

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA

Viviane Cristina Pederiva

**IMPACTO DA HOMEOSTASE REDOX SOBRE O EFEITO VASOATIVO DOS
HORMÔNIOS DA TIREOIDE**

Porto Alegre
2022

Viviane Cristina Pederiva

**IMPACTO DA HOMEOSTASE REDOX SOBRE O EFEITO VASOATIVO DOS
HORMÔNIOS DA TIREOIDE**

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

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo
Coorientador: Dr. Patrick Turck

Porto Alegre
2022

CARTA DE APROVAÇÃO



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: 38964

Título: Impacto da homeostase redox sobre o efeito vasoativo dos hormônios da tireoide

Vigência: 07/07/2020 à 07/12/2023

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ALEX SANDER DA ROSA ARAUJO - coordenador desde 07/07/2020

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 08/06/2020 - Reunião por ambiente virtual - Plataforma UFRGS - Mconf, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 180 ratos machos Wistar com 45 dias de idade, provenientes do CREAL/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Segunda-Feira, 15 de Junho de 2020

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA

“Existem mais pessoas que desistem, do que pessoas que fracassam” – Henry Ford

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar em uma alma humana, seja apenas outra alma humana” – Carl Jung

“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você” – Carl Sagan

DEDICATÓRIA

Quero dedicar esse trabalho a todos os pesquisadores que se empenham para buscar conhecimentos maiores sobre os hormônios da tireoide e sua função, principalmente, frente ao endotélio vascular, como a vasodilatação.

Dedico esse trabalho também, à todas as pessoas que se beneficiarão com esses resultados. Aos pacientes, acometidos por patologias diversas, que possam estar desesperançosos, persistam e mantenham-se firmes em seus tratamentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus, pois nada disso seria feito sem que Ele assim o quisesse.

Agradeço aos meus pais, que sempre me apoiaram e ajudaram a me manter firme nesse caminho cheio de incertezas e inseguranças. Pelo esforço que fizeram para que essa etapa na minha vida fosse concluída com sucesso.

Ao meu namorado, que me apoiou e incentivou ao longo dessa trajetória, principalmente nos momentos que foram mais decisivos, sendo compreensivo em todos os momentos.

Aos demais familiares e amigos, que estiveram de uma forma ou outra, apoiando e incentivando nos momentos difíceis.

Ao orientador Professor Dr. Alex Sander da Rosa Araujo, pela forma acolhedora com que trabalhou comigo.

Ao meu coorientador Dr. Patrick Turck, pelo tempo dedicado a me ajudar nesse trabalho, e pelo conhecimento compartilhado.

Aos demais professores, pesquisadores e colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular do ICBS, que sempre estiveram de uma forma ou outra se disponibilizando para auxiliar em qualquer ponto necessário.

À agência de fomento, Cnpq, pelo auxílio financeiro que possibilitou essa pesquisa.

À UFRGS, pelos seus laboratórios, e todos funcionários, desde o mais simples até os mais altos cargos, que possibilitam que todos os profissionais possam trabalhar de maneira eficaz e tranquila.

RESUMO

O aumento do número de diagnósticos de doenças cardiovasculares e a preocupação com o prognóstico dos pacientes acometidos por tais patologias vem preocupando a sociedade já algum tempo. Com isso, pesquisas vêm sendo feitas a fim de buscar novos conhecimentos sobre tratamentos possíveis. Uma dessas áreas sob análise envolve os efeitos vasodilatadores dos hormônios tireoidianos. Nesse estudo, objetivamos analisar os efeitos vasodilatadores da triiodotironina (T3) em aortas de ratos Wistar machos com 45 dias de idade. Analisamos a reatividade vascular em grupos com e sem endotélio, na presença de éster metil-N-nitro L-arginina (L-NAME), que é um inibidor da óxido nítrico sintase (NOS). Nesse contexto, verificamos a participação da modulação da homeostase redox, por meio da atividade das enzimas NADPH oxidase, superóxido dismutase (SOD) e catalase, assim como da mensuração dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) e do grupo sulfidrilas (SH). Nos protocolos realizados para a análise da reatividade vascular, tanto na presença de endotélio, com a administração de L-NAME, quanto na sua ausência, encontramos o efeito vasodilatador de T3 nas maiores doses administradas. Nos protocolos que envolveram as análises bioquímicas, observamos diminuição da atividade da enzima NADPH oxidase e o aumento da atividade da enzima SOD na presença de T3. Os dados sugerem que o T3 possui ação vasodilatadora independente de endotélio, mas dose-dependente; ademais, esse efeito sobre o vaso pode envolver uma preservação da homeostase redox.

ABSTRACT

The increase in the number of diagnoses of cardiovascular diseases and the concern about the prognosis of patients affected by such pathologies has been worrying society for some time. As a result, further research was carried out in order to gain new knowledge about possible treatments. One of the areas of research involves the vasodilatation effect of the thyroid hormones. In this study, we aimed to explore the effects of T3 in aortas of 45-day-old male Wistar rats. We analyzed vascular reactivity in groups with endothelium and without endothelium, in the presence of the methyl-N-nitro L-arginine ester (L-NAME), which is a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor. We evaluated the oxidative stress through, NADPH oxidase, superoxide dismutase (SOD), and catalase activity and reactive oxygen species (ROS) levels, as well as the concentration of the sulfhydryl group (SH). In the vascular reactivity protocol, both with and without endothelium, with the L-NAME administration, T3 administration led to vasodilation. Oxidative stress-induced *in vitro* experiments, revealed reduced NADPH oxidase, and increased SOD activities in the presence of T3. We conclude that T3 vasodilatation effect is endothelium-independent and dose-dependent and may be associated with redox homeostasis modulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos causados pelo T3;

Figura 2: Reações químicas que geram as espécies reativas de O₂;

Figura 3: Redução de O₂ até se transformar em H₂O, com formação de diversas espécies reativas;

Figura 4: Mecanismo de ação antioxidante enzimático;

Figura 5: Ação antioxidante do T3;

Figura 6: Ação vasorrelaxante do T3 na presença de endotélio;

Figura 7: Incubação prévia com T3 em vasos com endotélio;

Figura 8: Pré-incubação com L-NAME em aortas com endotélio;

Figura 9: Ação vasorrelaxante do T3 em aortas sem endotélio;

Figura 10: Pré-incubação com T3 no grupo sem endotélio;

Figura 11: Atividade d NADPH oxidase em grupos sem indução de estresse e com indução de estresse;

Figura 12: Níveis de espécies reativas de oxigênio totais;

Figura 13: Peroxidação lipídica nos grupos sem indução de estresse e com indução de estresse;

Figura 14: Atividade da superóxido dismutase no grupo sem indução de estresse oxidativo, e no grupo com indução de estresse oxidativo;

Figura 15: Atividade da catalase nos grupos com e sem indução de estresse;

Figura 16: Concentração de sulfidrilas nos grupos sem e com indução de estresse oxidativo;

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Defesas antioxidantes enzimáticas, suas ações e local de ação;

LISTA DE SIGLAS

ATP – trifosfato de adenosina

DCFH-DA – diacetato de 2,3-diclorofluoresceína

DIT – di-iodotirosina

EROS – espécie reativa de oxigênio

GMPc – monofosfato de guanosina cíclica

GPx – glutatona peroxidase

L-NAME – éster metil-N-nitro L-arginina

MIT – moniodotirosina

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintase

NOS_e – óxido nítrico sintase endotelial

NOS_n – óxido nítrico sintase neuronal

NOS_i – óxido nítrico sintase induzível

QL – quimiluminescência

SOD – superóxido dismutase

T3 – triiodotironina

T4 – tiroxina

TBOOH – hidróxido de terc-butila

TGB – globulina ligadora de tiroxina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 GLÂNDULA TIREOIDE	14
1.1.1 T3 E T4.....	14
1.1.2 EFEITOS NOS DIFERENTES SISTEMAS DO CORPO HUMANO	15
1.2 SISTEMA CARDIOVASCULAR	17
1.2.1 ENDOTÉLIO VASCULAR	17
1.3 RADICAIS LIVRES.....	18
1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	19
1.5 ANTIOXIDANTES	20
1.6 ESTRESSE OXIDATIVO.....	22
2. HIPÓTESE	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 ANIMAIS.....	24
4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	25
4.3 EUTANÁSIA	25
4.4 DESENHOS EXPERIMENTAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	25
4.5 PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA REATIVIDADE VASCULAR.....	28
4.6 REATIVIDADE VASCULAR	29
4.7 PREPARAÇÃO DA T3	29
4.8 PREPARAÇÃO DE TECIDO PARA ANÁLISE REDOX <i>IN VITRO</i>	30
4.9 INDUÇÃO DE ESTRESSE.....	30
4.10 ATIVIDADE DE NADPH OXIDASE.....	31
4.11 EROS TOTAL.....	31
4.12 OXIDAÇÃO LIPÍDICA	31
4.13 ATIVIDADES DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES	31
4.14 SULFIDRILAS (SH).....	32
4.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5. RESULTADOS	32
5.1 RESULTADOS DE REATIVIDADE VASCULAR	32
5.1.1 REATIVIDADE VASCULAR NA PRESENÇA DE ENDOTÉLIO	32
5.1.2 REATIVIDADE VASCULAR COM PRÉ-INCUBAÇÃO DE T3 EM AORTAS COM ENDOTÉLIO	33
5.1.3 REATIVIDADE VASCULAR COM PRÉ-INCUBAÇÃO DE L-NAME.....	33
5.1.4 REATIVIDADE VASCULAR NA AUSÊNCIA DE ENDOTÉLIO	34
5.1.5 REATIVIDADE VASCULAR COM PRÉ-INCUBAÇÃO DE T3 EM AORTAS SEM ENDOTÉLIO	34

5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	35
5.2.1 NADPH OXIDASE	35
5.2.2 EROS TOTAL.....	36
5.2.3 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	36
5.2.4 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	37
5.2.5 CATALASE	37
5.2.6 GRUPO SULFIDRILAS (SH).....	38
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	43
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glândula Tireoide

A glândula da tireoide possui um formato de borboleta, e se localiza na região anterior ao pescoço, logo abaixo da laringe. Cada lobo possui cerca de 4 cm de diâmetro. É responsável pela síntese e secreção dos hormônios triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), que são abordados nesse trabalho, e também pela calcitonina (SILVERTHORN, 2017; GUYTON & HALL, 2015; AIRES, 2015; RUBIN, 2010).

A síntese dos hormônios da tireoide se dá por meio das células foliculares presentes na glândula da tireoide. Primeiramente, tem-se a conversão de iodeto para a forma oxidada de iodo (GUYTON & HALL, 2015). As células foliculares sintetizam inicialmente a tireoglobulina, que é encaminhada para o coloide, onde, somente nele haverá a iodação dos resíduos de tirosina da tireoglobulina. A tireoglobulina ligada a um átomo de iodo forma o MIT (monoiodotirosina), já a ligação da tireoglobulina com dois átomos de iodo formam o DIT (di-iodotirosina). É com a ligação de MIT e DIT que ocorre a síntese dos hormônios da tireoide propriamente ditos (a ligação de um MIT mais um DIT forma o T3; já a ligação de dois DITs forma o T4). (SILVERTHORN, 2017; GUYTON & HALL, 2015; RUBIN, 2010).

1.1.1 T3 e T4

A tireoide está encarregada de sintetizar e secretar os hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), sendo que o T3 é a forma mais ativa, e por isso, responsável pelos efeitos fisiológicos no organismo, mesmo que este se encontre em menores quantidades (SILVA, et. al. 2018). Já o T4, é considerada um pró-hormônio, uma vez que se apresenta menos ativo, assim como sua deiodinação promove a formação de T3 (SILVERTHORN, 2017; RUBIN, 2010).

Há um tempo atrás, pensava-se que os hormônios da tireoide se difundiam para fora da célula folicular, mas já se tem conhecimento da existência do transportador monocarboxilato que participa dessa atividade (AIRES, 2015).

Esses hormônios possuem maior dificuldade para passar livremente pela corrente sanguínea, sendo necessário, em uma grande porcentagem, a ligação com

um transportador, como a globulina ligadora da tiroxina (TGB) (SILVERTHORN, 2017). Entretanto, conseguem atravessar a membrana da célula-alvo facilmente, entrando em contato com receptores intracelulares que se encontram no núcleo da célula, podendo estar associados com o DNA diretamente. Porém, essa passagem é saturável e gasta energia, com isso esses hormônios podem ainda se ligar a receptores de membrana celular (AIRES, 2015) ou ainda podem modular vias intracelulares por meio da ligação com proteínas específicas (GUYTON & HALL, 2015; RUBIN, 2010).

Pelo fato de existir, circulando pela corrente sanguínea, maior quantidade de T4, é importante reconhecermos que a maior produção de T3 se dá na própria célula-alvo por meio da conversão, através de deiodinases (especialmente tipo I e tipo II), enzimas conversoras específicas, que podem converter T4 em T3 ou em T3-reverso (SILVA et al. 2018; SAMUEL et al. 2017; SILVERTHORN, 2017).

1.1.2 Efeitos nos Diferentes Sistemas do Corpo Humano

Há em praticamente todos os tipos celulares proteínas receptoras para o T3. Isso significa dizer que, T3 possui ação em diferentes regiões do organismo (SILVERTHORN, 2017), podendo interferir tanto positivamente quanto negativamente, quando em altas concentrações, principalmente, no músculo cardíaco e na vasculatura. Há receptores dos hormônios da tireoide nas células endoteliais (SAMUEL et al. 2017). Neste contexto, T3 pode estimular a vasodilatação e provocar redução da resistência vascular total, a fim de compensar a demanda maior do metabolismo provocada pelo aumento da taxa metabólica basal ocasionado pelo próprio hormônio (SILVA et al. 2018; GONÇALVES et al. 2006; EPSTEIN et al. 1994).

Entre alguns outros efeitos que o T3 pode ocasionar no organismo, encontramos o aumento da frequência cardíaca e aumento do fluxo sanguíneo. Fora do sistema cardiovascular, ele pode gerar aumento da frequência respiratória, aumento da atividade metabólica celular, aumento do número e da atividade das mitocôndrias, estímulo do metabolismo dos carboidratos e lipídeos, efeito termogênico, entre outros, como mostrado na figura 1, logo abaixo (GUYTON & HALL, 2015; RUBIN, 2010).

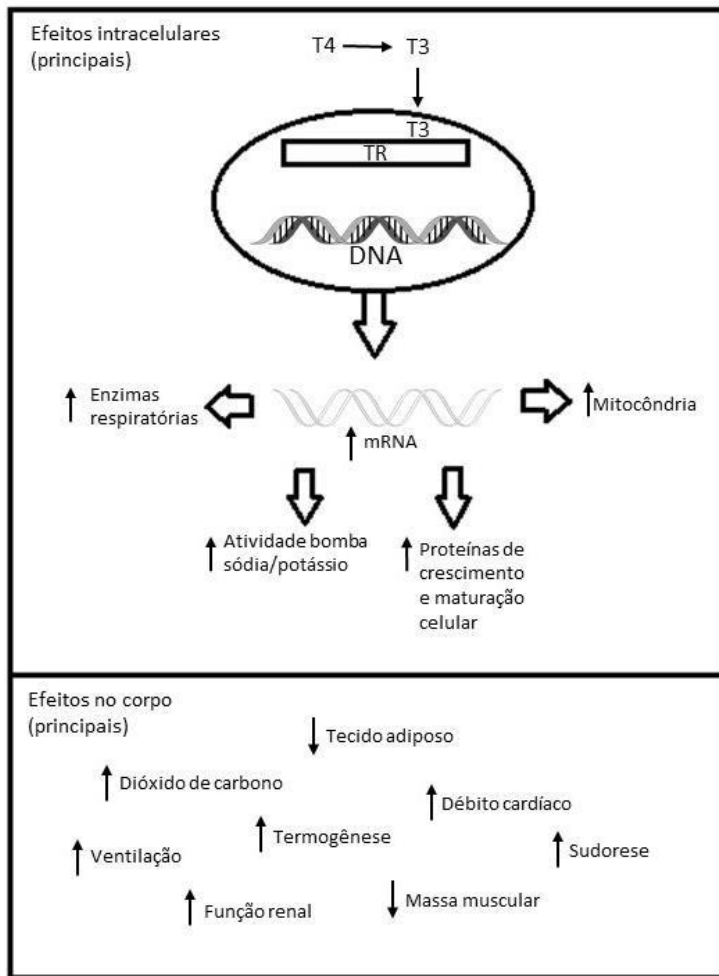


Figura 1: Efeitos causados pelo T3. Adaptado de BERNE & LEVY, 2018

*As setas para cima indicam aumento dos componentes ou efeitos indicados, já as setas para baixo indicam diminuição dos componentes ou efeitos indicados.

No estudo de Ojamma et al. 1996, o T3 foi descrito apresentando uma importante função vasodilatadora. Além disso, o receptor nuclear dos hormônios da tireoide alfa ($TR\alpha$) parece ser essencial para o controle do tônus vascular, particularmente do relaxamento mediado por T3 (LIU et al. 2014). Já é sabido que as ações mais comuns de T3 se dão através de ativação genômica, levando a ativação ou inibição da transcrição de genes (NUNES et al. 2003). Com novos dados na literatura relatando que além de respostas genômicas o T3 também desenvolve respostas rápidas envolvendo sinalização de receptor de membrana, já existem algumas vias de atuação conhecidas, sendo dois exemplos a via PKG/VASP (via proteína quinase-G/fosfoproteína estimulada por vasodilatador) (SAMUEL et al. 2017) e a via PI3K/Akt (via fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase-B) (CARRILLO-SEPÚLVEDA et. al. 2010). Essas vias medeiam o efeito direto de T3, ativando a eNOS

e conseqüentemente a ação vasodilatadora rápida nas células da musculatura lisa vascular e nas células endoteliais (SAMUEL et al. 2017; NING et al. 2013; HIROI et al. 2006).

Embora o hormônio tireoidiano promova o relaxamento vascular e reduza a contração da musculatura lisa do vaso em virtude da produção de óxido nítrico (NO) nas células do músculo liso vascular, níveis elevados dos hormônios, assim como sua ação em ambientes celulares previamente oxidados, podem amplificar o efeito de vasoconstrição (HU et al. 2014).

1.2 Sistema Cardiovascular

O sistema cardiovascular é composto pelo coração, que funciona como bomba para manter o sangue circulando, e pelos vasos sanguíneos, compostos pelas artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias. Esses vasos são formados por algumas camadas de tecidos específicos. Como exemplo, as artérias possuem uma camada muito mais grossa de músculo liso e tecido elástico, já que elas precisam suportar pressões maiores de sangue. Um importante componente que está presente nos vasos é o endotélio vascular (SILVERTHORN, 2017; GUYTON & HALL, 2015).

1.2.1 Endotélio Vascular

O endotélio vascular, por muito tempo, foi entendido como sendo apenas uma fina camada de células que compunha os vasos sanguíneos. Contudo, foi observado que as células endoteliais possuem funções como a síntese e secreção de muitas substâncias bioativas que participam de diversas reações locais nos vasos sanguíneos. (TEIXEIRA et al. 2014). Essas substâncias desempenham papéis na vasodilatação (por exemplo o NO e algumas prostaglandinas) e vasoconstrição (tal como a endotelina). O principal vasodilatador produzido pelo próprio endotélio vascular é o NO (AIRES, 2015; RUBIN, 2010; GOTTSCHALL, 2005).

A clivagem do aminoácido L-arginina para L-citrulina gera o NO, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual se apresenta em três isoformas diferentes, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (GOTTSCHALL, 2005).

O NO possui um relevante papel na manutenção de um endotélio saudável e intacto. Trabalha como um mensageiro local, que transmite sinais do endotélio para as demais células lisas da região. Por exemplo, para modular o tônus vascular, gerando vasodilatação, e participar da proliferação das células da musculatura lisa vascular, ele aumenta a formação de GMPc (monofosfato cíclico de guanosina), o que posteriormente ocasiona a ativação da proteína cinase dependente de GMPc (AIRES, 2015; RUBIN, 2010). Porém, quando sua síntese é afetada, ocorrendo um desequilíbrio entre suas concentrações, que gera estresse oxidativo através dos radicais livres presentes, que intensifica o dano endotelial (NEVES et al. 2016; TEIXEIRA et al. 2014; GOTTSCHALL, 2005).

1.3 Radicais Livres

Sabe-se que os radicais livres estão ligados diretamente ao desenvolvimento de algumas doenças, como por exemplo as de origem vascular e neurológica (HALLIWELL et al. 2004).

Os radicais livres podem ser formados a partir de reações de oxido-redução no próprio metabolismo aeróbio. Eles são espécies químicas reativas com elétrons não pareados na última camada de valência ou no orbital mais externo, situação que os mantém mais instáveis (FERREIRA et al. 1997). Produzidos em locais como na mitocôndria, em elevadas concentrações, tornam-se tóxicas, às células (BARBOSA et al. 2010; RUBIN, 2010).

Nem todas as espécies reativas que causam danos ao organismo são radicais livres. Então é errôneo dizer que apenas radicais livres geram danos celulares. Existem, dessa forma, outras espécies não radicalares que podem derivar do oxigênio e apresentar considerável reatividade com outras biomoléculas. Portanto, no sentido de agrupar essas estruturas químicas radicais e não-radicais, criou-se a denominação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (FERREIRA et al. 1997).

Na figura 2, mostrada a seguir, observa-se as espécies reativas mais comumente geradas no organismo:

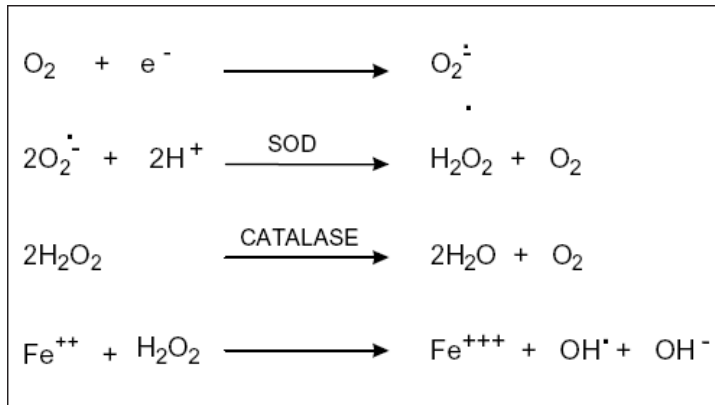


Figura 2: Reações químicas que geram as espécies reativas de O₂ (BAST, 1991)

1.4 Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são produtos que se formam no decorrer do processo de redução das moléculas de O₂. O O₂ é reduzido para formar moléculas de água (H₂O), como demonstrado na figura abaixo. Esses produtos intermediários possuem potencial de reação a outras moléculas, em especial proteínas e lipídeos (RADI, 2018), e produção de danos nas células de diversos tecidos (FERREIRA et al. 2019; FERREIRA et al. 1997). A figura 3 abaixo, mostra o processo de redução do oxigênio e a conseqüente formação de espécies reativas.

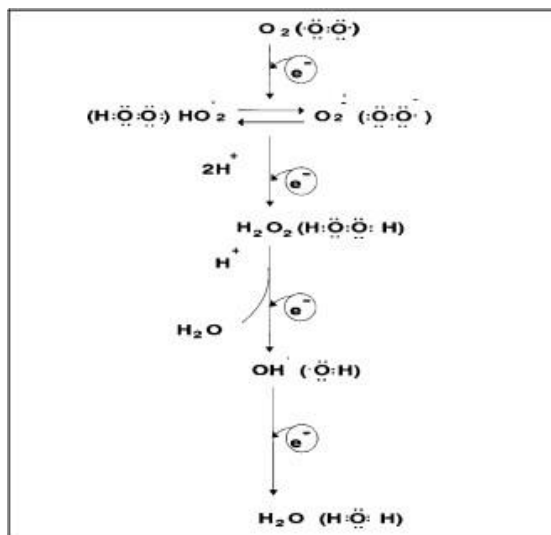


Figura 3: Redução de O₂ até se transformar em H₂O, com formação de diversas espécies reativas (FERREIRA et al. 1997)

Assim como a mitocôndria é responsável pela formação de radicais livres, ela também está envolvida com a produção de espécies reativas de oxigênio. Muitas enzimas estão ligadas com a produção de EROS, sendo bastante proeminente o papel da NADPH oxidase com ação pró-oxidante (KOCHMAN et al. 2021; QADDUMI et al. 2021; ORTIZ et al. 2015; KONIOR et al. 2014; RABELO et al. 2010). Um exemplo de espécie reativa que possui alto potencial, mas não é considerado um radical livre é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARBOSA et al. 2010). Outras espécies possuem alta reatividade, como é o caso do radical hidroxila ($OH\bullet$), que rapidamente reage com metais, oxidando-os e lesando, assim, as células (FERREIRA et al. 1997). Rabi 2018, descreveu que quantidades exageradas de O_2^- (radical superóxido) e H_2O_2 geram reações de oxidação na mitocôndria, induzindo à apoptose celular. A própria glândula da tireoide utiliza de EROS para sintetizar seus hormônios, sendo necessário haver um controle para as espécies reativas que mesmo produzidas não serão utilizadas para esse fim, e não devem ficar acumuladas no organismo (KOCHMAN et al. 2021).

1.5 Antioxidantes

Para controlar os níveis de espécies reativas no organismo, existem substâncias que mesmo em pequenas concentrações conseguem atrasar ou impedir que a oxidação dos substratos seja feita. Essas substâncias recebem o nome de antioxidantes (BARBOSA et al. 2010; BIANCHI et al. 1999). Os antioxidantes são responsáveis por romper as ligações das EROS, evitando que as células fiquem sujeitas a demasiada exposição a essas moléculas (KOCHMAN et al. 2021).

Na figura 4, abaixo, vemos os principais mecanismos de ação de enzimas antioxidantes no organismo, após a formação de moléculas oxidantes.

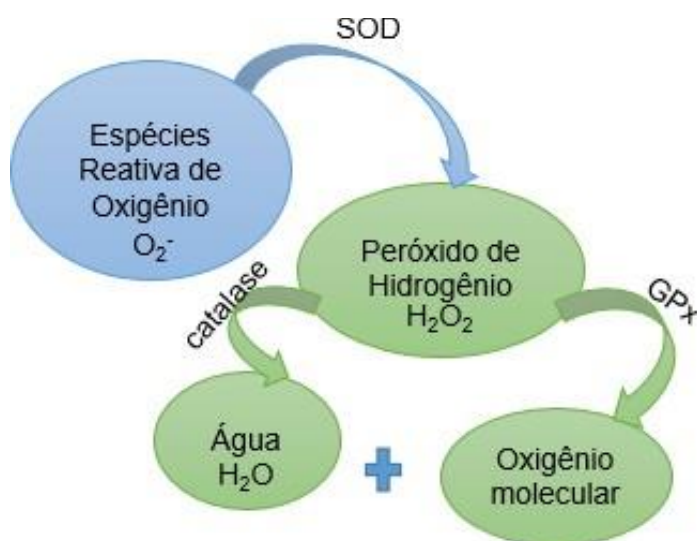


Figura 4: Mecanismos de ação dos antioxidantes enzimáticos. Adaptado de Sandi et al. 2010.

A tabela 1, colocada abaixo, mostra algumas substâncias que se encontram na defesa antioxidante do organismo.

Enzima	Ação biológica	Local de predomínio
Superóxido dismutase	Catalisa a dismutação do O_2^- para H_2O_2 , que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas	Abundante em células aeróbicas
Catalase	Catalisa a formação de água e oxigênio a partir de H_2O_2	Eritrócitos e baço, rim de mamíferos e fígado
Glutationa peroxidase	Catalisa a redução de H_2O_2 e peróxidos orgânicos ao álcool correspondente ao custo de conversão da forma de glutathione reduzida, em glutathione oxidada	Citosol
Glutationa redutase	Mantém o sistema de proteção das células incorrupta, reduzindo glutathione oxidada para glutathione reduzida	Fígado e Linfonodos

Tabela 1: Defesas antioxidantes enzimáticas, suas ações e local de ação (adaptado de OLIVEIRA E SCHOFFEN, 2010)

Os antioxidantes são classificados em enzimáticos e não-enzimáticos. Como o próprio nome diz, os enzimáticos são formados por enzimas que agem prevenindo ou controlando o aumento das concentrações de espécies reativas, sendo as mais comuns a superóxido dismutase (SOD) que possui maior ação neutralizando o O_2^- , a catalase que atua neutralizando o H_2O_2 e a glutathione peroxidase (GPx) que também atua na eliminação do H_2O_2 (KUCHMAN et al. 2021; BARBOSA et al. 2010; FERREIRA et al. 1997).

O grupo dos antioxidantes não-enzimáticos é aquele formado a partir de moléculas que podem ser obtidas por meio da dieta, na qual encontramos as vitaminas, tais como vitamina C, vitamina E, vitamina A, β -caroteno, minerais, como o zinco, e produtos fenólicos como os flavonóides (BARBOSA et al. 2010). A estrutura química pode definir o local de ação desses antioxidantes. A vitamina E, desse modo, promove sua ação nas membranas celulares, dado seu caráter lipossolúvel (FERREIRA et al. 1997). Ao passo que, a vitamina C, por ser hidrofílica, pode ter seus efeitos antioxidantes em meio aquoso (BARBOSA et al. 2010).

1.6 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido, como sendo uma desproporção nos níveis de produção de espécies reativas e de antioxidantes (HALLIWELL et al. 2004).

Esse quadro de estresse oxidativo gera uma falha no estado redox da célula, o que, diretamente, acaba desencadeando alterações no DNA, principalmente, interferindo na função da mitocôndria, que como visto anteriormente, tem papel importante na produção de radicais livres (YU et al. 2016; FORINI et al. 2015; GUSTAFSSON et al. 2008).

Doenças cardiovasculares estão associadas aos altos níveis de estresse oxidativo (DAIBER et al. 2021). Nesse sentido, o controle do dano oxidativo pode ser uma ação terapêutica importante. Dados na literatura demonstram o papel do estresse oxidativo no estabelecimento das doenças cardiovasculares, tais como a hipertensão arterial, aterosclerose, doenças pulmonares, em que é possível encontrar suas interações lesivas com o DNA da célula (AKHIGBE et al. 2021; RADI, 2018; PEREZ et al. 2019; NAKABEPPU et al. 2019; LIU et al. 2018; ZHANG et al. 2016; YU et al. 2016; BIANCHI et al. 1999).

Existem duas vias pelas quais o estresse oxidativo acaba influenciando em patologias, sendo a primeira a produção de espécies reativas que acabam oxidando as macromoléculas, levando à apoptose, e a segunda, que é sinalização redox anormal, o que implica na desestabilização da homeostase entre as moléculas produzidas (FORMAN et al. 2021). As doenças da tireoide, como certos distúrbios e câncer, podendo elas serem a causa ou a consequência do aumento de EROS e surgimento de danos oxidativos (RUCHMAN et al. 2021).

Cabe ressaltar que o T3 possui ação antioxidante, agindo diretamente na mitocôndria, protegendo essa organela, o que é importante para a homeostase redox e para o controle dos danos que possam ser causados pelo estresse oxidativo (FORINI et. al. 2019). O estudo de Frascarelli et al. 2011, descreve a eficácia do T3 como cardioprotetor, uma vez que parece modular a transição da permeabilidade mitocondrial mediada por uma via dependente da proteína quinase C. Em outro estudo, Castro et al. 2018, descreveu possíveis efeitos anti-inflamatórios da administração de T3 e T4 em relação ao dano cardíaco gerado em situações como no infarto.

Em suma, a busca terapêutica visando reestabelecer a homeostase redox é promissora, para que novas formas de tratamento sejam encontradas, a fim de ampliar os conhecimentos e melhorar o prognóstico dos pacientes acometidos por doenças, especialmente cardiovasculares.

2. HIPÓTESE

Uma vez que esse tema é de grande importância, com o aumento dos casos de doenças cardiovasculares, a busca por novas linhas de tratamento vêm sendo pesquisadas. Visando melhorar o prognóstico dos pacientes e entender novos possíveis tratamentos, nossas hipóteses são as seguintes:

H1= Os hormônios da tireoide possuem ação vasodilatadora sobre a artéria aorta mediada pela modulação do estresse oxidativo.

H0= Os hormônios da tireoide possuem ação vasodilatadora sobre a artéria aorta não mediada pela modulação do estresse oxidativo.

3. OBJETIVOS

Analisar se os mecanismos oxidativos, estimulados pelas espécies reativas, estão envolvidos no efeito vasodilatador dos hormônios da tireoide sobre sistema arterial.

3.1 Objetivos Específicos

As análises serão realizadas nos tecidos arteriais, a fim de:

- Avaliar a reatividade vascular após incubação com T3 em diferentes doses;
- Avaliar a reatividade vascular após pré-incubação com L-NAME;
- Analisar o estresse oxidativo (NADPH oxidase, espécies reativas totais, peroxidação lipídica);
- Determinar as defesas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, sulfidrilas).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados, ao todo, 60 ratos machos Wistar cuja idade foi de 45 dias provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL). O transporte dos roedores, do CREAL ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), foi realizado por veículo especializado (modelo utilitário) de responsabilidade do próprio CREAL, em caixas de polipropileno, descrita logo abaixo (com 4 animais por caixa). Os animais foram alocados no Biotério Setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS - UFRGS), e mantidos em caixas de dimensões de 410 mm x 340 mm x 160* mm com o assoalho recoberto com serragem (*a altura desta gaiola não atende a RN 15 do CONCEA para o alojamento de ratos, porém o biotério setorial do Departamento de Farmacologia do ICBS utiliza grades para as gaiolas que asseguram altura mínima de 17,8 cm). A área interna de cada gaiola é de 111,0 cm², assegurando uma área de

187,05 cm² por animal o que, desta forma, permite comportar, no máximo, quatro ratos (peso: 200 – 300g) por caixa. Todos os animais foram mantidos sob condição padrão de biotério: ambiente com temperatura controlada (21°C), ciclo claro-escuro de 12 horas e umidade relativa do ar de 70%. Água e ração comercial foram oferecidas “ad libitum”. Os animais foram também aclimatados por um período de sete dias antes do início do protocolo experimental.

4.2 Considerações Éticas

Este projeto foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os procedimentos desse estudo estão de acordo com o Código Estadual de Proteção aos Animais/ Rio Grande do Sul – Lei 11915/2003 e as Diretrizes do CONCEA 05/2013 e as Diretrizes da Prática da Eutanásia CONCEA 2013, que estabelecem normas para a Prática Didático-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).

4.3 Eutanásia

Inicialmente, os animais foram anestesiados com quetamina (90mg/kg, i.p. e volume de 0,45 mL para um rato de 250g) e xilazina (10mg/kg, i.p. e volume de 0,12 mL para um rato de 250g), para permitir sua contenção manual. Após, foi feita a eutanásia certificada mediante decapitação em guilhotina manual, em ambiente isolado (– Lei 11915/2003 Diretrizes do CONCEA 05/2013 e Diretrizes da Prática da Eutanásia CONCEA 2013). GRAU DE SEVERIDADE: sem recuperação. Após a eutanásia, retiramos a aorta, que foi utilizada para o estudo.

4.4 Desenhos experimentais e grupos experimentais

Para o primeiro protocolo do estudo, n amostral de 11 animais, fizemos um desenho experimental para mensurar a ação do T3 frente à reatividade vascular do vaso íntegro. Dessa forma, após a retirada das aortas, com cuidado para não

ocorrerem danos ao vaso, e após preparo dos tecidos, que se encontra no item 4.5 desse capítulo, dividimos da seguinte forma:

- Controle: anéis aórticos que não foram incubados com T3;
- T3 – anéis aórticos incubados com T3 (nas concentrações 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M e 10^{-4} M).

Utilizamos para contração do anel aórtico, fenilefrina na concentração 10^{-6} M. Para verificar a presença do endotélio, utilizamos acetilcolina na concentração 10^{-5} M.

Adicionamos a fenilefrina 10^{-6} M, aguardamos 6 minutos para contração máxima. Posteriormente, fizemos a curva com as doses de T3 acima citadas, fazendo as leituras a cada 3 minutos, totalizando 33 minutos ao final do experimento. Logo após, verificamos a presença de endotélio adicionando acetilcolina 10^{-5} M, e aguardamos 3 minutos para observar o vasorrelaxamento.

Finalizando esse protocolo, pré-incubamos o anel aórtico com T3 na maior concentração (10^{-4} M) por 3 minutos, e posteriormente administramos fenilefrina (10^{-6} M), para verificarmos se a contração induzida por fenilefrina na presença do hormônio sofria alguma alteração. N amostral utilizado foi de 17 animais.

Uma observação importante a ser feita é que nas cubas, durante todo o experimento, além das drogas e hormônio presentes, havia 10 mL de tampão tyrode, que mantinha o pH da solução. Esse tampão foi trocado quando alteramos as drogas, sendo que nos grupos controle, onde não foi utilizado T3, adicionamos e retiramos 1 mL de tampão, para que todas as cubas, conseqüentemente todos os anéis aórticos, passassem pelo mesmo processo.

Para o segundo protocolo do estudo, foi utilizado um n amostral de 6 animais, fizemos o desenho experimental visando analisarmos a influência da via do NO na vasodilatação desenvolvida pelo T3. Nesse protocolo, fizemos uso do L-NAME, um bloqueador da via do NO. Desse modo, dividimos em grupos da seguinte forma:

- Controle – anéis aórticos incubado com L-NAME (na concentração 10^{-5} M) por 20 minutos, sem incubação com T3;

- T3 – anéis aórticos incubados com L-NAME (na concentração 10^{-5}) por 20 minutos, com incubação com T3 (na concentração 10^{-4} M).

Utilizamos para contração do anel aórtico, fenilefrina na concentração 10^{-6} M. Para verificar a presença do endotélio, utilizamos acetilcolina na concentração 10^{-5} M.

Após contração máxima do vaso induzida por fenilefrina (10^{-6} M), foi adicionado L-NAME (10^{-5} M). Após 20 minutos de incubação com L-NAME, adicionamos T3 (10^{-4} M). Fizemos as leituras no ponto dos 5 minutos e no ponto de 8 minutos e 30 segundos após a adição de T3. Os anéis aórticos utilizados ao final desse protocolo, também foram pré-incubados com T3 10^{-4} M, e posteriormente contraídos com fenilefrina 10^{-6} M, sendo os resultados lidos após 3 minutos.

Para o terceiro protocolo do estudo, foi utilizado um n amostral de 13 animais, fizemos o desenho experimental afim de verificar o papel do endotélio na presença de T3. Sendo assim, fizemos a retirada do endotélio dos anéis aórticos. Portanto, dividimos em grupos da seguinte forma:

- Controle – anéis aórticos sem endotélio, não incubados com T3;
- T3 – anéis aórticos sem endotélio, incubados com T3 (nas concentrações 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M e 10^{-4} M).

Utilizamos para contração do anel aórtico, fenilefrina na concentração 10^{-6} M. Para verificar a presença do endotélio, utilizamos acetilcolina na concentração 10^{-5} M.

Adicionamos a fenilefrina 10^{-6} M, aguardamos 6 minutos para contração máxima. Logo após, verificamos a ausência de endotélio adicionando acetilcolina 10^{-5} M, e aguardamos 6 minutos para observar se não havia relaxamento. Posteriormente, fizemos a curva com as doses de T3 acima citadas, fazendo a leitura a cada 3 minutos, totalizando 33 minutos ao final do experimento.

Finalizando esse protocolo, pré-incubamos o anel aórtico com T3 na maior concentração (10^{-4} M), e posteriormente administramos fenilefrina (10^{-6} M), para verificarmos se a contração induzida por fenilefrina já na presença do hormônio sofria alguma alteração. Fizemos a leitura desses resultados após 3 minutos.

Uma observação importante a ser feita é que nas cubas, durante todo o experimento, além das drogas e hormônio utilizados, continha 10 mL de tampão tyrode, que mantinha o pH da solução. Esse tampão foi trocado quando alteramos as drogas, sendo que nos grupos controle, onde não foi utilizado T3, adicionamos e retiramos 1 mL de tampão, para que todas as cubas, conseqüentemente todos os anéis aórticos, passassem pelo mesmo processo.

O quarto protocolo desse estudo foi dedicado à análise bioquímica do estresse oxidativo. Com um n amostral de 11 animais, para tal, fizemos a indução de estresse, como descrita no item 4.8, os grupos experimentais estão dispostos da seguinte forma:

- Controle com estresse – 5 homogeneizados de aorta com indução de estresse oxidativo e sem presença de T3;
- Controle sem estresse – 5 homogeneizados de aorta sem indução de estresse oxidativo e sem presença de T3;
- T3 com estresse – 6 homogeneizados de aorta com indução de estresse oxidativo e com presença de T3 (10^{-4} M);
- T3 sem estresse – 6 homogeneizados de aorta sem indução de estresse oxidativo e com presença de T3 (10^{-4} M).

Utilizamos para esse protocolo, o T3 mais concentrado (10^{-4} M) para as amostras do grupo T3.

4.5 Preparação do Tecido para Reatividade Vascular

Após eutanásia, as aortas foram rapidamente isoladas e mantidas em solução tampão de Ringer-Henseleit, composta por: NaCl 115 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KCl 4,6 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄·7H₂O 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glicose 11,1 mM, Na₂EDTA 3 mM, na temperatura de 37°, borbulhando continuamente com uma mistura de 95% de O₂ a 5% de CO₂ (pH 7,4). Os tecidos adiposo e conjuntivo foram removidos cuidadosamente. Em seguida, as aortas foram cortadas em segmentos de anel com um comprimento de 4-5 mm. O endotélio, do grupo sem endotélio, foi removido mecanicamente esfregando suavemente a superfície interna do anel usando fio de

aço inoxidável. Cada aorta gerou dois anéis, um que foi utilizado para o grupo controle e outro que foi utilizado no grupo amostra.

4.6 Reatividade Vascular

Os vasos permaneceram no banho que continha 10 mL de uma solução tampão de Ringer-Henseleit, composta por: NaCl 115 mM, CaCl₂ 2,5 mM, KCl 4,6 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄·7H₂O 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, glicose 11,1 mM, Na₂EDTA 3 mM, na temperatura de 37°, borbulhando continuamente com uma mistura de 95% de O₂ a 5% de CO₂ (pH 7,4). A artéria ficou submetida a uma tensão de 1,0 gf, que foi ajustada a cada 15 minutos. Para o grupo sem endotélio, a verificação da ausência de endotélio, se deu através da administração de 10⁻⁵ M de acetilcolina e constatação da ausência de relaxamento. Foram realizadas curvas de dose-resposta para descrever a resposta do vaso mediante ausência/presença de T3 (triiodotironina) em concentrações (10⁻⁸ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M e 10⁻⁴ M) ao longo do tempo (LIU et al. 2014). Essas curvas foram obtidas após incubação por 20 min com o inibidor da enzima óxido nítrico sintase, denominado de éster metil-N-nitro L-arginina (L-NAME) (na concentração de 10⁻⁵ M), para avaliar o papel do óxido nítrico. Esse método foi descrito detalhadamente em outros estudos (LLÉVENES et al. 2018; NIELSEN et al. 1971).

4.7 Preparação da T3

No primeiro dia do experimento preparamos T3 da seguinte forma: 6,5 mg T3 diluído em 1 mL de NaOH, adicionamos à diluição 50 µL de HCl puro e completamos com mais 9 mL de tampão tyrode (essa solução ao final se encontrava na 10⁻⁴ M). Contudo, vimos que, a maior concentração no experimento de T3 seria 10⁻⁵ M (já que na cuba ele fica mais diluído pela presença do tampão) e que esse preparo não mantinha o pH.

Assim sendo, ajustamos o preparo de T3 para ficar mais concentrado da seguinte forma: 6,5 mg T3 diluído em 100 µL de NaOH, adicionamos à diluição 9 mL e 900 µL de tampão tyrode (essa solução ao final se encontrava, fora da cuba, na concentração de 10⁻³ M, permanecendo na cuba como dose mais concentrada 10⁻⁴ M).

4.8 Preparação de Tecido para Análise Redox *in vitro*

Para preparar os tecidos para as análises bioquímicas, iniciamos pesando as aortas para sabermos quantos mL de tampão deveriam ser preparados. Após, preparamos 6 mL de tampão nas seguintes proporções: 600 µL RIPA LYSIS 10X em 5,340 mL de água destilada mais a adição de 60 µL de PMSF (esse último reagente é colocado na proporção de 1% do volume final preparado).

Cada aorta foi colocada em um ependorff, adicionado o volume de tampão individual de cada amostra e picotada com tesoura. Posteriormente, fizemos a homogeneização por 40 minutos (o ependorff sobre o gelo), utilizando do homogeneizador Ultra-Turrax (OMNI Tissue Homogenizer, OMNI International, EUA). Após, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 8000 xg, 4°C.

O homogeneizado produzido foi congelado, e posteriormente, utilizado para as análises descritas a seguir.

4.9 Indução de Estresse

Do homogeneizado preparado com as aortas, 125 µL foi adicionado à 125 µL de T3 na concentração de 10^{-4} M (no caso de amostras), e 125 µL de água deionizada (no caso de controles). Após foi deixado 15 minutos em banho maria, 37°C.

Dividimos os homogeneizados conforme desenho experimental descrito no item 4.4 desse trabalho. Nos grupos com estresse, foi pipetado 2,5 µL de FeCl₂ (preparação: 5,5 mg de FeCl₂ em 10 mL de água deionizada - 0,02 mM), 2,5 µL de H₂O₂ (preparação: 5,6 µL de H₂O₂ em 1 mL de água deionizada – 50 mM), 25 µL de ácido ascórbico (preparação: 8,81 mg em 5 mL de água deionizada – 1 Mm). Nos grupos sem estresse, foi pipetado 30 µL de água deionizada. Após isso, novamente foi colocado em banho maria 37°C e, aguardado 30 minutos.

Posteriormente, esses preparados foram congelados, para serem utilizados nas análises bioquímicas descritas a seguir.

4.10 Atividade de NADPH Oxidase

A atividade enzimática foi determinada, por técnica espectrofotométrica, monitorando o consumo de NADPH em 340 nm. Aos 12,5 μ L de homogenizado foi adicionado 462,5 μ L de tampão fosfato 100 mM pH 7,4 e adicionado 25 μ L de NADPH 1 mg/mL, observando-se o consumo de NADPH por um intervalo de 20 minutos na presença das amostras. Os resultados foram expressos em nmol NADPH/mg de proteína por minuto (WEY et al. 2006).

4.11 EROS Total

A quantificação total de espécies reativas foi baseada na medição de fluorescência produzida pela oxidação de DCFH-DA (diacetato de 2,3-diclorofluoresceína) por espécies reativas presentes na amostra. Uma curva padrão com concentrações conhecidas de DCF foi usada (LEBEL et al. 1992). A fluorescência foi medida usando excitação (480 nm) e emissão (535 nm) como comprimentos de onda (LS 55 Fluorescence Spectrometer, Perkin Elmer, MA, EUA). Resultados foram expressos como pmol de DCF/mg de proteína.

4.12 Oxidação Lipídica

A oxidação lipídica foi avaliada pela produção de quimioluminescência (QL) iniciada pela adição de hidróxido de terc-butila (TBOOH), conforme indicada por Llesuy et al. 1990. A QL foi medida em um espectrômetro de cintilação (LKB Wallac Rack Beta Liquid Scintillation Spectrometer 1215, Australia) operando como luminômetro e com sensor de emissão fototubos na faixa de 380-620 nm. Os resultados foram expressos como contagens por segundo (cps)/mg de proteína.

4.13 Atividades de Enzimas Antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pelo método de auto-oxidação do composto pirogalol a 420 nm (MARKLUND et al. 1974), e os resultados foram expressos em unidade de SOD/mg de proteína. A atividade da catalase foi analisada pelo consumo de peróxido de hidrogênio a 240 nm (AEBI, 1984), e os valores foram expressos em nmol/min/mg de proteína.

4.14 Sulfidrilas (SH)

Para o ensaio da quantificação de sulfidrilas totais da amostra, foi utilizado DTNB 10 mM adicionados a 15 μ L de homogeneizados de aorta, previamente preparados, incubados por 30 minutos em ambiente no escuro. A absorbância (formação de TNB) foi medida espectrofotometricamente a 412 nm (Anthos Zenyth 200 RT, Biochrom, Reino Unido), e os resultados foram expressos como nmol TNB/mg de proteína.

4.15 Análise Estatística

As médias e desvios-padrão foram calculados para cada uma das medidas realizadas e para cada um dos grupos estudados. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para se avaliar a distribuição paramétrica dos dados. Para dados com distribuição normal, as comparações foram feitas através de ANOVA fatorial, complementado com o pós-teste de Tukey. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para comparação de dados não paramétricos, complementado com o pós-teste de Dunn. Para a análise com incubação prévia do T3 nos grupos com e sem endotélio utilizamos o teste t não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística mostrou $P < 0,05$. O software GraphPad InStat 6.01 para Windows foi utilizado como ferramenta de análise.

7. CONCLUSÃO

A análise do T3 frente ao estresse oxidativo, foi desenvolvida uma vez que este interfere na vasodilação e vasoconstrição, modificando a perfusão de células e tecidos do corpo.

Diante dos resultados obtidos nos protocolos experimentais aplicados neste estudo, sugerimos que os efeitos dos hormônios da tireoide, em doses elevadas, estão associados a uma ação vasodilatadora *in vitro*, independente de presença de endotélio, sendo, contudo, necessários mais estudos para elucidar as vias de sinalização que poderiam mediar esses efeitos. Também concluímos que T3 possui capacidade de reduzir a contratilidade vascular quando estimulado com fenilefrina.

Em relação às análises bioquímicas, os dados sugerem que o T3 apresenta relevante ação antioxidante, visto que diminui a atividade de NADPH oxidase em grupos onde foi utilizado. Ademais observamos o aumento da atividade da SOD nos grupos T3, ratificando sua ação protetora.

Deixamos claro que há a necessidade de aprofundarmos esse protocolo experimental, a fim de dissecarmos as principais vias intracelulares de sinalização que o T3 possa usar no mecanismo de vasodilatação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBI, Hugo Catalase in vitro. **Oxygen Radicals in Biological Systems, Methods of Enzymatic Analysis**. 1984.
- AIRES, Margarida M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- AKHIGBE, Roland E. et al. **Oxidative Stress and Cardiometabolic Disorders**. *Biomed Res Int*. 2021.
- BARBOSA, Kiriague et al. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. *Rev. Nutri. Campinas*, v. 23, 2010.
- BAST, A.; HAENEN, GRMM.; DOELMAN, CJA. **Oxidants and antioxidants: State of the art**. *Am J Med*, v. 91, 1991.
- BIANCHI, Maria de L. P.; ANTUNES, Lusânia M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta**. *Rev. Nutr., Campinas*, v. 12, n. 2, 1999.
- CAI, Yin et al. **Thyroid hormone affects both endothelial and vascular smooth muscle cells in rat arteries**. *European Journal of Pharmacology*, v. 747, 2015.
- CARRILLO-SEPÚLVEDA, Maria Alícia et al. **Emerging role of angiotensin type 2 receptor (AT2R)/Akt/NO pathway in vascular smooth muscle cell in the hyperthyroidism**. *PloS one*, v. 8, n. 4, 2013.
- CARRILLO-SEPÚLVEDA, Maria Alícia et al. **Triiodothyronine Reduces Vascular Dysfunction Associated with Hypertension by Attenuating Protein Kinase G/Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Signaling**. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 371, n. 1, 2019.
- CASTRO, Alexandre Luz de. et al. **Thyroid hormones decrease the proinflammatory TLR4/NF- κ B pathway and improve functional parameters of the left ventricle of infarcted rats**. *Molecular and Cellular Endocrinology*. v. 461, 2018.
- DAIBER, Andreas, et al. **Vascular and Cardiac Oxidative Stress and Inflammation as Targets for Cardioprotection**. *Curr Pharm Des*, v. 27, n. 18, 2021.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** Rev. Ass. Med. Brasil, v. 43, n. 1, 1997.

FERREIRA, Cláudia de S. et al. **O Sistema Nadph Oxidase De Neutrófilos E A Formação De Ages (Produtos Finais De Glicação Avançada) Em Ratos Diabéticos.** Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações, 2011. Acesso em fev/2022, < <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/423>>.

FERREIRA, Nathanne S., et al. **NLRP3 inflammasome and mineralocorticoid receptors are associated with vascular dysfunction in type 2 diabetes mellitus.** *Cells*, v. 8, n. 12, 2019.

FORINI, Francesca et al. **Low T3 State is Correlated with Cardiac Mitochondrial Impairments after Ischemia Reperfusion Injury: Evidence from a Proteomic Approach.** *International Journal of Molecular Science*. v. 16, 2015.

FORINI, Francesca et al. **Protective Effects of Euthyroidism Restoration on Mitochondria Function and Quality Control in Cardiac Pathophysiology.** *International Journal of Molecular Science*. 2019.

FORMAN, Henry J.; ZHANG, Hongqiao. **Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy.** *Nat Rev Drug Discov*, v. 20, n. 9, 2021.

FRASCARELLI, Sabina et al. **Cardioprotective Effect of 3-Iodothyronamine in Perfused Rat Heart Subjected to Ischemia and Reperfusion.** *Cardiovasc Drugs Ther*. v. 25, 2011.

GEIST, Daniela et al. **Noncanonical Thyroid Hormone Receptor α Action Mediates Arterial Vasodilation,** *Endocrinology*, v. 162, n. 7, 2021.

GOES, Grazielle R. et al. **O papel das espécies reativas de oxigênio na infecção por Trypanosoma cruzi.** Repositório Institucional da UFMG, 2015. Acesso em fev/2022, < <http://hdl.handle.net/1843/BUBD-AA5HC6>>.

GOLDIM, José Roberto. **Pesquisa em saúde: leis, normas e diretrizes**. Porto Alegre: HCPA, v. 77, 1997.

GONÇALVES, Alexandre et al. **Influência dos Hormônios Tireoidianos sobre o Sistema Cardiovascular, Sistema Muscular e a Tolerância ao Esforço: uma breve revisão**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 87, 2006 .

GOTTSCHELL, Carlos Antonio Mascia. **Dinâmica Cardiovascular: do miócito à maratona**. IC-FUC, São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

GOULART-SILVA, F et al. **Triiodothyronine (T3) induces proinsulin gene expression by activating PI3K: possible roles for GSK-3 β and the transcriptional factor PDX-1**. Exp Clin Endocrinol Diabetes, v. 121, n. 1 2013.

GUSTAFSSON, Asa B. et al. **Heart mitochondria: Gates of life and death**. Cardiovasc. Res., v. 77, 2008.

GUYTON & HALL **Tratado de Fisiologia Médica**. 12^a Edição, Elsevier, 2015.

HALLIWELL, Barry et al. **Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?**. British Journal of Pharmacology. v. 142, 2004.

HEDAYATI, M. et al. **Vitamin E improved redox homeostasis in heart and aorta of hypothyroid rats**. Endocrine Regulations, v. 51, n. 4, 2017.

HIROI, Yukio et al. **Rapid nongenomic actions of thyroid hormone**. Proc Natl Acad Sci U S A. v. 19, 2006.

HU, D. H., et al. **Thyroid hormone exacerbates vasoconstriction in insulin resistance: The role of ONOO⁻** European Journal of Pharmacology, v. 730, 2014.

KONIOR, Anna et al. **NADPH oxidases in vascular pathology**. Antioxid Redox Signal, v. 20, n. 17, 2014.

KOCHMAN, Joanna et al. **The Influence of Oxidative Stress on Thyroid Diseases**. Antioxidants, v. 10, n. 9, 2021

LIU, Kiao Ling et al. **Vascular Function of the Mesenteric Artery Isolated from Thyroid Hormone Receptor-E Knockout Mice**. Journal of vascular research, v. 51, n. 5, 2014.

LIU, Wei et al. **Oxidative stress-elicited YY1 potentiates antioxidative response via enhancement of NRF2-driven transcriptional activity: A potential neuronal defensive mechanism against ischemia/reperfusion cerebral injury**. Biomedicine & Pharmacotherapy. v. 108, 2018.

LEBEL C.P. et al. **Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress**. Chem Res Toxicol, v. 5 p. 227-231, 1992.

LLESUY S.F. et al. **Myocardial damage induced by doxorubicins: hydroperoxide-initiated chemiluminescence and morphology**. Free Radic Biol Med, v. 8, p. 259-64, 1990.

LLÉVENES, Pablo et al. **Thyroid hormones affect nitrergic innervation function in rat mesenteric artery: Role of the PI3K/AKT pathway**. Vascular Pharmacology, 2018.

LOPEZ, Ruth M. et al. **Comparative study of acute in vitro and short-term in vivo triiodothyronine treatments on the contractile activity of isolated rat thoracic aortas**. The Korean Journal of Physiology & Pharmacology, v. 24, n. 4, 2020.

LOZANO-CUENCA, J et al. **Pharmacological study of the mechanisms involved in the vasodilator effect produced by the acute application of triiodothyronine to rat aortic rings**. Brazillian Journal of Medical and Biological Research, v. 49, n. 8, 2016.

MARIEB, E. N.; HOEHN, K. **Anatomia E Fisiologia**. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

MARKLUND, Stefan et al. **Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase**. European Journal of Biochemistry. 47 (469-474) 1974.

MOELLER, L. C. et al. **Stanniocalcin 1 induction by thyroid hormone depends on thyroid hormone receptor β and phosphatidylinositol 3-kinase activation.** Experimental and clinical endocrinology & diabetes, v. 119, n. 02, p. 81-85, 2011.

NAKABEPPU, Yusaku **Molecular Pathophysiology of Insulin Depletion, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease Brain.** Adv. Exp. Med. Biol. 2019.

NANDA, Nivedita et al. **Association between oxidative stress and coronary lipid risk factors in hypothyroid women is independent of body mass index.** Metabolism. v. 56, n. 10, 2007.

NEVES, Josynaria A; OLIVEIRA, Rita de Cássia M. **Biomarcadores de função endotelial em doenças cardiovasculares: hipertensão.** J Vasc Bras. 15(3):224-233, 2016.

NIELSEN, Kai C. et al **Contractile Response and Amine Receptor Mechanisms in Isolated Middle Cerebral Artery of the Cat.** Brain Research. 1971.

NING, Wen-Hu; ZHAO, Kan. **Propionyl-L-carnitine induces eNOS activation and nitric oxide synthesis in endothelial cells via PI3 and Akt kinases.** Vascul Pharmacol, v. 59, n. 3-4, 2013

NUNES, Maria Tereza. **Hormônios Tiroideanos: Mecanismo de Ação e Importância Biológica.** Arq Bras Endocrinol Metab, v. 47, n. 6, 2003

OJAMAA, Kaie et al. **Acute Effects of Thyroid Hormone on Vascular Smooth Muscle.** Thyroid, 1996.

ORTIZ, Vanessa D. et al. **Avaliação dos Efeitos da Co-administração dos Hormônios da Tireoide e do Carvedilol sobre o Coração de Ratos Wistar Submetidos ao Infarto Agudo do Miocárdio.** LUME UFRGS, 2018. Acesso em feve/2022, <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/175141>>.

ORTIZ, Vanessa D. et al. **Influência do Infarto Agudo do Miocárdio e do Tratamento com Hormônios da Tireoide Sobre a Vasculatura Periférica.** LUME UFRGS, 2015. Acesso em fev/2022, <<http://hdl.handle.net/10183/183759>>.

PARK, Kyung et al. **The Direct Vasomotor Effect of Thyroid Hormones on Rat Skeletal Muscle Resistance Arteries.** Anesth. Analg., v. 85, 1997.

PEREZ, Marta et al. **Oxygen radical disease in the newborn, revisited: Oxidative stress and disease in the newborn period.** Free Radical Biology and Medicine. 2019.

QADDUMI, Walled N.; JOSE, Pedro A. **The Role of the Renal Dopaminergic System and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hypertension.** Biomedicine, v. 9, n. 139, 2021.

RADI, Rafael **Oxigen Radicals, Nitric Oxide, and Peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine.** PNAS, v. 115, n. 23, 2018

RUBIN, Emanuel (Ed). Rubin: **Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SAMUEL, Sherin et al. **Triiodothyronine Potentiates Vasorelaxation via PKG/VASP Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells.** Cellular Physiology and Biochemistry, v. 41, n. 05, 2017.

SANTI, Adriana et al. **Association between thyroid hormones, lipids and oxidative stress biomarkers in overt hypothyroidism.** Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, v. 48, n. 11, 2010.

SILVA, Alana Rodrigues da, et al. **Medicina resumida: Sistema Endócrino e Reprodutor.** Editora Sanar, Salvador: 2018.

SILVERTHORN, D. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada,** 7ª Edição, Artmed, 2017.

SZANTO, Ildiko et al. **H₂O₂ Metabolism in Normal Thyroid Cells and in Thyroid Tumorigenesis: Focus on NADPH Oxidases.** Antioxidants, v. 8, n. 5, 2019.

TEIXEIRA, Bruno Costa et al. **Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares**. *Jornal Vascular Brasileiro* [online], v. 13, n. 02, 2014 .

TEIXEIRA, Rayane B. et al. **Papel das Espécies Reativas de Oxigênio sobre os Níveis de Citocinas Inflamatórias e Proteínas Apoptóticas no Hipertireoidismo Experimental**. LUME UFRGS, 2015. Acesso em fev/2022, <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/115697/000965267.pdf;sequence=1>>.

TORUN, Ayse N. et al. **Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in overt and subclinical hypothyroidism**. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 70, n. 3, 2009.

WEY, Yongzhong et al. **Angiotensin II-induced NADPH oxidase activation impairs insulin signaling in skeletal muscle cells**, *J. Biol. Chem.*, n. 281, 2006.

YU, Liming et al. **Berberine Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Reducing Oxidative Stress and Inflammation Response: Role of Silent Information Regulator 1**. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

ZHANG, Rongrong et al. **Nrf2—a Promising Therapeutic Target for Defending Against Oxidative Stress in Stroke**. *Mol. Neurobiol.*, 2016.

ZHANG, Yixuan et al. **NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets**. *Nat Rev Cardiol*, v. 17, n. 3, 2020.