E., HU A., COLETTI C., WANG Y., CHRISTOPHER T.A., LOPEZ B.L., KOCH W., MA X.L. Thioredoxin reduces post-ischemic myocardial apoptosis by reducing oxidative/nitrative stress. *British Journal of Pharmacology*, v.149, p.311–318, 2006.

TAVARES A.M., DA ROSA ARAUJO A.S., LLESUY S., KHAPER N., ROHDE L.E., CLAUSELL N., BELLO-KLEIN A. Early loss of cardiac function in acute myocardial infarction is associated with redox imbalance. *Experimental & Clinical Cardiology*, v.17, p.263–267, 2012.

TAVI P., SJOGREN M., LUNDE P.K., ZHANG S.J., ABBATE F., VENNSTRÖM B., WESTERBLAD H. Impaired Ca²⁺ handling and contraction in cardiomyocytes from mice with a dominant negative thyroid hormone receptor alpha1. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v.38, p.655–663, 2005.

TRACHOOTHAM D., LU W., OGASAWARA M.A., NILSA R.D., HUANG P. Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signalling*, v.10(8), p.1343-1374, 2008.

VALDEZ L.B., ZAOBORNAYI T., BOVERIS A. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods in Enzymology*, v.396, p.444-55, 2005.

WHELAN R.S., KAPLINSKIY V., KITSIS R.N. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annual Review of Physiology*, v.72, p.19-44, 2010.

YAO J., EGHBALI M. Decreased collagen gene expression and absence of fibrosis in thyroid hormone-induced myocardial hypertrophy. Response of cardiac fibroblasts to thyroid hormone in vitro. *Circulation Research*, v.71, p.831–839, 1992.

YEN P.M., ANDO S., FENG X., LIU Y., MARUVADA P., XIA X. Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 246, n.1-2, p.121–127, 2006.

YOSHIDA K., YOSHIYAMA M., OMURA T., NAKAMURA Y., KIM S., TAKEUCHI K., IWAO H.. Activation of mitogen-activated protein kinases in the non-ischemic myocardium of an acute myocardial infarction in rats. *Japanese Circulation Journal*, v.65, p.808–814, 2001

ZHANG Y., TOCCHETTI C.G., KRIEG T., MOENS A.L. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function. *Free Radical Biology and Medicine*, v.53, p.1531–1540, 2012.

9. ANEXOS

Em anexo a versão publicada dos artigos:

- Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction
Molecular and Cellular Endocrinology 391 (2014) 22-29
DOI: 10.1016/j.mce.2014.04.010
- T3 and T4 decrease ROS levels and increase endothelial nitric oxide synthase expression in the myocardium of infarcted rats
Molecular and Cellular Biochemistry 408 (2015) 235-243
DOI: 10.1007/s11010-015-2501-4.