

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**INFLUÊNCIA DO ESTADO REDOX NA MODULAÇÃO DE PROTEÍNAS DO
MANEJO DO CÁLCIO E NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERTROFIA
CARDÍACA INDUZIDA PELO HIPERTIREOIDISMO**

Dissertação de Mestrado

AMANDA DE AVILA BICCA MARTINS

Porto Alegre, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**INFLUÊNCIA DO ESTADO REDOX NA MODULAÇÃO DE PROTEÍNAS DO
MANEJO DO CÁLCIO E NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERTROFIA
CARDÍACA INDUZIDA PELO HIPERTIREOIDISMO**

AMANDA DE ÁVILA BICCA MARTINS

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo C. Schenkel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para obtenção do título de mestre.

Porto Alegre, fevereiro de 2014

*Dedico este trabalho a meus pais, Vera e Roberto
com todo meu amor e gratidão, por todos
os esforços que fizeram por mim
ao longo de minha vida*

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, Alex Sander da Rosa Araujo, não apenas pela oportunidade de ser por ele orientada, mas principalmente por nossa convivência ao longo destes dois anos. Seus ensinamentos, sua confiança e paciência comigo e, principalmente, as palavras fraternas nos momentos mais delicados, fizeram com que tudo fosse mais leve e tranquilo.

Agradeço ao meu co-orientador Professor Paulo Cavalheiro Schenkel, pela atenção e tempo dispensados a correção e discussão deste trabalho. Foi uma ajuda de grande valia.

Registro aqui meu agradecimento à Professora Adriane, que me recebeu em seu laboratório de forma tão acolhedora, proporcionando tantos aprendizados.

Aos meus queridos colegas que fizeram parte não apenas dos meus experimentos, mas também do meu dia-a-dia: Adriana Conzatti, Rafaela Siqueira e Rafael Colombo. Sinto-me privilegiada por ter tido como equipe de trabalho pessoas com tamanha competência e seriedade, e que se tornaram amigos tão queridos ao longo desta jornada.

Agradeço à querida Tânia Gatelli, não apenas pelo auxílio, mas pelo carinho e sábias palavras compartilhadas nestes anos de convivência.

Agradeço aos meus colegas "cotistas" que formaram a turma de mestrado de 2012. As conversas de corredor e a "terapia de grupo" nos momentos de maior estresse fizeram esta experiência mais especial ainda.

E por fim, mas não menos importante, agradeço aos animais utilizados neste trabalho. Sem eles este trabalho não seria possível.

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. Hormônios da Tireóide	5
1.2. Hipertireoidismo	8
1.3. Proteínas de Manejo do Cálcio.....	10
1.4. Espécies reativas	12
1.5. Defesas Antioxidantes.....	15
1.6. Hipertireodismo, proteínas de manejo do cálcio, hipertrofia cardíaca, espécies reativas e antioxidantes.....	20
2. HIPÓTESE.....	23
3. OBJETIVOS	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. Animais	25
4.2. Considerações Éticas.....	25
4.3. Grupos Experimentais	26
4.4. Sequência Experimental.....	26
4.5. Indução ao Hipertireoidismo e Tratamento com Vitamina C	27
4.6. Morte dos animais, coleta de sangue e retirada do tecido cardíaco.....	27
4.7. Dosagem Hormonal	28
4.8. Hipertrofia Cardíaca e Morfometria Cardíaca	28
4.9. Preparo do Homogeneizado de Tecido Cardíaco	28
4.10. Quantificação de Proteínas	29
4.11. Detecção de Radicais Livres Totais pelo 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)	29
4.12. Avaliação da atividade de Glutarredoxina.....	29
4.13. Atividade da enzima Tiorredoxina Redutase	30
4.14. Glicose – 6 - fosfato desidrogenase	30
4.15. Análise da expressão de proteínas pela técnica de Western Blot.....	30
4.16. Nitritos Totais	32

4.17. Análise Estatística e Cálculo Amostral.....	32
5. RESULTADOS	34
5.1. Medida de peso corporal dos animais.	35
5.2. Concentração sérica de Triiodotironina(T3).....	36
5.3. Concentração sérica de Tiroxina (T4).....	37
5.4. Índice de hipertrofia cardíaca	38
5.5. Índice de hipertrofia do ventrículo esquerdo	39
5.6. Razão PLB/SERCA	40
5.7. Nível total de espécies reativas (DCFH-DA).....	41
5.8. Concentração de Nitritos Totais	42
5.9. Atividade da Glutarredoxina	43
5.10. Imunoconteúdo da Glutarredoxina.....	44
5.11. Atividade da Tiorredoxina Redutase	45
5.12. Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase	46
6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÕES.....	54
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Medida de peso corporal dos animais.....	43
Concentração sérica de Triiodotironina (T3).....	44
Concentração sérica de Tiroxina (T4).....	45
Índice de hipertrofia cardíaca.....	46
Índice de hipertrofia do ventrículo esquerdo.....	47
Razão PLB/SERCA.....	48
Nível total de espécies reativas (DCFH-DA).....	49
Concentração de Nitritos Totais.....	50
Atividade da glutarredoxina.....	51
Imunoconteúdo da glutarredoxina.....	52
Atividade da tiorredoxina redutase.....	53
Atividade de Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT: catalase

DCFH-DA: 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate

EAO: espécies ativas de oxigênio

G6PD: glicose-6-fosfato-desidrogenase

GPx: glutaciona Peroxidase

GR: glutaciona redutase

GRLx: glutarredoxina

NADPH: fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

Nrf-2: fator eritróide nuclear 2

PLB: fosfolambam

RS: retículo sarcoplasmático

RyR: receptor de rianodina

SERCA2: Ca²⁺ATPase do retículo sarcoplasmático

SOD: superóxido dismutase

SRA: sistema renina angiotensina

T3: triiodotironina

T4: tiroxina

TRx: tiorredoxina

RESUMO

O hipertireoidismo é uma patologia que exerce importante influência sobre o sistema cardiovascular. Frente às concentrações elevadas de hormônios tireóideos, a taxa metabólica basal é intensificada, juntamente com o consumo de oxigênio. Como resultado destas alterações, a produção de espécies reativas pode ser incrementada. Em conjunto, estas alterações acarretam mudanças morfológicas funcionais e bioquímicas no tecido cardíaco.

O tecido cardíaco pode ter sua massa muscular aumentada em resposta à intensa síntese protéica e concomitante hiperestimulação do sistema nervoso simpático. Estes fatores podem ser os possíveis mecanismos que explicam a associação entre o estado hipertireoideo e o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca.

Neste estudo, avaliamos a influência do aumento das concentrações de espécies reativas de oxigênio sobre o imunoconteúdo das proteínas de manejo do cálcio no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca.

Para isto, foram utilizados ratos Wistar machos, pesando cerca de 220g, divididos em 4 grupos experimentais: Controle, Vitamina C(100mg/Kg/dia, 28 dias, via sonda intragástrica), T4 (0,8mg/rato/dia, 28 dias) e T4+Vitamina C. Foram avaliados a massa cardíaca, a expressão protéica de SERCA e PLB, a concentração total de espécies reativas, os metabólitos de óxido nítrico e o perfil antioxidante(glutarredoxina, tioredoxina redutase e glicose-6-fosfato-desidrogenase) no tecido cardíaco.

A hipertrofia no ventrículo esquerdo e a concentração de espécies reativas totais foram atenuados no grupo T4+Vitamina C. Os níveis de tioredoxina apresentaram elevação no grupo T4, quando comparados ao grupo controle. A razão calculada a partir da expressão protéica de SERCA e PLB esteve aumentada no grupo hipertireoideo, contudo não apresentou aumento significativo no grupo hipertireoideo que recebeu vitamina C.

Os resultados obtidos sugerem que o estado redox gera importante impacto sobre a expressão das proteínas de manejo do cálcio e, por conseguinte, a capacidade de contração e relaxamento cardíaco.

Palavras-chave: *proteínas de manejo do cálcio, tioredoxina, glutaredoxina, hipertrofia cardíaca, espécies ativas de oxigênio, hormônios da tireóide.*

ABSTRACT

Hyperthyroidism is a condition that has a major impact on the cardiovascular system. When there are high concentrations of thyroid hormones the basal metabolic rate is enhanced, together with oxygen consumption. As a result of these changes, the production of reactive species can be increased. Together, these alterations cause functional morphological and biochemical changes in cardiac tissue.

The cardiac tissue may have its mass increased in response to intense protein synthesis and concomitant hyper stimulation of the sympathetic nervous system. These factors can be the possible mechanisms that explain the association between hyperthyroid state and the development of cardiac hypertrophy.

In this study, we evaluated the influence of increased concentrations of reactive oxygen species on the immunocontent of calcium handling proteins in the development of cardiac hypertrophy.

For this purpose, male Wistar rats were used , weighing about 220g were divided into 4 groups: control , Vitamin C (100mg/kg/d 28 days , intragastric probe) , T4 (0.8 mg / rat / day , 28 days) and T4 + Vitamin C. cardiac mass, the protein expression of SERCA and PLB , the total concentration of reactive species , nitric oxide metabolites and antioxidant profile (glutaredoxin , thioredoxin reductase and glucose - 6 -phosphate dehydrogenase were evaluated) in cardiac tissue .

The hypertrophy of the left ventricle and the total concentration of reactive species were attenuated in group T4 + Vitamin C. The levels of thioredoxin significantly increased in the T4 group compared to the control group . The ratio calculated from the protein expression of SERCA and PLB was increased in hyperthyroid group, however no significant increase in the hyperthyroid group receiving vitamin C.

The results suggest that the redox state creates significant impact on the expression of proteins calcium handling and therefore the ability of cardiac contraction and relaxation.

Keywords: *calcium handling proteins , thioredoxin , glutaredoxin , cardiac hypertrophy , reactive oxygen species , thyroid hormones*

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Hormônios da Tireóide*

A tireóide atua como uma das principais glândulas reguladoras do organismo. Ela é responsável pela produção e liberação de 3 importantes hormônios: Triiodotironina(T3), Tiroxina(T4) e Calcitonina. Os dois primeiros influenciam o crescimento tecidual e o metabolismo basal de praticamente todos os sistemas, enquanto o último atua sob o metabolismo do cálcio (VIGUERIE; LANGIN, 2003).

T3 e T4 são produzidos nos folículos da tireóide. Essas estruturas são compostas por tireoglobulina, molécula glicoproteica extensa, que quando sofre iodetação em seus resíduos de tirosina forma a monoiodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT). Os hormônios T3 e T4 são formados como resultado do acoplamento de MIT e DIT e dois DIT, respectivamente. Após o acoplamento dessas moléculas, ocorre a clivagem das porções acopladas da molécula de tireoglobulina, para que então ocorra a secreção (GUYTON e HALL, 2011).

A tireóide secreta 90% de T4 e 10% de T3. Sugere-se que essa relação na produção de T3 e T4 ocorra em virtude das diferenças no tempo de ação e potencia de cada hormônio. A baixa proporção de T3 secretado estaria relacionada ao seu tempo de ação e a potencia de sua ação, sendo considerada três vezes maior, quando comparada ao tempo de ação e potencia apresentada pelo T4. Dessa forma, a manutenção de menores concentrações de T3 é uma medida de controle de seus efeitos. Quando há necessidade de aumento da concentração deste hormônio, a disponibilização rápida do T3 se

dá via conversão do T4 em T3, pelas deiodinases, potencializando efeitos em termos de impacto e tempo (Mc PHEARSON e PINCUS, 2011).

O controle da produção e liberação dos hormônios da tireoide (HT) depende, inicialmente, de outro hormônio produzido no hipotálamo chamado hormônio liberador de tireotrofinas (TRH) que estimula adeno-hipófise a liberar hormônio estimulador da tireoide (TSH). O TSH tem por função estimular a tireoide que, por fim, secreta T3 e T4. O controle da liberação e produção destes hormônios ocorre por retroalimentação negativa, com ação de T3 e T4, sob o hipotálamo. Ao entrar na célula, T4 é convertido em T3, por ação da enzima deiodinase tipo 1, presente nos tecidos periféricos(YEN *et al*, 2001).

Dois mecanismos distintos são responsáveis pelos efeitos dos hormônios da tireoide: mecanismos genômicos e não-genômicos. No primeiro, o receptor nuclear de hormônios da tireoide (TR) liga-se ao T3 mediando suas atividades biológicas, atuando como fator de transcrição na regulação da expressão gênica (SHEUE-YANN *et al*, 2010; KLEIN e DANSI, 2007). No segundo, a formação do complexo hormônio-receptor ocorre na membrana celular, podendo ativar cascatas de sinalização celular e influenciar a atividade mitocondrial e de canais iônicos (HIROI *et al*, 2006).

As ações dos HT dividem-se em dois tipos: ações de crescimento e desenvolvimento e ações metabólicas. Os efeitos destes hormônios relacionados ao desenvolvimento e crescimento, seriam resultado da modulação de fatores de crescimento, como somatomedinas, fator de crescimento nervoso e fator de crescimento epidérmico, que estariam associados aos efeitos dos hormônios da tireoide sob a maturação do sistema

nervoso, e desenvolvimento epidérmico. É sabido que estes hormônios podem ainda estimular, por vias genômicas, a síntese de hormônio do crescimento e potencializar a estimulação de somatomedinas, bem como seus efeitos anabólicos (FISHER *et al*, 1982).

Além dos efeitos tróficos, os hormônios da tireóide, atuam sob o metabolismo de diferentes tecidos, regulando tanto consumo quanto síntese energética. As concentrações plasmáticas de hormônios da tireóide influenciam, fortemente, o metabolismo intermediário. Tal ação é resultado da influência sob o metabolismo dos macronutrientes. Os hormônios da tireóide podem estimular o transporte de glicose, por via dependente de insulina, aumentando a gliconeogênese e glicogenólise. Do mesmo modo, T3 pode gerar aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres por estimular a mobilização de gorduras (CHAUHAN, 2008). Os hormônios tireoideos podem modular ainda o consumo de ATP, situação bem ilustrada pelo hipertireoidismo. Nesta doença o aumento do consumo de oxigênio promove um aumento na síntese e consumo de ATP (CHAUHAN, 2008).

No sistema cardiovascular, os hormônios da tireóide atuam por intermédio de múltiplos mecanismos. A ação genômica de T3 via ligação hormônio-receptor nuclear resulta no controle de genes cardíacos. Contudo, trabalhos recentes postulam que os hormônios tireoideos também exerceriam importante capacidade regulatória através de vias extra nucleares de rápida responsividade ao T4, alterando não apenas a expressão, mas também a atividade de Proteínas de Manejo do Cálcio (PORTMAN, 2008; DAVIS e DAVIS, 2002).

1.2. Hipertireoidismo

O hipertireoidismo é o resultado da secreção em demasia de T3 e T4. O aumento da concentração desses hormônios leva à elevação do consumo de oxigênio e mudanças morfo-funcionais de diferentes órgãos. Este conjunto de alterações geradas recebe o nome de hipertireoidismo. A perda de peso, intolerância ao calor e taquicardia compõe sintomatologia clássica desta disfunção (KLEIN e OJAMA, 2001). As principais causas associadas ao estabelecimento desta disfunção relacionam – se à Doença de Graves, condição em que os receptores de TSH presentes na tireoide são atacados por anticorpos, hiperestimulando a síntese e secreção de hormônios tireóideos (ROBBINS *et al*, 2005).

O sistema cardiovascular sofre grande influência dos hormônios da tireóide, ocasionando efeitos proeminentes, como taquicardia e redução da resistência vascular periférica. Dentre os efeitos supracitados, os dois últimos estão associados à sobrecarga de pressão e volume (OSMAN *et al*, 2007). A sobrecarga característica desta disfunção conduz à alterações moleculares e celulares, que culminam na alteração tanto do tamanho, quanto do forma cardíaco. Tais eventos representam uma estratégia compensatória, em que se estabelece um aumento da massa muscular cardíaca, via aumento do número de miofibrilas e mitocôndrias, esta última atuando como fator que intensifica o aporte de ATP, de modo que o maior número de miofibrilas possuirá energia, conferindo assim maior capacidade contrátil cardíaca. Dessa forma, o coração é capaz de desenvolver força suficiente para sobrepor-se à carga intensificada sob o ventrículo esquerdo, em razão do hipertireoidismo (HU *et al*, 2005).

A hipertrofia cardíaca é uma característica integrante do remodelamento, podendo ser classificada em dois tipos, sendo esses diferenciados pelos padrões que exibem. A hipertrofia fisiológica é o resultado de incremento transitório de sobrecarga hemodinâmica, presente em situações como o período gestacional e as respostas resultantes da prática regular de atividade física. Em situações em que a sobrecarga hemodinâmica é mantida, como na hipertensão arterial, a hipertrofia é classificada como patológica. A hipertrofia patológica é a evolução da resposta inicialmente adaptativa, que mantida culmina na dilatação da câmara cardíaca e culmina no prejuízo à função contrátil (CARREÑO *et al*, 2006).

Acredita-se que a hipertrofia cardíaca, característica proeminente em modelos experimentais hipertireoideos, possua origem multifatorial. Tal consideração origina-se do conhecimento que a administração de tiroxina altera a dinâmica de diferentes sistemas (HU *et al*, 2005). Postula-se que efeitos extranucleares também impactariam de modo importante no estabelecimento da hipertrofia cardíaca em resposta ao hipertireoidismo, uma vez que o desequilíbrio redox, característico desta condição, induz à ativação de cascatas de sinalização redox-sensíveis que conduzem a um quadro de hipertrofia cardíaca descompensada (FERNANDES *et al*, 2011).

A literatura indica que concentrações elevadas de T3 estariam associadas a alterações nas proteínas de manejo do cálcio em modelos experimentais de hipertireoidismo (KETZER *et al*, 2009). A literatura sugere que o aumento do metabolismo basal estaria associado às alterações na expressão de proteínas como Fosfolambam (PLB), Ca⁺²ATPase do Retículo

Sarcoplasmático (SERCA) e os Receptores de Rianodina (RyR) (CLAPHAM, 2007).

1.3. Proteínas de Manejo do Cálcio

O cálcio (Ca^{+2}) desempenha importante papel no controle da atividade cardíaca, uma vez que atua diretamente sobre a atividade contrátil. A homeostase do Ca^{+2} confere equilíbrio ao sistema de contração e relaxamento muscular (SMITH *et al*, 2008). Para que as concentrações ideais de Ca^{+2} sejam mantidas, a liberação e a retirada de Ca^{+2} do citosol é controlada por proteínas de membrana, dentre as quais podemos destacar a Ca^{+2} ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA), a fosfolamban (PLB) e os receptores de rianodina (RyR) (SMITH *et al*, 2008).

Estas proteínas atuam a partir do potencial de ação, desencadeado no início do acoplamento excitação – contração, que promove o aumento inicial da concentração intracelular de Ca^{+2} através da abertura de canais de Ca^{+2} tipo – L. Esta pequena elevação nas concentrações de cálcio intracelular atua como um gatilho que intensifica a liberação de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático através da ativação dos receptores de rianodina. O RyR são canais iônicos seletivos presentes na membrana do retículo sarcoplasmático que, quando fosforilados, liberam Ca^{+2} para o citosol, possibilitando a contração da musculatura (SCOOTE; WILLIAMS, 2002). O relaxamento, por sua vez, é resultado da recaptação de Ca^{+2} para o retículo sarcoplasmático mediada pela da SERCA. Essa recaptação, contudo, depende do estado da fosfolamban, uma vez que esta, em seu estado basal, reduz a afinidade de SERCA por Ca^{+2} . Em seu estado fosforilado, a inibição exercida pela fosfolamban sobre a

SERCA é atenuada, favorecendo a recaptação de Ca^{+2} para o RS (PERIASAMY *et al*, 2008).

A literatura indica que estas proteínas sofrem alteração em suas funções quando há aumento na liberação de hormônios tireoideanos (CARR; KRANIAS, 2002). De acordo com Bahaa *et al* (2000), o hipertireoidismo, interfere em vias de manutenção da atividade cardíaca normal, gerando efeito inotrópico positivo. O aumento da contratilidade frente à elevação dos níveis de T3 e T4 vem sendo associado à *upregulation* da SERCA concomitante a *downregulation* da PLB (CARR; KRANIAS, 2002). Com isso, acredita-se que variações de concentração de cálcio, fator determinante na caracterização dos parâmetros contráteis cardíacos, dependem de uma relação muito próxima entre as concentrações proteicas de SERCA e PLB. Variações da relação entre estas proteínas estariam fortemente associadas a alterações nas concentrações séricas de hormônios tireóideos (PERISIAMY *et al*, 2007).

Adicionalmente à modulação das proteínas de manejo do cálcio, os hormônios da tireóide podem estimular o sistema β -adrenérgico. A ativação simpática parecer ser um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo (DASH *et al*, 2001). Estudos indicam que o ambiente pró-oxidante, presente no hipertireoidismo, também seria um dos fatores associados ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, dado sua capacidade de interferir na sinalização intracelular (SAWYER *et al*, 2002). A disfunção contrátil presente na insuficiência cardíaca, estágio final da hipertrofia cardíaca patológica, tem sido intimamente relacionada à modulação redox.

Além das vias clássicas de ativação, postula-se que espécies ativas de oxigênio podem modular diretamente moléculas como a Proteína cinase A(PKA), Proteína cinase C(PKC) e a Proteína cinase II dependente de Cálcio/Calmodulina(CaMKII), sabidamente envolvidas em diversos mecanismos regulatórios das proteínas de manejo do cálcio. Tal função redox poderia ser considerada um mecanismo de ativação alternativa destas cinases. Como consequência, a oxidação e ativação de CaMKII, em resposta a elevadas concentrações de espécies ativas de oxigênio, favorece o prolongamento de potenciais de ação, aumentando a entrada de cálcio. A elevação das concentrações citosólicas de cálcio, associadas à disfunção induzida por espécies reativas presente no retículo sarcoplasmático, conduzem ao acúmulo de cálcio intracelular, prejudicando a contratilidade e gerando arritmias (WAGNER *et al*, 2013).

Neste contexto, a ruptura do equilíbrio redox seria responsável pela alteração das vias de sinalização intracelular e expressão das proteínas de manejo do cálcio. Em resposta a esta condição, a intensificação da síntese de proteínas e o aumento do volume dos cardiomiócitos conduziria à hipertrofia da musculatura cardíaca (KAHALY e DILLMAN, 2003).

1.4. Espécies reativas

A homeostase do corpo humano consiste em um equilíbrio dinâmico, estabelecido pelas diversas reações químicas que compõe os organismos vivos. Todas essas reações geram produtos que podem seguir duas rotas diferentes: incorporação a outras reações metabólicas, sendo reaproveitados;

ou descarte, uma vez que seu acúmulo pode causar prejuízo para as funções celulares normais (SCHRODER, 2008).

Dentre as diversas reações que compõe nosso metabolismo, a cadeia respiratória juntamente com a fosforilação oxidativa destacam-se por seu papel essencial na geração de energia para o organismo, na forma de ATP. As reações que compõe essa via metabólica ocorrem na mitocôndria, particularmente em suas membranas. Além do ATP, outros metabólitos, derivados do oxigênio, são produtos destas reações, como o oxigênio molecular (RIEGEL, 2012).

A estrutura birradicalar do oxigênio, a primeira vista pouco nociva, em função de sua baixa reatividade, torna-se potencialmente perigosa por sua capacidade de formar derivados de alta capacidade oxidante, que podem desestabilizar outras moléculas, por sua alta reatividade, como carboidratos, lipídeos, DNA entre outros. O potencial oxidante é resultado de sua tendência ao recebimento de um elétron por vez, característica que favorece a formação de diferentes compostos reativos, as espécies ativas de oxigênio (EAO) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

A expressão EAO se refere a compostos que derivam principalmente de oxigênio e podem gerar diversos produtos resultantes da redução do oxigênio, por meio de diferentes reações. Estas espécies incluem não só moléculas com alto potencial reativo, mas também os radicais livres (RL), estruturas químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seu último orbital eletrônico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985). Dentre as principais EAO a

serem citadas, podemos destacar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}).

O anion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é composto a partir de reações que adicionam um elétron ao oxigênio molecular. Isso pode ocorrer por diferentes vias (VALKO *et al*, 2007). A reação entre o $O_2^{\cdot-}$ e a enzima superóxido dismutase (SOD) gera, como produto, o H_2O_2 (BRAND *et al*, 2004).

O H_2O_2 é uma molécula cujo tempo de meia vida é relativamente longa. Possui facilidade de atravessar membranas lipídicas, o que aumenta sua capacidade de dispersão e formação de metabólitos tóxicos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Frente a íons metálicos, como o ferroso ou cúprico, o H_2O_2 integra a reação que dá origem ao OH^{\cdot} , a reação de Fenton. Além desta reação, o OH^{\cdot} pode ser também produzido pela reação de Wabber-Weiss, onde o H_2O_2 interage diretamente com $O_2^{\cdot-}$ (HALLIWELL; GUTTERDGE, 1985).

O OH^{\cdot} é conceituado como uma EAO secundária. É freqüentemente descrito como a EAO de maior potencial deletério, uma vez que se trata de uma espécie bastante agressiva ao organismo e não possui um antioxidante específico. Apesar do curto tempo de vida, consegue reagir rapidamente com moléculas biológicas próximas, sendo responsável por uma vasta gama de efeitos nocivos, como peroxidação lipídica (DROGE, 2002). A lipoperoxidação, por exemplo, é resultado da ação do radical hidroxil sobre as membranas lipídicas. As ligações insaturadas existentes nos ácidos graxos sofrem rearranjo molecular. Este arranjo determina uma maior suscetibilidade ao ataque de espécies reativas, propagando lipoperoxidação em uma reação em cadeia (HALLIWELL; GUTTERDGE, 1985).

Além das espécies ativas derivadas de oxigênio existem ainda aquelas que derivam do nitrogênio. Estes compostos são conhecidos como espécies reativas de nitrogênio (ERN). O óxido nítrico, é uma importante ERN, produzida pela óxido nítrico sintase (NOS), enzima responsável pela conversão da L-arginina em L-citrulina e NO. A regulação da atividade enzimática da NOS é efetuada por cofatores, moléculas sinalizadoras e citocinas que integram a produção de NO em diferentes sistemas, como o cardiovascular, nervoso e o imunológico (WANG *et al*, 2007). Na vasculatura, o NO atua como Fator Relaxante Derivado do Endotélio (EDRF) promovendo a vasodilatação e o relaxamento do tônus vascular. Sua produção neste sistema pode ser desencadeada pelo estresse de cisalhamento (*shear stress*) ou aumento do fluxo de sangue, o que resulta no relaxamento do tônus do vaso. No sistema imunológico, o NO é produzido e liberado por células como neutrófilos e macrófagos ativados frente a diferentes patógenos (BODGAN, 2001; NEUZIL *et al*, 1997). Apesar de desempenhar funções benéficas, a capacidade do NO de reagir facilmente com o $O_2^{\cdot-}$ produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$) faz com que esta molécula integre um grupo de moléculas de potencial deletério (PACHER *et al*, 2007).

1.5. Defesas Antioxidantes

Considerando que aproximadamente 5% do oxigênio consumido para formação de energia é transformado em EAO, e que elas podem interagir com NO e seus derivados, foi preciso que os organismos aeróbios desenvolvessem um ambiente redutor intracelular na prevenção de danos causados por tais espécies. Essa capacidade redutora celular deve-se à ação de compostos antioxidantes, moléculas capazes de neutralizar a ação das EAO levando à

formação de produtos menos tóxicos. Esses compostos podem ser classificados em dois grupos: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SIES, 1997).

Dentre os antioxidantes enzimáticos, podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), que atua como primeira linha de defesa antioxidante. Sua função é catalisar a reação entre dois radicais superóxido $O_2^{\cdot-}$ gerados na primeira etapa da redução monovalente do oxigênio, formando H_2O_2 (TSUTSUI *et al*, 2001). A catalase (CAT), assim como a glutathiona peroxidase (GPx), catalisa a redução de peróxido de hidrogênio, diminuindo a formação de OH^{\cdot} . A glutathiona redutase (GR), por sua vez, é responsável pela reciclagem do dissulfeto de glutathiona (GSSG) em sua forma reduzida (GSH) (TSUTSUI *et al*, 2001).

Existem ainda antioxidantes enzimáticos que integram o grupo de oxirredutases, encontradas em diversas porções das células. Esse grupo de enzimas contém um sítio ativo com dois resíduos de cisteína, que desempenham importante papel na regulação redox. Sua ação consiste na redução de ligações dissulfeto, o que as torna oxidadas, formando um dissulfeto em seu sítio ativo. Posteriormente, estas enzimas são reduzidas por suas respectivas redutases (HOLMGREN *et al*, 2008). Pode-se destacar as integrantes da superfamília tiorredoxina-tiorredoxina redutase (TRx) e glutarredoxina (GLRx). A literatura indica que a TRx possui importante papel no controle da apoptose, regulação do Fator Nuclear $K\beta$ (NF- $K\beta$) e modulador da sinalização redox, estando esta última associada à *upregulation* de TRx frente a altas concentrações de substâncias estressoras. A maior expressão desta

enzima, nestas condições, pode ser considerada um mecanismo de sobrevivência e regeneração celular.

Associado ao sistema cardiovascular, o sistema TRx é entendido como um possível foco terapêutico no combate à hipertrofia cardíaca, uma vez que animais transgênicos apresentando expressão diminuída da TRx apresentaram maiores concentrações de espécies reativas e estabelecimento de hipertrofia cardíaca significativa, quando comparado ao grupo controle não transgênicos (YAMAMOTO *et al*, 2003). Em animais jovens infartados, com expressão pronunciada de TRx, a área de infarto foi menor do que aquela apresentada pelos animais controle com expressão normal da mesma enzima (PEREZ *et al*, 2013). A super expressão de tiorredoxina em camundongos, apresentou efeitos cardioprotetores em modelo experimental de hipertrofia cardíaca induzida por angiotensina II e hipertensão e diminuiu lesões ateroscleróticas (HANSCHMANN *et al*, 2013).

A Glutarredoxina (GLRx), também conhecida como tioltransferase, é uma pequena proteína oxirredutase de baixo peso molecular (12KDa), com estrutura contendo dois resíduos de cisteína no sítio ativo, assim como a TRx, que podem formar tanto um ditiol (quando reduzido) ou um dissulfeto (quando oxidado) (HANSCHMANN *et al*, 2013). Sua capacidade de retornar ao estado reduzido deve-se aos componentes do sistema GLRx, que incluem a GR, a GSH e o NADPH. A GLRx utiliza a GSH no seu mecanismo enzimático frente às agressões causadas pelo aumento da concentração de EAO, não só reduzindo o dano oxidativo, mas também modulando diferentes vias de sinalização redox. Murata *et al* (2003) sugerem que essas características justificariam sua ação como agente anti-apoptótico, uma vez que a GLRx

estaria associada à ativação de Akt e, conseqüentemente, indução de vias de sobrevivência a ela associadas. Postula-se que, em tecido cardíaco, a GLRx tenha papel importante na prevenção da hipertrofia cardíaca, uma vez que animais transgênicos com expressão diminuída de GLRx apresentaram índices hipertróficos exacerbados em modelo de sobrecarga de pressão (CHA *et al*, 2008).

A Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase (G6PD) é uma enzima chave na via das pentoses, também considerada essencial ao controle do potencial redutor intracelular. Sua influência sob o estado redox da célula origina-se da relação entre a intensificação de sua expressão e o incremento dos níveis de GSH em células animais. Tal influência parte de sua capacidade de geração de NADPH, uma vez que tanto os sistemas GSH quanto o sistema TRx são recuperados pelo NADPH, podendo assim continuar atuando sobre espécies reativas (WANG *et al*, 2007).

Além dos antioxidantes enzimáticos, os organismos possuem substâncias orgânicas que, em baixas concentrações, atuam em diferentes processos metabólicos sem, contudo, representar fonte de energia. Tratam-se das vitaminas, dentre elas tais como a vitamina E (α -tocoferol) e C (ácido ascórbico). A vitamina E é composta por oito moléculas lipofílicas, sendo quatro tocoteróis e quatro tocotrienos. O α -tocoferol é a forma de vitamina E presente em maior quantidade no plasma, onde apresenta alta atividade biológica. Sua atividade antioxidante está relacionada à capacidade *scavenger* de radicais peróxido, uma vez que a vitamina E interage com este radical, bloqueando a propagação da lipoperoxidação. Somado a isso, a vitamina E pode ser

reciclada a sua forma inicial não oxidada, via ação de outros antioxidantes, como a vitamina C (VARDI, 2013).

A vitamina C, por sua vez, é uma molécula pertencente ao grupo das lactonas, que não é sintetizada em humanos devido à ausência de gulonolactona oxidase, enzima essencial para formação do ácido ascórbico. A vitamina C é considerada um antioxidante por sua capacidade de doar dois elétrons a partir da liga dupla existente entre o segundo e o terceiro carbono da molécula. Com isso, reduz outros compostos e torna-se oxidada, gerando o ácido semi-dehidroascórbico ou radical ascorbil. Este último apresenta relativa estabilidade e baixa reatividade, propriedade química que, quando comparada a agentes oxidantes mais potentes, torna sua ação antioxidante conveniente (RIEGEL, 2012). Somado a isso, o ascorbil e o ácido dehidroascórbico são moléculas passíveis de redução, via diferentes sistemas enzimáticos, como a glutathione e a glutarredoxina, por exemplo, (PADAYATTY e LEVINE, 2003). No sistema cardiovascular, acredita-se que a vitamina C possa prover efeitos citoprotetores diretos e indiretos. Sua ação direta seria resultado de sua influência sob a interação entre NO e EAO, resultando em vasodilatação e melhora na reatividade vascular. Indiretamente, a vitamina C auxiliaria o controle da lipoperoxidação, uma vez que desempenha importante papel na reciclagem da vitamina E (PADYATTY e LEVINE, 2000). Em trabalho recente, Hafez e Tousson (2014) observaram a interação da vitamina C na hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo. Os animais pertencentes aos grupos tratados com vitamina C durante a administração de T3, assim como os animais que receberam vitamina C somente após a conclusão da indução do hipertireoidismo apresentaram não apenas redução significativa nos

parâmetros hipertróficos, como também apresentaram redução significativa dos níveis de hormônios tireoideos.

Em condições fisiológicas, as concentrações de espécies reativas são mantidas dentro de uma faixa de variação que não acarreta prejuízos. Essa faixa de variação é controlada por ação de agentes antioxidantes, que neutralizam concentrações suprafisiológicas destas espécies. Contudo, se a produção de moléculas pró-oxidantes ocorrer de modo que as reservas antioxidantes não consigam restabelecer às concentrações destas espécies de volta à faixa de variação normal, ocorre a ruptura do equilíbrio redox. Este desequilíbrio é conceituado como estresse oxidativo (KOHEN, 2002).

1.6. Hipertireodismo, proteínas de manejo do cálcio, hipertrofia cardíaca, espécies reativas e antioxidantes

O crescimento do tecido cardíaco após o nascimento é resultado do aumento do tamanho de cardiomiócitos, conhecido como hipertrofia, consequência da resposta a fatores mecânicos e hormonais. O estabelecimento da hipertrofia cardíaca, contudo, também pode ocorrer em resposta à variadas patologias, sendo acompanhado de deterioração funcional, bem como alterações morfológicas (SADOSHIMA e AGO, 2006). Alterações morfológicas como a fibrose e a apoptose, podem gerar o remodelamento ventricular. Inicialmente, este remodelamento pode ser uma resposta adaptativa a um evento fisiológico, como a manutenção da função cardíaca. Contudo, o remodelamento contínuo inclui não somente alterações estruturais, como também alterações no uso de combustíveis energéticos, caracterizado com remodelamento metabólico. Frequentemente, estas alterações conduzem

a desfechos patológicos, como a hipertrofia e insuficiência cardíaca (IKEUCHI *et al*, 2004).

Concentrações séricas elevadas de hormônios associados ao crescimento e desenvolvimento, como no hipertireoidismo, estariam associados ao estabelecimento da hipertrofia cardíaca. Acredita-se que o incremento no metabolismo basal, com conseqüente elevação do consumo de oxigênio altere as vias de sinalização celulares cardíacas, por intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio. Apesar da presença de concentrações baixas de EAO serem consideradas importantes na manutenção da sinalização das funções fisiológicas normais, altas concentrações de EAO são consideradas prejudiciais às funções celulares. Estudos apontam importante papel das EAO tanto no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, quanto na transição da hipertrofia cardíaca compensada para insuficiência cardíaca (SADOSHIMA e AGO, 2006).

Entre as diferentes vias de sinalização estudadas com o objetivo de elucidar os mecanismos que conduzem ao aumento da massa cardíaca presente no hipertireoidismo, podemos destacar aquelas associadas às proteínas de manejo do cálcio. Estas proteínas têm sido apontadas como possíveis moléculas influenciadas pelas alterações redox instauradas em resposta ao aumento da liberação de hormônios tireóideos. (CARR; KRANIAS, 2002).

De acordo com Joulin *et al* (2009), a expressão reduzida de SERCA estaria relacionada à alterações na relação força/frequência cardíaca. Além

disso, radicais hidroxil apresentaram capacidade de desnaturar SERCA, por atacar diretamente o sítio de ligação com ATP (XU et al, 1997).

Contudo, estudos indicam que tecidos com alta atividade metabólica, como o coração, apresentam expressão intensificada de oxirredutases, como a tiorredoxina e a glutarredoxina, em resposta à elevação nas concentrações de EAO. Animais *knockout* para tiorredoxina redutase, portadores de cardiomiopatia dilatada fatal morreram logo após o nascimento, sugerindo que a remoção de EAO por esta enzima é fator crítico na manutenção da integridade celular (CONRAD *et al*, 2004).

Além da tiorredoxina, animais *knockout* para glutarredoxina apresentam maiores áreas de infarto, enquanto o grupo com super expressão de glutarredoxina apresentou inibição da hipertrofia cardíaca induzida por tratamento com endotelina-1 e fenilefrina (CHA *et al*, 2008).

Além do componente enzimático antioxidante, a vitamina C também apresenta papel importante associado à melhora da hipertrofia cardíaca. Hafez e Tousson (2014) demonstram que os grupos hipertireoideos que receberam ácido ascórbico durante ou após o tratamento com T3 obtiveram redução significativa de indicadores de hipertrofia cardíaca.

Considerando todos os fatores supracitados, é importante entender como o estado redox, presente no hipertireoidismo, pode interferir na expressão das proteínas de manejo o cálcio bem como estabelecimento da hipertrofia cardíaca.

2. HIPÓTESE

O hipertireoidismo promove um aumento na produção das espécies ativas de oxigênio, que alteram o estado redox celular, modulando, deste modo, a expressão de proteínas de manejo do cálcio, tais como a SERCA e a PLB.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o papel do estresse oxidativo cardíaco sobre as proteínas de manejo do cálcio em ratos com hipertrofia cardíaca, induzida por hipertireoidismo crônico, tratados com um antioxidante clássico (vitamina C).

Objetivos Específicos

- Determinar a concentração sérica dos hormônios tireoidianos nos grupos experimentais;
- Estimar a hipertrofia cardíaca nos diferentes grupos experimentais
- Avaliar a expressão proteica de SERCA, PLB no tecido cardíaco dos diferentes grupos experimentais;
- Analisar o papel das espécies ativas de oxigênio através da medida da concentração total de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no tecido cardíaco dos grupos experimentais;
- Analisar o estado redox através da atividade e expressão da Glutarredoxina,
- Determinar a atividade de Tiorredoxina reductase e Glicose - 6 – fosfato – desidrogenase no tecido cardíaco dos grupos experimentais.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso médio de 200 ± 20 gramas. Os animais foram provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Durante o período de tratamento (28 dias), os animais foram alojados no Biotério Setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) no Departamento de Farmacologia da UFRGS, sendo mantidos em caixas plásticas de 270 x 260 x 310 mm, com quatro ratos cada, com o assoalho recoberto com maravalha. Receberam alimentação e água à vontade e foram mantidos sob períodos de 12 horas luz/ 12 horas escuro, sob temperatura de 22°C.

4.2. Considerações Éticas

O projeto foi encaminhado à Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo que os experimentos foram iniciados somente após sua aprovação. Todos os procedimentos desse estudo estão de acordo com a Lei 11.794 (08.10.2008), que estabelece normas para a Prática Didática - Científica da Vivisseção de animais; dos Princípios Éticos na Experimentação Animal, formulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal; assim como àquelas contidas nos Princípios Internacionais Orientadores para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais provenientes do *Council for International Organizations of Medical Science (CIOMS)* (Goldim, 1997). Os experimentos referentes a este

projeto caracterizam um grau moderado de severidade considerando os tipos de tratamento aplicados aos componentes dos grupos experimentais. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética sob o número 21616.

4.3. Grupos Experimentais

Foram utilizados quatro grupos experimentais (n = total de), sendo eles:

- **Controle:** animais que receberão apenas o veículo da tiroxina.
- **Vitamina C:** animais que receberão vitamina C e veículo da tiroxina
- **Hipertireoideo:** animais que serão submetidos à ingestão de tiroxina.
- **Hipertireoideo + Vitamina C:** animais que serão submetidos à ingestão de tiroxina, concomitante ao tratamento com vitamina C.

4.4. Sequência Experimental

O desenvolvimento do protocolo experimental foi realizado através da indução ao hipertireoidismo, seguido concomitantemente do tratamento com vitamina C. Após o término do tratamento, os animais foram eutanasiados através da decapitação por guilhotinamento. A partir disso, foi coletado o sangue troncular e o tecido cardíaco para realizar as medidas propostas. A seqüência experimental está descrita em detalhes a seguir:

O hipertireoidismo foi induzido através da administração de L-tiroxina (T4) durante quatro semanas (ARAUJO *et al.*, 2006). Os grupos vitamina C e Hipertireoideo+vitamina C foram tratados com vitamina C, administrada por via intragástrica (HEUSCH *et al.*, 2010). O seguimento do protocolo experimental

deu-se ao final dos 28 dias de tratamento, com a eutanásia dos animais pela decapitação por guilhotinamento. Subsequentemente a este processo, o sangue troncular foi coletado (aproximadamente 1,5 mL) para análise dos hormônios tireoidianos, a fim de confirmar o estabelecimento do hipertireoidismo. Foram retirados destes animais, os corações para as medidas bioquímicas de estresse oxidativo e da expressão da glutarredoxina, SERCA e fosfolambam.

4.5. Indução ao Hipertireoidismo e Tratamento com Vitamina C

O hipertireoidismo crônico foi induzido mediante administração de L-tiroxina (0,15 µM) -12mg T4 dissolvido em aproximadamente 10 mL de Tris/Na OH (0,1 M) para um volume final de um litro de água *ad libitum* durante quatro semanas, na água de beber oferecida aos ratos (LADENSON *et al.*, 1986; MIRANDA, 1997). O grupo hipertireoideo + Vitamina C foi tratado com vitamina C administrada (100mg/Kg/dia em água) por via intragástrica, concomitante ao tratamento com L-tiroxina (HEUSCH *et al.*, 2010).

4.6. Morte dos animais, coleta de sangue e retirada do tecido cardíaco

Os animais foram mortos através da decapitação por guilhotinamento. Em seguida, foi realizada a coleta de sangue do tronco dos animais decapitados (volume de aproximadamente 1,5 mL) com heparina. O sangue coletado foi centrifugado por 10 minutos a 1000 X g em centrífuga refrigerada (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24), o plasma separado e congelado em freezer a -80°C para dosagens de hormônios tireoidianos. O coração foi retirado, os

ventriculos separados e pesados imediatamente após a coleta e congelados em freezer a -80°C para análises bioquímicas e de expressão de proteínas.

4.7. Dosagem Hormonal

Para dosar os hormônios T3 e T4 foi utilizada a metodologia de quimiluminescência por imunoensaio competitivo (FERREIRA; ÁVILA, 2001). Os resultados foram expressos em ng/dL.

4.8. Hipertrofia Cardíaca e Morfometria Cardíaca

O índice de hipertrofia cardíaca foi calculado pela razão do peso em grama de tecido cardíaco pelo peso corporal dos animais, ao final do experimento, multiplicado por mil (HU *et al.*, 2005).

4.9. Preparo do Homogeneizado de Tecido Cardíaco

Para as análises de atividade enzimática e quantificação de proteínas presentes em tecido cardíaco, uma fatia do coração foi adicionada a uma solução contendo KCl 1,15%(5mL/g de tecido) e de fluoreto de fenil metil sulfonil (PMSF), na concentração de 100mmol/L em isopropanol (10µL/mL de KCl adicionado). O PMSF inibe a ação de proteases, contendo assim a degradação enzimática. A solução contendo tecido cardíaco, KCl e PMSF foi homogeneizada por 40 segundos em Ultra-Turrax. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado por 20 minutos a 1000g em uma centrífuga refrigerada (Sorvall RC5B – Rotor SM 24) e o sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em freezer a -80°C, para análises posteriores (LLESUY *et al.*, 1985).

4.10. Quantificação de Proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, em 1951, que utiliza 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 expressos em mg/mL (LOWRY,1951).

4.11. Detecção de Radicais Livres Totais pelo 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)

O conteúdo de DCF foi medido no homogeneizado, após incubação, como um meio de estimar a concentração total de espécies reativas (Lebel, 1992). DCFH-DA é desacetilado a DCFH que, então, é oxidado por espécies reativas intracelulares formando um composto de alta fluorescência, o DCF. Para o cálculo dos resultados é feita uma curva padrão com DCF, estes expressos em pmol/mg de proteína (LEBEL *et al.*, 1992).

4.12. Avaliação da atividade de Glutarredoxina

Para avaliar a atividade de glutarredoxina foi utilizado o protocolo estabelecido por Holmgren e Åslund (1995). À glutathione 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 partir da adição de NADPH e glutathione reductase de levedura a 340 nm. A atividade é expressa em mmol/mg de proteína(HOLMGREN & ÅSLUND, 1995).

4.13. Atividade da enzima Tiorredoxina Redutase

A atividade da Tiorredoxina Redutase foi mensurada a partir da redução do composto 5'5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) à TNB, que apresenta cor amarela, podendo ser detectado via espectrofotometria a 412nm. Para isto, foi preparado um meio de reação neutro(pH 7,0) contendo DTNB (72nmol/L), NADPH (47nmol/L) e EDTA (200mmol/L), onde a reação foi medida durante um minuto. Cada unidade de tiorredoxina corresponde à 1µmol de TNB formado por minuto. Os dados foram expressos em U/min/mg de proteína(HOLMEGREN e BJORNSTEDT, 1995).

4.14. Glicose – 6 - fosfato desidrogenase

A medida da Glicose 6 fosfato desidrogenase foi executada a partir do método de Leong e Clark (1984) onde ocorre a reação entre mistura de 1 mL da solução composta por 100 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 10 mmol/L MgCl₂, 0.5mmol/L NADP e a amostra após a adição de 1mmol/L de G6PDH, sendo esta reação avaliada em espectrofotômetro a 340nm. Uma unidade de G6PDHcorresponde a 1mmol de substrato U/mg de proteína.

4.15. Análise da expressão de proteínas pela técnica de Western Blot

Para a identificação da proteína, as amostras de tecido foram descongeladas em tampão Tris-EDTA gelado (Tris HCl 100 mol/L, EDTA 5mol/L, pH=7.4) e homogeneizadas usando um homogeneizador Politron em quatro pulsos de 10 segundos com intervalo de 10 segundos. Foi adicionado ao tampão, fluoreto de fenilmetilsulfonila (20 µmol/L), para prevenir a degradação proteica. As concentrações de proteína foram analisadas e

utilizadas para normalizar a quantidade de proteína. Quarenta microgramas de proteína foram expostas à eletroforese em gel monodimensional de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida (SDS-PAGE) em um sistema descontínuo usando 15% (p/v) de gel separador e 5% (w/v) de gel fixador (LAEMMLI, 1970). As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membranas usando tampão Tween modificado, contendo Tris 20 mol/L, glicina 150 mol/L, metanol 20% (v/v), SDS 0,02% (p/v) (pH= 8,3) em uma unidade de transferência Bio-Rad resfriada. Após, os sítios de proteínas inespecíficas foram bloqueados através de 1h de incubação em solução bloqueadora (5% (p/v) de leite desnatado) em tampão Tris salina 0,1% (p/v), tween-20. Após o bloqueio, as membranas de NC foram incubadas por, no mínimo, 16h a 4°C, sob agitação constante, com os anticorpos de interesse específicos para: SERCA2, PLB, PLB - fosforilada, glutarredoxina. Após a incubação, as membranas foram lavadas com TTBS (3 lavagens de 10 minutos cada) e então incubadas com o segundo anticorpo por 1 hora. Após a incubação com o segundo anticorpo, as membranas foram lavadas novamente com TTBS (3 lavagens de 10 minutos cada). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimiluminescência (ECL) por 1min. Após a incubação com solução para quimiluminescência, as membranas de NC foram colocadas em contato com o filme fotográfico (GE Healthcare®) durante 30 a 120 segundos. Para revelação, o filme foi colocado na solução reveladora por 1 min; lavado com ácido acético e colocado por mais 1 min na solução fixadora. Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura. A densidade óptica das bandas foi mensurada por um sistema de processamento de imagem. A densitometria obtida para as bandas das proteínas estudadas foi

corrigida pela banda da β -tubulina, sendo os resultados obtidos expressos em unidades arbitrárias.

4.16. Nitritos Totais

A concentração de nitritos foi determinada no plasma, de acordo com a técnica descrita por Granger e colaboradores (1999). Para converter nitrito a nitrato, as amostras foram incubadas com cofatores enzimáticos a nitrato redutase. A reação foi finalizada pela adição do reagente de Griess. A coloração final foi detectada por espectrofotometria a 542nm.

4.17. Análise Estatística e Cálculo Amostral

O tamanho da amostra para a análise da expressão protéica, da análise da morfologia do tecido cardíaco e da avaliação do estresse oxidativo foi calculado através do programa PEPI 3, utilizando-se dados de estudos prévios realizados pelo nosso laboratório (ARAUJO *et al.*, 2008, ARAUJO *et al.*, 2010). Com base nos resultados das análises, foram calculadas as médias, os desvios-padrão para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. Foi utilizada *Análise de Variância* (ANOVA) de uma via complementada com o teste de Student- Newman-Keuls(SNK). Considerando a presença do tratamento com L-tiroxina e a administração de vitamina C, a escolha de ANOVA de uma via pode parecer equivocada. Contudo, o objetivo deste trabalho prima pela observação da possível influência de uma ambiente pró-oxidante, característico do hipertireoidismo sobre as proteínas de manejo do cálcio. A utilização de ácido ascórbico, neste estudo, visa observar apenas se o padrão de resposta das alterações associadas ao estresse oxidativo sobre as proteínas de manejo de cálcio seriam afetadas frente a um incremento nas

reservas antioxidantes, de modo a reforçar ou refutar nossa hipótese. Além disso, em trabalho de mestrado de outro integrante deste grupo de pesquisa (BARALDI *et al*, 2013) esta análise estatística também foi utilizada, uma vez que o desenho experimental apresentou semelhanças estruturais às aqui apresentadas. Para tais análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.

5. RESULTADOS

Os resultados apresentados neste trabalho são referentes à média \pm desvio padrão da média de cada parâmetro analisado nos diferentes grupos amostrais. A variação do peso corporal dos animais foi analisada ao longo do experimento. No plasma sanguíneo, foram analisados os hormônios T3 e T4, indicadores do funcionamento da tireóide. No tecido cardíaco, foram analisadas as amostras de ventrículo esquerdo. Nele, foi determinada a concentração total de espécies ativas de oxigênio e nitrogênio, através da medida do DCF-DA, juntamente com as defesas antioxidantes enzimáticas (atividade das enzimas glutarredoxina, tioredoxinaredutase e G6PDH). O imunoconteúdo da SERCA, PLB e Glutarredoxina foram medidos neste tecido através da técnica de Western Blot.

5.1. Medida de peso corporal dos animais

O peso dos animais não apresentou diferença significativa entre os grupos. Os resultados são apresentados na Figura 1.

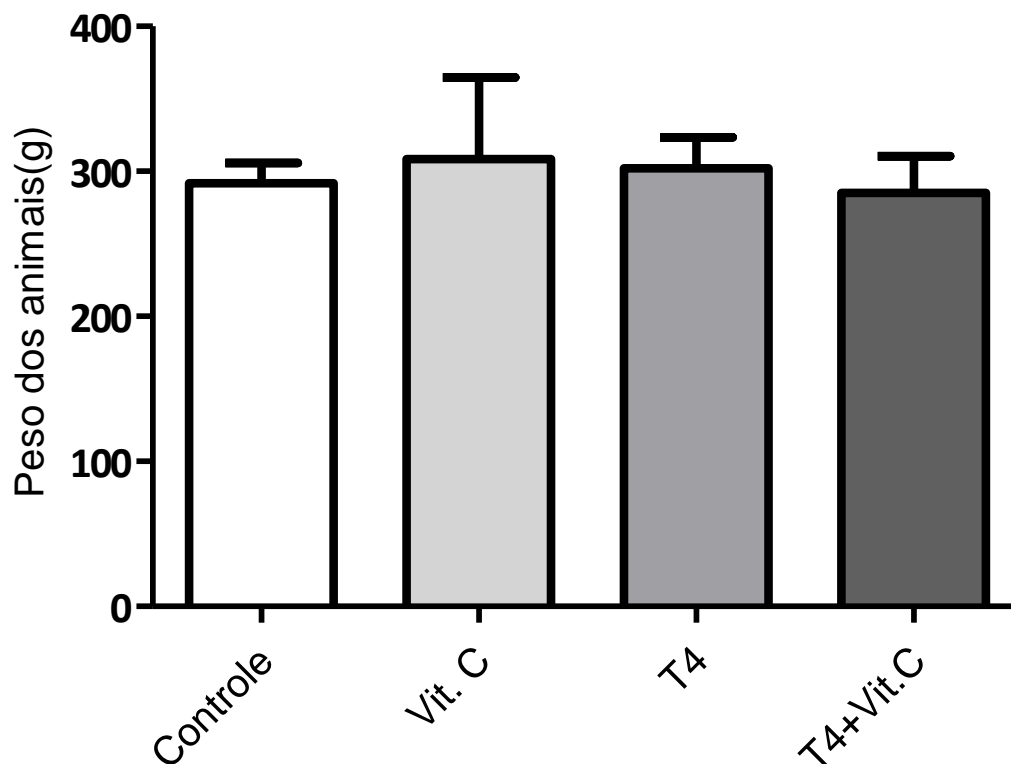


Figura 1: Peso dos animais em gramas. Os valores representam média±desvio padrão n= total de 7-8 animais por grupo. As médias foram analisadas por ANOVA de uma via complementada com o teste SNK ($p < 0,05$).

5.2. Concentração sérica de Triiodotironina(T3)

A concentração sérica de T3 apresentou aumento significativo no grupo T4+Vitamina C (~119,97%) em relação ao grupo Vitamina C ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa quando comparados os grupos Controle “versus” Vitamina C, assim como também não foi observada diferença significativa quando comparados os grupos T4 “versus” T4 + Vitamina C. Os resultados são apresentados na Figura 2.

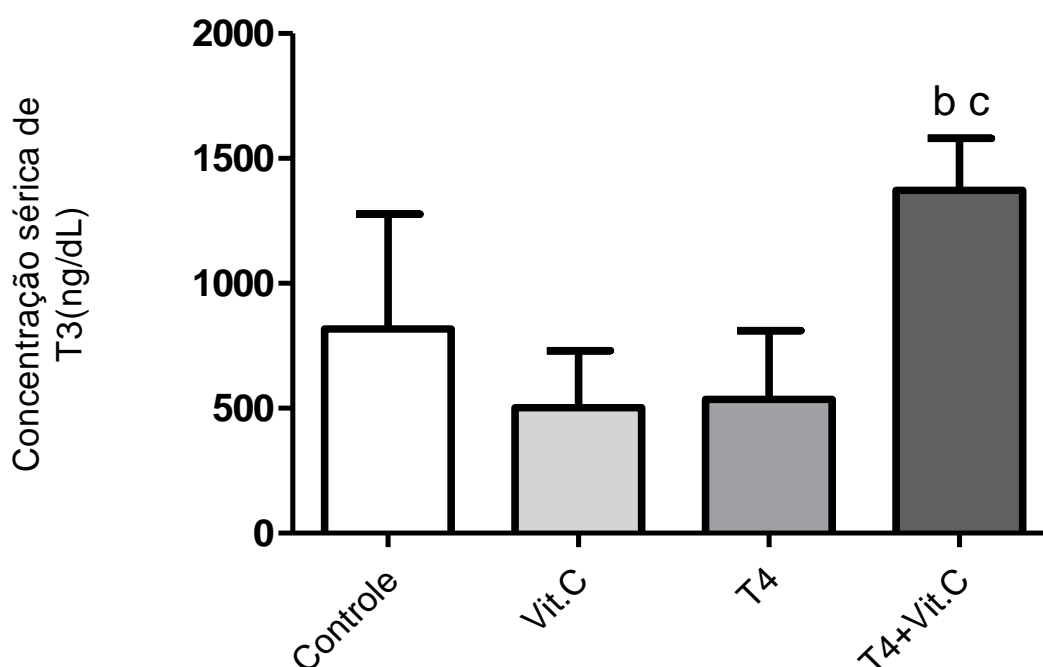


Figura 2. Concentração sérica de Triiodotironina (T3). Os valores representam média±desvio padrão, n= total de 4-6 animais por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via complementada com o teste SNK. b-diferença significativa em relação ao grupo Vitamina C ($p < 0,05$) c-diferença significativa em relação ao grupo T4 ($p < 0,05$)

5.3. Concentração sérica de Tiroxina (T4)

A concentração sérica do grupo T4 apresentou aumento significativo (~218%) quando comparado ao grupo Controle. O grupo T4 também apresentou aumento significativo (~473%) em relação ao grupo Vitamina C ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa quando comparados os grupos Controle “versus” Vitamina C, assim como também não foi observada diferença significativa entre os grupos T4 “versus” T4 + Vitamina C. Os resultados são apresentados na Figura 3.

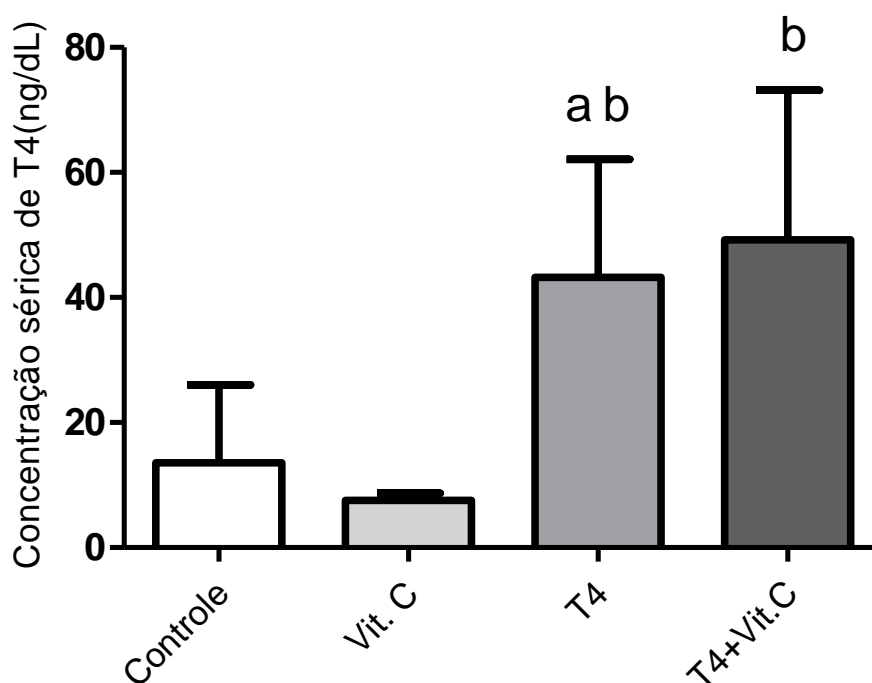


Figura 3. Concentração sérica de Tiroxina(T4). Os valores representam média±desvio padrão n = total de 4-6 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via complementada com o teste SNK. a-diferença significativa em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$) b-diferença significativa em relação ao grupo Vitamina C($p < 0,05$)

5.4. Índice de hipertrofia cardíaca

O peso absoluto do coração (em gramas) em relação ao peso corporal dos animais foi maior no grupo T4 (~23%) quando comparado ao grupo controle. O grupo T4 também apresentou elevação significativa no índice de hipertrofia cardíaca em relação ao grupo Vitamina C (~24%). O grupo T4+Vitamina C apresentou elevação significativa em relação ao grupo Vitamina C (~18%) ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos controle “versus” Vitamina C, tampouco entre os grupos T4 “versus” T4+Vitamina C. Os resultados são apresentados na Figura 4.

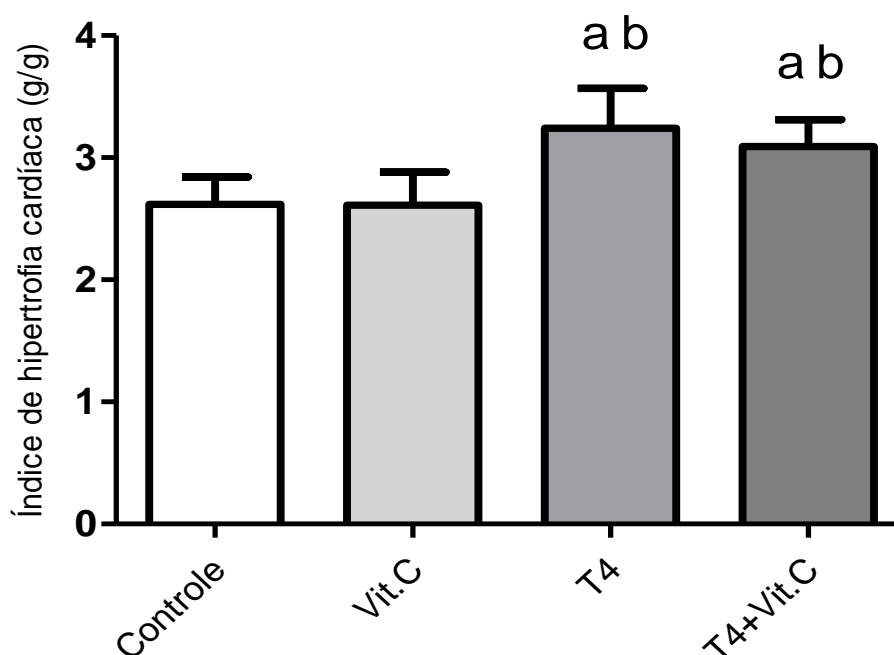


Figura 4. Índice de hipertrofia cardíaca dos animais em gramas. Valores representam média \pm desvio padrão n= total de 6-8 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via complementada com o teste SNK. a-diferença significativa em relação ao grupo Controle ($P < 0,05$). b-diferença significativa em relação ao grupo Vitamina C ($P < 0,05$).

5.5. Índice de hipertrofia do ventrículo esquerdo

Os resultados apresentaram elevação significativa no grupo T4 em comparação ao grupo controle (~17%). O grupo T4 apresentou também elevação (~23%) em relação ao grupo Vitamina C ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa quando comparados os grupos controle “versus” T4 + Vitamina C. Os resultados são apresentados na Figura 5.

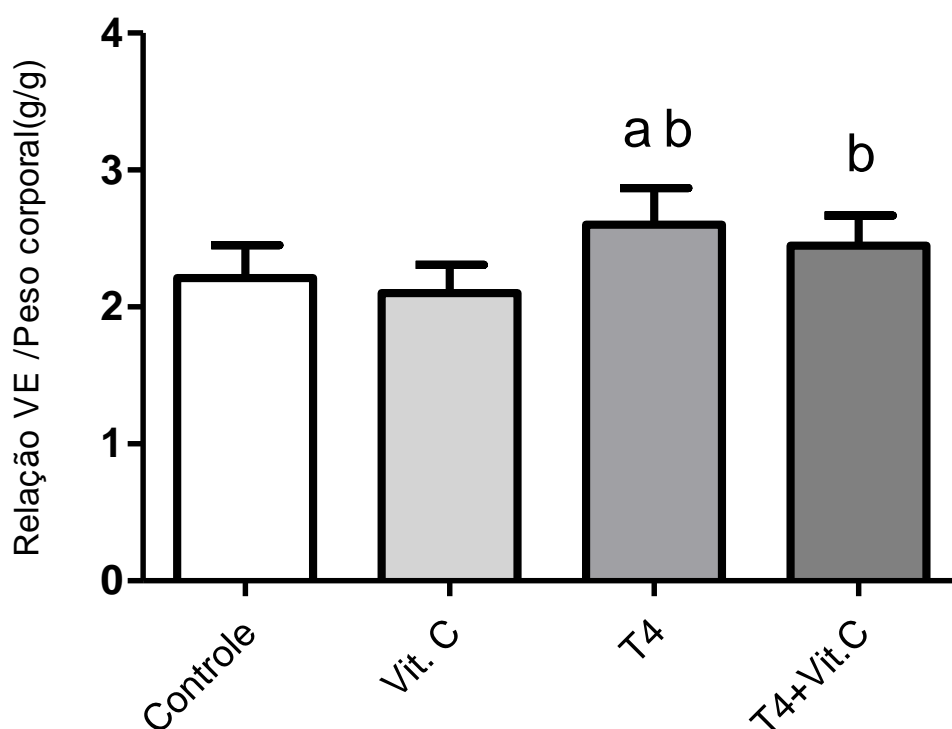


Figura 5. Relação ventrículo esquerdo/peso corporal em gramas. Valores representam média±desvio padrão n= total de 6-8 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via complementada como teste de SNK. a-diferença significativa em relação aos grupos controle ($P < 0,05$). b-diferença significativa em relação ao grupo Vitamina C ($P < 0,05$).

5.6. Razão PLB/SERCA

A razão PLB/SERCA apresentou-se elevada no grupo T4 (~381%) em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa quando comparados os grupos controle “versus” Vitamina C, tampouco entre os grupos T4 “versus” T4+Vitamina C. Também não foi observada diferença entre o grupo T4+vitamina C e o grupo controle ou na comparação entre o grupo T4+Vitamina C e o grupo Vitamina C. Os resultados são apresentados na

Figura 6.

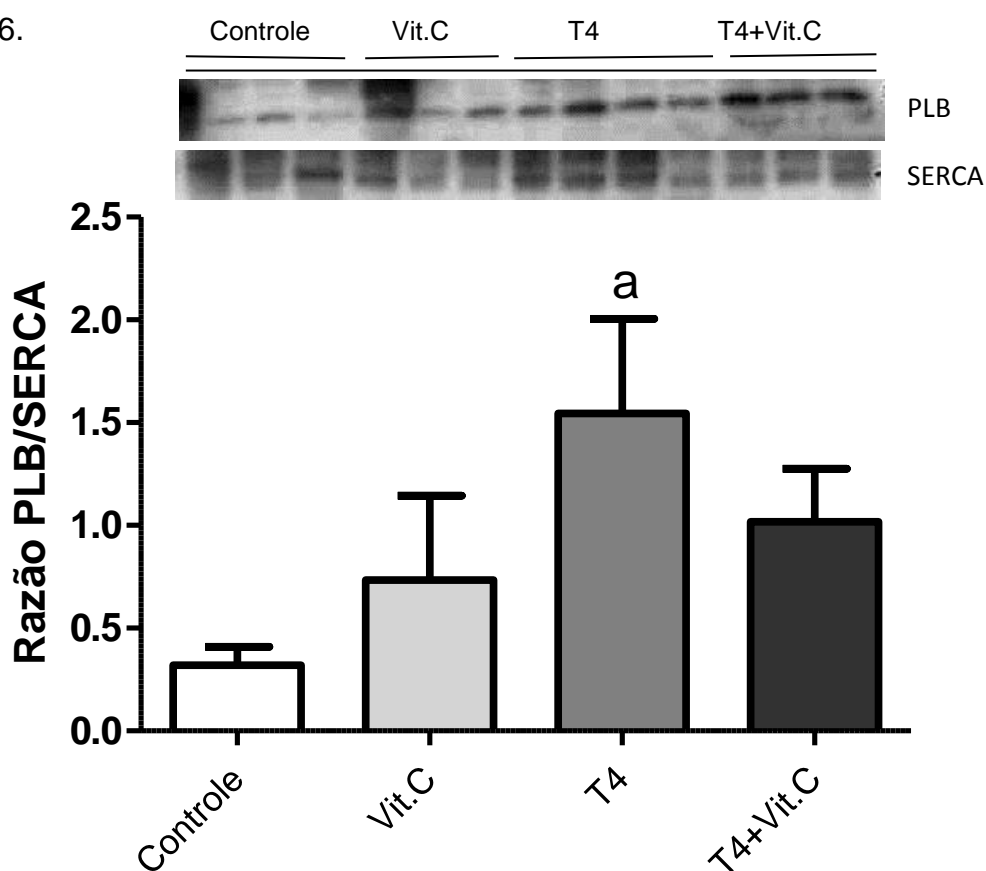


Figura 6. Razão PLB/SERCA. Valores representam média±desvio padrão n= total de 3-4 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via complementada como teste de SNK. a-diferença significativa em relação aos grupos controle ($P<0,05$).

5.7. Nível total de espécies reativas (DCFH-DA)

A concentração das espécies reativas no grupo T4 apresentou aumento significativo (~41%) quando comparada a concentração presente no grupo controle. O grupo T4 também apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo Vitamina C (~34%). A concentração destas espécies no grupo T4+Vitamina C apresentou redução (~27%) significativa quando comparados em relação ao grupo T4 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos controle e vitamina C, assim como também não foi observada diferença significativa entre o grupo T4+Vitamina C, quando comparado ao grupo controle. Não foram observadas diferenças entre os grupos T4+Vitamina C e Vitamina C. Os resultados são apresentados na Figura 7.

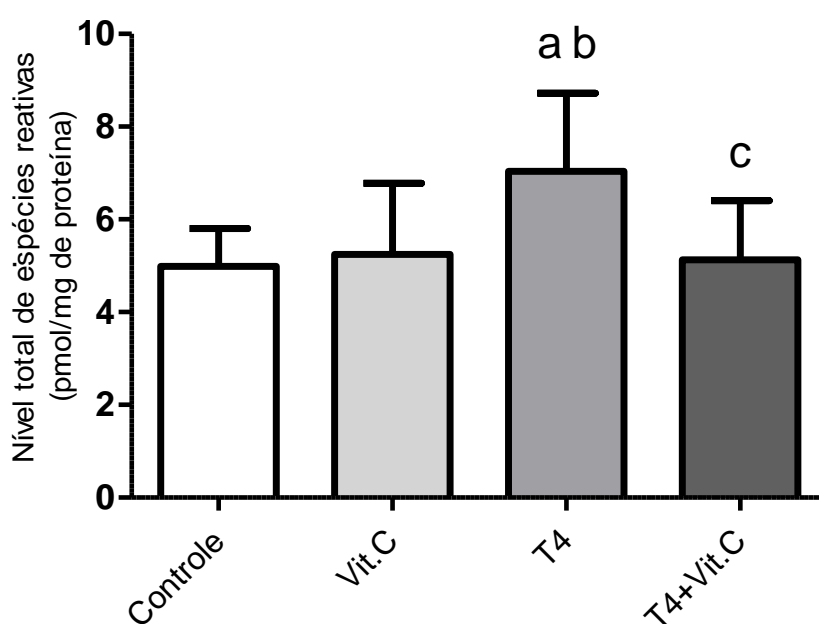


Figura 7. Nível total de espécies reativas. Valores representam média±desvio padrão n= total de 5-8 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via complementada com o teste de SNK. a-diferença significativa em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$)

b-diferença significativa em relação ao grupo Vitamina C($p<0,05$)

c-diferença significativa em relação ao grupo T4($p<0,05$)

5.8. Concentração de Nitritos Totais

Os resultados apresentaram aumento significativa na comparação entre os grupos T4 (~50%) quando comparados ao grupo Controle. Foi observada elevação significativa no grupo T4 + Vitamina C (~39%) em comparação ao grupo controle ($p<0,05$). Não houve diferença significativa quando comparados os grupos Controle “versus” Vitamina C, assim como também não foram observadas diferenças entre os grupos T4 e T4+Vitamina C. Os resultados são apresentados na Figura 8.

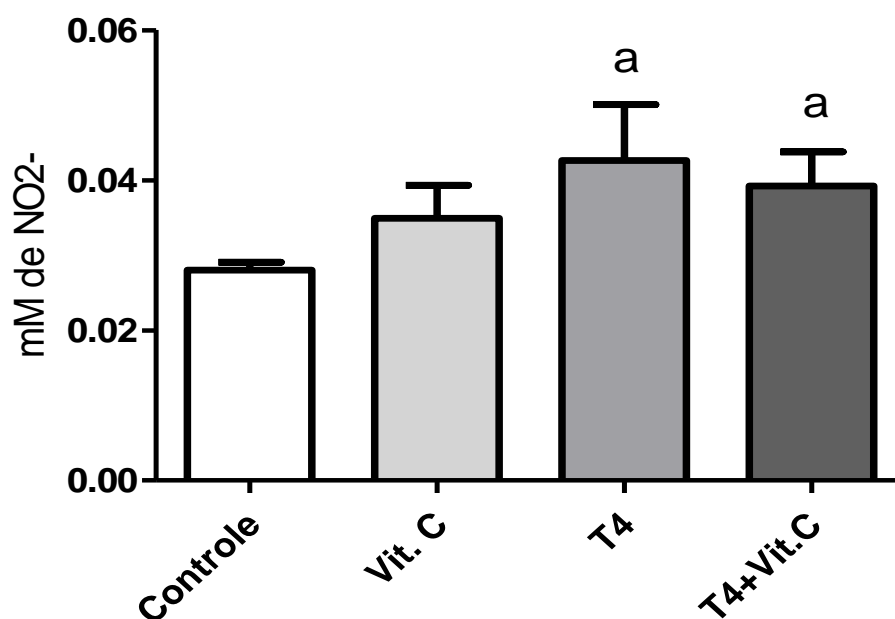


Figura 8. Concentração de Nitritos Totais em mM de NO₂⁻. Valores representam média±desvio padrão n= total de 5-8 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via complementada com o teste de SNK ($p<0,05$).

a-diferença significativa em relação ao grupo Controle($p<0,05$)

5.9. Atividade da Glutarredoxina

A atividade enzimática da Glutarredoxina no grupo Vitamina C apresentou aumento significativo (~71%), quando comparada com a atividade de glutarredoxina do grupo controle. Foi observada redução significativa da atividade desta enzima no grupo T4(~53%) em relação ao grupo Vitamina C. Também foi observada redução significativa no grupo T4+Vitamina C(~47%) em relação ao grupo Vitamina C($P < 0,05$). Os resultados são apresentados Na Figura 9.

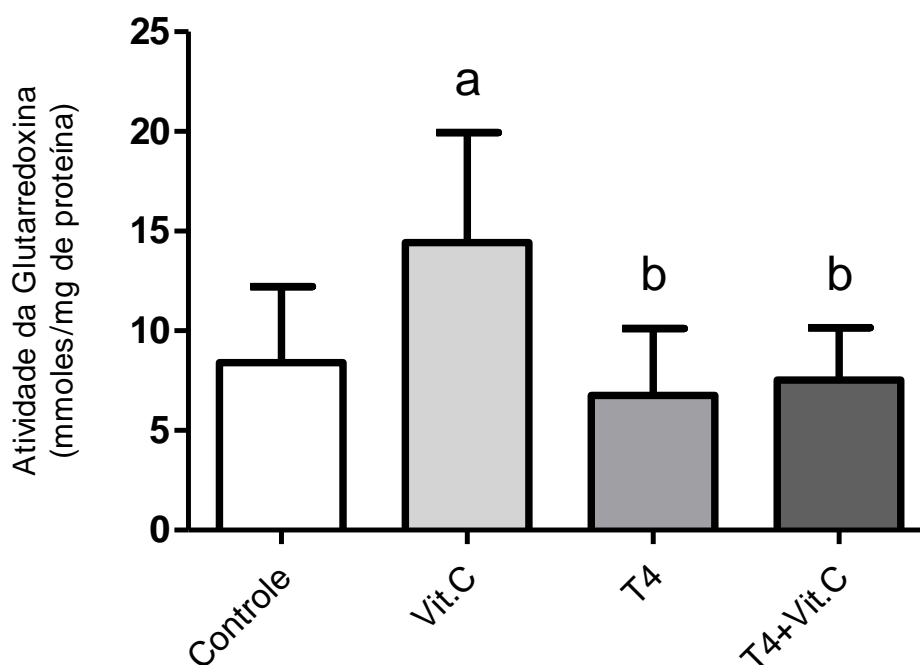


Figura 9. Atividade da Glutarredoxina em mmoles/mg de proteína. Valores representam média \pm desvio padrão n= total de 5-8 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via complementada com o teste de SNK ($p < 0,05$).

a-diferença significativa em relação ao grupo Controle($p < 0,05$)

b-diferença significativa em relação ao grupo Vitamina C($p < 0,05$)

5.10. Imunoconteúdo da Glutarredoxina

Os resultados apresentaram elevação significativa no grupo T4 (~420%) em comparação ao grupo Controle. Também foi observado aumento no grupo T4+Vitamina C (~320%) quando comparado ao grupo controle ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos T4 “versus” T4 + Vitamina C. Não houve diferença significativa quando comparados os grupos Controle “versus” Vitamina C. Os resultados são apresentados na Figura 10.

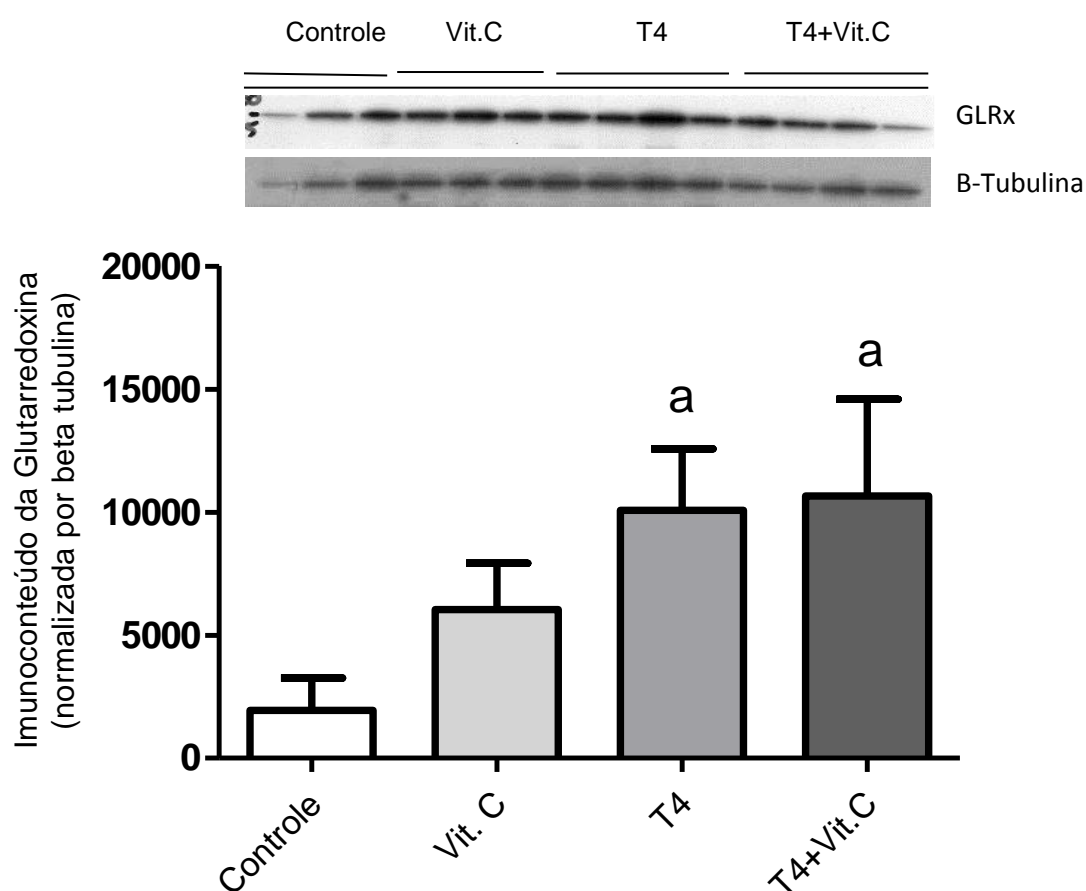


Figura 10. Imunoconteúdo de Glutarredoxina. Valores representam média±desvio padrão n= total de 3-4 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via complementada com o teste de SNK ($P < 0,05$).

a-diferença significativa entre em relação ao grupo controle($P < 0,05$).

5.11. Atividade da Tiorredoxina Redutase

Os resultados apresentaram aumento significativo na atividade da tiorredoxina redutase do grupo T4 (~74%) em comparação aos grupos Controle. Foi observado também aumento da atividade enzimática no grupo T4 (~53%) quando comparado ao grupo Vitamina C ($P < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os grupos T4 “versus” T4 + Vitamina C. Não houve diferença significativa quando comparados os grupos Controle “versus” Vitamina C. Também não foi possível observar diferença entre o grupo T4+Vitamina C e o grupo controle, tampouco houve diferença entre o grupo T4+Vitamina C e o grupo Vitamina C. Os resultados são apresentados na Figura 11.

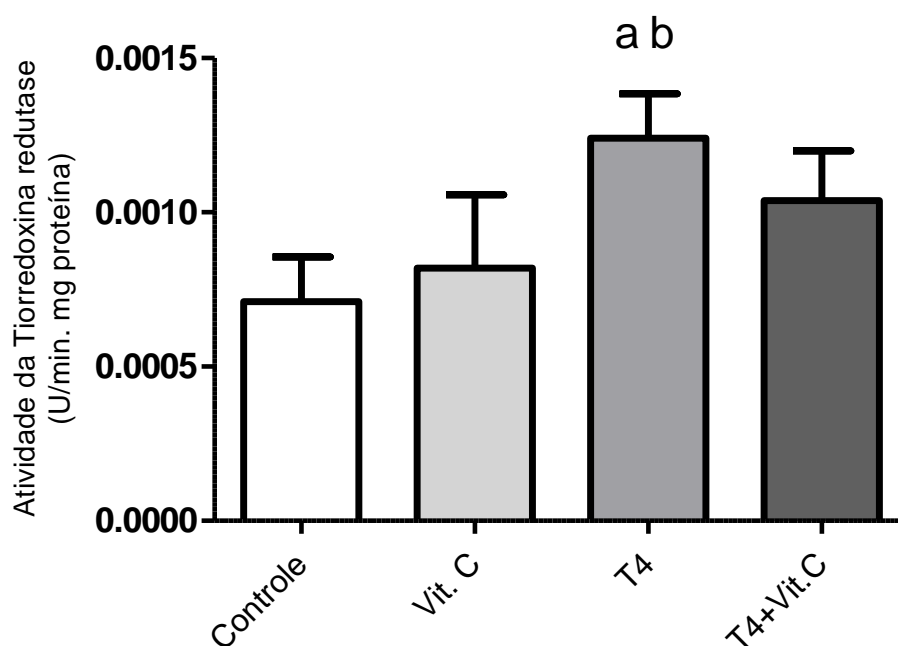


Figura 11. Atividade da Tiorredoxina Redutase. Valores representam média±desvio padrão n=total de 3-4 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via complementada com o teste de SNK. a-diferença significativa em relação ao grupo Controle($p < 0,05$) b-diferença significativa em relação ao grupo Vitamina C($p < 0,05$)

5.12. Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase

A atividade de Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase não apresentou diferença estatística entre nenhum dos grupos estudados. Os resultados são apresentados na Figura 12.

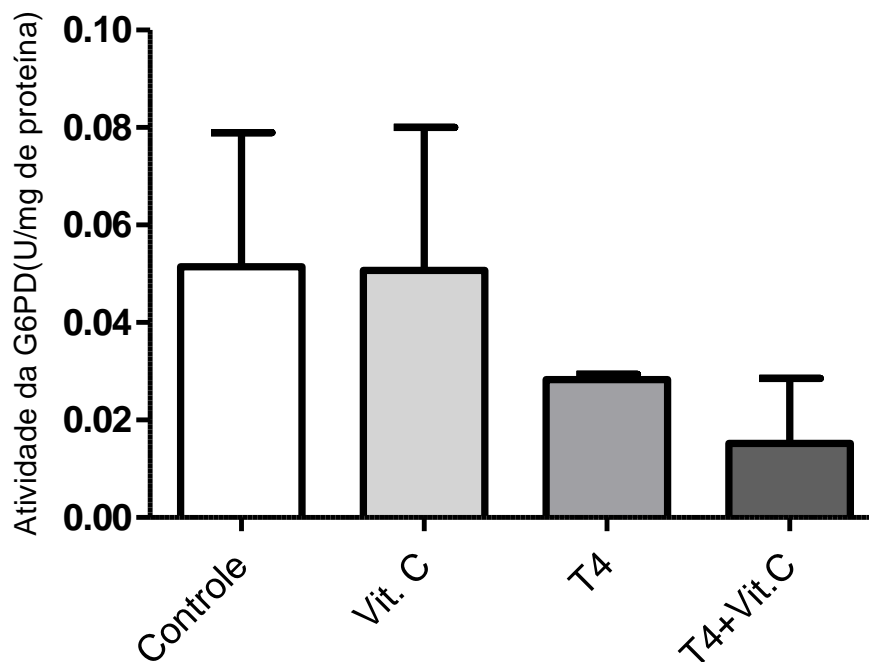


Figura 12. Atividade da Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase. Valores representam média±desvio padrão n= total de 3-4 animais por grupo. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via complementada com o teste de SNK ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi enfocada a relação entre as proteínas de manejo do cálcio e o papel das espécies reativas no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida pelo hipertireoidismo. Inicialmente, foi observado um aumento significativo na razão PLB/SERCA no grupo T4. Em segundo lugar, foi verificado o aumento da concentração de espécies reativas totais e metabólitos de NO no grupo T4. Além disso, este mesmo grupo alteração no padrão da atividade antioxidante, em resposta ao insulto oxidativo.

Os animais foram induzidos ao hipertireoidismo através da administração de L-Tiroxina. Esse procedimento foi escolhido por ser um protocolo bem estabelecido em nosso grupo de pesquisa. Após quatro semanas de tratamento, as concentrações séricas de triiodotironina(T3) e Tiroxina(T4), medidas por quimiluminescência, apresentaram aumento significativo nos grupos tratados em relação aos grupos controle, caracterizando, dessa forma, a condição hormonal de hipertireoidismo em ratos Wistar. Esses resultados correlacionam-se adequadamente com outros já apresentados por nosso grupo de pesquisa (ARAUJO *et al*, 2006). O peso corporal dos animais não variou entre os grupos, após quatro semanas de tratamento. A literatura apresenta diferentes resultados associados a esta variável, em animais hipertireoideos comparados a seus respectivos grupos controles. Aragão *et al* (2007), não observou diferença entre o peso corporal entre os animais hipertireoideos e hipotireoideos. Outros trabalhos indicam que animais hipertireoideos podem apresentar redução do peso durante 28 dias de tratamento (DEGENS *et al*, 2003).

Outra variável relevante apresentada nesse trabalho é o dado morfométrico. Os animais dos grupos hipertireoideos apresentaram aumento da massa miocárdica, quando comparados aos grupos controle. Outros trabalhos apresentam resultados que corroboram com os aqui demonstrados (BEDOTTO *et al*, 1989; FERNANDES *et al*, 2007). Diferentes vias estariam associadas ao estabelecimento da hipertrofia cardíaca no modelo experimental utilizado, entre elas a sinergia existente entre os hormônios tireoidianos e a sensibilidade β -adrenérgica e a ativação do sistema renina angiotensina (SRA). A literatura indica que os hormônios tireoidianos poderiam influenciar a susceptibilidade β -adrenérgica pelo aumento da densidade destes receptores no coração, apesar de esta não ser a ação mais pronunciada dos hormônios da tireoide sob o sistema neurovegetativo simpático (SULEIMAN *et al*, 1997). Além disso, os hormônios tireoidianos podem atuar sob diversos aspectos da resposta β -adrenérgica, entre os quais podemos destacar a ativação da hidrólise do inositol trifosfato (IP_3), que se liga a receptores do retículo endoplasmático liberando o cálcio estocado, que por sua vez ativa diferentes processos celulares (SILVA e BIANCO, 2008). Aliado a isso, o sistema simpático, via noreadrenalina, intensifica a conversão de T3 em T4, intensificando os efeitos dos hormônios tireoideos (SILVA e BIANCO, 2008). Além da influência sob a resposta β -adrenérgica, os hormônios da tireoide intensificam a expressão de mRNA de renina, não só no sistema circulatório, mas também no cardíaco. Sendo assim, o SRA integraria uma das vias que caracteriza a hipertrofia cardíaca como um evento multifatorial (KOBORI *et al*, 1999).

Este parâmetro não foi modificado de modo significativo pela administração da vitamina C. Por outro lado, quando se analisa a hipertrofia especificamente do ventrículo esquerdo, pode-se constatar que não houve diferença do grupo T4 tratado com vitamina C em relação ao grupo controle. Conforme dados da literatura, a hipertrofia ventricular esquerda é, sem dúvida, um padrão de risco cardiovascular, que pode conduzir ao estabelecimento da insuficiência cardíaca (FUSTIONE, 2003). Dessa forma, fatores que reduzam o estabelecimento desta condição podem demonstrar um potencial benefício. Neste contexto, a ação da vitamina C pode estar associada à modulação do estresse oxidativo, visto que alguns estudos demonstram a importância do homeostase redox no desenvolvimento do padrão hipertrófico deste modelo experimental (SEEDON *et al*, 2007; CHARLES *et al*, 2010).

A concentração total de espécies reativas, mensurada pela técnica de DCFH-DA, demonstrou aumento significativo no grupo T4. Tal resultado é consequência da elevação da taxa metabólica basal, que acarreta maior consumo de oxigênio e, com isso, maior produção de espécies reativas (CHAUHAN, 2008). Este aumento foi atenuado quando se administrou vitamina C neste grupo. A vitamina C é um antioxidante clássico, sendo considerado um bom agente redutor, podendo assim reduzir o dano oxidativo citosólico (CARR e FREI, 1999). É possível inferir que a vitamina C pode ter atuado por diferentes vias, entre elas a reciclagem da vitamina E, que também é importante antioxidante (NICHOLSON *et al*, 2013). De acordo com Min-Shan Tsai *et al* (2011), animais submetidos à parada cardíaca, que receberam vitamina C, apresentaram redução de parâmetros como o dano miocárdico, lipoperoxidação, dano mitocondrial e, conseqüentemente, o extravasamento de

cálcio. Ainda sobre a avaliação de eventos associados à oxidação biológica, a avaliação dos metabólitos de NO, evidenciada pela técnica de nitritos totais, apresentou elevação no grupo T4. Este resultado corrobora com aqueles encontrados por Carrillo-Sepulveda *et al* (2010), que indicaram que a administração de hormônios tireoidianos levaram à produção de NO por ativação da via PI3K/Akt.

Além dos parâmetros oxidativos, a atividade antioxidante também foi mensurada de modo a configurar o perfil redox do modelo experimental. Como avaliação da atividade antioxidante, foram utilizadas técnicas que analisaram diferentes enzimas antioxidantes: Glutarredoxina, Tiorredoxina Redutase e Glicose-6-fosfato-desidrogenase. A Glutarredoxina apresentou aumento significativo apenas no grupo vitamina C. Esse resultado corrobora com outros dados da literatura que implicam a glutarredoxina como um importante agente redutor do ácido ascórbico oxidado, podendo ser esta a razão da maior atividade no grupo vitamina C (WELLS *et al*, 1990; PARK e LEVINE, 1996). O imunoconteúdo de glutarredoxina não apresentou o mesmo padrão de resposta que sua atividade enzimática. Juntos, os achados referentes à atividade e expressão de glutarredoxina podem indicar que os processos que governam a expressão desta enzima não se relacionam diretamente àqueles que intensificam sua atividade. Sugere-se que a expressão do imunoconteúdo de glutarredoxina pode ser induzida nos grupos hipertireoideos pelo aumento na formação de espécies reativas. A elevação nas concentrações de espécies reativas nestes grupos estaria associado à ativação do *fator nuclear eritróide 2* relacionado ao *fator 2* (NrF2), que induz a expressão de diferentes moléculas antioxidantes (REISMAN *et al*, 2009).

A atividade da Tiorredoxina redutase, por sua vez, apresentou atividade aumentada do grupo T4. Esse resultado associa-se com as concentrações de espécies reativas demonstradas pela técnica de DCFH-DA. A literatura postula que a tiorredoxina redutase tem papel importante na contrarregulação das concentrações de espécies reativas modulando, conseqüentemente, as vias de sinalização redox sensíveis (SCHENKEL *et al*, 2012). Este papel deve-se a sua ação restauradora sobre os grupos tióis da proteína tiorredoxina oxidada por espécies reativas, mantendo-a apta a atuar na neutralização de outros possíveis insultos oxidativos. O grupo hipertireoideo que recebeu vitamina C não apresentou atividade enzimática semelhante àquela do grupo T4. É possível que a administração de vitamina C tenha amenizado a sobrecarga do sistema tiorredoxina - tiorredoxina redutase, de modo que sua atividade não apresentou incremento significativo (HALLIWELL, 2007).

Uma das coenzimas importantes para tiorredoxina redutase é o NADPH (STARK, 2001). Esta molécula é resultado das reações que compõe o ciclo das pentoses, em que a G6PD é uma enzima chave. Por esta razão, a atividade da G6PD foi analisada, porém sem ocorrência de diferença entre os grupos. Segundo Zimmer *et al* (1995), a atividade da G6PD varia de acordo com o modelo experimental utilizado para indução da hipertrofia cardíaca. A indução da hipertrofia cardíaca via administração de T3 apresentou resultados semelhantes aos aqui apresentados. Por outro lado, a indução de hipertrofia cardíaca por administração de noradrenalina apresentou alteração significativa na atividade desta enzima, de modo que a ação enzimática pode apresentar padrões diferentes de resposta, dependendo do modelo experimental utilizado (KOLWICZ e TIAN, 2011).

Outro ponto importante no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca, induzida por hipertireoidismo, são as proteínas de manejo do cálcio, como a PLB e a SERCA. Os resultados foram apresentados como razão entre PLB/SERCA. Tal relação se deve à estreita associação funcional entre estas proteínas, em que a PLB modula a sensibilidade da SERCA ao cálcio. Desta forma, esta proteína influencia a capacidade sequestradora desta bomba e, conseqüentemente, a contratilidade miocárdica. Desse modo, a relação PLB/SERCA oferece uma visão do estado contrátil do coração (KOSS *et al*,1997). Os resultados indicam que houve aumento significativo da razão PLB/SERCA apenas no grupo T4 em relação ao grupo controle e ao grupo vitamina C. A razão destas proteínas elevada sugere que as propriedades contráteis e de relaxamento estariam reduzidas, em resposta ao prejuízo no manejo do cálcio (LALLI *et al*, 2001). No grupo hipertireoideo tratado com vitamina C, esta razão, embora não fora diferente do grupo T4, também não diferenciou do grupo controle, indicando uma ação parcial da vitamina C sobre este parâmetro.

Tomados em conjunto, os resultados sugerem que o aumento da taxa metabólica induzida pelo hipertireoidismo pode interferir na homeostase redox, conforme demonstrado nos parâmetros de espécies reativas totais e de metabólitos de NO. Tal efeito desencadeou uma resposta contrarregulatória das reservas antioxidantes, na tentativa de restabelecer o equilíbrio redox, conforme demonstrado nos parâmetros antioxidantes avaliados (tiorredoxina redutase). As condições pró-oxidantes induzidas pelo estado hipertireoideo demonstraram o aumento da razão de PLB/SERCA, sugerindo possível prejuízo na capacidade contrátil e de relaxamento cardíaco. Por outro lado,

este processo foi parcialmente atenuado pelo tratamento com vitamina C, indicando uma potencial associação das proteínas do manejo do cálcio com o estado redox cardíaco.

7. CONCLUSÕES

- 1) O tratamento com L-Tiroxina foi eficaz na indução do hipertireoidismo, considerando os resultados laboratoriais dos hormônios T3 e T4, que apresentaram concentrações séricas significativamente aumentadas nos animais tratados.
- 2) O índice de hipertrofia cardíaca, calculado pela relação entre peso corporal e peso do coração demonstrou-se aumentado nos animais hipertireoideos, sugerindo que no hipertireoidismo ocorre um aumento na massa cardíaca.
- 3) O índice de hipertrofia ventricular esquerda, calculado pela relação entre peso corporal e peso do ventrículo esquerdo, demonstrou-se aumentado nos animais hipertireoideos, sugerindo que no hipertireoidismo ocorre um aumento na massa do ventrículo esquerdo. Esta hipótese não foi provada nos animais hipertireoideos que receberam vitamina C. A hipertrofia no ventrículo esquerdo não se estabeleceu em relação ao grupo hipertireoideo, sugerindo que a vitamina C pode ter atenuado parcialmente os efeitos hipertróficos do hormônio da tireóide sob o ventrículo esquerdo.
- 4) A razão entre PLB/SERCA, mensurada por *western blot*, demonstrou-se aumentada no grupo T4, sugerindo que no hipertireoidismo há prejuízo na capacidade miocárdica contrátil e de relaxamento. Esta hipótese não foi provada nos animais hipertireoideos que receberam vitamina C. A razão PLB/SERCA permaneceu inalterada em relação ao grupo hipertireoideo, sugerindo que a vitamina C pode ter atenuado os prejuízos ao aparato contrátil deste modelo experimental.

- 5) A concentração total de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio, mensurada pela técnica de DCFH-DA e de nitritos totais demonstrou-se aumentada no grupo T4, sugerindo que no hipertireoidismo há um aumento na produção de EAO/ERN quando comparada com os demais grupos, indicando que o tratamento com L-Tiroxina intensificou a produção de EAO/ERN. Esta hipótese não foi comprovada no grupo hipertireoideo que recebeu vitamina C. A concentração de EAO/ERN manteve-se inalterada em relação ao grupo hipertireoideo, sugerindo um efeito protetor da vitamina C no grupo T4+Vitamina C.
- 6) A atividade da Glutarredoxina demonstrou-se aumentada no grupo Controle+Vitamina C. Essa hipótese não foi provada nos demais grupos. A atividade da glutarredoxina manteve-se inalterada em relação aos grupos Controle, T4 e T4+Vitamina C, sugerindo que em condições fisiológicas a vitamina C poderia interagir com a glutarredoxina. O aumento da expressão da Glutarredoxina acompanhou o aumento da concentração de EAO/ERN nos grupos T4 e T4+Vitamina C. Essa hipótese não foi provada nos grupos controle, sugerindo que o aumento na concentração de espécies pró-oxidantes poderia induzir a expressão desta enzima.
- 7) A atividade da tiorredoxina redutase demonstrou-se aumentada no grupo hipertireoideo. Essa hipótese não foi provada nos demais grupos avaliados. A atividade da TRx redutase nos animais do grupo T4+Vitamina C não diferiu de nenhum dos demais grupos avaliados, sugerindo que a vitamina C pode atuar reduzindo indiretamente a atividade da tiorredoxina redutase em ambientes com desbalanço redox,

de modo a aproximar sua atividade daquela apresentada em condições fisiológicas.

- 8) A atividade da Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase não evidenciou nenhuma diferença entre os grupos estudados, sugerindo que esta enzima não tenha sua atividade alterada no modelo experimental utilizado.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados, podemos concluir que o tratamento com tiroxina é responsável pelo aumento das concentrações de EAO/ERN, em consequência às alterações metabólicas características dessa condição. A configuração redox estabelecida pelo hipertireoidismo interfere em diferentes vias de sinalização cardiovascular, que culminam na hipertrofia e perda de função cardíaca. A inclusão da vitamina C em nosso desenho experimental auxiliou no entendimento da magnitude da influência das EAO/ERN sob a função e a morfologia cardíaca.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aragão CN , Souza LL, Cabanelas A, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC. Effect of experimental hypo- and hyperthyroidism on serum adiponectin. *Metabolism*. 2007 Jan;56(1):6-11.
- Arai M, Alpert NR, MacLennan DH, Barton P, Periasamy M. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ Res*. 72:463-469, 1993.
- Araujo ASR, Ribeiro MFM, Enzweiler A, Schenkel P, Fernandes TRG, Partata WA. Myocardial antioxidant enzyme activities and concentration and glutathione metabolism in experimental hyperthyroidism. *Mol Cell Endocrinol*; 249: 133-39, 2006.
- Araujo ASR, Ribeiro MFM, Enzweiler A, Schenkel PC, Fernandes TRG, Partata WA, Irigoyen MC, Llesuy S & Belló-Klein A Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine. *Molecular and Cellular Biochemistry* 303: 89-95, 2008.
- Babušíková E, Lehotský J, Dobrota D, Račay P, Kaplán P. Age-Associated Changes in Ca²⁺-ATPase and Oxidative Damage in Sarcoplasmic Reticulum of Rat Heart. *Physiol. Res*. 61: 453-460, 2012.
- Bahaa MF, Samer E, Mathew DR. Hyperthyroid Heart Disease. *Clin Cardiol*, 23:402 – 408, 2000.

- Baraldi D, Casali K, Fernandes RO, Campos C, Sartório C, Conzatti A, Couto GK, Schenkel PC, Belló-Klein A, Araujo ARS. The role of AT1-receptor blockade on reactive oxygen species and cardiac autonomic drive in experimental hyperthyroidism. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 177, 163–169, 2013.
- Bedotto JB, Gay RG, Graham SD, Morkin E, Goldman S. Cardiac hypertrophy induced by thyroid hormone is independent of loading conditions and beta adrenoceptor blockade.
- Bodgan C. Nitric oxide and immune response. *Nature Immunology*. 2-10, 2001.
- Brand M, Affourt C, Eesteves T, Grenn K, Lambert A, Miwa, Pakay J, Parker N. Mitochondrial Superoxide: Production, biological effects, and of uncoupling protein. *Free Radical Biology & Medicine*, 6:755 – 767, 2004.
- Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*. 15: 186- 190, 2010.
- Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB*. 1007-1024, 1999.
- Carr AN, Kranias EG. Thyroid Hormone Regulation of Calcium Cycling Proteins. *Thyroid*, 12: 453 – 457, 2002.
- Carreño JE, Felipe Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE. Cardiac Hypertrophy: Molecular and Cellular Events. *Rev Esp Cardiol.*;59:473-86, 2006.
- Carrillo-Sepulveda MA, Ceravolo GS, Fortes ZB, Barreto-Chaves ML. Thyroid hormone stimulates NO production via activation of the

- PI3K/Akt pathway in vascular myocytes. *Cardiovascular Research* . 85, 560–570, 2010.
- Cha H, Kim JM, Oh JG, Jeong MH, Hajjar RJ, Park WJ. PICOT is a critical regulator of cardiac hypertrophy and cardiomyocyte contractility. *J Mol Cell Cardiol.* 45(6): 796–803, 2008.
 - Charles RL, Burgoyne JR, Eaton P. Mechanisms of Redox Signaling in Cardiovascular Disease. *Studies on Cardiovascular Disorders.* 43-60, 2010.
 - Chauhan BS. Principles of Biochemistry and Biophysics. Laxmi Publications Pvt. 1ed, 829p 2008.
 - Clapham DE, Calcium Signaling. *Cell*, 6: 1047-1058,2007.
 - Clerk A, Cullingford TE, Fuller SJ, Giraldo A, Markou T, Pikkarainen S, Sugden PH.. Signaling pathways mediating cardiac myocyte gene expression in physiological and stress responses.*J Cell Physiol.* 212:311-322, 2007.
 - Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Essential Role for Mitochondrial Thioredoxin Reductase in Hematopoiesis, Heart Development, and Heart Function. *Mol. Cell. Biol.* 24:9414, 2004.
 - Dash R, Vivek EJ, Schmidt AG. Interactions Between Phospholamban and β -Adrenergic Drive May Lead to Cardiomyopathy and Early Mortality, *Circulation*, 103:889 – 896, 2001.
 - Davis, PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone in the heart. *Thyroid* ,12, 6, 2002.
 - Degens H., Gilde A. J., Lindhout M, Willemsen P. H. M., Vander Vusse G. J., Van Bilsen M. Functional and metabolic adaptation of the heart to prolonged thyroid hormone treatment. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: 108–115, 2003

- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*; 82: 47-95, 2002.
- Fernandes M.L. M. P., Ferro E. A. V., Beletti ME, Resende ES. Spironolactone Effects on Myocardium Changes Induced by Thyroid Hormone in Rats. *Arq Bras Cardiol*, 89 : 398-402, 2007.
- Fernandes RO, Dreher GJ, Schenkel PC, Fernandes TRG, Ribeiro MFM, Araujo ASR, A. Belló-Klein Peri Redox status and pro-survival/pro-apoptotic protein expression in the early cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *Cell Biochem Funct*. 29: 617–623, 2011.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil*. 43 : 61 - 68, 1997.
- Ferreira, A. W, Ávila S. L. M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes. 2º ed. Ed. Guanabara Koogan S. A. Rio de Janeiro, 2001.
- Fisher DA, Hoath S, Lakshmanan J. The thyroid hormone effects on growth and development may be mediated by growth factors. *Endocrinol Exp*. 16, 259-71, 1982.
- Fustioni O. Left Ventricular Hypertrophy: An Unseemly Risk Factor for Stroke? *Stroke*. 34:2385-2386, 2003.
- Guyton AC; Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*. 10aed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2011.
- Hafez E, Tousson E. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: Role of ascorbic acid in treatment *Biomed Aging Pathol* ,2014, in press.

- Halliwell, B. & Gutteridge JMC . Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. Oxford, UK. 2 ed, 1985
- Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 35, 1147-1150, 2007.
- Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH. Thioredoxins, Glutaredoxins, and Peroxiredoxins—Molecular Mechanisms and Health Significance: from Cofactors to Antioxidants to Redox Signaling. *Antioxidants & Redox Signaling.* 19, 13, 2013
- Hasenfuss G, Meyer M, Schillinger W, Preuss M, Pieske BH, Calcium handling proteins in the failing human heart. *Basic Res Cardio* 192: 1, 87 – 93.
- Heller R, Münscher-Paulig F, Gräbner R, Till U. Synthesis in Endothelial Cells l-Ascorbic Acid Potentiates Nitric Oxide. *J. Biol. Chem.* 1999, 274:8254-8260.
- Heusch P, Canton M, Aker S, van de Sand A, Konietzka I, Rassaf T, Menazza S, Brodde OE, Di Lisa F, Heusch G, Schulz R. The contribution of reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase to myofilament oxidation and progression of heart failure in rabbits. *Br J Pharmacol.* 2010 Jul;160(6):1408-16.
- Hiroi H, Kim HW, Ying H, Furuya F, Liao JK. Rapid nongenomic actions of thyroid hormone. *PNAS*, 38, 14104–14109, 2006
- Holmgren A., Åslund F. “Glutaredoxin,” *Methods in Enzymology*, vol. 252, pp. 283–292, 1995.
- Hu LW, Benvenuti LA, Liberti EA, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves MLM. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic

- nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285: 1473–1480, 2005.
- Ikeuchi M, Tsutsui H, Shiomi T, Matsusaka H, Matsushima S, Takeshita A. Inhibition of TGF- β signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovascular Research* 64 526 – 535, 2004.
 - Jain M, Brenner DA, Cui L, Chee CL, Bo W, Pimentel DR, Koh S, Sawyer DB, Leopold JA, Handy DE, Loscalzo J, Apstein CS, Liao R. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Modulates Cytosolic Redox Status and Contractile Phenotype in Adult Cardiomyocytes. *Circulation Research*, 93:93, 2003.
 - Jing W, Shi P, Bradford C. Glutaredoxin Mediates Akt and eNOS Activation by Flow in a Glutathione Reductase-Dependent Manner *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.;27:1283-1288, 2007.
 - Joulin O, Marechaux S, Hassoun S, Montaigne S, Lancel S. Cardiac force-frequency relationship and frequency-dependent acceleration of relaxation are impaired in LPS-treated rats *Critical Care* .13:14, 2009.
 - Kahaly GJ , Dillmann WH. Thyroid Hormone Action in the Heart. *Endocrine Reviews* 26,704–728, 2003.
 - Kai Y. Xu, Jay L. Zweier, Becker LC. Hydroxyl Radical Inhibits Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Function by Direct Attack on the ATP Binding Site. *Circulation Research*. 80: 76-81, 1997.
 - Ketzer LA, Arruda AP, Carvalho DP, de Meis L. Cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: heat production and phospholamban alterations

- promoted by cold exposure and thyroid hormone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: 556–563, 2009.
- Klein I, Danzi S. Thyroid Disease and the Heart Circulation. 116:1725-1735
 - Klein I, Ojama, K. N. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Engl J Med*, 344, 7, 2001.
 - Kobori H, Ichihara A, Miyashita Y, Hayashi M, Saruta T. Local renin–angiotensin system contributes to hyperthyroidism-induced cardiac hypertrophy. *J Endocrinol*. 1999 ; 160: 43–47
 - Kohen R, Nyska A. Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants Redox Reactions, and Methods for Their Quantification *Toxicol Pathol*. 30: 620, 2002
 - Kolwicz SC, Tian R. Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research* .90, 194–201, 2011.
 - Koss KL, Grupp IL, Kranias EG. The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. *Basic Res Cardio*. 192, 17 - 24, 1997.
 - Ladenson PW, Kieffer JD, Farwell AP, Ridgway EC. Modulation of myocardial L-triiodothyronine receptors in normal, hypothyroid and hyperthyroid rats. *Metabolism*; 35: 5-12, 1986.
 - Laemmli V. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-85, 1970.
 - Lalli MJ, Yong J, Prasad V, Hashimoto K, Plank D, Babu GJ, Kirkpatrick D, Walsh RA, Sussman M, Yatani A, Marbán E, Periasamy M. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) atpase (SERCA) 1a structurally

- substitutes for SERCA2a in the cardiac sarcoplasmic reticulum and increases cardiac Ca(2+) handling capacity. *Circ Res.* 20;89,2,160-7, 2001.
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Milei S. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. *Tumori* 71, 241-249, 1985
 - Leong, S.F., Clark, J.B. Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem. J.* 1: 131–138, 1984.
 - Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*; 193: 265–75, 1951
 - Marks, AR. Calcium and the heart: a question of life and death. *J Clin Invest*; 5: 597– 600, 2003
 - Massion P.B., Feron O., Dessy C, Balligand JL. Nitric Oxide and Cardiac Function: Ten Years After, and Continuing *Circ Res.*, 93:388-398, 2003.
 - McPherson RA, Pincus MR. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* 22 ed. Philadelphia Saunders Elsevier; 2011
 - Min-Shan Tsai, Chien-Hua Huang, Chia-Ying Tsai, Huei-Wen Chen, Hsin-Chen Lee, Hsiao-Ju Cheng, Chiung-Yuan Hsu, Tzung-Dau Wang, Wei-Tien Chang, Wen-Jone Chen. Ascorbic acid mitigates the myocardial injury after cardiac arrest and electrical shock. *Intensive Care Med* 37:2033–2040, 2011.
 - Miranda M.F.S. Função tireoidiana e estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio em coração isolado de rato. Porto Alegre:

- UFRGS, 1997. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.
- Misra M, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit.* 10:209-219, 2009.
 - Murata H, Nakamura KT, Hajime HI . Glutaredoxin Exerts an Antiapoptotic Effect by Regulating the Redox State of Akt *J. Biol. Chem.* 278:50226-50233, 2003.
 - Neuzil J, Thomas SR, Stocker R. Requirement for, promotion, or inhibition by alpha-tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med.*22,1-2,57-71, 1997.
 - Nicholson CK, Lambert JP, Molkentin JD, Sadoshima J, Calvert JW. Thioredoxin 1 Is Essential for Sodium Sulfide-Mediated Cardioprotection in the Setting of heart failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;33:744-751; 2013.
 - Osman F, Franklyn JA, Holder RL, Sheppard MC, Gammage MD. Cardiovascular manifestations of hyperthyroidism before and after antithyroid therapy: a matched case-control study. *J Am Coll Cardiol.* 49, 71-81, 2007
 - Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev.* 87, 315–424, 2007.
 - Padayatty SJ, Levine M. Vitamin C and myocardial infarction: the heart of the matter. *Am J Clin Nutr* 71:1027–8, 2003.
 - Park JB, Levine M. Purification, cloning and expression of dehydroascorbic acid-reducing activity from human neutrophils : identification as glutaredoxin. *Biochem. J.*315, 931-938, 1996.

- Perez V, D'Annunzio V, Labonia C, Rey Deutsch AC, Gelpi RJ. Thioredoxin-1 Reduces Infarct Size But Does Not Improve Postischemic Ventricular Dysfunction. *Rev Argent Cardiol.*81:202-207, 2013.
- Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovascular Research* 77, 265–273, 2008
- Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Meth*; 38: 161-70, 1980.
- Portman MA. Thyroid Hormone Regulation of Heart Metabolism Nongenomic Actions of Thyroid Hormone on the Heart. *Thyroid.* 18, 2, 2008.
- Reisman SA, Yeager RL, Yamamoto M, Klaassen CD. Increased Nrf2 Activation in Livers from Keap1-Knockdown Mice Increases Expression of Cytoprotective Genes that Detoxify Electrophiles more than those that Detoxify Reactive Oxygen Species. *Toxicological sciences.* 108, 35–47, 2009.
- Riegel, RE. *Bioquímica*. Editora: Unisinos, 2012
- Robbins, S. L.; Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. *Patologia: Bases Patológicas das doenças*. 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- Sadochima J, Ago T. Thioredoxin and ventricular remodeling. *Journal of molecular and cellular cardiology.*41, 762-773, 2006.
- Schenkel PC, Tavares AMV, Fernandes RO, Diniz GP, Ludke ARL, Ribeiro MFM, Araujo ASR, Barreto-Chaves ML, Bello-Klein A. Time

course of hydrogen peroxide–thioredoxin balance and its influence on the intracellular signalling in myocardial infarction. *Exp Physiol* 97.6 ,741–749 741, 2012.



- Schröder, M. Endoplasmic reticulum stress responses *Cellular and molecular life sciences*. 65 862 -894, 2008
- Scoote M, Williams AJ. The cardiac ryanodine receptor (calcium release channel): Emerging role in heart failure and arrhythmia pathogenesis. *Cardiovascular Research* 56, 359–372, 2002.
- Seddon M, Looi YH, Shah AM. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* ;93:903–907, 2007.
- Sheue-Yann C, Leonard JL, Davis PJ. Molecular Aspects of Thyroid Hormone Actions. *Endocrine Reviews*, 31, 139–170, 2010.
- Sies H. Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experitnental Physiologv*. 82, 291- 295, 1997.
- Silva JE, Bianco SDC. Thyroid–Adrenergic Interactions: Physiological and Clinical Implications *Thyroid* 18, 2, 2008
- Smith, C ; Marks, AD.; Lieberman, M. *Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica*. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- Stark JM. Inadequate reducing systems in pre-eclampsia: a complementary role for vitamins C and E with thioredoxin-related activities. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*. 108, 339±343, 2001.
- Stephen C. Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research* 90, 194–201, 2011.

- Suleiman WB, Cui X, Beauchamp MJ , Park EA. Thyroid Hormone Induces b1-Adrenergic Receptor Gene Transcription Through a Direct Repeat Separated by Five Nucleotides. *J Mol Cell Cardiol* 29, 3223–3237 ,1997.
- Tsutsui H. Oxidative stress in heart failure: the role of mitochondria. *Intern Med*; 40: 1177-82, 2001.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M & Telser J Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology* 39: 44-84, 2007.
- Vardi M, Levy NS, Levy AP. Vitamin E in the Prevention of Cardiovascular Disease- the Importance of Proper Patient Selection. *J Lipid Res.* 54, 2307-14, 2013.
- Venditti, P. Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. *J Endocrinol.* 155: 151-157; 2000.ff
- Viguerie N, Langin D. Effect of thyroid hormone on gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 6:377–81, 2003.
- Wagner S, Rokita AG, Anderson ME, Maier LS. Redox Regulation of Sodium and Calcium Handling. *Antioxidants & redox signaling.*18, 9, 2013
- Wang J, Pan S, Berk BC. Glutaredoxin Mediates Akt and eNOS Activation by Flow in a Glutathione Reductase-Dependent Manner *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:1283-1288, 2007.

- Wells WW, Xu D P, Yang Y F, Rocque PA. Dehydroascorbate reductase activity. and protein disulfide isomerase have Mammalian thioltransferase (glutaredoxin). *J. Biol. Chem.*, 265:15361-15364, 1990.
- Yamamoto M, Yang G, Hong C, Liu J, Holle E, Yu X, Sadoshima J. Inhibition of endogenous thioredoxin in the heart increases oxidative stress and cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 112:1395–1406, 2003.
- Yang DW, Cha H, Kim E, Kang M, Ji Myoung .Cardiomyocyte Contractility PICOT Inhibits Cardiac Hypertrophy and Enhances Ventricular Function and *Circ Res.* 99:307-314, 2006.
- Yen PM. *Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action* 81, 2001
- Yeung H. M., Hung M. W. , Fung M. L. Melatonin ameliorates calcium homeostasis in myocardial and ischemia–reperfusion injury in chronically hypoxic rats *J. Pineal Res.* 45:373–382, 2008.
- Xu KY, Zweier JL, Becker LC. Hydroxyl Radical Inhibits Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Function by Direct Attack on the ATP Binding Site. *Circulation Research.* 80: 76-81, 1997.
- Zimmer HG, Irlbeck M, Kolbeck-Rtihmkorff C . Response of the rat heart to catecholamines and thyroid hormones. *Molecular and Cellular Biochemistry* 147: 105- 114, 1995.

ANEXOS

Carta de aprovação do comitê de ética no uso de animais:

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRÓ-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

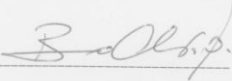
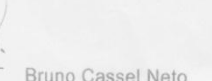
Número: 21616
Título: INFLUÊNCIA DO ESTADO REDOX NA MODULAÇÃO DE PROTEÍNAS DO MANEJO DO CÁLCIO E NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA PELO HIPERTIREOIDISMO

Pesquisadores:
Equipe UFRGS:

ALEX SANDER DA ROSA ARAUJO - coordenador desde 02/01/2012
ADRIANE BELLO KLEIN - pesquisador desde 02/01/2012
TANIA REGINA GATTELLI FERNANDES - Técnico de Laboratório desde 02/01/2012
Amanda de Avila Bicca Martins - Aluno de Mestrado desde 02/01/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 24/10/2011 - Sala de Reuniões do 2º andar no Prédio da Reitoria, Campus Central., em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 60 ratos machos Wistar, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 3 de Abril de 2012

 FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO Coordenador da comissão de ética	 Bruno Cassel Neto Vice-Pró-Reitor de Pesquisa PROPESQ/UFRGS
--	--

1